



**HAL**  
open science

# Effets des glucides alimentaires sur le microbiote intestinal et le métabolisme de la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime 100% végétal.

Raphaël Defaix

## ► To cite this version:

Raphaël Defaix. Effets des glucides alimentaires sur le microbiote intestinal et le métabolisme de la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime 100% végétal.. Médecine humaine et pathologie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2023. Français. NNT : 2023PAUU3055 . tel-04662797

**HAL Id: tel-04662797**

**<https://theses.hal.science/tel-04662797v1>**

Submitted on 26 Jul 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**

Ecole Doctorale Sciences Exactes et leurs Applications - ED211

Manuscrit de thèse par

**Raphaël Defaix**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

Spécialité : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

**Effets des glucides alimentaires sur le microbiote intestinal et le métabolisme  
de la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime 100% végétal.**

Thèse soutenue le 15 novembre 2023 devant le jury composé de :

RAPPORTEURS

**Annabelle Meynadier** Professeure, École Nationale Vétérinaire de Toulouse (INRAE-GenPhySE)

**Aires Oliva-teles** Professeur, Université de Porto (Portugal)

EXAMINATEURS

**Sergio Polakof** Directeur de recherche, Université Clermont Auvergne (INRAE)

**Rémy Guyoneaud** Professeur, UPPA (CNRS-IPREM)

DIRECTEURS DE THÈSE

**Karine Ricaud** Maître de conférences, UPPA (INRAE-NuMÉA)

**Stéphane Panserat** Directeur de recherche (INRAE-NuMÉA)







## Résumé

L'augmentation de la demande en protéines animales, liée à l'augmentation de la population mondiale, requiert un développement important de l'aquaculture dans les prochaines décennies, afin de couvrir les besoins grandissant en poissons, considérés comme **la meilleure source de protéines animales** au vu de ses qualités nutritionnelles. Dans ce contexte, les farines et huiles de poisson, composants principaux des aliments aquacoles, ont progressivement été remplacés, en particulier, par des **ingrédients d'origine végétale**. Cependant, le remplacement total de farines et huiles de poisson n'est pas encore possible sans diminuer les performances de croissance et la survie des truites, à cause des déséquilibres en acides aminés et en micronutriments, et de la présence de facteurs antinutritionnels. L'incorporation d'une quantité importante de **glucides digestibles** pourrait réduire les protéines végétales dans l'alimentation des poissons et pourrait être une solution intéressante afin d'optimiser l'aliment sans farines et huiles de poisson.

L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier, pour la première fois, l'incorporation de glucides digestibles (à hauteur de 20%) dans un régime 100% végétal, modifiant ainsi le ratio glucides/protéines chez la truite arc-en-ciel. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé trois expérimentations afin de tester l'effet du ratio glucides/protéines sur le **microbiote intestinal**, le **métabolisme** de la truite à long terme (après 12 semaines de nutrition) ou à court terme (3 semaines de nutrition), ainsi que la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), molécules clés du dialogue moléculaire microbiote-hôte. De plus, l'effet cumulé de la supplémentation en inuline (prébiotique), et de variations du ratio glucides /protéines a également permis d'évaluer les effets de l'utilisation des glucides sur les **paramètres immunitaires**.

Le ratio élevé glucides/protéines a eu un effet important sur l'alpha et la beta diversité et sur l'abondance de différentes **bactéries lactiques**, mais aussi sur celle du genre *Bacillus*, à court et à long terme, dans le microbiote associé aux contenus digestifs. Le microbiote associé au mucus a été, lui, moins affecté par ce ratio. Le **changement dans la diversité microbienne** pourrait expliquer les différences observées dans la production des acides gras à chaîne courte, qui peuvent jouer un rôle important sur le métabolisme de l'hôte. Au niveau du métabolisme, l'introduction des glucides n'a pas diminué les performances de croissance des truites, et n'a pas été associée à un dysfonctionnement de **l'homéostasie glucidique** et du métabolisme intermédiaire. Une diminution de certains marqueurs inflammatoires a aussi été observée avec le fort ratio glucides/protéines. En revanche, l'incorporation du prébiotique inuline n'a pas eu d'effets positifs sur l'utilisation des glucides.

En conclusion, l'incorporation de glucides digestibles dans un aliment 100% végétal semble être une **voie prometteuse** pour optimiser l'utilisation des nouveaux aliments aquacoles, sans ressources marines, chez la truite arc-en-ciel.



## Abstract

The growing demand for animal proteins due to the increase in the world's population means that aquaculture will have to develop significantly over the next few decades to cover these needs, as fish are considered **the best source of animal proteins**, given its nutritional qualities. In this context, fishmeal and fish oil, the main components of feed initially used in aquaculture, have gradually been replaced by plant products, more sustainable. However, total replacement is not yet possible without degrading fish performance (growth and survival) due to imbalances in amino acids, micronutrients and the presence of anti-nutritional factors. The incorporation of a significant amount of **digestible carbohydrates** could reduce the amount of vegetable protein in the fish diet and could be an interesting solution for optimizing the feed without fishmeal and oil.

The aim of this thesis was to study, for the first time, the incorporation of digestible carbohydrates (up to 20%) in a 100% plant-based diet, thus modifying the CHO/Proteins ratio in rainbow trout. During this thesis, we carried out 3 experiments to test the effect of the CHO/Proteins ratio on the **intestinal microbiota**, the trout **metabolism** in the long term (after 12 weeks of feeding) or in the short term (3 weeks of feeding), and the production of short-chain fatty acids (SCFAs), key molecules in the microbiota-host molecular dialogue. In addition, the cumulative effect of inulin supplementation and variations in CHO/Proteins ratio was studied to evaluate the effects on carbohydrates utilization and **immune parameters**.

The high carbohydrate/protein ratio had a significant effect on alpha and beta diversity and on the abundance of various **lactic acid bacteria**, as well as *Bacillus*, in both short-term, and long-term experiments, in the microbiota associated with digesta, while the microbiota associated with mucus was less affected. The **change in microbial diversity** could be linked to the differences observed in AGCC production which may play an important role in host metabolism. In terms of metabolism, the introduction of carbohydrates did not impair trout growth performance, and was not associated with dysfunctional **carbohydrate homeostasis** and intermediate metabolism. A decrease in several inflammatory markers was also observed with the high CHO/Protein ratio. In contrast, incorporation of the prebiotic inulin had no positive effect on carbohydrate utilization.

In conclusion, the incorporation of digestible carbohydrates in a 100% plant diet seems to be a **promising way** to optimize the use of new aquaculture feeds (without marine resources) in rainbow trout.





## Remerciements

Je remercie tout particulièrement les membres de mon jury de thèse, Annabelle Meynadier et Aires Oliva-Teles comme rapporteurs, Sergio Polakof et Rémy Guyoneaud comme examinateurs, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens bien évidemment à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Karine et Stéphane. Je vous remercie de m'avoir fait confiance dès le début, je vous remercie de m'avoir fait grandir scientifiquement, de m'avoir permis de « faire monter la montgolfière », et d'avoir fait de moi, je l'espère, un bon jeune chercheur. Ce fut un réel plaisir de réaliser cette thèse à vos côtés ces trois années, tant sur le plan professionnel que personnel. Vous êtes d'excellents directeurs de thèse, et de formidables scientifiques.

Je remercie le conseil départemental des Landes (CD40) pour le financement de ma thèse, qui, par son implication, permet de faire avancer la recherche scientifique dans ce magnifique département.

Merci Charlotte, de m'avoir si bien accueilli sur le site de l'IUT de Mont de Marsan et de m'avoir transmis ta passion de *Rstudio*. Merci pour ta patience, tes explications, ça a été un plaisir de travailler à tes côtés pendant mes 2 premières années de thèse.

Merci Lokesh, pour ton aide particulièrement précieuse pendant toute ma thèse. J'ai énormément appris grâce à toi sur l'analyse du microbiote. Tu es un post-doctorant exceptionnel, et une magnifique personne.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Lucie Marandel, Martin Beaumont, et Sergio Polakof, pour leurs excellents conseils qui m'ont permis d'avancer au mieux dans ma thèse.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont accepté de collaborer avec moi, ou qui m'ont apporté une aide scientifique essentielle. Notamment, Mylène Ghislain, Mickaël Le Behec, et Thierry Pigot du laboratoire IPREM de l'UPPA, pour leurs analyses des métabolites bactériens en SIFT-MS. Mais aussi Sabrina Lacomme du Bordeaux Imaging Center (BIC), pour m'avoir formé à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission. Je remercie également Géraldine Pascal et toute l'équipe du Genotoul de Toulouse, pour nous permettre d'utiliser la plateforme de bio-informatique FROGS. Je tiens à remercier Erwan Guichoux de la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux pour ces séquençages 16S, toujours réalisés en un temps record, mais aussi Jessica Calo et José Luis Soengas de l'Université de Vigo (Espagne).

Je remercie toutes les personnes de l'IUT de Mont de Marsan, du département Génie Biologique, que j'ai adoré croiser tous les jours, et qui font de cet IUT un endroit tellement plaisant ! Je remercie bien sûr Marianne Houssier, Karine Gontier, Sandra Biasutti, Marine Etchegoyhen, Mikaël Rey, Laurie Labastie, Stéphane Davail, Delphine Pedurthe-Lauga, Justine Aragones, Sabine Destouesse, Emmanuelle Lespine, et Pierre Bertrand. Vous êtes une formidable équipe.



Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire NuMÉA de Saint-Pée-sur-Nivelle. Dans un premier temps je voudrais remercier les magnifiques doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer, et avec qui j'ai énormément rigolé. Vous avez été un soutien indéfectible, merci Marius Bidon, Laura Frohn, Simon Schnebert, Élodie Baranek, et Soizig Le Garrec. Je remercie les personnes avec qui j'ai pu manipuler, Vincent Véron, Anne Surget, Alexandre Herman, et Michaël Marchand. Je remercie chaleureusement Jérôme Roy pour tes innombrables et amicaux conseils. Je remercie également Sandrine Skiba-Cassy, Akintha Ganot, et Geneviève Corraze.

De plus, je souhaite saluer le professionnalisme et la grande qualité du personnel de la pisciculture de Donzacq (mais aussi celle de Lées-Athas). Merci Frédéric Terrier, Franck Sandres, et Anthony Lanuque d'avoir veillé quotidiennement aux truites arc-en-ciel utilisées lors de mes différentes expérimentations.

Je tiens à remercier ma famille tout entière que j'aime profondément, mon papi, Yves Delbos, pour son aide précieuse, et ma mère, Bérengère Delbos, de qui je tiens toute ma force et sans qui je n'aurais jamais réussi à faire cette thèse. Je remercie aussi mon père Vincent Defaix, et mon petit frère Gaspard Defaix.

Je remercie aussi mes amis qui m'accompagnent et auxquels je tiens énormément Thomas Blin, Chloé Niveau, et Alexandre Gasnier.

Pour finir, je tiens à remercier chaque personne qui, aujourd'hui ou plus tard, souhaitera prendre le temps pour lire ces lignes, écrites avec passion.

*Faites-en bon usage.*



## Table des matières

Résumé.....	1
Abstract .....	3
Liste des publications & communications.....	17
Liste des abréviations.....	19
Liste des figures.....	23
Liste des tableaux.....	35
<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>37</b>
Préambule .....	39
1.1. Aquaculture.....	43
1.1.1. Aquaculture mondiale.....	43
1.1.1.1. De l'antiquité à nos jours .....	43
1.1.1.2. État des lieux de l'aquaculture mondiale, européenne et française .....	45
1.1.1.3. Intérêt du poisson pour l'alimentation humaine .....	47
1.1.2. Évolution des aliments aquacoles .....	51
1.1.2.1. Limites à l'incorporation des farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles .	53
1.1.2.2. Recherche des alternatives à l'incorporation des farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles.....	55
1.1.2.2.1. Réduction des farines et huiles de poisson dans l'aliment aquacole : vers leur suppression totale ? .....	55
1.1.2.2.2. Remplacement des farines et huiles de poisson par des produits d'origine végétale..	55
1.1.2.2.3. Limites à l'utilisation des ingrédients végétaux .....	59
1.1.2.2.4. Les sous-produits et autres ingrédients pour l'aliment aquacole.....	63
1.2. Utilisation métabolique des glucides alimentaires chez les salmonidés .....	65
1.2.1. L'aliment « naturel » de la truite-arc-en-ciel : riche en protéines et en lipides, sans glucides digestibles.....	65
1.2.2. Le métabolisme glucidique de la truite arc-en-ciel : sa régulation par les glucides alimentaires .....	67
1.2.2.1. Apport des glucides alimentaires pour la nutrition de la truite d'élevage .....	67



1.2.2.2. Enzymes impliquées dans l'hydrolyse des glucides digestibles .....	71
1.2.2.3. Transport intestinal du glucose.....	73
1.2.2.4. Glycémie post-prandiale après ingestion de glucides.....	75
1.2.2.5. Régulation de l'homéostasie glucidique : rôle des différents tissus.....	77
1.2.2.6. Devenir du glucose alimentaire dans le foie : La glycolyse .....	79
1.2.2.7. Synthèse endogène de glucose dans le foie : la néoglucogénèse.....	83
1.2.2.8. Lorsque le glucose alimentaire est en excès : première étape, la synthèse de glycogène .....	85
1.2.2.9. Lorsque le glucose alimentaire est en excès : deuxième étape, bioconversion du glucose en lipides (lipogénèse).....	87
1.2.2.10. Jusqu'à 20% de glucides digestibles, une épargne protéique efficace chez la truite ....	89
1.2.2.11. Vue générale des mécanismes de régulation du métabolisme du glucose et de la lipogénèse hépatique par l'ingestion de glucides alimentaires .....	91
1.3. Le microbiote intestinal des salmonidés .....	95
1.3.1 Diversité du microbiote intestinal des salmonidés .....	99
1.3.2. Implantation du microbiote intestinal chez les salmonidés.....	103
1.3.3. Répartition sélective des microorganismes dans les différents compartiments du tractus digestif de la truite arc-en-ciel .....	105
1.3.4. Facteurs biotiques et abiotiques influençant la diversité du microbiote .....	111
1.3.4.1. Facteur abiotique : Effet de l'alimentation sur le microbiote .....	111
1.3.4.2. Différents facteurs influençant le microbiote intestinal des salmonidés .....	115
1.3.5. Le rôle clé des métabolites bactériens dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte .....	119
1.3.6. Fonctionnalités du microbiote intestinal .....	125
1.3.6.1. Dégradation des nutriments .....	125
1.3.6.2. Stimulation du système immunitaire et effet barrière chez les salmonidés .....	129
1.3.7. Mode d'action des probiotiques et des prébiotiques chez les salmonidés .....	133
1.4. Objectifs généraux de la thèse .....	139
1.4.1. Problématique générale.....	141
1.4.2. Objectifs de la thèse .....	141





<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b> .....	<b>145</b>
2.1. Éthique .....	147
2.2. Aliments en formulation .....	147
2.2.1. Formulation et production des régimes alimentaires expérimentaux 100% végétaux. ...	147
2.3. Matériel biologique .....	149
2.3.1. Elevage des truites et mesures zootechniques .....	149
2.3.2. Échantillonnages .....	149
2.4. Protocoles analytiques .....	151
2.4.1. Analyse de la composition des régimes expérimentaux et de la composition corporelle	151
2.4.2. Quantification des métabolites plasmatiques et hépatiques .....	151
2.4.3. Analyse de la composition du microbiote intestinal .....	151
2.4.4. Microscopie électronique à transmission .....	157
2.4.5. Analyses de la production de certains métabolites bactériens (acides gras à chaîne courte)	
.....	159
2.4.6. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel .....	161
2.4.7. Activités enzymatiques.....	165
2.4.8. Mesures de marqueurs inflammatoires plasmatiques .....	167
2.4.9. Analyses statistiques .....	171
2.4.10. Disponibilité des données de séquençage .....	171
<b>Chapitre 3 : Résultats</b> .....	<b>173</b>
3.1. Résumé du premier article .....	177
3.2. Données additionnelles article 1 .....	199
3.3. Résumé du deuxième article .....	209
3.4. Données additionnelles article 2 .....	265
3.5. Résumé du troisième article .....	269



<b>Chapitre 4 : Discussion générale</b> .....	<b>299</b>
4.1. Discussion.....	301
4.1.1. Incorporation prometteuse de glucides digestibles dans un aliment sans farines et huiles de poisson chez un poisson carnivore : pas de modification des performances de croissance et absence de problèmes métaboliques .....	303
4.1.2. Incorporation de glucides digestibles dans un aliment sans farines et huiles de poisson chez un poisson carnivore : effet sur la diversité du microbiote intestinal .....	309
4.1.3. Les acides gras à chaîne courte et autres métabolites bactériens, des molécules clés dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte ? .....	321
4.1.4. La supplémentation du prébiotique inuline dans un régime 100% végétal - bien que prometteuse dans des études antérieures - n'a pas eu les effets attendus chez la truite nourrie avec un ratio glucides/protéines élevé.....	329
4.2. Perspectives.....	333
4.3. Conclusion.....	343
Bibliographie .....	345
Annexes .....	385
Liste des annexes.....	387



## Liste des publications & communications

### Articles scientifiques

#### 1<sup>er</sup> auteur

**Defaix R**, Lokesh J, Ghislain M, Le Behec M, Marchand M, Véron V, Surget A, Biasutti S, Terrier F, Pigot T; Panserat S, Ricaud K. 2023. High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet. Accepté, dans *Aquaculture*. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740049>

**Defaix R**, Lokesh J, Frohn L, Le Behec M, Pigot T, Véron V, Surget A, Biasutti S, Terrier F, Skiba-Cassy S, Roy J, Panserat S, Ricaud K. 2023. Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant-based diet. Accepté, dans *Journal of animal Science and Biotechnology*. DOI:10.1186/S40104-023-00951-Z .

**Defaix R**, Lokesh J, Surget A, Terrier F, Panserat S, Ricaud K. 2023. Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet. *Prêt pour soumission*.

### Collaboration

Lokesh J, Delaygues M, **Defaix R**, Le Behec M, Pigot T, Dupont-Nivet M, Kerneis T, Labbé L, Goardon L, Terrier F, Panserat S, Ricaud K. 2022. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *British Journal of Nutrition*. DOI: 10.1017/S0007114523000120

### Communication scientifique

**R. Defaix**, J. Lokesh, M. Ghislain, M. Marchand, V. Véron, A. Surget, S. Biasutti, M. Le Behec, F. Terrier, T. Pigot, S. Panserat, K. Ricaud. 2022. Incorporation of carbohydrates in a 100% plant-based diet has a strong effect on the gut microbiota and metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Symposium of Fish Nutrition and Feeding (ISFNF – 2022) Communication orale.



## Liste des abréviations

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**EPA** : acide eicosapentaénoïque

**DHA** : acide docosahexaénoïque

**USD** : United States dollar

**COVID-19** : COronaVirus Disease 2019

**$\omega$  3, 6** : omega-3, 6

**ATP** : Adénosine triphosphate

**EC** : Enzyme Commission numbers

**n** : nombre

**FM** : Farine de poisson

**FO** : Huile de poisson

**FIFO** : Fish in / Fish out

**SGLT** : cotransporteurs glucose sodium dépendant

**GLUT** : transporteur de glucose

**hk** : hexokinase

**PFK-1** : 6-phosphofructo-1-kinase

**PK** : pyruvate kinase

**PEPCK** : phosphoenolpyruvate carboxykinase

**GK** : Glucokinase

**K<sub>m</sub>** : constante de Michaelis

**ARN<sub>m</sub>** : Acide ribonucléique messenger

**FAS** : acide gras synthase

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**ACLY** : ATP citrate lyase

**ACC** : Acétyl-CoA carboxylase

**CHO** : carbohydrate

**PRE** : Protein efficiency ratio

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PIP2** : phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate

**PIP3** : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

**PDK1** : pyruvate dehydrogenase kinase 1

**AKT** : protéine kinase B

**mTORC1** : mammalian target of rapamycin complex 1

**Ko** : knockout

**SREBP-1** : Sterol regulatory element-binding protein 1

**ChREBP** : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein

**sp.** : espèce

**Sf** : Microvillosités simples

**Cf** : Microvillosités complexes

**AGCC** : acides gras à chaîne courte

**SCFA** : Short-chain fatty acid

**FFAR** : free fatty acid receptors

**CAZymes** : Carbohydrate Active Enzymes

**GH** : glycosides hydrolases

**PL** : polysaccharides lyases

**ZO-1** : Zonula Occludens-1

**IL-** : Interleukine

**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor

**PAMPS** : Motif moléculaire associé aux pathogènes

**FOS** : Fructo-oligosaccharide

**GOS** : Galacto-oligosaccharide

**MOS** : mannan-oligosaccharides

**ACH50** : Alternative complement pathway

**NO** : Nitric oxide

**Expé.** : expérimentation

**MS** : matière sèche

**UE** : Union Européenne

**ARNr 16S** : ARN ribosomique 16S

**V (3, 4)** : Variable (3, 4)

**ADN** : acide désoxyribonucléique





**PCR (q)** : Polymerase Chain Reaction  
(quantitative)

**FROGS** : Find, Rapidly, OTUs with Galaxy  
Solution

**OTU** : Operational taxonomic unit

**SIFT-MS** : spectrométrie de masse par flux  
d'ions sélectionnés

**ADNc** : ADN complémentaire

**Ef1 $\alpha$**  : Elongation factor 1 alpha

**Ct** : Cycle Threshold

**DTT** : Dithiothréitol

**TMB** : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

**OD** : densité optique

**SD** : standard déviation

**P value** : probability value

**SRA** : Sequence Read Archive

**NCBI** : National Center for Biotechnology  
Information

**DOI** : Digital Object Identifier

**HS** : high-starch

**LS** : low-starch

**ANOVA** : Analysis of Variance

**PERMANOVA** : Permutational analysis of  
variance

**In** : Inuline

**PLSDA** : Partial least squares-discriminant  
analysis

**ARN-seq** : séquençage aléatoire du  
transcriptome

**ISFNF** : International Symposium on Fish  
Nutrition and Feeding

**JED** : Journées de l'école doctorale



## Liste des figures

**Figure 1** : Bas-relief de la tombe de Mastaba (Aktihetep) daté de 2500 avant JC, montrant la pêche de tilapias du Nil – Page 42.

**Figure 2** : Bas-relief d'une tombe thébaine daté de 2000 avant JC, pêche de tilapias dans un bassin aménagé (Chimits, 1957) – Page 42.

**Figure 3** : Production de poissons de capture ou d'aquaculture, depuis les années 1950 jusqu'à aujourd'hui en million de tonnes. Source : FAO 2022 – Page 44.

**Figure 4** : Tendances de l'état du stock mondial de poissons dans les océans, de 1974 à 2019. (FAO, 2022) – Page 44.

**Figure 5** : Quantification des émissions de gaz à effet de serre en fonction de 22 sources alimentaires. Modifié de (Tilman and Clark, 2014) – Page 46.

**Figure 6** : Proportion de protéines et matières grasses pour 100g de diverses sources alimentaires (Tacon and Metian, 2013) – Page 48.

**Figure 7** : Estimation et évolution des prix des farines et huiles de poisson de 1995 à 2025 (Kok et al., 2020) – Page 52.

**Figure 8** : Évolution de la composition des aliments donnés aux saumons de Norvège, de 1990 à 2013. (Ytrestøyl et al., 2015a) – Page 52.

**Figure 9** : Comparaisons du prix des farines de poisson avec le prix des farines de soja en dollars par tonne, depuis 30 ans (de 1993 à aujourd'hui). Graphique créé à partir du site (<https://www.indexmundi.com/commodities/>) – Page 58.

**Figure 10** : Les voies du catabolisme oxydatif des protéines, des glucides et des lipides, permettant, entre autres, la libération d'énergie sous forme d'ATP (Jalabert and Fostier, 2010) – Page 64.

**Figure 11** : Structure de l'amylose et de l'amylopectine : molécules composant l'amidon (Paul and Bengal, 2016) – Page 68.

**Figure 12** : Activités enzymatiques au sein de différentes sections du tube digestif du saumon (Krogdahl et al., 1999). Les activités enzymatiques de la maltase, sucrase, trehalase et lactase sont exprimées en mmol de substrat hydrolysé par minute et mg de protéine de l'homogénat. Ces activités enzymatiques sont mesurées dans l'estomac (ST), les caeca pyloriques (PR), première moitié du *midgut* (MI1), deuxième moitié du *midgut* (MI2) et *hindgut* (DI) – Page 70.

**Figure 13** : Concentration de D-Glucose au sein des vésicules de la bordure en brosse au niveau des caeca pyloriques, de l'intestin proximal, et de l'intestin distal, chez la truite arc-en-ciel, 6h (gris), et 36h (blanc) après le dernier repas. L'aliment à base de farine de poisson (**FM**) est remplacé à **75%** ou **100%** par des farines végétales (Santigosa et al., 2011) – Page 72.



**Figure 14** : Taux de glucose plasmatique, mesuré chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides (gris), avec de forts taux (28,4%) de glucides (noir), ou après une réalimentation et 4 jours de remise à jeun. (Marandel et al., 2015) – Page 74.

**Figure 15** : Hypothèses majeures expliquant l'apparition de l'hyperglycémie post-prandiale chez la truite arc-en-ciel nourrie avec des glucides (cf (Kamalam et al., 2017)) – Page 78.

**Figure 16** : Étapes clés des voies de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Les enzymes clés de la voie de la glycolyse sont : hexokinase (HK), 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), et pyruvate kinase (PK). Les enzymes clés de la néoglucogenèse sont phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-biphosphatase (FBPase), et glucose-6-phosphatase (G6Pase) (Enes et al., 2009). Ces enzymes clés catalysent des réactions irréversibles et sont ainsi les enzymes les plus contrôlées par l'apport en glucides alimentaires – Page 78.

**Figure 17** : Expression des gènes ohnologues codant pour la glucokinase (*gcka* et *gckb*) ainsi que l'activité enzymatique de la glucokiase mesurée chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides (gris) ou avec de forts taux (28,4%) de glucides (noir), ou après une réalimentation et 4 jours de remise à jeun. (Marandel et al., 2015) – Page 80.

**Figure 18** : Expression relative des gènes ohnologues codant pour la glucose-6-phosphatase mesurés chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides – Page 82.

**Figure 19** : Vue générale du métabolisme lipidique présentant les acteurs impliqués dans la lipogenèse (Jeong et al., 2011) – Page 86.

**Figure 20** : Courbes de croissance pour trois groupes de saumons nourris avec trois ratios glucides/protéines différents, pendant 12 semaines. (Villasante et al., 2022) – Page 88.

**Figure 21** : Représentation schématique des voies de signalisation insuline-dépendant dans le foie, permettant la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. (Titchenell et al., 2017) – Page 90.

**Figure 22** : Régulation transcriptionnelle de la glycolyse hépatique par deux facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP. (Han et al., 2016) – Page 92.

**Figure 23** : Représentation schématique du tractus gastrointestinal ainsi que des organes associés chez la truite arc-en-ciel. (Olsson, 2011) – Page 104.

**Figure 24** : Présentation des différentes sections du tractus digestif chez la truite arc-en-ciel – Page 104.

**Figure 25** : Coupe intestinale d'un segment de l'intestin proximal (« midgut ») d'un saumon d'Atlantique, issu de (Bjørngen et al., 2020) et (Lkka et al., 2013), modifié. Sf : Microvillosités simples (« simple folds»), cf : Microvillosités complexes (« complex folds ») – Page 106.

**Figure 26** : L'abondance relative des différentes communautés microbiennes au niveau taxonomique de l'ordre, au sein de différents compartiments du tube digestif (Caeca Pylorique, *Midgut*, *Hindgut*), chez le bar commun nourri avec différents régimes alimentaires. (Kokou et al., 2019) – Page 108.



**Figure 27** : Composition du microbiote de l'intestin distal au niveau du phylum dans la lumière intestinale (Intestinal Digesta) et dans le mucus (Intestinal mucosa) chez le saumon (*Salmo salar*) nourri avec différentes sources nutritives. (Gajardo et al., 2017) – Page 108.

**Figure 28** : Abondances relatives des phyla identifiés dans les contenus digestifs du microbiote intestinal de la truite arc-en-ciel, après 49 jours de nutrition avec un régime composé majoritairement d'ingrédients végétaux (Plant), de farines et huiles de poisson (Marine), avec utilisation d'un probiotique (Pro). (Ingerslev et al., 2014) – Page 112.

**Figure 29** : Représentation de l'abondance relative des 15 genres bactériens les plus abondants après 49 jours de nutrition avec un régime composé majoritairement d'ingrédients végétaux (Plant), de farines et huiles de poisson (Marine), avec utilisation d'un probiotique (Pro). (Ingerslev et al., 2014) – Page 112.

**Figure 30** : Abondance relative des phyla bactériens les plus abondants dans les contenus digestifs de truites arc-en-ciel, nourries avec : T0, régime commercial à base de farines et huiles de poisson ; Tv, régime 100% végétal ; F1, régime végétal avec 11 % remplacés par (5,5 %) des protéines de levures (YEA) et (5,5 %) de protéines de larves d'insectes (INS) ; F2, régime végétal avec 16,5 % remplacé par 5,5 % YEA, 5,5 % de INS et 5,5 % de protéines animales transformées. (Pérez-Pascual et al., 2021) – Page 114.

**Figure 31** : Facteurs influençant la diversité du microbiote intestinal des poissons (Talwar et al., 2018) – Page 114.

**Figure 32** : Effet des antibiotiques sur le microbiote cutané (A) et intestinal (B) de la gambusie (*Gambusia affinis*). Abondance relative des genres dominants au cours de la semaine d'exposition aux antibiotiques. À 5,5 h (T0) est représentée la moyenne de quatre poissons avant l'exposition. Les points d'exposition sont à 50,5, 63,5, 88,5, 115,5, 136,6 et 161,5 heures (Carlson et al., 2017) – Page 116.

**Figure 33** : Représentation du modèle classique de cross-feeding : description des premiers et seconds dégradeurs ainsi que les molécules impliquées dans le dialogue microbiote-microbiote ou microbiote-hôte dialogue (Daisley et al., 2021) – Page 118.

**Figure 34** : Représentation schématique de la dégradation des glucides digestibles et non-digestibles par l'hôte et son microbiote intestinal. \* : Effets décrits chez l'homme (Kimura et al., 2019) – Page 118.

**Figure 35** : Concentration intestinale en acides gras à chaîne courte, chez les poissons marins et d'eau douce, par rapport au temps de transit des contenus digestifs dans les intestins. Les poissons décrits sont : (1) *Oreochromis mossambicus*, (2) *O. niloticus*, (3) *Dorosoma cepedianum*, (4) *Campostoma anomalum*, (5) *C. oligolepis*, (6) *C. pauciradii*, (7) *Ctenopharyngodon idella*, (8) *Cyprinus carpio*, (9) *Nocomis micropogon*, (10) *Girella tricuspidata*, (11) *Hermosilla azurea*, (12) *Kyphosus sydneyanus*, (13) *Odax pullus*, (14) *Chlorurus microrhinos*, (15) *Hypostomus pyrineusi*, (16) *Panaque nocturnus*, (17) *P. cf. nigrolineatus*, (18) *Pterygoplichthys disjunctivus*, (19) *Cebidichthys violaceus* (Clements et al., 2014) – Page 120.

**Figure 36** : Schéma simplifié de la stratégie de fermentation en présence d'oxygène (A), de la fermentation lactique (B), et de la fermentation alcoolique (C). (Wolfe, 2015) – Page 120.





**Figure 37** : Implication des différentes vitamines et acides gras à chaîne courte produits par le microbiote dans les différentes voies du métabolisme énergétique chez l'homme. (LeBlanc et al., 2017) – Page 122.

**Figure 38** : Représentation des bactéries présentant la plus grande diversité et la plus grande quantité de gènes codant pour des CAzymes (glycosides hydrolases (GH), et les polysaccharides lyases (PL), en fonction des différents phyla (a). Représentation schématique de la répartition des GH et PL au sein des différents groupes taxonomiques bactériens (b). (Kaoutari et al., 2013) – Page 124.

**Figure 39** : Changement de la morphologie de la *lamina propria* en réponse à l'utilisation d'un régime végétal contenant des facteurs antinutritionnels chez le saumon : à l'état normal (a), après 5 jours de nutrition avec le régime végétal (b), et après 7 jours de nutrition (c). (Sahlmann et al., 2013) – Page 128.

**Figure 40** : Représentation schématique du système de jonctions serrées entre cellules épithéliales. (Chasiotis et al., 2012) – Page 128.

**Figure 41** : Représentation schématique de l'effet immunostimulant de la production de butyrate par le microbiote intestinal au niveau local et systémique chez les salmonidés. Réalisée à partir de (Mirghaed et al., 2019; Song et al., 2014) – Page 130.

**Figure 42** : Majeures contributions des bactéries lactiques au sein du microbiote intestinal. Représentation produite à partir de (Helander et al., 1997; LeBlanc et al., 2017; Oliphant and Allen-Vercoe, 2019; Pessione, 2012; Reddy et al., 2008) – Page 130.

**Figure 43** : Effets directs et indirects des probiotiques sur l'effet barrière et la stimulation du système immunitaire chez l'hôte. (Sassone-Corsi and Raffatellu, 2015) – Page 132.

**Figure 44** : Effet de l'alimentation croisée des bactéries (« *cross-feeding* ») sur la conversion en butyrate du lactate ou des produits de dégradation des prébiotiques (Chez l'homme). (Scott et al., 2013) – Page 134.

**Figure 45** : Effet de l'utilisation du prébiotique inuline chez le tilapia en supplémentation d'un régime fort en glucides (HC), sur le pourcentage de survie, l'expression de gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires (*tgf- $\beta$* , *il-10*), l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (*srebp*, *acly*, *acca*), ainsi que les taux de glucoses sanguins, la production d'insuline, et le taux de glycogène (Wang et al., 2021). Pour les taux de glucoses sanguins et le taux d'insuline : ligne noire, poissons nourris avec régimes contrôles (35% d'amidon) ; ligne grise, poissons nourris avec régime fort en glucides (45 % d'amidon) ; ligne rouge, poissons nourris avec 45 % d'amidon et 5 g/kg d'inuline – Page 136.

**Figure 46** : Pisciculture de Donzacq, photographies des bacs contenant les truites arc-en-ciel utilisées pendant les expérimentations animales – Page 148.

**Figure 47** : Calculs réalisés pour l'évaluation des paramètres zootechniques lors des différentes expérimentations animales – Page 148.

**Figure 48** : Structure secondaire de l'ARNr 16S ribosomal d'*Escherichia coli* (Yarza et al., 2014) – Page 152.



**Figure 49** : Vue globale du protocole *Illumina* pour l'amplification, les deux PCR, et le séquençage des régions variables V3 et V4 de l'ARNr 16S – Page 152.

**Figure 50** : Visualisation d'un rapport de pré-process produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expérimentation.), permettant d'évaluer la quantité de séquences exploitables et l'élimination selon les critères choisis – Page 154.

**Figure 51** : Visualisation de la quantité d'OTU et de la quantité de séquences gardées ne faisant pas partie de la base de données de contaminants « PhiX », rapport produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expé.) – Page 154.

**Figure 52** : Visualisation des courbes de raréfaction atteignant un plateau, rapport produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expé.) – Page 154.

**Figure 53** : Microscope électronique à transmission de type Hitachi utilisé lors de la 1<sup>ère</sup> expérimentation au Centre d'imagerie de Bordeaux - Université de Bordeaux – Page 156.

**Figure 54** : Spectromètre de masse de type SIFT-MS utilisé dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire IPREM de l'Université de Pau et des pays de l'Adour, dans le but de mesurer la quantité de métabolites bactériens – Page 158.

**Figure 55** : Indices d'alpha diversité, pour les échantillons de contenus digestifs (digesta) prélevés 25 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ . Page 198.

**Figure 56** : Indices d'alpha diversité, pour les échantillons de mucus (mucosa) prélevés 25 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ . Page 198.

**Figure 57** : Bêta diversité (*Weighted unifrac*), pour les échantillons de contenus digestifs prélevés 25 heures après le dernier repas. Les différences de Bêta diversité sont estimées grâce au test PERMANOVA. Une différence est considérée significative si  $PERMANOVA < 0,05$ .  $n = 12$ . Page 200.

**Figure 58** : Bêta diversité (*Weighted unifrac*), pour les échantillons de mucus (mucosa) prélevés 25 heures après le dernier repas. Les différences de Bêta diversité sont estimées grâce au test PERMANOVA. Une différence est considérée significative si  $PERMANOVA < 0,05$ .  $n = 12$ . Page 200.

**Figure 59** : Abondances relatives des genres bactériens (*Bacillus*, *Peptoniphilus*, *Clostridium sensu stricto* 1) significativement différents dans les échantillons de mucus (mucosa) prélevés 6 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ . Page 202.

**Figure 60** : Comparaison des abondances relatives des genres *Mycoplasma* et *Ralstonia* entre les contenus digestifs et le mucus, pour les échantillons prélevés 6 heures après le dernier repas. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ . Page 202.



**Figure 61** : Photographies en microscopie électronique à transmission mettant en évidence les microvillosités des cellules intestinales – Page 204.

**Figure 62** : Résumés des objectifs et des analyses réalisées lors de la thèse – Page 300.

**Figure 63** : Schéma récapitulatif de l'effet de l'aliment riche en glucides, 100% végétal, dans le foie, les organes et les tissus périphériques – Page 302.

**Figure 64** : Focus sur le foie, centre du métabolisme intermédiaire - effets de l'aliment riche en glucides sur l'activité enzymatique de la glucokinase, de la pyruvate kinase, de la glucose-6-phosphatase, de l'acide gras synthase, et sur le stockage de glycogène – Page 302.

**Figure 65** : Microbiote conservé (*core microbiota*) chez la truite arc-en-ciel nourrie avec un aliment riche en glucides, 100% végétal. La flèche rouge montre une forme pouvant correspondre à une bactérie du genre *Mycoplasma*. Image prise par microscopie électronique à transmission (grossissement 0,5 µm) – Page 310.

**Figure 66** : Représentation de l'effet de l'utilisation de l'aliment riche en glucides, sur la composition du microbiote intestinal, au niveau des phyla, et au niveau des genres, de la truite arc-en-ciel dans les contenus digestifs. Données issues de la première expérimentation – Page 312.

**Figure 67** : Hypothèse quant à la prolifération des bactéries lactique en présence d'un aliment riche en glucides, 100% végétal. Utilisation métabolique du glucose comme source énergétique chez les bactéries lactiques – Page 314.

**Figure 68** : Comparaison de la modulation du microbiote intestinal au niveau des contenus digestifs, après 3 semaines, et 12 semaines de nutrition avec l'aliment riche en glucides, 100% végétal – Page 316.

**Figure 69** : Hypothèses liées à l'augmentation de la concentration en acides gras à chaîne courte chez les truites nourries avec l'aliment riche en glucides : effet potentiel sur l'énergie cellulaire, la stimulation du métabolisme de l'hôte, et la régulation de l'inflammation au niveau local et systémique – Page 322.



## Liste des tableaux

**Tableau 1** : *Fish-in/Fish-out ratio* pour différents produits aquacoles dans les années 2000, 2010, et 2015. (Jannathulla et al., 2019) – Page 54.

**Tableau 2** : Composition des farines de poisson et de différentes sources végétales (Gatlin et al., 2007) – Page 54.

**Tableau 3** : Composition en acides gras des huiles de poisson, huiles végétales, et graisses animales (Turchini et al., 2009) – Page 56.

**Tableau 4** : Facteurs antinutritionnels au sein des ingrédients végétaux ainsi que les traitements permettant d'éliminer ou de réduire leurs activités biologiques (Krogdahl et al., 2010) – Page 58.

**Tableau 5** : Proportion moyenne de glucides alimentaires issus de différents produits végétaux utilisés pour l'alimentation des poissons d'élevage (Kamalam et al., 2017) – Page 68.

**Tableau 6** : Activité de l'amylase à 37°C dans le foie, l'intestin, et la bile, chez différents poissons : herbivores, omnivores ou carnivores (Krogdahl et al., 2005) – Page 70.

**Tableau 7** : Niveau de glycogène (en  $\mu$ mole de glycosyl par gramme de poids net) dans différents organes de la truite arc-en-ciel, nourrie avec des granulés contenant 6% de glucides digestibles (fed), mise à jeun (fasted), puis renourrie (refed). (Soengas et al., 2006) – Page 84.

**Tableau 8** : Présentation des différentes bactéries reconnues chez les poissons pour leur capacité de synthèse de protéases, cellulases, amylases, phytases, et lipases. (Banerjee and Ray, 2017) – Page 126.

**Tableau 9** : Formulation des aliments donnés aux truites arc-en-ciel lors des trois expérimentations – Page 146.

**Tableau 10** : Expression relative de gènes d'intérêt dans les échantillons de muscles (blanc) de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes « high-starch » ou « low-starch », 6 heures après le dernier repas. (Données additionnelles article 1) – Page 206.

**Tableau 11** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de tissus adipeux de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes high-starch ou low-starch, 6 heures après le dernier repas. (Données additionnelles article 1) – Page 206.

**Tableau 12** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de muscles de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes LS-0, LS-In, HS-0, et HS-In, 6 heures après le dernier repas. (Données additionnelles article 2) – Page 264.

**Tableau 13** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de tissus adipeux de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes LS-0, LS-In, HS-0, et HS-In, 6 heures après le dernier repas. (Données additionnelles article 2) – Page 266.

**Tableau 14** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons d'intestin proximal (Midgut) et distal (Hindgut) de truites arc-en-ciel (Données additionnelles article 2) – Page 268.





# Chapitre 1 : Introduction générale

---



## Préambule

L'augmentation de la population mondiale nous oblige à revoir nos méthodes de production alimentaire. En effet, alors que le poisson est reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une excellente source de protéines animales en vertu de ses qualités nutritionnelles (FAO/WHO., 2023), des problèmes grandissants quant à sa production sont remarqués. Depuis les années 1970, la diminution de la quantité de poissons biologiquement reproductibles dans les océans, engendrée en partie par la surpêche, ne permet plus à la pêche de produire suffisamment de poissons pour la population mondiale (FAO, 2022). De plus, le secteur de l'aquaculture qui, depuis plusieurs décennies est en pleine expansion, est également impacté par ce problème car tous les poissons d'aquaculture du monde sont au moins en partie nourris avec des farines et huiles de poisson issues de la pêche minotière, dont le prix est en constante augmentation (de 500 €/tonne en 2000 à 1700 €/tonne de farine de poisson aujourd'hui) (Jannathulla et al., 2019). Par ailleurs, la production de ces ingrédients par la pêche minotière est éthiquement et écologiquement défavorable : ces produits sont souvent pêchés dans des océans lointains, et cette production est très délétère pour la biodiversité marine. Bien que les farines et huiles de poisson soient majoritairement remplacées par des sources protéiques alternatives, plus de 20 millions de tonnes de poissons sont encore pêchés chaque année dans les océans pour produire ces matières premières, chères, et néfastes pour l'environnement. Aujourd'hui, différentes alternatives plus durables sont à l'étude visant à terme à remplacer l'utilisation des farines et huiles de poisson en totalité (Boyd et al., 2020; Napier et al., 2020).

Une alternative est l'utilisation d'aliments composés à 100% d'ingrédients végétaux. Son intérêt s'explique par le faible coût de ses matières premières, aujourd'hui 600 €/tonne (pour les farines de soja), mais aussi à la forte disponibilité de ses ingrédients, son plus faible impact environnemental, et par ses nutriments qui couvrent les besoins nutritionnels des poissons d'élevage (Reverter et al., 2021). Toutefois, les différences dans la composition en acides aminés et en acides gras dans ces régimes 100% végétaux, mais aussi la présence de facteurs antinutritionnels diminuent les performances de croissance des poissons (Drew et al., 2007; Panserat et al., 2009a).

**L'objectif principal de ma thèse, visant à répondre à cette problématique, consiste à remplacer une partie de ces protéines végétales par des glucides digestibles, sans que cela n'affecte négativement les performances de croissance des poissons (Kamalam et al., 2017) dans un régime 100% végétal. Ce travail a été réalisé chez la truite arc-en-ciel, principal salmonidé produit en France.**



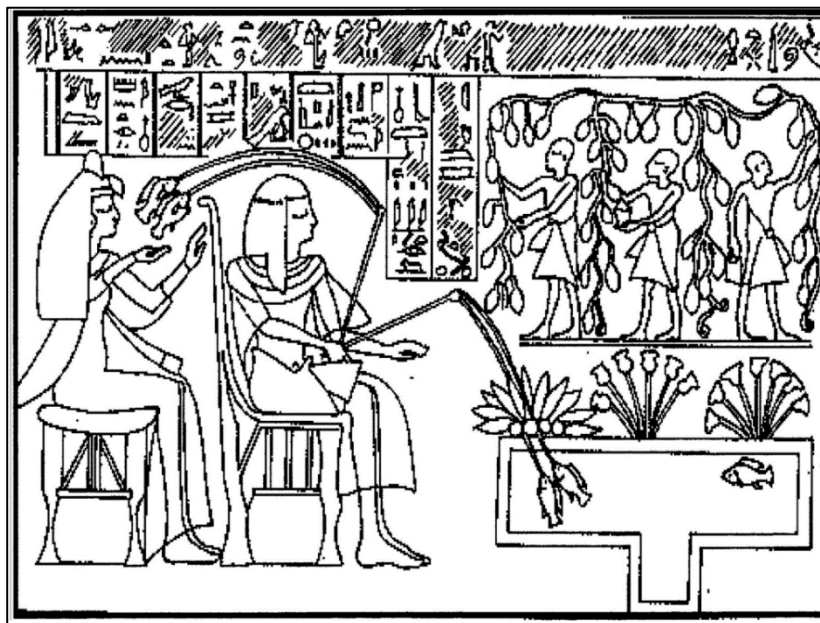
Cette stratégie nutritionnelle permettrait de diminuer le prix de l'aliment donné aux poissons, sans affecter les performances de croissance en réduisant notamment les facteurs antinutritionnels présents dans les protéines végétales. L'utilisation de glucides digestibles est intéressante car bien que la truite soit un faible consommateur de glucides, ceux-ci pourraient favoriser l'utilisation des protéines pour la croissance, et diminuer leur utilisation dans ses voies catalytiques pour la production d'énergie (« *sparing protein effect* » cf. partie 1.2.2.10.) (Polakof et al., 2012). Une étude approfondie de plusieurs acteurs moléculaires du métabolisme intermédiaire de la truite arc-en-ciel visera à mieux comprendre comment ce poisson s'adapte à l'utilisation de ces glucides dans un aliment 100% végétal. De plus, l'adaptation du microbiote intestinal à ces nouveaux nutriments pourrait permettre de favoriser la dégradation de ces sources glucidiques naturelles et d'améliorer la digestion de ces nutriments par le poisson (Gajardo et al., 2017). Par ailleurs, il est indispensable aujourd'hui, lors de nouvelles expérimentations nutritionnelles, de prendre en considération le bien-être animal, et donc de vérifier différents marqueurs inflammatoires. Un microbiote en « bonne santé » pourrait permettre une stimulation du système digestif, une meilleure robustesse de la truite et ainsi limiter l'impact négatif des facteurs antinutritionnels. Pour finir, dans un monde où la population mondiale est en pleine croissance et où les enjeux environnementaux n'ont jamais été aussi grands, il est dorénavant essentiel de changer nos modes de production et nos habitudes alimentaires, tout en adoptant une stratégie de production durable et éthique.

**Lors de cette thèse réalisée à l'UMR INRAE-UPPA « Nutrition Métabolisme Aquaculture », nous étudions pour la première fois chez la truite arc-en-ciel l'utilisation d'un aliment 100% végétal associé à un fort ratio glucides/protéines afin de proposer une solution durable et de diminuer les farines et huiles de poisson pour l'aliment aquacole.**

Ce manuscrit se compose d'une étude bibliographique présentant les travaux antérieurs à ceux de la thèse, toutes les thématiques étudiées au cours de ces trois années, ainsi que la problématique et les objectifs de thèse (**chapitre 1**). Une partie « matériels et méthodes » présentera ensuite les différents matériels biologiques et techniques utilisés lors des expérimentations (**chapitre 2**). Ensuite, les différents travaux réalisés lors de la thèse seront présentés sous la forme d'articles avec des résultats complémentaires (**chapitre 3**). La dernière partie de ce manuscrit consistera en une discussion générale permettant de conduire à une réflexion sur les résultats obtenus et sur les perspectives pour la poursuite de ce travail (**chapitre 4**).



**Figure 1 :** Bas-relief de la tombe de Mastaba (Aktihetep) daté de 2500 avant JC, montrant la pêche de tilapias du Nil.



**Figure 2 :** Bas-relief d'une tombe thébaine daté de 2000 avant JC, pêche de tilapias dans un bassin aménagé (Chimits, 1957).

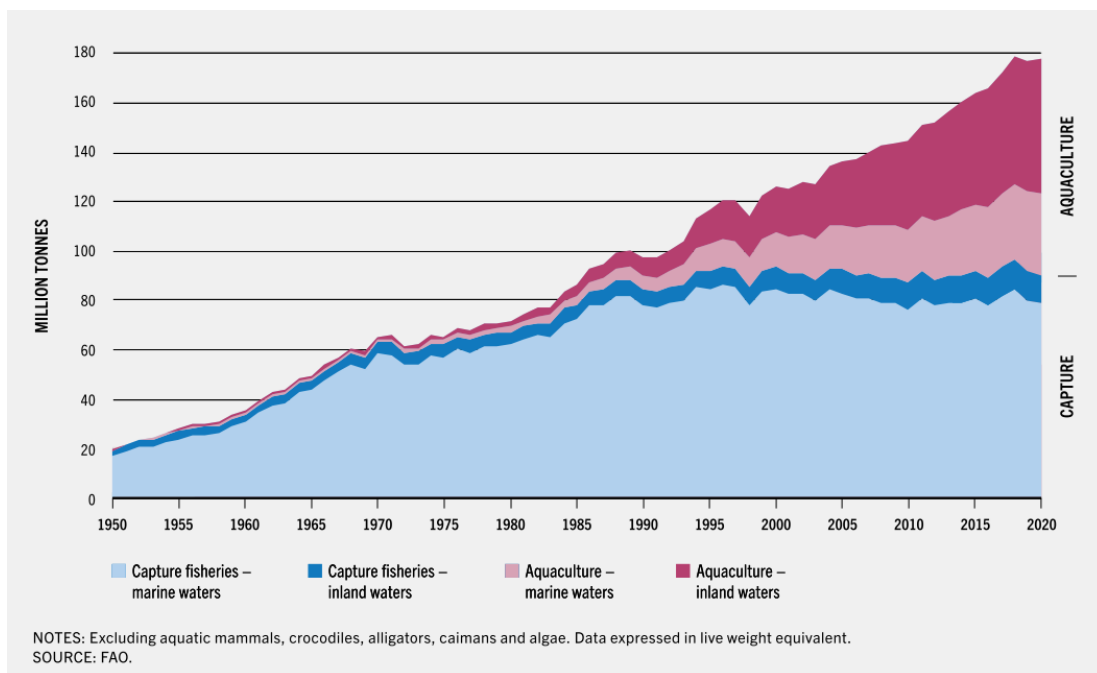
## 1.1. Aquaculture

### 1.1.1. Aquaculture mondiale

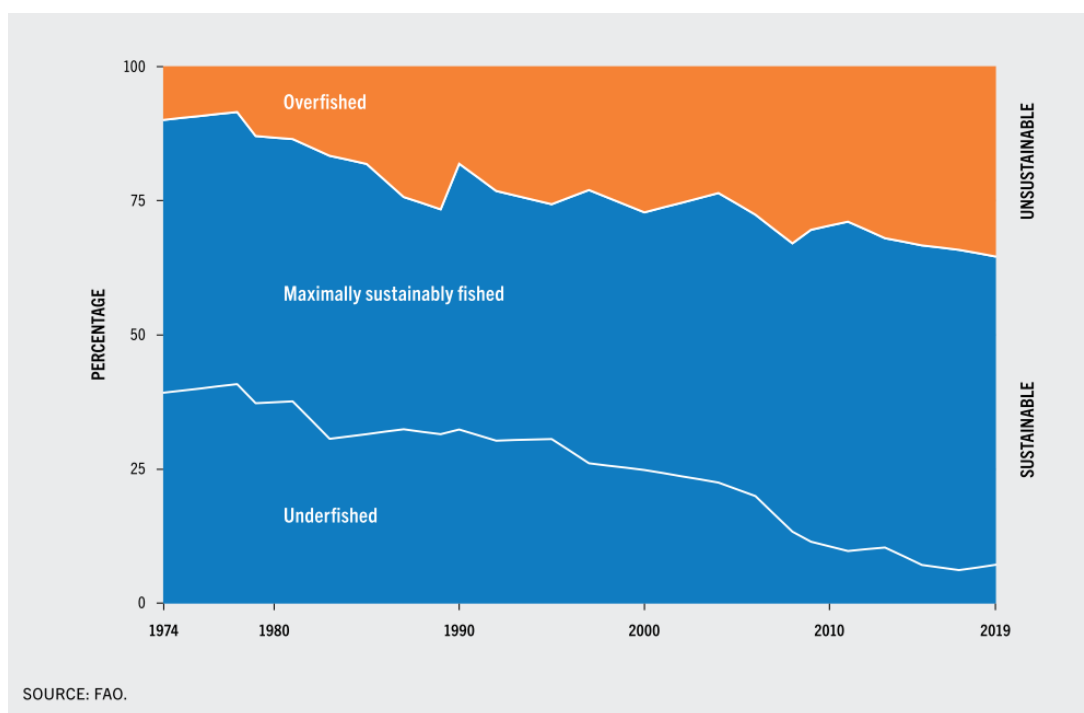
#### 1.1.1.1. De l'antiquité à nos jours

L'aquaculture désigne l'élevage par l'homme de poissons ou d'algues de manière très large. Il est alors compliqué de déterminer avec précision la naissance de l'aquaculture dans le monde. Cependant, alors que la pratique de la pêche semble avoir existé il y a plus de 40 000 ans (Hu et al., 2009), de nombreux auteurs s'accordent à dire que les premières fermes d'aquaculture auraient pu voir le jour entre -5000 et -3500 avant Jésus-Christ, sur le continent asiatique, probablement dans la Chine antique (Ling, 1977; Ruddle, K., and Zhong, 1988; Timmons and Ebeling, 2010). La culture de la carpe aurait initialement commencé simplement en gardant des carpes dans des pièges après les avoir pêchées, puis en leur donnant à manger jusqu'à ce que celles-ci atteignent une taille plus importante afin de pouvoir être finalement récoltées (Nash, 2011). Après des milliers d'années de développement de l'élevage de la carpe en Chine, curieusement, celui-ci a été menacé à partir de 618 avant Jésus-Christ, lors de l'avènement de la dynastie Lee. En effet, le mot « carpe » en chinois se prononçant également « Lee », il est alors devenu un sacrilège de tuer et de manger des carpes communes (Ling, 1977). Afin d'éviter la culture de la carpe commune, le développement de la polyculture est apparu, avec de nouvelles espèces : la carpe grasse (*Ctenopharyngodon Idella*), la carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpe à grosse tête (*Hypophthalmichthys nobilis*), et la carpe de vase (*Cirrhinus molitorella*). L'aquaculture se serait également développée dans l'Égypte ancienne entre -2357 et -1786 avant J-C. Selon certaines sources, les Égyptiens auraient pratiqué l'élevage du tilapia (*Oreochromis niloticus*), en lac artificiel (Chimits, 1957; Costa-Pierce, 2022). Par ailleurs, la diversité des poissons vivants dans le fleuve du Nil (**Figure 1**) aurait permis d'étendre la culture à de plus nombreuses espèces de poisson. Ainsi, des auteurs travaillant sur l'Égypte ancienne (Chimits, 1957; Costa-Pierce, 2022) ont reproduit un bas-relief datant de 2000 ans (**Figure 2**), qui était présent sur une tombe Thebaine. En Europe, les Romains auraient introduit la carpe à partir de l'Asie mineure (A. Maar et al., 1966), et auraient développé sa culture en Angleterre au premier siècle après J-C. La culture de la carpe se serait donc établie en Europe centrale dès le VII<sup>ème</sup> siècle (Beveridge and Little, 2002) puis se serait développée en Europe, au Moyen Age, au sein de monastères (Pillay and Kutty, 2005). La truite commune (*Salmo trutta*) aurait fait partie des premières espèces cultivées en Europe. Sa culture aurait commencé dès le XIV<sup>ème</sup> siècle. Dans le même temps, en Amérique du nord, c'est la culture de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui se serait développée.





**Figure 3 :** Production de poissons de capture ou d’aquaculture, depuis les années 1950 jusqu’à aujourd’hui en million de tonnes. Source : FAO 2022.

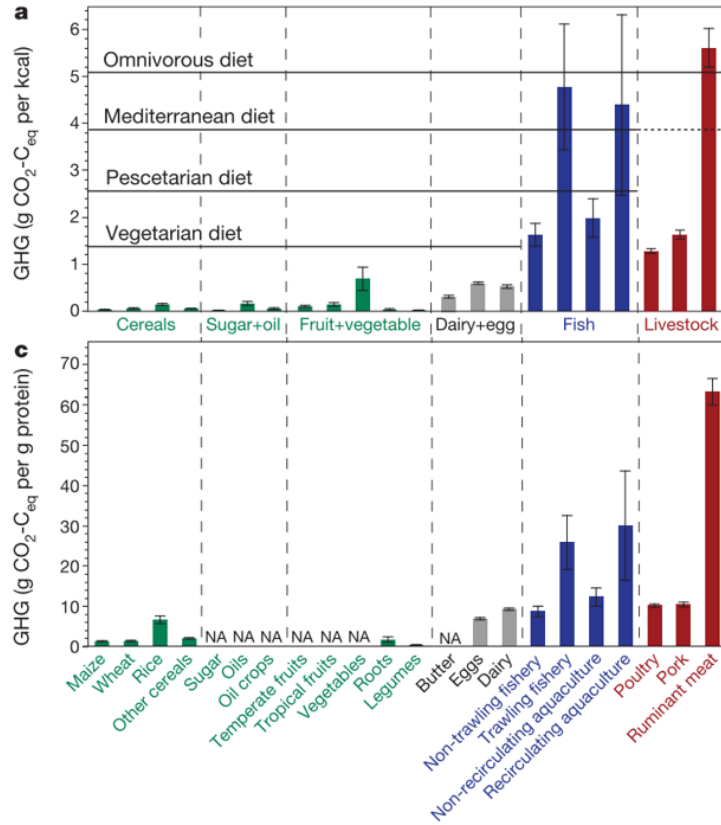


**Figure 4 :** Tendence de l’état du stock mondial de poissons dans les océans, de 1974 à 2019. (FAO, 2022).

C'est enfin à partir du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, que l'industrie de l'aquaculture explose dans le monde. Elle utilise aujourd'hui plus de 200 espèces de poissons différents et présente des similitudes avec les installations que nous connaissons (Pillay and Kutty, 2005).

#### 1.1.1.2. État des lieux de l'aquaculture mondiale, européenne et française

Le développement des techniques d'élevage a permis depuis 70 ans d'améliorer l'efficacité de production des diverses ressources halieutiques (espèces vivantes aquatiques) au sein des installations d'aquaculture. Ainsi, alors que la quantité mondiale de ressources halieutiques, regroupant les poissons mais aussi les crustacés et les mollusques, n'était que de 19 millions de tonnes annuelles en 1950, cette production a connu une croissance moyenne annuelle de 3.3% pour arriver à une production de 178 millions de tonnes en 2020 (FAO, 2022) (**Figure 3**). On estime que parmi ces 178 millions, 51%, soit 90 millions de tonnes proviennent de la pêche et 49% du secteur de l'aquaculture, soit 88 millions de tonnes. Additionnellement, 36 millions de tonnes d'algues ont été produites dans le monde en 2020. Comme il peut être observé sur la **Figure 3**, la production de poissons issus de l'aquaculture est restée relativement faible (environ 12%) jusqu'aux années 1990, comparativement à celle provenant de la pêche. C'est seulement à partir de 1990 qu'une forte augmentation du secteur de l'aquaculture a débuté. Par rapport à la pêche, la proportion de poissons venus de l'aquaculture est passée de 18% dans les années 1990 à 49% en 2020. Par ailleurs, alors que la quantité de poissons issus de la pêche était en constante augmentation jusqu'alors, une stagnation de ces poissons pêchés, autour de 80 millions de tonnes annuelles à partir des années 1990, a été observée par la FAO (FAO, 2018). Cette stagnation peut s'expliquer par une diminution de la quantité de poissons biologiquement reproductibles dans les océans (**Figure 4**) passant de 90% en 1974, à 64,6% en 2019 (FAO, 2022), probablement liée à la surpêche. La surpêche, correspondant à une prise de poissons excessive, ne permet pas la régénération maximale du stock de poissons dans les océans, et engendre aussi de nombreux effets négatifs sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes marins. C'est donc aujourd'hui le secteur de l'aquaculture qui permet d'accroître la production de poissons dans le monde et qui devrait à l'avenir dépasser le secteur de la pêche. En effet, selon la FAO la production halieutique mondiale pourrait excéder 202 millions de tonnes en 2030, dont 106 millions venant de l'aquaculture et 96 millions de la pêche (FAO, 2022). De plus, l'instauration des quotas de pêche, à condition qu'ils soient respectés, pourrait limiter la quantité de poissons pêchés dans les océans.

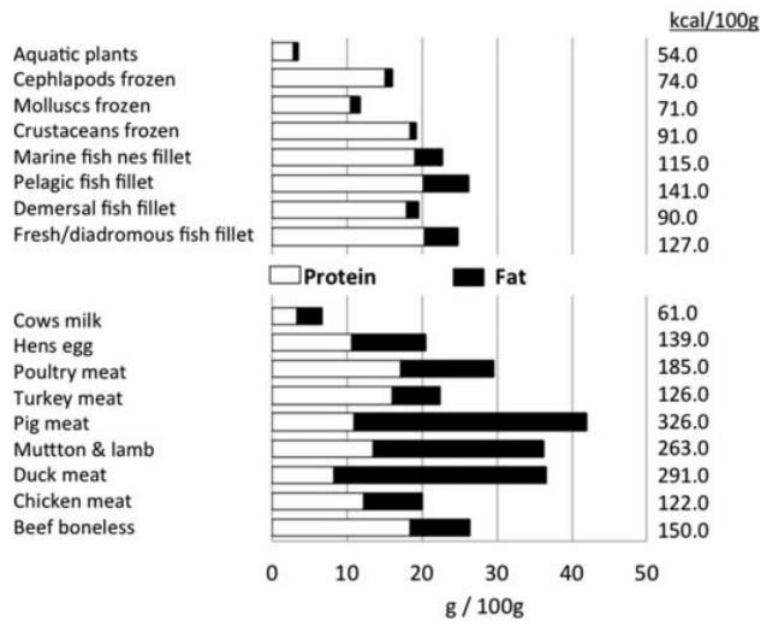


**Figure 5** : Quantification des émissions de gaz à effet de serre en fonction de 22 sources alimentaires. Modifié de (Tilman and Clark, 2014).

Selon le dernier rapport gouvernemental « FranceAgriMer » (FranceAgriMer, 2021) la France est un pays majeur en terme de production de produits aquacoles. En effet, en 2018, la production de poisson a atteint 749 000 tonnes, dont 561 000 provenant de la pêche, 145 000 de la conchyliculture, et 43 000 de la pisciculture, représentant un total de ventes, pour cette année, de 2 021 millions d'euros. Les principales régions productrices en France sont la Bretagne (121 720 tonnes), la Normandie (36 907 tonnes), les Pays de la Loire (20 152 tonnes) et la région Nouvelle Aquitaine (15 409 tonnes). Les principales espèces vendues en 2018 étaient le thon, l'huître, la coquille Saint-Jacques, la moule, le merlu, et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La France possède 2 295 entreprises de conchyliculture et production de crustacés, 380 entreprises de pisciculture en eau douce et 29 entreprises de pisciculture marine. Ces entreprises permettent 13 270 emplois de marins pêcheurs, 16 900 pour la conchyliculture et 3 200 employés pour le secteur de la pisciculture. La France se situe au 2<sup>ème</sup> rang européen en ce qui concerne la conchyliculture et est la 1<sup>ère</sup> productrice européenne de truite d'eau douce issue de la pisciculture, avec environ 40 000 tonnes produites en 2019 devant l'Italie et le Danemark (UEMOFA, 2021). Il est d'ailleurs estimé par le rapport « Plan aquacultures d'avenir » 2021-2027 ("Plan Aquacultures D ' Avenir," 2022), que le marché français de la truite fumée est en fort développement. En effet, la production annuelle de truite fumée est de 7000 tonnes et devrait atteindre les 12 000 tonnes en 2030.

### 1.1.1.3. Intérêt du poisson pour l'alimentation humaine

Dans un monde où la population mondiale est en constante augmentation et où plus de 30% de la population souffre de malnutrition (Tacon and Metian, 2013), il est essentiel de trouver de nouvelles solutions. Aujourd'hui, 811 millions de personnes souffrent de sous-nutrition chronique et 6.6 millions d'enfants décèdent de cette malnutrition chaque année, engendrant de nombreuses maladies ainsi que des carences alimentaires diverses (WFP, 2021, 2012). Dans le même temps, la quantité de personnes en surpoids est aussi en constante augmentation. En 2016, on décomptait plus de 650 millions de personnes obèses dans le monde (WHO, 2021), résultat d'une alimentation hypercalorique pouvant causer de nombreuses maladies telles que des maladies cardiovasculaires, ainsi que des diabètes et des cancers. Il est alors essentiel de fournir une alimentation saine, en assurant les besoins nutritionnels de la population mondiale (Willett et al., 2019). Par ailleurs, l'agriculture mondiale est aujourd'hui responsable à 20% du rejet de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, ainsi que de la pollution des eaux douces et marines, et utilise la moitié des terres (hors glace) exploitables sur terre (Tilman and Clark, 2014). Cependant, comme le montre la **Figure 5**, l'émission de gaz à effet de serre varie beaucoup selon les diverses sources alimentaires.



**Figure 6 :** Proportion de protéines et matières grasses pour 100g de diverses sources alimentaires (Tacon and Metian, 2013).

Ainsi, la production de viandes issues de ruminants (bœufs, agneaux etc.) rejette 250 fois plus de gaz à effet de serre que la production de légumes (Tilman and Clark, 2014). La production de viande rouge est en partie liée à la déforestation et engendre également le rejet de méthane dans l'atmosphère (Napier et al., 2020). Le mode de production est aussi un paramètre impactant l'environnement, comme par exemple pour la production de poissons. En effet, l'usage de filets de pêche draguant le fond des océans est 3 fois plus polluant que les filets de surface, et la production de poisson d'aquaculture en circuit fermé est aussi plus polluante qu'en circuit ouvert. Au niveau nutritionnel, pour différentes raisons, les produits issus de la mer présentent de meilleures valeurs nutritives que les sources animales terrestres. Tout d'abord, comme le montre la **Figure 6** (Tacon and Metian, 2013), les produits de la mer présentent une plus grande proportion de protéines (environ 17,3%) que les produits issus de la terre (environ 13,8%), qui ont une proportion de matière grasse plus importante. Les protéines issues des produits de la mer sont aussi hautement digestibles et contiennent un profil en acides aminés essentiels excellent pour l'homme. Par exemple, chez les poissons il est observé une teneur en méthionine de 6,4% et de lysine de 19,6%, alors que ces teneurs sont de 5,7% et 19,0% respectivement dans les viandes animales.

De plus, certains acides aminés essentiels pour l'homme sont présents en faible quantité au sein des protéines végétales, ce qui fait des poissons un produit particulièrement intéressant pour la consommation humaine. De plus, les poissons sont en général beaucoup moins gras (environ 2,7% de matière grasse) que les viandes animales, en particulier le porc (environ 16,6%), et présentent des taux plus faibles d'acides gras saturés. Quant aux acides gras poly-insaturés excellents pour la santé humaine, ils sont eux en bien plus forte concentration dans les produits de la mer. La proportion en oméga-3 et notamment en acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA), est d'environ de 279-467 mg pour 100g de poisson contre 2-8mg pour 100g de viandes animales. Enfin le poisson est également riche en minéraux (calcium, phosphore, magnésium) et en vitamine A. Ensemble, ces informations nous indiquent que les poissons présentent d'excellentes qualités nutritionnelles et sont d'ailleurs considérés (WHO, 2021) comme la meilleure source de protéines animales. La consommation de poisson pourrait également limiter les risques de nombreuses maladies humaines. Ainsi, la consommation de poisson est la source principale de protéines animales dans plusieurs pays asiatiques, notamment le Japon, où la consommation de produits de la mer représente 37,2% (FAO, 2012), pays connu pour avoir une très bonne qualité de vie et qui présente de faibles taux d'obésité et de maladies cardiaques.

**Parmi tous les paramètres importants pour l'aquaculture, l'alimentation des poissons est un facteur clé car il représente plus de 50% du coût d'un élevage aquacole. De plus, la formulation des aliments aquacoles représente également un enjeu écologique majeur.**

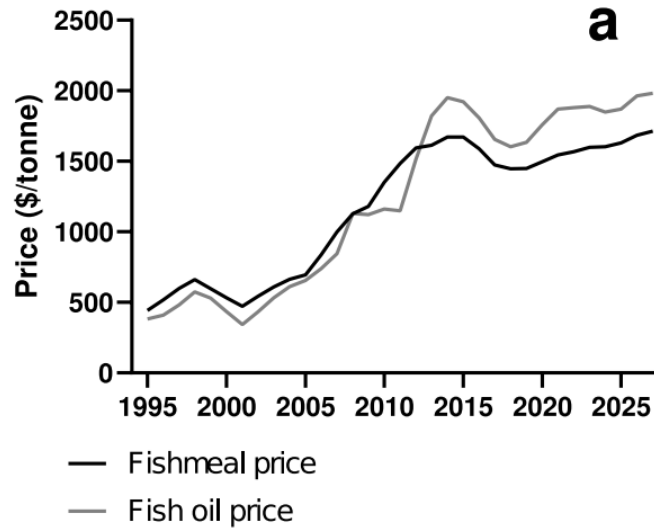


### 1.1.2. Évolution des aliments aquacoles

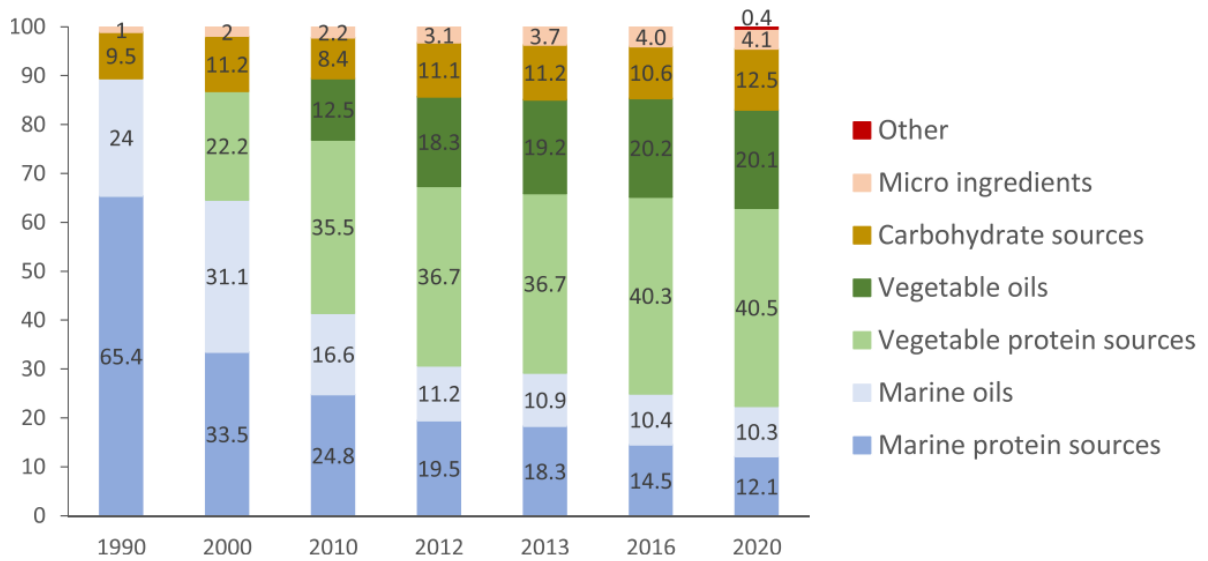
Dans les premières fermes d'aquaculture, les carcasses de poissons étaient utilisées pour nourrir les poissons d'élevage (Hardy and S.J. Kaushik, 2022). Cependant cette méthode engendrait une mauvaise qualité de l'eau, et provoquait des maladies chez les poissons, telles que la tuberculose du poisson (Parisot TJ, 1958). Il fut découvert que l'élimination du pathogène *Mycobacterium chelonae* (agent pathogène responsable de la tuberculose chez le poisson) nécessitait l'inactivation du pathogène par la cuisson de l'aliment. Cette cuisson a permis le développement des premiers granulés pour poissons, moins toxiques. Il fut important de travailler sur la formulation des granulés, notamment pour diminuer le coût de ces matières premières, tout en s'adaptant aux besoins nutritionnels des poissons. Tout d'abord, pour améliorer la durabilité, la flottabilité et le maintien des granulés dans l'eau, des polymères d'amidon ont été utilisés (Samuelsen et al., 2013). La proportion de protéines dans les granulés a été adaptée selon les différents stades de développement des poissons (Cottrell et al., 2020; Hua et al., 2019). La formulation des granulés pour les poissons adultes a des taux de protéines plus faibles (~40%) que pour les poissons alevins et juvéniles (~55%) (Hua et al., 2019a; Oliva Teles et al., 2019). La température de l'eau joue aussi un rôle sur la quantité en protéines dans l'aliment. En effet, les poissons grandissent plus vite dans des eaux plus chaudes, l'augmentation de la température de l'eau dans les bassins permet ainsi de diminuer les teneurs en farines de poisson (Oliva Teles et al., 2019). Par ailleurs, pour les poissons d'aquaculture omnivores ou herbivores, comme le tilapia du Nil ou la carpe, il a été possible de remplacer totalement l'utilisation de farines et huiles de poisson sans impacter les performances de croissance de ces poissons (Olsen and Hasan, 2012; Tacon et al., 2006). De plus, aujourd'hui, à cause du coût de ces matières premières, la proportion de farines et huiles de poisson dans les aliments donnés aux poissons carnivores d'aquaculture, comme la truite arc-en-ciel, a été réduite à environ 12% (Hua et al., 2019).

Les farines de poisson sont, sans surprise, la source protéique la plus adaptée pour la nutrition des poissons, et en particulier les poissons carnivores d'aquaculture (Oliva Teles et al., 2019; Peres and Oliva-teles, 2007). Les farines et les huiles de poisson (Tacon and Metian, 2008) présentent une proportion en acides aminés et en acides gras optimale pour les poissons tels que la truite et permettent ainsi une croissance rapide de ces poissons en captivité (Hua et al., 2019). Ces ingrédients sont également intéressants car ils sont appétant, efficacement digérés par les poissons et sont facilement utilisables sous forme de granulés (Jannathulla et al., 2019).





**Figure 7 :** Estimation et évolution des prix des farines et huiles de poisson de 1995 à 2025 (Kok et al., 2020).



**Figure 8 :** Évolution de la composition des aliments donnés aux saumon de Norvège, de 1990 à 2020. (Aas et al., 2022)

### **1.1.2.1. Limites à l'incorporation des farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles**

L'utilisation des farines et huiles de poisson présente cependant de nombreuses limites. Tout d'abord, les farines et huiles de poisson sont issues de la pêche minotière. Cette pêche, produisant plus de 20 millions de tonnes de poissons chaque année, non destinée à la consommation humaine directe est très décriée car impactant significativement la biodiversité marine. Tout d'abord, les poissons pélagiques tels que les anchois, merlans bleus, capelans, sardines, maquereaux et harengs, utilisés pour la production des farines et huiles de poisson sont sensibles au réchauffement climatique et à l'acidification des océans, ce qui affecte négativement ces populations (Barange et al., 2009). De plus, la fluctuation des courants marins et en particulier celui de « El Niño », associée à la surpêche, entraîne une perte de productibilité et une diminution de la prise de poissons (Hardy, 2006). La réduction de la quantité de poissons dans les océans, associée à une plus forte demande de matières premières pour les fermes d'aquaculture a entraîné une forte augmentation du prix de ces matières premières (**Figure 7**). Le prix des farines de poisson est ainsi passé d'environ de 600 €/tonne en 2002 à 1200 €/tonne en 2009 (Olsen and Hasan, 2012). Le prix des huiles de poisson a lui aussi également fortement augmenté passant de 500 €/tonne en 1995 à plus de 1500 €/tonne en 2020 (Kok et al., 2020). En outre, il a été démontré que le réchauffement climatique et que la pollution des océans (plastiques, métaux lourds), associés à la destruction des fonds océaniques par certains filets de pêche pouvaient impacter sévèrement les écosystèmes marins et ainsi participer davantage à la diminution de la biodiversité marine (Issifu et al., 2022). D'autre part, la pollution des océans engendre une accumulation de certains métaux lourds, comme le mercure dans les poissons pêchés, qui remontent la chaîne alimentaire, ce qui constitue une menace sérieuse pour la santé humaine (Issifu et al., 2022). Enfin, des millions de tonnes de poissons pélagiques de faibles valeurs nutritionnelles sont pêchés tous les ans dans les eaux de l'hémisphère sud pour la production de poissons de grandes valeurs nutritionnelles (saumons, truites etc.) dans le but de nourrir les populations de l'hémisphère nord. Ceci pose de nombreuses questions éthiques, surtout que ces petits poissons sont très souvent une source alimentaire importante pour certains peuples d'Afrique ou d'Amérique du sud.

**Il est donc essentiel de trouver des alternatives durables à l'incorporation des farines et huiles de poisson dans l'aliment des poissons d'aquaculture.**

Farmed fed category	FIFO ratio			FCR	Production increase (%)
	2000	2010	2015		
Eels	2.98	1.81	1.75	1.42	14
Salmonids	2.57	1.38	0.82	1.25	53
Marine fishes	1.48	0.88	0.53	1.35	81
Crustaceans (shrimp & crab)	0.91	0.45	0.46	1.56	232
Tilapia	0.27	0.18	0.15	1.38	143
Freshwater fish	0.60	0.15	0.13	0.83	462
Total for fed aquaculture	0.63	0.33	0.22	—	97

Source: FAO (2012), IFFO (2018).

**Tableau 1** : *Fish-in/Fish-out ratio* pour différents produits aquacoles dans les années 2000, 2010, et 2015. (Jannathulla et al., 2019).

Ingredient	International feed number	Dry matter (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	Lysine (%)	Methionine (%)	Cystine (%)
Fish meal, herring*	5-02-000	92.0	72.0	8.4	10.4	5.57	2.08	0.74
Barley†	4-00-552	88.0	14.9	2.1	2.9	0.44	0.16	0.24
Canola*	5-06-145	93.0	38.0	3.8	6.8	2.27	0.70	0.47
Corn*	4-02-935	88.0	8.5	3.6	1.3	0.25	0.17	0.22
Corn gluten meal*	5-28-242	91.0	60.4	1.8	2.1	1.11	1.63	1.20
Cottonseed meal*	5-01-619	92.0	41.7	1.8	6.4	1.89	0.50	0.45
Lupin <i>Lupinus angustifolius</i> ‡ (whole)	5-27-717	89.0	39.2	10.3	2.8	1.40	0.27	0.51
Field peas‡ (whole)	5-03-600	89.0	25.6	1.3	3.4	1.50	0.21	0.31
Soybean meal, de-hulled*	5-04-612	90.0	48.5	0.9	5.8	3.08	0.68	0.75
Soy protein concentrate†		90.0	64.0	3.0	1.5	4.20	0.90	1.00
Wheat*	4-05-268	88.0	12.9	1.7	1.6	0.36	0.21	0.27

\*Data from NRC (1993).

†Data from NRC (1998).

‡Data from Allan et al. (2000).

**Tableau 2** : Composition des farines de poisson et de différentes sources végétales (Gatlin et al., 2007).

## 1.1.2.2. Recherche des alternatives à l'incorporation des farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles

### 1.1.2.2.1. Réduction des farines et huiles de poisson dans l'aliment aquacole : vers leur suppression totale ?

La production croissante de poissons d'aquaculture a entraîné plusieurs décennies de recherches scientifiques visant à trouver des alternatives à l'utilisation exclusive de farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles (Jannathulla et al., 2019). De 1995 à 2013, la plupart de ces études ont permis de réduire significativement la proportion de farines et huiles de poisson dans ces régimes aquacoles, passant d'environ 65% à 18% en farines de poisson, sans complètement les retirer (**Figure 8**). Il est également observé une diminution de la proportion d'huiles de poisson, passant par exemple de 24% en 1990 à 10,9% dans les aliments donnés au saumon de Norvège. Pour mesurer ces diminutions, le facteur « Fish-in / Fish-out » FIFO a été utilisé (Kok et al., 2020). Il permet de quantifier la proportion de poissons utilisés pour la production des aliments via la pêche minotière (Fish-in), et la quantité de poissons d'élevage produite (Fish-out). Ainsi, alors qu'en 2000, la production d'un kilogramme de saumon nécessitait l'utilisation de 2,57 kg de farines et huiles de poisson, en 2015 la production d'un kilogramme de saumon ne demandait plus que 0,82 kilogramme de farines et huiles de poisson (**Tableau 1**). Pour remplacer les farines et huiles de poisson, l'utilisation de protéines et huiles végétales, ainsi que des « sous-produits » de productions diverses, et d'autres sources de protéines (insectes, levures, etc.) ont fait leur apparition (Hodar et al., 2020; Hua et al., 2019). Les chapitres suivants vont décrire ces alternatives.

### 1.1.2.2.2. Remplacement des farines et huiles de poisson par des produits d'origine végétale

Le changement dans les formulations des aliments aquacoles a permis de diminuer la proportion d'ingrédients issus de la mer et d'augmenter la proportion d'ingrédients terrestres dans l'aliment aquacole (Napier et al., 2020). L'utilisation de diverses matières premières végétales, telles que les farines de soja, les farines de gluten de maïs et les farines de colza ont pris leur place dans les aliments aquacoles et présentent de nombreux avantages. Tout d'abord, comme le montre le **Tableau 2**, certaines sources végétales comme le soja contiennent de hautes proportions en protéines végétales (Gatlin et al., 2007). Cependant, les protéines végétales présentent des proportions faibles en plusieurs acides aminés essentiels, tel que la lysine, la méthionine et la cystine.

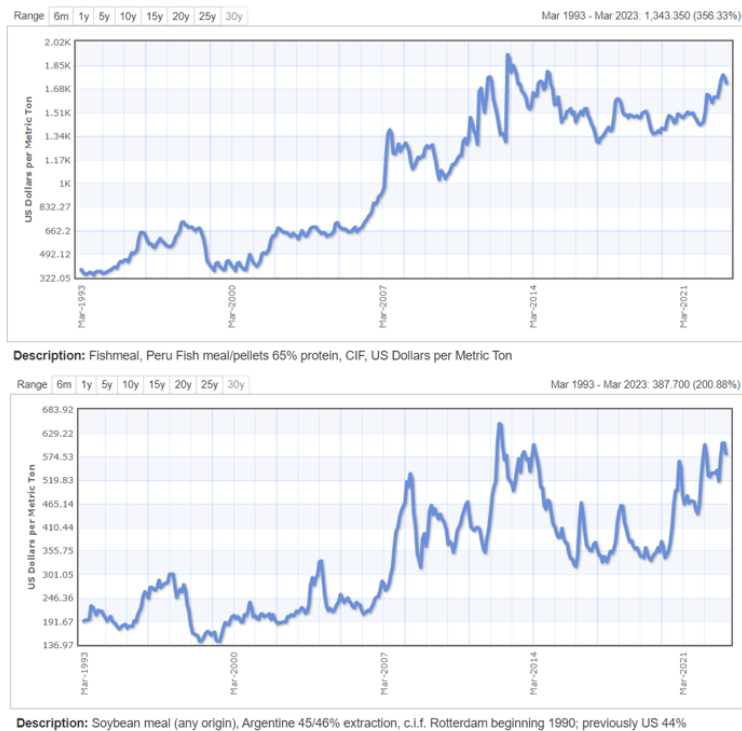
Oils/fats	Iodine value‡	SFA	MUFA	LA	AA	ALA	EPA	DHA	n-6 PUFA	n-3 PUFA	n-3/n-6 ratio
Fish oils											
Anchovy oil	180–200	28.8	24.9	1.2	0.1	0.8	17.0	8.8	1.3	31.2	24.0
Capelin oil	95–160	20.0	61.7	1.7	0.1	0.4	4.6	3.0	1.8	12.2	6.8
Menhaden oil	150–200	30.5	24.8	1.3	0.2	0.3	11.0	9.1	1.5	25.1	16.7
Herring oil	115–160	20.0	56.4	1.1	0.3	0.6	8.4	4.9	1.4	17.8	12.7
Cod liver oil	n.a.§	19.4	46.0	1.4	1.6	0.6	11.2	12.6	3.0	27.0	9.0
Vegetable oils											
Crude palm oil	44–58	48.8	37.0	9.1	–¶	0.2	–	–	9.1	0.2	0.0
Soybean oil	120–141	14.2	23.2	51.0	–	6.8	–	–	51.0	6.8	0.1
Canola/rapeseed oil	110–126	4.6	62.3	20.2	–	12.0	–	–	20.2	12.0	0.6
Sunflower oil	110–143	10.4	19.5	65.7	–	–	–	–	65.7	0.0	0.0
Cottonseed oil	99–113	45.3	17.8	51.5	–	0.2	–	–	51.5	0.2	0.0
Groundnut oil	n.a.	11.8	46.2	32.0	–	–	–	–	32.0	0.0	0.0
Corn oil	103–128	12.7	24.2	58.0	–	0.7	–	–	58.0	0.7	0.0
Linseed oil	177	9.4	20.2	12.7	–	53.3	–	–	12.7	53.3	4.2
Animal fats											
Beef tallow	41–52	47.5	40.5	3.1	0.4	0.6	–	–	3.1	0.6	0.2
Pork lard	52–74	38.6	44.0	10.2	–	1.0	–	–	10.2	1.0	0.1
Poultry fat	80–85	28.5	43.1	19.5	–	1.0	–	–	19.5	1.0	0.0

**Tableau 3 :** Composition en acides gras des huiles de poisson, huiles végétales, et graisses animales (Turchini et al., 2009).

Il est donc nécessaire de combiner plusieurs sources protéiques végétales pour avoir un profil en acides aminés alimentaires se rapprochant le plus de « la protéine idéale » pour les poissons. L'utilisation d'huile de lin pour remplacer l'utilisation de l'huile de poisson est aussi très intéressante car ces huiles végétales présentent des compositions en oméga-3 (n-3 PUFA) et en oméga-6 (n-6 PUFA) comparables aux huiles de poisson et bien supérieures aux autres huiles animales (**Tableau 3**) (Turchini et al., 2009). La qualité des huiles apportées dans l'alimentation des poissons d'élevage, sans avoir d'effets négatifs sur les performances de croissance, a une importance significative sur la teneur en oméga-3 et oméga-6 des filets de poissons et impacte donc la qualité nutritionnelle du poisson pour l'alimentation humaine (Calder and Yaqoob, 2009). L'utilisation de régimes végétaux présente également d'autres avantages majeurs. Tout d'abord, contrairement au stock limité de poissons dans les océans, il est possible, dans une certaine mesure, d'augmenter la production de matières premières végétales. Par exemple, en réaction à cette demande grandissante, les États-Unis ont créé en 1995 « *The United Soybean Board* », un programme qui a permis, à partir de 2005, la production de 5 millions de tonnes annuelles de soja destiné au secteur de l'aquaculture (Gatlin et al., 2007). Aujourd'hui la production mondiale de protéines de soja avoisine les 238 millions de tonnes annuelles (Jannathulla et al., 2019). Toutefois, cette production de soja à grande échelle est responsable de déforestations dans le monde.

L'autre avantage, qui explique l'intérêt du secteur de l'aquaculture pour l'utilisation de produits végétaux, est le prix des matières premières. En effet, comme le montre la **Figure 9**, alors que le prix des farines de poisson est passé d'environ 350 €/tonne en 1993 à 1700 €/tonne en 2023, le prix des farines de soja est passé d'environ 200 €/tonne en 1993 à 600 €/tonne en 2023 ("<https://www.indexmundi.com/commodities/>," n.d.). Bien que le prix de la farine de soja soit environ 3 fois moins cher que celui des farines de poisson, on observe tout de même une forte fluctuation des prix, accompagnée d'une nette augmentation à partir de 2020, pouvant probablement être expliquée par l'arrêt de l'économie mondiale provoqué par la pandémie de COVID-19 et par la guerre en Ukraine.

**En raison des qualités nutritionnelles des produits végétaux, de la capacité d'accroissement de production, des prix attractifs, et de la possibilité de faire venir ces produits de moins loin, l'utilisation des produits végétaux pour l'aquaculture a été la première piste étudiée pour remplacer, en partie, les farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles.**



**Figure 9 :** Comparaisons du prix des farines de poisson avec le prix des farines de soja en dollars par tonne, depuis 30 ans (de 1993 à aujourd’hui). Graphique créé à partir du site (<https://www.indexmundi.com/commodities/>).

Antinutrient	Sources	Type of treatment
Proteinase inhibitors	Legumes	Heat, methionine supplementation
Amylase inhibitors	Peas	Heat
Lipase inhibitor	Beans	Heat
Lectins	All plants seeds	Heat, supplementation with specific carbohydrates
Phytic acid	All plants	Mineral supplementation
Fibre	All plants	Dehulling
Tannins	Rape seed, beans	Dehulling, restriction of heat treatment
Saponins	Legumes	Alcohol extraction
Sterols	Legumes	Alcohol/non-polar extraction, cholesterol supplementation
Oestrogens	Beans	Alcohol/non-polar extraction
Gossypol	Cotton seed	Non-polar extraction, iron supplementation
Oligosaccharides	Legumes	Alcohol/aqueous extraction
Quinolozidine alkaloids	Lupins	Aqueous extraction
Goitrogens	Rape seed	Iodine supplementation

For all antinutrients, levels may be reduced by fermentation, treatment with enzymes that specifically inactivate the compound, selective breeding and genetic modification.

**Tableau 4 :** Facteurs antinutritionnels au sein des ingrédients végétaux ainsi que les traitements permettant d’éliminer ou de réduire leurs activités biologiques (Krogdahl et al., 2010).

### 1.1.2.2.3. Limites à l'utilisation des ingrédients végétaux

L'utilisation d'ingrédients végétaux ne présente toutefois pas que des avantages. Tout d'abord, les protéines végétales contiennent différents facteurs antinutritionnels. En effet, certaines plantes produisent des composés secondaires permettant d'éviter leur dégradation par d'éventuels agresseurs (Krogdahl et al., 2010). Ces substances peuvent donc avoir des effets négatifs et limiter l'appétence chez les poissons, pouvant impacter négativement leurs performances de croissance (Urán et al., 2009). Ainsi les poissons carnivores d'aquaculture nourris avec des régimes végétaux présentent des baisses de performance de croissance comparativement à ceux nourris avec des farines et des huiles de poisson (Lazarotto et al., 2015; Panserat et al., 2009a). De plus, certains facteurs antinutritionnels tels que les saponines de soja peuvent induire chez les poissons une inflammation du tube digestif, appelée entérite (Gu et al., 2021; Urán et al., 2009). Cette inflammation chronique peut entraîner une infiltration de cellules immunitaires de la *lamina propria*, ainsi qu'un raccourcissement de la taille des microvillosités intestinales. Pour répondre à cette problématique, des avancées techniques et chimiques ont été faites pour réduire la concentration de ces facteurs antinutritionnels et améliorer la qualité de ces produits végétaux **Tableau 4** (Drew et al., 2007). Il est ainsi, par exemple, possible d'éliminer certaines molécules, par traitement chimique. De plus, les aliments aquacoles sont aussi extrudés à haute température, ce qui permet de désactiver de nombreux facteurs antinutritionnels et ainsi d'améliorer la digestibilité de ces diverses sources végétales. L'extrusion de certaines matières végétales permet par exemple d'obtenir de l'amidon gélatinisé, riche en glucides digestibles, et produisant des granulés plus résistants à l'eau et plus solides (Samuelsen et al., 2013).

L'utilisation des matières végétales présente également d'autres défauts. Comme dit précédemment, les protéines végétales présentent une composition en acides aminés différente des farines et huiles de poisson. Nourris avec des aliments déficients en acides aminés essentiels, les poissons peuvent présenter des diminutions de croissance, une baisse de la prise alimentaire et de l'efficacité alimentaire (Oliva-Teles, 2012). En outre, les matières premières végétales peuvent avoir été produites à l'aide de pesticides (contaminants biologiques ou chimiques), ce qui est mauvais pour l'environnement et qui peut également induire une diminution de l'appétence (Tacon, 1992).





De plus, la taurine, synthétisée à partir de cystéine, est une molécule importante pour la physiologie des poissons (Salze and Davis, 2015) et peut ne pas être présente en concentration suffisante dans les aliments végétaux et entraîner diverses complications métaboliques comme l'anémie et la décoloration verte du foie, appelée "foie vert". (Takagi et al., 2010). Il est aussi observé des modifications au niveau de la structure et de la physiologie du tube digestif avec notamment une altération de l'expression d'aquaporine, de transporteurs d'ion, et de l'expression de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité des jonctions serrées (Hu et al., 2016; Sitjà-Bobadilla et al., 2005) entraînant chez la truite arc-en-ciel une modulation de la capacité d'absorption des nutriments (Santigosa et al., 2011). Le remplacement des huiles de poisson par des huiles végétales induit une diminution des taux d'acides gras insaturés ( $\omega$ -3 et  $\omega$ -6), ce qui impacte négativement la prise alimentaire chez la truite arc-en-ciel (Roy et al., 2020). Pour compléter, les vitamines sont des molécules sensibles à la chaleur. Elles peuvent être dégradées par les techniques d'extrusion utilisées pour la fabrication des granulés (Tacon, 1992). D'ailleurs, des carences en vitamines A et E peuvent impacter négativement l'intégrité de la barrière épithéliale chez les poissons (Jiang et al., 2019). De plus, des carences en minéraux, tels que le manganèse ou le zinc peuvent induire des inflammations chez la truite (Inoue et al., 1998) et des diminutions de croissance. Ces facteurs peuvent avoir des effets négatifs sur les performances de croissance des poissons, expliqués par des baisses de prises alimentaires et de l'efficacité alimentaire. L'agriculture intensive présente aussi des inconvénients environnementaux. Cette production de matières premières végétales induit l'irrigation des sols (surtout en zone aride), ainsi que la déforestation (Islam and Tanaka, 2004). Les exportations de ces produits à travers le monde sont aussi un problème. Enfin, alors que le dernier rapport du World Food Programme (WFP, 2021) nous alerte sur l'aggravation de la famine dans le monde, il est critiquable de donner aux poissons d'élevage des produits végétaux utilisables pour la nutrition humaine directe. D'autres sources protéiques comme les sous-produits ou les insectes pourraient être donnés aux poissons sans concurrencer la nutrition humaine (Sandström et al., 2022).

**En conclusion, bien que l'utilisation de matières premières végétales soit d'un intérêt évident pour remplacer totalement les farines et huiles de poisson, il est intéressant de diminuer la proportion de protéines végétales dans ces aliments pour éviter les effets négatifs de ces dernières.**

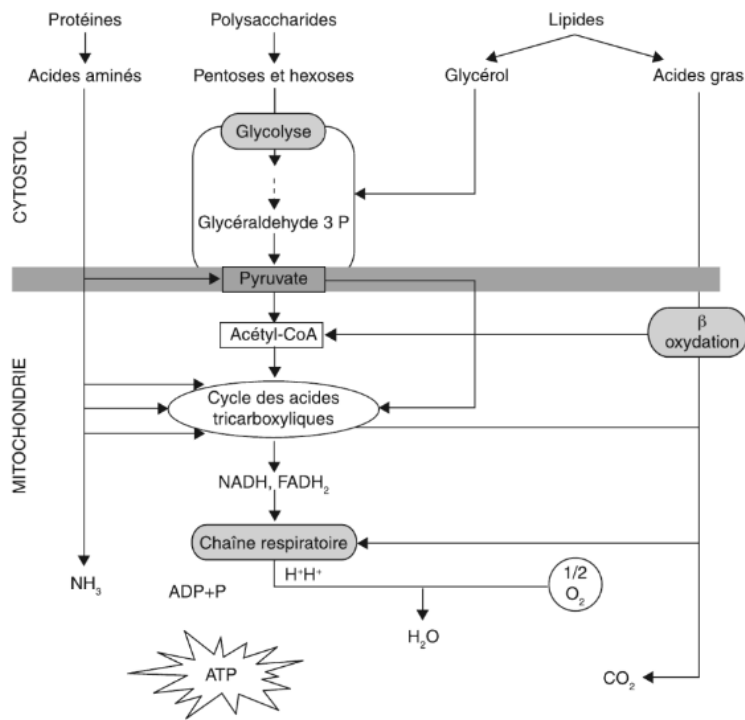


#### **1.1.2.2.4. Les co-produits et autres ingrédients pour l'aliment aquacole**

**Afin de couvrir la demande grandissante d'aliments aquacoles, et pour réduire la proportion de farines et huiles de poisson, d'autres sources protéiques que les protéines et huiles végétales sont aujourd'hui à l'étude. Nous faisons ici une description rapide (et non exhaustive) des différentes alternatives car cela n'est pas l'objet de la présente thèse.**

Tout d'abord, l'utilisation de co-produits d'abattoir (ou « sous-produits ») rencontre un intérêt grandissant (Hossain et al., 2023). Les sous-produits correspondent aux cadavres entiers ou aux parties d'animaux non destinées à la consommation humaine. Pour les poissons, il s'agit par exemple des peaux, viscères, têtes, et sang qui sont habituellement jetés (Stevens et al., 2018). L'utilisation de ces aliments est intéressante car ils présentent de très bonnes qualités nutritionnelles : vitamines, protéines, minéraux, et lipides. La Norvège est l'un des premiers pays à avoir exploré l'utilisation des sous-produits avec 650 000 tonnes de sous-produits provenant d'aliments marins chaque année (Ytrestøyl et al., 2015a). Ces sous-produits peuvent également provenir de la production animale (matières grasses, organes internes, os, têtes de volailles, peaux, etc.) ou de végétaux (Sandström et al., 2022). De plus, on estime que l'utilisation de sous-produits pourrait permettre d'économiser 8,8 millions de tonnes de céréales en concurrence avec l'alimentation humaine sur le sol européen (zu Ermgassen et al., 2016). Leur utilisation pourrait donc être très intéressante car ces produits sont disponibles en grande quantité, et présentent de bonnes qualités nutritionnelles. Elle pourrait permettre de réaliser des économies, tout en limitant le transport de produits à travers le monde. Néanmoins, l'acceptabilité sociétale de ces co-produits doit être également pris en compte : l'utilisation de certains co-produits animal pourrait repousser les consommateurs. De nombreuses autres sources protéiques sont à l'étude. L'utilisation de protéines d'insectes est intéressante car cette source protéique ne rentre pas en concurrence avec l'alimentation humaine (Berggren et al., 2019). De plus, les insectes présentent des valeurs nutritionnelles intéressantes pour la nutrition des poissons (Magalhães et al., 2017). Par ailleurs, l'Union Européenne a approuvé, en juillet 2017, l'utilisation de sept espèces d'insectes pour nourrir les poissons d'élevage. L'utilisation de microalgues pourrait aussi être intéressante. Les microalgues présentent également de très bonnes qualités protéiques et lipidiques (Armenta and Valentine, 2013) et pourraient remplacer au moins partiellement l'utilisation des farines et huiles de poisson pour l'aquaculture (Hua et al., 2019; Kiron et al., 2012; Sirakov et al., 2015).

**Afin de diminuer le taux de protéines végétales à incorporer dans des aliments sans farines et huiles de poisson, l'utilisation de taux élevés de glucides digestibles (amidon) est une des pistes possibles : c'est la principale hypothèse au centre du projet de recherche de cette thèse. L'incorporation des glucides et leur utilisation métabolique chez les salmonidés sont décrites dans le chapitre suivant.**



**Figure 10** : Les voies du catabolisme oxydatif des protéines, des glucides et des lipides, permettant, entre autres, la libération d'énergie sous forme d'ATP (Jalabert and Fostier, 2010).

## 1.2. Utilisation métabolique des glucides alimentaires chez les salmonidés

### 1.2.1. L'aliment « naturel » de la truite-arc-en-ciel : riche en protéines et en lipides, sans glucides digestibles

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est un poisson appartenant à la famille des salmonidés. Cette espèce, originaire de la côte ouest d'Amérique du Nord, vit naturellement en eau douce, en lac, ou en rivière, mais peut également migrer en mer. La truite arc-en-ciel est un **poisson carnivore**, se nourrissant dans son espace naturel de diverses sources alimentaires, telles que de petits poissons, des insectes, des mollusques, ou des crustacés. Par conséquent, ces poissons sont de grands consommateurs de protéines et sont naturellement adaptés à l'utilisation des acides aminés. L'efficacité de la digestion des protéines alimentaires chez la truite peut monter jusqu'à 96% (German, 2011). Les besoins nutritionnels de ces poissons en terme de protéines varient selon les stades de développement, et sont estimés à 42% en moyenne (Oliva Teles et al., 2019). La digestion des protéines chez les salmonidés est tout d'abord permise grâce à la présence d'enzymes du tractus digestif, telles que la trypsine (*Enzyme Commission numbers* (EC) 3.4.21.4), la chymotrypsine (EC 3.4.21.1), la carboxypeptidase (EC 3.4.18), ou les peptidases, permettant l'hydrolyse des protéines en acides aminés (Esmaeili, 2017; Nordrum et al., 2003; Sahraei et al., 2019). Ensuite, l'entrée des acides aminés dans la circulation sanguine de la truite se fait grâce à des transporteurs cellulaires comme *Peptide Transporter 1* (PepT1) présents tout le long du tube digestif (caeca pyloriques, intestin antérieur, intestin postérieur) (Kamalam et al., 2013b; Wang et al., 2017). Comme tous les organismes vivants, la truite a besoin d'énergie pour sa croissance et pour le maintien de ses besoins vitaux. Chez la truite en milieu naturel, ce sont principalement les acides aminés et les lipides alimentaires qui sont utilisés pour la production d'énergie (Oliva Teles et al., 2019; Panserat et al., 2013), le glucose alimentaire n'étant pas nécessaire (**Figure 10**). En plus d'être une source essentielle pour la synthèse protéique et donc la croissance, les acides aminés chez les poissons carnivores sont utilisés efficacement comme source d'énergie par les voies du catabolisme des acides aminés.



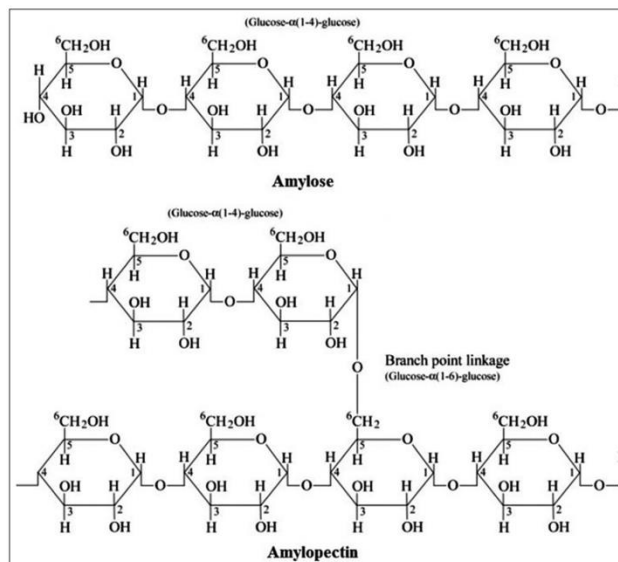
Il faut noter toutefois que la désamination des acides aminés, pour la production d'ATP, induit le relargage dans l'environnement de molécules azotées (ammonium,  $\text{NH}_4^+$ ), par les branchies (75%) et par l'urine (25%) (Médale et al., 1995), ce qui peut poser des soucis lors des élevages intensifs. Les lipides alimentaires jouent aussi un rôle important dans la production d'énergie chez la truite (S. Polakof et al., 2010a). En effet, le catabolisme des lipides, principalement des triglycérides, par la voie de la beta-oxydation permet la production d'ATP chez les poissons (Turchini et al., 2022). Il a d'ailleurs été démontré que 1g de lipides apporte 2,5 fois plus d'énergie que 1g de glucides et 1,8 fois plus que 1g de protéines. De plus, la digestibilité des lipides est élevée chez la truite arc-en-ciel, entre 71% et 97% (German, 2011). Bien que chez la truite, un taux de 10% à 20% de lipides dans l'aliment est suffisant pour avoir de bonnes performances de croissance, des taux plus élevés de lipides permettent de favoriser la croissance et d'améliorer la rétention protéique chez les salmonidés (voir partie 3.2.9), ce qui permet de limiter le rejet de molécules azotées dans l'environnement (Gélineau et al., 2001). Toutefois, des taux élevés de lipides alimentaires peuvent avoir des conséquences négatives sur la qualité de la chair (poisson trop gras) et doivent être limités dans l'alimentation. En plus de leur importance comme sources d'énergie, les lipides alimentaires, et en particulier les omega-3 et omega-6, jouent un rôle considérable dans la fluidité des membranes cellulaires (Turchini et al., 2022), et sont aussi reconnus comme pouvant être précurseurs de la réponse inflammatoire chez les poissons (Hoseinifar et al., 2017; Oliva-Teles, 2012; Qiang et al., 2017).

## **1.2.2. Le métabolisme glucidique de la truite arc-en-ciel : sa régulation par les glucides alimentaires**

### **1.2.2.1. Apport des glucides dans l'alimentation de la truite d'élevage**

Les glucides sont des molécules organiques naturellement présentes au sein de toutes formes de vie. Ces molécules sont principalement composées d'atomes de carbone, d'oxygène, et d'hydrogène, correspondant à la formule empirique  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , où  $n \geq 3$ . Les glucides sont généralement classés en 3 catégories : les monosaccharides, les disaccharides, et les polysaccharides. Ce sont principalement les monosaccharides à 6 atomes de carbone (hexoses), comme le glucose, le galactose, le mannose, ou le fructose qui présentent des véritables valeurs nutritionnelles chez les poissons (Kaushik et al., 2022). Les di-, ou polysaccharides sont des polymères de monosaccharides, liés entre eux par liaisons glycosidiques. Certains ont également des rôles nutritionnels chez les animaux, tels que le maltose (2 glucoses), le saccharose (glucose + fructose), le lactose (glucose + galactose), la cellulose et l'hémicellulose chez les herbivores, ou encore l'amidon et le glycogène. Avec les lignocelluloses et la chitine, l'amidon est l'une des plus importantes sources de biomasse sur Terre (Jane, 2004).





**Figure 11** : Structure de l'amylose et de l'amylopectine : molécules composant l'amidon (Paul and Bengal, 2016).

Ingredient		Total carbohydrate <sup>a</sup> (g/kg dry matter)	Digestible fraction <sup>b</sup> (g/kg dry matter)	Total global production <sup>c</sup> (million tonnes)
Maize	Whole grain <sup>d</sup>	843	741	1018.1
	Bran	777	378	-
	Germ meal <sup>d</sup>	660	330	-
	Gluten feed <sup>d</sup>	689	221	-
	Gluten meal	278	181	-
	Starch	-	950	-
Wheat	Whole grain	839	723	715.9
	Screenings	780	617	-
	Germ meal	561	373	-
	Bran	732	303	-
	Distillers grain <sup>d</sup>	553	146	-
	Starch	-	877	-
Rice	Whole grain	837	642	740.9
	Bran <sup>d</sup>	651	284	-
Oat	Whole grain <sup>d</sup>	800	524	23.9
	Bran	696	499	-
Rye	Whole grain	863	658	16.7
	Bran	756	359	-
Barley	Whole grain <sup>d</sup>	824	618	143.9
Triticale	Whole grain	847	713	14.5
Sorghum	Whole grain	837	759	62.3
Pea	Whole seed	714	562	17.4
	Starch	-	954	-
Soybean	Whole seed	333	151	276
	Meal <sup>d</sup>	376	98	-
Groundnut	Decorticated seed	199	136	45.6
	Meal <sup>d</sup>	347	98	-
Rapeseed	Whole seed	288	92	72.7
	Meal <sup>d</sup>	469	99	-
Linseed	Whole seed	319	81	2.3
Cottonseed	Whole seed	541	42	47.1
Sunflower	Whole seed	320	40	44.5
Faba bean	Whole seed <sup>d</sup>	647	478	-
Lupin	Whole seed <sup>d</sup>	520	110	0.8
Jatropha	Kernel meal	196	130	-
Cassava	Tuber	938	808	269.1
	Starch	-	943	-

<sup>a</sup> Calculated as 1000 - (crude protein + ether extract + ash), on dry matter basis.

<sup>b</sup> Starch and total sugars.

<sup>c</sup> Production statistics for the year 2013.

<sup>d</sup> Average of different sources or types.

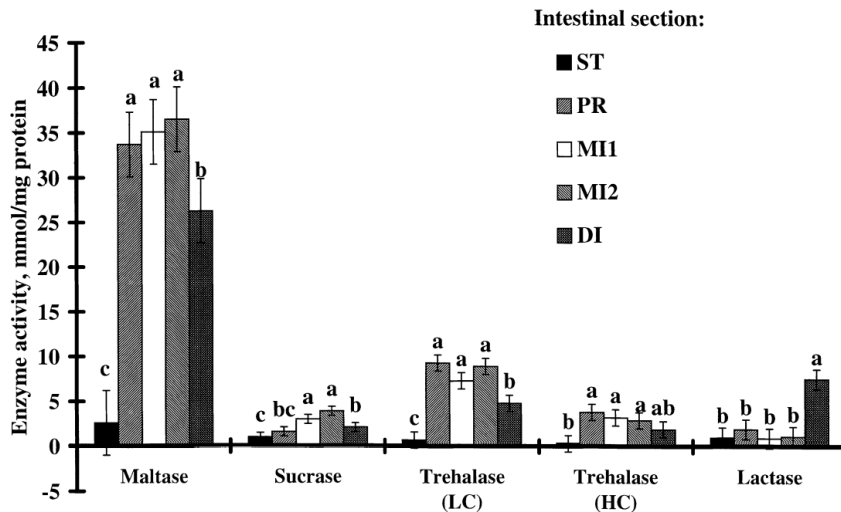
**Tableau 5** : Proportion moyenne de glucides alimentaires issus de différents produits végétaux utilisés pour l'alimentation des poissons d'élevage (Kamalam et al., 2017).

Ce polysaccharide est composé de deux homopolymères de glucose : l'amylose et l'amylopectine (**Figure 11**). L'amylose est considéré comme un polymère linéaire composé de glucopyranoses liés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -d-(1→4). L'amylopectine est, lui, un polymère ramifié composé d'unités de glucopyranose reliées par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -d-(1→4) (Karim et al., 2000). Par ailleurs, l'amidon est un polysaccharide présent au sein de nombreuses plantes et céréales ; il est le résultat du stockage de glucides en excès. Chez les animaux, les glucides en excès sont soit convertis en acides gras dans les tissus adipeux, soit stockés sous forme de glycogène (Adeva-Andany et al., 2016; Soengas et al., 2006). D'autres glucides, tels que la cellulose ou les hémicelluloses, sont non-digestibles et sont des molécules formant la paroi de la plupart des cellules végétales.

Alors que les glucides sont une source d'énergie majeure chez les mammifères (sauf carnivores stricts), les glucides alimentaires ne sont pas essentiels pour la survie des poissons carnivores. Toutefois, les glucides ont toujours été incorporés dans les aliments produits pour les poissons d'élevage en raison de leur capacité à lier les ingrédients lors de la fabrication des granulés (Krogdahl et al., 2005). Comme le montre le **tableau 5**, les sources glucidiques données aux poissons peuvent être variées (Kamalam et al., 2017). Elles peuvent être issues de céréales entières, de sous-produits de céréales, de graines, ou d'amidons venant de ces céréales. Différentes techniques hydrothermiques d'extrusion permettent d'améliorer la digestibilité de ces amidons végétaux (Drew et al., 2007). Le maïs, le blé, ou le riz font partie des matières premières végétales contenant le plus de glucides digestibles pour les poissons d'aquaculture, et sont d'ailleurs produites massivement dans le monde. Aujourd'hui, le secteur de l'aquaculture cherche à limiter l'utilisation des farines et huiles de poisson comme indiqué dans le chapitre précédent de cette thèse. Une des solutions potentielles pourrait être l'incorporation de glucides alimentaires. De plus, comme présenté dans la partie 1.2.2.10., l'utilisation de glucides alimentaires permet une épargne protéique, c'est-à-dire de limiter davantage les proportions de farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles (et d'en réduire le coût), sans affecter négativement la croissance des poissons. L'utilisation des glucides digestibles pour la nutrition des poissons d'élevage est très dépendante du type d'alimentation des poissons. En effet, alors que chez les poissons herbivores ou omnivores les taux peuvent atteindre les 40% à 50%, chez les poissons carnivores le niveau d'incorporation des glucides est généralement limité à 20% (20g de glucides pour 100g d'aliments) (Polakof et al., 2012). Le dépassement de ce taux d'incorporation engendre chez les poissons carnivores des effets négatifs sur la croissance, liés à des troubles métaboliques dont une hyperglycémie post-prandiale persistante (discutée dans les chapitres suivants). De plus, à l'exception des poissons herbivores, les glucides alimentaires non amylacés ne peuvent pas être donnés aux poissons d'élevage à cause de leur incapacité de synthèse d'enzymes fibrolytiques, et à cause de l'absence de microorganismes clés de la digestion de ces fibres (Pardesi et al., 2022).

	Liver (U mg <sup>-1</sup> protein)	Intestine (U mg <sup>-1</sup> protein)	Bile (U mL <sup>-1</sup> )
Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	108.0 ± 7.3	72.5 ± 8.5	4.79
Goldfish ( <i>Carassius auratus</i> )	23.8 ± 4.2	75.5 ± 15.8	1.61
Tench ( <i>Tinca tinca</i> )	13.1 ± 1.3	19.4 ± 2.7	n.a.
Seabream ( <i>Sparus aurata</i> )	2.7 ± 0.4	1.75 ± 0.28	0.84
Trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	0.0	1.30 ± 0.07	0.0
Eel ( <i>Anguilla anguilla</i> )	0.76 ± 0.08	0.46 ± 0.05	0.067

**Tableau 6** : Activité de l'amylase à 37°C dans le foie, l'intestin, et la bile, chez différents poissons : herbivores, omnivores ou carnivores (Krogdahl et al., 2005).



**Figure 12** : Activités enzymatiques au sein de différentes sections du tube digestif du saumon (Krogdahl et al., 1999). Les activités enzymatiques de la maltase, sucrase, trehalase et lactase sont exprimées en mmol de substrat hydrolysé par minute et mg de protéine de l'homogénat. Ces activités enzymatiques sont mesurées dans l'estomac (ST), les cæca pyloriques (PR), première moitié du *midgut* (MI1), deuxième moitié du *midgut* (MI2) et *hindgut* (DI).

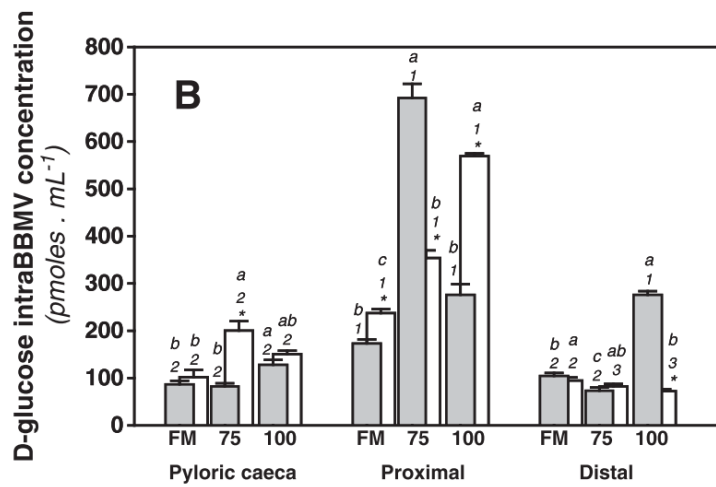
À l'inverse, l'amidon après extrusion et gélatinisation peut être digéré efficacement (plus de 95%) par les poissons carnivores comme la truite arc-en-ciel car ces poissons présentent des capacités de synthèse de l'amylase et de la maltase (Geurden et al., 2007; Santigosa et al., 2008).

**Plusieurs décennies de recherches ont permis de mieux comprendre comment les glucides alimentaires digestibles sont utilisés et métabolisés par les poissons carnivores d'aquaculture, comme la truite arc-en-ciel.**

#### **1.2.2.2. Enzymes impliquées dans l'hydrolyse des glucides digestibles**

Afin que les poissons puissent tirer de l'énergie des glucides alimentaires complexes (amidon, glycogène, etc. ), ils doivent pouvoir réaliser une hydrolyse de ces molécules pendant la digestion. Il existe deux catégories d'enzymes digestives, les endoglucosidases et les disaccharidases. Pour commencer, les endoglucosidases sont des enzymes digestives permettant d'hydrolyser des polysaccharides en disaccharides (Krogdahl et al., 2005). L' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) permet par exemple la production de maltose (disaccharides) à partir des composants de l'amidon : l'amylose et l'amylopectine. Cette enzyme a déjà été mise en évidence chez les poissons (Hemre, Mommsen, 2002; Hidalgo et al., 1999). L' $\alpha$ -amylase est une enzyme d'une grande importance chez les poissons herbivores et omnivores car elle leur permet de digérer certains polysaccharides contenus dans les plantes et algues. Toutefois, cette enzyme pancréatique est également retrouvée dans l'intestin de poissons carnivores (**Tableau 6**). À l'inverse des mammifères dans lesquels l' $\alpha$ -amylase est produite par la salive et par les cellules pancréatiques, chez les poissons l' $\alpha$ -amylase endogène est notamment produite par le pancréas (Krogdahl et al., 2005). La présence d' $\alpha$ -amylase exogène, produite par différentes bactéries amylolytiques du microbiote a aussi été mise en évidence (Reddy et al., 2008). Chez les salmonidés, comme ce qui est retrouvé chez d'autres animaux carnivores, il est démontré que la sécrétion d'amylase n'était pas augmentée par l'apport de glucides dans l'aliment (Bakke et al., 2010).

Par la suite, les disaccharides présentes dans le tube digestif des poissons, et en particulier le maltose issu de la digestion de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase, sont ensuite hydrolysées en monosaccharides, par des disaccharidases (maltases EC 3.2.1.20, sucrases EC 3.2.1.26, tréhalase EC 3.2.1.28, lactase EC 3.2.1.108) (Krogdahl et al., 1999). Ces enzymes sont à la fois retrouvées dans le mucus, proche des cellules intestinales, mais aussi au niveau de la lumière intestinale, ainsi que dans les contenus digestifs. L'activité enzymatique des disaccharidases est généralement plus forte au niveau des caeca pyloriques et du *midgut* (intestin proximal) qu'au niveau de l'*hindgut* (intestin distal) (Krogdahl et al., 1999). De plus, il peut être observé sur la **Figure 12** que l'activité de la maltase dans le tractus digestif du saumon atlantique est 8 à 10 fois plus grande que l'activité des enzymes sucrase, tréhalase, et lactase suggérant que ces poissons sont capables de tirer efficacement de l'énergie de la dégradation de l'amidon.



**Figure 13** : Concentration de D-Glucose au sein des vésicules de la bordure en brosse au niveau des caeca pyloriques, de l'intestin proximal, et de l'intestin distal, chez la truite arc-en-ciel, 6h (gris), et 36h (blanc) après le dernier repas. L'aliment à base de farine de poisson (**FM**) est remplacé à **75%** ou **100%** par des farines végétales (Santigosa et al., 2011).

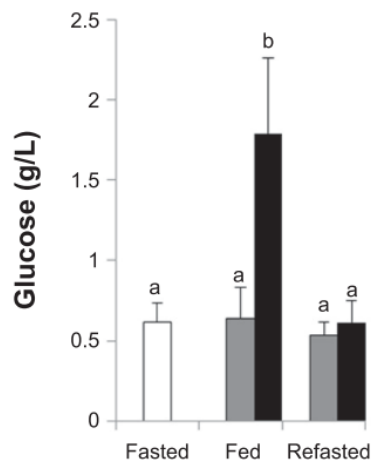
De la même manière que l'activité de l'amylase, les activités enzymatiques des disaccharidases ne semblent pas (ou peu) réagir à l'apport de glucides digestibles dans l'aliment chez la truite arc-en-ciel (Buddington and Hilton, 1987) et le saumon atlantique (Krogdahl et al., 1999). Finalement, la digestibilité des glucides a pu être améliorée chez la truite arc-en-ciel grâce aux techniques d'extrusion, permettant ainsi une forte digestibilité de l'amidon de plus de 90% chez la truite arc-en-ciel (Krogdahl et al., 2004) et rendant l'amidon plus accessible aux enzymes digestives.

**Les poissons carnivores d'aquaculture tels que la truite ou le saumon, possèdent donc les enzymes digestives leur permettant de récupérer efficacement du glucose à partir de l'hydrolyse de l'amidon (extrudé) par le biais de différentes enzymes digestives.**

D'autres enzymes existent chez les poissons, dont les chitinases (EC 3.2.1.14) permettant l'hydrolyse de la chitine, polysaccharides présents dans l'exosquelette d'insectes et d'invertébrés marins. Cette enzyme est d'ailleurs retrouvée dans l'estomac de la truite arc-en-ciel et pourrait être d'origine exogène (Lindsay et al., 1984). La truite est également capable de produire la cellulase (EC 3.2.1.4) (Bergot, 1981), enzyme permettant la digestion de cellulose présente, notamment, dans les algues. Ces acteurs ont été jusqu'à présent peu étudiés en nutrition des truites mais le développement de nouveaux aliments à base d'insectes et d'algues ouvre de nouvelles questions dans ce domaine.

### 1.2.2.3. Transport intestinal du glucose

L'hydrolyse des glucides complexes en glucides simples effectuée, ceux-ci vont pouvoir être absorbés par les cellules intestinales au niveau des microvillosités (**Figure 13**) afin d'être transportés dans différents organes par la circulation sanguine. Le passage des monosaccharides (glucose, galactose etc.), au travers des cellules entérocytes de l'intestin se fait grâce à deux transporteurs : les transporteurs *Na<sup>+</sup> dependent glucose cotransporters* (SGLTs) au niveau du pôle apical des cellules, et les transporteurs *Na<sup>+</sup> independent glucose transporters* (GLUT2) au pôle basal (Enes et al., 2011; Kamalam et al., 2017). Chez les poissons carnivores d'aquaculture, le tube digestif est souvent plus court que chez les poissons herbivores car il est plus adapté à la digestion d'un régime riche en protéines et faible en glucides (et fibres). Cependant, à la différence des mammifères pour lesquels l'entrée du glucose se fait uniquement au niveau de l'intestin grêle, chez le poisson l'absorption du glucose peut être réalisée après l'estomac, tout le long du tube digestif, et a lieu majoritairement au niveau de l'intestin proximal (*Midgut*) (Santigosa et al., 2011). De plus, comme le montre la **figure 13**, l'absorption de glucose chez la truite peut se faire jusqu'à 36h après le dernier repas (Santigosa et al., 2011) ; toutefois, chez la truite la glycémie est à son niveau le plus fort environ 6h après le dernier repas (Polakof et al., 2012).



**Figure 14** : Taux de glucose plasmatique, mesuré chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides (gris), avec de forts taux (28,4%) de glucides (noir), ou après une réalimentation et 4 jours de remise à jeun. (Marandel et al., 2015).

#### 1.2.2.4. Glycémie post-prandiale après ingestion de glucides

La glycémie correspond au taux de glucose résultant de la différence entre le flux de glucose entrant dans la circulation sanguine, et le flux de glucose sortant, pouvant être utilisé par les différents organes. Chez la truite arc-en-ciel, il a été estimé que la glycémie basale se trouvait aux alentours de 4 à 6 mmol/L, soit 0,72 à 1,09 g/L (Choi and Weber, 2015; Weber and Shanghavi, 2000).

Cependant, l'évolution des aliments aquacoles a abouti à une augmentation de la proportion de glucides dans ces aliments. Il a été découvert rapidement que la truite arc-en-ciel présente une faible régulation de sa glycémie postprandiale (Polakof et al., 2012). En effet, il est observé que la glycémie post-prandiale ne redescend à des valeurs basales que longtemps (12h) après un repas riche en glucides, et que ces valeurs de glycémie peuvent atteindre des concentrations très élevées, de l'ordre de 20 mmol/L (Callet et al., 2020; Hemre, Mommsen, 2002; Marandel et al., 2015; Panserat et al., 2009b; Skiba-Cassy et al., 2013; Song et al., 2018a). Il semble que c'est à partir de ~20% de glucides dans l'aliment, contenant des farines et huiles de poisson, que cette hyperglycémie post-prandiale est retrouvée (**Figure 14**). Cette hyperglycémie post-prandiale est souvent associée à une baisse des performances de croissance. Cependant, cette observation n'est pas systématique (Song et al., 2018b), suggérant une régulation de l'homéostasie glucidique dépendante de facteurs (biotiques ou abiotiques) encore inconnus.

**Il peut donc être estimé que l'utilisation d'environ 20% de glucides digestibles dans un aliment à base de farines et huiles de poisson constitue une limite à ne pas dépasser afin de ne pas induire de problèmes métaboliques chez la truite arc-en-ciel (Kamalam et al., 2017). Ceci représente la principale barrière à l'utilisation de cette source énergétique naturelle et durable, dans le but de diminuer les proportions de farines et huiles de poisson dans les aliments aquacoles.**

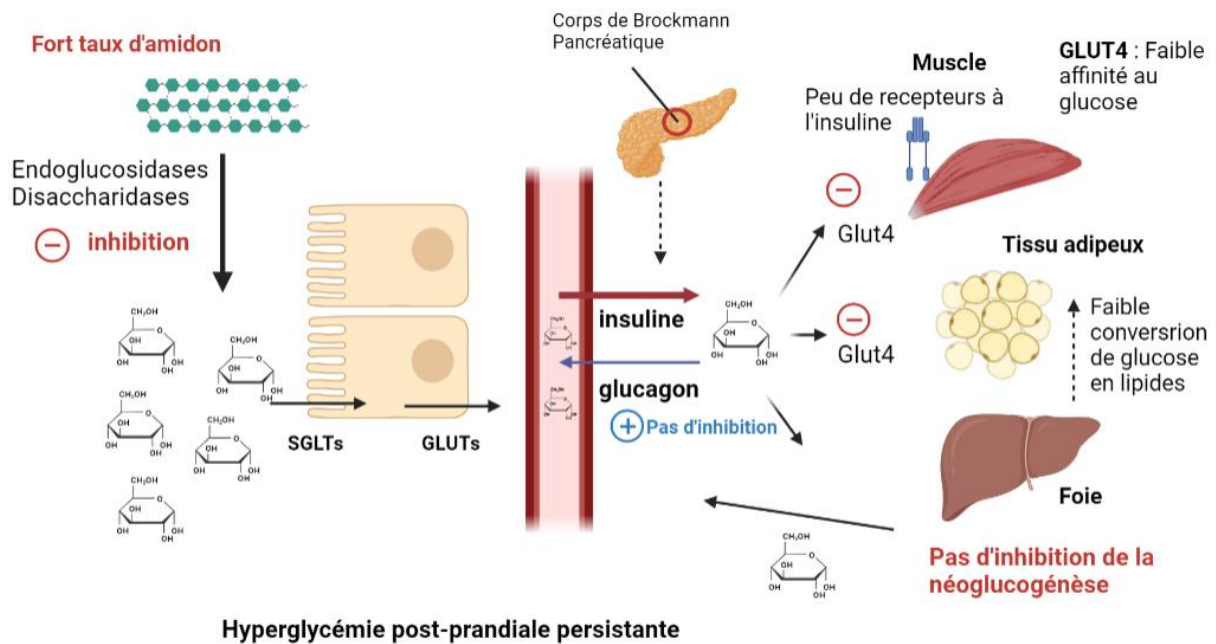




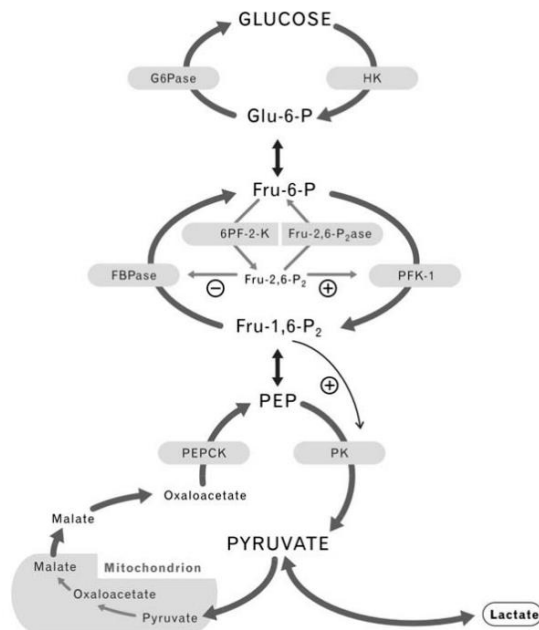
### 1.2.2.5. Régulation de l'homéostasie glucidique : rôle des différents tissus

Après un repas, la concentration de glucose dans le sang est, principalement, régulée par deux hormones pancréatiques : l'insuline et le glucagon. L'insuline est sécrétée à la suite d'un repas ou en réponse à différents stimuli. Chez la truite, l'insuline réduit le glucose plasmatique (S. Polakof et al., 2010b), stimule la prise de glucose par les tissus périphériques (S. Polakof et al., 2010b), active la glycogénèse et la lipogénèse (Polakof S, Skiba-Cassy S, Choubert G, 2010; Polakof et al., 2011a), et inhibe la néoglucogénèse et l'oxydation des acides gras (Plagnes-Juan et al., 2008; Polakof et al., 2011a). Cependant, la consommation de taux importants de glucides alimentaires induit une augmentation importante de la concentration d'insuline plasmatique, qui passe de 0,5-5 nM à 8,6 nM (Baños et al., 1998). Mais la faible quantité de récepteurs à l'insuline des cellules musculaires limite l'action de l'insuline et empêche la réduction de la glycémie post-prandiale (Moon, 2001; Navarro et al., 1999). De plus, le glucagon présente un rôle antagoniste de l'insuline. Une fois dans la circulation sanguine, le glucagon induit une augmentation de la production endogène de glucose par la glycogénolyse, et la néoglucogénèse (Polakof et al., 2011b) induisant une augmentation de la glycémie. Chez la truite, le taux de glucagon pancréatique est inversement corrélé aux proportions de glucides dans le régime alimentaire, mais n'est pas complètement absent lors d'une hyperglycémie (Del Sol Novoa et al., 2004; Forbes et al., 2019). Le rapport insuline/glucagon dans le plasma ne semble donc pas aussi élevé que chez les mammifères et pourrait expliquer en partie la faible utilisation des glucides alimentaires (Polakof et al., 2012).

Après digestion et absorption, le glucose postprandial peut être utilisé par différents organes (insulino-dépendants) comme le foie, les muscles, les tissus adipeux sous l'action de l'insuline/glucagon plasmatique. Le glucose est capté par les organes par le biais des transporteurs de type GLUTs (« GLUcose Transporters »). Plusieurs isoformes GLUTs sont retrouvées chez les salmonidés. GLUT1 et GLUT3 sont présents dans toutes les cellules (Hall et al., 2005; Teerijoki et al., 2000). GLUT2 est exprimé dans le foie par les cellules hépatiques, mais également dans les intestins et les reins et permet d'équilibrer la concentration de glucose entre le sang et les cellules en transportant le glucose dans les deux sens (Panserat et al., 2001). GLUT4 est exprimé dans les muscles, les tissus adipeux, et par les cellules cardiaques (Capilla et al., 2004). Chez les vertébrés, GLUT4 joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose car il permet l'entrée du glucose dans les tissus périphériques (muscles et tissus adipeux) grâce à sa translocation insulino-dépendante du cytosol à la membrane plasmique. Cependant chez la truite, ce récepteur semble avoir une faible affinité pour le glucose entraînant une faible entrée de glucose dans les cellules après la consommation d'un régime riche en glucides (Kamalam et al., 2013a), ce qui peut retarder l'entrée du glucose dans ces cellules et prolonger l'hyperglycémie post-prandiale.



**Figure 15 :** Hypothèses majeures expliquant l'apparition de l'hyperglycémie post-prandiale chez la truite arc-en-ciel nourrie avec des glucides (cf (Kamalam et al., 2017)).



**Figure 16 :** Étapes clés des voies de la glycolyse et de la néoglucogénèse. Les enzymes clés de la voie de la glycolyse sont : hexokinase (HK), 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), et pyruvate kinase (PK). Les enzymes clés de la néoglucogénèse sont phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-biphosphatase (FBPase), et glucose-6-phosphatase (G6Pase) (Enes et al., 2009). Ces enzymes clés catalysent des réactions irréversibles et sont ainsi les enzymes les plus contrôlées par l'apport en glucides alimentaires.

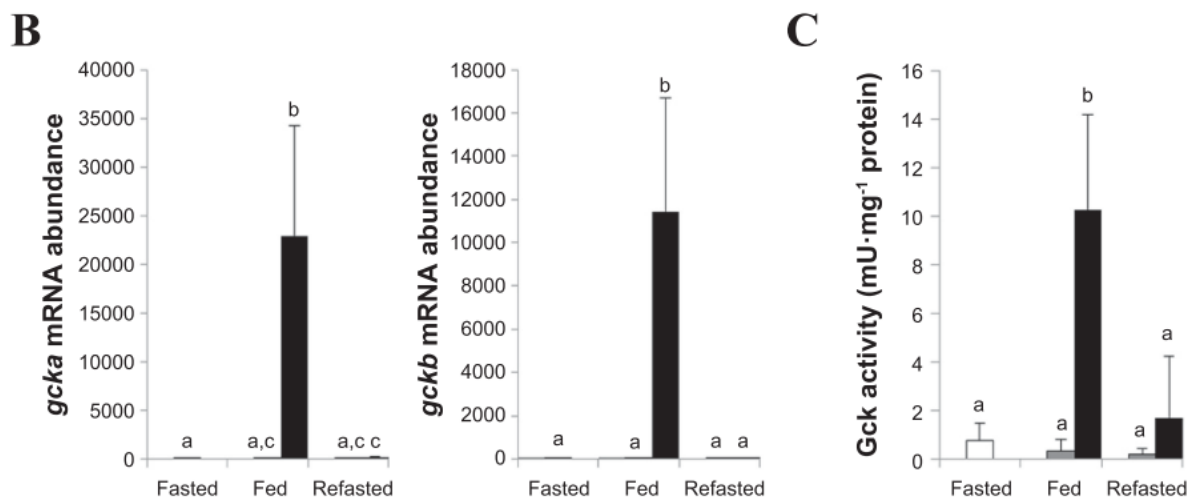
Le foie est l'organe clé de l'homéostasie glucidique par sa capacité de stockage du glucose en excès, mais également par sa production endogène de glucose (Kamalam et al., 2017; Polakof et al., 2012). Quand les concentrations de glucose sont élevées, les voies de la glycolyse, de la glycogénèse, et de la lipogenèse *de novo* sont activées dans le foie. En revanche, quand les concentrations de glucose sont faibles, les enzymes de la néoglucogénèse, et de la glycogénolyse sont activées afin de libérer du glucose dans l'organisme. Au niveau de ces voies métaboliques, d'autres hypothèses peuvent expliquer l'hyperglycémie post-prandiale, comme la non-inhibition de la voie de la néoglucogénèse même en présence de glycémie élevée (voir partie 3.2.6), la faible conversion de glucoses en lipides via la lipogenèse *de novo* (voir partie 3.2.8), ou encore l'absence de régulation du glucagon. Le foie sera au centre des études sur le métabolisme réalisées lors de cette thèse et les principales voies métaboliques sont détaillées dans les chapitres ci-après.

Il faut aussi noter que la faible utilisation du glucose par les tissus périphériques, et en particulier les muscles et les tissus adipeux, pourrait également être associée à l'hyperglycémie post-prandiale persistante chez la truite. Cette hyperglycémie est en partie expliquée par la faible quantité de récepteurs à l'insuline dans les tissus périphériques, comme le muscle (Navarro et al., 1999), et une faible activité enzymatique des hexokinases. Par ailleurs, une faible régulation de l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques est retrouvée chez la truite après une alimentation riche en glucides (Kamalam et al., 2013b).

Dans la **Figure 15** sont résumées les principales hypothèses pour expliquer la faible utilisation des glucides alimentaires chez la truite arc-en-ciel.

#### **1.2.2.6. Devenir du glucose alimentaire dans le foie : La glycolyse**

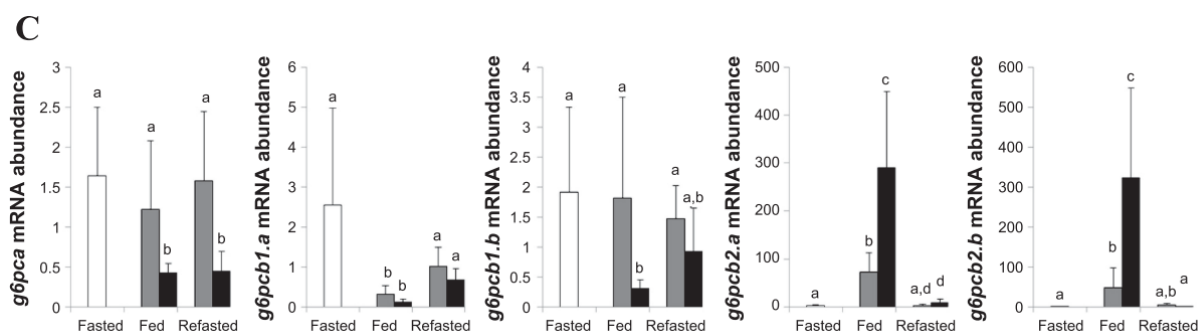
Le foie étant capable de dégrader le glucose (glycolyse), de le synthétiser (néoglucogénèse), de dégrader le glycogène en glucose (glycogénolyse) et de produire des lipides à partir de glucose (lipogenèse), il est donc considéré comme l'organe clé de la régulation du glucose dans l'organisme (voir chapitre précédent). À la suite de l'entrée du glucose dans les cellules hépatiques via le transporteur GLUT2 (Krasnov et al., 2001), celui-ci peut être utilisé notamment pour la production d'énergie. **La voie de la glycolyse, induite normalement par l'ingestion de glucides** (Soengas et al., 1995), s'effectue par une cascade de réactions enzymatiques, retrouvée chez la truite (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012), dont trois étapes sont irréversibles et catalysées par la glucokinase (GK, EC 2.7.1.2), la phosphofructokinase (PFK-1, EC 2.7.1.11), et la pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) (**figure 16**).



**Figure 17** : Expression des gènes ohnologues codant pour la glucokinase (*gcka* et *gckb*) ainsi que l'activité enzymatique de la glucokiase mesurée chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides (gris) ou avec de forts taux (28,4%) de glucides (noir), ou après une réalimentation et 4 jours de remise à jeun. (Marandel et al., 2015).

La première étape irréversible de la glycolyse consiste en la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate. Parmi les quatre isoenzymes apparentées à l'hexokinase chez le poisson, trois présentent une haute affinité pour le glucose (faible Km) et une, la glucokinase, présente une affinité forte pour le glucose (fort Km). Cette dernière est la seule enzyme pouvant être active en présence de grandes quantités de glucose (ce qui est le cas en phase postprandiale après ingestion de glucides). Chez le poisson, cette enzyme inductible par le glucose (GK) ne semble pas avoir d'activation progressive, mais plutôt une activation de type « on-off », liée à la présence ou à l'absence de glucides alimentaires digestibles (**figure 17**) (Panserat et al., 2014; Song et al., 2018b). Le principal mécanisme de régulation de cette enzyme est une régulation moléculaire de l'expression du gène. La phosphofructokinase est la seconde réaction irréversible de la voie de la glycolyse. Présente en troisième étape de cette voie, la phosphofructokinase permet la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate. L'activité enzymatique de la phosphofructokinase est modulée par la prise de glucides alimentaires (Fernández et al., 2007), mais plus faiblement que l'activité de la glucokinase chez le poisson (Enes et al., 2008). Pour finir, la dernière étape irréversible de la glycolyse, permettant la production de pyruvate à partir de phosphoénolpyruvate, est réalisée par le pyruvate kinase (Panserat et al., 2001). Chez la truite, une régulation atypique de l'expression du gène exprimant la pyruvate kinase est souvent retrouvée en présence de glucides alimentaires. En effet, il est observé une faible augmentation de l'activité de la pyruvate kinase par les glucides chez la truite, comme le montrent certaines études travaillant avec de la radioactivité ( $C^{14}$  Glucose) (Brauge et al., 1995). Le taux d'ARNm codant pour la PK semble, paradoxalement, moins élevé chez les truites nourries avec glucides (Song et al., 2018b). À la suite de la glycolyse, et en présence d'oxygène, le pyruvate issu de cette voie métabolique peut ainsi entrer dans la matrice mitochondriale et générer de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP.

**Comme attendu, la voie de la glycolyse hépatique semble bien induite par les glucides ingérés chez la truite, leur permettant de cataboliser le glucose en pyruvate, pouvant servir à la production d'énergie, voire à la production de lipides si le glucose est en large excès.**



**Figure 18** : Expression relative des gènes ohnologues codant pour la glucose-6-phosphatase mesurés chez la truite arc-en-ciel, à jeun (blanc), 6 heures après le dernier repas avec un régime sans glucides (gris) ou avec de forts taux (28,4%) de glucides (noir), ou après une réalimentation et 4 jours de remise à jeun (Marandel et al., 2015).

### 1.2.2.7. Synthèse endogène de glucose dans le foie : la néoglucogénèse

La néoglucogénèse permet la synthèse *de novo* de glucose à partir de substrats non-glucidiques. Cette voie est essentielle car elle permet de réguler les taux de glucose sanguin et d'éviter l'hypoglycémie chez les animaux (Forbes et al., 2019). Cette voie métabolique est donc - inversement à la glycolyse - **inhibée suite à l'ingestion de glucides alimentaires** (Bisschop et al., 2000). Différents substrats non glucidiques peuvent être utilisés comme précurseurs de la voie tels que les acides aminés, issus de la dégradation des protéines, le glycérol issu de la dégradation des triglycérides, ainsi que le lactate (Moon, 1988; Walton and Cowey, 1982). La néosynthèse de glucose est principalement réalisée dans le foie mais peut avoir lieu dans les reins, les muscles, et l'intestin. Les poissons étant de faibles consommateurs de glucides, la voie de la néoglucogénèse est essentielle pour eux car elle permet de synthétiser du glucose, source énergétique essentielle du cerveau.

Cette voie, correspondant à la voie inverse de la glycolyse, présente trois étapes unidirectionnelles et irréversibles, catalysées par les enzymes phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.32), fructose-1,6-biphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11), et glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) (**Figure 16**) (Enes et al., 2009). Les activités de ces trois enzymes clés semblent être fortement régulées par la prise de protéines digestibles chez les poissons (Guerreiro et al., 2014; S. Kirchner et al., 2003), en particulier l'alanine, la sérine, ou la glycine et semblent constituer les substrats privilégiés de cette voie. La PEPCK catalyse la conversion d'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate. Chez la truite arc-en-ciel, la PEPCK, régulée par l'insuline, présente une activité plus forte en présence d'un régime fort en protéines, qu'avec un régime fort en glucides (Enes et al., 2009). La FBPase catalysant l'hydrolyse du fructose 1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate, ne semble pas être activée par l'absence de nutriments et ne diminue pas en présence de glucides dans le régime alimentaire (Panserat et al., 2001). La Glucose-6-phosphatase catalyse la déphosphorylation du glucose-6-phosphate en glucose. L'activité de la GPase n'est ni affectée par la prise de glucides digestibles (0%, 8%, 12%, 20%), ni modifiée après 6h ou 25h après cette consommation (S. Panserat et al., 2000). La non-inhibition de la voie de la néoglucogénèse est probablement en partie responsable de l'hyperglycémie persistante car, en présence de glucides exogènes et d'un régime contenant des farines et huiles de poisson, cette voie n'est pas dérégulée (Moon, 2001). Selon Marandel et al., (Marandel et al., 2015), la duplication récente du génome de la truite arc-en-ciel, aurait entraîné la présence de plusieurs gènes ohnologues (gènes paralogues issus de la duplication complète du génome) codant pour l'enzyme glucose-6-phosphatase, hydrolysant le glucose-6-phosphate en glucose (Marandel et al., 2017). En effet, certains de ces gènes dupliqués (*g6pcb2a* et *g6pcb2b*) semblent être exprimés (et induits) même en présence d'un régime fort en glucides (**Figure 18**), ce qui pourrait expliquer en partie l'hyperglycémie post-prandiale persistante observée chez la truite.



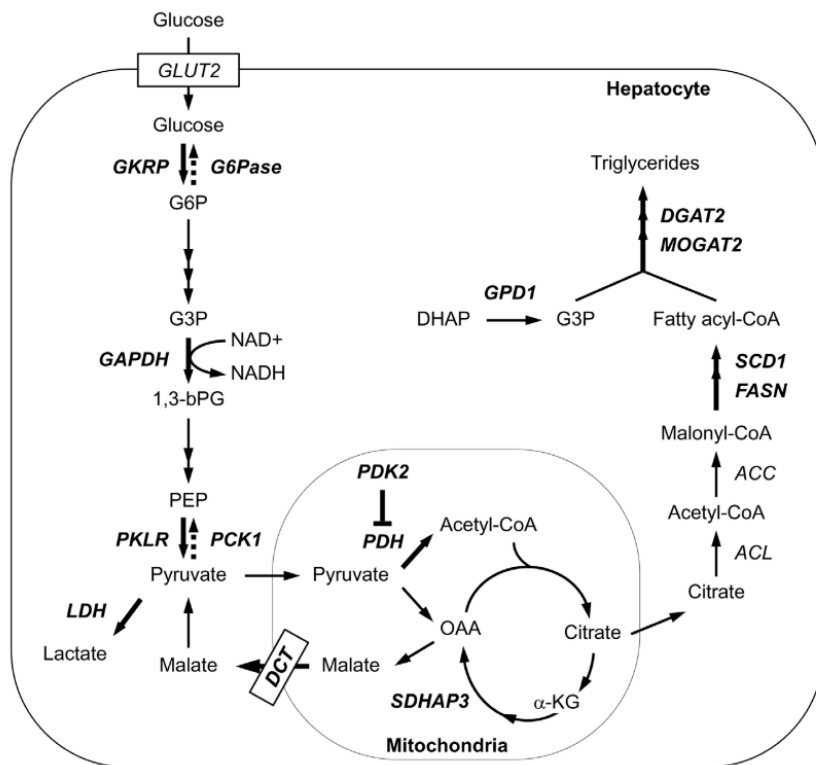
Tissue	Nutritional Group		
	Fed	Fasted	Refed
Liver	34.6 ± 5.20 <sup>a</sup>	9.73 ± 1.81 <sup>b</sup>	193 ± 13.3 <sup>c</sup>
Hypothalamus	2.80 ± 0.59 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.46 <sup>a</sup>	19.2 ± 1.84 <sup>b</sup>
Midbrain	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.08
Hindbrain	2.75 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.30 ± 0.03 <sup>c</sup>
White muscle	0.29 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.33 <sup>b</sup>
Kidney	0.58 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.09 <sup>b</sup>
Gills	0.44 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>b</sup>
Intestine	0.33 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>
Erythrocytes	0.59 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>b</sup>
Heart	5.08 ± 0.51 <sup>ab</sup>	6.71 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.73 ± 0.38 <sup>b</sup>

**Tableau 7** : Niveau de glycogène (en  $\mu$ mole de glycosyl par gramme de poids net) dans différents organes de la truite arc-en-ciel, nourrie avec des granulés contenant 6% de glucides digestibles (fed), mise à jeun (fasted), puis renourrie (refed). (Soengas et al., 2006).

#### **1.2.2.8. Lorsque le glucose alimentaire est en excès : première étape, la synthèse de glycogène**

Chez les mammifères comme chez le poisson, l'excès de glucose peut être stocké sous forme de glycogène, grâce à la glycogène synthase (EC 2.4.1.11). En ce qui concerne la truite, le foie est, en proportion, l'organe capable de stocker le plus de glycogène, jusqu'à 200 mg/g de tissus (Kamalam et al., 2017), ce qui représente 10 000 à 14 000 unités de glucose. D'autres organes comme les muscles, le cœur, ou encore le cerveau sont également capables de garder cette source énergétique mobilisable (**Tableau 7**) (Soengas et al., 2006). Les niveaux de glycogène dans les différents organes sont très dépendants des aliments consommés. D'ailleurs, en utilisant des molécules radioactives, il a pu être mis en évidence que l'amidon contribue fortement à la formation du glycogène hépatique chez le poisson (Felip et al., 2015). Dans le cas d'une absence de prise alimentaire, le glycogène peut être remobilisé par le poisson. Ainsi, ce polysaccharide peut être hydrolysé en molécules de glucose par l'activation de la glycogène phosphorylase (EC 2.4.1.1) (Enes et al., 2009). L'activation de la production de glycogène est activée par la prise alimentaire ou l'insuline, alors que la dégradation de cette macromolécule peut être induite par le glucagon chez la truite (Conde-Sieira et al., 2015; Polakof et al., 2012).

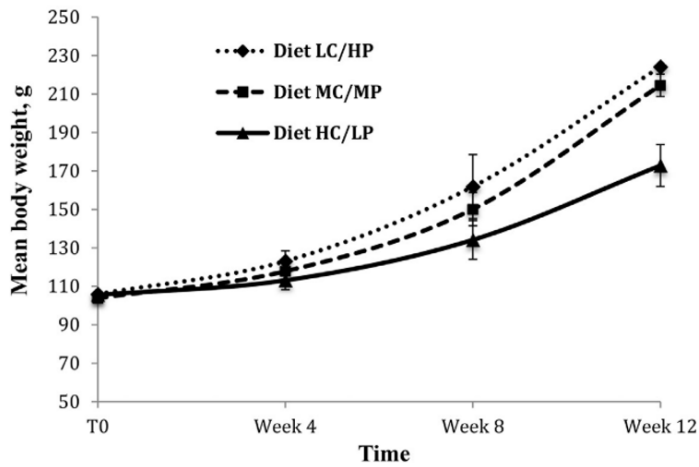
**Le glucose est donc stocké efficacement chez la truite sous forme de glycogène essentiellement dans le foie. Cependant, lorsque les glucides ingérés sont en large excès, ces derniers doivent alors être transformés en lipides par la voie de la lipogenèse.**



**Figure 19** : Vue générale du métabolisme lipidique présentant les acteurs impliqués dans la lipogenèse (Jeong et al., 2011).

### 1.2.2.9. Lorsque le glucose alimentaire est en excès : deuxième étape, bioconversion du glucose en lipides (lipogénèse)

La lipogénèse *de novo* est une voie métabolique régulée par la nutrition, permettant la transformation de glucose (ou des acides aminés) en lipides dans le foie ou dans les tissus adipeux des mammifères (**figure 19**) (Hellerstein, 1999; Yong Jeon et al., 2022). Les glucides ou les acides aminés sont catabolisés pour générer de l'acétyl-CoA puis du citrate dans les mitochondries. Le citrate est ensuite transporté dans le cytosol où par une cascade enzymatique, impliquant l'ATP citrate lyase (ACLY, EC 2.3.3.8), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC, EC 6.4.1.2), et l'acide gras synthase (FAS, EC 2.3.1.85), induit la production d'acide palmitique, d'acide stéarique, et de NADPH (Turchini et al., 2022). Le lien entre l'ingestion de glucides digestibles et l'induction de la voie de la lipogénèse a été mis en évidence chez les poissons, entraînant un dépôt de graisse, associé à une élévation de la production de NADPH et une plus forte activité de la FAS (Brauge et al., 1995; Dias et al., 2004; Polakof et al., 2011b). Cependant, il semblerait que la transformation du glucose en lipides via la lipogénèse *de novo* reste limitée chez les poissons carnivores (Ekman et al., 2013; Viegas et al., 2016). En effet il a été suggéré que, chez ces poissons, les glucides ont davantage un rôle positif afin de générer du NADPH, plutôt qu'un rôle de donneur de groupements carbonés (acétyl-CoA) pour la voie de la lipogénèse (Hemre, Mommsen, 2002). En fait, la lipogénèse chez la truite semble plus facilement induite par les acides aminés que par le glucose (Dai, 2015). Cette faible capacité à induire la lipogénèse par les glucides alimentaires serait une des raisons possibles de la faible capacité des truites à contrôler efficacement la glycémie après ingestion de glucides (Ekman et al., 2013; Rawles et al., 2008).



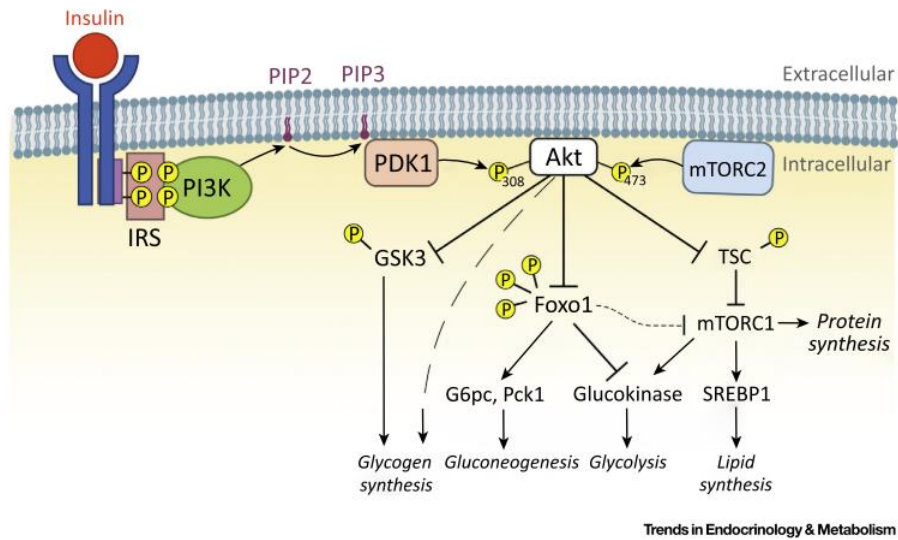
Diets	LC/HP	MC/MP	HC/LP
% CHO	4,4	17,7	25,9
% Prot	58,6	50,1	41,5

**Figure 20** : Courbes de croissance pour trois groupes de saumons nourris avec trois ratios glucides/protéines différents, pendant 12 semaines. (Villasante et al., 2022).

### 1.2.2.10. Jusqu'à 20% de glucides digestibles, une épargne protéique efficace chez la truite

Puisque les protéines sont les macronutriments les plus chers contenus dans les aliments proposés aux poissons d'élevage, il est nécessaire d'optimiser l'utilisation de ces protéines (et donc des acides aminés), principalement pour la synthèse protéique et la croissance des animaux (Steinberg, 2022). Ainsi, les glucides et les lipides sont des sources énergétiques intéressantes pouvant permettre une épargne en protéines (*protein sparing effect*) (Stone, 2003). Cette épargne protéique favorise l'utilisation des protéines (des acides aminés) pour la croissance et des autres macronutriments pour le métabolisme basal (Cho and Kaushik, 1990). De plus, la réduction de la proportion de protéines alimentaires permet de diminuer les rejets azotés dans l'environnement causés par le catabolisme des acides aminés et leur oxydation (Fernández et al., 2007; Peres and Oliva-teles, 2007). **Cette épargne protéique est alors considérée comme fonctionnelle par les nutritionnistes si elle n'entraîne pas de diminution de la croissance des poissons.** L'épargne protéique par les glucides (CHO), correspondant à l'augmentation du ratio CHO/protéines a déjà été testée sur différentes espèces de poissons et semble efficace chez les poissons omnivores (Li et al., 2020; Singh et al., 2006; T. Wang et al., 2021), car ces poissons d'élevage sont nourris avec des taux importants en glucides alimentaires (plus de 40% de glucides). De plus, même chez les salmonidés, *le protein sparing effect* des glucides a été démontré et est illustré sur la **Figure 20** (Kamalam et al., 2012; Villasante et al., 2022; T. Wang et al., 2021). Par ailleurs, l'effet d'épargne protéique peut être calculé avec le « *protein retention efficiency* » (PRE, %), correspondant au rapport entre la prise nette de protéines dans la composition corporelle et la prise de protéines provenant du régime alimentaire. Si ce rapport augmente, on estime qu'il reflète une utilisation efficace des nutriments et que l'épargne protéique a fonctionné (Song et al., 2018b). Toutefois, chez les poissons carnivores, un rapport CHO/protéines trop élevé dans l'aliment peut entraîner des diminutions de croissance (**Figure 20**), un problème de régulation du métabolisme, une hépatomégalie (hypertrophie du foie), une hyperglycémie postprandiale et, parfois, une plus forte mortalité (Li et al., 2020).

**L'utilisation d'un rapport adapté glucides/protéines permet de favoriser l'utilisation des protéines pour la croissance sans entraîner de diminution de croissance. L'introduction de glucides alimentaires est ainsi associée à une baisse du catabolisme des acides aminés (en tant que source d'énergie), permettant une diminution des rejets azotés dans l'environnement. De plus, cette épargne protéique est favorable pour les poissons carnivores, car elle permettrait de diminuer la proportion de facteurs antinutritionnels (souvent associés aux protéines végétales) et de réduire le coût des nouveaux aliments aquacoles.**



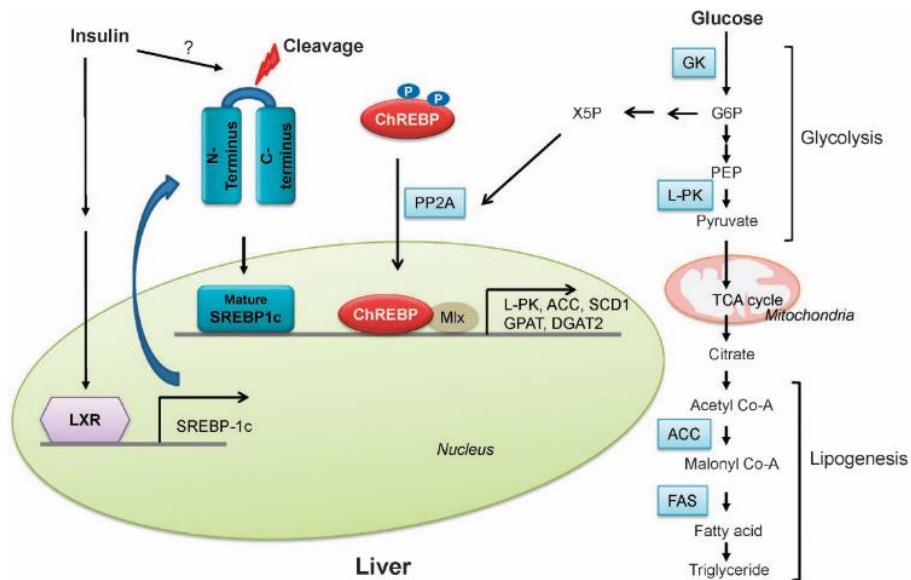
**Figure 21** : Représentation schématique des voies de signalisation insuline-dépendant dans le foie, permettant la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. (Titchenell et al., 2017).

### 1.2.2.11. Vue générale des mécanismes de régulation du métabolisme du glucose et de la lipogenèse hépatique par l'ingestion de glucides alimentaires

Le foie est un organe au centre du métabolisme intermédiaire chez le poisson comme chez l'homme car il est le régulateur de l'homéostasie glucidique, paramètre essentiel pour maintenir à long terme une bonne santé de l'hôte. Le foie contrôle les voies métaboliques de la glycogénèse, de la glycolyse, de la néoglucogénèse et de la lipogenèse, régulées principalement au statut nutritionnel et à la composition des aliments. Ces voies sont contrôlées par des acteurs multiples et à différents niveaux (expression de gènes, modifications post-transcriptionnelles, facteurs de transcription, hormones) (Polakof et al., 2012).

En phase post-prandiale, l'insuline (présentant un pic de sécrétion postprandiale) contrôle les niveaux de glucose plasmatique en induisant la sortie du glucose plasmatique et l'entrée de celui-ci dans les organes périphériques (Moon, 2004; S. Polakof et al., 2010b). Dans ces cellules, après fixation sur le récepteur à insuline, une cascade de signalisation s'enclenche (**Figure 21**). Chez les salmonidés, comme chez l'homme, après l'activation du récepteur à l'insuline, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est recrutée (Caruso and Sheridan, 2011). Cette kinase induit la phosphorylation de phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP2), en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Cette dernière permet le recrutement de la *pyruvate dehydrogenase kinase 1* (PDK1) et de AKT (protéine kinase B) (Navarro et al., 2002; Titchenell et al., 2017). Les jeux de phosphorylation de AKT, activant la voie mTORC1, entraînent une cascade de signalisation débouchant sur le relargage de facteurs de transcription tels que FoxO (Conde-Sieira et al., 2018; Gross et al., 2009). Cette cascade de signalisation activant la voie mTOR a déjà été démontrée chez la truite arc-en-ciel (Seiliez et al., 2008). Par ailleurs, l'inhibition de la voie AKT entraîne chez la souris knockout (KO) une augmentation de la prise de masse, expliquée par une non-inhibition de la voie de la lipogenèse (Horie et al., 2004; Leavens et al., 2009; Ono et al., 2003). La voie AKT active également les facteurs de transcription SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) et ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*). À l'inverse, chez la truite arc-en-ciel, le glucagon (hormone principalement sécrétée lors des phases à jeun) joue un rôle critique dans l'activation d'une cascade de signalisation de la voie AKT, et induit l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse mais aussi ceux de la néoglucogénèse (Forbes et al., 2019), ce qui permet de distribuer suffisamment de glucose dans les tissus périphériques en condition de carence.





**Figure 22** : Régulation transcriptionnelle de la glycolyse hépatique par deux facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP. (Han et al., 2016).

La voie de la glycolyse convertissant le glucose en pyruvate par une cascade d'activités enzymatiques est régulée (principalement) par deux facteurs de transcription : SREBP-1c, et le *carbohydrate response element binding protein* (Linden et al., 2018) (**Figure 22**). Lors de la consommation d'un régime riche en glucides, ces facteurs de transcription retrouvés chez la truite sont responsables de l'activation transcriptionnelle des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (Conde-Sieira et al., 2018). SREBP-1c active l'expression de la glucokinase, première enzyme de la glycolyse, et active également les gènes de la lipogenèse (fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, etc.) (Shimano et al., 1999). Dans les cellules hépatiques, le niveau transcriptionnel de SREBP-1c est principalement régulé par l'insuline. De plus, la transcription de SREBP-1c est contrôlée par le récepteur nucléaire des oxystéroïls LXR, lui-même activé par l'insuline (Repa et al., 2000; Zhu et al., 2020). LXR semble, chez la truite arc-en-ciel, avoir également un rôle régulateur de ChREBP dans le foie (Cruz-Garcia et al., 2009). Le facteur de transcription ChREBP peut être phosphorylé au niveau de 3 sites par l'*AMP activated protein kinase* (AMPK) dans des conditions de carences nutritionnelles. Durant l'alimentation le xylulose 5-phosphate (X5P) induit l'activation de la *protein phosphatase 2A* (PP2A), ce qui entraîne l'expression de nombreux gènes de la glycolyse et lipogenèse après l'activation de leur promoteur par le facteur de transcription ChREBP (Han et al., 2016).

**Les études de ces acteurs moléculaires sont d'une grande importance pour mieux comprendre comment la consommation de glucides alimentaires affecte le métabolisme intermédiaire et l'homéostasie de la truite arc-en-ciel. Toutefois, de plus amples études sont nécessaires pour la compréhension de ces mécanismes moléculaires afin d'optimiser l'utilisation des glucides alimentaires chez les poissons carnivores (comme la truite arc-en-ciel).**



### 1.3. Le microbiote intestinal des salmonidés

Le terme de microbiote correspond à une communauté complexe de microorganismes colonisant un écosystème. Le microbiote, précédemment appelé « microflore », est retrouvé dans différents environnements tels que la muqueuse buccale, la peau, ou encore le tractus digestif. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans la physiologie de l'organisme hôte en agissant sur différentes fonctions (Doré and Blottière, 2015). Le microbiote intestinal permet la dégradation de composés non-assimilables par l'hôte (Cantarel et al., 2012), comme décrit chez les ruminants où seuls les microorganismes présents dans le rumen sont capables de dégrader la cellulose. Le microbiote intestinal joue également un rôle dans la régulation du métabolisme de l'hôte notamment en synthétisant des vitamines, et peut également affecter sa capacité d'absorption des nutriments en modifiant la morphologie du tractus digestif (Dimitroglou et al., 2010). Le microbiote intestinal est aussi un facteur clé pour la santé de l'hôte en stimulant le système immunitaire (Huang, 2013), mais également en assurant une protection face à la prolifération potentielle de microorganismes pathogènes (effet barrière) (Huang, 2013). Ainsi, le microbiote est capable, au moins partiellement, de métaboliser les matières ingérées par l'hôte et en particulier les nutriments non assimilables par l'hôte tels que certaines fibres et glucides résistants (Scott et al., 2013). Ces nutriments permettent la croissance et la survie de ces microorganismes (Vincent B. Young, 2012), pendant que certains produits issus des métabolismes microbiens peuvent être utilisables par l'hôte. Le microbiote intestinal présente également un rôle crucial dans l'homéostasie énergétique du côlon. En effet, certains métabolites bactériens, et en particulier l'acide butyrique, servent de source énergétique préférentielle des cellules intestinales (Donohoe et al., 2011). Comme dit précédemment, une autre fonction essentielle du microbiote est son effet sur la réponse immunitaire (Elinav et al., 2011). Tout d'abord, les bactéries commensales jouent un rôle clé dans l'élaboration d'une fonction barrière dans l'intestin, visant à empêcher la prolifération de bactéries pathogènes et ainsi éviter leur entrée dans les tissus de l'hôte (Huang, 2013). Cette fonction barrière du microbiote est permise grâce à plusieurs mécanismes, dont la compétition aux nutriments, la limitation de l'accès aux sites d'adhérence, ou encore par la biosynthèse de peptides antimicrobiens (Hardt, 2011; Liévin-Le Moal and Servin, 2006). D'autre part, le microbiote intestinal influence fortement le développement du système immunitaire, inné et adaptatif (Geuking et al., 2014). La production d'acides gras à chaîne courte par le microbiote, et en particulier le butyrate, permet la stimulation des jonctions serrées des cellules intestinales (Peng et al., 2007). De plus, la reconnaissance de motifs moléculaires microbiens par les récepteurs intestinaux entraîne une stimulation du système immunitaire (Zipfel, 2009), et l'activation des lymphocytes T, et B (Atarashi et al., 2011).



Enfin, le microbiote affecte la morphologie du tube digestif telle que la taille et le nombre ou la largeur des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin (Dimitroglou et al., 2009).

L'importance du microbiote humain pour la santé a été largement démontrée. Pour ce qui est des écosystèmes digestifs non-humains, les recherches s'intensifient fortement. L'étude de certains microbiotes vise à augmenter la production animale (cochon, vache, poule et poisson) en améliorant notamment l'efficacité alimentaire (Pascoe et al., 2017) mais aussi le bien-être des animaux. Cependant, peu d'écosystèmes digestifs ont été explorés jusqu'à présent en dehors des mammifères. Les connaissances sur le microbiote intestinal des poissons nécessitent donc des recherches approfondies afin d'identifier sa fonction et son rôle sur la physiologie et la santé de l'hôte.

**Aujourd'hui, le développement de nouvelles techniques d'analyse du microbiote a permis de mieux comprendre l'importance du microbiote chez les mammifères. Si des études existent chez les salmonidés (Luna et al., 2022; Wang et al., 2018), le rôle fonctionnel du microbiote doit être clarifié. Toutefois, les études sont de plus en plus nombreuses et seront détaillées dans les parties suivantes.**



### 1.3.1 Diversité du microbiote intestinal des salmonidés

Chez l'homme, le tube digestif héberge des microorganismes dans toutes les sections, représentant plus de 1000 espèces microbiennes réparties dans tous les domaines du vivant (archées, bactéries, eucaryotes) (Kastl et al., 2020). C'est principalement au niveau de l'intestin que la population microbienne est la plus grande, soit environ  $10^{10} - 10^{11}$  unités formant colonies par mL. Chez les salmonidés, il a pu être montré que la densité bactérienne (nombre de bactéries par gramme) moyenne était de  $1.10^7$  dans l'estomac,  $8.10^6$  dans les caeca pyloriques, et  $5.10^7$  dans l'intestin (Navarrete et al., 2009).

Les microorganismes sont des êtres vivants présents dans tous les domaines de l'arbre du vivant : les procaryotes (les bactéries, et les archées) et les eucaryotes (levures, champignons). Les microorganismes procaryotes représentent une fraction majoritaire du microbiote humain (Hugon et al., 2015) et probablement, des espèces animales. Chez l'homme, la majorité des espèces bactériennes retrouvées sont anaérobies strictes, c'est-à-dire vivant uniquement en absence d'oxygène (Lozupone et al., 2012; Nagy, 2010), alors que chez les poissons, les bactéries peuvent tout autant être aérobies, anaérobies facultatives, et anaérobies strictes (Egerton et al., 2018; Nayak, 2010; Saha et al., 2006). Les fonctions des bactéries composant le microbiote (du moins chez les mammifères) ont été identifiées mais leur rôle reste à éclaircir chez les poissons.

Les archées sont des procaryotes se distinguant des bactéries notamment par l'absence de peptidoglycane au niveau de la paroi cellulaire. Par exemple, le genre *Methanobacterium* est important pour la digestion chez les ruminants et est aussi présent chez l'homme pour des fonctions de fermentation au niveau du tractus gastro-intestinal (Chellapandi et al., 2018). Chez le poisson, très peu d'informations sont disponibles sur la présence de ces microorganismes dans le tractus digestif, à part une étude mettant en évidence la présence de *Methanococcoides methylutens* au sein du tractus digestif du flet commun (*Platichthys flesus*) (Van Der Maarel et al., 1999). Différents organismes eucaryotes colonisent également le microbiote intestinal, tels que des levures, ou encore des protozoaires. Plusieurs espèces de levures ont déjà été mises en évidence chez la truite arc-en-ciel dont *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sp*, *Debaryomyces hansenii*, ou encore *Leucosporidium sp* (Aubin et al., 2005; Gatesoupe, 2007; Waché et al., 2006). Enfin, des virus de type bactériophage (virus spécifiques des bactéries) ont également été retrouvés dans le tractus intestinal des poissons, mais leur rôle est encore peu connu (Bastías et al., 2010).





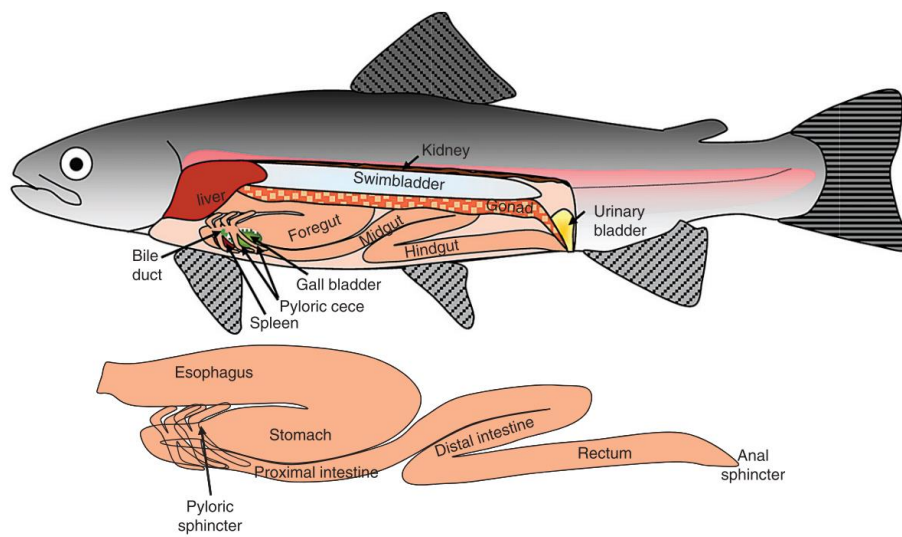
Bien que le microbiote intestinal des poissons soit complexe et composé de toutes sortes de microorganismes, les bactéries étant majoritairement retrouvées dans les microbiotes intestinaux, la majorité des études s'intéresse à leurs fonctions. Les bactéries sont classées en différents rangs taxonomiques, du plus haut au plus bas : phylum, classe, ordre, famille, genre, espèce, souche. À la différence de l'homme, pour lequel le microbiote est principalement dominé par les phyla des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*, chez les salmonidés les phyla majoritaires sont les *Proteobacteria*, et les *Firmicutes* (Romero et al., 2014). Les bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* sont généralement retrouvées en plus faible quantité chez les poissons. Les microbiotes des poissons marins sont principalement composés de bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacteriaceae*, *Micrococcus*, et *Lactobacillus*. Les poissons d'eau douce présentent, eux, dans leur tube digestif les genres *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacteriuaceae*, et *Micrococcus*. Si certains genres sont présents chez les poissons d'eau douce et marins, des différences existent suggérant un effet, notamment, de l'environnement ou de l'hôte lui-même. Cependant, de nombreux paramètres biotiques (facteurs liés aux êtres vivants, relations avec les autres organismes) et abiotiques (composantes physico-chimiques de l'environnement) peuvent affecter la composition du microbiote intestinal, comme la localisation dans les différentes sections du tube digestif, ainsi que l'âge, la salinité, la génétique de l'hôte, la présence d'antibiotiques, ou encore la composition des régimes alimentaires. Mais tout d'abord, comment le microbiote s'implante-t-il chez les salmonidés et quels sont les compartiments du tube digestif ?



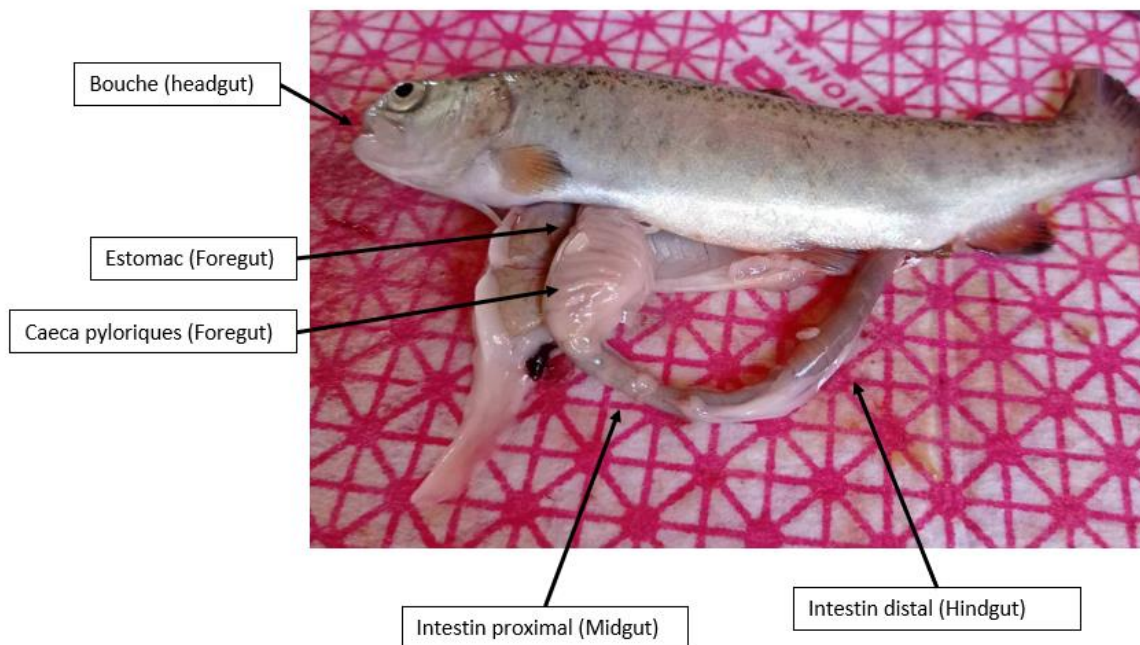
### 1.3.2. Implantation du microbiote intestinal chez les salmonidés

Le tractus digestif constitue une niche favorable pour les microorganismes chez les poissons. Les premiers stades du développement des vertébrés se déroulent dans les limites protégées du chorion, un environnement dépourvu de micro-organismes (Roeselers et al., 2011). Chez les poissons, l'implantation du microbiote se réalise dès les premières heures après la naissance. En effet, après éclosion des œufs, les poissons sont exposés directement aux microorganismes présents dans leur environnement (Ringø and Birkbeck, 1999). La surface externe des poissons est alors rapidement colonisée par les microorganismes de l'eau notamment. De plus, des études ont démontré que les bactéries retrouvées dans les éclosiers, dans l'eau, ou bien dans les granulés donnés aux poissons étaient retrouvées dans le tube digestif de ces poissons (Cahill, 1990; Lavoie et al., 2018; Olafsen, 2001). En outre, les larves de poissons peuvent ingérer de petites quantités de bactéries en se nourrissant de particules en suspension (Hansen and Olafsen, 1999). Il est alors supposé que les débris d'œufs, pourraient être responsables en partie de la première colonisation du tube digestif (en formation) de ces larves, puisque la présence de glycoprotéines de la surface des œufs est propice à l'adhésion et à la colonisation bactérienne. Ainsi, la surface des œufs permet la prolifération de bactéries appartenant majoritairement au phylum des *Proteobacteria* (Hansen and Olafsen, 1999). En utilisant des techniques de biologie moléculaire, des chercheurs ont mis en évidence les bactéries majoritaires du tractus digestif présentes dans les premiers stades de développement chez le saumon argenté (*Oncorhynchus kisutch*) (Romero and Navarrete, 2006). Pendant les premiers jours de nutrition, ce sont les bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria* qui sont retrouvées en plus grand nombre, en particulier les genres *Shewanella* et *Aeromonas*. Enfin chez les juvéniles, pesant plus de 2 grammes, les bactéries dominantes sont composées du genre *Aeromonas*, déjà présent plus tôt, mais aussi du genre *Pseudomonas*, suggérant une importance du phylum *Proteobacteria* dans les stades précoces de vie. Ces chercheurs ont également montré que ces bactéries étaient retrouvées dans l'eau des bassins et également sur les œufs, mais pas dans l'aliment (extrudé) donné aux poissons. Ensuite, le microbiote intestinal des poissons semble être grandement modifié dans les premiers jours de nutrition. C'est en effet après plusieurs jours de nutrition que des bactéries ayant des propriétés de fermentation, tels que *Vibrio* spp., sont détectées. Finalement, ce n'est qu'à partir du 26<sup>ème</sup> jour (~4 semaines) après éclosion que le microbiote intestinal chez les poissons semble se stabiliser (Ingerslev et al., 2014).

**Il est donc reconnu que le microbiote intestinal chez les poissons s'établit dès les premiers stades de développement et pourrait provenir de l'eau, des résidus d'œufs (chorion), et des aliments donnés aux poissons.**



**Figure 23** : Représentation schématique du tractus gastrointestinal ainsi que des organes associés chez la truite arc-en-ciel. (Olsson, 2011).

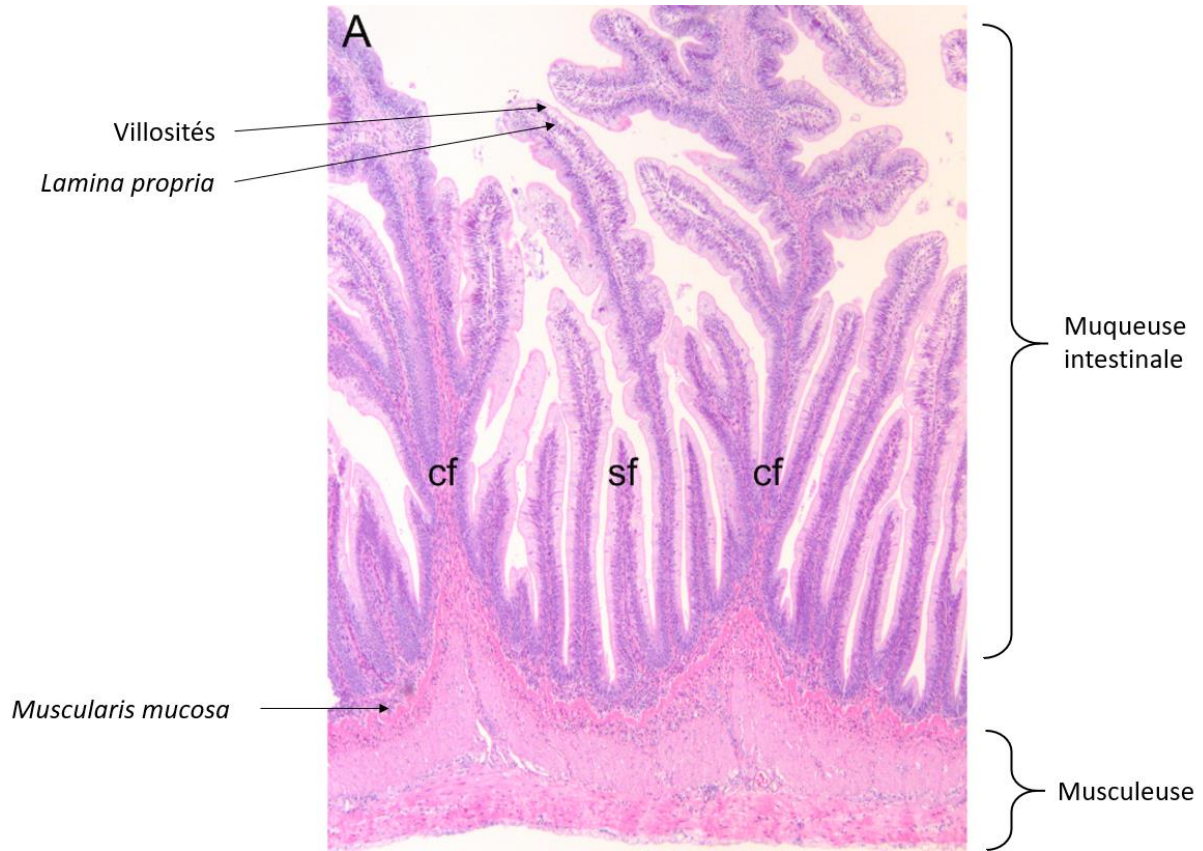


**Figure 24** : Présentation des différentes sections du tractus digestif chez la truite arc-en-ciel.

### 1.3.3. Répartition sélective des microorganismes dans les différents compartiments du tractus digestif de la truite arc-en-ciel

Les premiers microorganismes implantés vont pouvoir coloniser l'ensemble des compartiments du tube digestif des salmonidés. Mais qui sont-ils ?

Une fois développé, le tube digestif des salmonidés (**Figure 23 & 24**) présente quelques similarités avec celui des mammifères (Bjørngen et al., 2020; Olsson, 2011). Il débute par la bouche (« *headgut* ») leur permettant de capturer leur nourriture. Celle-ci est morphologiquement différente selon le type de nourriture consommé (Orlandi et al., 2017). De petites dents sont présentes sur la mâchoire des salmonidés, leur permettant de capturer de petites proies vivantes (Constantinescu et al., 2015). Une fois ingérés, les aliments passent par l'œsophage pour arriver au niveau de l'estomac (« *foregut* »). La première partie de cet organe, en forme de sac, pourrait être un site important pour la dégradation enzymatique des aliments réalisée grâce à la sécrétion de différentes enzymes (protéases, amylases, lipases) (Conde-Sieira et al., 2014) et à une acidité importante. La seconde partie du *foregut* présente chez la truite de nombreux caeca pyloriques (Ray et al., 2012). Ceux-ci sont formés d'une multitude de petits appendices (Olsson, 2011). La fonction des caeca pyloriques reste encore méconnue chez les salmonidés mais elle pourrait permettre une augmentation de la surface d'absorption des nutriments (Krogdahl and Bakke-McKellep, 2005). Les aliments en digestion sont ensuite retrouvés dans les intestins proximaux et distaux (« *midgut* » et « *hindgut* »). Le *midgut* (intestin proximal) correspond à l'intestin grêle chez l'homme, fortement impliqué dans l'absorption des nutriments (Santigosa et al., 2011). L'*hindgut* correspond à l'intestin distal et au côlon. Chez les poissons herbivores, le *hindgut* semble être particulièrement important. En effet, les poissons herbivores et omnivores présentent un intestin plus long leur permettant une dégradation plus lente de certains nutriments (fibres). Les salmonidés, poissons carnivores, possèdent une longueur intestinale en général plus faible que la plupart des poissons herbivores (Li et al., 2018). Chez les poissons herbivores, comme le tambour argenté (*Kyphosus sydneyanus*) consommant des régimes à base de plantes, le microbiote intestinal présent au niveau de l'intestin distal (*hindgut*) joue un rôle très important dans la digestion des aliments. En effet, les bactéries du phylum des *Firmicutes* sont majoritaires et sont impliquées dans la fermentation des fibres et la production d'acides gras à chaîne courte (Mountfort et al., 2002; Pardesi et al., 2022).

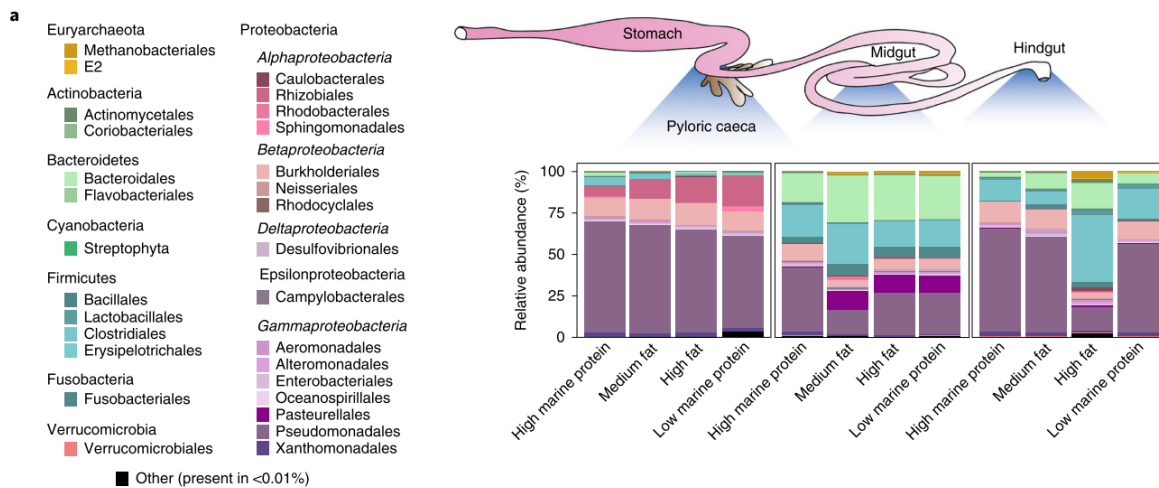


**Figure 25** : Coupe intestinale d'un segment de l'intestin proximal (« midgut ») d'un saumon d'Atlantique, issu de (Bjørngen et al., 2020) et (Lkka et al., 2013), modifié. sf : Microvillosités simples (« simple folds»), cf : Microvillosités complexes (« complex folds »).

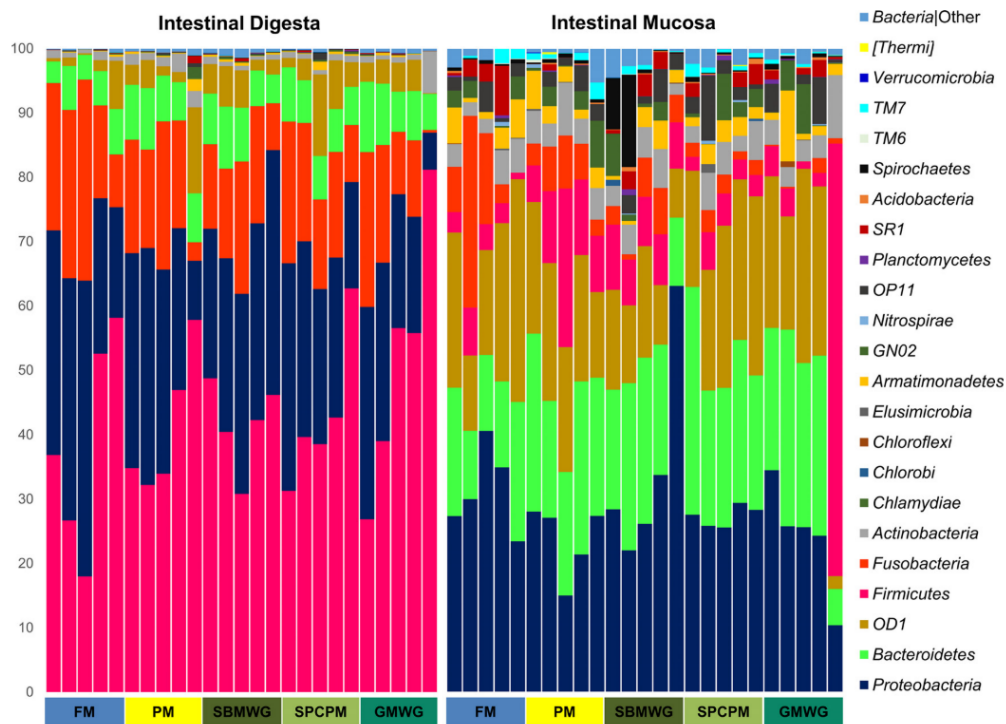
Au sein des différentes sections de l'intestin, plusieurs couches fonctionnelles sont retrouvées chez la truite arc-en-ciel (Kim et al., 2007). La muqueuse intestinale consiste en une simple couche de cellules épithéliales. Cette couche de cellules prend la forme d'une bordure en brosse (**Figure 25**). Ces nombreuses villosités intestinales permettent d'augmenter considérablement la surface d'absorption des nutriments (Bjørngen et al., 2020). Le tissu épithélial est lié à la *lamina propria*, couche épaisse de tissus conjonctifs, associé à une couche de muscles (*muscularis mucosa*). Ces trois tissus permettent le transit intestinal des nutriments vers la circulation sanguine, et constituent également une barrière empêchant l'entrée de microorganismes dans l'organisme. Au niveau du tube digestif, la production de mucus est réalisée par des cellules caliciformes dites cellules à mucus. Le mucus consiste en une sécrétion de la glycoprotéine mucine au sein d'un gel visqueux permettant d'empêcher l'adhésion et la prolifération de bactéries au niveau des cellules épithéliales (Jin et al., 2015). Le mucus n'a pas seulement une fonction barrière, il transporte aussi différentes sources protéiques et glucidiques favorisant la prolifération de certaines bactéries commensales de l'intestin (Adak and Khan, 2019; Li et al., 2021).

L'établissement du microbiote intestinal varie longitudinalement tout au long du tractus digestif, mais également transversalement, entre la muqueuse et la lumière intestinale (où sont retrouvés les contenus digestifs). La multiplication des différents microorganismes au sein des différents compartiments du tractus digestif dépend de nombreux facteurs : la capacité d'adhésion de certaines bactéries au mucus, leur capacité de dégradation de substrat, ou encore la résistance à l'acidité de l'intestin, ce qui permet la prolifération des bactéries et leur répartition sélective dans les différentes sections (W. Liu et al., 2014).





**Figure 26** : L'abondance relative des différentes communautés microbiennes au niveau taxonomique de l'ordre, au sein de différents compartiments du tube digestif (Caeca Pylorique, *Midgut*, *Hindgut*), chez le bar commun nourri avec différents régimes alimentaires. (Kokou et al., 2019).



**Figure 27** : Composition du microbiote de l'intestin distal au niveau du phylum dans la lumière intestinale (Intestinal Digesta) et dans le mucus (Intestinal mucosa) chez le saumon (*Salmo salar*) nourri avec différentes sources nutritives. (Gajardo et al., 2017).

Chez les poissons, des études ont également été menées pour identifier les changements du microbiote intestinal entre les différentes sections de l'intestin (**Figure 26**), mais aussi entre les contenus digestifs et le mucus intestinal (**Figure 27**). Tout d'abord, une plus faible diversité bactérienne est observée dans les caeca pyloriques par rapport aux *midgut* et *hindgut* (Kokou et al., 2019). Les auteurs suggèrent que cette plus faible variabilité pourrait provenir du faible pH dans les caeca pyloriques en comparaison avec les autres segments de l'intestin, ce qui engendre une forte pression de sélection. À l'inverse, comme le confirment certaines études (Gajardo et al., 2016; Kononova et al., 2019), il ne semble pas y avoir de changements importants entre les communautés bactériennes des régions du *midgut* et de l'*hindgut* chez les salmonidés (Ricaud et al., 2018). Ces régions sont principalement colonisées par des bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria*, des phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria* y sont aussi retrouvées. Par contre, d'importants changements sont observés chez les salmonidés entre le microbiote associé aux contenus digestifs (« digesta ») (lumière intestinale) et le microbiote associé au mucus (« mucosa ») (Gajardo et al., 2017; Li et al., 2021; Lokesh et al., 2023). Il est parfois difficile d'associer un changement de la diversité du microbiote à un seul facteur tant ceux-ci sont multiples et simultanés (alimentation, génétique de l'hôte, environnement ; cf. partie 1.3.4.). Cependant, une augmentation du ratio *Firmicutes/Proteobacteria* est souvent observée dans les contenus digestifs par rapport aux bactéries présentes dans les mucus (Gajardo et al., 2016). Chez l'homme, le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* est couramment utilisé (Mariat et al., 2009), celui-ci est peu utilisé chez les poissons à cause de la faible proportion de *Bacteroidetes*. L'augmentation du rapport *Firmicutes/Proteobacteria* dans les contenus digestifs des salmonidés est en partie expliquée par une plus grande abondance de bactéries ayant des propriétés de fermentation et, notamment, une plus grande abondance de bactéries lactiques ou du genre *Bacillus* (*Firmicutes*), fortement impliquées dans la dégradation des nutriments. Par ailleurs, une diminution de la diversité microbienne est observée dans les échantillons de mucus comparés aux échantillons de contenus digestifs (Gajardo et al., 2016; Lokesh et al., 2023). Il est également démontré que les microorganismes présents dans les mucus sont probablement plus affectés par la génétique de l'hôte (Ringø et al., 2016), alors que ceux présents dans les contenus digestifs pourraient être influencés par de multiples facteurs environnementaux, et en particulier la dégradation des aliments (Legrand et al., 2021). De plus, dans certaines études une grande proportion de bactéries du genre *Mycoplasma* est retrouvée dans le mucus. En effet, à cause de son génome réduit, le genre *Mycoplasma* présente une capacité de biosynthèse limitée : ces bactéries peuvent être retrouvées à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin afin de récupérer certains nutriments de l'hôte (acides aminés, acides gras, etc.). Bien que les bactéries du genre *Mycoplasma* soient connues pour être pathogènes opportunistes (Sáez et al., 2003), il semblerait que les souches présentes chez les salmonidés soient dépourvues de certains facteurs de pathogénicité (Cheaib et al., 2021).



De plus, ces bactéries pourraient présenter une relation symbiotique avec l'hôte puisque des gènes codant pour la riboflavine (vitamine B2) ont été découverts dans leur génome (Rasmussen et al., 2023).

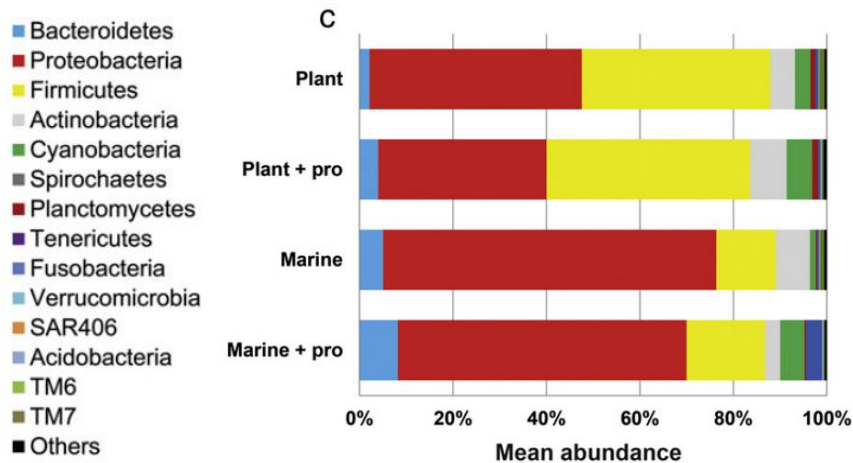
### **1.3.4. Facteurs biotiques et abiotiques influençant la diversité du microbiote**

Le microbiote intestinal des poissons est sensible à de nombreux facteurs. En effet, il varie en fonction de facteurs abiotiques : l'habitat, la qualité de l'eau, la salinité, le régime alimentaire, le niveau trophique, la présence d'antibiotique ; et de facteurs biotiques : stress, statut immunitaire, le comportement, ou encore l'âge des poissons. Dans le cadre de cette thèse, le seul facteur que nous souhaitons mettre en évidence est l'effet alimentation. Il est donc essentiel de limiter au maximum l'effet des autres facteurs. C'est pourquoi, par souci de synthèse, cette partie s'intéressera principalement à l'effet de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinal.

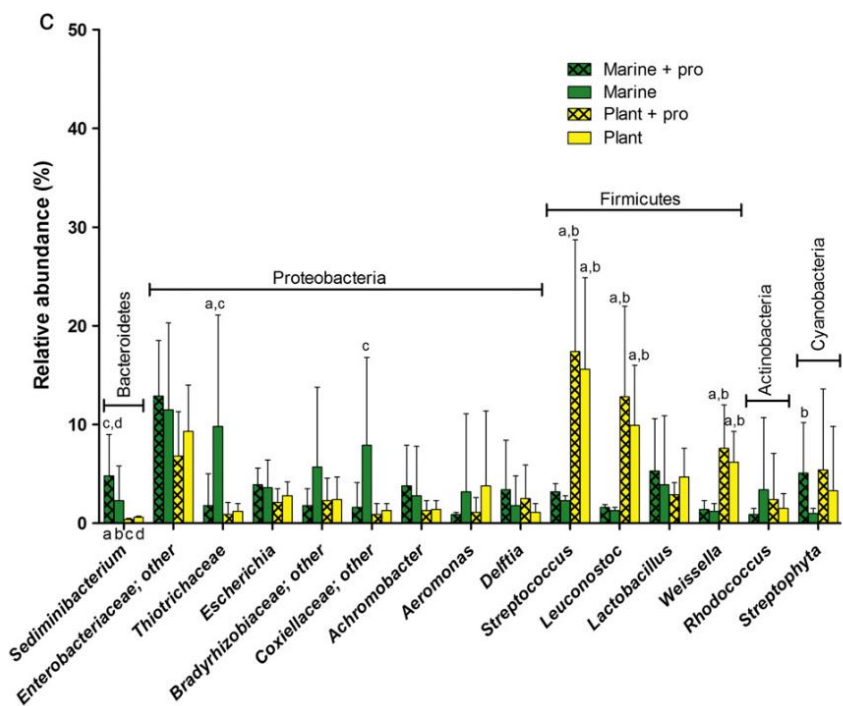
#### **1.3.4.1. Facteur abiotique : Effet de l'alimentation sur le microbiote**

L'alimentation est un facteur essentiel influençant la composition du microbiote intestinal car il conditionne le flux de nutriments et d'énergie disponible pour le microbiote intestinal, et affecte les paramètres physico-chimiques du milieu tels que l'acidité ou le potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Ainsi, la proportion de chaque type de nutriments (protéines, glucides, lipides) va favoriser la prolifération de bactéries spécifiques, spécialisées dans leur dégradation, et ce, au sein des différentes sections du tube digestif. L'alimentation peut également être considérée comme un facteur biotique en cas de consommation de probiotiques par exemple.

**Glucides digestibles et non digestibles.** Les polysaccharides non digestibles, tels que les constituants des parois des végétaux (cellulose, hémicellulose) ou l'amidon résistant, représentent une part importante de l'alimentation humaine. Chez l'homme, la majorité des glucides digestibles consommés est rapidement absorbée au niveau de l'intestin grêle après différentes hydrolyses enzymatiques (amylase, maltase, tréhalase, lactase), ne laissant qu'une faible proportion des glucides non digérés arriver jusqu'au niveau du côlon. À l'inverse, les glucides non digestibles (fibres), représentent la majeure partie des glucides non digérés du tube digestif et sont une source importante d'énergie pour les bactéries amylolytiques, et cellulolytiques (LeBlanc et al., 2017). Parmi les groupes bactériens présentant la plus grande capacité de dégradation de ces glucides non digestibles, il est retrouvé des bactéries du phylum des *Firmicutes*, et des genres *Ruminococcus*, *Eubacterium*, et *Bifidobacterium* (Ze et al., 2012). Chez les poissons herbivores consommant des quantités élevées de glucides non digestibles, le phylum *Firmicutes* est dominant et particulièrement la classe des *Bacilli* (Pardesi et al., 2022). Chez les salmonidés, l'utilisation de glucides digestibles affecte significativement les phyla des *Firmicutes*, *Proteobacteria*, et *Actinobacteria* (Villasante et al., 2022).



**Figure 28** : Abondances relatives des phyla identifiés dans les contenus digestifs du microbiote intestinal de la truite arc-en-ciel, après 49 jours de nutrition avec un régime composé majoritairement d'ingrédients végétaux (Plant), de farines et huiles de poisson (Marine), avec utilisation d'un probiotique (Pro). (Ingerslev et al., 2014).

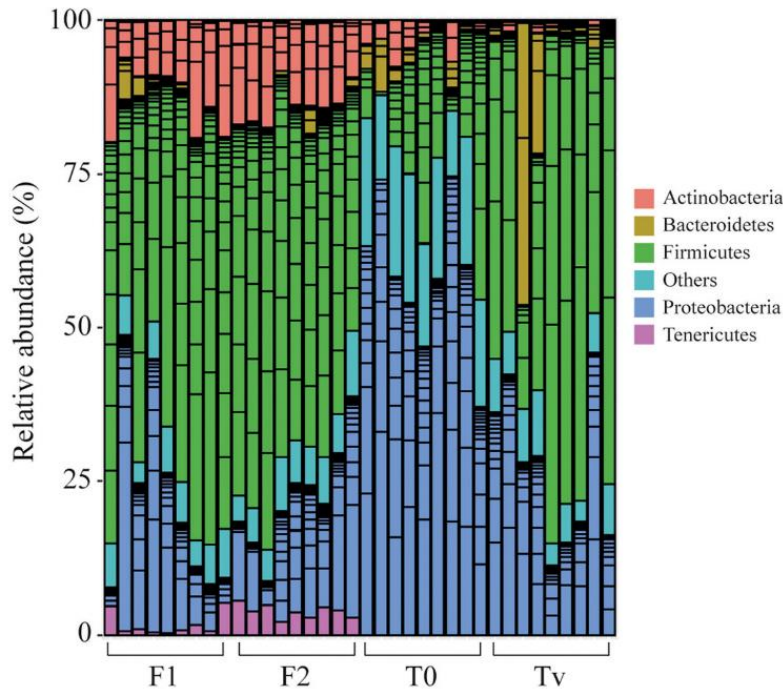


**Figure 29** : Représentation de l'abondance relative des 15 genres bactériens les plus abondants après 49 jours de nutrition avec un régime composé majoritairement d'ingrédients végétaux (Plant), de farines et huiles de poisson (Marine), avec utilisation d'un probiotique (Pro). (Ingerslev et al., 2014).

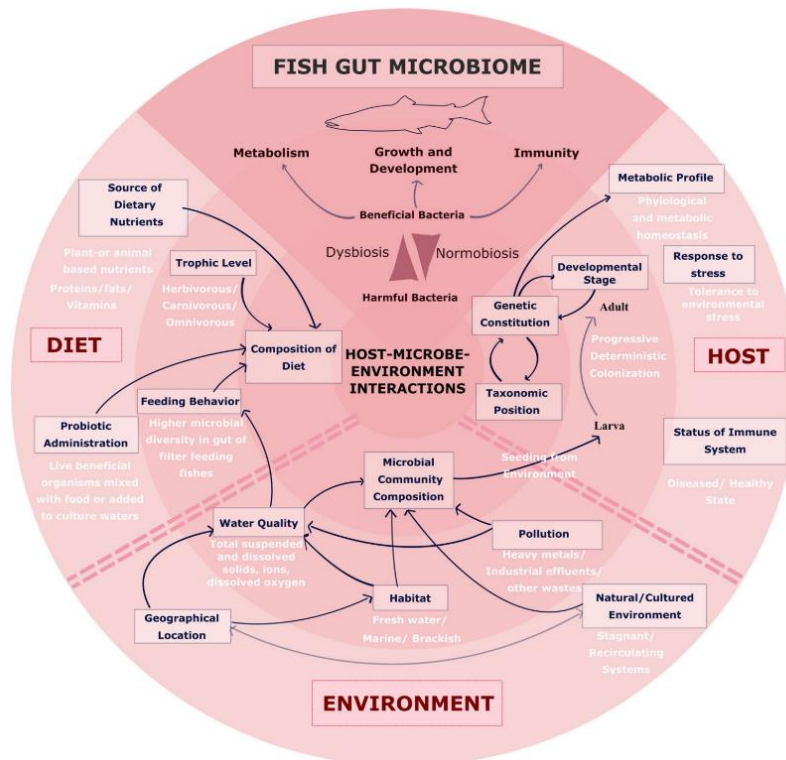
De plus, l'utilisation d'ingrédients végétaux, contenant des proportions importantes de glucides non digestibles semble augmenter le ratio *Firmicutes/Proteobacteria* (Ingerslev et al., 2014; Pérez-Pascual et al., 2021). L'augmentation des *Firmicutes* est expliquée en partie par une plus forte abondance des bactéries lactiques telles que les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*. La digestion de ces glucides aboutit notamment à la libération d'acides gras à chaîne courte, des vitamines, et des gaz (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) (Daisley et al., 2021; LeBlanc et al., 2017).

**Protéines.** Chez l'homme, une alimentation riche en protéines induit principalement la prolifération des bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes*, et en particulier les bactéries du genre *Bacteroides sp.* et *Alistipes putredinis* (David et al., 2013; Wu, 2011). Ces bactéries ont la capacité de dégrader les protéines, ce qui aboutit à la sécrétion d'ammoniac, amines libres, sulfures, dihydrogène (H<sub>2</sub>), dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), méthane (CH<sub>4</sub>), mais aussi des acides gras à chaîne courte. Cette protéolyse bactérienne a lieu principalement dans les premiers segments du tube digestif, où le pH est neutre (Hamer et al., 2011; Walker et al., 2005). Chez les salmonidés, ce sont les bactéries du phylum des *Proteobacteria* qui sont majoritairement retrouvées en présence d'un régime riche en protéines digestibles (Weththasinghe et al., 2022), avec une forte abondance des *Proteobacteria* des genres *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Escherichia*, *Vibrio*, ou encore *Ralstonia* (Ingerslev et al., 2014; Li et al., 2021; M. Hartviksen, J.L.G. Vecino, E. Ringø, A.-M. Bakke, S. Wadsworth, Å. Krogdahl, K. Ruohonen, 2014; Weththasinghe et al., 2022). De plus, chez les salmonidés, les bactéries du genre *Bacillus* sont aussi connues pour présenter des activités protéolytiques (cf. 1.3.6.1. dégradation des nutriments) (Banerjee and Ray, 2017). En effet, Askarian et al., (Askarian et al., 2012) ont mis en évidence la présence des bactéries cultivables telles que *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* à partir du tractus digestif du saumon. Ces espèces bactériennes ont été isolées dans plusieurs poissons téléostéens et leurs capacités protéolytiques ont été démontrées (Das et al., 2014; Mondal et al., 2010).

**Effets des sources protéiques alternatives :** Par ailleurs, la nature des sources protéiques données aux poissons modifie la composition du microbiote intestinal. Ainsi, même si les proportions en protéines sont similaires, le passage de sources protéiques issues de farines et huiles de poisson à des sources protéiques végétales entraîne une augmentation du ratio *Firmicutes/Proteobacteria* (**figure 28**), avec une augmentation des bactéries lactiques (**figure 29**) (Desai et al., 2012; Ingerslev et al., 2014; Pérez-Pascual et al., 2021; Zhou et al., 2018). L'utilisation de farine de soja fermentée augmente significativement la population de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, chez les salmonidés (Catalán et al., 2017). Par ailleurs, chez les salmonidés, le changement de la nature des sources protéiques végétales affecte le microbiote intestinal (Bruce et al., 2018; Król et al., 2016).



**Figure 30** : Abondance relative des phyla bactériens les plus abondants dans les contenus digestifs de truites arc-en-ciel, nourries avec : T0, régime commercial à base de farines et huiles de poisson ; Tv, régime 100% végétal ; F1, régime végétal avec 11 % remplacés par (5,5 %) des protéines de levures (YEA) et (5,5 %) de protéines de larves d’insectes (INS) ; F2, régime végétal avec 16,5 % remplacé par 5,5 % YEA, 5,5 % de INS et 5,5 % de protéines animales transformées. (Pérez-Pascual et al., 2021).



**Figure 31** : Facteurs influençant la diversité du microbiote intestinal des poissons (Talwar et al., 2018).

L'utilisation de sources protéiques d'insectes induit également de nombreux effets sur les communautés microbiennes intestinales des salmonidés, et augmente généralement la proportion de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* (**Figure 30**) (Li et al., 2021; Pérez-Pascual et al., 2021; Terova et al., 2021; Weththasinghe et al., 2022).

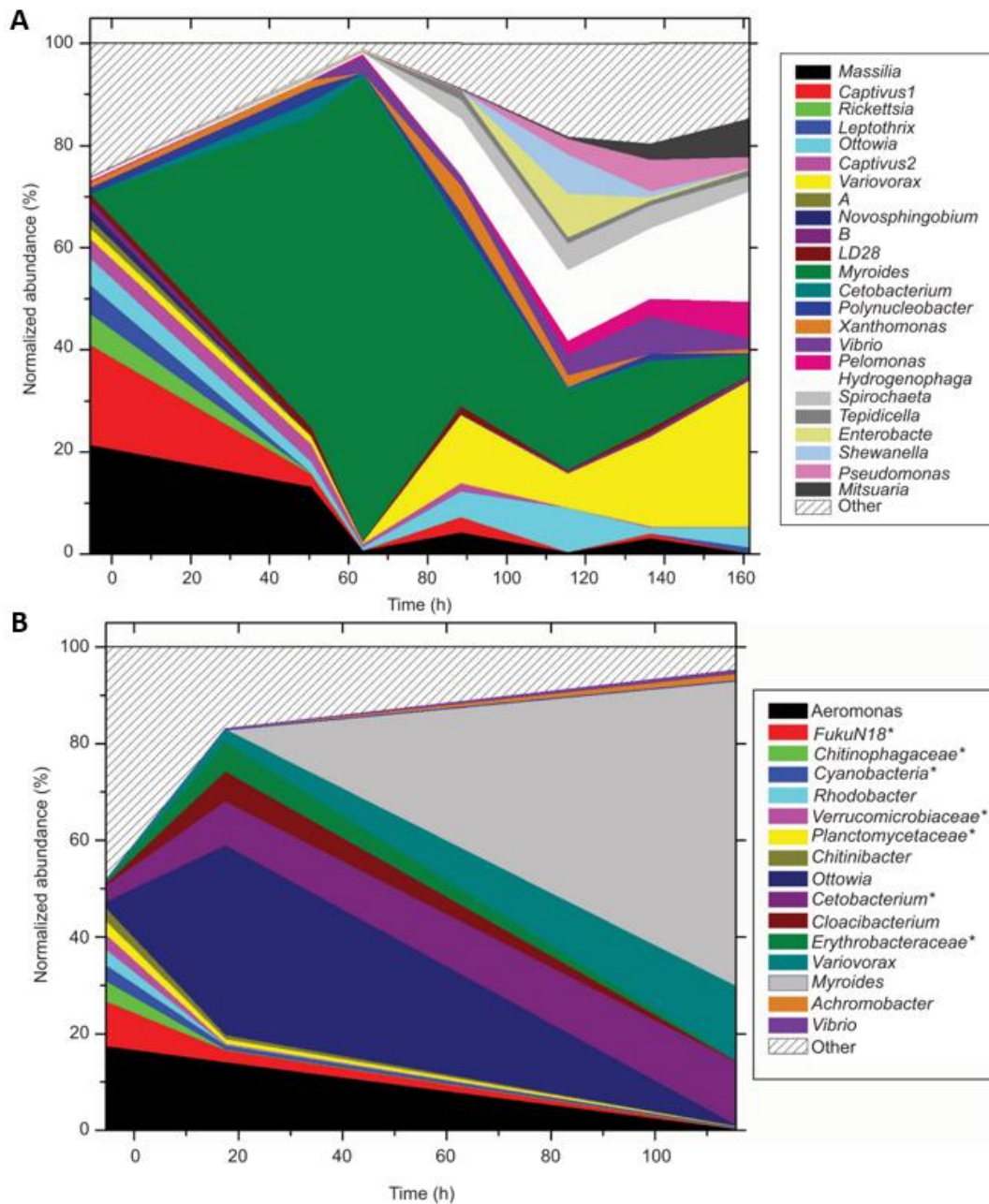
#### 1.3.4.2. Différents facteurs influençant le microbiote intestinal des salmonidés

Au-delà du régime alimentaire, d'autres facteurs biotiques (génétique, cycle de vie, stress, etc.) et abiotiques (température, environnement, etc.) affectent le microbiote intestinal des salmonidés **Figure 31** (Talwar et al., 2018).

Tout d'abord, la génétique de l'hôte est un facteur déterminant chez la truite arc-en-ciel (Navarrete et al., 2012). En effet la génétique de l'hôte détermine la morphologie du tractus digestif (longueur, densité des villosités) favorisant la prolifération de certains microorganismes. Le croisement d'un poisson herbivore (*Megalobrama amblycephala*) et d'un poisson carnivore (*Culter alburnus*) entraîne une modification importante de la morphologie du tube digestif et une modification de la composition du microbiote intestinal (Li et al., 2018). De plus, l'élaboration de lignées génétiques peut affaiblir ou rendre plus résilient le microbiote intestinal de la truite arc-en-ciel face à un pathogène (*Flavobacterium psychrophilum*) (Brown et al., 2019). Toutefois, le développement d'une nouvelle lignée génétique n'affecte pas systématiquement le microbiote intestinal (Ricaud et al., 2018). Parallèlement, la cohabitation de différentes espèces de poissons (la carpe argentée, la carpe herbivore, la carpe à grosse tête et la brème à museau émoussé) dans un même environnement aquatique révèle une composition distincte du microbiote, ce qui démontre l'influence des facteurs de l'hôte sur la prolifération des communautés microbiennes (Li et al., 2012).

Il a aussi été démontré que la salinité de l'eau affecte le microbiote intestinal des salmonidés. Les salmonidés sont d'ailleurs des poissons pouvant migrer de la mer vers les cours d'eau non salée afin de s'y reproduire. Chez le saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*), le changement de la salinité entraîne une modification du microbiote, comme l'abondance des bactéries lactiques (R. Zhao et al., 2020). La salinité est aussi un facteur influençant le microbiote chez le tambour jaune (*Nibeal albiflor*) (Tian et al., 2020), la carpe de roseau (*Ctenopharyngodon idella*) (Liu et al., 2023), et le tilapia du Nil (Hersi et al., 2023).

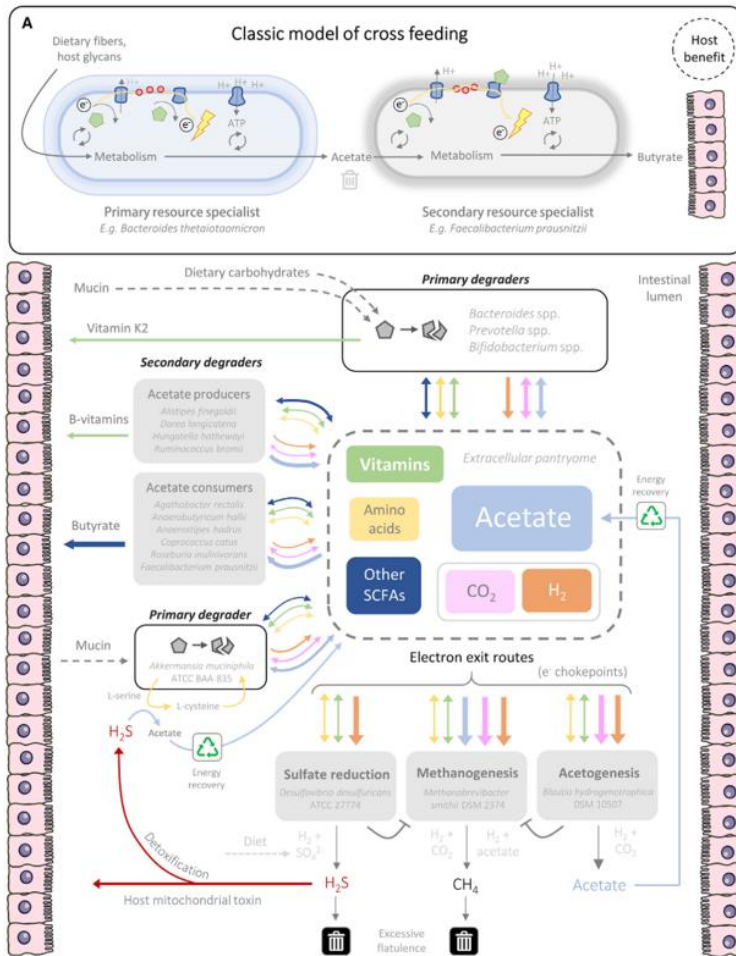




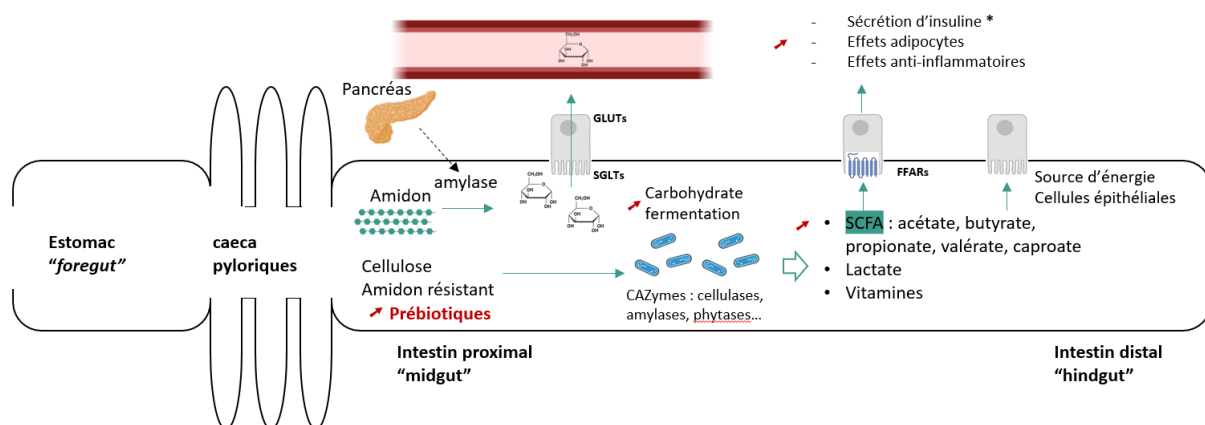
**Figure 32** : Effet des antibiotiques sur le microbiote cutané (A) et intestinal (B) de la gambusie (*Gambusia affinis*). Abondance relative des genres dominants au cours de la semaine d'exposition aux antibiotiques. À 5,5 h (T0) est représentée la moyenne de quatre poissons avant l'exposition. Les points d'exposition sont à 50,5, 63,5, 88,5, 115,5, 136,6 et 161,5 heures (Carlson et al., 2017).

L'infection bactérienne est un facteur important affectant les rendements économiques du secteur de l'aquaculture (Yukgehnaish et al., 2020). Pour lutter contre les épidémies dans les fermes aquacoles, différents antibiotiques sont couramment utilisés : érythromycine, sulfaméthoxazole, norfloxacine, triméthoprime (Nguyen Dang Giang et al., 2015). Dans la plupart des cas, ce sont de fortes concentrations d'antibiotiques qui sont utilisées, ce qui n'est pas sans conséquence au niveau écologique. En effet, la diffusion d'antibiotiques dans les cours d'eau, puis l'absorption par les sols entraînent le développement de souches résistantes aux antibiotiques (Thiele-Bruhn, 2003). Ces fortes concentrations d'antibiotiques données aux poissons d'élevage causent une chute sévère de la quantité et de la diversité des microorganismes du microbiote intestinal, ce qui au vu du rôle important du microbiote, peut avoir un impact sur la robustesse et l'efficacité alimentaire des poissons. De plus, le microbiote intestinal est impacté sur le long terme après le traitement et ne semble pas revenir à son état initial (Carlson et al., 2017). Ces fortes perturbations de la biodiversité microbienne sont à la fois retrouvées dans les microbiotes intestinaux et cutanés (**Figure 32**). Ces effets ont aussi été mis en évidence chez la truite arc-en-ciel (Parshukov et al., 2022). Chez ce poisson, l'utilisation d'oxytétracycline affecte le microbiote sur le long terme, engendre une diminution de la proportion de bactéries des genres *Mycoplasma* et *Bacillus*, et augmente la proportion de *Aeromonas*, *Deefgea*, et *Pseudomonas* (Payne et al., 2022).

D'autres facteurs biotiques (sélection de l'hôte, cycle de vie, stress) et abiotiques (température de l'eau, environnement) peuvent également impacter significativement le microbiote intestinal des poissons et particulièrement des salmonidés (Talwar et al., 2018) mais dans un souci de synthèse ils ne seront pas décrits ici.



**Figure 33** : Représentation du modèle classique de cross-feeding : description des premiers et seconds dégradeurs ainsi que les molécules impliquées dans le dialogue microbiote-microbiote ou microbiote-hôte dialogue (Daisley et al., 2021).

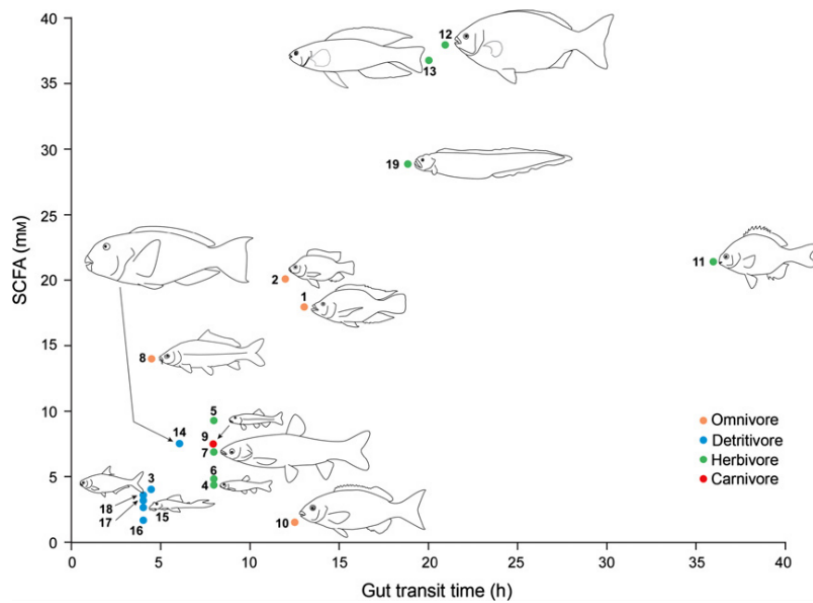


**Figure 34** : Représentation schématique de la dégradation des glucides digestibles et non-digestibles par l'hôte et son microbiote intestinal. \* : Effets décrits chez l'homme (Kimura et al., 2019).

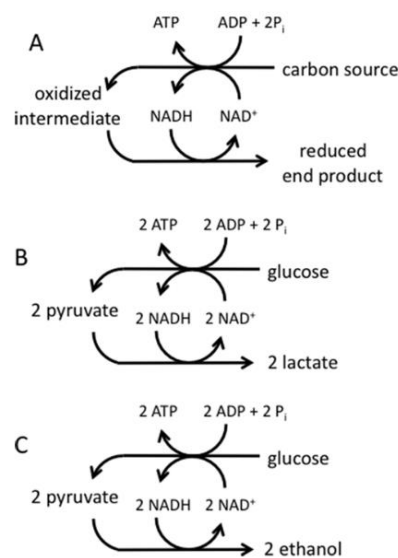
### 1.3.5. Le rôle clé des métabolites bactériens dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte

Les bactéries commensales entretiennent avec leur hôte une relation symbiotique notamment en synthétisant des molécules utilisables et bénéfiques pour l'hôte. Plusieurs molécules ont ainsi été mises en évidence dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte.

Pour commencer, de nombreuses bactéries du microbiote utilisent les glucides (en particulier les glucides non digestibles) afin de produire de l'énergie. En effet, en l'absence d'oxygène, certaines bactéries intestinales réalisent une fermentation de ces sources de carbone afin de générer de l'ATP. Il existe plusieurs types de fermentation dont, la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, et la fermentation malolactique (Wolfe, 2015). La fermentation lactique est réalisée par différents genres bactériens tels que *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, et bien sûr par les bactéries lactiques, comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, ou *Streptococcus* (phylum des *Firmicutes*) (LeBlanc et al., 2017). Ces catabolismes, réalisés par ces « premiers fermenteurs », rejettent différentes molécules telles que du succinate, de l'acétyl-CoA, des vitamines, des acides gras à chaîne courte (AGCC, ou « SCFA » pour *short-chain fatty acids*) comme, par exemple, l'acétate, le butyrate, le propionate, le valérate, et le caproate. Puis, dans un second temps, ces substrats peuvent être métabolisés par une large quantité de bactéries « *cross-feeders* » (**Figure 33**). Ces seconds fermenteurs appartiennent majoritairement au phylum des *Firmicutes* et induisent le relargage de différentes molécules dont les acides gras à chaîne courte décrits précédemment, mais également des vitamines, du lactate, et de l'éthanol (Daisley et al., 2021) (**Figure 34**). Parallèlement, la fermentation des acides aminés par différentes bactéries intestinales peut également entraîner le relargage des SCFA (Oliphant and Allen-Vercoe, 2019). Ces acides gras à chaîne courte présentent de nombreux effets bénéfiques pour l'hôte. Dans un premier temps, ils constituent une source importante d'énergie pour les cellules épithéliales de l'intestin. Chez l'homme, les besoins énergétiques sont couverts à 10% par l'absorption de SCFA ; chez les animaux herbivores ou omnivores, ce taux peut monter à 20% et jusqu'à 70% chez les ruminants (Bergman, 1990). Chez l'homme, les acides gras à chaîne courte activent des récepteurs couplés aux protéines G, les *free fatty-acid receptors*, pouvant induire une cascade de signalisation, et de nombreux effets bénéfiques chez l'hôte. Cette cascade de signalisation, induite par les SCFA peut induire la synthèse d'insuline dans l'organisme (Priyadarshini et al., 2018). Ces récepteurs ont d'ailleurs récemment été mis en évidence chez la truite arc-en-ciel (Roy et al., 2023).



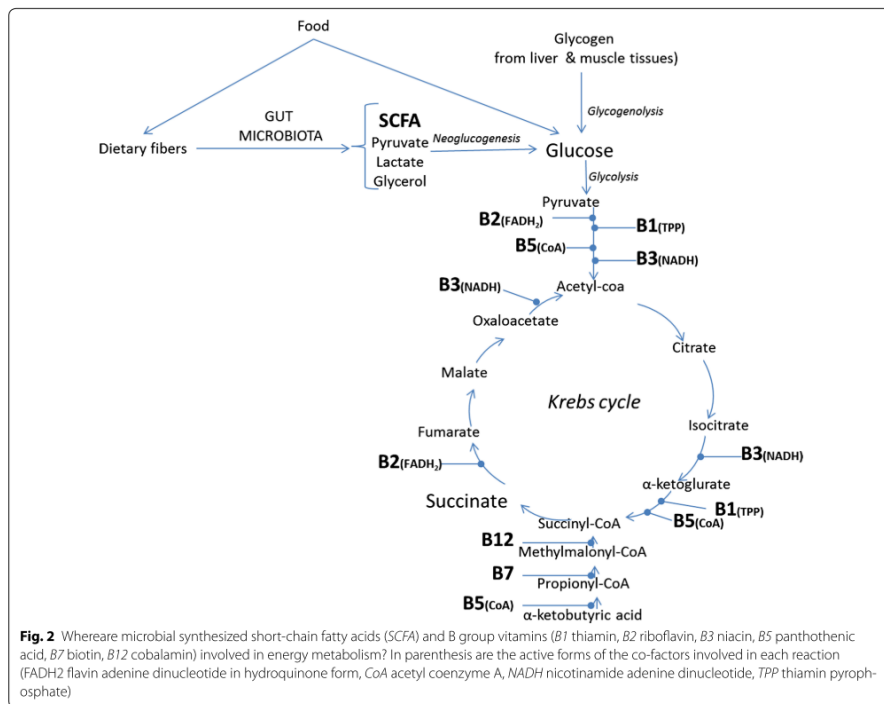
**Figure 35** : Concentration intestinale en acides gras à chaîne courte, chez les poissons marins et d'eau douce, par rapport au temps de transit des contenus digestifs dans les intestins. Les poissons décrits sont : (1) *Oreochromis mossambicus*, (2) *O. niloticus*, (3) *Dorosoma cepedianum*, (4) *Campostoma anomalum*, (5) *C. oligolepis*, (6) *C. pauciradii*, (7) *Ctenopharyngodon idella*, (8) *Cyprinus carpio*, (9) *Nocomis micropogon*, (10) *Girella tricuspidata*, (11) *Hermosilla azurea*, (12) *Kyphosus sydneyanus*, (13) *Odax pullus*, (14) *Chlorurus microrhinos*, (15) *Hypostomus pyrineusi*, (16) *Panaque nocturnus*, (17) *P. cf. nigrolineatus*, (18) *Pterygoplichthys disjunctivus*, (19) *Cebidichthys violaceus* (Clements et al., 2014).



**Figure 36** : Schéma simplifié de la stratégie de fermentation en présence d'oxygène (A), de la fermentation lactique (B), et de la fermentation alcoolique (C). (Wolfe, 2015).

De plus, l'incorporation de butyrate dans les aliments donnés aux poissons a déjà montré des bénéfices chez de nombreux poissons (Abdel-Latif et al., 2020). Par exemple, face à une souche pathogène (*Streptococcus iniae*), la consommation de butyrate chez la truite arc-en-ciel entraîne une stimulation du système immunitaire, induit une augmentation de l'activité du lysozyme intestinal (enzyme dégradant la paroi et en particulier le peptidoglycane présent en grande quantité chez les bactéries Gram+), l'activation du complément (entraînant l'élimination des pathogènes par phagocytose), des activités bactéricides, et le maintien de la perméabilité de la barrière épithéliale (Mirghaed et al., 2019). Des résultats comparables, induisant une stimulation du système immunitaire par l'acétate ou le butyrate, ont également été retrouvés chez le tilapia (Abdel-Latif et al., 2021; Dawood et al., 2020; Li et al., 2020), et chez la carpe (Wu et al., 2018). De plus, les acides gras à chaîne courte sont généralement présents en plus grande quantité dans les différentes sections de l'intestin chez les poissons herbivores, comme le tambour argenté (*Kyphosus sydneyanus*) (Pardesi et al., 2022), que chez les poissons carnivores (Clements et al., 2014) (**Figure 35**). Ces SCFA sont donc des molécules importantes du dialogue microbiote-hôte et induisent de nombreux effets bénéfiques sur le poisson.

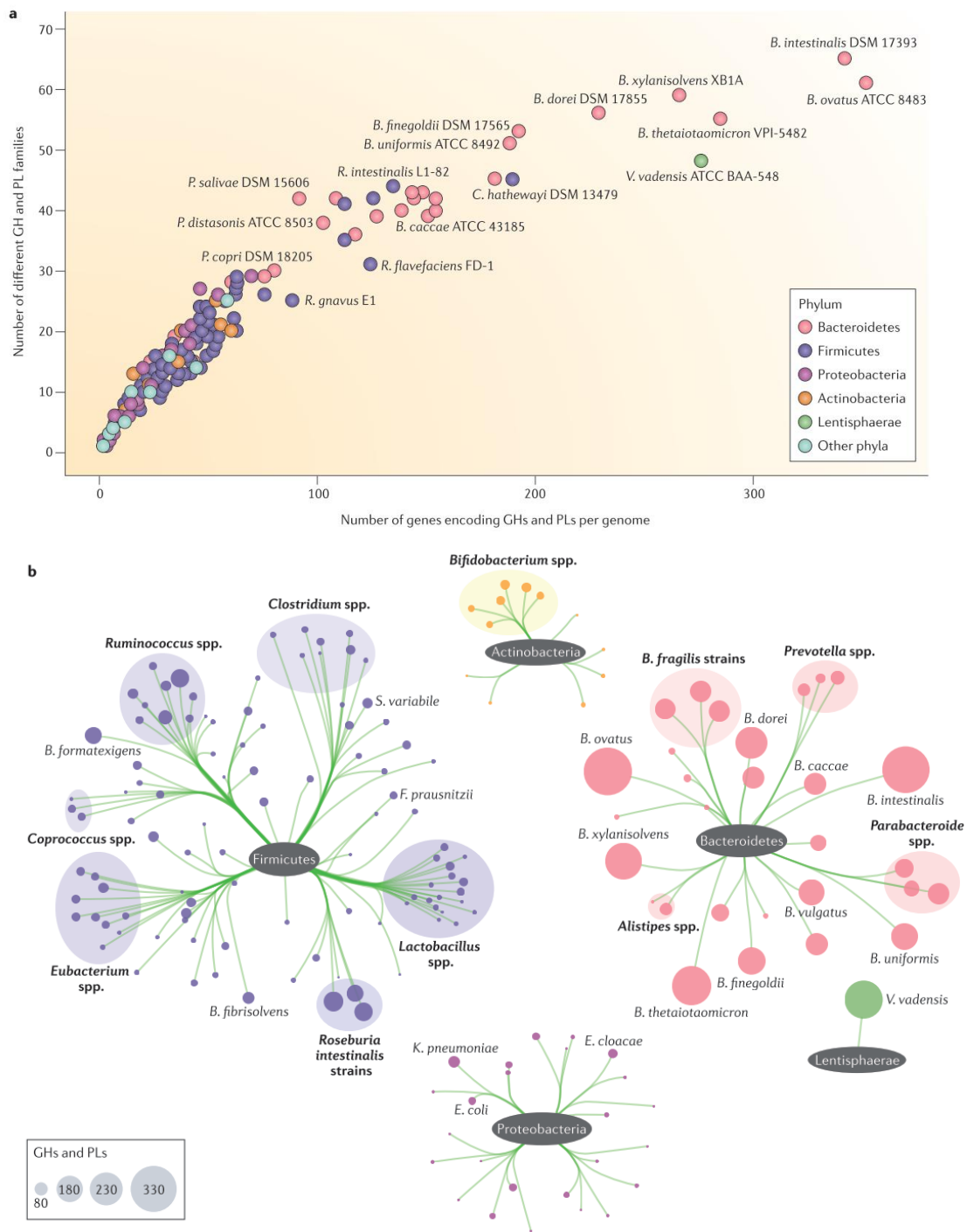
L'acide lactique (ou lactate) est le produit de la fermentation lactique (**Figure 36**) par les bactéries lactiques. En effet, la fermentation lactique d'une molécule de glucose induit la production de deux molécules d'ATP et de deux molécules de lactate (Wolfe, 2015). Le lactate peut ensuite être métabolisé par de nombreuses bactéries commensales « *cross-feeders* » du microbiote et induire la libération d'acétate, de butyrate, de propionate, ou de caproate (Bourriaud et al., 2005; Zhu et al., 2017). Additionnellement, le lactate produit par le microbiote peut être retrouvé dans le plasma ou les urines. Il peut aussi engendrer l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPR81) (Lee et al., 2018). La cascade de signalisation entraîne la différenciation de cellules souches intestinales et une stimulation du système immunitaire (Lee et al., 2018), l'hématopoïèse (Lee et al., 2021), et affecte le métabolisme lipidique (Liu et al., 2009). Chez le poisson, peu d'études sont disponibles, mais ce récepteur et son activation par le lactate ont déjà été montrés chez le poisson zèbre (Kuei et al., 2011). Par conséquent, l'effet direct du lactate sur le métabolisme et l'immunité des poissons reste à démontrer.



**Figure 37** : Implication des différentes vitamines et acides gras à chaîne courte produits par le microbiote dans les différentes voies du métabolisme énergétique chez l'homme. (LeBlanc et al., 2017).

Les vitamines sont des cofacteurs permettant de catalyser de nombreuses réactions enzymatiques de l'organisme. Les vitamines du groupe B par exemple sont directement impliquées dans le métabolisme énergétique chez l'homme (**Figure 37**) (LeBlanc et al., 2017). Cependant, alors que l'homme est capable de synthétiser certaines des vitamines, la plupart ne sont pas codées par le génome humain et doivent être apportées de manière exogène par l'alimentation ou produites par le microbiote intestinal. En effet, la thiamine (vitamine B1), la niacine (vitamine B3), l'acide pantothénique (vitamine B5), la biotine (vitamine B7), la cobalamine (vitamine B12), ou encore la menaquinone (vitamine K) sont synthétisées par les microorganismes du microbiote. (LeBlanc et al., 2013). Ces molécules sont produites par le microbiote commensal, telles que les bactéries lactiques et notamment les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (LeBlanc et al., 2017; Santos et al., 2008). De plus, la biosynthèse de thiamine a aussi été décrite chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, et *Bacillus subtilis* (Begley et al., 1999), ou encore la bactérie *Cetobacterium somerae*. Alors que la production de vitamines par le microbiote du poisson n'est pas encore décrite, de nombreuses bactéries productrices de vitamines, telles que *Cetobacterium somerae*, sont retrouvées chez les poissons (A. Wang et al., 2021b; Xie et al., 2022).





**Figure 38** : Représentation des bactéries présentant la plus grande diversité et la plus grande quantité de gènes codant pour des CAZymes (glycosides hydrolases (GH), et les polysaccharides lyases (PL), en fonction des différents phyla (a). Représentation schématique de la répartition des GH et PL au sein des différents groupes taxonomiques bactériens (b). (Kaoutari et al., 2013).

### 1.3.6. Fonctionnalités du microbiote intestinal

#### 1.3.6.1. Dégradation des nutriments

Le microbiote intestinal est considéré aujourd'hui comme un « organe » à part entière et possède de nombreuses fonctions pour la nutrition et la santé humaines (Valdes et al., 2018). L'une d'elles correspond à la capacité des espèces bactériennes à transformer les composés alimentaires (pouvant être non digestibles par l'homme) en molécules plus petites, assimilables par l'organisme hôte.

**Métabolisme des glucides du microbiote.** Tandis que la plupart des glucides digestibles sont rapidement hydrolysés et absorbés par l'organisme hôte, certaines fibres comme les glycanes ou l'amidon résistant, échappent à la dégradation enzymatique de l'hôte. C'est le cas, par exemple, chez les ruminants ou les équidés qui puisent leur énergie à partir de sources végétales mais sont totalement dépourvus d'enzymes ayant la capacité d'hydrolyse des polymères végétaux (Xu et al., 2021). Celle-ci est permise par la capacité de certaines bactéries du rumen à produire ces enzymes (cellulases, pectinases, amylases) (Flint et al., 2008). Ainsi, plus les polysaccharides sont complexes, plus ils nécessitent d'étapes de dégradation (Martens et al., 2011). Ces enzymes, appelées CAZymes (« *Carbohydrate-active enzymes* »), permettant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, peuvent être réparties en 2 familles : les glycosides hydrolases (GH), et les polysaccharides lyases (PL). En explorant la fonctionnalité du génome humain, il a pu être estimé que des gènes codant pour des CAZymes étaient retrouvés dans 104 génomes microbiens appartenant au phylum des *Firmicutes*, 29 génomes microbiens appartenant à celui des *Bacteroidetes*, 22 génomes microbiens appartenant à celui des *Proteobacteria*, et 12 génomes microbiens appartenant au phylum des *Actinobacteria* (**Figure 38**) (Kaoutari et al., 2013). De plus, un total de 4119 gènes codant pour des GH ou PL sont retrouvés dans 104 génomes de *Firmicutes*, contre 3976 retrouvés dans 29 génomes de *Bacteroidetes*, et beaucoup moins dans les autres phyla. Ces CAZymes sont ainsi retrouvées dans le génome de nombreux genres bactériens tels que *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, mais aussi *Bacillus*. La dégradation de polysaccharides végétaux, comme les xylanes ou pectines, nécessite l'action d'un grand nombre de glycosidases agissant de manière coordonnée. Par exemple, la dégradation de rhamnogalacturonane (composant de la paroi des cellules végétales) nécessite l'action d'au moins 12 enzymes bactériennes (Martens et al., 2011). À la suite de la dégradation d'osides complexes par le microbiote, certains glucides simples vont pouvoir être directement absorbés par l'hôte. D'autres seront fermentés et produiront des acides gras à chaîne courte par le biais de « *cross-feeders* » et pourront avoir des effets bénéfiques pour l'hôte. D'ailleurs, ces bactéries productrices de CAZymes ont déjà été retrouvées dans les microbiotes intestinaux des poissons.

**Table 1** Enzyme producing bacteria from fish gut

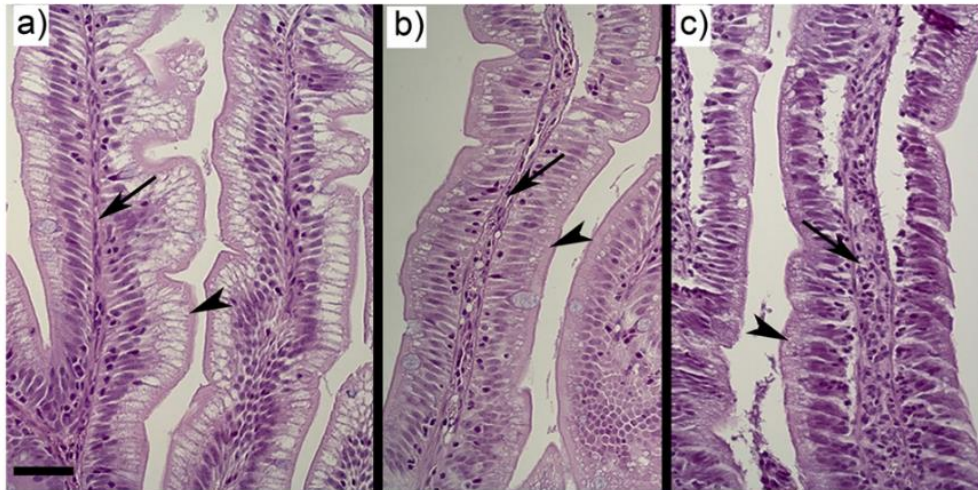
Enzymes	Bacterial isolates	Fish species	References
protease	<i>Bacillus licheniformis</i> BF2, <i>Bacillus subtilis</i> BH4, <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Brochothrix</i> sp. and <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , and <i>Bacillus cereus</i> , <i>Brevibacillus parabrevis</i> Sa2.2, <i>Bacillus licheniformis</i> MG4.2	<i>Labeo bata</i> , <i>Channa punctatus</i> , <i>Heteropneustes fossilis</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Labeo rohita</i> , <i>Scatophagus argus</i> , <i>Terapon jarbua</i> , <i>Mystus gulio</i> , <i>Etroplus suratensis</i>	Ghosh et al. 2002; Mondal et al. 2010; Askarian et al. 2012a, b; Banerjee et al. 2013; Das et al. 2014
Cellulase	<i>Citrobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Brochothrix</i> sp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus circulans</i> TM1, <i>Bacillus megaterium</i> C13, <i>Aeromonas</i> sp.	<i>Labeo rohita</i> , <i>Catla catla</i> , <i>Cirrhinus mrigala</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Channa punctatus</i> , <i>Heteropneustes fossilis</i> , <i>Oreochromis mossambica</i> , <i>Ctenopharyngodon idella</i>	Saha et al. 2006; Ray et al. 2010; Askarian et al. 2012a; Banerjee et al. 2013; Jiang et al. 2011
Amylase	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus circulans</i> ; <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i> , <i>Labeo rohita</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Labeo bata</i> , <i>Channa punctatus</i> , <i>Heteropneustes fossilis</i> , <i>Salmo salar</i>	Trust et al. 1979; Ghosh et al. 2002; Mondal et al. 2010; Askarian et al. 2012a, b; Banerjee et al. 2013
Phytase	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Brochothrix</i> sp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Ten fresh water teleost, <i>Gudusia chapra</i> , <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> ,	Roy et al. 2009; Khan and Ghosh 2012; Askarian et al. 2012b; Dan and Ray 2014
Lipase	<i>Agrobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Salvelinus alpinus</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Gadus morhua</i>	Ringo et al. 1995; Askarian et al. 2012a, b

**Tableau 8** : Présentation des différentes bactéries reconnues chez les poissons pour leur capacité de synthèse de protéases, cellulases, amylases, phytases, et lipases. (Banerjee and Ray, 2017).

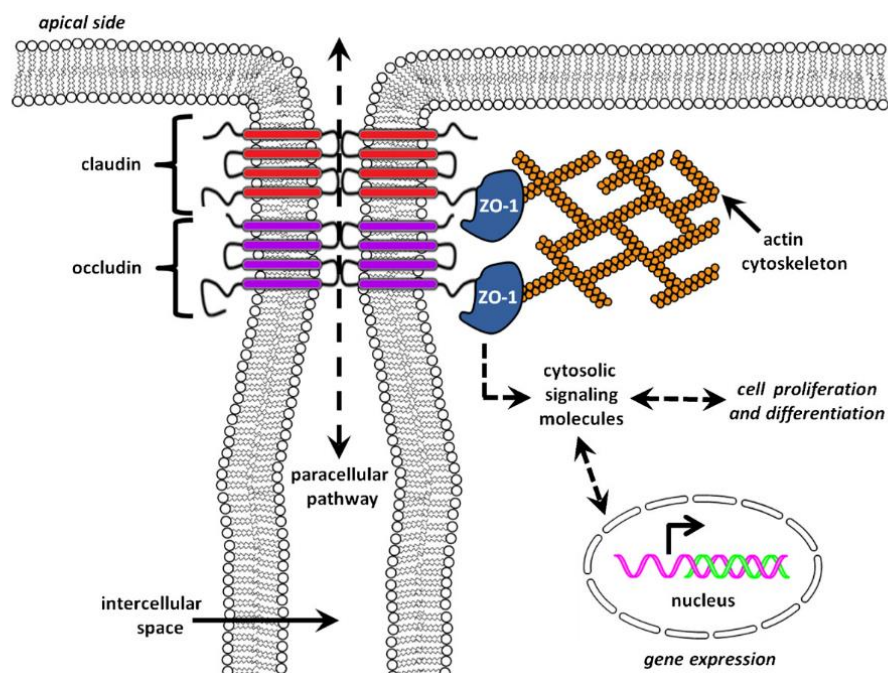
Ainsi, de nombreuses études ont montré qu'une grande diversité d'espèces bactériennes amylolytiques, telles que *Bacillus circulans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, et *Lactobacillus spp* sont retrouvées dans le microbiote des poissons herbivores et omnivores. Par ailleurs, de nombreuses bactéries cellulolytiques (*Enterobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix sp.*, *Aeromonas sp.*, (Banerjee and Ray, 2017)) ont également été retrouvées chez différents poissons herbivores et omnivores (Jiang et al., 2011; Ray et al., 2010). À l'inverse, bien que certaines bactéries du phylum des *Proteobacteria* soient capables de produire des CAZymes, la plus faible abondance des *Firmicutes* dans le microbiote intestinal des poissons carnivores a longtemps été un obstacle à l'idée d'utiliser un régime fort en glucides pour ces poissons (Karasov et al., 2011; Ray et al., 2012).

### **Métabolisme des protéines.**

Les protéines passant l'intestin proximal sont, soit des protéines alimentaires résiduelles, non absorbées par l'organisme hôte, soit des protéines d'origine endogène (enzymes, mucines, etc.). Les acides aminés représentent ainsi la principale source d'azote du microbiote intestinal (Zhao et al., 2018). Les bactéries productrices de protéases sont des communautés importantes du microbiote intestinal chez les animaux carnivores. Les principales bactéries protéolytiques du microbiote humain font partie du phyla des *Bacteroidetes* : l'espèce *Bacteroides fragilis* par exemple (Scott et al., 2013). Toutefois, d'autres bactéries appartenant au phylum des *Actinobacteria*, et en particulier la famille *Propionibacteriaceae* mais également des bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* (dont les genres *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, et *Staphylococcus*), participent à l'activité protéolytique. L'hydrolyse des protéines conduit à la libération de peptides et d'acides aminés utilisés en priorité par des bactéries ne fermentant pas les oses comme *Veillonella*, *Peptococcus*, *Acidaminococcus* (Scott et al., 2013). Cependant, beaucoup de bactéries glycolytiques utilisent les acides aminés comme source exclusive d'azote. La fermentation des protéines induit la désamination et la décarboxylation des acides aminés et induit la libération d'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Elle libère également des métabolites utilisables par l'hôte comme des acides gras à chaîne courte (acétate, butyrate, propionate), des acides gras ramifiés (iso butyrate, iso valérate, etc.), ainsi que des composés phénoliques et des sulfures (Oliphant and Allenvercoe, 2019; Scott et al., 2013). Chez les poissons, les bactéries protéolytiques appartiennent majoritairement au phylum des *Proteobacteria* et sont présentes chez tous les poissons herbivores, omnivores et carnivores, mais ces bactéries sont retrouvées en plus forte abondance chez les poissons carnivores (Ray et al., 2012). Enfin, de nombreuses espèces appartenant au genre *Bacillus* présentent aussi des activités protéolytiques (Singh et al., 2001), telles que *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, et *Bacillus cereus* (**Tableau 8**) qui ont été retrouvées chez différents poissons (Banerjee and Ray, 2017).



**Figure 39** : Changement de la morphologie de la *lamina propria* en réponse à l'utilisation d'un régime végétal contenant des facteurs antinutritionnels chez le saumon : à l'état normal (a), après 5 jours de nutrition avec le régime végétal (b), et après 7 jours de nutrition (c). (Sahlmann et al., 2013).

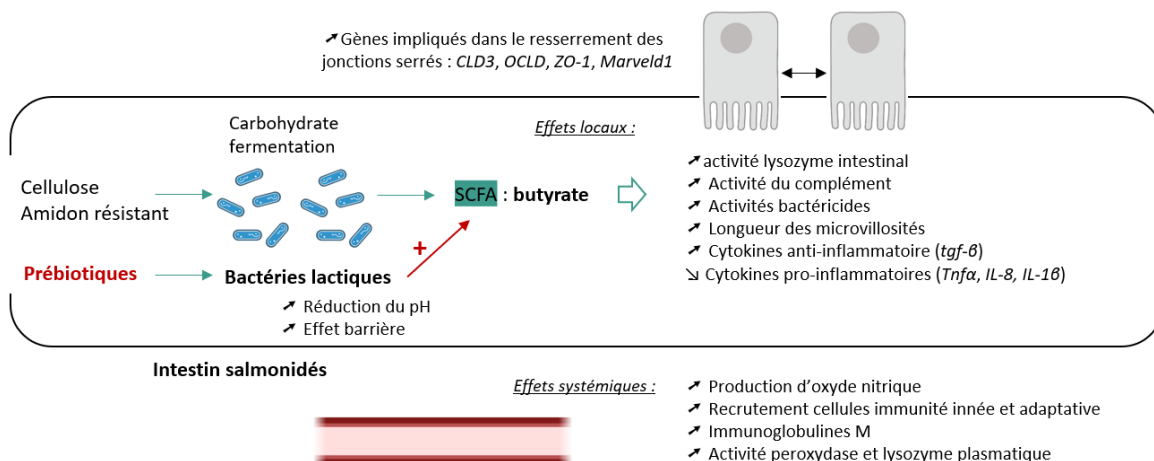


**Figure 40** : Représentation schématique du système de jonctions serrées entre cellules épithéliales. (Chasiotis et al., 2012).

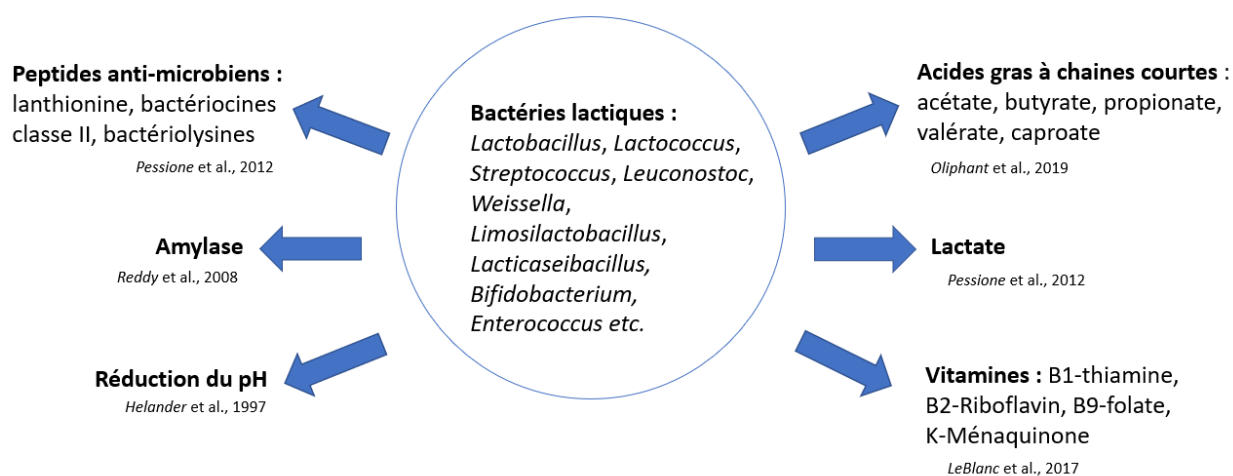
### 1.3.6.2. Stimulation du système immunitaire et effet barrière chez les salmonidés

L'effet barrière correspond à la capacité des bactéries commensales du microbiote à empêcher la colonisation de bactéries pathogènes dans leur environnement. L'inhibition de la prolifération de bactéries pathogènes se fait par compétition pour les nutriments ou encore en empêchant leur adhésion à la muqueuse intestinale (Ulluwishewa et al., 2011). De plus, certaines bactéries commensales peuvent produire des peptides anti-microbiens (bactériocines) pouvant tuer ou limiter la croissance des bactéries cibles (Cotter et al., 2012). De même, par la production de butyrate, le microbiote intestinal peut influencer la production de mucines par les cellules caliciformes, afin d'empêcher l'entrée des pathogènes dans l'hôte après leur passage à travers le mucus et les cellules épithéliales (Liang et al., 2022). Les jonctions serrées présentent à la fois une fonction de barrière en empêchant le passage de microorganismes, et régulent le passage de molécules à travers l'espace paracellulaire. Par ailleurs, plusieurs études ont déjà montré que chez les salmonidés, les pathogènes pouvaient pénétrer à travers l'épithélium et entraîner une hyperplasie du tissu intestinal (**Figure 39**) (Adams and Nowak, 2003; Sahlmann et al., 2013). La première protéine impliquée dans le resserrement des jonctions serrées est l'occludine (Furuse et al., 1993). Cette protéine permet d'occulter ("occlure") l'espace intercellulaire. D'autres protéines sont également impliquées comme la famille des claudines, ainsi que la protéine ZO-1 (**Figure 40**). Ces protéines transmembranaires « occludin » ont déjà été identifiées chez la truite arc-en-ciel (Chasiotis et al., 2012; Chasiotis and Kelly, 2011).

Cependant, comme indiqué dans la partie 1.1.2.2.3., la consommation de facteurs antinutritionnels dont les lectines, phytostérols, ou saponines, contenus dans les aliments végétaux donnés aux poissons d'élevage peut entraîner une inflammation du tube digestif (Urán et al., 2009). Cette inflammation, appelée entérite, augmente la perméabilité intestinale, altère l'absorption de nutriments et augmente l'abondance de bactéries pathogènes. Chez le turbot (*Scophthalmus maximus*), l'ajout de saponines au sein d'un régime à base de farines et huiles de poisson augmente l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (*il-1 $\beta$* , *il-8*, et *tnfa*) (Gu et al., 2021), ainsi que des gènes codant des protéines impliquées dans le resserrement des jonctions serrées (*clnd3*, *clnd4*, *ocln*, *tricellulin*, et *ZO-1*). De plus, une récente étude sur le saumon (*Salmo salar*) a montré une augmentation de la synthèse de mucus par le tissu intestinal dès le 5<sup>ème</sup> jour de nutrition avec des farines de soja (Sahlmann et al., 2013).



**Figure 41** : Représentation schématique de l'effet immunostimulant de la production de butyrate par le microbiote intestinal au niveau local et systémique chez les salmonidés. Réalisée à partir de (Mirghaed et al., 2019; Song et al., 2014).

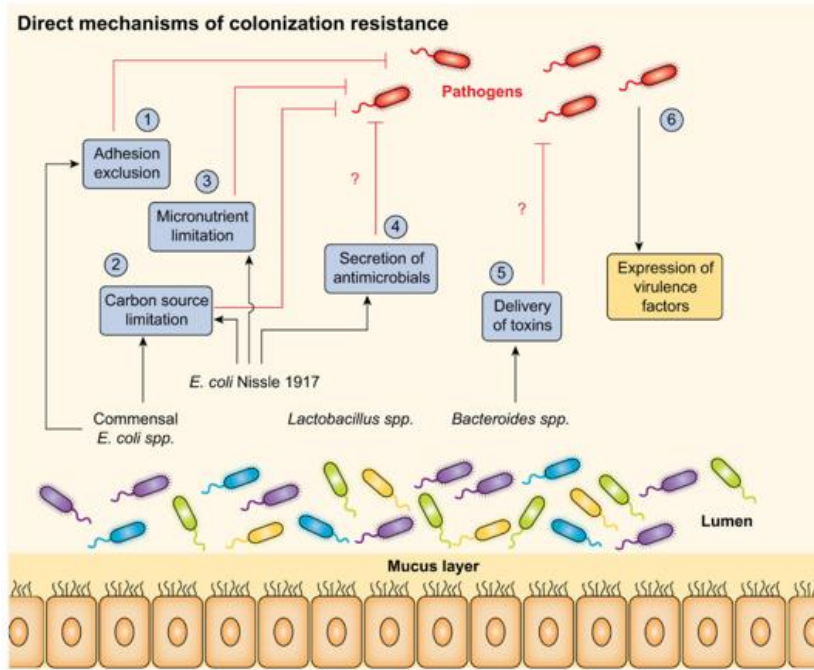


**Figure 42** : Majeures contributions des bactéries lactiques au sein du microbiote intestinal. Représentation produite à partir de (Helander et al., 1997; LeBlanc et al., 2017; Oliphant and Allen-Vercoe, 2019; Pessione, 2012; Reddy et al., 2008).

L'arrivée de cellules lymphocytaires (T et B) sur le site de dommage, induit chez les salmonidés une augmentation de la largeur de la *lamina propria*, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans le transport de protéines et des canaux ioniques, important pour le maintien des fonctions premières de l'intestin.

Toutefois, le microbiote intestinal peut stimuler le système immunitaire, de manière à rendre plus efficace sa réponse face à un pathogène (cf. partie 1.3.7. « Prébiotiques ») (Fung et al., 2017) (**figure 41**). En effet, la production de butyrate par les bactéries commensales, telles que les bactéries lactiques (**figure 42**), permet de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et d'oxyde nitrique (Chang et al., 2014; W. Liu et al., 2014). L'acétate, le propionate, et le butyrate jouent un rôle clé dans le recrutement de cellules de l'immunité innée (ex. neutrophiles) et inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires (Fang et al., 2019; B. Liu et al., 2014). Ensuite, le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram -, la flagelline des bactéries flagellées, les mannanes des levures, les ARN viraux constituent des motifs pathogéniques (PAMPS, antigènes), qui pourront entraîner une stimulation de la réponse immunitaire innée et adaptative des poissons (Buchmann and Secombes, 2022). L'élimination de bactéries pathogènes via la production de peptides anti-microbiens, ainsi que la synthèse d'acides gras à chaîne courte du microbiote commensal, représentent des facteurs importants du maintien du système immunitaire chez le poisson.



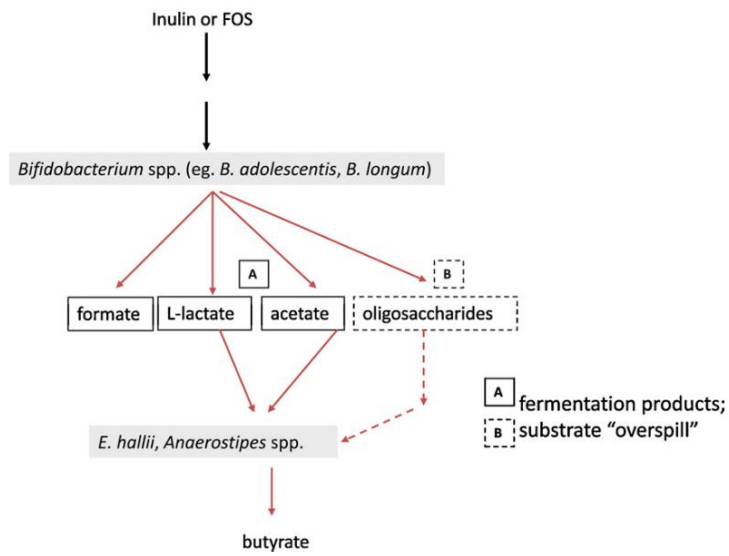


**Figure 43 :** Effets directs et indirects des probiotiques sur l'effet barrière et la stimulation du système immunitaire chez l'hôte. (Sassone-Corsi and Raffatellu, 2015).

### 1.3.7. Mode d'action des probiotiques et des prébiotiques chez les salmonidés

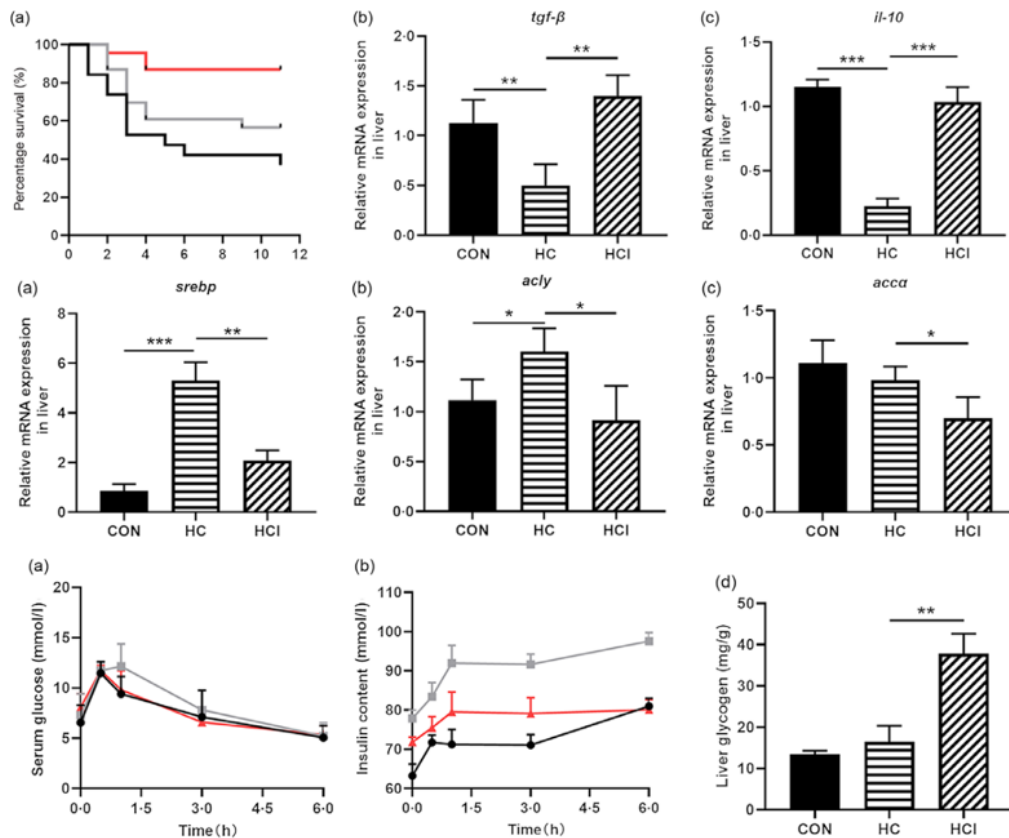
La connaissance de la diversité microbienne ainsi que la compréhension des fonctions du microbiote nous permettent aujourd'hui d'initier des thématiques de recherches visant à moduler le microbiote intestinal des salmonidés. La modification du microbiote est intéressante car elle pourrait permettre de favoriser l'abondance de microorganismes identifiés comme pouvant être favorables à la dégradation des nutriments, et donc d'améliorer la nutrition de l'hôte. Dans le cadre d'une thèse visant à tester la prise alimentaire d'aliments expérimentaux, la capacité d'adaptation, ou plasticité du microbiote, est donc un facteur clé. **Un microbiote adapté à la dégradation de composés végétaux pourrait améliorer leur dégradation, mais aussi produire des métabolites bactériens pouvant être bénéfiques pour les fonctions métaboliques et le statut immunitaire de l'hôte.**

**Probiotiques.** Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Élie Metchnikoff, a été le premier chercheur à suggérer que les personnes consommant des produits laitiers fermentés appelés « Kéfir » étaient en meilleure santé et vivaient plus longtemps (Fuller, 1992; Vasiljevic and Shah, 2008). Par la suite, la bactérie *Lactobacillus delbrueckii* a été isolée du kéfir et utilisée dans des préparations commerciales grâce à ses capacités de production d'(L)acide-lactique à faible coût (John et al., 2006). Aujourd'hui, le terme probiotique est défini comme des microorganismes vivants qui, administrés en supplément d'un aliment dans de bonnes proportions, confèrent des bienfaits pour la santé de l'hôte (**Figure 43**) (Socol et al., 2013). Les microorganismes (probiotiques) vivants les plus utilisés en aquaculture sont *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacters*, *Microbacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, et certaines souches de levure comme *Saccharomyces cerevisiae* (Rohani et al., 2022). Les probiotiques interagissent avec l'hôte et le microbiote en sécrétant des molécules clés de l'interaction microbiote-hôte (Cunningham et al., 2021). Une fois ingérés, ces microorganismes vivants vont pouvoir adhérer au mucus intestinal, et entrer en compétition pour l'accès aux nutriments avec les microorganismes pathogènes. Ils favorisent la production de mucus, l'effet barrière via la production de bactériocines, ils réduisent le pH et stimulent la réponse innée et adaptative de l'hôte (Sassone-Corsi and Raffatellu, 2015). Chez le poisson, les probiotiques stimulent la croissance et l'utilisation de l'aliment sans effets négatifs pour le poisson. Les probiotiques favorisent la prolifération de bactéries commensales de l'organisme, ce qui augmente la libération de molécules d'intérêt du microbiote et aide à la digestion des nutriments. De plus, les activités enzymatiques (protéase, amylase, lipase) des enzymes digestives sont aussi améliorées chez le poisson (Mohapatra et al., 2012), augmentant l'absorption des nutriments. Les probiotiques ont un effet bénéfique sur le système immunitaire des poissons en inhibant la croissance des bactéries pathogènes dans leur tube digestif (Dawood et al., 2016; Verschuere et al., 2000).



**Figure 44** : Effet de l'alimentation croisée des bactéries (« *cross-feeding* ») sur la conversion en butyrate du lactate ou des produits de dégradation des prébiotiques (Chez l'homme). (Scott et al., 2013).

**Prébiotiques.** En 1995, Gibson and Roberfroid (Gibson and Roberfroid, 1995) définissent les prébiotiques comme étant une classe de composants stimulant la croissance de bactéries bénéfiques (comme *Lactobacillus*, ou *Bifidobacterium*) dans le côlon, et induisant des bénéfices pour l'hôte. Les prébiotiques sont définis comme des substrats interagissant directement avec les récepteurs des cellules intestinales et pouvant influencer spécifiquement la croissance de certains groupes bactériens (Cunningham et al., 2021). Les prébiotiques correspondent à des glucides non-digestibles pour l'hôte, tels que le fructooligosaccharide (FOS), galactooligosaccharide (GOS), mannanoligosaccharide (MOS), ou encore l'inuline (Bastard et al., 2020). L'inuline est un polymère de fructose composé de  $\beta$ -D-fructofuranoses reliées par des liaisons glycosidiques  $\beta(1\rightarrow2)$ . Chez l'homme, la fermentation de fibres telles que l'inuline, induit la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) comme l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate, et le caproate (**Figure 44**) (R. Havenaar, 2010). Les bactéries commensales du microbiote, comme les bactéries lactiques (**Figure 41 & 42**), peuvent ainsi transformer ces substances dérivées de plantes en molécules clés du dialogue microbiote-hôte, comme les vitamines B et K, le lactate, les acides gras à chaîne courte et des bactériocines ciblant les pathogènes présents dans l'intestin (LeBlanc et al., 2017). Chez les poissons, les prébiotiques, tels que l'inuline, les fructo-oligosaccharides (FOS) et les mannan-oligosaccharides (MOS) ont été incorporés aux régimes FM/FO, ce qui a eu de nombreux effets positifs (Ringø et al., 2010). Les prébiotiques améliorent positivement les performances de croissance des poissons qui, associées à une plus grande activité des enzymes digestives intestinales telles que la protéase, l'amylase, la lipase, permettent une meilleure disponibilité des nutriments pour l'hôte et pour le microbiote chez un grand nombre de poissons (Nawaz et al., 2018; Porter et al., 2022a; Rohani et al., 2022; Song et al., 2014). Chez la truite, il a été démontré que l'utilisation de prébiotiques entraînait une stimulation de différentes voies métaboliques au niveau de différents organes et tissus (Lokesh et al., 2023, 2022). De plus, chez le tilapia, la supplémentation en inuline dans un régime riche en glucides, entraîne une diminution de la lipogenèse ainsi qu'une meilleure homéostasie glucidique (**figure 45**) (Wang et al., 2021). En outre, l'utilisation de prébiotiques induit un changement dans la diversité du microbiote en faveur de certaines bactéries commensales telles que les bactéries lactiques ou *Bacillus* (Hoseinifar et al., 2011; Lokesh et al., 2023, 2022). Cette amélioration de la croissance des poissons est associée à un renforcement de la réponse immunitaire.



**Figure 45** : Effet de l'utilisation du prébiotique inuline chez le tilapia en supplémentation d'un régime fort en glucides (HC), sur le pourcentage de survie, l'expression de gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires (*tgf-β*, *il-10*), l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (*srebP*, *acly*, *acca*), ainsi que les taux de glucoses sanguins, la production d'insuline, et le taux de glycogène (Wang et al., 2021). Pour les taux de glucoses sanguins et le taux d'insuline : ligne noire, poissons nourris avec régimes contrôles (35% d'amidon) ; ligne grise, poissons nourris avec régime fort en glucides (45 % d'amidon) ; ligne rouge, poissons nourris avec 45 % d'amidon et 5 g/kg d'inulin.

De nombreuses études démontrent les effets positifs des prébiotiques sur la santé des poissons, et plus particulièrement sur celle de la truite arc-en-ciel, avec une activité plus élevée du lysozyme et du complément (ACH50), et des niveaux d'immunoglobulines, lors d'un défi contre une bactérie pathologique comme *Aeromonas salmonicida*, associés à de meilleurs taux de croissance (Soleimani et al., 2012; Syed Raffic Ali et al., 2018; Tiengtam et al., 2015). Chez la truite arc-en-ciel, les prébiotiques stimulent l'activité hémolytique, l'activité phagocytaire, la production de mucus et une réduction du taux de survie lors d'une épreuve contre *Enterococcus faecalis* (Estrada et al., 2009; Rodriguez-Estrada et al., 2013). Chez le poisson zèbre, l'utilisation d'acétate permet d'améliorer l'homéostasie glucidique (A. Wang et al., 2021a; H. Zhang et al., 2020). L'utilisation de fructoolisaccharides semble permettre une stimulation de certains marqueurs inflammatoires avec une augmentation de la production d'oxyde nitrique, des activités bactéricides, associées à une diminution de la quantité d'immunoglobulines, et de cellules lymphocytaires chez la daurade (Guerreiro et al., 2016).

Cependant, l'utilisation de prébiotiques chez les poissons peut varier en fonction de l'espèce et peut également conduire à une inflammation du tube digestif liée à une altération du microbiote intestinal (Cerezuela et al., 2013) et à une réduction de plusieurs paramètres immunitaires innés (Cerezuela et al., 2008) pouvant diminuer les paramètres zootechniques (Reza et al., 2009) compliquant la compréhension des études fonctionnelles sur le microbiote intestinal.

**Les communautés de microorganismes présentes dans le tractus intestinal de la truite arc-en-ciel semblent jouer un rôle majeur pour la santé mais aussi pour la dégradation des nutriments chez l'hôte. En outre, ces communautés semblent pouvoir être modulées par la prise de prébiotiques, ce qui pourrait permettre d'améliorer les capacités de dégradation et le potentiel métabolique, ainsi que le statut inflammatoire de la truite arc-en-ciel.**



## 1.4. Objectifs généraux de la thèse

---





### 1.4.1. Problématique générale

Depuis les années 2000, les proportions de farines et huiles de poisson diminuent fortement dans les aliments aquacoles et sont remplacées en grande partie par des ingrédients végétaux. Ces derniers sont intéressants car ils sont faciles à produire en grande quantité (impact environnemental plus faible) et sont moins chers que les farines et huiles de poisson. Cependant, le remplacement total des farines et huiles de poisson par des aliments 100 % végétaux entraîne des diminutions de croissance, et une inflammation du tube digestif, liées, entre autres, à la présence de facteurs antinutritionnels.

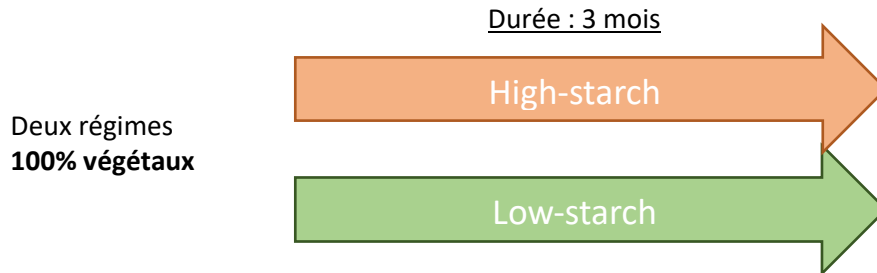
Pour répondre à la problématique générale, cette thèse vise à tester le remplacement partiel des protéines végétales par 20 % de glucides digestibles dans un régime 100 % végétal. En effet, ceci pourrait avoir plusieurs intérêts. Les glucides représentent une source énergétique peu chère, et disponible en grande quantité, bien qu'ils puissent également être utilisés pour l'alimentation humaine. Ils pourraient donc permettre de diminuer l'utilisation des protéines dans certaines voies métaboliques (baisse des rejets azotés) et réduire d'avantage le prix des aliments aquacoles, voire d'améliorer la croissance et la prise alimentaire. Le poisson étudié lors de la thèse est la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui est la principale espèce carnivore produite en France.

### 1.4.2. Objectifs de la thèse

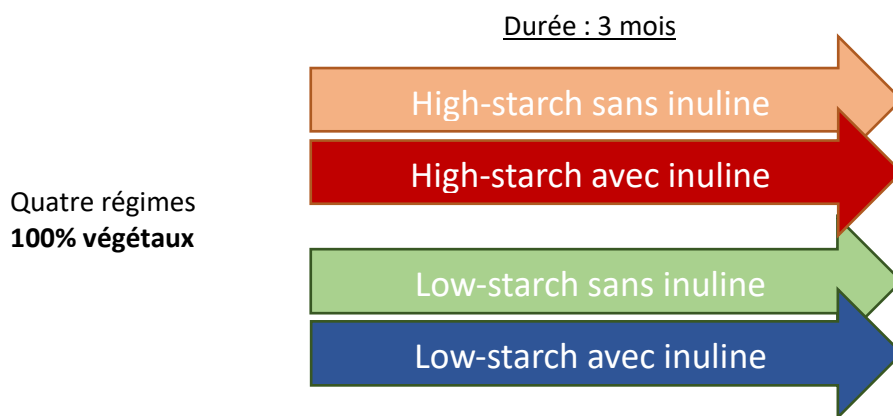
L'objectif principal de la thèse est d'évaluer si un apport élevé glucides / protéines dans un aliment 100 % végétal peut représenter une piste intéressante chez la truite arc-en-ciel. Au-delà de cet aspect « finalisé » de la thèse, l'objectif est aussi de décrire les effets des glucides alimentaires chez un poisson carnivore faiblement consommateur de glucides en condition naturelle. En effet, notre objectif est d'étudier le métabolisme de l'hôte, et donc l'utilisation métabolique des glucides, en mettant aussi en lumière le rôle potentiel du microbiote intestinal. En effet, un microbiote intestinal modulé par ces changements de sources nutritives pourrait favoriser la dégradation de ces nouveaux nutriments, et avoir des effets bénéfiques sur le statut immunitaire de l'hôte via la production de certains métabolites bactériens. Enfin, sachant que chez la truite arc-en-ciel, l'utilisation de 20 % de glucides digestibles reste un « challenge » dans un aliment « classique » à base de farines et huiles de poisson, lors de cette thèse nous testerons pour la première fois l'incorporation de glucides alimentaires en quantité importante dans un aliment 100% végétal, avec de nouvelles potentielles interactions entre nutriments.

## Organisation des travaux de la thèse :

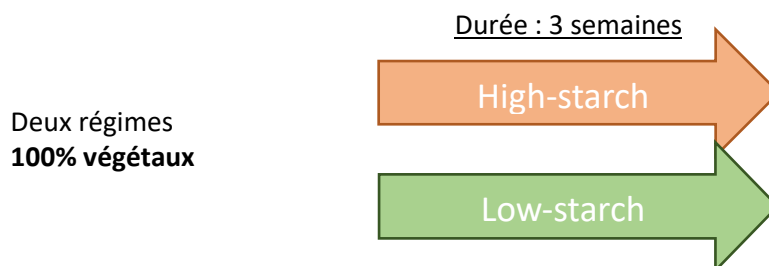
*1<sup>ère</sup> partie* : Comprendre comment le changement du ratio glucides/protéines au sein d'un régime 100% végétal affecte le **microbiote** et le **métabolisme** de la truite arc-en-ciel.



*2<sup>nd</sup> partie* : Déterminer si l'effet d'un prébiotique est bénéfique pour le **microbiote** et le **métabolisme** de la truite arc-en-ciel, et engendre une amélioration de la **santé** du poisson tout en augmentant ses **performances de croissance**.



*3<sup>ème</sup> partie* : Vérifier si les changements obtenus sur le **microbiote** et le **métabolisme** de la truite arc-en-ciel sont également retrouvés à **court terme**.



Lors de cette thèse, trois expérimentations ont été réalisées :

Le premier travail de thèse, correspondant au **premier article**, vise à déterminer si, après 3 mois de nutrition (12 semaines), le changement du ratio glucides/protéines au sein d'un régime 100% végétal induit des modifications des communautés bactériennes intestinales. De plus, la consommation d'un régime contenant des proportions de glucides digestibles importantes pouvant entraîner chez la truite des problèmes métaboliques, les métabolismes du glucose et des lipides ont été étudiés pour la première fois avec un aliment sans farines et huiles de poisson. Enfin, l'étude de certaines molécules clés du dialogue moléculaire microbiote-hôte a été initiée afin de comprendre les potentielles interactions entre le microbiote et le métabolisme de l'hôte.

Le second travail de thèse, correspondant au **deuxième article**, vise à étudier l'utilisation du prébiotique inuline afin d'améliorer l'utilisation des glucides digestibles dans un régime 100% végétal chez la truite. En effet, un article récemment publié dans « *British Journal of Nutrition* » (T. Wang et al., 2021) a montré que chez le tilapia, l'utilisation d'inuline avec un régime fort en glucides permettait une amélioration du statut métabolique, avec une augmentation de la synthèse de glycogène et une diminution de la voie de la lipogenèse hépatique. L'inuline pouvant aussi avoir un effet immunostimulant (important pour la santé de l'animal), lors de cette seconde expérimentation nous avons aussi étudié certains marqueurs de l'inflammation chez la truite.

Le troisième travail de thèse, correspondant au **troisième article**, vise à déterminer si les modifications du microbiote, et de plusieurs paramètres métaboliques, apportées par la consommation de régime 100% végétal et d'un ratio glucides/protéines observés à 12 semaines (cf. article 1), sont observables dès 3 semaines d'alimentation. En effet, la mise en évidence d'une plasticité à court terme du microbiote donnera des informations importantes pour l'intérêt d'une manipulation plus précoce et rapide du microbiote chez le poisson et donc pour la mise en place future de nouvelles stratégies d'alimentation.



## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

**Tableau 9** : Formulation des aliments donnés aux truites arc-en-ciel lors des trois expérimentations.

	Expe. 1		Expe. 2				Expe. 3	
	low-starch	high-starch	low-starch	low-starch	high-starch	high-starch	low-starch	high-starch
			0% inuline	2% inuline	0% inuline	2% inuline		
<b>Ingrédients (%)</b>								
Gluten de blé (VITAL) DZQ.190890	15	20	15	15	20	20	10,2	21,1
Amidon de blé prégélatinisé DZQ-170571	0	15,022	-	-	-	-	-	-
amidon gélatinisé de blé 200049	-	-	0	0	15	15	0	14,83
Blé entier SOAL190880 (DZQ)	0	7,091	0	0	4,86	4,86	0	7,09
CP de Pois Lysamine (Roquette) DZQ.190892	16	20	16	16	20	20	21,43	20
Tourteau de soja tracé (SOAL) DZQ.180857	15	0	15	15	0	0	-	-
Tourteau de soja non tracé (SOAL) 220378	-	-	-	-	-	-	15	0
CP de Soja Sopropêche DZQ.170718	12	0	-	-	-	-	-	-
Concentré protéique de Soja Estril 75 DZQ.180831	-	-	12	12	0	0	12	0
Gluten de maïs SOAL DZQ.180856	7,235	5,438	7,24	7,24	5,44	5,44	7,23	5,44
Conc. prot féverole Fabaqua (Sote-pro) DZQ.190910	0	5	0	0	5	5	-	-
Farine de lupin (Terrena) DZQ-180855	4,527	0	4,53	4,53	0	0	4,53	4,26
inuline 200101	-	-	0	2	0	2	-	-
Cellulose DZQ.190912	2	0	2	0	2	0	1,43	0
Huile de Colza (Analyse NUNEA 12/2019)	10,738	12	10,74	10,74	11,91	11,91	11,03	11,84
Huile de Lin (Analyse NUNEA 02/2019)	6	5,289	6	6	5,29	5,29	6	5,29
Huile de palme (Analyse NUNEA 02/2019)	2	2	2	2	2	2	2	2
Dicalcium Phosphate	2	2	2	2	2	2	2	2
L-Lysine	1	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5
L-Méthionine	1	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5
Lécithine soja poudre (Louis François) DZQ.170750	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Premix Vitamine INRA DZQ	1,5	1,16	1,5	1,5	1,5	1,5	1,16	1,16
Premix Minéraux INRADZQ.764	1,5	1,5	1,5	1,49	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>Composition (% MS)</b>								
Matière sèche (MS)	96,90	97,20	96,98	96,17	96,32	95,69	93,51	92,98
Amidon (% MS)	3,11	19,73	2,57	2,41	19,22	19,32	2,67	18,03
Protéines (% MS)	51,39	42,23	53,31	53,72	43,67	43,62	50,63	42,07
Lipides (% MS)	23,88	23,25	23,06	22,49	22,74	23,15	25,54	24,61
Energie brute (KJ g-1 MS)	25,27	24,54	25,14	25,10	24,40	24,39	25,78	25,01
Cendres (% MS)	6,05	5,12	5,86	5,98	4,99	5,00	6,14	4,97

Les expérimentations animales ont été réalisées au sein des installations de l'INRAE NuMÉA à Donzacq (Nouvelle-Aquitaine, France). Ces trois manipulations, utilisant des matériels et méthodes proches, sont décrites ensemble.

## 2.1. Éthique

Les manipulations réalisées lors de cette thèse n'ont pas nécessité l'accord d'un comité d'éthique car aucun prélèvement n'a été réalisé sur des organismes vivants, et les régimes alimentaires couvrent les besoins nutritionnels des poissons. Les expérimentations animales ont été menées conformément aux directives établies par les législations françaises et européennes pour l'utilisation et les soins des animaux de laboratoire (décret n° 2013-36 du 1er février 2013 et directive 2010/63/UE, respectivement), et réalisées avec l'aide de personnels formés à l'expérimentation animale.

## 2.2. Aliments en formulation

### 2.2.1. Formulation et production des régimes alimentaires expérimentaux 100% végétaux.

Afin d'évaluer les changements apportés par une modification du rapport glucides/protéines dans un aliment 100% végétal, la formulation (**Tableau 9**) mais aussi la production des différents granulés donnés aux truites sont primordiales. En effet, il est nécessaire de produire des aliments dans lesquels, à part le rapport glucides/protéines, un minimum de changement est opéré entre les régimes. Les régimes alimentaires composés d'ingrédients en proportions différentes doivent être iso énergétiques, iso lipidiques, et doivent présenter une faible modification de proportions en acides aminés et acides gras. De plus, les expérimentations animales étant réalisées sur des truites juvéniles, puis, jeunes adultes (mais toujours immatures), la taille des granulés produits doit être adaptée à la croissance des poissons.

Dans les régimes expérimentaux à base de végétaux, les glucides sont issus principalement d'amidon de blé sous différentes formes : amidon de blé pré-gélatinisé ou gélatinisé, blé entier ou gluten de blé. Les sources de protéines digestibles sont en particulier délivrées par les concentrés protéiques de pois lysamines, les tourteaux de soja, les concentrés protéiques de soja, le gluten de maïs, et les farines de lupin. Plusieurs huiles végétales ont été utilisées pour remplacer les huiles de poisson : l'huile de colza, l'huile de lin, et l'huile de palme. Pour finir, afin de couvrir totalement les besoins nutritionnels des poissons, des acides aminés essentiels sont ajoutés aux régimes ainsi que des vitamines et des minéraux. En outre, dans la seconde manipulation, les régimes contiennent 2% du prébiotique inuline, ou, 2 % de cellulose. La formulation de ces régimes alimentaires est réalisée grâce au logiciel « *Allix* » par Frédéric Terrier (Assistant-Ingénieur) à Donzacq.





**Figure 46** : Pisciculture de Donzacq, photographies des bacs contenant les truites arc-en-ciel utilisées pendant les expérimentations animales.

Prise alimentaire quotidienne =  $(\text{poids moyen final} - \text{poids moyen initial}) / \text{nombre de jours}$   
 Croissance spécifique =  $100 \times [(\ln \text{ poids moyen final} - \ln \text{ poids moyen initial})] / \text{nombre de jours}$   
 Efficacité alimentaire =  $\text{gain de poids (g)} / \text{consommation d'aliments en matière sèche (g)}$   
 Prise alimentaire =  $\text{matière sèche consommée} / \text{nombre de jours}$   
 Ratio d'efficacité protéique =  $\text{gain de poids (g)} / \text{apport en protéines brutes (g)}$

**Figure 47** : Calculs réalisés pour l'évaluation des paramètres zootechniques lors des différentes expérimentations animales.

L'utilisation de ce logiciel permet d'ajuster la proportion des différents ingrédients, dans le but de limiter au mieux les écarts (en termes de proportions d'acides aminés, acides gras, taux de lipides, etc.) entre les régimes. Les aliments sont produits à Donzacq grâce à un extrudeur. De plus, plusieurs filtres sont utilisés afin de produire des granulés de taille adaptée à la croissance des poissons.

## 2.3. Matériel biologique

### 2.3.1. Elevage des truites et mesures zootechniques

Afin de mesurer au mieux les changements apportés par les régimes alimentaires, des dispositions particulières ont été mises en œuvre sur le site d'expérimentation. Pour commencer, les œufs de truite sont issus du second site expérimental de l'UMR INRAE-UPPA à Lees-Athas. La pisciculture de Lees-Athas, dans les Pyrénées-Atlantiques, est alimentée par une eau à basse température  $\sim 8^{\circ}\text{C}$ , toute l'année, ce qui permet une meilleure reproduction des truites. Une fois éclos, les alevins de truites sont déplacés sur le site de la pisciculture de Donzacq, dans les Landes, présentant une eau plus chaude  $\sim 17^{\circ}\text{C}$  (toute l'année), ce qui permet une meilleure croissance des truites. Pour chaque expérimentation réalisée au cours de cette thèse, 3 bacs sont utilisés par condition (**Figure 46**). Chaque bac contient environ 170 L d'eau, avec un pH de 7.5, un débit d'eau de 0.3 L/s, et avec un taux d'oxygène de 9 mg/L. Environ 30 truites arc-en-ciel y sont placées, ce qui semble être une densité optimale pour les poissons car peu stressante (Roy et al., 2021). Seules les femelles sont utilisées, elles sont nourries deux fois par jours avec les régimes expérimentaux. Le poids des poissons par bac et la quantité d'aliments donnés aux poissons sont mesurés toutes les 3 semaines ; et les morts sont comptés. Différents paramètres zootechniques sont ainsi calculés tels que : la prise alimentaire quotidienne et la croissance spécifique (**Figure 47**).

### 2.3.2. Échantillonnages

À la fin de la période d'expérimentation, entre 4 et 8 truites par bac sont prélevées de manière aléatoire, 6 heures ou 25 heures après leur dernier repas. Le point 6 heures après le dernier repas correspond au pic de glycémie post-prandiale chez la truite arc-en-ciel (Polakof et al., 2012). Le point 25 heures est classiquement utilisé pour l'étude du microbiote intestinal chez la truite arc-en-ciel. Les poissons sont anesthésiés par 50 mg/L de benzocaïne, puis euthanasiés par 150 mg/L de benzocaïne. Le sang est prélevé à partir de la veine caudale à l'aide de seringues et de tubes héparinés, puis centrifugé à 12 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes, en vue de la collecte de plasma. Le plasma est récupéré puis stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Les différents tissus (foie, muscles dorsaux, tissus adipeux, tissus intestinaux proximaux et distaux (aussi appelés midgut et hindgut respectivement) sont prélevés, puis immédiatement plongés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C avant différentes analyses d'expression de gènes, de composition et d'activités enzymatiques. Concernant les prélèvements pour l'analyse du microbiote intestinal : les contenus digestifs sont prélevés au niveau de l'intestin proximal et les échantillons de mucus sont également récupérés en grattant l'extérieur des tissus intestinaux de l'intestin proximal avec un scalpel. Plusieurs truites entières par bac sont stockées à - 20 °C dans le but de réaliser des analyses de composition corporelle.

## **2.4. Protocoles analytiques**

### **2.4.1. Analyse de la composition des régimes expérimentaux et de la composition corporelle**

Afin de s'assurer de la composition réelle des aliments, mais aussi de la composition corporelle finale et initiale des poissons, des analyses biochimiques sont réalisées. Les matières sèches sont mesurées après séchage des échantillons à 105 °C, pendant 8 h. L'analyse de la proportion en lipides est réalisée grâce à la méthode Folch (Folch et al., 1953). Le taux de protéines est mesuré par la méthode Kjeldahl (FOSS, Danemark). L'énergie brute des échantillons est mesurée à l'aide d'un colorimètre de bombe adiabatique (IKA, Heitersheim Gribheimer, Allemagne). Le contenu en amidon est mesuré grâce au kit Megazyme (Megazyme, Bray, Ireland).

### **2.4.2. Quantification des métabolites plasmatiques et hépatiques**

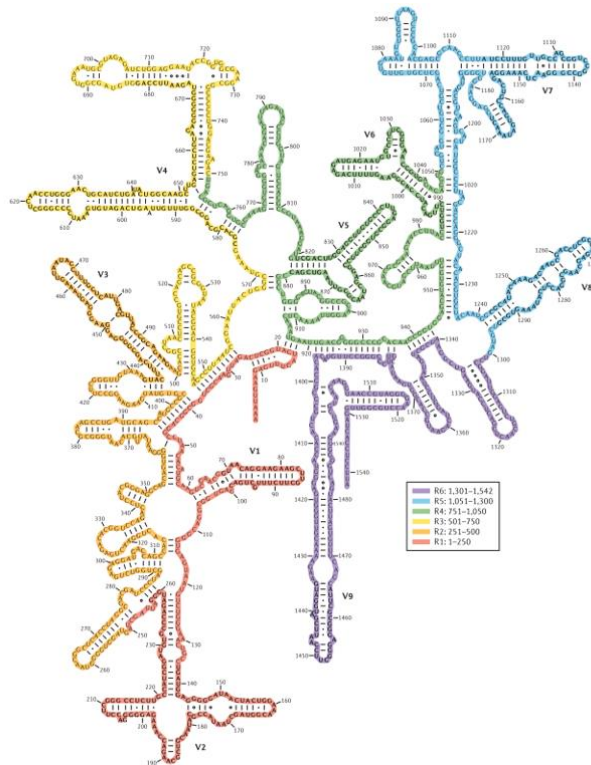
Plusieurs paramètres plasmatiques et hépatiques sont analysés avec 12 répliques par groupe (4 poissons par bac). Plusieurs kits commerciaux sont utilisés afin de mesurer l'effet des régimes alimentaires sur, la glycémie post-prandiale (Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France), le taux de triglycérides (Sobioda), le taux de cholestérol (Sobioda), et le taux de lactate (Kit Randox, Crumlin, Royaume-Uni), en respectant les consignes des fabricants. Ces kits sont réalisés à partir de 5 µL de plasma par puits et sont utilisés en plaques de 96 puits. En outre, le taux de glycogène hépatique est mesuré grâce à la méthode développée par Good et al. (Good et al., 1933).

### **2.4.3. Analyse de la composition du microbiote intestinal**

L'analyse de la composition du microbiote est réalisée avec 12 répliques par groupe (4 poissons par bac), par une méthode de métagénomique ciblée permettant d'établir l'inventaire des microorganismes présents dans les échantillons.

#### *Extraction d'ADN*

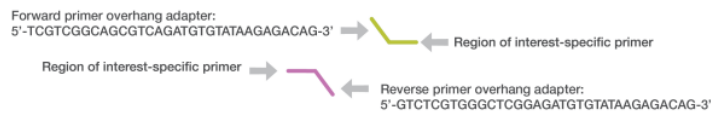
L'extraction de l'ADN est réalisée au niveau des contenus digestifs et du mucus grâce au kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Pour commencer, environ 200 mg d'échantillons à - 80 °C sont ajoutés à 1 : 7 (soit environ 1,4 mL) de buffer inhibitex, préalablement chauffé à 70 °C. Le buffer inhibitex protège les échantillons face à des inhibiteurs PCR et favorise l'amplification PCR.



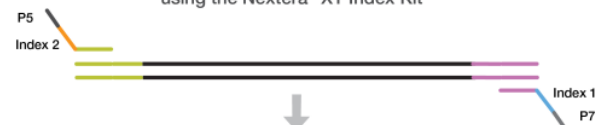
**Figure 48** : Structure secondaire de l'ARNr 16S ribosomal d'*Escherichia coli* (Yarza et al., 2014).

### 16S V3 and V4 Amplicon Workflow

PCR amplify template out of genomic DNA using region of interest-specific primers with overhang adapters



Attach indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera® XT Index Kit



Normalize and pool libraries



Sequence

**Figure 49** : Vue globale du protocole *Illumina* pour l'amplification, les deux PCR, et le séquençage des régions variables V3 et V4 de l'ARNr 16S.

Une étape de broyage est réalisée grâce à l'utilisation d'un broyeur à billes (Vibrobroyeur, VWR, Radnor, USA), et avec l'utilisation de billes de zirconium stériles. L'homogénéat est ensuite incubé dans un bain-marie sec (Thermomixer compact, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à 70 °C pendant 10 minutes, puis homogénéisé pendant 15 secondes (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Pittsburgh, USA). Une étape de centrifugation (Centrifuge 5424, Eppendorf) à 20 000 g pendant 2 min est réalisée afin de culotter les particules en suspension. Un volume de surnageant de 600 µL est placé dans un tube contenant 25 µL de protéinase K. La protéinase K permet l'inactivation des DNases et RNases et l'élimination de contaminants. Un volume de 600 µL de buffer AL est ajouté. Dans chaque échantillon, 600 µL d'éthanol absolu sont ajoutés au lysat et une homogénéisation est réalisée. À partir de cette étape, 600 µL du dernier lysat sont ajoutés à la colonne QIAamp. Afin de purifier l'ADN présent sur les filtres des colonnes QIAamp, et de retirer les molécules indésirables, les buffers AW1 et AW2 sont utilisés à hauteur de 500 µL puis rejetés après une rapide centrifugation. Les colonnes QIAamp sont une nouvelle fois mises à centrifuger sans tampon afin de sécher et de retirer les sels encore présents sur les filtres. Enfin, 75 µL du buffer d'élution ATE, préalablement chauffé à 70 °C, sont ajoutés afin de libérer l'ADN de la colonne pour le récupérer dans un tube Eppendorf. Les ADN issus des contenus digestifs et des mucus sont ensuite stockés à - 20 °C. Une mesure de la quantité d'ADN est réalisée par spectrophotométrie.

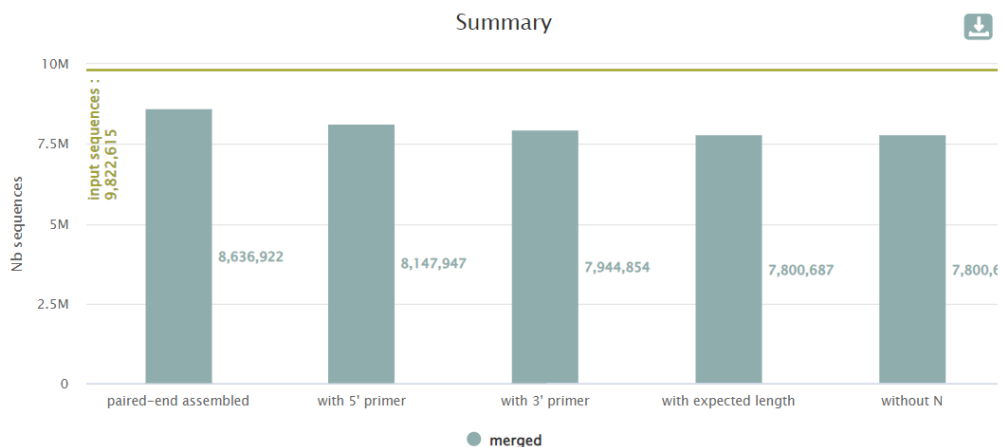
#### *PCR 1 pour amplification spécifique des régions V3 - V4 de l'ARNr 16S*

Pour analyser la composition du microbiote, une amplification des régions V3 - V4 de l'ARN ribosomal 16S (**Figure 48**) est réalisée. Le gène 16S est spécifiquement choisi car, en raison de sa fonction essentielle pour l'assemblage des ribosomes bactériens, il est retrouvé dans le génome de tous les organismes procaryotes. En outre, en plus de régions constantes, il présente des régions variables, permettant l'identification spécifique des microorganismes. L'amplification de cette séquence de 460 nucléotidiques est réalisée par une réaction en chaîne de polymérase (PCR). Pour l'amplification des régions V3 - V4 de l'ARNr 16S, les amorces suivantes sont utilisées :

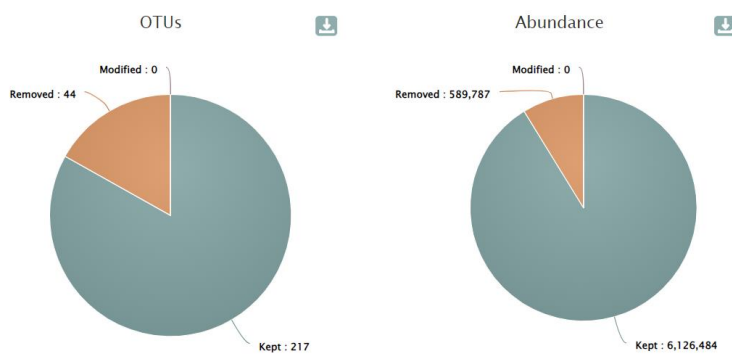
F (Forward) : 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

R (Reverse) : 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

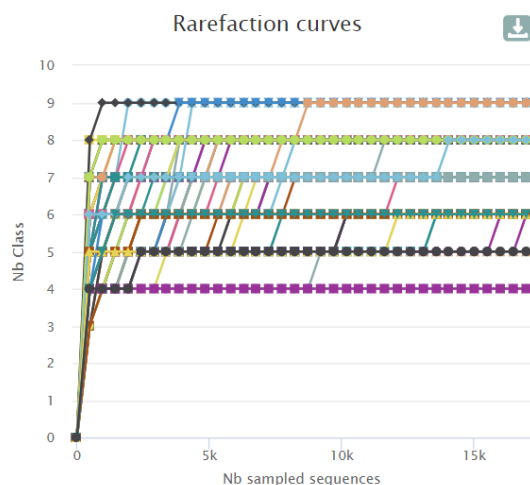
Les parties vertes de ces amorces correspondent aux adaptateurs (**Figure 49**). Les parties rouges correspondent aux premiers nucléotides des régions variables V3-V4 qui seront amplifiées. Pour réaliser la PCR, un mix est réalisé avec 2,5 µL d'ADN (5 ng/µL) ; 5 µL des amorces F et R (1 µM); 12,5 µL de polymérase KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Bâle, Suisse). Cette polymérase permet l'amplification des fragments d'ADNc, et ce réactif contient 0.3 mM de nucléotides, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, et des stabilisateurs.



**Figure 50** : Visualisation d'un rapport de pré-process produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expé.), permettant d'évaluer la quantité de séquences exploitables et l'élimination selon les critères choisis.



**Figure 51** : Visualisation de la quantité d'OTU et de la quantité de séquences gardées ne faisant pas partie de la base de données de contaminants « PhiX », rapport produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expé.).



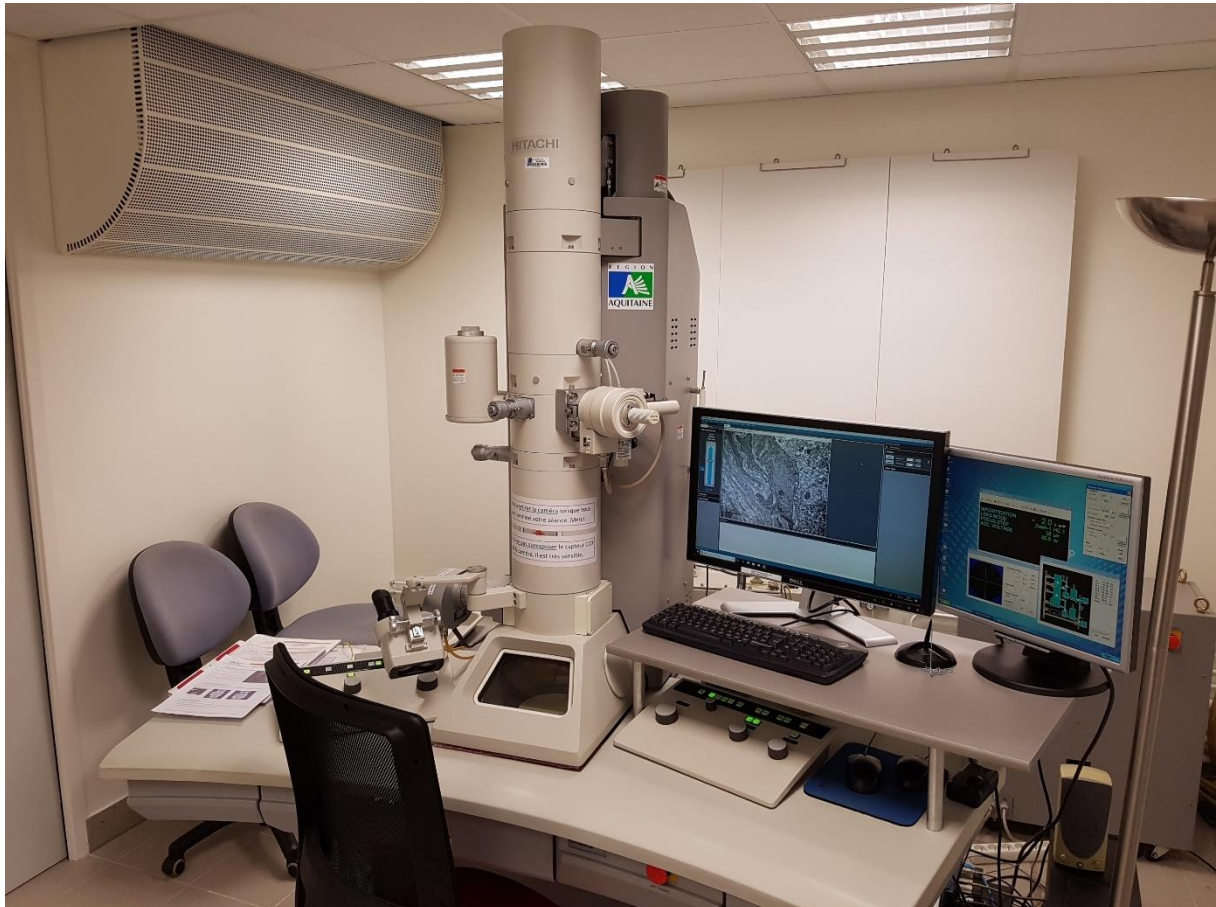
**Figure 52** : Visualisation des courbes de raréfaction atteignant un plateau, rapport produit par FROGS (1<sup>ère</sup> expé.).

Puis, à l'aide d'un thermocycleur (T100 Thermal Cycler, BioRad, Hercules, USA), 35 cycles de variation de température selon le programme suivant : 3 minutes de pré-incubation à 95 °C, 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation à 55 °C pendant 30 secondes, et élongation à 72 °C pendant 30 secondes, suivi d'une élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes. Les ADN génomiques extraits des souches de *Escherichia coli* et de *Lactobacillus plantarum*, sont utilisés comme témoins positifs lors de cette PCR. De plus, les ADN extraits des échantillons d'eau des bacs et des aliments donnés aux poissons sont également utilisés comme contrôles et séquencés. Les différents produits PCR (échantillons et témoins) sont contrôlés par un gel d'agarose. À la suite de cette première PCR et de la vérification des produits amplifiés par gel d'agarose, les produits sont envoyés à la plateforme de séquençage (« La plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux »). Une seconde PCR est réalisée par la plateforme de séquençage, avec des amorces spécifiques, dans le but d'ajouter des index aux produits PCR qui permettront de réaliser le séquençage des amplicons des régions V3- V4 de l'ARNr 16S.

#### *Analyse des données de séquençage*

Les résultats de séquençage sont récupérés sous forme de fichiers fastq, et d'un rapport de la qualité du séquençage. Ces données sont analysées avec l'aide de FROGS (Escudié et al., 2018). Dans un premier temps, les séquences ne faisant pas la taille attendue, étant dépourvues d'amorces F ou R, ou présentant des ambiguïtés au niveau de certains nucléotides, sont retirées (**Figure 50**). Dans un second temps, les séquences ne présentant qu'un nucléotide de différence sont regroupées ensemble sous forme de « cluster », par la méthode de « clustering swarm » (Mahé et al., 2014). Puis, les clusters présents en très faible proportion sont éliminés par le biais de l'outil « OTU filter » de FROGS : élimination des clusters présents dans 4 échantillons ou moins, ou représentant moins de 0.005 % de toutes les séquences, selon les recommandations de Bokulich et al., 2013 (Bokulich et al., 2013). De plus, les séquences pouvant contenir des contaminants (chloroplastiques ou mitochondriaux) sont retirées avec l'aide de la banque de données de contaminants « phiX » (Mukherjee et al., 2015) (**Figure 51**). Ensuite, chaque cluster restant est affilié à une taxonomie bactérienne grâce à la base de données « silva 138.1 pintail100 16S ». Pintail\* représente la probabilité que l'ADN séquencé contienne des anomalies ou soit une chimère, et 100 signifie que la probabilité d'anomalie ou de chimère est faible. La version 138.1 de la base de données silva a été utilisée pour les trois études. Dans cette base de données, il est important de préciser que les bactéries du genre *Mycoplasma* sont apparentées au phylum des *Firmicutes* et non à celui des *Tenericutes* ("<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>," n.d.). Enfin, des courbes de raréfaction sont obtenues (**Figure 52**).





**Figure 53** : Microscope électronique à transmission de type Hitachi utilisé lors de la 1<sup>ère</sup> expérimentation au Centre d'imagerie de Bordeaux - Université de Bordeaux.

Les données de séquençage sont extraites de FROGS sous forme de fichier « Phyloseq » utilisable sur le logiciel *Rstudio* (version 2022-07-22), et contenant un fichier « BIOM » présentant les abondances de chaque cluster ; un fichier taxonomie permettant de relier chaque cluster à une taxonomie ainsi qu'un fichier « Tree » permettant d'établir des rapprochements phylogénétiques. Toutes les analyses des données sont finalement réalisées sur le logiciel *Rstudio*.

#### **2.4.4. Microscopie électronique à transmission**

Les études de microscopie électronique ont été menées au Centre d'imagerie de Bordeaux - Université de Bordeaux, une installation centrale du réseau français "France Bio Imaging". Cette étude a été réalisée sur la première expérimentation uniquement à partir de 6 poissons par groupe (2 par bac), au niveau de l'intestin proximal et de l'intestin distal. Ces échantillons intestinaux ont été fixés avec 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) pendant 2 heures à température ambiante et conservés à 4 °C. Les échantillons ont été lavés dans un tampon phosphate 0,1 M, puis fixés dans du tétroxyde d'osmium à 1 % (v/v) dans un tampon phosphate 0,1 M, pendant 2 heures dans l'obscurité, suivi d'une étape de lavage à l'eau. La déshydratation (par une série d'éthanol graduée) et les préparations d'inclusion dans la résine époxy (Epon 812 ; Delta Microscopy, Toulouse, France) ont été réalisées à l'aide du processeur automatique de tissus à micro-ondes pour la microscopie électronique (Leica EM AMW ; Leica Microsystems, Vienne, Autriche). La polymérisation de la résine a été effectuée à 60 °C pendant une période de 24 à 48 heures. Les échantillons ont ensuite été sectionnés à l'aide d'un couteau diamanté (Diatome, Biel-Bienne, Suisse) sur un ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienne, Autriche). Des coupes épaisses (500 nm) ont été préparées avec une coloration au bleu de toluidine pour localiser la région d'intérêt. Ensuite, des sections ultrafines (70 nm) ont été prélevées sur des grilles de cuivre et ensuite colorées avec de l'uranyle et du citrate de plomb. Les grilles ont été examinées avec un microscope électronique à transmission (H7650, Hitachi, Tokyo, Japon) à 80kV (**Figure 53**) .



**Figure 54** : Spectromètre de masse de type SIFT-MS utilisé dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire IPREM de l'Université de Pau et des pays de l'Adour, dans le but de mesurer la quantité de métabolites bactériens.

#### 2.4.5. Analyses de la production de certains métabolites bactériens (acides gras à chaîne courte)

Lors de cette thèse, une collaboration est réalisée avec le laboratoire IPREM de l'Université de Pau & des Pays de l'Adour. Cette collaboration vise à quantifier la concentration de différents métabolites bactériens, retrouvés dans les échantillons de contenus digestifs, à l'aide d'un spectromètre de masse de type « SIFT-MS » (**Figure 54**). Pour cela, les échantillons congelés de contenus intestinaux ont été pesés et placés dans une microchambre  $\mu$ CTE250 de 114 ml (Markes international, Llantrisant, UK). La microchambre a été chauffée à 100 °C avec un débit de 60 ml/min-1 d'azote sec. Un tube à flux d'ions sélectionnés - spectromètre de masse (SIFT-MS) - a été connecté, par un connecteur en T, à la microchambre avec un débit d'échantillonnage de 20 mL.min-1. Un SIFT-MS Voice 200 Ultra (SYFT Technologies, Christchurch, Nouvelle-Zélande) générant trois ions réactifs positifs ( $H_3O^+$ ,  $O_2^+$ ,  $NO^+$ ) et utilisant un gaz porteur d'azote (Air Liquid, Alphagaz 2) a été utilisé dans cette étude. Des spectres de masse à balayage complet ont été enregistrés pour chaque ion précurseur positif dans une plage de 15 à 250 avec un temps d'intégration de 60 secondes et ont été accumulés pendant 16 heures. L'identification a été basée sur des modèles de réaction ion-molécule spécifique des analytes cibles, avec les trois ions précurseurs positifs décrits dans la littérature et dans la base de données du logiciel LabSyft (LabSyft 1.6.2, SYFT Technologies). Dans l'analyse SIFT-MS, la quantification est simple et ne nécessite que la mesure du taux de comptage de l'ion précurseur [R] et des ions produits [P]. La concentration de l'analyte ( $\mu$ g/g) dans le tube d'écoulement [A] a été déterminée selon la formule suivante :

$$[A] = \frac{[P]}{tr \cdot k[R]}$$

Où  $tr$  est le temps de réaction dans le tube d'écoulement et  $k$  est la constante de vitesse de réaction apparente. Lors de la première expérimentation, 5 échantillons par modalité expérimentale ont été mesurés, et 6 par condition lors de la seconde expérimentation.



#### 2.4.6. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel

L'un des objectifs de ma thèse est d'analyser l'effet des régimes expérimentaux et en particulier la modification du rapport glucides/protéines au niveau de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques de différents tissus et organes, lors des 3 expérimentations. De plus, l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'immunité et des jonctions serrées de l'intestin a aussi été étudiée, en particulier lors de la deuxième expérience de la thèse.

##### *Extraction d'ARN*

Pour mesurer l'effet des régimes alimentaires sur l'expression des gènes, la quantification de la transcription de gènes en ARN est réalisée. Pour cela, dans un premier temps, une extraction de tous les ARNs doit être réalisée dans les différents tissus et organes. Pour chaque analyse, 12 réplicats par groupe (4 poissons par bac) sont réalisés. Lors de cette thèse, les ARN ont été extraits à partir de foies, muscles, tissus adipeux, intestin proximal et intestin distal. Pour cela, environ 100 mg de foie et de muscles et environ 400 mg de tissus adipeux, d'intestin proximal, et d'intestin distal sont récupérés, et immédiatement placés dans 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Le réactif TRIzol permet de préserver l'intégrité des ARN en raison de l'inhibition des RNase après lyse des échantillons, et améliore l'isolement des ARN. Les échantillons sont homogénéisés avec 5 billes de zirconium, à l'aide d'un broyeur à billes, pendant 2 fois 30 secondes (2 fois 1 minute pour les échantillons d'intestin proximal et distal). Pour l'extraction des tissus adipeux, une étape de clarification est réalisée, correspondant à une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g à 4 °C (Centrifuge 5804R, Eppendorf). Le surnageant est récupéré (c'est-à-dire la phase du TRIzol) et la phase transparente contenant la majorité de la matière grasse est éliminée. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 200 µL de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube, pour tous les tissus, et homogénéisés. Le chloroforme permet de séparer l'homogénat en une couche aqueuse supérieure transparente contenant l'ARN, et d'autres couches contenant les protéines, l'ADN, et les débris cellulaires. Ces différentes phases sont obtenues à l'issue d'une étape de centrifugation de 15 minutes à 12 000 g à 4 °C. Pour les échantillons de tissus adipeux, la phase supérieure est récupérée et cette étape, utilisant le chloroforme, est réalisée une seconde fois. Puis, pour tous les échantillons, la phase supérieure est récupérée et un volume égal d'isopropanol est ajouté (environ 500 µL). Les échantillons sont homogénéisés puis centrifugés 10 minutes (20 minutes pour les tissus adipeux) à 12 000 g et à 4 °C. L'ARN est culotté au fond du tube. Les surnageants (isopropanol) sont éliminés et 1 mL d'éthanol réfrigéré, dilué à 75 % avec de l'eau distillée est ajouté. Une dernière centrifugation est effectuée pendant 5 minutes à 7 500 g à 4 °C.



L'éthanol est finalement éliminé délicatement et le culot est séché. Pour finir, l'ARN est remis en suspension dans 100 µL d'eau RNase free (VWR). Un gel d'agarose est réalisé ainsi qu'une lecture de l'absorbance à 270 nm avec un spectrophotomètre (Epoch2 Microplate Reader, BioTek, Winooski, USA), afin de déterminer les concentrations.

#### *Reverse transcription*

La quantification de l'expression des gènes par qPCR se fait à partir de brins d'ADN complémentaire. La rétrotranscription des ARN extraits en ADN complémentaire peut être réalisée grâce à des reverse transcriptases. Sur le principe, le protocole utilisé consiste à rétro-transcrire 1 µg d'ARN en ADNc, grâce à l'utilisation de l'enzyme SuperScript III et à l'utilisation d'amorces aléatoires et de nucléotides. Pour commencer, 2 µg d'ARN sont dilués dans 20 µL d'eau RNase free pour chaque échantillon. Un premier mix est réalisé avec 2 µL d'amorces aléatoires (Random primer C1181, Promega, Madison, USA) et 2 µL de nucléotides (PCR Nucleotide Mix C1145, Promega) par échantillon. Les échantillons sont homogénéisés et un premier programme de dénaturation est réalisé à l'aide d'un thermocycleur (T100 Thermal Cycler, BioRad) pendant 5 minutes à 65 °C, puis 1 minute à 4 °C. Ensuite, chaque échantillon (de 24 µL) est divisé en deux aliquots de 12 µL afin que chaque échantillon soit rétro-transcrit en duplicat. Un second mix est réalisé avec, par échantillon : 1,5 µL d'eau RNase Free (VWR), 4 µL de Tampon 5X, 1 µL de dTT, 1 µL de RNase Out (Thermo Fisher Scientific), et 0,5 µL de Transcriptase inverse SuperScript III (Thermo Fisher Scientific). Après homogénéisation, les échantillons (20 µL) sont placés une seconde fois en thermocycleur, pour la synthèse des ADN complémentaires. Le programme utilisé est 5 minutes à 25 °C, 60 minutes à 55 °C (élongation de l'ADNc), et 15 minutes à 70 °C (inactivation de l'enzyme). Lors de cette manipulation, plusieurs contrôles sont réalisés : deux contrôles sans ARN (blancs RT) sont utilisés ainsi que deux (par groupe expérimental) sans l'enzyme SuperScript III (blancs ADN).

#### *PCR en temps réel (qPCR pour quantitative PCR)*

La technique de qPCR permet de mesurer en temps réel le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorce) produits par la réaction de polymérisation en chaîne. La réaction a lieu en présence d'une matrice d'ADNc, d'un couple d'amorces, de nucléotides, et d'une enzyme polymérase. De plus le suivi continu de l'amplification est permis grâce à la détection de fluorescence émise par les produits néo synthétisés, grâce à l'utilisation de l'intercalant de l'ADN : SYBR green (PerfeCTa® SYBR® Green SuperMixes et FastMixes™, VWR). Au cours des différents cycles de la qPCR, la fluorescence émise augmente proportionnellement avec la quantité d'ADN amplifié. L'intensité de la fluorescence est enregistrée et quantifiée à chaque cycle par le thermocycleur (C1000 Touch Thermal Cycler CFX384 Real-Time System, BioRad).





La qPCR est réalisée à partir des duplicats de rétrotranscription (RT1 & RT2). Une dilution est réalisée au 1/80<sup>ème</sup> pour les échantillons de foie et au 1/40<sup>ème</sup> pour les échantillons de muscles, tissus adipeux, et tissus intestinaux. La qPCR est réalisée en duplicat pour le gène de référence (2 x RT1 et 2 x RT2), et en simplicat pour les gènes d'intérêt (1 x RT1 et 1 x RT 2). Les qPCR sont réalisées dans une plaque 384 puits. Un pool d'ADNc non dilué est réalisé en mixant 2 µL de chaque échantillon dilué avec de l'eau RNase Free permettant la production d'une gamme de dilution (1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup>, 1/80<sup>ème</sup>, 1/160<sup>ème</sup>, et 1/320<sup>ème</sup>), qui est ajoutée sur chaque plaque en triplicat. Les différents contrôles (Blancs RT et Blancs ADN) réalisés pendant la rétrotranscription sont également placés sur la plaque en duplicat. Un mix est réalisé avec, par échantillons : 3 µL de l'intercalant d'ADN SYBR green, 0.24 µL (10 µM) d'amorces F et R (permettant l'amplification des gènes d'intérêt), et 0.52 µL d'eau RNase Free. Dans chaque puits, 4 µL de mix sont mélangés avec 2 µL d'ADNc. Le programme utilisé pour l'amplification des ADNc par le thermocycleur est le suivant : une pré-incubation de 10 minutes à 95 °C, 45 cycles de, dénaturation de 15 secondes à 95 °C, hybridation de 10 secondes à 60 °C, et élongation de 15 secondes à 72 °C. Une courbe de fusion est réalisée, de 5 secondes à 95 °C, et 60 secondes à 65 °C, afin de s'assurer de la spécificité du produit amplifié. La normalisation des résultats est permise grâce à l'utilisation de gènes de référence. Dans les échantillons de foie, de tissus adipeux, et de muscles, le gène de référence chez les salmonidés *ef1α* est utilisé (Olsvik et al., 2005), le gène codant pour la GAPDH a aussi été testé ; dans les échantillons de tissus intestinaux c'est le gène de la *beta-actine* qui est utilisé, gène faiblement régulé chez les salmonidés (Olsvik et al., 2005). La quantification de l'expression des gènes d'intérêt est réalisée à partir du Ct (*cycle threshold*) obtenu. La méthode de Livak est utilisée pour mesurer les expressions relatives ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), avec  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ référence}$ . Les gènes d'intérêt utilisés proviennent des bases de données du laboratoire ou sont issus de publications scientifiques, et sont disponibles en annexe.

#### **2.4.7. Activités enzymatiques**

Les activités enzymatiques de certaines enzymes clés du métabolisme ont été réalisées. La glucokinase (GK), la pyruvate kinase (PK), la glucose-6-phosphatase (G6Pase), et l'acide gras synthase (FAS) ont été mesurées dans le foie, avec 12 réplicats par groupe. Les tissus utilisés pour mesurer l'activité enzymatique de la FAS sont broyés dans 10 volumes de buffer glacé à pH 7.4 contenant 50 mmol/L TRIS, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, et un inhibiteur de protéase (Sigma, St Louis, MO). Après homogénéisation, l'échantillon est centrifugé à 4 °C et immédiatement utilisé dans les essais enzymatiques. Les tests enzymatiques sont : glucokinase (GK; EC 2.7.1.2) (S. Panserat et al., 2000), pyruvate kinase (Pk; EC 2.7.1.40) (Séverine Kirchner et al., 2003), glucose-6-phosphatase (G6Pase; EC 3.1.3.9) (S. Kirchner et al., 2003), et acide gras synthase (FAS ; EC 2.3.1.85) (Chang et al., 1967).



Les activités enzymatiques sont mesurées à 37 °C, en duplicat, en suivant les variations d'absorbance à 340 nm. Les réactions sont initiées par l'addition d'un substrat spécifique et le lecteur de plaque Power Wave X (BioTek Instrument, Inc.) est utilisé. Un blanc est réalisé pour chaque échantillon, en remplaçant le volume de substrat par un volume d'eau RNase Free.

Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme catalysant la transformation de 1 µmol de substrat par minute, sauf pour l'acide gras synthase qui a été exprimé comme la quantité d'enzyme oxydant 1 µmol de NADPH à 37°C. Les activités enzymatiques ont été exprimées par mg de protéine soluble. La concentration en protéines a été mesurée en triplicat selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide d'un kit de dosage des protéines (Bio Rad, München, Allemagne) avec de l'albumine sérique bovine comme étalon.

#### **2.4.8. Mesures de marqueurs inflammatoires plasmatiques**

##### *Lysozyme*

L'activité du lysozyme (12 échantillons par condition, 4 poissons par bac) est quantifiée selon un protocole décrit par Peixoto et al. (Peixoto et al., 2022). Sur une microplaque, 15 µL de plasma sont incubés dans 250 µL d'une solution de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 25 °C. L'absorbance est lue après 30 secondes et après 15 minutes d'incubation à 450 nm. Une courbe de référence est réalisée avec une dilution en cascade de lysozyme de blanc d'œuf de poule lyophilisé (Sigma-Aldrich). Les concentrations de lysozyme sont calculées en utilisant l'équation de la courbe de référence.

##### *Activité anti-trypsine*

L'activité anti-trypsine (12 échantillons par condition, 4 poissons par bac) est mesurée selon le protocole de Peixoto et al. (Peixoto et al., 2022). Pour cela, 10 µL de plasma sont mélangés avec 10 µL de solution trypsine (5 mg/ml, dans du NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3) et incubés pendant 10 minutes à 22 °C. Un volume de 100 µL de tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (13,9 mg/ml, Ph 7,0), et 125 µL de d'azocasein (20 mg/ml, dans du NaHCO<sub>3</sub>) sont mélangés au mix précédent et les échantillons sont incubés 1 heure à 22 °C, dans l'obscurité. Une solution d'acide trichloracétique (100 mg/mL) est ajoutée à hauteur de 250 µL dans les puits et une nouvelle incubation de 30 minutes est réalisée dans l'obscurité, à 22 °C. Une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 5 minutes est réalisée (Centrifuge 5424). Le surnageant (100 µL) est transféré sur une plaque 96 puits, contenant 100 µL de NaOH (40 mg/mL) par puits. Enfin, une lecture de l'absorbance est effectuée à 450 nm en duplicat (Epoch2).



Un échantillon de référence est réalisé en remplaçant le volume de plasma par un volume de tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le pourcentage de l'activité anti-trypsine est mesuré selon le calcul suivant :

$$\% \text{ trypsine non inhibée} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times 100}{\text{Absorbance de la référence}}$$

$$\% \text{ trypsine inhibée} = 100 - \% \text{ trypsine non inhibée}$$

#### *Oxyde nitrique*

La mesure de l'oxyde nitrique plasmatique est réalisée en accord avec les instructions du kit colorimétrique utilisé (Nitrite/Nitrate colorimetric test, Roche, Boulogne-Billancourt, France) avec 12 échantillons par condition, 4 poissons par bac. Tout d'abord, pour la réalisation de la gamme de référence, 1 mL de sodium nitrite et 1 mL de potassium nitrate sont mélangés, puis dilués en cascade à partir de 10 µL de ce mix, pour obtenir les concentrations finales : 5 mg/L ; 2,5 mg/L ; 1,25 mg/L ; 0,625 mg/L ; 0,3125 mg/L ; 0,156 mg/L ; 0,078 mg/L ; 0,039 mg/L. Puis, 100 µL de chaque point de la gamme (en duplicat), ou 100 µL d'H<sub>2</sub>O (blanc), ou 100 µL de plasma dilué au 1/10<sup>ième</sup> (en duplicat) sont mélangés avec 50 µL de la solution R2 du kit, et 4 µL de la solution R3 du kit. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est réalisée sous agitation constante, et une première lecture est effectuée à 540 nm. Dans un second temps, 50 µL de la solution R4, et 50 µL de la solution R5 sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante sous agitation, une seconde lecture à 540 nm est effectuée. La concentration d'oxyde nitrique est estimée en fonction des résultats de la gamme de référence.



### 2.4.9. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R Studio (version 2022-07-22). Toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  écart-type (SD). Des tests ANOVA à une ou deux voies ont été réalisés. Les données ont été testées pour leur distribution normale avec le test Shapiro-Wilk (P value > 0.05), et l'homogénéité des variances avec le test Bartlett's (P value > 0.05). Sinon, un test de Wilcoxon non paramétrique est effectué. En cas d'interaction, les comparaisons *Post-hoc* ont été réalisées avec le test Tukey's HSD. Un résultat est considéré significatif si P value < 0.05, et indiqué : \*, P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001.

### 2.4.10. Disponibilité des données de séquençage

Les données de séquençages sont entièrement disponibles dans la base de données « SRA » (*Sequence Read Archive*) établi par « NCBI » (*National Center of Biotechnology Information*).

#### SRA Accession numbers:

1<sup>ère</sup> expérimentation : PRJNA827991

2<sup>ème</sup> expérimentation : PRJNA953773

3<sup>ème</sup> expérimentation : PRJNA1007474





## Chapitre 3 : Résultats

---



Les résultats principaux obtenus lors de cette thèse font l'objet de trois articles scientifiques en cours de publication dans plusieurs journaux internationaux à comités de lecture. Dans cette partie, des résultats complémentaires, non présents dans les articles, sont également apportés. Les données supplémentaires des articles sont présentes en annexes.

**Premier article :**

**Defaix R**, Lokesh J, Ghislain M, Le Behec M, Marchand M, Véron V, Surget A, Biasutti S, Terrier F, Pigot T; Panserat S, Ricaud K. 2023. High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet. Accepté, dans *Aquaculture*. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740049>

**Deuxième article :**

**Defaix R**, Lokesh J, Frohn L, Le Behec M, Pigot T, Véron V, Surget A, Biasutti S, Terrier F, Skiba-Cassy S, Roy J, Panserat S, Ricaud K. 2023. Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant-based diet. Accepté, dans *Journal of animal Science and Biotechnology*. DOI : 10.1186/S40104-023-00951-Z.

**Troisième article :**

**Defaix R**, Lokesh J, Surget A, Terrier F, Panserat S, Ricaud K. 2023. Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet. Prêt pour soumission.



### 3.1. Résumé du premier article:

**« High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet ». Accepté dans *Aquaculture*.**

#### Objectif :

L'objectif de cette première étude est d'analyser les effets du remplacement partiel des protéines végétales par 20 % de glucides digestibles (amidon) sur le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte chez des truites arc-en-ciel nourries avec un régime 100% végétal. Ce travail vise à étudier comment ce régime alimentaire peut modifier le microbiote intestinal. Etant un poisson carnivore, la truite arc-en-ciel présente des communautés bactériennes majoritairement protéolytiques, une adaptation du microbiote vers des populations microbiennes pouvant dégrader les glucides pourrait être bénéfique pour l'hôte. En outre, l'utilisation d'un régime avec 20 % de glucides pourrait permettre de réaliser une « économie des protéines » pour la croissance (*protein sparing effect*), et encourager ainsi l'utilisation de cette source énergétique durable et peu chère dans cet aliment sans farine et huile de poisson. Cependant, un régime fort en glucides engendre chez ce poisson carnivore des troubles métaboliques tels qu'une hyperglycémie post-prandiale persistante, il est donc possible que ce remplacement des protéines végétales par les glucides ne soit pas une bonne stratégie.

#### Plan expérimental :

Pour répondre aux objectifs décrits précédemment, les aliments « high-starch » (HS), et « low-starch » (LS), sont produits sur le site de la pisciculture expérimentale de Donzacq (France) à partir d'ingrédients végétaux, exclusivement. Le régime HS correspond à un fort ratio glucides / protéines, avec 20 % de glucides digestibles et 42 % de protéines. Le régime LS est un faible ratio glucides / protéines avec 3 % de glucides digestibles et 51 % de protéines. Ces aliments sont donnés à 81 truites arc-en-ciel femelles juvéniles, environ 60 g par groupe (3 bacs de 27 poissons par groupe expérimental), pendant 12 semaines. Sur toute la période d'expérimentation, les paramètres zootechniques sont calculés. À l'issue de la période d'élevage, 12 poissons par groupe expérimental (4 poissons par bac) sont prélevés à 6 h et 25 h après le dernier repas : le plasma, les contenus digestifs de l'intestin proximal, les tissus de l'intestin proximal et distal, le foie, le muscle, les tissus adipeux et le plasma.



## Résultats et discussion :

À l'issue des 12 semaines d'expérimentation, l'utilisation du régime HS n'a pas entraîné d'effets négatifs sur les performances de croissance des poissons. Une augmentation du taux d'efficacité des protéines pour la croissance est observée chez le groupe HS, ce qui montre que « l'économie des protéines » par les glucides semble avoir été efficace. Au niveau du microbiote intestinal, seul le microbiote associé aux contenus digestifs, dans les échantillons prélevés 6 heures après le dernier repas, a été affecté par les régimes. En effet, un changement significatif des principaux phyla bactériens (*Proteobacteria*, *Firmicutes*) est constaté, et une augmentation de la proportion de certaines communautés bactériennes appartenant au groupe des bactéries lactiques (*Weissella*, *Limosilactobacillus*, *Lactococcus*) a été observée. Ces bactéries sont connues pour présenter des activités amylolytiques et pourraient favoriser la fermentation des glucides non-digestibles, largement retrouvés dans ces régimes 100 % végétaux. Parallèlement, 6 h après le dernier repas, le dosage du taux de glucose plasmatique n'a pas mis en évidence d'hyperglycémie post-prandiale. De plus, l'excès de glucose alimentaire semble avoir été efficacement stocké sous forme de glycogène et non sous forme de lipides (pas d'induction de la lipogenèse et du taux de lipides). D'ailleurs une augmentation de l'expression des gènes (*gcka*, *gckb*) et des activités enzymatiques de la glucokinase et pyruvate kinase impliqué dans le glycolyse a été observée dans le foie. Cependant, comme souvent observé chez la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime fort en glucides, une non-inhibition de la voie de la néoglucogénèse (activité enzymatique de la glucose-6 phosphatase, et des gènes codant pour cette voie) a été observée mais sans impact négatif sur l'homéostasie glucidique. Enfin, pour comprendre les relations entre le microbiote et le métabolisme de l'hôte chez la truite, nous avons observé une plus grande production de métabolites bactériens (valérate, lactate) chez les poissons nourris avec l'aliment HS ; ces données pourraient expliquer, au moins en partie, les possibles interactions entre l'abondance de certaines bactéries et les modifications de certains des paramètres métaboliques étudiés ici.

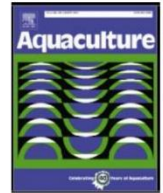
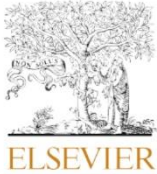




**Conclusion du premier article :**

Le remplacement partiel des protéines par 20 % de glucides digestibles dans un aliment 100 % végétal est associé à une modification importante du microbiote associé aux contenus digestifs, 6 heures après le dernier repas. Toutefois, de façon surprenante, alors que les performances de croissance n'ont pas été affectées, aucun trouble métabolique n'a été observé chez ces poissons nourris avec des glucides : le régime HS n'a pas entraîné d'hyperglycémie post-prandiale, suggérant une bonne régulation de l'homéostasie glucidique. L'incorporation des glucides digestibles pourrait donc être intéressante afin de réduire la quantité de protéines dans les aliments aquacoles pour poissons carnivores, particulièrement lorsqu'ils sont associés à un régime 100 % végétal.





## High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet

Raphaël Defaix <sup>a</sup>, Jep Lokesh <sup>a</sup>, Mylène Ghislain <sup>b</sup>, Mickael Le Behec <sup>b</sup>, Michaël Marchand <sup>a</sup>, Vincent Véron <sup>a</sup>, Anne Surget <sup>a</sup>, Sandra Biasutti <sup>c</sup>, Frederic Terrier <sup>a</sup>, Thierry Pigot <sup>b</sup>, Stéphane Panserat <sup>a</sup>, Karine Ricaud <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>b</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IMT Mines Ales, IPREM Pau, France

<sup>c</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, IUT des Pays de l'Adour, Département Génie Biologique, rue du ruisseau, 40004 Mont de Marsan, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Rainbow trout  
Gut microbiota  
Intermediary metabolism  
Aquaculture  
Fish nutrition

### ABSTRACT

To ensure the sustainability of aquaculture, it is necessary to change the “menu” of carnivorous fish such as rainbow trout from a fish-based diet to one with plant-based ingredients. However, there is a major problem with the growth performance decrease of fish fed with a 100% plant-based diet due to the reduction in feed intake and feed efficiency. For the first time, we incorporated high levels of digestible carbohydrates (high-starch diet) in a 100% plant-based diet during a 12-week feeding trial in order to improve protein utilization for growth (protein sparing effect) and reduce nitrogen waste.

We measured the changes in the intestinal microbiota, Short-Chain Fatty Acid (SCFA) levels and metabolic responses in liver. Dietary carbohydrates had a strong effect on alpha and beta diversity and abundance of 12 genera, including *Ralstonia* and *Bacillus* in digesta associated microbiota whereas mucosa associated microbiota was less affected. The change in microbial diversity might be linked to the change observed in SCFA production. High levels of *Mycoplasma* were observed in the intestinal mucosa. Overall, hepatic gene expression was significantly altered by the CHO/protein ratio. Up-regulation of genes involved in glucose metabolism (*gcka*, *gckb*, *g6pcb2a*), down-regulation of genes involved in lipid metabolism (*hadh*, *acox3*, *sreb2a*, and *cyp51a*) were associated with higher enzymatic activities (such as glucokinase or pyruvate kinase) and higher glycogen levels in the liver, suggesting adequate adaptation to diet. Interestingly, strong correlations were observed between abundances of certain bacterial OTUs and gene expression in the liver.

The inclusion of digestible carbohydrates in combination with a 100% plant-based diet, could be a promising way to improve and reduce the use of plant proteins in rainbow trout. In addition, the relationship between intestinal microbiota and host metabolism needs further investigation to better understand fish nutrition.

**Abbreviations:** CHO, carbohydrates; HS, high-starch; LS, low-starch; SCFA, Short-Chain Fatty Acid; FM, Fish meal; FO, Fish Oil; FBM, Final body mass; SGR, Specific growth rate; FE, Feed efficiency; PER, Protein efficiency ratio; DGI, Daily growth intake; SD, Standard deviation; OTU, Operational taxonomic unit; PLS-DA, Partial Least Squares – Discriminant Analysis; bp, base-pair; 16S rRNA, 16S ribosomal Ribonucleic acid; PCR, Polymerase Chain Reaction; PERMANOVA, Permutational Analysis of Variance; FROGS, Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution; LAB, Lactic-Acid bacteria; Cq, quantification cycle

\* Corresponding author.

**E-mail addresses:** [raphael.defaix@inrae.fr](mailto:raphael.defaix@inrae.fr) (R. Defaix), [lokesh.jep@inrae.fr](mailto:lokesh.jep@inrae.fr) (J. Lokesh), [mylene.ghislain@univ-pau.fr](mailto:mylene.ghislain@univ-pau.fr) (M. Ghislain), [mickael.lebehec@univ-pau.fr](mailto:mickael.lebehec@univ-pau.fr) (M. Le Behec), [michael.marchand@inrae.fr](mailto:michael.marchand@inrae.fr) (M. Marchand), [vincent.veron@inrae.fr](mailto:vincent.veron@inrae.fr) (V. Véron), [anne.surget@inrae.fr](mailto:anne.surget@inrae.fr) (A. Surget), [sandra.biasutti@univ-pau.fr](mailto:sandra.biasutti@univ-pau.fr) (S. Biasutti), [frederic.terrier@inrae.fr](mailto:frederic.terrier@inrae.fr) (F. Terrier), [thierry.pigot@univ-pau.fr](mailto:thierry.pigot@univ-pau.fr) (T. Pigot), [stephane.panserat@inrae.fr](mailto:stephane.panserat@inrae.fr) (S. Panserat), [karine.brugirardricaud@univ-pau.fr](mailto:karine.brugirardricaud@univ-pau.fr) (K. Ricaud).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740049>

Received 28 April 2023; Received in revised form 28 August 2023; Accepted 1 September 2023  
0044-8486/© 20XX

## 1. Introduction

Sustainable and efficient seafood production is urgently needed to meet the growth in world's nutritional requirements (FAO, 2020). Seafood products for human consumption are provided at 46.8% (2016) by aquaculture (FAO, 2018) which allows to reduce the depletion of fish stock in the oceans caused by overfishing. Traditionally, Fish meal (FM) and fish oil (FO) coming from industrial fishing are used to feed aquaculture fishes. Although these ingredients have been partially replaced in the aqua-diets by plant-based products, the use of FM and FO is not sustainable due to the constant shortage and their continuous rising costs (Hua et al., 2019). A sustainable alternative is therefore necessary to feed the species under aquaculture instead of the FM and FO in commercial diets. The utilization of a plant-based diet as an alternative has been widely studied for >25 years in carnivorous fish such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Kaushik et al., 1995). Although a 100% plant-based diet cover the nutritional needs of fish, long-term feeding induces reduction of growth, feed intake, and feed efficiency as well as activities of key liver enzymes that are involved in glycolysis (Véron et al., 2016). Moreover, the use of plant-protein and the presence of anti-nutritional factors lead to an unbalanced and lower amino-acid utilization (Deborde et al., 2021), has negative effects on reproduction, survival of the offspring (Lazzarotto et al., 2015), and reduced levels of long-chain polyunsaturated fatty acid in muscle (Nasopoulou and Zabetakis, 2012). Thus, it is necessary to improve and optimize the use of 100% plant-based diets. Interestingly, one strategy to improve the 100% plant-based diets could be the use of digestible carbohydrates (CHO) (Kamalam et al., 2017). CHO are one of the most abundant sources of energy-yielding nutrients on earth and have never been tested in association with 100% plant-based diet in fish. Increasing the CHO level in rainbow trout diets will reduce the proportion of plant proteins and then decrease all the negative impact of plant ingredients. In association with FM and FO diets, an appropriate amount (<20%) of digestible carbohydrates, such as starch, improve fish growth (Boonanuntanasarn et al., 2018), reduce environmental nitrogen pollution, ameliorate feed adhesion, and have a strong protein-sparing effect (Kamalam et al., 2012). However, carnivorous fish are metabolically adapted for high protein catabolism as energy source. Indeed, when fed with >20% of carbohydrates, metabolic disorders are observed such as a persistent post-prandial hyperglycemia explained (at least partially) by a non-inhibition of gluconeogenesis pathway (Panserat et al., 2019; Polakof et al., 2012). Nevertheless, these fish present mechanisms adapted to the use of glucose, such as the presence of enzymes involved in starch digestion and glucose metabolism (Enes et al., 2009), the presence of glucose transporter (Krasnov et al., 2001), and an inducible glucokinase (Panserat et al., 2000), indicating that fish have a glucose homeostatic system (Kamalam et al., 2017). All these data have been obtained with diets containing fish meal and fish oil. Many different factors can play a critical role in fish nutrition and feed efficiency but among them, the gut microbiota plays an important role in several large functions known to be involved in fish growth, such as energy production, nutrient metabolism and fermentation of dietary non-digestible components (dietary fibers) (Bäckhed et al., 2004; Butt and Volkoff, 2019; Gomes et al., 2018). Plant based-diets strongly modify gut microbiota composition in salmonids (Ingerslev et al., 2014; Pérez-Pascual et al., 2021). Few studies have examined the effect of CHO on fish gut microbiome (Huang et al., 2021; Lin et al., 2018; Ortiz and Rebole, 2013; Wang et al., 2021b; Zhang et al., 2020). Although several papers have investigated the effect of a 100% plant-based diet on intestinal microbiota (Pérez-Pascual et al., 2021), none has studied the combined effect of a 100% plant-based diet with the use of digestible carbohydrates. The functional role of the gut microbiota on the host physiology and health remains to be explored in fish (Perry et al., 2020). The key role of the gut microbiota on fish health and metabolism is being increasingly described (Dvergedal et al., 2020; Wang et al.,

2021a), showing strong associations between gut microbiome and lipid metabolism, fish growth, and feed efficiency. To partially explain the interaction between microbiota and host, short-chain fatty acids (SCFAs) are relevant candidates: they are the products of fermentation of non-digestible carbohydrates that become available to the gut microbiota and have been already linked to the host glucose metabolism in mammals (Morrison and Preston, 2016) but their role remains to be investigated in fish. The objective of this study is to understand the effect of the partial replacement of plant proteins by CHO (starch) in rainbow trout fed with a 100% plant-based diet on the gut microbiota and host metabolism. For this purpose, juveniles rainbow trout were fed with 100% plant-based diets with high or low CHO (starch) for 12 weeks. In particular, we evaluated the effect of the high-starch (HS) diet on (I) the zootechnical, growth and feed parameters, (II) the diversity and composition of the midgut microbiota (both digesta and mucosa associated microbiota), (III) the short-chain fatty acid concentration in hindgut, (IV) and the host glucose metabolism i.e. gene expressions, liver enzymatic activities, glycogen contents, and plasmatic parameters. The hypothesis of the study is that the addition of digestible carbohydrates could affect the gut microbiota, induce bacterial metabolites (SCFA) production, and thus improve the utilization of this 100% plant-based diet by rainbow trout. The results of this study will allow to have new directions to optimize alternative 100% plant-based diet for fish nutrition in the future.

## 2. Methods

### 2.1. Ethical approval

The rearing experiment was conducted in accordance with the guidelines laid down by French and European legislation for the use and care of laboratory animals (Decree no. 2013-36, February 1st 2013 and Directive 2010/63/EU, respectively). The fish handling protocols and the sampling for the experiment were described by the INRAE ethics committee (INRAE, 2002-36, April 14, 2002). The INRAE experimental station (INRAE facilities of Donzacq, Landes, France) is certified for animal services under the license number A40-228.1 by the French veterinary service, which is a competent authority.

### 2.2. Diet and experimental setup

Two experimental 100% plant-based diets were formulated for juvenile rainbow trout. The High-starch diet (HS) corresponds to a high CHO/protein ratio, with 20% of dietary carbohydrates and 42% of proteins. Regarding the Low-starch diet (LS) it is a low CHO/protein ratio, with 3% of dietary carbohydrates and 51% of proteins. The proteins are issue from different plant ingredients. Descriptions of the diets are given in Table 1. These diets, adjusted to meet the nutritional requirement of rainbow trout, were isolipidic (23.565% crude fat) and isoenergetic (~24.905 KJ-g dry matter). These diets have been produced as extruded pellets. The fish were manually fed twice a day (with an interval of 8 h) during 12 weeks. For both experimental groups, eighty-one female Trout (~60 g) were randomly distributed in three tanks (130L). During the experimental period, the fish were kept under standard rearing conditions with water at 17 °C, pH 7.5, water flow rate 0.3 L/s, and oxygen levels 9 mg/L. The fish mortality was checked (if any) every day, and the tanks were weighted every 3 weeks to evaluate the growth and zootechnical parameters (Fig. 1).

### 2.3. Sampling

After 12 weeks of feeding, four fish from each tank (twelve fish per group) were randomly sampled. The fish were anaesthetized with benzocaine (50 mg-L) before being euthanized with a benzocaine overdose of 150 mg-L, followed by blood collection for plasma isolation. After

**Table 1**  
Formulation and proximate composition of two experimental diets.

	High-starch	Low-starch
Ingredients (%)		
Wheat gluten	20	15
Lysamine pea protein concentrate	20	16
Corn gluten	5.44	7.24
Whole wheat	7.09	–
Faba Protein Concentrate	5	–
Pregelatinized wheat starch	15.02	–
Lupin flour	–	4.53
Soybean meal	–	15
Soybean protein concentrate	–	12
Rapeseed oil	12	10.74
Linseed oil	5.29	6
Palm oil	2	2
Dicalcium Phosphate	2	2
L-Lysine	0.5	1
L-Methionine	0.5	1
Soy Lecithin powder	2.5	2.5
Premix Vitamins	1.16	1.5
Premix minerals	1.5	1.5
Cellulose	–	2
Proximate composition (% DM)		
Dry Mass (DM)	97.20	96.90
Starch (% DM)	19.73	3.11
Proteins (% DM)	42.23	51.39
Lipids (% DM)	23.25	23.88
Energy (KJ g <sup>-1</sup> DM)	24.54	25.27
Ash (% DM)	5.12	6.05

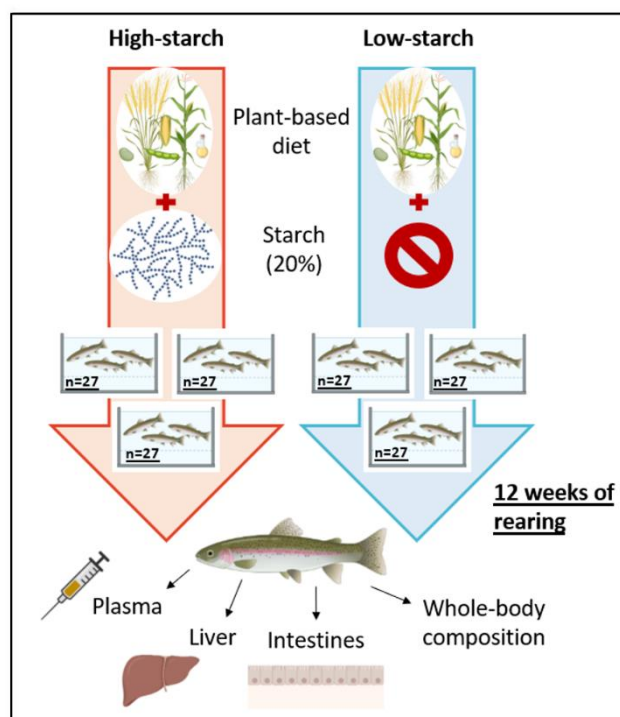
the blood collection, fish were aseptically dissected and the digestive tract was separated. Liver and midgut was dissected at 6 h after the last meal (the peak of the postprandial regulation of metabolism in trout (Polakof et al., 2012)) and immediately frozen with liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for long-term storage. For microbiota analysis, the midgut was separated from the rest of the digestive tract and was cut open using sterile instruments. The midgut was chosen because microbiota of this intestine part is involved in the digestion of food in trout, moreover the existence of a glucosensing mechanism have already been demonstrated in the midgut for these carnivorous fish species (Polakof et al., 2010). The digesta was separated carefully and the mucosa samples were collected by scraping the intestinal epithelium using a glass slide and then collected into sterile tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for DNA extraction. Intestinal contents from hindgut were sampled 25 h after last meal for SCFA analysis in 6 fish per group (2 per tanks) (Fig. 1).

#### 2.4. Diets and whole-body proximate composition

Composition of diets and whole-body fish were determined by the following procedures. Dry matter was obtained by drying the samples at  $105^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The weight of the post-dried samples was subtracted from the pre-dried samples. Ash content was measured by incinerating the samples at  $550^{\circ}\text{C}$  for 8 h. Protein content was measured by the Kjeldahl method. Lipid content was determined by the Soxhtherm method. Gross energy was measured with an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Heitersheim Gribheimer, Germany). Starch content was determined using the Megazyme© (Bray, Ireland) total starch assay procedure.

#### 2.5. Measurement of the plasma biochemical parameters

Blood was sampled for plasma collection from the caudal vein and then were directly centrifuged at 12,000g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min, and stored in heparinized tubes at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Commercial kits were used to determine the level of several plasma metabolites: glucose (Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France), lactate (kit Randox, Crumlin,



**Fig. 1.** Experimental design. Two experimental diets containing a 100% plant-based diet with 20% of digestible starch (high-starch diet) or without digestible starch (low-starch diet) were produced as extruded pellets. The experimental diets were given manually, twice a day, during 12 weeks to 162 females rainbow trout (50–70 g) distributed in 6 tanks. The trout tanks were weight every 3 weeks for zootechnical parameters ( $n = 3$ ). At the end of the rearing trial, 4 fish per tanks ( $n = 12$ ) were randomly sampled for microbiota and metabolism studies. Additional trout were recovered for whole-body composition.

United Kingdom), triglycerides (Sobioda), and cholesterol (Sobioda). These kits were adapted to 96-well plates formats according to the manufacturer's instructions.

#### 2.6. Hepatic metabolites measurement

Liver glycogen was measured using a protocol previously described (Good et al., 1933). For glycogen determination, 250 mg of liver were homogenized with 1 M HCL and divided in two aliquots. One part was neutralized with 5 M KOH, centrifuged and the supernatant was used to measure the free glucose with a commercial kit (Sobioda). The second group of aliquots was hydrolyzed during a boiling step (2 h30 at  $100^{\circ}\text{C}$ ) and then neutralized with 5 M KOH. After centrifugation, the total glucose (free glucose and glucose released by hydrolysis of glycogen) was measured in the supernatant. For hepatic cholesterol determination 100 mg of liver was homogenized in 5% Igepal (sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Samples are placed twice at  $90^{\circ}\text{C}$  during 5 min and then centrifuged 2 min at 5000 g. Supernatants were recovered and the cholesterol concentration measured in 96-well plates thanks to a commercial kit (Sobioda).

#### 2.7. Microbial composition analysis

##### 2.7.1. DNA extraction and purification

DNA from gut samples (digesta and mucosa) were extracted using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with the following modifications as suggested by (Lokesh et al., 2022). About 200 mg of  $-80^{\circ}\text{C}$  frozen samples were mixed with the pre-heated ( $70^{\circ}\text{C}$ ) Inhibitex buffer

(1/7 ratio) and homogenized with 0.5 mm and 1 mm zirconia beads in a bead beater for 30 s on high speed (Beater, VWR, Radnor, USA). The homogenized samples were placed in a heat block for 10 min at 70 °C and then centrifuged for 2 min at 20,000 g to pellet stool particles. Then, 600 µL of supernatant were added into 2 mL tubes containing 25 µL of Proteinase K. A volume of 600 µL of pre-heated (70 °C) buffer AL was added to the tubes, and incubated at 70 °C for 10 min. A volume of 600 µL of absolute ethanol was added to the lysate and homogenized. The lysate was carefully applied to the QIAamp spin column. Several wash steps were performed with the AW1 and AW2 buffer. Finally, pre-heated (70 °C) ATE buffer was used to elute the DNA. DNA was assessed for purity and integrity, and quantified using a microplate Spectrophotometer (Epoch2, BioTek, France).

### 2.7.2. Generation of the 16S rRNA gene libraries

The 460 base-pair (bp) V3–V4 regions of 16S rRNA genes were amplified by PCR (first stage of PCR) using 12.5 µL of 2× KAPA HiFi Hot-Start Ready Mix (Roche, France), 5 µL of amplicon PCR Forward primer 1 µM (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGG NGGCWGCAG –3'), 5 µL of amplicon PCR Reverse primer 1 µM (5' GT CTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATC TAATCC –3'), and 2.5 µL of DNA (5 ng/µL). Thermocycler conditions included 95 °C for 3 min (a pre-incubation), followed by 35 cycles of 95 °C for 30s, 55 °C for 30s, 72 °C for 30s, and a final elongation step at 72 °C for 5 min. Controls, including water from fish tanks, diets samples, *Escherichia coli*, and ultra-pure water were also added to the run. After confirmation of PCR amplification by agarose electrophoresis, the samples and controls were transferred to the genomic platform of Bordeaux (PGTB, Bordeaux, France). Libraries were prepared according to the standard protocol recommended by Illumina (Illumina, CA, USA). Index PCR was used to add the unique dual indexes to the sequences, by using the Nextera XT index kit according to the manufacturer's recommendation (Illumina). The thermocycling conditions were the same than in step 1, except that PCR was performed for only 8 cycles. After PCR cleaning, libraries were quantified using the KAPA library quantification kit for Illumina platforms (Roche). Libraries were pooled at an equimolar concentration (4 nM) and sequenced on a MiSeq platform using a 250 bp Paired End Sequencing Kit v2 (Illumina).

### 2.7.3. Data analysis

The initial data analysis was performed using the FROGS pipeline according to standard procedures (Escudé et al., 2017). First, the forward and reverse reads of each sample are merged. Only amplicons with size between 380 bp and 500 bp corresponding to the size of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, without ambiguous bases and with the two primers were kept. The adapter sequences were removed and the sequences with not expected lengths or ambiguous bases (N) were deleted. After this step 7,800,687 sequences have been kept, which represents 79.42% of initial input sequences. The clustering swarm algorithm was used to group together amplicons with a maximum of one nucleotide difference between two amplicons (Mahé et al., 2014), 476,371 clusters were created. PCR-generated chimeras, typically created when an aborted amplicon acts as a primer, are removed. Clusters present in <4 samples, and having a minimum abundance of 0.005% are removed. After this step, 261 clusters have remained with 6,716,271 sequences. The rarefaction curve was provided (Supplementary Fig. 1). The PhiX database was used to removed contaminants such as chloroplasmic or mitochondrial sequences (Mukherjee et al., 2015). Then, taxonomic affiliations are carried out for each OTUs (Operational Taxonomic Unit), using the silva138.1 pintail100 16S reference database ("https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/," n.d.). However, some multi-affiliations can be generated when a cluster is composed by several amplicons with not the exact same nucleotide sequence. Samples had an average of 61.729 +/- 18.210 sequences

(minimum: 17.009; maximum: 107.484 sequences) with 202 OTUs remaining (ranging from 56 to 119 OTUs per sample).

## 2.8. Short-chain fatty acid measurement

### 2.8.1. Sample preparation

Frozen intestinal samples were weighed and added into a 114 mL micro-chamber µCTE250 (Markes international, Llantrisant, UK). The micro-chamber was heated at 100 °C with a flow rate of 60 mL min<sup>-1</sup> of dry nitrogen. The SIFT-MS sampling was carried out at the outlet of the micro-chamber at a flow rate of 20 mL min<sup>-1</sup>.

### 2.8.2. Selected ion flow tube – mass spectrometry (SIFT-MS) measurements

A Voice 200 Ultra SIFT-MS (SYFT Technologies, Christchurch, New Zealand) equipped with a dual source generating positive soft ionizing reagent ions (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, O<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO<sup>+</sup>) with the nitrogen carrier gas (Air Liquid, Alphagaz 2) was used in this study. Full-scan mass spectra were recorded for each positive precursor ion (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, O<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO<sup>+</sup>) in a range from 15 to 250 with an integration time of 60 s and accumulated during 16 h identification was based on specific ion–molecule reactions patterns of target analytes with the three positive precursor ions described in the literature and in the database of the LabSyft software (LabSyft 1.6.2, SYFT Technologies). Product ions from ion–molecule reactions of SCFA are summarized in Supplementary Table 1. Quantification of short-chain fatty acids was performed using the NO<sup>+</sup> precursor ion. In SIFT-MS analysis, quantification is straight forward and requires only measurement of the count rate of the precursor ion [R] and product ions [P]. The analyte concentration in the flow tube [A] can be determined according to the following calculation:

$$[A] = \frac{[P]}{t_r k [R]}$$

where  $t_r$  is the reaction time in the flow tube and  $k$  is the apparent reaction rate constant.

## 2.9. Gene expression analysis

RNA from liver, were extracted using TRIzol™ reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instruction, and quantified by spectrophotometry (absorbance at 260 nm). The qualities of the RNA extracted were assessed using agarose gel electrophoresis. One µg of RNA was transcribed into cDNA using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) with random primer (Promega, Madison, WI, USA). After the reverse transcription, cDNA was diluted 76-fold for each tissue before it uses in quantitative real-time (q) RT–qPCR. RT–qPCR was performed on a C1000 Touch™ thermal cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using PerfeCTa SYBR green (VWR, Radnor, PA, USA). Reactions were performed on a 384 well plate. The total volume of reaction was with 2 µL of diluted cDNA mixed with 0.24 µL of forward and reverse primer (10 µM), 0.52 µL of RNase-free water, and 3 µL of SYBR green. Thermocycling conditions included a pre-incubation at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing 60 °C for 10s, and extension at 72 °C for 15 s. Melting curves were systematically monitored (95 °C for 5 s, 65 °C for 60s, 40 °C for 30s) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each RT–qPCR included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification), a standard curve (a range of dilution of cDNA from a pool of all cDNA samples) in triplicate, and negative controls (reverse transcriptase-free samples and RNA-free samples) in duplicate. The relative quantification of gene expression was carried out by the Bio–Rad CFX Maestro software (Version 4.0.2325.0418). Cq (Quantification cycle) values were further converted to relative quantities. Relative quantification of target gene expression was performed using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001). *eflα* gene was used as reference

gene for liver samples (Kamalam et al., 2012; Song et al., 2018). The list primer used to study the genes of interest are present in Supplementary Table 2. A total of 58 genes of interest were evaluated in this study.

### 2.10. Hepatic enzymatic analysis

The hepatic enzymatic activity level of Glucokinase, Pyruvate kinase, Glucose-6-phosphatase, and Fatty acid synthase were determined according to the protocol described by (Véron et al., 2016). For the measurement of these enzymatic activities the livers were crushed in 10 volumes of ice-cold buffer at pH 7.4 (50 mmol/L TRIS, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT and a protease inhibitor cocktail (P2714, purchased from Sigma, St Louis, MO)). After homogenization, homogenates were then centrifuged at 4 °C, and the supernatants were used immediately for enzyme assays. The enzymes assayed were: glucokinase (GK; EC 2.7.1.2) (Panserat et al., 2000), pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) as described by (Kirchner et al., 2003), glucose-6-phosphatase (G6Pase; EC 3.1.3.9) according to (Kirchner et al., 2003), fatty acid synthase (FAS; EC 2.3.1.85) from (Chang et al., 1967). Enzyme activity was measured at 37 °C in duplicate following variation of absorbance of NAD(P)(H) at 340 nm. The reactions were started by adding the specific substrate; a Power Wave X (BioTek Instrument, Inc.) plate reader was used. For each sample, a blank with water instead of the substrate was run. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the transformation of 1 μmol of substrate per min at 37 °C, except for FAS which was expressed as the amount of enzyme oxidizing 1 μmol of NADPH at 37 °C. Enzymatic activities was expressed per mg of soluble protein. Protein concentration was measured in triplicate according to Bradford (Bradford, 1976), using a protein assay kit (Bio Rad, München, Germany) with bovine serum albumin as a standard.

### 2.11. Statistical analysis

Zootechnical parameters, including initial and final body weight, specific growth rate, feed intake, feed efficiency, and protein retention

efficiency were calculated per tank ( $n = 3$ ). The hepatosomatic index (liver weight\*100/fish weight) were obtained during the final sampling of the trial experimentation ( $n = 12$ ). All data were presented as mean  $\pm$  SEM. All statistical analysis were performed with R software (version 4.0.3). Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance using the Bartlett's test. All Data were analyzed using the one-way ANOVA. These statistical tests were followed by Tukey's HSD as post hoc test when the normal distribution is respected, otherwise a Wilcoxon non-parametric test is carried out. Bonferroni-based adjustment of  $P$ -values was made on one-way ANOVA specifically on the genera abundances (Table 4). Results with a  $P$ -value  $< 0.05$  were considered statistically significant. In the figures: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . The microbial composition was analyzed using the phyloseq package. For alpha and beta diversity, data samples were rarified. Beta-diversity was analyzed with the Bray-Curtis distance using permutational multivariate analysis of

variance (PERMANOVA). The mixOmics package was used to perform a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to determine the most discriminant OTUs. The rCCA (regularized canonical correlation analysis) function of the same package was used to understand the correlations between the bacterial OTUs and different host parameters. The core microbiota visualization was made using the phyloseq package on R. Core microbiota was estimated using the OTU abundances with a 0.1% threshold prevalence. The Venn diagram was created using Venny ("https://bioinfo.gcnb.csic.es/tools/venny/", n.d.).

## 3. Results

### 3.1. Whole-body composition, zootechnical, hepatic and plasma metabolite levels

At the end of the feeding trial different zootechnical parameters such as final weight, specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE) and protein efficiency ratio (PER) were measured, showing no statistical differences (Table 2). Plasma parameters such as triglycerides, glucose, lactate and cholesterol were also measured. Statistical analysis did not reveal any change between the two experimental groups (Table 3). Regarding feed utilization, protein efficiency ratio increased ( $p = 2.41e-4$ ) in trout fed with high starch diet (HS), whereas no significant differences in daily feed intake and feed efficiency were measured (Table 2). Whole-body composition (dry matter, gross energy, crude protein and lipid) of fish for the two experimental groups were evaluated (Supplementary Table 3). The two diets did not lead to any significant differences of whole-body composition of fish. Moreover, plasma metabolites (glucose, lactate, triglycerides, cholesterol) were also not affected by the diets (Table 3). Finally, several significant changes were observed for hepatic parameters. The use of the high-starch diet increased significantly the average liver weight (hepatosomatic index). The level of glycogen stored in the liver was also significantly higher ( $p = 1.894e-8$ ) in the group of fish fed with the high-starch diet. Inversely, a decrease of the hepatic cholesterol was observed when trout were fed with the high-starch diet.

**Table 2**  
Growth performance, and feed utilization, in rainbow trout fed with high-starch diet and low-starch diet.

Zootechnical parameters	High-starch	Low-starch	$P$ value
Initial body weight (g)	53.33	53.33	–
Final body weight (g)	237.80 $\pm$ 20.14	261.90 $\pm$ 9.80	NS
Daily growth index <sup>1</sup>	2.89 $\pm$ 0.17	3.13 $\pm$ 0.07	NS
Specific growth rate <sup>2</sup> (%/day)	1.78 $\pm$ 0.07	1.89 $\pm$ 0.03	NS
Daily feed intake <sup>3</sup> (gram/fish/day)	2.16 $\pm$ 0.18	2.38 $\pm$ 0.11	NS
Feed efficiency <sup>4</sup>	1.02 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.01	NS
Protein efficiency ratio <sup>5</sup>	2.61 $\pm$ 0.05	2.21 $\pm$ 0.02	2.35e-04***

Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  tanks). Statistical differences were calculated by one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant. Daily growth index<sup>1</sup> =  $100 \times (\text{Mean final weight}^{1/3} \text{ g} - \text{Mean initial weight}^{1/3} \text{ g}) / \text{Experiment duration (days)}$ . Specific growth rate (%/day) =  $100 \times [\text{Ln (final body weight g)} - \text{Ln (initial body weight g)}] / \text{Experiment duration (days)}$ . Daily feed intake<sup>3</sup> (gram/fish/day) = (Total feed consumed g/Number of fish/Experiment duration (days)). Feed efficiency<sup>4</sup> = (Final biomass g - Initial biomass g)/Total feed consumed (g DM). Protein efficiency ratio<sup>5</sup> = (Final biomass - Initial biomass)/ Total protein consumed (g).

**Table 3**  
Hepatic and plasmatic parameters in rainbow trout fed with the high or low-starch diet.

	High-starch	Low-starch	$P$ value
Hepatic parameters			
Hepatosomatic index (%)	1.28 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.14	2.27e-03 **
Glycogen (mg/g)	32.65 $\pm$ 3.99	21.77 $\pm$ 1.86	1.89e-08 ***
Cholesterol (g/L)	5.30 $\pm$ 0.48	5.72 $\pm$ 0.36	0.04 *
Free-Glucose (mg/g)	0.45 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.03	NS
Plasmatic parameters			
Glucose (g/L)	1.11 $\pm$ 0.40	1.01 $\pm$ 0.38	NS
Triglycerides (g/L)	3.49 $\pm$ 1.04	3.17 $\pm$ 0.80	NS
Lactate (g/L)	3.59 $\pm$ 0.93	3.37 $\pm$ 0.89	NS
Cholesterol (g/L)	1.87 $\pm$ 0.36	1.84 $\pm$ 0.44	NS

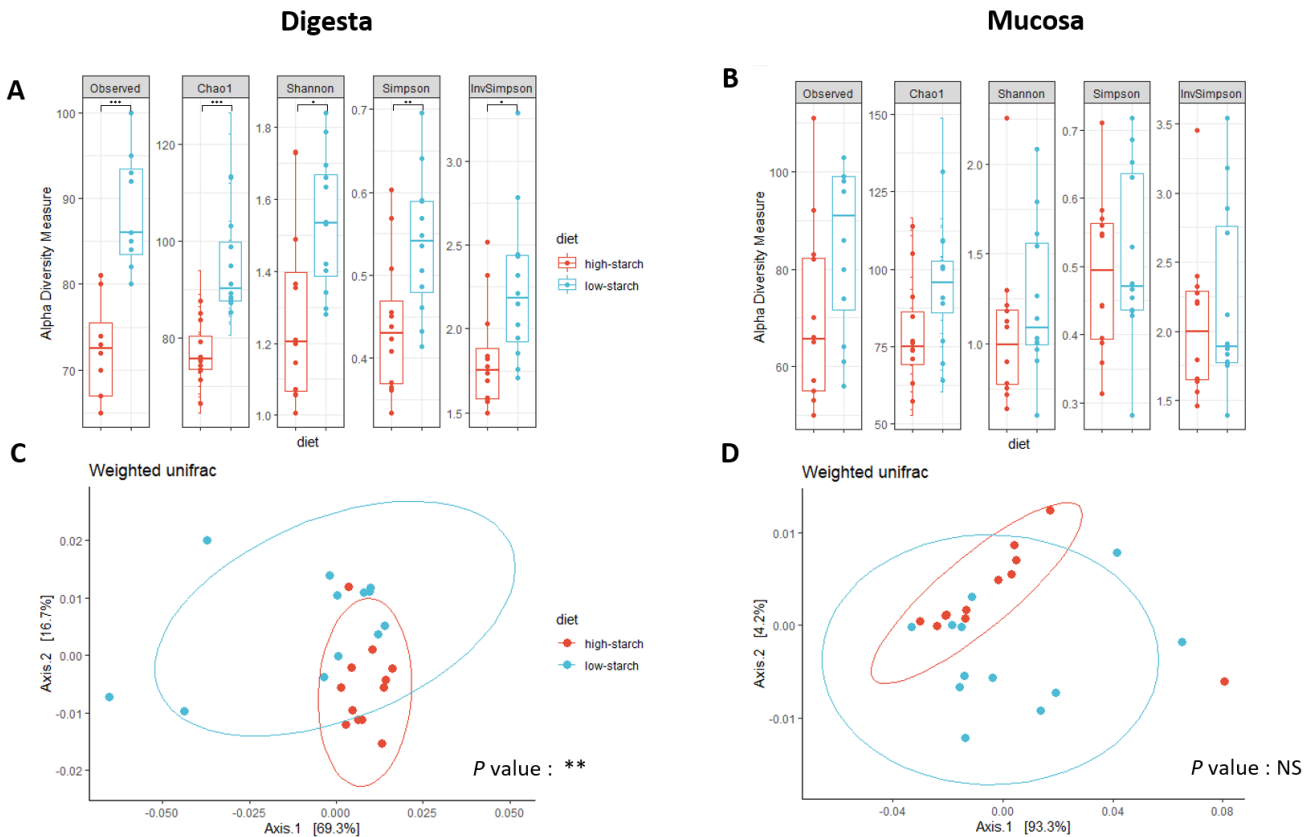
Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 12$  fish). statistical differences are calculated by one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant.



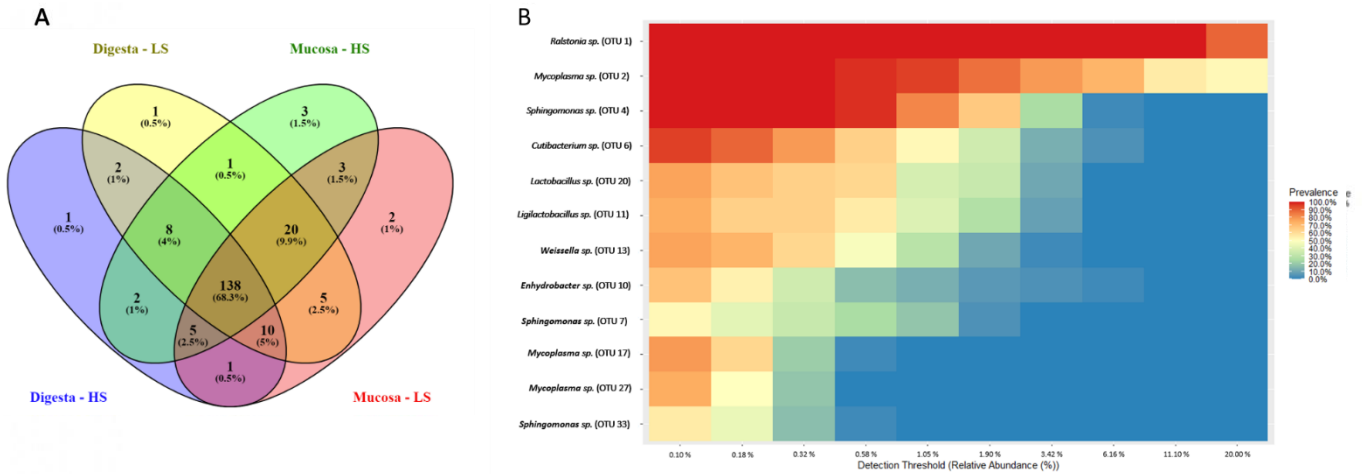
### 3.2. Microbiota diversities and composition

Sequence data were rarefied to 17,000 sequences per sample. Alpha diversity measures including the indexes Observed OTUs, Chao1, Shannon, Simpson, and InvSimpson were calculated in the digesta (Fig. 2A) and in mucosa (Fig. 2B). A significant decrease (ANOVA,  $p < 0.05$ ) of all the alpha diversities indices only in the digesta associated microbiota was observed for the high-starch group. Most of the alpha diversity indices did not differ between digesta and mucosa samples except for the Shannon index which is significantly ( $p = 0.01$ ) higher in digesta (data not shown). Beta diversities were measured in the digesta (Fig. 2C), and in the mucosa (Fig. 2D) of the midgut using the Weighted UniFrac dissimilarity index and visualized using NMDS ordination. The pairwise PERMANOVA test was used to compare both groups, showing a significant ( $p = 0.003$ ) modification of the beta diversities only in the digesta. At total of 202 OTUs (Operational Taxonomic Units) were detected in all samples (Fig. 3A). Among them, 138 OTU i.e. 68.3% were common across the four experimental groups (Fig. 3A). The 10 most abundant common OTUs are *Ralstonia pickettii* (OTU 1), *Mycoplasma* sp. (OTU 2), *Sphingomonas* sp. (OTU 4), *Cutibacterium* sp. (OTU 6), *Sphingomonas* sp. (OTU 7), *Lactobacillus* sp. (OTU 20), *Ligilactobacillus* sp. (OTU 11), *Bacillus* sp. (OTU 18), *Weissella* sp. (OTU 13), and *Enhydrobacter* sp. (OTU 10) (Fig. 3B). After performing taxonomic affiliations on OTUs, removing OTUs found in  $< 4$  samples, and having a minimum abundance of 0.005%, 7 phyla, 54 families, and 85 genera were observed in the overall dataset. Results are presented at phylum (Fig. 4A, B), family (Fig. 4D, E) and genera (Fig. 4G, H) levels. *Proteobacteria* and *Firmicutes* were the most abundant phyla regardless the sample origin. Independently of the diet, we observed significant difference be-

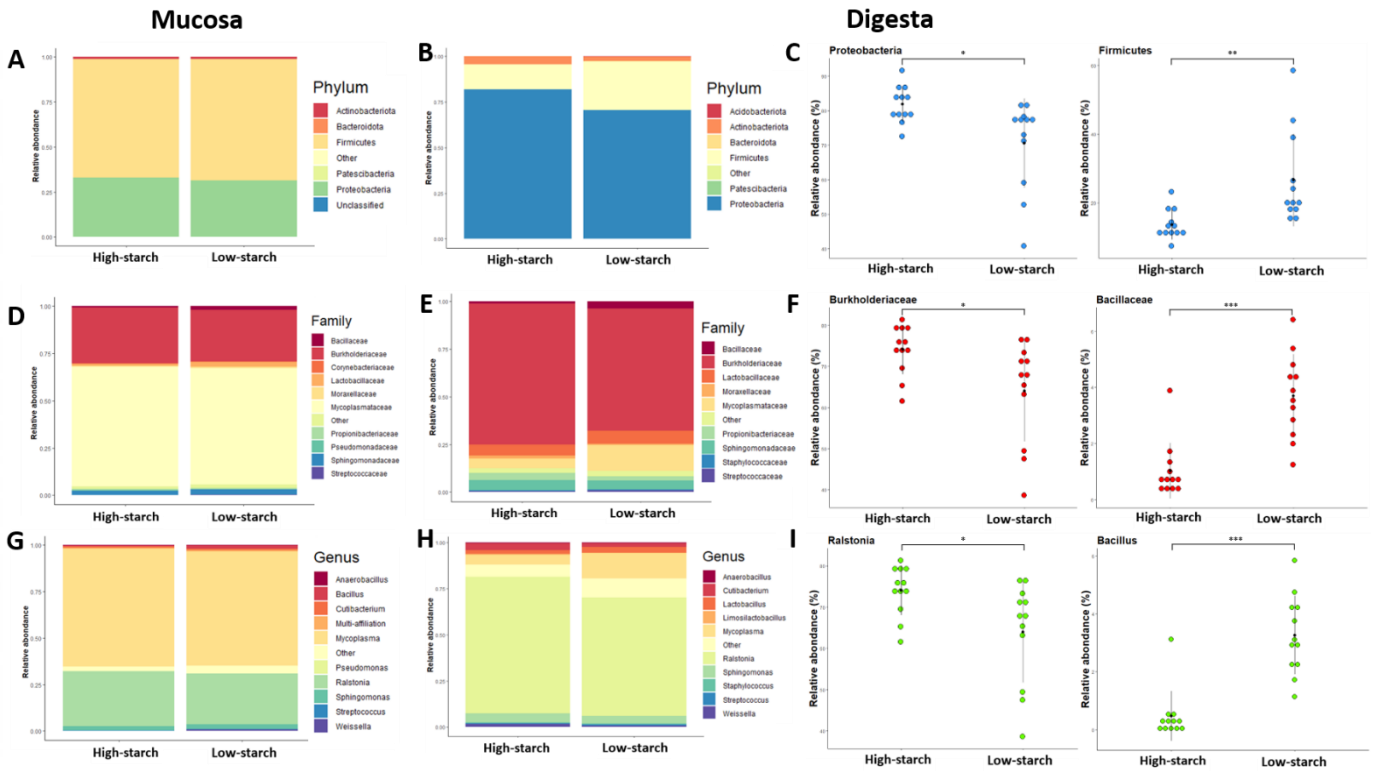
tween mucosa associated microbiota and digesta associated microbiota. In digesta, *Proteobacteria* was the dominant phylum ( $76.21 \pm 11.22\%$ ) (Fig. 4B) which is not the case in the mucosa associated microbiota where *Firmicutes* dominates ( $66.58 \pm 14.10\%$ ) (Fig. 4A). In both mucosa and digesta associated microbiota, *Proteobacteria* were dominated by the genus *Ralstonia* belonging to the *Burkholderiaceae* family, whereas the genus *Mycoplasma* (*Mycoplasmaceae* family) dominated in *Firmicutes* but significant differences occurred regarding their relative abundance. In mucosa, no change in the relative abundance was observed at phylum, family, and genus levels (Fig. 4A, D, G), except for three genera significantly lower in high-starch i.e. *Bacillus*, *Pep-toniphilus*, and *Clostridium sensu stricto 1* (Table 4). Only in digesta associated microbiota, these three phyla were significantly affected by the diet, resulting in an increase in the relative abundance of the *Proteobacteria* ( $81.84 \pm 5.25\%$  in HS and  $70.58 \pm 12.91\%$  in LS,  $p = 0.010$ ) and the *Actinobacteria* ( $4.39 \pm 2.68\%$  in HS and  $2.48 \pm 0.93\%$  in LS,  $p = 0.02987$ ) in trout fed with the high-starch diet. The *Firmicutes* proportion was lower in the high-starch group ( $13.68 \pm 4.32\%$  in HS and  $26.64 \pm 13.49\%$  in LS,  $p = 0.0044$ ). The *Ralstonia* genus was present a larger relative abundance, in the digesta associated microbiota, with a significant higher genera level with the high-starch diet ( $0.74 \pm 0.06$  in HS and  $0.64 \pm 0.12$  in LS,  $p = 0.019$ ) (Fig. 4C, F, I). The proportion of *Bacillus*, belonging to the *Bacillaceae* family and *Firmicutes* phylum was significantly lower in the high-starch diet ( $0.0047 \pm 0.0085$  in HS and  $0.033 \pm 0.014$  in LS,  $p = 4.45e-06$ ). Moreover, the proportion of *Cutibacterium*, belonging to the *Propionibacteriaceae* family and *Actinobacteria* phylum was significantly higher in the high-starch group ( $0.037 \pm 0.025$  in HS and  $0.020 \pm 0.0083$  in LS,  $p = 0.042$ ). Furthermore, 12 bacterial genera were significantly affected by the diet in the



**Fig. 2.** Bacterial alpha diversity represented in terms of observed OTUs, Chao1, Shannon Simpson, InvSimpson, in digesta (A) and mucosa (B) according to the experimental diversity. Alpha diversity between diet groups was compared using one-way ANOVA and  $p < 0.05$  was considered significant. Beta diversity is presented by a nMDS representation (Weighted-Unifrac analysis) in digesta (C) and in mucosa (D). Beta diversity was compared using pairwise PERMANOVA and  $p < 0.05$  was considered significant and indicated with asterisk.  $n = 12$ .



**Fig. 3.** Venn diagram showing compartmental core microbiota OTUs distribution (A) in digesta, mucosa of the fish fed with high-starch (HS) or low-starch (LS) diet. Heatmap of the core microbiota with the 12 most abundant OTUs among all groups (B).



**Fig. 4.** Microbial composition of the experimental groups in mucosa (A, D, G), and digesta (B, E, H) at phylum, family, and genus level. In panel D, E, G and H only the 10, and 11 most abundant Family and genus, respectively, were presented. Means are presented as black points and SD as horizontal error lines. Only some significant differences were showed on panels C, F, I. Significant differences were measured with one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ), represented by asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*,  $n = 12$ .

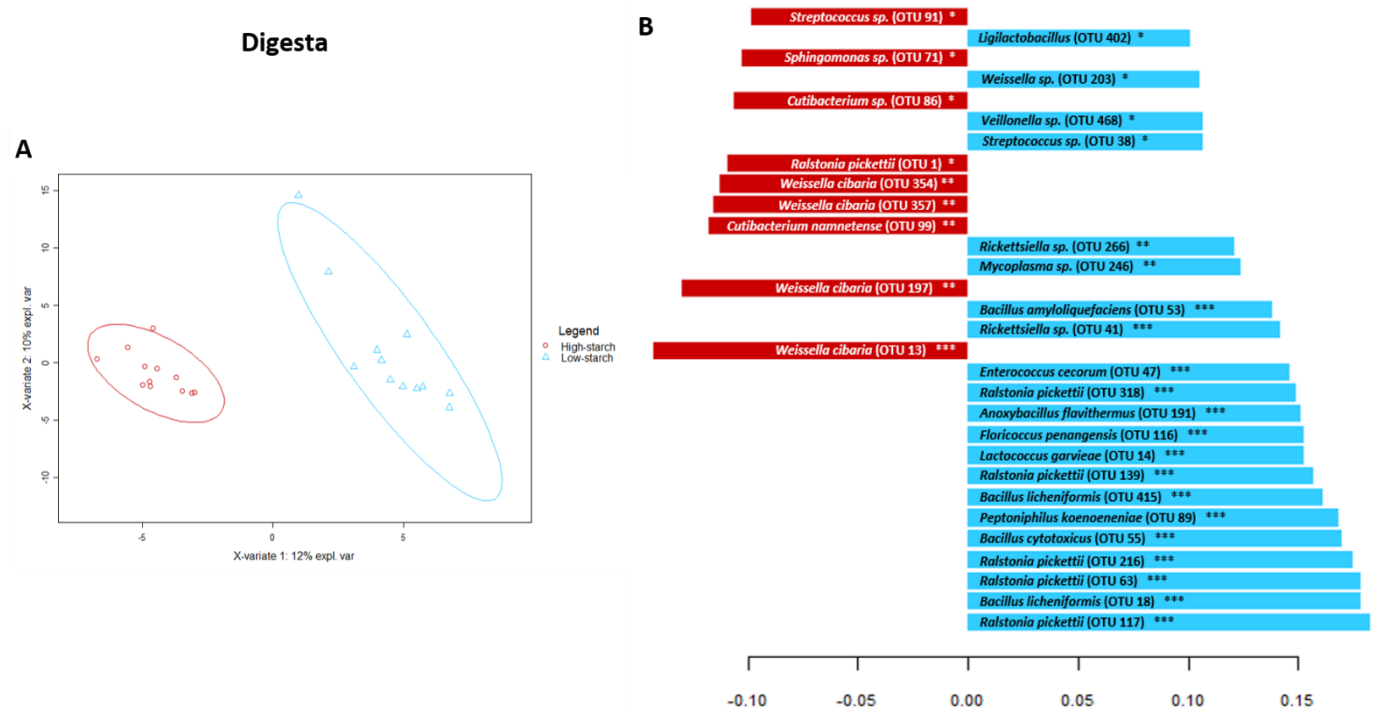
digesta i.e. the genera *Ralstonia*, *Bacillus*, *Cutibacterium*, *Ligilactobacillus*, *Weissella*, *Anaerobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Rickettsiella*, *Peptoniphilus*, *Lactococcus*, *Floriccoccus*, and *Anoxybacillus* (Table 4), whereas in mucosa only 3 genera were impacted, all in the *Firmicutes* phylum: *Bacillus*, *Peptoniphilus* and *Clostridium sensu stricto 1 (s.s. 1)*. In order to evaluate whether some bacterial taxa could distinguish the two diet groups, a PLS-DA was performed, keeping the OTU with abundance above 0.005% in at least one group. A clear separation was observed for digesta (Fig. 5A) and the top 30 most contributing OTUs were identified (Fig. 5B). Indeed, one-way ANOVA allowed to indicate that all of these OTUs were significantly different between the diets (Supplementary Table 4). OTUs belonging to *Ralstonia pickettii*, *Peptoniphilus Koenoene-*

*niae*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Enterococcus cecorum*, *Mycoplasma sp.*, *Rickettsiella sp.*, *Streptococcus sp.*, *Veillonella sp.*, and *Bacillus licheniformis*, *cytotoxicus*, and *amyloliquefaciens* decrease in fish fed with the high starch diet. One OTU belonging to *Ralstonia pickettii*, and several OTUs from *Weissella cibaria*, *Cutibacterium namnetense*, *Sphingomonas sp.*, and *Streptococcus sp.*, were higher in the high-starch group. Regarding mucosa associated microbiota, the separation was not clear and only 6 OTUs were significantly different between the diet groups: 4 OTUs belonging to *Bacillus* genus, 1 from *Peptoniphilus* and the last one from *Clostridium s.s. 1* as previously described (data not shown).

**Table 4**  
Genera abundances significantly affected by diets.

Location	Phylum	Family	Genus	High-starch	Low-starch	P value
Digesta	Proteobacteria	Burkholderiaceae	Ralstonia	0.74 ± 0.06	0.64 ± 0.12	0.019 *
Digesta	Firmicutes	Bacillaceae	Bacillus	0.0047 ± 0.0085	0.033 ± 0.014	4.4e-06 ***
Digesta	Actinobacteria	Propionibacteriaceae	Cutibacterium	0.037 ± 0.025	0.020 ± 0.0083	0.042 *
Digesta	Firmicutes	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus	0.014 ± 0.0075	0.025 ± 0.016	0.035 *
Digesta	Firmicutes	Lactobacillaceae	Weissella	0.017 ± 0.0080	0.0075 ± 0.0043	0.0014 **
Digesta	Firmicutes	Bacillaceae	Anaerobacillus	0.0045 ± 0.0027	0.0026 ± 0.0014	0.04 *
Digesta	Firmicutes	Lactobacillaceae	Limosilactobacillus	0.0044 ± 0.0033	0.0017 ± 0.0011	0.012 *
Digesta	Proteobacteria	Coxiellaceae	Rickettsiella	9.7E-06 ± 2.2E-05	0.0049 ± 0.0044	0.00076 ***
Digesta	Firmicutes	Peptoniphilaceae	Peptoniphilus	0.00052 ± 0.0010	0.0022 ± 0.0016	0.0052 **
Digesta	Firmicutes	Streptococcaceae	Lactococcus	0.00048 ± 0.00053	0.0013 ± 0.00093	0.012 *
Digesta	Firmicutes	Streptococcaceae	Floricoccus	0 ± 0	0.0013 ± 0.00099	0.00015 ***
Digesta	Firmicutes	Bacillaceae	Anoxybacillus	0 ± 0	0.00080 ± 0.00060	0.00019 ***
Mucosa	Firmicutes	Bacillaceae	Bacillus	0.0049 ± 0.014	0.018 ± 0.02	0.041 *
Mucosa	Firmicutes	Peptoniphilaceae	Peptoniphilus	0.00011 ± 0.00032	0.0017 ± 0.0014	0.00078 ***
Mucosa	Firmicutes	Clostridiaceae	Clostridium s.s. 1	0 ± 0	0.00020 ± 0.00021	0.00321 **

Data are presented as mean ± SD (n = 12 fish). statistical differences were calculated by one-ways ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.



**Fig. 5.** PLS-DA analysis on high-starch and low-starch groups based on OTU abundance (A). Each red points or blue triangles represent a fish. Fish can be discriminated according to experimental group on component 1. Contribution level of the top 30 OTUs are presented (B). The bar length represents the importance of the variable in the multivariable model. Red bars correspond to the high-starch group and blue bars to the low-starch group. Significant differences for each OTUs were calculated with one-way ANOVA.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*, n = 12. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

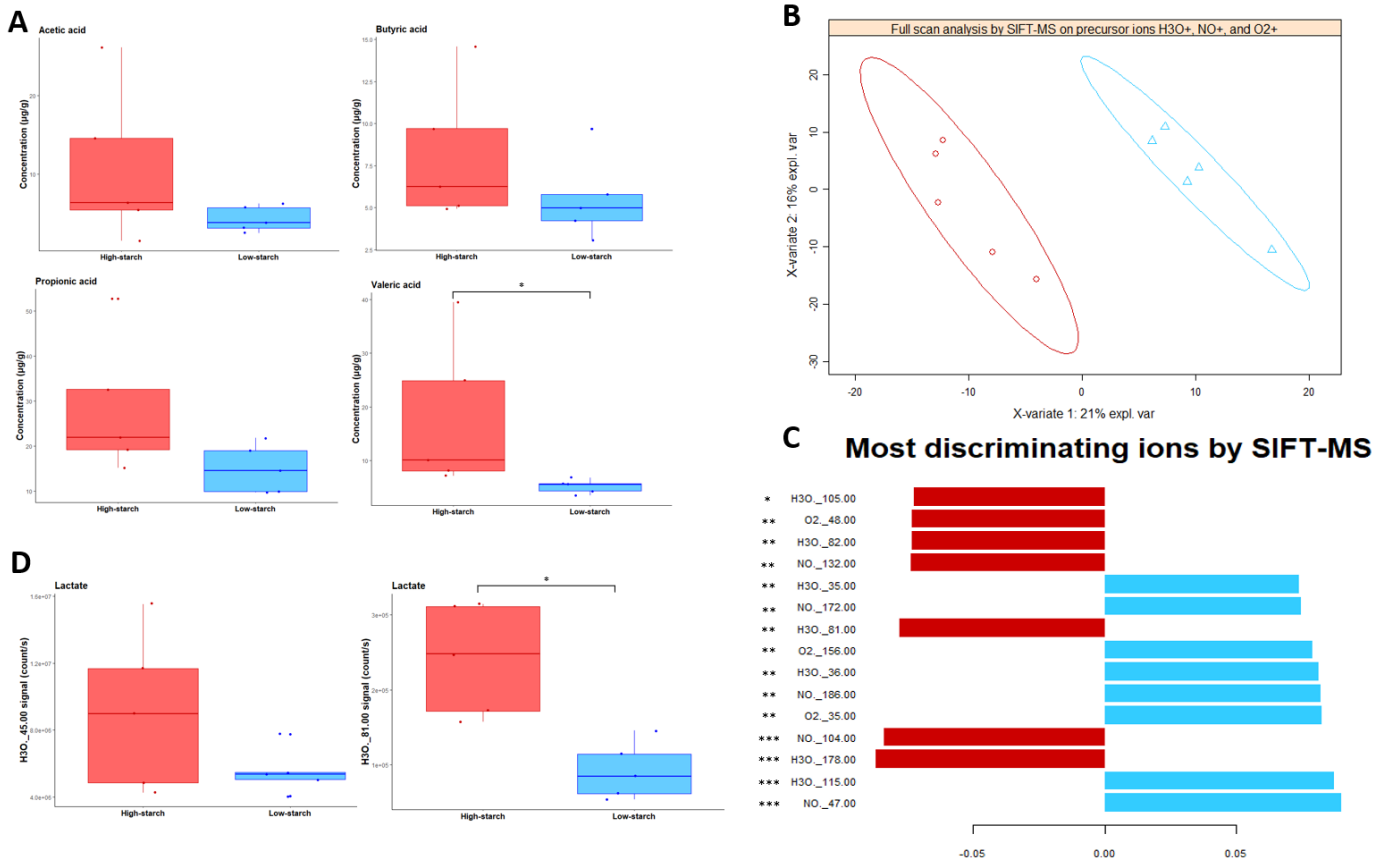
### 3.3. Short-chain fatty acid

Short-chain fatty acid concentrations, including acetic, propionic, butyric, and valeric acid were measured in samples collected from the fish hindgut. A significant increase of the valeric acid concentration, going from  $5.23 \pm 1.27$  µg/g for the low-starch group to  $17.96 \pm 14.00$  µg/g for the high-starch group were obtained according to a Wilcoxon non-parametric test. The level of acetic, butyric, and propionic acid did not differ between the diets (Fig. 6A) but show the same trend as valeric acid. Clustering of the samples based on the count rates of the product ions derived from the SCFAs using PLS-DA showing a clear separation between the two diet groups (Fig. 6B) and the 15 most discriminating ions were identified and showed significant differences (Fig. 6C). Lactate fragmentation induce the production of multiple ions

including  $H_3O^+ 45$ , and  $H_3O^+ 81$  (Fig. 6D). A significant higher proportion of lactate ( $H_3O^+ 81$  signal) was measured in the hindgut sample in trout fed with the high-starch diet.

### 3.4. Gene expression in liver

We evaluated the expression of different genes involved in gluconeogenesis, glycolysis, lipogenesis and fatty acid oxidation in the liver, the center of the intermediary metabolism. ANOVA revealed that there was not a significant effect of CHO on the expression of *glut2a* and *glut2b*, two genes involved in glucose transport (Table 5). The mRNA level of genes implicated in the first (*gcka*, *gckb*), the third (*pfkla*, *pfklb*) and last (*pk*) glycolysis steps was measured. The expression of genes involved in the first steps of glycolysis (*gcka*:  $p < 0.001$  \*\*\*; *gckb*:



**Fig. 6.** SCFA levels of acetic acid, butyric acid, propionic acid, and valeric acid in the digesta of different diets groups (A) were measured in function of the mass of the digestive tract (in gram) with SIFT-MS mass spectrometry. A PLS-DA based on the product ions on the full scan spectrum were made (B) using the H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, NO<sup>+</sup>, and O<sub>2</sub><sup>+</sup> precursor ions. Each red points or blue triangles represent a fish. The top 15 ions discriminated in SIFT-MS were presented (C). The bar length represents the importance of variation contributed by each ions (variable). Red bars correspond to the high-starch group and blue bars to the low-starch group. The proportion of ion H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 45 and H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 81 corresponding to the lactate fragmentation are presented (D). All significant differences ( $P < 0.05$ ) were calculated according to a Wilcoxon non-parametric test.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 5$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

$p < 0.01$  \*\*) increased whereas the expression of the gene implicated in the last-step ( $pk$ :  $p < 0.001$  \*\*\*) decreased in the high-starch group. In the same way, the *pck1* ( $p < 0.05$  \*) and *fbp1b1* ( $p < 0.05$  \*) mRNA gene expression involved in gluconeogenesis were significantly lower in the high-starch group, while in this group the mRNA level of *g6pcb2a* ( $p < 0.05$  \*) was increased. High-starch diet did not affect the expression of genes involved in lipogenesis. By contrast, the *hadh* ( $p < 0.01$  \*\*) and *acox3* ( $p < 0.05$  \*) expression implicated in beta oxidation of lipids decreased in trout fed with the high-starch diet. Regarding cholesterol biosynthesis gene, the expression of the *srebp2a*, *hmgcs*, and *cyp51a* genes decreased significantly in high-starch diet group.

### 3.5. Hepatic enzymatic activities

To validate the gene expression at functional level, the specific activities of glucokinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase, and fatty acid synthase were measured in the liver. The enzymes involved in the first (glucokinase) and in the last (PK) steps of glycolysis were both significantly increased in trout fed with high starch diet (Fig. 7A, B). Indeed, the average activity of glucokinase was higher in the high-starch group ( $+ 0.023$  mU/mg of protein,  $p < 0.001$  \*\*\*). Glucose-6-phosphatase, implicated in gluconeogenesis presented a significant ( $p < 0.05$  \*) higher specific activity in high-starch group,  $0.36 \pm 0.098$  mU/mg of protein, than low-starch group,  $0.26 \pm 0.11$  mU/mg of protein (Fig. 7C). Then, for lipogenesis the key

enzyme, Fatty Acid Synthase (FAS), did not show significant difference between the two groups (Fig. 7D).

### 3.6. Correlations between the OTUs and the hepatic gene expression, zootechnical, liver, plasma parameters and enzymatic activities

The correlations between discriminatory bacterial genera and hepatic gene expression was firstly evaluated using regularized canonical correlation analysis (rCCA) (Fig. 8A). *Anoxybacillus*, *Ligilactobacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Rickettsiella*, *Mycoplasma*, *Brevundimonas*, and *Fibrella* were positively correlated with *fbp1b1*, and *pck1* genes evolved in gluconeogenesis, as well as *pk* involved in glycolysis. These genera were all negatively correlated with *pck2* (gluconeogenesis) and *g6pcb2a* (glycolysis). *Sphingomonas*, *Undibacterium*, *Acinetobacter*, *Veillonella*, and *Salmonella*, were positively correlated with *g6pca*, *g6pcb2a*, *g6pcb2b*, *fbp1b1*, *pck2* (implicated in gluconeogenesis), and negatively with *pk* and *pck1*. *Ralstonia* was negatively correlated with all of these gene expressions. Secondly, OTUs abundances were correlated with zootechnical, liver, and plasmatic parameters as well as enzymatic activities (Fig. 8B). The first 9 OTUs i.e. *Lactococcus*, *Floricoccus*, *Ligilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Peptoniphilus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Rickettsiella* and *Mycoplasma* were positively correlated with FBM (Final Body Mass), DGI (Daily Growth Intake), SGR, DFI, FE and the level of liver cholesterol. These 9 OTUs were negatively correlated with the PER, HSI, as well as the level of glycogen and all the enzymatic activities and the plasma parameters. Inversely, the 9 OTUs, *Ralstonia*, *Burk-*

**Table 5**  
mRNA levels of liver genes of rainbow trout fed with the high or low-starch diet.

	High-starch	Low-starch	P value
Glucose transporter			
<i>glut2a</i>	1.31 ± 0.23	0.94 ± 1.02	NS
<i>glut2b</i>	1.09 ± 0.38	1.01 ± 0.35	NS
Glycolysis			
<i>gcka</i>	5.0 ± 4.07	0.39 ± 0.29	5.92e-06***
<i>gckb</i>	1.76 ± 0.79	0.74 ± 0.54	1.90e-03**
<i>pfkla</i>	1.15 ± 0.62	1.19 ± 0.56	NS
<i>pfklb</i>	1.10 ± 0.44	1.2 ± 0.45	NS
<i>pk</i>	0.90 ± 0.28	1.42 ± 0.33	6.10e-04***
Gluconeogenesis			
<i>pck1</i>	0.59 ± 0.36	4.76 ± 5.95	0.016 *
<i>pck2</i>	1.28 ± 0.96	1.21 ± 0.52	NS
<i>fbp1b1</i>	0.93 ± 0.41	1.48 ± 0.62	0.020 *
<i>g6pca</i>	1.01 ± 0.28	1.12 ± 0.48	NS
<i>g6pcb2a</i>	2.26 ± 1.91	0.79 ± 0.51	0.013 *
Lipogenesis			
<i>achya</i>	1.03 ± 0.74	1.82 ± 1.57	NS
<i>aca-aa</i>	1.76 ± 2.00	1.50 ± 1.45	NS
<i>fasna</i>	2.25 ± 2.08	1.45 ± 0.94	NS
<i>fasnb</i>	1.47 ± 1.53	1.34 ± 0.65	NS
Beta oxidation			
<i>hadh</i>	0.91 ± 0.31	1.47 ± 0.56	7.10e-03 **
<i>cpt1a</i>	1.08 ± 0.52	1.23 ± 0.57	NS
<i>acox3</i>	0.91 ± 0.35	1.48 ± 0.68	0.018 *
Cholesterol synthesis			
<i>srebp2a</i>	0.89 ± 0.48	1.51 ± 0.83	4.40e-03 **
<i>hmgcs</i>	0.85 ± 0.51	1.70 ± 0.77	0.005 **
<i>cyp51a</i>	0.86 ± 0.47	1.66 ± 0.73	0.005 **

Data are presented as mean ± SD (n = 12 fish). statistical differences are calculated by one-ways ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*, *glut2a* and *glut2b*: glucose transporter 2 paralogs. *Gcka* and *gckb*: glucokinase paralogs. *Pfkl*a and *pfkl*b: 6-phosphofructokinase. *pk*: pyruvate kinase. *pck1* and *pck2*: phosphoenolpyruvate carboxykinase paralogs. *fbp1b1*: fructose 1,6-bisphosphatase. *g6pca*. *g6pcb2a*: glucose-6-phosphatase paralogs. *Achya*: adenosine triphosphate citrate lyase. *Aca-aa*: acetylCoA carboxylase alpha. *Fasna* and *fasnb*: fatty acid synthase paralogs. *Hadh*: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *cpt1a*: carnitine palmitoyl transferase 1. *acox3*: acylCoA oxidase. *Srebp-2*: sterol regulatory element-binding protein 2. *hmgcs*: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase. *cyp51a*: Lanosterol 14-alpha demethylase. *abca1a*: ATP-binding cassette transporter A1.

*holderia*, *Weissella*, *Cutibacterium*, *Limosilactobacillus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Macroccoccus*, and *Anaerobacillus*, were positively correlated with PER, HSI, as well as the enzymatic activities and the level of glucose and plasmatic lactate. These OTUs were negatively correlated with the zootechnical parameters implicated in growth parameters as well as the DFI and the FE and the level of liver cholesterol.

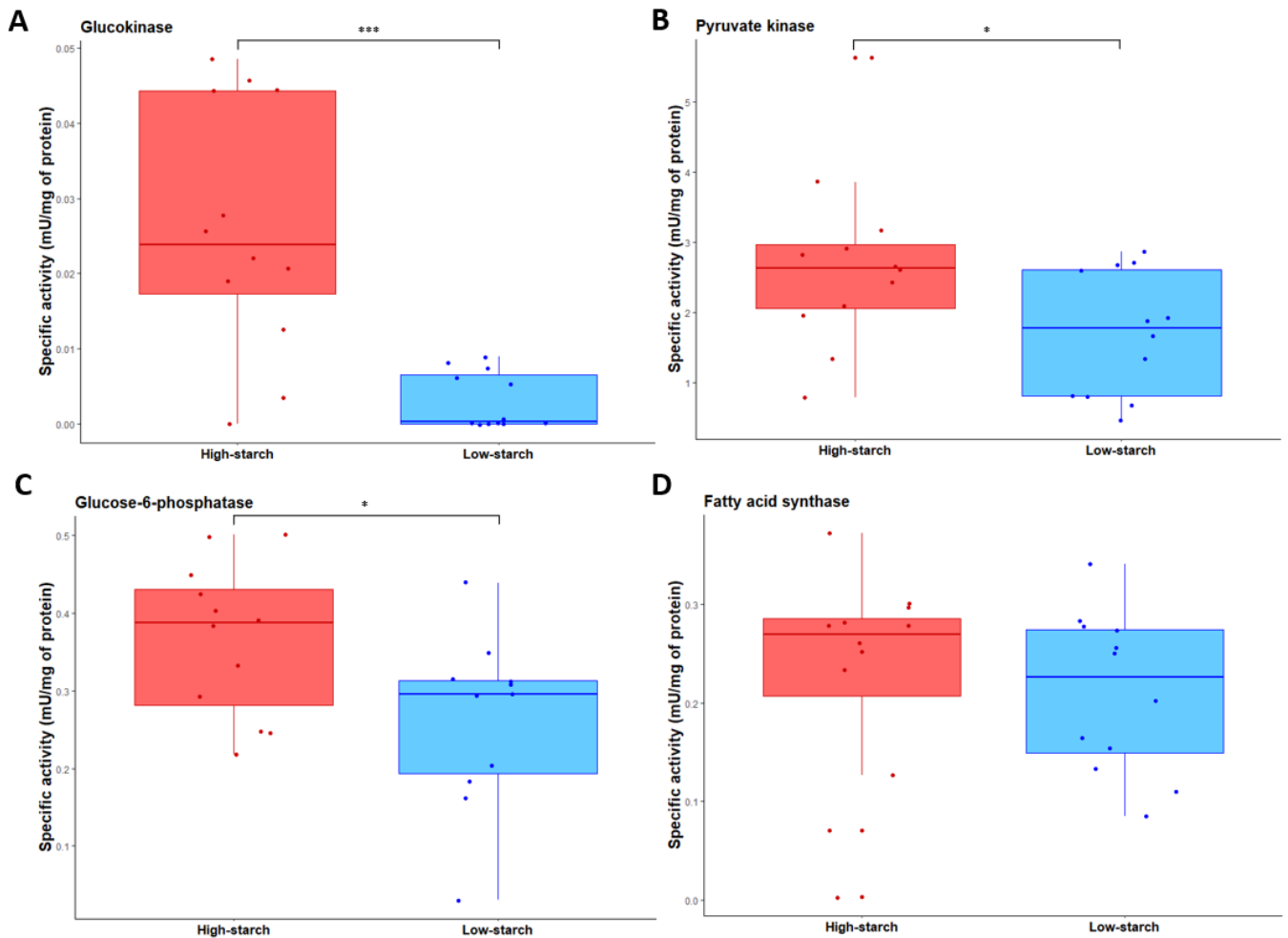
#### 4. Discussion

It is widely known that the vertebrate gut microbiome plays a critical role in digestive system by breaking down nutrients. Bacteria can provide vitamins, fatty acids, as well as nutrients to the host (Dhanasiri et al., 2011), and can also affect the gut morphology (Taschuk and Griebel, 2012). Diet composition is an important factor that could modify both intestinal microbiome (its structure and its metabolic function) and host metabolic response in fish (Ingerslev et al., 2014; Naya-Català et al., 2021; Yang et al., 2021). Although the gut microbiota diversity in fish has been characterized in the last decade (Mansfield et al., 2010), the influence of changes in nutrient composition linked to carbohydrates and proteins levels needs to be investigated in order to improve

the use of all plant-based diet for farmed carnivorous fish. Therefore, the goal of this study was to evaluate the effect of dietary carbohydrates in rainbow trout fed with 100% plant-based diet. The use of high-starch diet have already been studied in diets containing FM and/or FO showing strong changes in the fish microbiota and metabolism (Huang et al., 2021; Wang et al., 2021b; Zhang et al., 2020) but has never been studied with a 100% plant-based diet. We used a similar approach in this study.

##### 4.1. The high-starch diet strongly affects the composition and biodiversity of the gut microbiota

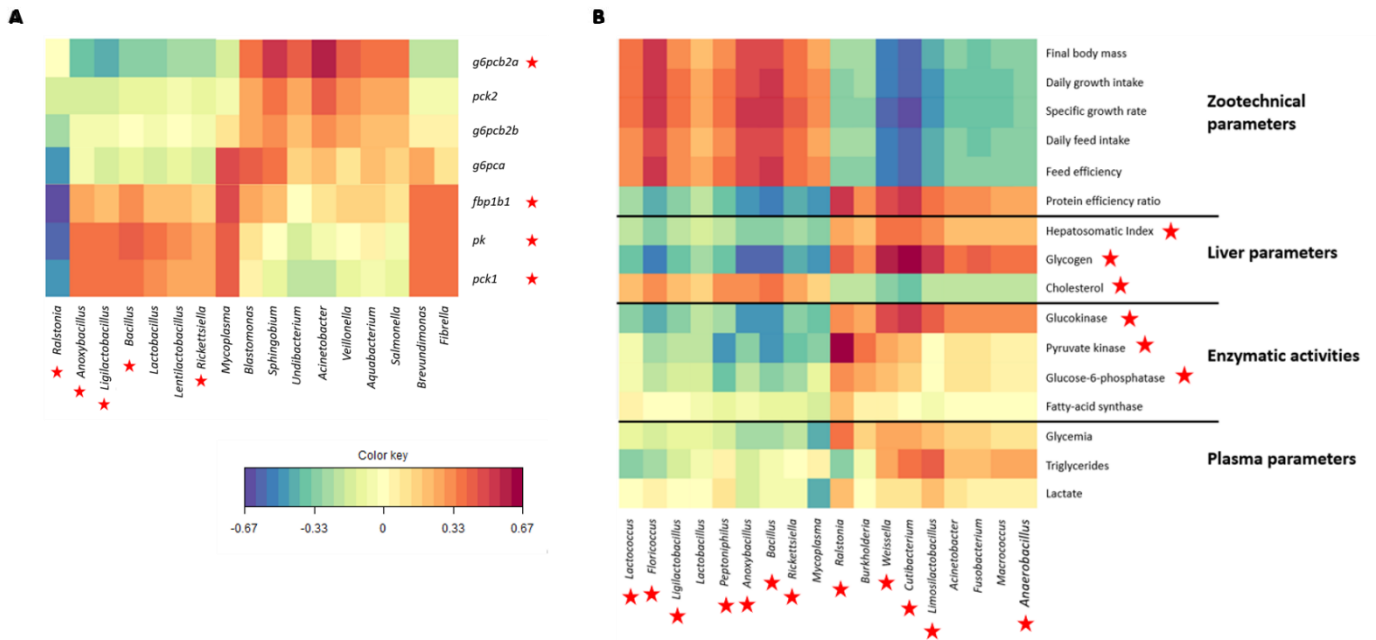
Firstly, *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla were the most abundant phyla regardless the location and the diet according to previous studies in salmon and rainbow trout (Gajardo et al., 2016, 2017; Li et al., 2021; Villasante et al., 2019, 2022). Several studies have already shown that a high-starch diet decreases the intestinal microbiota diversity on the fish intestinal microbiota when combined with diets based on FM and FO in rainbow trout (Geurden et al., 2014), largemouth bass (Huang et al., 2021; Zhou et al., 2021), Chinese perch (Zhang et al., 2020), and Nile tilapia (Xu et al., 2022). Moreover, the comparison between a plant-based diet (but not 100% plant based-diet) and a FM/FO diet have been studied in rainbow trout, revealing that the *Firmicutes* phylum were dominant with the plant-based diet, while with the FM / FO diet, the *Proteobacteria* were dominant (Ingerslev et al., 2014). We sampled the microbiota in the midgut region by collecting the digesta, and by scraping the mucus layer (mucosa associated microbiota) according to (Li et al., 2021). The results obtained in this study allows us to demonstrate that regardless of the diet, a significant difference between digesta and mucosa associated microbiota were observed according to previous works in mammals and fish (Bruni et al., 2022; Gajardo et al., 2016, 2017; Li et al., 2021). Most studies investigating diet effect on gut microbiota in fish were focused only on digesta or on both mucosa and content mixed together. Investigating only one or a mix could allow us to misinterpret the response of intestinal microbiota to dietary changes. Interestingly, in our study, *Ralstonia* dominates in digesta microbiota when *Mycoplasma* is highly abundant in mucus samples (Lokesh et al., 2023; Rasmussen et al., 2021). In the last version of silva database (n°138.1) used in this study ("<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>," n.d.), *Mycoplasma* is now part of the *Bacilli* class explaining the high abundance of *Firmicutes* in mucosa associated microbiota. The mucosa associated microbiota in salmonids is well known to be dominated by *Mycoplasma*, a potential intracellular bacterium (Cheaib et al., 2021). Previous studies have shown a lack of pathogenicity genes in *Mycoplasma* strains identified in salmon suggesting a symbiotic relationship by enhancing host defense (Bozzi et al., 2021; Lian et al., 2020) and providing biotin in a nutrient poor environment (Lian et al., 2020). *Ralstonia* is already described in high abundance in the gut of marine fish (Huang et al., 2020) and in rainbow trout occasionally (Kim et al., 2007). But it is not the case in most studies on gut microbiota of salmonids. Interestingly, a study in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) using a protocol allowing the authors to identify both active and inactive bacteria, showed that *Ralstonia* was more abundant after depletion of dead bacteria (Legrand et al., 2021). Regarding the effect of diet on gut microbiota diversity, we observed that it was dependent on the sample origin. Digesta associated microbiota was more affected by the diet than the mucosa associated microbiota. A significant decrease of the microbial diversity and richness (both alpha and beta diversity) was observed in the digesta for trout fed with the high-starch diet as previously described in fish fed with high CHO associated with FM/FO (Gajardo et al., 2017; Huang et al., 2021; Morrison and Preston, 2016). Inversely, no change in the alpha and beta diversities were observed in the mucosa associated microbiota, suggesting that the mucosa associated microbiota is more resilient to diet changes. In addition, it has already been shown that transient microbes in the di-



**Fig. 7.** The enzymatic activities of Glucokinase (A), Pyruvate kinase (B), Glucose-6-phosphatase (C), and fatty acid synthase (D) were measured in liver samples in function of the average of milligram of proteins. Significant differences were calculated with one-way ANOVA.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$ .

gesta are influenced by multiple environmental factors such as diet, while mucosa contains more resident microbes that are more influenced by the host (Legrand et al., 2021). Apparently, in rainbow trout the microbes capable of using the dietary components are more abundant in the digesta as observed previously (Lokesh et al., 2023). While in mammals the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio is helpful to understand the link with diet, in fish the ratio *Firmicutes/Proteobacteria* is more relevant regarding the low abundance of *Bacteroidetes* in fish microbiota (Desai et al., 2012). In our study, the gut microbiota of rainbow trout in the midgut digesta were mainly colonized by bacteria belonging to the *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla. The inclusion of high-starch diet (corresponding to a high CHO/Protein ratio) led to an increase to the abundance of *Proteobacteria* and *Actinobacteria* with a decrease in the *Firmicutes*. The *Firmicutes/Proteobacteria* ratio is more relevant in fish and the ratio decreased when rainbow trout are fed with the high-starch diet. This has been previously described in salmonids fed with FM/FO diets (Gajardo et al., 2017; Huang et al., 2021; Morrison and Preston, 2016). More specifically at genus level, the digesta is dominated by *Ralstonia* which increased with the high-starch diet. Interestingly, we observed in the digesta significant higher proportion of Gram positive *Limosilactobacillus* and *Weissella* which are members of the Lactic Acid Bacteria (LAB). These bacteria are known to produce lactic acid through glucose metabolism and *Weissella* has been already identified at higher abundance in salmonids fed with high content of plant ingredients (Desai et al., 2012; Gajardo et al., 2016; Villasante et al., 2019;

Zarkasi et al., 2014). Finally, 12 genera of bacteria were significantly affected by the high-starch diet in the digesta of the midgut. Among these 12 bacterial genera, other lactic acid bacteria were observed in lower abundance in the high-starch group, i.e. *Ligilactobacillus* showing all the complexity of gut microbiota analysis. To go further, the PLS-DA analysis, showing clear separation of the microbial composition, allowed us to identify the most divergent OTUs between the two groups. Most of these OTUs are part of the genera already identified as affected by the diet such as *Weissella*, *Ralstonia* or *Ligilactobacillus*. Regarding *Ralstonia pickettii*, in particular the OTU1 which increases in the high-starch group whereas other OTUs belonging to *R. pickettii* were significantly in lower proportion showing we need to go further the species level by using shotgun metagenomics to fully understand the role of these bacteria. Interestingly, in our study, *Ralstonia pickettii* was dominant in the digesta microbiota, regardless of the diet, and has been found in several environment such as soil, rivers or lakes. In mammals, *Ralstonia pickettii* has been linked to the development of obesity and type 2 diabetes (Udayappan et al., 2017). In this, the increase of *Ralstonia* was not associated to any negative effect of fish physiology. OTUs belonging to genus *Bacillus*: *Bacillus licheniformis*, *B. cytotoxicus*, and *B. amyloliquefaciens* as previously described, have been observed in lower abundance in the high-starch group (Burtscher et al., 2021; Cao et al., 2019; Xu et al., 2022). In the high-starch group we can notify the higher proportion of 4 OTUs corresponding to *Weissella cibaria*. The presence of these lactic acid-producing bacteria could have beneficial effects on



**Fig. 8.** Correlations between OTU abundances and zootechnical, liver, plasma parameters, and enzymatic activities (A) or with several liver gene expressions (B), presented as heatmaps, were calculated using regularized canonical correlation analysis (rCCA). The red stars correspond to the parameters significantly affected by the diets ( $P < 0.05$ ).  $n = 12$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the immune system and may protect against pathogen invasion through the intestinal surface (Nayak, 2010; Salinas et al., 2008).

#### 4.2. Modification in gut microbiota potentially mediates changes in SCFA concentrations in rainbow trout fed with the high-starch diet

In humans, the metabolic changes in the liver in response to carbohydrates are known to be due to the activity of SCFA such as acetate and propionate, since butyrate is generally preferentially absorbed by intestinal cells (Den Besten et al., 2013; Frampton et al., 2020). Indeed, SCFA are good candidates to explain the crosstalk between diet, microbiota, host physiology and health (van der Hee and Wells, 2021). SCFA i.e. acetate, butyrate, propionate, valerate, caproate, are produced mainly in the colon after saccharolytic fermentation (Cummings et al., 1987), mostly by the *Firmicutes* and *Actinobacteria* phyla (Louis and Flint, 2017; Zhu et al., 2017). In fish, the production of SCFA have already been described (Pardesi et al., 2022) as their beneficial effects on glucose tolerance and immune function were identified in tilapia (Wang et al., 2021b). Moreover, it has been recently demonstrated that *Bacillus amyloliquefaciens*, could alleviate the metabolic phenotypes caused by a high-carbohydrate diet by enriching the acetate-producing bacteria in Nile tilapia intestines (Xu et al., 2022). Furthermore, a study in zebrafish has revealed that *Cetobacterium* improves glucose homeostasis, mediated by a potential effect of acetate (Wang et al., 2021a). In our study, a significant increase of the valerate concentration was observed in the microbiota of trout fed with the high-starch diet whereas acetate, butyrate and propionate showed the same trend. Regarding SCFA levels, their increase observed in the high-starch group could at least partially explain differences in gene expression in the liver (Morrison and Preston, 2016). In addition, our data suggested a high production of lactate probably linked to lactate-producing bacteria, *Weissella* and *Limosilactobacillus*, in the high-starch group microbiota.

#### 4.3. The high-starch diet did not affect growth performance and glucose homeostasis but have expected effect on glucose and lipid metabolism in liver

Overall, the incorporation of 20% of dietary starch to a 100% plant-based diet has resulted in strong change in the digesta associated micro-

biota of the midgut. Indeed, we observed a decrease of microbiota diversity, in particular in contents as well as changes in several bacterial groups abundance without affecting the growth performance. Interestingly, while rainbow trout use high levels of protein for growth (Cleveland and Radler, 2019; Seiliez et al., 2008), decreasing the proportion of plant protein in the high-starch diet did not affect the trout final weight and even increase the protein efficiency ratio suggesting that increasing the CHO/protein ratio could prevent protein catabolism for energy needs as shown previously in fish fed with marine resources (Kamalam et al., 2017). For the first time, we showed that it is possible to incorporate high levels of digestible carbohydrates (20%) without any negative effects on zootechnical parameters and whole-body composition even in fish fed with a 100% plant-based diet. While trout are often described as poor users of glucose caused by a persistent post-prandial hyperglycemia when fed a diet containing >20% of carbohydrates (Polakof et al., 2012), this metabolic disorder has not been observed with the high-starch diet in our study. Other studies have also shown low blood glucose levels in mature brood stock trout fed with high levels of CHO in their diets (Callet et al., 2020), suggesting that CHO can be efficiently metabolized and/or stored as glycogen in the liver at least at later stage of development. Indeed, in rainbow trout fed with the high-starch diet, the glycogen level is higher in the liver resulting in a higher hepatosomatic index. Regarding the metabolism of glucose through glycolysis, our results reveal that the hepatic glucokinase mRNA gene expression (*gcka* and *gckb*) and their enzymatic activities were significantly higher in fish with the high-starch diet. The increase of glucokinase activity and glycogen level in trout fed with carbohydrates suggests that the rainbow trout can adapt at a metabolic level to the carbohydrate intake in fish fed with a 100% plant-based diet, as previously observed in fish fed with marine resources (Capilla et al., 2003; Pereira et al., 1995). We observed a significant lower expression of the *pk* gene (coding for the pyruvate kinase enzyme) involved in the last step of the glycolysis which is different to what is found in mammals (Yamada and Noguchi, 1999). However, this result is consistent in rainbow trout where it has been shown that the expression of the *pk* gene was poorly controlled with high levels of dietary carbohydrates, linked to a strong and constant expression of this gene (Enes et al., 2009; Panserat et al., 2001; Skiba-Cassy et al., 2013). The production of

glucose in the liver through gluconeogenesis occurs from amino acids, glycerol, or lactate in mammals and fish (Kamalam et al., 2017; Polakof et al., 2010) and is inhibited when the animals are fed with carbohydrates (Metzger et al., 2004). In fish fed with the high-starch diet, we observed as expected a significant diminution of the *pck1*, and *fbp1b1*, gene expression involved in different steps of gluconeogenesis pathway. By contrast, the enzymatic activity of the glucose-6-phosphatase (allowing the hydrolysis of the glucose-6-phosphate to d-glucose) is higher in the high-starch diet with higher *g6pcb2a* gene expression according to previous studies that the liver glucose-6-phosphatase (*g6p*) is not well regulated in rainbow trout in fish fed with FM and FO (Kamalam et al., 2012; Marandel et al., 2015; Skiba-Cassy et al., 2013). Indeed, the duplication of genes implicated in gluconeogenesis such as *g6pcb* was suggested to contribute to the glucose intolerance and poor use of dietary carbohydrates in rainbow trout (Marandel et al., 2015). In our study, we confirmed this atypical regulation of glucose-6-phosphatase in fish fed without fish meal and fish oil, although no hyperglycemia was observed; this was observed for the first time, suggesting that the deregulation of the *g6pcb2* gene expression by carbohydrates is not sufficient to explain the low carbohydrate use in trout. The absence of differences in lipid contents in whole body composition as well as triglycerides levels in plasma in fish fed carbohydrates suggests that de novo lipogenesis is not induced in fish fed with CHO. According to lipid contents, all lipogenesis genes were not regulated by CHO which was consistent with the FAS activity which is not modified in the high starch group confirming that in rainbow trout fed with CHO (Sam et al., 2014), dietary glucose is not a strong inducer of hepatic lipogenesis. Finally, we observed as expected a decrease of the beta oxidation capacity for lipid catabolism (through *hadh* and *acox3* genes expression) as it was demonstrated in rainbow trout fed with a high-starch diet containing fish meal and fish oil (Song et al., 2018). We then investigated cholesterol metabolism, which is known to play an essential role in modulating membrane fluidity and essentially synthesized in liver of all animals (Dietschy et al., 1993) but can also be provided by the diet. Interestingly, we observed a significant decrease of the cholesterol concentration in the liver of high starch group associated with a decrease in the expression of several genes (*srebp2a*, *hmgcs*, *cyp51a*) involved in cholesterol biosynthesis (Khare and Gaur, 2020). *Lactobacillus* species have been previously identified to have cholesterol lowering effect on the hosts, in particular on hepatic cholesterol synthesis (Khare and Gaur, 2020; Martínez Cruz et al., 2012).

#### 4.4. Strong interactions between trout microbiota and host metabolism were observed in trout fed with high-starch diet

There were positive correlations between genes glycolysis, and gluconeogenesis as well as with, the growth parameters and OTUS belonging to *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Rickettsiella*, *Anoxybacillus*, *Ligilactobacillus*, and *Lactobacillus* whereas *Ralstonia* is negatively correlated with these pathways. Correlated. A positive correlation with *Bacillus* groups with these metabolic pathways were previously observed in rainbow trout (Lokesh et al., 2022). Interestingly, *Bacillus* and *Lactobacillus* are already used as probiotics in teleost aquaculture showing different beneficial effect on fish (Martínez Cruz et al., 2012). However, we need further investigation, especially, information on the genomes *Lactobacillus* and *Bacillus* to fully understand the role of these bacteria.

## 5. Conclusions

The present work allows us to show clear differences between the digesta associated microbiota and mucosa associated microbiota. Phyla from *Proteobacteria* and *Firmicutes* are dominant in both contents and mucosa associated microbiota. CHO/protein ratio strongly modify the bacterial community and diversity especially in digesta-associated microbiota, associated with differences in concentration of SCFA. Never-

theless, we cannot discard that some of these effects can also be related to the different plant protein sources. We also identified for the first time a good utilization of dietary carbohydrates in carnivorous rainbow trout when associated with a 100% plant-based diet, as reflected by the growth performance and the metabolic analysis. Finally, important correlations have been highlighted between several OTUs and the trout zootechnical and metabolic parameters. Further investigations through the use of meta-omics approaches in future studies could provide a better understanding of the nutrient and carbohydrate utilization by the host microbiome in order to improve the use of a 100% plant-based diet and be a sustainable alternative to FM and FO for carnivorous fish in aquaculture.

## Ethics approval and consent to participate

No submission to the bioethics committee has been made since the energy and nutritional needs of the animals have been covered. Moreover, all the samples were taken post mortem.

## Consent for publication

Not applicable.

## Funding

Funding was provided by the CD40 (Conseil Départemental des Landes) and the "Université de Pau et Pays de l'Adour" (UPPA).

## Authors' contributions

RD designed and performed the wet lab experiments and data analysis, and drafted the first version of the paper with subsequent editing by coauthors. KR and SP designed, conceived and coordinated the study. JL contributed to the microbiota analysis and made the first correction of the first version. MG, MLB, and TP performed the SCFA analysis. FT formulated the diets and overlooked the experiment. MM, VV, SB, AS collected samples and performed several lab manipulations. All authors contributed to the review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Declaration of Competing Interest

We declare no conflicts of interest.

## Data availability

All sequence data are available at the NCBI sequence read archive under accession numbers PRJNA827991, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/827991>.

## Acknowledgements

We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, doi: [10.15454/1.5572369328961167E12](https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12)) and Siganae group for providing help and/or computing and/or storage resources thanks to Galaxy instance <http://siganae-workbench.toulouse.inra.fr>. We thank Frédéric Terrier, Franck Sandres and Anthony Lanuque for the fish rearing in the Donzacq (France) INRAE experimental fish farm. Fig. 1 created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

## Appendix A. Supplementary data

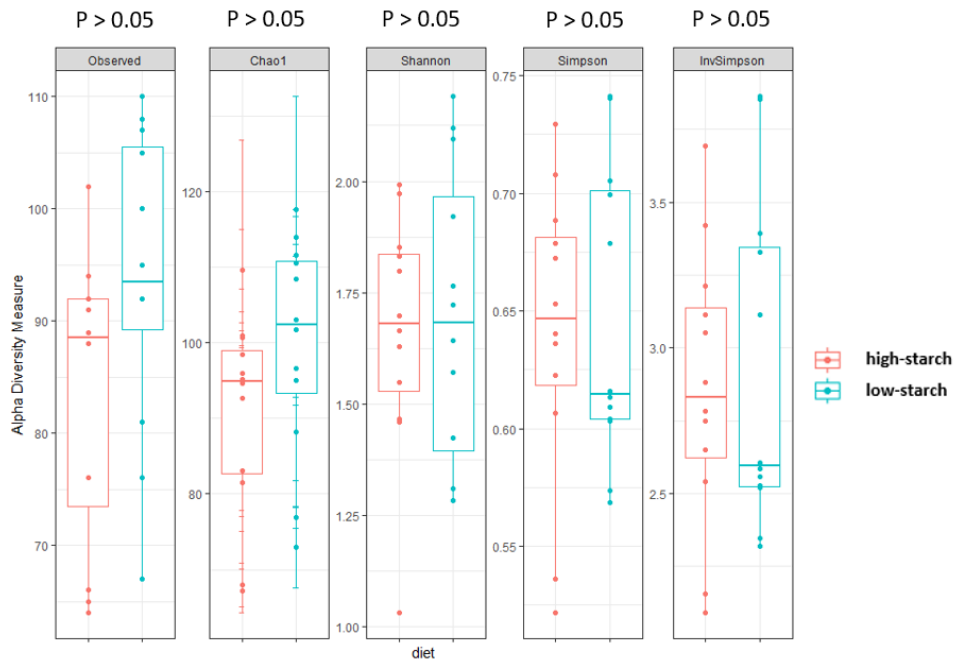
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740049>.



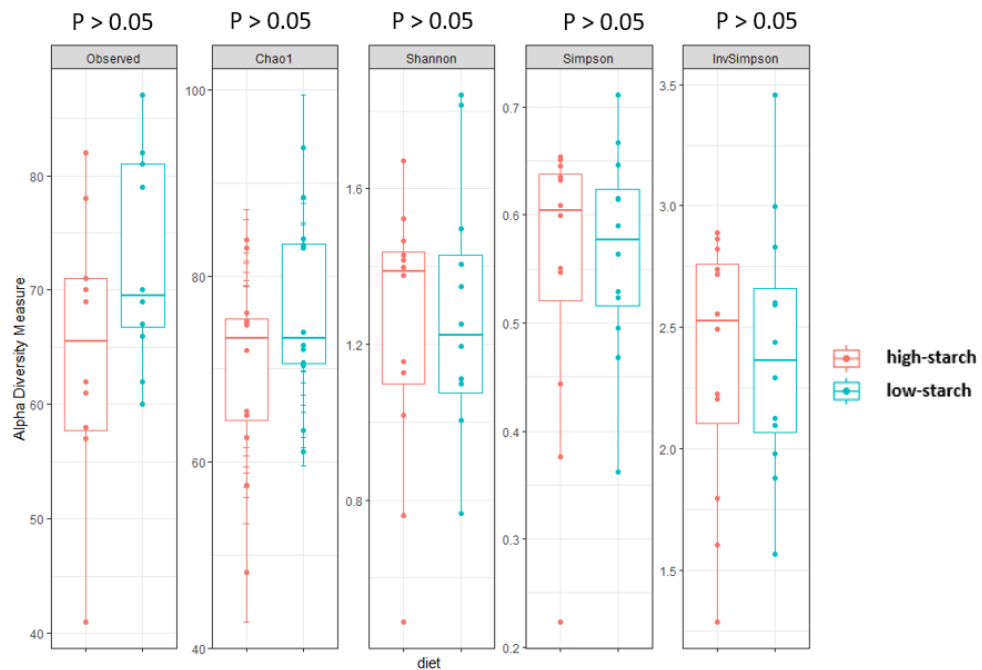
## References

- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Gou, Y.K., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Boonantanasarn, S., Jangprai, A., Kumkhong, S., Plagnes–Juan, E., Veron, V., Burel, C., Marandel, L., Panserat, S., 2018. Adaptation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates: new insights from a long term nutritional study. *Aquaculture* 496, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.011>.
- Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2021. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bruni, L., Milanović, V., Tulli, F., Aquilanti, L., Parisi, G., 2022. Effect of diets containing full-fat *Hermetia illucens* on rainbow trout microbiota: a dual cultivation-independent approach with DGGE and NGS. *Aquaculture* 553, 738109. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738109>.
- Burtscher, J., Etter, D., Biggel, M., Schlaepfer, J., Johler, S., 2021. Further insights into the toxicity of bacillus cytotoxicus based on toxin gene profiling and vero cell cytotoxicity assays. *Toxins (Basel)* 13, 1–7. <https://doi.org/10.3390/toxins13040234>.
- Butt, R.L., Volkoff, H., 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>.
- Callet, T., Hu, H., Larroquet, L., Surget, A., Liu, J., Plagnes–Juan, E., Maunas, P., Turonnet, N., Mennigen, J.A., Bobe, J., Burel, C., Corraze, G., Panserat, S., Marandel, L., 2020. Exploring the impact of a low–protein high–carbohydrate diet in mature broodstock of a glucose–intolerant teleost, the rainbow trout. *Front. Physiol.* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00303>.
- Cao, G.T., Dai, B., Wang, K.L., Yan, Y., Xu, Y.L., Wang, Y.X., Yang, C.M., 2019. *Bacillus licheniformis*, a potential probiotic, inhibits obesity by modulating colonic microflora in C57BL/6J mice model. *J. Appl. Microbiol.* 127, 880–888. <https://doi.org/10.1111/jam.14352>.
- Capilla, E., Médale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S., Gutiérrez, J., 2003. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul. Pept.* 110, 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00212-4).
- Chang, H.C., Seidman, I., Teebor, G., Lane, M.D., 1967. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 682–686. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90369-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90369-5).
- Cheah, B., Yang, P., Kazlauskaitė, R., Lindsay, E., Heys, C., Dwyer, T., De Noa, M., Schaal, P., Sloan, W., Ijaz, U.Z., Llewellyn, M.S., 2021. Genome erosion and evidence for an intracellular niche – exploring the biology of mycoplasmas in Atlantic salmon. *Aquaculture* 541, 736772. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736772>.
- Cleveland, B.M., Radler, L.M., 2019. Essential amino acids exhibit variable effects on protein degradation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 229, 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2018.11.019>.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, H.W.J., Naylor, C.P.E., MacFarlane, G.T., 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>.
- Deborde, C., Hounoum, B.M., Moing, A., Maucourt, M., Jacob, D., Corraze, G., Médale, F., Fauconneau, B., 2021. Putative imbalanced amino acid metabolism in rainbow trout long term fed a plant–based diet as revealed by 1H–NMR metabolomics. *J. Nutr. Sci.* 1–18. <https://doi.org/10.1017/jns.2021.3>.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short–chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>.
- 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>.
- Dhanasiri, A.K.S., Brunvold, L., Brinchmann, M.F., Korsnes, K., Bergh, Ø., Kiron, V., 2011. Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microb. Ecol.* 61, 20–30. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9673-y>.
- Dietsch, J.M., Turley, S.D., Spady, D.K., 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34, 1637–1659. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)35728-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)35728-X).
- Dvergedal, H., Sandve, S.R., Angell, I.L., Klemetsdal, G., Rudi, K., 2020. Association of gut microbiota with metabolism in juvenile Atlantic salmon. *Microbiome* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00938-2>.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva–Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>.
- Escudí, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez–Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2017. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- FAO, 2018. The Future of Food and Agriculture – Alternative Pathways to 2050.
- FAO, 2020. World Fisheries and Aquaculture.
- Frampton, J., Murphy, K.G., Frost, G., Chambers, E.S., 2020. Short–chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat. Metab.* 29 (2), 840–848. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-01887-7>. 2020. .
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Kroghdahl, Å., Bakke, A.M., Merrifield, D.L., Sørum, H., 2016. A high–resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep30893>.
- Gajardo, K., Jaramillo–Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Kroghdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>.
- Geurden, I., Mennigen, J., Plagnes–Juan, E., Veron, V., Cerezo, T., Mazurais, D., Zambonino–Infante, J., Gatesoupe, J., Skiba–Cassy, S., Panserat, S., 2014. High or low dietary carbohydrate: protein ratios during first–feeding affect glucose metabolism and intestinal microbiota in juvenile rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 217, 3396–3406. <https://doi.org/10.1242/jeb.106062>.
- Gomes, A.C., Hoffmann, C., Mota, J.F., 2018. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* 9, 308–325. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1465157>.
- Good, C.A., Kramer, H., Somogyi, M., 1933. The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* 100, 485–491. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75966-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75966-8) <https://bioinfopub.cnsc.es/tools/venny/>, n.d. <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>, n.d.
- Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnelli, 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>.
- Huang, Q., Sham, R.C., Deng, Y., Mao, Y., Wang, C., Zhang, T., Leung, K.M.Y., 2020. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host–related factors. *Mol. Ecol.* 29, 5019–5034. <https://doi.org/10.1111/mec.15699>.
- Huang, X., Zhong, L., Kang, Q., Liu, S., Feng, Y., Geng, Y., Chen, D., Ou, Y., Yang, S., Yin, L., Luo, W., 2021. A high starch diet alters the composition of the intestinal microbiota of largemouth bass *Micropterus salmoides*, which may be associated with the development of enteritis. *Front. Microbiol.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696588>.
- Ingerslev, H.C., von Gersdorff–Jørgensen, L., Lenz–Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L., 2014. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>.
- Kamalam, B.S., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba–Cassy, S., Panserat, S., 2012. Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *J. Exp. Biol.* 215, 2567–2578. <https://doi.org/10.1242/jeb.070581>.
- 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* 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or Total Replacement of Fish Meal by Soybean Protein on Growth, Protein Utilization, Potential Estrogenic or Antigenic Effects, Cholesterolemia and Flesh Quality in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. 133. pp. 257–274.
- Khare, A., Gaur, S., 2020. Cholesterol–lowering effects of *Lactobacillus* species. *Curr. Microbiol.* 77, 638–644. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w>.
- Kim, D.H., Brunt, J., Austin, B., 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 102, 1654–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 133, 2561–2564. <https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2561>.
- Krasnov, A., Teerijoki, H., Mölsä, H., 2001. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* 1520, 174–178. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00258-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00258-5).
- Lazarotto, 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, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117609>.
- Legrand, T.P.R.A., Wos–Oxley, M.L., Wynne, J.W., Weyrich, L.S., Oxley, A.P.A., Thibault, C., Legrand, P.R.A., 2021. Dead or Alive: Microbial Viability Treatment Reveals Both Active and Inactive Bacterial Constituents in the Fish Gut Microbiota. <https://doi.org/10.1111/jam.15113>.
- Lí, Y., Bruni, L., Jaramillo–Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T.M., Kroghdahl, Å., 2021. Differential response of digesta– and mucosa–associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00071-3>.
- Lian, C.A., Yan, G.Y., Huang, J.M., Danchin, A., Wang, Y., He, L.S., 2020. Genomic characterization of a novel gut symbiont from the Hadal Snailfish. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02978>.
- Lin, S.M., Shi, C.M., Mu, M.M., Chen, Y.J., Luo, L., 2018. Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Fish Shellfish Immunol.* 78, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.046>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real–time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$  method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lokesh, J., Ghislain, M., Reyrolle, M., Le Behec, M., Pigot, T., Terrier, F., Roy, J.,

- Panserat, S., Ricaud, K., 2022. Prebiotics modify host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a total plant-based diet: potential implications for microbiome-mediated diet optimization. *Aquaculture* 561, 738699. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738699>.
- Lokesh, J., Delaygues, M., Defaix, R., Le Bechec, M., Pigot, T., Dupont Nivet, M., Kerneis, T., Labbé, L., Goardon, L., Terrier, F., Panserat, S., Ricaud, K., 2023. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *Br. J. Nutr.* 1–40. <https://doi.org/10.1017/S0007114523000120>.
- Louis, P., Flint, H.J., 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 19, 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>.
- Mansfield, G.S., Desai, A.R., Nilson, S.A., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., Hill, J.E., 2010. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 307, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.014>.
- Marandel, L., Seilliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2015. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trait. *Physiol. Genomics* 47, 253–263. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramírez Saad, H.C., 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>.
- Metzger, S., Nusair, S., Planer, D., Barash, V., Pappo, O., Shilyansky, J., Chajek-Shaul, T., 2004. Inhibition of hepatic gluconeogenesis and enhanced glucose uptake contribute to the development of hypoglycemia in mice bearing interleukin-1beta-secreting tumor. *Endocrinology* 145, 5150–5156. <https://doi.org/10.1210/EN.2004-0323>.
- Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>.
- Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N., Kyripides, N.C., Pati, A., 2015. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by illumina Phix control. *Stand. Genomic Sci.* 10, 1–4. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-18>.
- Nasopoulou, C., Zabetakis, I., 2012. LWT – food science and technology bene fits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT Food Sci. Technol.* 47, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.018>.
- Naya-Català, F., de Vale Pereira, G., Piazzon, M.C., Fernandes, A.M., Caldach-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Conceição, L.E.C., Pérez-Sánchez, J., 2021. Cross-talk between intestinal microbiota and host gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: insights in fish feeds for increased circularity and resource utilization. *Front. Physiol.* 12, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.748265>.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, G., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 278, 1164–1170. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.5.r1164>.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.13.2351>.
- Panserat, S., Marandel, L., Seilliez, I., Skiba-Cassy, S., 2019. New insights on intermediary metabolism for a better understanding of nutrition in Teleosts. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115250>.
- Pardesi, B., Robertson, A.M., Lee, K.C., Angert, E.R., Rosendale, D.I., Boycheva, S., White, W.L., Clements, K.D., 2022. Distinct microbiota composition and fermentation products indicate functional compartmentalization in the hindgut of a marine herbivorous fish. *Mol. Ecol.* 1–16. <https://doi.org/10.1111/mec.16394>.
- Pereira, C., Vijayan, M.M., Storey, K.B., Jones, R.A., Moon, T.W., 1995. Role of glucose and insulin in regulating glycogen synthesis and phosphorylase activities in rainbow trout hepatocytes. *J. Comp. Physiol. B* 165(1) (65), 62–70. <https://doi.org/10.1007/BF00264687>. 1995.
- Pérez-Pascual, D., Pérez-Cobas, A.E., Rigaudeau, D., Rochat, T., Bernardet, J.-F., Skiba-Cassy, S., Marchand, Y., Duchaud, E., Ghigo, J.-M., 2021. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00107-2>.
- Perry, W.B., Lindsay, E., Payne, C.J., Brodie, C., Kazlauskaitė, R., 2020. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0184>.
- Polakof, S., Álvarez, R., Soengas, J.L., 2010. Gut glucose metabolism in rainbow trout: implications in glucose homeostasis and glucosensing capacity. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 299, 19–32. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00005.2010>.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>.
- Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., Duchêne, D.A., Puetz, L.C., Delmont, T.O., Sveier, H., von Jørgensen, L.G., Præbel, K., Martin, M.D., Bojesen, A.M., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2021. Genome-resolved metagenomics suggests a mutualistic relationship between *Mycoplasma* and salmonid hosts. *Commun. Biol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02105-1>.
- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M.A., Olsen, R.E., Meseguer, J., Ringø, E., 2008. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet. Microbiol.* 128, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.011>.
- Sam, B., Aguirre, P., Ve, V., 2014. Comparison of Glucose and Lipid Metabolic Gene Expressions between Fat and Lean Lines of Rainbow Trout after a Glucose Load. p. 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105548>.
- Seilliez, I., Gabillard, J.C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 295, 329–335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2008>.
- Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., Seilliez, I., 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate: protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 109, 1359–1372. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003352>.
- Song, X., Marandel, L., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018. Regulation by dietary carbohydrates of intermediary metabolism in liver and muscle of two isogenic lines of rainbow trout. *Front. Physiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01579>.
- Taschuk, R., Griebel, P.J., 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 129–141. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000096>.
- Udayappan, S.D., Kovatcheva-Datchary, P., Bakker, G.J., Havik, S.R., Herrema, H., Cani, P.D., Bouter, K.E., Belzer, C., Witjes, J.J., Vrieze, A., De Sonneville, N., Chaplin, A., Van Raalte, D.H., Aalvink, S., Dallinga-Thie, G.M., Heilig, H.G.H.J., Bergström, G., Van Der Meij, S., Van Wagenveld, B.A., Hoekstra, J.B.L., Holleman, F., Stroes, E.S.G., Groen, A.K., Bäckhed, F., De Vos, W.M., Nieuwdorp, M., 2017. Intestinal *Ralstonia pickettii* augments glucose intolerance in obesity. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181693>.
- van der Heer, B., Wells, J.M., 2021. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends Microbiol.* 29, 700–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001>.
- Véron, V., Panserat, S., Le Boucher, R., Labbé, L., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Médale, F., 2016. Long-term feeding a plant-based diet devoid of marine ingredients strongly affects certain key metabolic enzymes in the rainbow trout liver. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 771–785. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0174-2>.
- Villasante, A., Ramírez, C., Catalán, N., Opazo, R., Dantagnan, P., Romero, J., 2019. Effect of dietary carbohydrate-to-protein ratio on gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animals* 9, 9. <https://doi.org/10.3390/ani9030089>.
- 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*). *Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.04.003>.
- Wang, A., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., Bindelle, J., 2021a. Intestinal cetobacterium and acetate modify glucose homeostasis via parasympathetic activation in zebrafish. *Gut Microbes* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1900996>.
- Wang, T., Zhang, N., Yu, X.B., Qiao, F., Chen, L.Q., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2021b. Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br. J. Nutr.* 126, 161–171. <https://doi.org/10.1017/S000711452000402X>.
- Xu, R., Li, M., Wang, T., Zhao, Y.W., Shan, C.J., Qiao, F., Chen, L.Q., Zhang, W.B., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates high-carbohydrate diet-induced metabolic phenotypes by restoration of intestinal acetate-producing bacteria in Nile Tilapia. *Br. J. Nutr.* 127, 653–665. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001318>.
- Yamada, K., Noguchi, T., 1999. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* 337, 1–11. <https://doi.org/10.1042/BJ3370001>.
- Yang, C., Jiang, M., Lu, X., Wen, H., 2021. Effects of dietary protein level on the gut microbiome and nutrient metabolism in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals* 11. <https://doi.org/10.3390/ani11041024>.
- Zarkasi, K.Z., Abell, G.C.J., Taylor, R.S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M.L., Katouli, M., Bowman, J.P., 2014. Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. *J. Appl. Microbiol.* 117, 18–27. <https://doi.org/10.1111/jam.12514>.
- Zhang, Y., Liang, X.F., He, S., Chen, X., Wang, J., Li, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Li, L., Alam, M.S., 2020. Effects of high carbohydrate diet-modulated microbiota on gut health in Chinese perch. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575102>.
- Zhou, Y.L., He, G.L., Jin, T., Chen, Y.J., Dai, F.Y., Luo, L., Lin, S.M., 2021. High dietary starch impairs intestinal health and microbiota of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* 534, 736261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736261>.
- Zhu, X., Zhou, Y., Wang, Y., Wu, T., Li, X., Li, D., Tao, Y., 2017. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated Ruminococcaceae bacterium CPB6. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0788-y>.
- Ortiz, L.T., Rebole, A., V.S., et al., 2013. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 19(4), 475–482. doi: 10.1111/J.1365-2095.2012.00981.X. nd.



**Figure 55** : Indices d'alpha diversité, pour les échantillons de contenus digestifs (digesta) prélevés 25 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ .



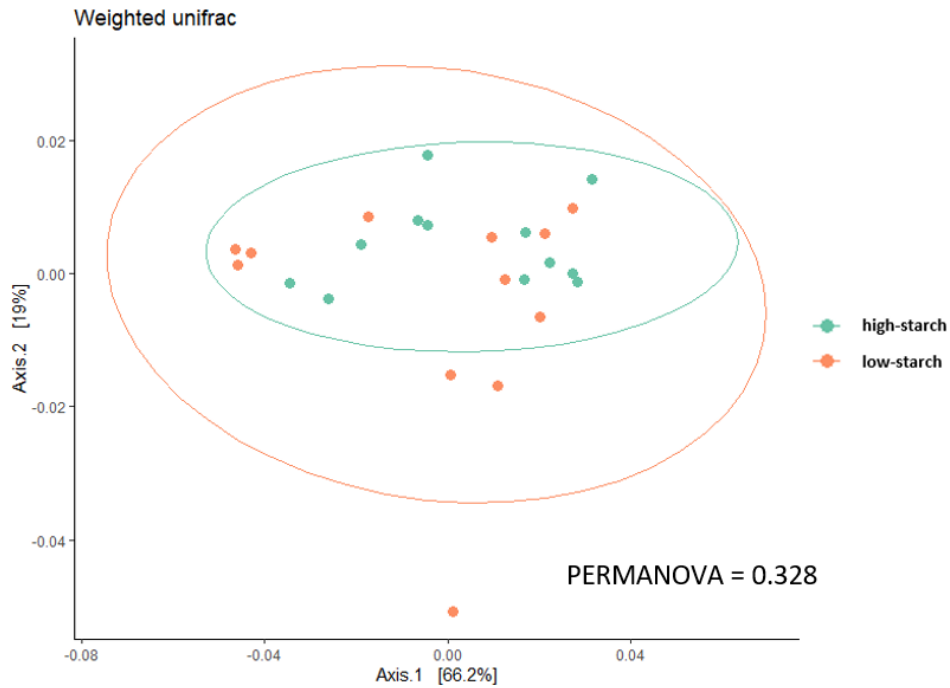
**Figure 56** : Indices d'alpha diversité, pour les échantillons de mucus (mucosa) prélevés 25 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ .

### 3.2. Données additionnelles article 1 :

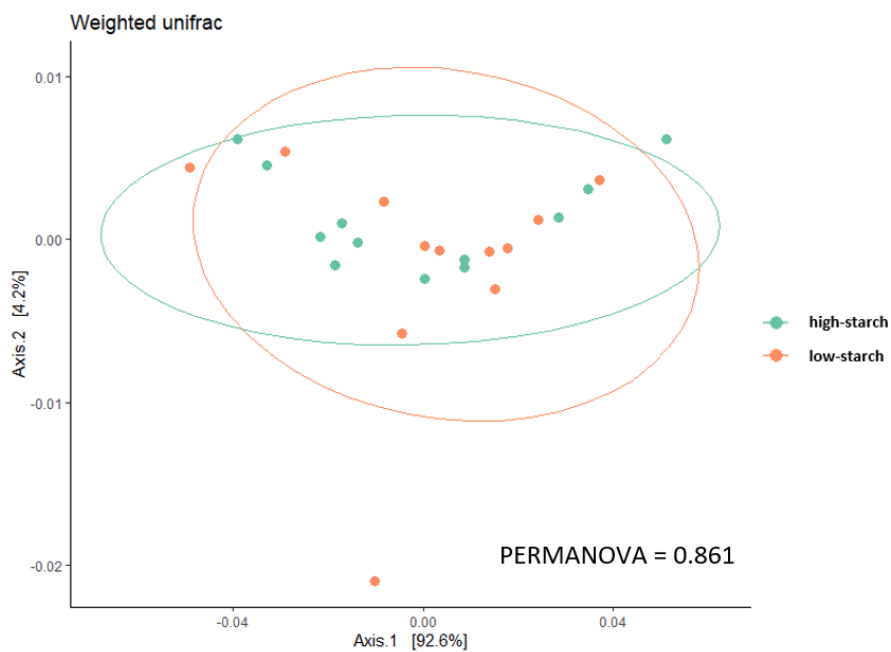
Ci-après, sont ajoutées des données complémentaires non incluses dans le premier article. Les figures et tableaux sont suivis d'une courte explication.

Ces données portent sur les analyses du microbiote intestinal et la structure de l'épithélium intestinal et sur des études d'expression de gènes du métabolisme dans deux tissus importants pour le métabolisme du glucose et l'homéostasie glucidique, c'est-à-dire le muscle et le tissu adipeux.

Contrairement aux indices d'alpha diversité des échantillons de contenus digestifs prélevés 6 heures après le dernier repas, présentés en Figure 2A de l'article, à 25 h, aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) n'est mesurée entre les régimes (**Figure 55**). Cela signifie qu'à 25h, le changement du ratio glucides / protéines n'affecte pas les indices de biodiversités tels que le nombre d'espèces mesurées et estimées par échantillon (indices « *Observed* » et « *Chao1* »), l'abondance des microorganismes par échantillon (« *Shannon* »), ou encore la diversité des microorganismes par échantillon (indices « *Simpson* » et « *InvSimpson* »). L'effet du régime « high-starch » sur les indices d'alpha diversité dans les contenus digestifs ne sont plus observés 25 h après le dernier repas, mais uniquement 6 heures après le dernier repas. Comme obtenu à partir des indices d'alpha diversité des échantillons de mucus prélevés 6 heures après le dernier repas, présenté en Figure 2B de l'article, à 25 h, aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) n'est mesurée entre les régimes (**Figure 56**). L'effet du régime « high-starch » sur les indices d'alpha diversité dans le mucus n'est observé ni à 25 h, ni à 6 heures après le dernier repas.



**Figure 57** : Bêta diversité (*Weighted unifrac*), pour les échantillons de contenus digestifs prélevés 25 heures après le dernier repas. Les différences de Bêta diversité sont estimées grâce au test PERMANOVA. Une différence est considérée significative si  $PERMANOVA < 0,05$ .  $n = 12$ .

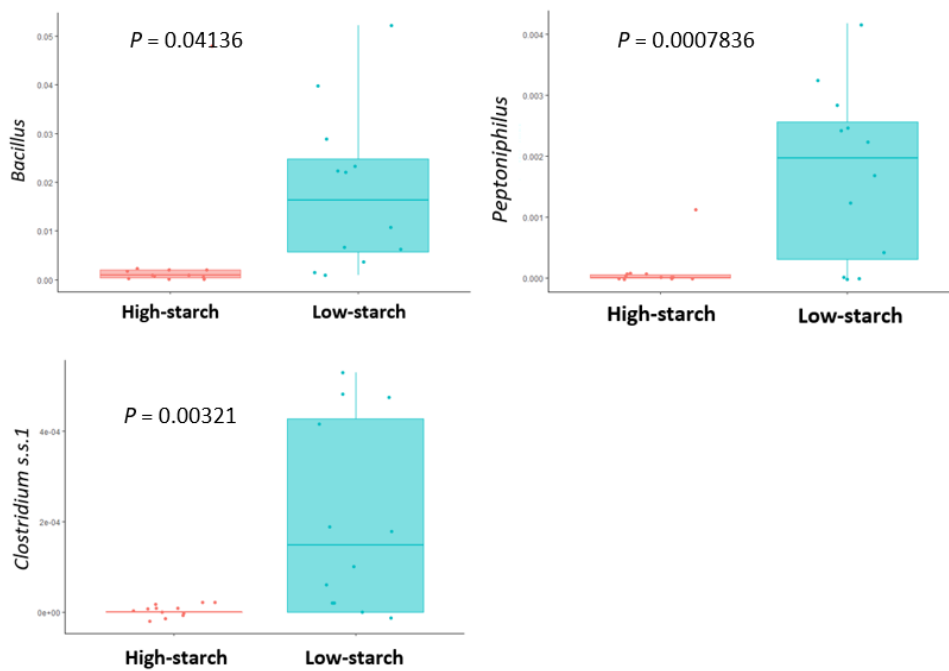


**Figure 58** : Bêta diversité (*Weighted unifrac*), pour les échantillons de mucus prélevés 25 heures après le dernier repas. Les différences de Bêta diversité sont estimées grâce au test PERMANOVA. Une différence est considérée significative si  $PERMANOVA < 0,05$ .  $n = 12$ .

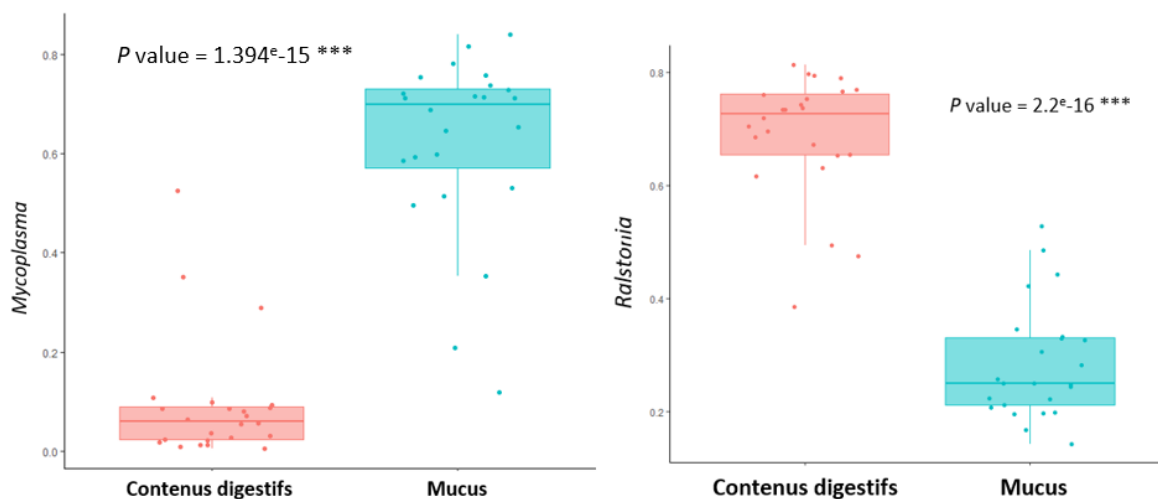
Contrairement à l'indice de bêta diversité (*Weighted unifrac*) des échantillons de contenus digestifs prélevés 6 heures après le dernier repas et présentés Figure 2C de l'article, à 25 heures après le dernier repas, aucune différence significative n'est détectée (**Figure 57**). L'indice de bêta diversité *Weighted unifrac* permet de comparer des communautés microbiennes en fonction de la diversité des espèces (qualitatif), de l'abondance de ces espèces (quantitatif), et de l'importance des différences phylogénétiques des espèces entre les groupes.

Pour les échantillons de contenus digestifs, que ce soit pour les indices d'alpha diversité comme de bêta diversité, les changements apportés par le régime « high-starch » ne sont observés que 6 heures après le dernier repas et non 25 heures après le dernier repas. Il peut être supposé que la modification du microbiote est observée lors du passage des aliments dans le midgut (à 6h), et que le microbiote « revient à la normale » à 25h, après le passage des aliments.

Comme obtenu à partir du résultat de bêta diversité des échantillons de mucus prélevés 6 heures après le dernier repas, présentés en Figure 2D de l'article, à 25 h, aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) n'est mesurée entre les régimes (**Figure 58**). L'effet du régime high-starch sur la bêta diversité du microbiote dans le mucus n'est observé ni à 6 h, ni à 25 heures après le dernier repas.



**Figure 59** : Abondances relatives des genres bactériens (*Bacillus*, *Peptoniphilus*, *Clostridium sensu stricto* 1) significativement différents dans les échantillons de mucus (mucosa) prélevés 6 heures après le dernier repas. Le test ANOVA une voie a été réalisé. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ .

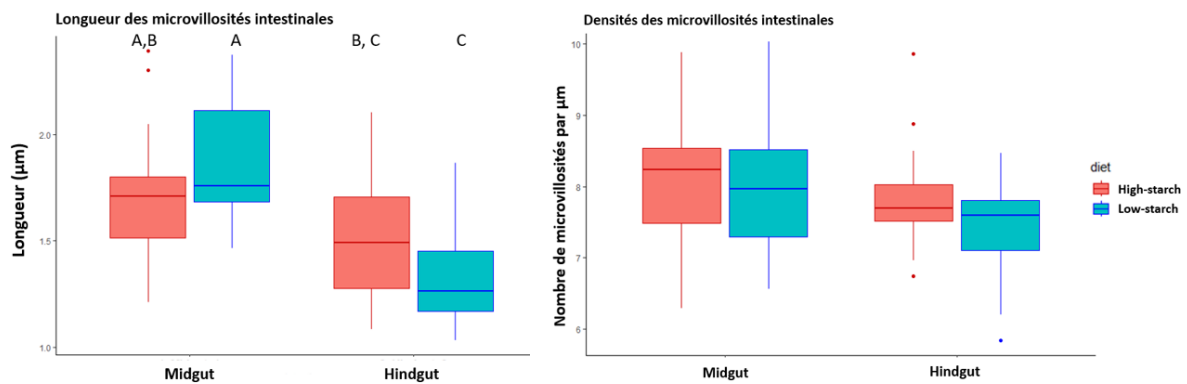
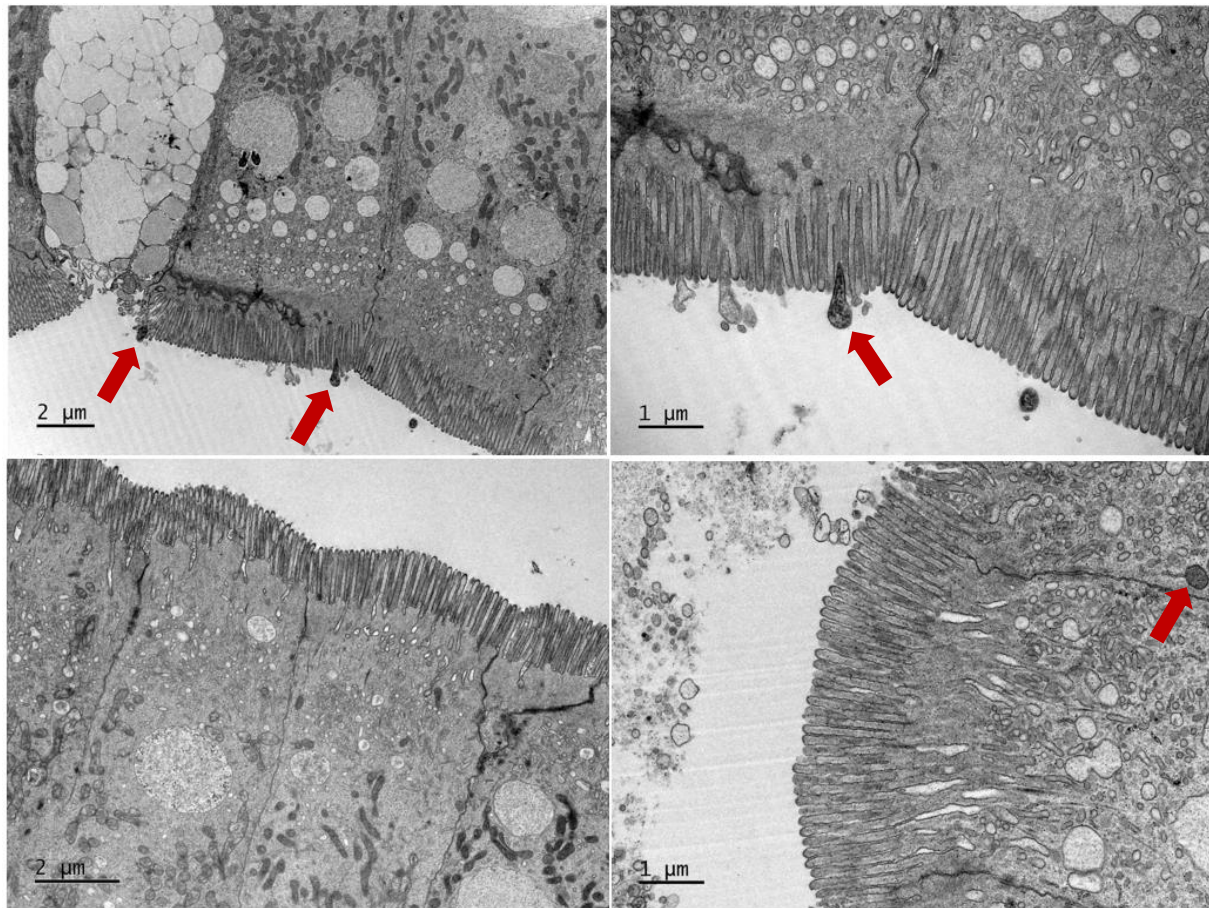


**Figure 60** : Comparaison des abondances relatives des genres *Mycoplasma* et *Ralstonia* entre les contenus digestifs et le mucus, pour les échantillons prélevés 6 heures après le dernier repas. Une différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .  $n = 12$ .

Dans les échantillons de mucus, prélevés 6 heures après le dernier repas, seuls trois genres bactériens sont significativement différents entre les groupes, les genres *Bacillus*, *Peptoniphilus*, et *Clostridium sensu stricto 1* (**Figure 59**). En comparaison avec les effets observés dans les contenus digestifs sur les abondances bactériennes (Tableau 4 de l'article), ce sont finalement « peu » de différences qui sont observées dans les mucus, ce qui est conforme aux résultats non significatifs d'alpha et de bêta diversités obtenus pour ces échantillons. De plus, la diminution de l'abondance relative des genres *Bacillus* et *Peptoniphilus* observée dans les mucus a aussi été mesurée dans les contenus digestifs. Il est d'ailleurs démontré que les microorganismes présents dans les mucus sont probablement plus affectés par la génétique de l'hôte (Ringø et al., 2016). Ceux présents dans les contenus digestifs pourraient être influencés par de multiples facteurs environnementaux, et en particulier la dégradation des aliments (Legrand et al., 2021).

La comparaison des communautés bactériennes entre les contenus digestifs et les mucus (6 heures après le dernier repas) est fortement marquée par les modifications d'abondances relatives des genres *Mycoplasma* et *Ralstonia* (**Figure 60**) (Lokesh et al., 2023). Les bactéries du genre *Mycoplasma* sont souvent retrouvées dans les mucus chez la truite (Lokesh et al., 2022). En effet, ces bactéries pouvant être intra-cellulaires peuvent établir une interaction mutualiste avec les cellules hôtes de l'intestin (Rasmussen et al., 2023). À l'inverse, les bactéries du genre *Ralstonia*, appartenant au phylum des *Proteobacteria*, sont connues pour leur capacité de dégradation des nutriments et sont retrouvées en beaucoup plus forte proportion dans les contenus digestifs.





**Figure 61 :** Photographies en microscopie électronique à transmission mettant en évidence les microvillosités des cellules intestinales. Longueur ( $\mu\text{m}$ ) et densité (nombre de microvillosités par  $\mu\text{m}$ ) sur les échantillons de Midgut et Hindgut des truites nourries avec le régime high-starch ou low-starch, 6 heures après le dernier repas. Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA à deux voies. Les flèches rouges indiquent la présence de formes pouvant être associées à des bactéries du genre *Mycoplasma*.

L'une des fonctions associées au microbiote intestinal est sa capacité à induire des changements histologiques au niveau de l'intestin, en modulant par exemple la taille et la densité des microvillosités intestinales. Lors de cette première étude, des coupes histologiques ont été réalisées à partir des intestins proximaux (*midgut*) et distaux (*hindgut*), et des photos de microscopie électronique à transmission ont permis de mettre en évidence ces cellules intestinales ainsi que les microvillosités (**Figure 61**). De plus, grâce au logiciel Image J, la longueur (en  $\mu\text{m}$ ) et la densité des microvillosités par  $\mu\text{m}$  ont pu être estimées. Il a pu être démontré que le changement du ratio glucides / protéines avec un régime 100 % végétal n'induit pas de changements significatifs sur ces deux facteurs (**Figure 61**). Cependant une diminution significative de la taille des microvillosités du *hindgut* est observée par rapport au *midgut* chez les truites nourries avec le régime « low-starch », comme précédemment observé chez la truite (D. L. Merrifield et al., 2009). En conclusion, la modification du microbiote intestinal induite par la modification du ratio glucides / protéines dans un régime 100 % végétal affecte peu la morphologie des microvillosités intestinales.

	High-starch	Low-starch	P value
<b>Glucose transporter</b>			
<i>glut4a</i>	1.10 ± 0.48	1.51 ± 1.06	NS
<i>glut4b</i>	1.26 ± 0.87	1.53 ± 0.86	NS
<b>Glycolysis</b>			
<i>hk</i>	1.26 ± 0.71	1.34 ± 0.64	NS
<i>pfkmaa</i>	1.13 ± 0.63	1.70 ± 1.16	NS
<i>pfkmab</i>	1.34 ± 0.66	1.20 ± 0.58	NS
<i>pfkmba</i>	1.38 ± 0.64	1.16 ± 0.67	NS
<i>pfkmbb</i>	1.44 ± 0.86	1.20 ± 0.60	NS
<i>pkmaa</i>	1.13 ± 0.63	1.70 ± 1.16	NS
<i>pkmab</i>	1.11 ± 0.41	1.38 ± 0.50	NS
<i>pkmba</i>	1.58 ± 0.71	1.10 ± 0.73	NS
<i>pkmbb</i>	1.38 ± 0.67	1.07 ± 0.62	NS
<b>Beta oxidation</b>			
<i>hadh</i>	1.29 ± 0.97	1.15 ± 0.40	NS
<i>cpt1ba</i>	1.55 ± 0.94	1.13 ± 0.53	NS
<i>cpt1bb</i>	1.2 ± 0.78	1.27 ± 0.72	NS
<i>acox1a</i>	1.43 ± 1.11	1.24 ± 0.68	NS
<i>acox3</i>	1.03 ± 0.58	1.42 ± 0.79	NS

**Tableau 10** : Expression relative de gènes d'intérêt dans les échantillons de muscles (blanc) de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes « high-starch » ou « low-starch », 6 heures après le dernier repas. Les données sont présentées moyenne ± écart type (n=12). Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA une voie. NS : pas significatif. *glut4a* and *glut4b*: glucose transporter 4 paralogues. *hk*: hexokinase. *pfkmaa*, *pfkmab*, *pfkmba*, and *pfkmbb*: 6-phosphofructokinase muscle type paralogues. *pkmaa*, *pkmab*, *pkmba*, and *pkmbb*: pyruvate kinase muscle type. *hadh*: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *cpt1ba*, *cpt1bb*: carnitine palmitoyl transferase 1, paralogues. *acox1a*, *acox3*: acylCoA oxidase paralogues. Les résultats sont normalisés avec le gène de référence *ef1a*.

	High-starch	Low-starch	P value
<b>Glucose transporter</b>			
<i>glut4a</i>	0.81 ± 0.31	1.04 ± 0.25	NS
<i>glut4b</i>	0.53 ± 0.18	1.10 ± 0.93	NS
<b>Glycolysis</b>			
<i>hk</i>	1.97 ± 1.22	0.88 ± 0.97	NS
<i>pfkla</i>	0.57 ± 0.30	0.91 ± 0.91	NS
<i>pfklb</i>	1.34 ± 0.66	1.20 ± 0.58	NS
<i>pk</i>	1.14 ± 1.26	0.75 ± 0.58	NS
<b>Lipogenesis</b>			
<i>sreb1a</i>	0.46 ± 0.36	0.46 ± 0.28	NS
<i>acly</i>	1.77 ± 0.86	0.77 ± 0.37	**
<i>aca-<math>\beta</math>a</i>	0.56 ± 0.43	0.74 ± 0.15	NS
<i>fasna</i>	0.57 ± 0.29	0.71 ± 0.29	NS
<b>Beta oxidation</b>			
<i>hadh</i>	0.89 ± 0.58	0.67 ± 0.63	NS
<i>acox1a</i>	0.61 ± 0.23	0.65 ± 0.24	NS
<i>acox3</i>	1.38 ± 0.88	0.45 ± 0.83	NS

**Tableau 11** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de tissus adipeux de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes high-starch ou low-starch, 6 heures après le dernier repas. Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA une voie. n = 12

Dans le cadre de l'étude de l'effet du régime « high-starch » sur les paramètres métaboliques de la truite, les expressions de différents gènes impliqués dans le transport de glucose, la glycolyse, et la bêta oxydation ont été mesurées dans le muscle blanc (**Tableau 10**). Alors que dans le foie, le changement du ratio glucides / protéines affecte significativement les expressions relatives de différents gènes de la glycolyse et la bêta oxydation (tableau 5 de l'article), aucun effet n'est observé sur les 16 gènes testés dans le muscle. Ces résultats sont différents de ce qui a déjà été mesuré chez la truite nourrie avec 20% de glucides et des farines et huiles de poisson. En effet, il est alors observé une plus forte régulation de l'expression des gènes *pfkmab*, *pfkmba*, *pfkmbb*, *pkmba*, *pkmba*, et *pkmbb* (Song et al., 2018b). La voie de la glycolyse dans les muscles ne semble pas être activée par 20 % de glucides alimentaires, quand les truites sont nourries avec un régime 100% végétal.

L'étude de l'expression relative de différents gènes impliqués dans le transport du glucose et les voies métaboliques de la glycolyse, la lipogenèse, et la bêta oxydation dans le tissu adipeux périviscéral a été réalisée (**Tableau 11**). À l'exception du gène *acly*, dont l'expression est plus haute avec le régime high-starch, aucun effet significatif dans les échantillons de tissus adipeux entre les régimes. L'utilisation d'un fort ratio glucides / protéines ne semble pas affecter significativement les tissus adipeux lorsqu'il est associé à un régime 100 % végétal.



### 3.3. Résumé du deuxième article :

**« Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant-based diet ». *Journal of animal Science and Biotechnology* (En révision).**

#### Objectif :

L'objectif de ce second article est d'améliorer l'utilisation de l'aliment « high-starch » (HS) - utilisé lors de la première expérimentation chez la truite - avec le prébiotique inuline (*functional feed additive*). En effet, l'inuline est un glucide non-digestible par l'hôte, mais pouvant libérer des métabolites bactériens bénéfiques pour l'organisme après fermentation par le microbiote intestinal. Ces métabolites (acides gras à chaîne courte), procurent de l'énergie à l'hôte (1), peuvent stimuler le métabolisme glucidique (2), réduire la lipogenèse (3), mais aussi présenter un rôle anti-inflammatoire (4) local (intestin), ou systémique. L'utilisation de ce prébiotique est intéressante chez la truite nourrie avec glucides car elle pourrait améliorer la croissance des poissons (1), stimuler la voie de la glycolyse utile pour l'utilisation de l'énergie d'origine glucidique (2), limiter l'engraissement (3), et enfin inhiber l'inflammation intestinale causée par l'ingestion de facteurs antinutritionnels (4).

#### Plan expérimental :

Dans le cadre de cette seconde étude, quatre régimes alimentaires 100 % végétaux ont été formulés. Les régimes HS correspondent à un fort ratio glucides / protéines, avec 19 % de glucides et 43 % de protéines. Les régimes low-starch (LS) correspondent à un faible ratio glucides / protéines avec 2 % de glucides et 53 % de protéines. Deux régimes présentent 2 % d'inuline (HS-In ; LS-In) ; et deux régimes sans ajout d'inuline (HS-0 ; LS-0) ont été formulés. Ces régimes alimentaires ont été donnés à 81 truites arc-en-ciel femelles d'environ 32 g, pendant 12 semaines (27 truites par bac, 3 bacs par groupe). Durant la période d'étude, les paramètres zootechniques sont mesurés. À la fin de la période d'expérimentation, et 6 heures après le dernier repas, les contenus intestinaux de l'intestin proximal sont prélevés pour l'étude du microbiote intestinal. Pour comprendre comment ces aliments affectent le métabolisme (expression de gènes et activités enzymatiques) et l'immunité de l'hôte, des prélèvements sont réalisés sur les tissus intestinaux des intestins proximaux et distaux, ainsi que sur le foie, le muscle, les tissus adipeux et le plasma. Quatre poissons par bac, soit douze poissons par groupe, sont étudiés.



### Résultats et conclusion :

À l'issue de la période d'expérimentation, de manière inattendue, une diminution significative des performances de croissance des truites nourries avec les régimes contenant 2 % d'inuline (HS-In, et LS-In) a été observée par rapport aux poissons nourris avec les régimes HS-0, et LS-0. Cependant, confirmant notre première expérience, le fort ratio glucides / protéines (régime HS) n'a pas entraîné de diminution du poids des poissons, et l'étude des métabolites plasmatiques n'a pas mis en évidence d'hyperglycémie post-prandiale chez les groupes HS. L'inuline n'a pas eu d'effet sur les paramètres plasmatiques et hépatiques. Concernant le microbiote intestinal, le rapport glucides / protéines élevé est associé à une modification significative du microbiote intestinal, avec une modification de l'abondance relative des principaux phyla bactériens (*Proteobacteria*, et *Firmicutes*). Par ailleurs, alors que le fort ratio glucides / protéines a induit une plus grande abondance de bactéries lactiques (*Streptococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, etc.), mais aussi une plus grande production d'acides gras à chaîne courte (butyrate), l'inuline n'a pas entraîné de modification majeure des abondances bactériennes (que cela soit au niveau du phylum et/ou des genres bactériens) et de la production de métabolites bactériens. En revanche, alors que les glucides ont modifié comme attendu le métabolisme du glucose, l'incorporation d'inuline a entraîné une diminution significative des activités enzymatiques hépatiques de la glucokinase et de la pyruvate kinase pour des raisons inconnues. Enfin, dans le but de mesurer l'effet de ces 4 aliments sur la santé des poissons, plusieurs marqueurs inflammatoires ont été étudiés dans cette étude. Une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires (*il-1 $\beta$* , *il-8*, *tnf $\alpha$* ) dans le foie des poissons nourris avec les régimes HS et une diminution significative de la quantité d'oxyde nitrique dans le plasma (l'oxyde nitrique induit l'angiogenèse, ce qui permet le passage de cellules immunitaires) ont été observées. Ces résultats pourraient être expliqués par la possible réduction de la quantité de facteurs antinutritionnels retrouvée dans les régimes HS (liés à la baisse de l'apport en protéines végétales). Pour finir, toujours de manière surprenante, l'inuline ne semble pas avoir eu d'effet bénéfique sur les marqueurs inflammatoires étudiés.





**Conclusion du deuxième article :**

L'utilisation d'inuline à hauteur de 2 % n'a pas permis d'améliorer l'utilisation du régime HS chez la truite arc-en-ciel, comme le montrent les performances de croissance. De plus, l'inuline n'a pas affecté significativement le microbiote intestinal, et n'a pas permis d'augmenter la production de molécules clés du dialogue microbiote-hôte (c'est à dire les SCFAs). Enfin, l'inuline n'a pas induit de stimulation de métabolisme de l'hôte (en particulier glycolyse), et n'a pas affecté positivement les marqueurs inflammatoires étudiés. En conclusion, l'association de ce glucide non digestible (prébiotique) avec un régime HS, 100 % végétal ne semble pas être une approche prometteuse.

D'autre part, une bonne reproductibilité des résultats observés lors de la première étude a été obtenue, tant au niveau du microbiote intestinal que du métabolisme en ce qui concerne le ratio glucides / protéines, confortant l'approche du remplacement partiel des protéines (végétales) par des glucides digestibles dans un régime 100 % végétal.



## Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant-based diet

Raphaël Defaix <sup>a, †</sup>, Jep Lokesh <sup>a, †</sup>, Laura Frohn <sup>a</sup>, Mickael Le Behec <sup>b</sup>, Thierry Pigot <sup>b</sup>, Vincent Véron <sup>a</sup>, Anne Surget <sup>a</sup>, Sandra Biasutti <sup>c</sup>, Frédéric Terrier <sup>a</sup>, Sandrine Skiba-Cassy <sup>a</sup>, Jérôme Roy <sup>a</sup>, Stéphane Panserat <sup>a</sup>, Karine Ricaud <sup>a\*</sup>

[raphael.defaix@inrae.fr](mailto:raphael.defaix@inrae.fr) ; [lokesh.jep@inrae.fr](mailto:lokesh.jep@inrae.fr) ; [laura.frohn@inrae.fr](mailto:laura.frohn@inrae.fr) ; [mickael.lebehec@univ-pau.fr](mailto:mickael.lebehec@univ-pau.fr) ; [thierry.pigot@univ-pau.fr](mailto:thierry.pigot@univ-pau.fr) ; [vincent.veron@inrae.fr](mailto:vincent.veron@inrae.fr) ; [anne.surget@inrae.fr](mailto:anne.surget@inrae.fr) ; [sandra.biasutti@univ-pau.fr](mailto:sandra.biasutti@univ-pau.fr) ; [frederic.terrier@inrae.fr](mailto:frederic.terrier@inrae.fr) ; [sandrine.skiba@inrae.fr](mailto:sandrine.skiba@inrae.fr) ; [jerome.roy@inrae.fr](mailto:jerome.roy@inrae.fr) ; [stephane.panserat@inrae.fr](mailto:stephane.panserat@inrae.fr) ; [karine.brugirardricaud@univ-pau.fr](mailto:karine.brugirardricaud@univ-pau.fr)

<sup>a</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>b</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IMT Mines Ales, IPREM Pau, France

<sup>c</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, IUT des Pays de l'Adour, Département Génie Biologique, rue du ruisseau 40004 Mont de Marsan, France

\* Corresponding author: Karine Ricaud: [karine.brugirardricaud@univ-pau.fr](mailto:karine.brugirardricaud@univ-pau.fr)

† These authors contributed equally to this work.

## **Abstract**

**Background:** High dietary carbohydrates can spare protein in rainbow trout but may affect growth and health. Inulin, a prebiotic, could have nutritional and metabolic effects, along with anti-inflammatory properties in teleosts, improving growth and welfare. We tested this hypothesis in rainbow trout by feeding them a 100% plant-based diet, which is a viable alternative to fishmeal and fish oil in aquaculture feeds. In a two-factorial design, we examined the impact of inulin (2%) as well as the variation in the CHO/plant protein ratio on rainbow trout. We assessed the influence of these factors on zootechnical parameters, plasmatic metabolites, gut microbiota, production of Short-Chain Fatty Acid and lactic acid, as well as the expression of free-fatty acid receptors genes in the mid-intestine, intermediary liver metabolism, and immune markers.

**Results:** The use of 2% inulin did not change significantly the fish intestinal microbiota, while interestingly, the high CHO/Protein ratio group shows modification of intestinal microbiota and in particular the beta diversity, with 21 bacterial genera affected, including *Ralstonia*, *Bacillus*, and 11 lactic-acid producing bacteria. There were higher levels of butyric, and valeric acid in groups fed with high CHO/protein diet but not with inulin. The high CHO/Protein group shows a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines (*il1b*, *il8*, *tnfa*) in liver and a lower expression of the genes coding for tight-junction proteins in mid-intestine (*tjp1a*, *tjp3*). However, the 2% inulin did not modify the expression of plasma immune markers. Finally, inulin induced a negative effect on rainbow trout growth performance irrespective of the dietary carbohydrates.

**Conclusions:** with a 100% plant-based diet, inclusion of high levels of carbohydrates could be a promising way for fish nutrition in aquaculture through a protein sparing effect whereas the supplementation of inulin in combination with such alternative diets needs further investigations.

**Keywords:** rainbow trout, gut microbiota, intermediary metabolism, inulin, prebiotic, aquaculture, fish nutrition, immune markers, SCFA

## Background

The production of fish meal and fish oil for aquaculture requires more than 20 million tons of wild caught fish every year (FAO, 2022). Beyond causing a disastrous environmental impact, this scale of industrial fishing leads to a decline of fish stocks in the oceans. Additionally, the price of fishmeal and fish oil (FM/FO) are on a rise and expected to increase further until 2030 due to the growing aquaculture sector (FAO, 2022). To overcome these sustainability issues, aquafeeds made from 100% plant-based ingredients are being researched as an alternative to FM/FO (Desai et al., 2012; Lokesh et al., 2023, 2022). In fact, this alternative allows ecological and economic benefits since the ingredients are cheaper, more sustainable, and more available than marine ingredients. However, the 100% plant-based diet lead to a decrease in the growth rates in carnivorous fish such as rainbow trout (Véron et al., 2016). In a recent study, we replaced a part of the plant-proteins by 20% of digestible starch (Raphael Defaix et al., 2023) . We showed for the first time that using digestible starch in trout in combination with a 100% plant-based diet did not induce metabolic complications, i.e. no post-prandial hyperglycemia, and no glycogen and lipid accumulation in the liver, suggesting an efficient metabolic adaptation of rainbow trout to 20% of starch. In addition, we observed, a shift in the abundance of intestinal microbes such as the *Ralstonia* and *Bacillus*, accompanied by a higher production of short-chain fatty acids and lactate which are key molecules in the microbiota-host cross-talk (Perler et al., 2023). Among the many critical factors in fish nutrition and feed efficiency, the intestinal microbiome plays an important role in several important functions such as energy production, nutrient metabolism, fermentation of dietary non-digestible components and immunity (Butt and Volkoff, 2019; Egerton et al., 2018; Ze et al., 2012).

Prebiotics such as inulin, are known to modulate different metabolic and immune processes in mammals through direct or indirect actions on microbiota (Tawfick et al., 2022). This non-digestible polysaccharide is fermented by intestinal microbes resulting in the production of various metabolites, mainly short chain fatty acids (SCFA) (LeBlanc et al., 2017; Morrison and Preston, 2016). The SCFA molecules serve as an energy source for the epithelial cells (Bergman, 1990), and led to the activation of the free fatty acid receptors (*ffar*). SCFA are also transported to the liver *via* the portal vein and are involved in different

metabolic pathways: *de novo* lipogenesis, cholesterologenesis, fat storage (Demigné et al., 1995; Nishina and Freedland, 1990) as well as glucose homeostasis through regulation of gluconeogenic genes (De Vadder et al., 2014; Soty et al., 2015). Furthermore, SCFA play an important role in regulating the integrity of the epithelial barrier of the intestinal mucosa, (Patrice D Cani et al., 2008) and have anti-inflammatory functions (Lührs et al., 2009; Nastasi et al., 2015). Inulin is extensively used in aquaculture for its beneficial effects. Inulin is known to improve the growth performance of fish (Ibrahim et al., 2010; Ringø et al., 2010; Rohani et al., 2022; Tiengtam et al., 2015) and known to be associated with a higher activity of intestinal digestive enzymes such as protease, amylase and lipase leading to a better availability of the nutrients for the host and for the microbiota (Anguiano et al., 2013; Soleimani et al., 2012). Additionally, the use of inulin is known to induce a shift in the diversity of microbes such as lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Weissella*) and *Bacillus* species (Hoseinifar et al., 2011; Lokesh et al., 2022). This modulation of microbiota through the use of prebiotics can induce the proliferation of beneficial intestinal bacteria that stimulate immune response and restrict the proliferation of pathogenic bacteria (Ortiz et al., 2013; Soleimani et al., 2012; Syed Raffic Ali et al., 2018; Tiengtam et al., 2015).

It has been shown that the use of inulin in the diet reduces the metabolic disorder induced by a high carbohydrate (CHO) diet in Nile tilapia through modification of the expression of genes involved in metabolic and immune pathways (T. Wang et al., 2021), suggesting a better use of high level of dietary carbohydrates. The use of inulin in combination with a 100% plant-based diet (without carbohydrate supplementation) has also been tested in juvenile rainbow trout (Lokesh et al., 2023, 2022). These studies showed that the use of 2% inulin resulted in higher expression of several genes involved in different metabolic pathways (i.e. gluconeogenesis and glycolysis) and the higher expression of fatty acid receptor (*ffar*) genes in liver, indicating the possible interaction between the liver and the SCFA metabolites. Moreover, in the prebiotics-fed groups, differential abundances of *Lactobacillus* and *Bacillus* were observed which possibly indicates a “prebiotics-microbiome-host axis”. Together, these studies showed that inulin could be a promising ingredient to be incorporated in a high-CHO, 100% plant-based diet.

In this study, in a 2-factorial design, we investigated the effect of dietary digestible starch (CHO/Protein ratio) and inulin on the growth performance, host metabolism (gene expression in liver and intestine), intestinal inflammation and intestinal microbiome of rainbow trout fed a 100% plant-based diet. In addition, microbially derived metabolites such as SCFA were measured as these are known to be key intermediary molecules between the gut microbiome and the host.

## **Methods**

### **Ethical approval**

The feeding experiment was conducted in accordance with the guidelines laid down by French and European legislation for the use and care of laboratory animals (Decree no. 2013-36, February 1st 2013 and Directive 2010/63/EU, respectively). The fish handling protocols and the sampling procedures were described by the INRAE ethics committee (INRAE, 2002-36, April 14, 2002). The INRAE experimental station (Donzacq, Landes, France) is certified for animal experiments under the license number A40-228.1 by the French veterinary service, which is a competent authority.

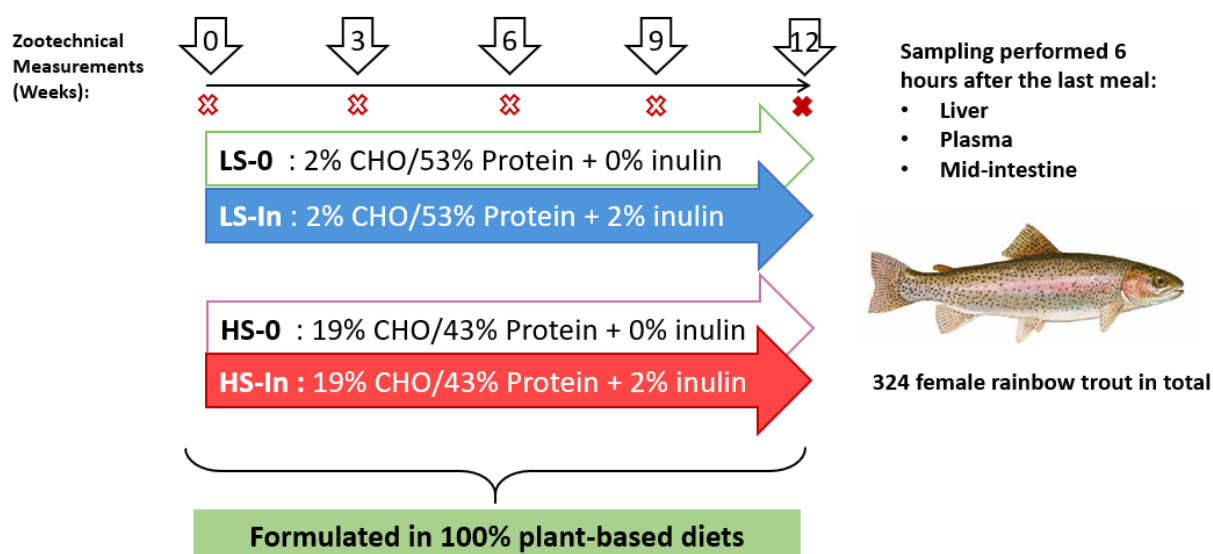
### **Diet and experimental setup**

Four experimental 100% plant-based diets were formulated for in this study. The high-starch (HS) diets contained a high carbohydrate to protein ratio, with 19% digestible CHO and 43% protein. The low-starch (LS) diet contained a low CHO to protein ratio, with 2% of digestible CHO and 53% protein. The diets with inulin were incorporated with 2% inulin while the diet without inulin had 2% cellulose supplementation, resulting in four experimental diets: LS-0, LS-In, HS-0, and HS-In (Table 1). These diets were isolipidic ( $21.43\% \pm 1.08$  crude fat (%DM)) and isoenergetic ( $24.76 \pm 0.39$  KJ. g<sup>-1</sup> dry matter). The diets were extruded as pellets and were fed to fish manually twice a day (with an interval of 8h) during 12 weeks. Three tanks (130 L) per group were used, each one containing 27 juvenile female rainbow trout (Initial weight:  $31.80 \pm 0.11$  g). During the experimental period, the fish were kept under standard rearing conditions with constant water temperature (17°C, pH 7.5), constant water flow (0.3 L/s), and oxygen levels (9 mg/L). The fish mortality was checked (if any) every day, and the tanks were weighted every 3 weeks to evaluate the growth and zootechnical parameters (Figure 1).



**Table 1:** Formulation and proximate composition of four experimental diets.

	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In
<b>Ingredients (%)</b>				
Wheat gluten	15	15	20	20
gelatinized wheat starch	-	-	15	15
Whole wheat	-	-	4,86	4,86
Lysamine pea protein concentrate	16	16	20	20
Soybean meal	15	15	-	-
Soybean protein concentrate	12	12	-	-
Corn gluten	7,24	7,24	5,44	5,44
Faba Protein Concentrate	-	-	5	5
Lupin flour	4,53	4,53	-	-
inulin	0	2	0	2
Cellulose	2	0	2	0
Rapeseed oil	10,74	10,74	11,91	11,91
Linseed Oil	6	6	5,29	5,29
Palm oil	2	2	2	2
Dicalcium Phosphate	2	2	2	2
L-Lysine	1	1	0,5	0,5
L-Methionine	1	1	0,5	0,5
Soy Lecithin powder	2,5	2,5	2,5	2,5
Premix Vitamins	1,5	1,5	1,5	1,5
Premix minerals	1,5	1,49	1,5	1,5
<b>Proximate composition (%)</b>				
Dry Mass (DM)	96,98	96,17	96,32	95,69
Starch (% DM)	2,57	2,41	19,22	19,32
Proteins (% DM)	53,31	53,72	43,67	43,62
Lipids (% DM)	23,06	22,49	22,74	23,15
Energy (KJ g-1 DM)	25,14	25,10	24,40	24,39
Ash (% DM)	5,86	5,98	4,99	5,00



**Figure 1:** Experimental design of the feeding trial. Four experimental diets were produced as extruded pellets. These diets were made of 100% plant raw material and contained either 19% of digestible starch

(high-starch diet) or 2% digestible starch (low-starch diet) and with 2% of inulin or 0% of inulin were produced as extruded pellets. The fish were fed the experimental diets by hand, twice a day, during 12 weeks to 324 females rainbow trout (~31g) distributed in 12 tanks (3 tanks per group). The trout were weighed every 3 weeks to record the zootechnical parameters (n=3 tank per experimental diet).

### **Sampling**

At the end of the 12 weeks rearing, 12 fish per group (4 fish per tank) were sampled randomly, 6 hours after the last meal. The fish were anaesthetized with benzocaine (50 mg/L) and euthanized by a benzocaine overdose (150 mg/L). Plasma, liver, and mid intestinal tissues were sampled from these fish and immediately frozen in liquid nitrogen. For microbiota analysis, the digestive-contents were recovered using sterile glass slide from the mid intestinal section which have been previously described as intestinal part involved in food digestion in rainbow trout (Sergio Polakof et al., 2010). In addition, the mid intestine and distal intestinal tissues were collected for RNA extraction. The digestive contents from two additional fish per tank were sampled for the SCFA measurement.

### **Diets and whole-body composition**

Dry matter was obtained by drying the samples at 105°C for 24h. The weight of the post-dried samples was subtracted from the pre-dried samples. Ash content was measured by incinerating the samples at 550°C for 16h. Protein content was measured by the Kjeldahl™ method (FOSS, Denmark). Lipid content was determined by the Soxtherm method (Gerhardt analytical systems, Königswinter, Germany). Gross energy was measured with an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Heitersheim Gribheimer, Germany). Starch contents was determined using the Megazyme© (Bray, Wicklow, Ireland) total starch assay procedure.

### **Quantification of plasma and liver metabolites**

Blood was sampled for plasma collection from the caudal vein using heparinized syringes and tubes and then was centrifuged at 12,000g at 4°C for 5 min. The plasma samples were stored at -20°C until use. Commercial kits were used to determine the level of different plasma metabolites: glucose (Sobioda,

Montbonnot-Saint-Martin, France), lactate (kit Randox, Cruclin, United Kingdom), triglycerides (Sobioda), and cholesterol (Sobioda). These kits were adapted to 96-well plate format according to the manufacturer's instructions. Liver glycogen were measured using a protocol previously described by Good CA et al. (Good et al., 1933).

## **Microbial composition analysis**

### *DNA extraction*

The DNA extraction was performed on digestive contents from mid intestinal region (about 200mg) using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions. The DNA quality was assessed for purity, and quantified with a microplate spectrophotometer (Epoch2, BioTek, France).

### *Generation of the (V3-V4) 16S rRNA gene sequencing libraries*

From the digestive-contents DNA, the prokaryotic DNA was targeted using specific primers amplifying the V3-V4 region (460 base-pair) of the 16S rRNA gene. The first step PCR was performed using 12.5µL of KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Boulogne-Billancourt, France), 5 µL of 1 µM forward primer (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG -3'), 5 µL of 1 µM reverse primer (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC – 3'), and 2.5µL of the extracted DNA (5 ng/µL). The thermocycling condition included a pre-incubation step of 3 min at 95°C, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30sec, hybridization at 55°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 30 sec, with a final extension step at 72°C for 5 min. Controls, including, *Escherichia coli*, and ultra-pure water were also added to the run. Additionally, DNA extracted from diet samples and water from the tanks were also included in the PCR. Amplification of the PCR products were confirmed using gel electrophoresis. The products were then sent to the genomic platform of Bordeaux (PGTB, Bordeaux, France). Libraries were prepared according to the standard protocol recommended by Illumina (Illumina, CA, USA). Index PCR was used to add the unique dual indexes to the sequences using the Nextera XT index kit according to the manufacturer's recommendation (Illumina). The thermocycling conditions were the same as in step 1, except for PCR that was performed on 8 cycles. After PCR cleaning, libraries were

quantified using the KAPA library quantification kit for Illumina platforms (Roche). Libraries were pooled at an equimolar concentration (4nM) and sequenced on a MiSeq platform using a 250 bp Paired End Sequencing Kit v2 (Illumina).

### *Sequence data analysis*

The FROGS pipeline was used to perform the initial analysis of the sequence data (Escudié et al., 2018). The forward and reverse reads of each sample were merged, the adapter sequences were trimmed, and the sequences with long ambiguous bases (N) were removed (18.74 % sequences withdrawn). After the quality filter steps, the resulting in 12,770,918 sequences, representing 81.26% of the initial input sequences were used for the downstream analysis. To group together amplicons with a maximum of one nucleotide difference between two amplicons, the clustering swarm protocol was used (Mahé et al., 2014), resulting in the creation of 1,081,234 clusters. Clusters having an abundance less than 0.005% and not present in at least 4 samples were removed. This step resulted in 385 clusters. The PhiX database was used to remove the sequences corresponding to chloroplast and mitochondria (Mukherjee et al., 2015). The taxonomic affiliation was made with the silva138.1 pintail 100 16S reference database ("<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>," n.d.). Finally, the samples had an average of  $130,308 \pm 24,495$  sequences (minimum: 38,085; maximum: 194,676 sequences) with 239 OTUs (operational taxonomic units), ranging from 63 to 136 OTUs per sample. Microbiota data were all rarefied to 38,085 sequences/sample.

### **Short-chain fatty acid measurement**

The frozen intestinal content samples were weighed and placed into a 114 mL micro-chamber  $\mu$ CTE250 (Markes international, Llantrisant, UK). The micro-chamber was heated at 100 °C with a flow rate of 60 mL/min<sup>-1</sup> of dry nitrogen. A selected ion flow tube – mass spectrometer (SIFT-MS) was connected through a T connector to the micro-chamber with a sampling flow rate at 20 mL.min<sup>-1</sup>. A Voice 200 Ultra SIFT-MS (SYFT Technologies, Christchurch, New Zealand) generating three positive soft reagent ions (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, O<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO<sup>+</sup>) and with the nitrogen carrier gas (Air Liquid, Alphagaz 2) was used in this study. Full-scan mass spectra were recorded for each positive precursor ion in a range from 15 to 250 with an integration time

of 60 sec and accumulated during 16h. Identification was based on specific ion-molecule reaction patterns of target analytes with the three positive precursor ions described in the literature and in the database from LabSyft software (LabSyft 1.6.2, SYFT Technologies). Product ions from ion-molecule reactions of SCFA are summarized in Figure S1. In SIFT-MS analysis, quantification is straight forward and requires only measurement of the count rate of the precursor ion [R] and product ions [P]. The analyte concentration in the flow tube [A] was determined according to the following formula:

$[A] = \frac{[P]}{t_r k [R]}$  Where  $t_r$  is the reaction time in the flow tube and  $k$  is the apparent reaction rate constant.

### Gene expression analysis

RNA from liver, and mid intestine, were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). One  $\mu\text{g}$  of RNA was converted to cDNA with the superscript III reverse transcriptase enzyme (Invitrogen, Waltham, USA) and random primers (Promega, Madison, WI, USA). After the reverse transcription step, cDNA was diluted 80-fold for liver, and 40-fold for mid intestine, before being used in quantitative real-time (q) PCR. The RT-qPCR were performed in 384 well-plates in a C1000 Touchtm thermal cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using PerfeCTa SYBR green (VWR, Radnor, PA, USA). The total volume of reaction was 6  $\mu\text{L}$ , including 2 $\mu\text{L}$  of diluted cDNA mixed with 0.24  $\mu\text{L}$  each of forward and reverse primer (10  $\mu\text{M}$ ), 0.52  $\mu\text{L}$  of RNase-free water, and 3  $\mu\text{L}$  of SYBR green. Thermocycling conditions included a pre-incubation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15sec, annealing at 60°C for 10sec, and extension at 72°C for 15sec. A Melt curve analysis was performed at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each RT-qPCR included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification), a standard curve in triplicate (a range of dilution of cDNA from a pool of all cDNA samples), and negative controls in duplicate (reverse transcriptase-free samples and RNA-free samples). The relative quantification of gene expression was carried out by the Bio-Rad CFX Maestro software (Version 4.0.2325.0418). Cq (Quantification cycle) values were further converted to relative quantities. Elongation factor 1 alpha (*eef1a*) and *beta*-actin (*actb*) were used as reference for liver and mid intestine, respectively. The mRNA expression of the SCFA

intestinal receptors i.e FFAR receptors were analyzed using the new nomenclature described by Roy et al. (Roy et al., 2023). The list of primers used in the present study are given in Figure S2.

### **Hepatic enzymatic activities**

The activity of the hepatic enzymes including Glucokinase, Pyruvate kinase, Glucose-6-phosphatase, and Fatty acid synthase were analyzed using the protocols described previously (Raphael Defaix et al., 2023).

### **Plasma immune markers**

The lysozyme activity was measured in plasma according to the protocol described by Frohn et al. (Frohn et al., 2023). Total anti-protease activity was determined by assessing the ability of plasma to inhibit trypsin activity as described by Peixoto et al. (Peixoto et al., 2022). Plasma nitric oxide content were assayed with the Nitrite/Nitrate, colorimetric test, following the manufacturer instructions (Roche, Boulogne-Billancourt, France).

### **Statistical analysis**

Zootechnical parameters, including initial and final body weight, specific growth rate, daily feed intake, feed efficiency, and protein efficiency ratio were calculated per tank (n=3). The hepatosomatic index (liver weight\*100/fish weight) were obtained during the final sampling of the trial (n=12 fish per condition/diet). All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using the R software (version 4.0.3) ("R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.," 2018). Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance was tested using Bartlett's test. All data were analyzed using a two-way ANOVA, with CHO/Protein ratio and inulin as factors. Tukey's HSD was used as post hoc test. Results with a *P*-value < 0.05 were considered significant. The interactions between the 2 factors are identified by "CHO/Protein: inulin".

The microbial composition was analyzed using the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). For alpha and beta diversity, data samples were rarified. Beta-diversity was analyzed with the Bray-Curtis distance using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) (Anderson, 2017). The mixOmics package was used to perform a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to

determine the most discriminant OTUs (F. et al., 2017). The rCCA (regularized canonical correlation analysis) function of the same package was used to understand the correlations between the bacterial OTUs and different host parameters.

## **Results**

### **Zootechnical parameters, whole-body composition, and hepatic and plasma metabolites**

Zootechnical parameters obtained after 12 weeks of feeding are summarized in (Table 2). We observed a significant decrease ( $p=0.022$ ) in the final body weight of the group fed with 2% inulin. This was accompanied by a decrease in the specific growth rate ( $p=0.017$ ), and feed efficiency ( $p=0.037$ ). The protein efficiency ratio was positively affected ( $p=1.459e^{-06}$ ) in trout fed with high-starch diets and negatively affected ( $p=0.034$ ) by inulin. Concerning the whole-body composition (Figure S3), no changes were observed between groups for the dry matter (DM, %), ash (% of DM), protein level (% of DM), lipids level (% of DM), and gross energy (KJ/g of DM). Plasma and hepatic parameters are presented in the Table 3. The change in the CHO/protein ratio and the use of 2% inulin did not significantly affect plasma glucose levels ( $p>0.05$ ). In contrast, the triglycerides levels were significantly lower ( $p=0.005$ ) in the high starch groups independently of the factor inulin. In the high-starch groups (HS-0 and HS-In), a higher concentration of plasma lactate ( $p=0.020$ ) and a lower level of the cholesterol was measured ( $p=0.003$ ). Regarding hepatic parameters, there was a significant effect of the factor starch on the hepatosomatic index ( $p= 3.045e-08$ ) with a concomitant increase of glycogen concentration ( $p=7.916e^{-09}$ ).

**Table 2:** Growth performances and feed utilization, in rainbow trout fed the experimental diets

Zootechnical parameters	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
Initial body weight (g)	31.7 ± 0.26	31.9 ± 0.13	31.7 ± 0.19	31.8 ± 0.14			
Final body weight (g)	168.21 ± 4.94	159.33 ± 5.28	170.58 ± 10.10	158.40 ± 3.69	NS	*	NS
Specific growth rate <sup>1</sup> (%/day)	1.98 ± 0.04	1.91 ± 0.04	2.00 ± 0.07	1.91 ± 0.03	NS	*	NS
Daily feed intake <sup>2</sup> (gram/fish/day)	1.57 ± 0.03	1.49 ± 0.04	1.57 ± 0.07	1.53 ± 0.03	NS	NS (p=0.058)	NS
Feed efficiency <sup>3</sup>	1.04 ± 0.02	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.04	0.99 ± 0.01	NS	*	NS
Protein efficiency ratio <sup>4</sup>	2.36 ± 0.04	2.32 ± 0.07	2.95 ± 0.12	2.78 ± 0.02	***	*	NS

Data are presented as mean ± SD (n=3 tanks). Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS, non-significant. <sup>1</sup>Specific growth rate (%/day) = 100x [Ln (final body weight. g)-Ln (initial body weight. g)]/ Experiment duration (days). <sup>2</sup>Daily feed intake (gram/fish/day) = (Total feed consumed. g/Number of fish/Experiment duration (days)). <sup>3</sup>Feed efficiency = (Final biomass. g – Initial biomass. g)/Total feed consumed (g DM). <sup>4</sup>Protein efficiency ratio = (Final biomass – Initial biomass)/ Total protein consumed (g).



**Table 3:** Plasma metabolites, hepatic glycogen contents, and hepato-somatic index in rainbow trout

	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
<b>Plasma parameters</b>							
Glucose (g/L)	1.13 ± 0.19	1.13 ± 0.17	1.26 ± 0.31	1.18 ± 0.20	NS	NS	NS
Triglycerides (g/L)	4.00 ± 0.79	3.91 ± 0.79	3.42 ± 1.00	2.83 ± 0.97	**	NS	NS
Lactate (g/L)	4.04 ± 1.48	3.52 ± 1.61	4.63 ± 1.52	5.14 ± 1.74	*	NS	NS
Cholesterol (g/L)	2.63 ± 0.48	2.34 ± 0.48	1.94 ± 0.68	2.01 ± 0.60	**	NS	NS
<b>Hepatic parameters</b>							
Hepatosomatic index	0.91 ± 0.12	0.90 ± 0.09	1.17 ± 0.10	1.22 ± 0.13	***	NS	NS
Glycogen (mg/g)	23.53 ± 16.32	20.72 ± 13.01	79.72 ± 33.00	71.91 ± 34.84	***	NS	NS

Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . NS, not significant.  $P < 0.05$  \*.  $P < 0.01$  \*\*.  $P < 0.001$  \*\*\*.

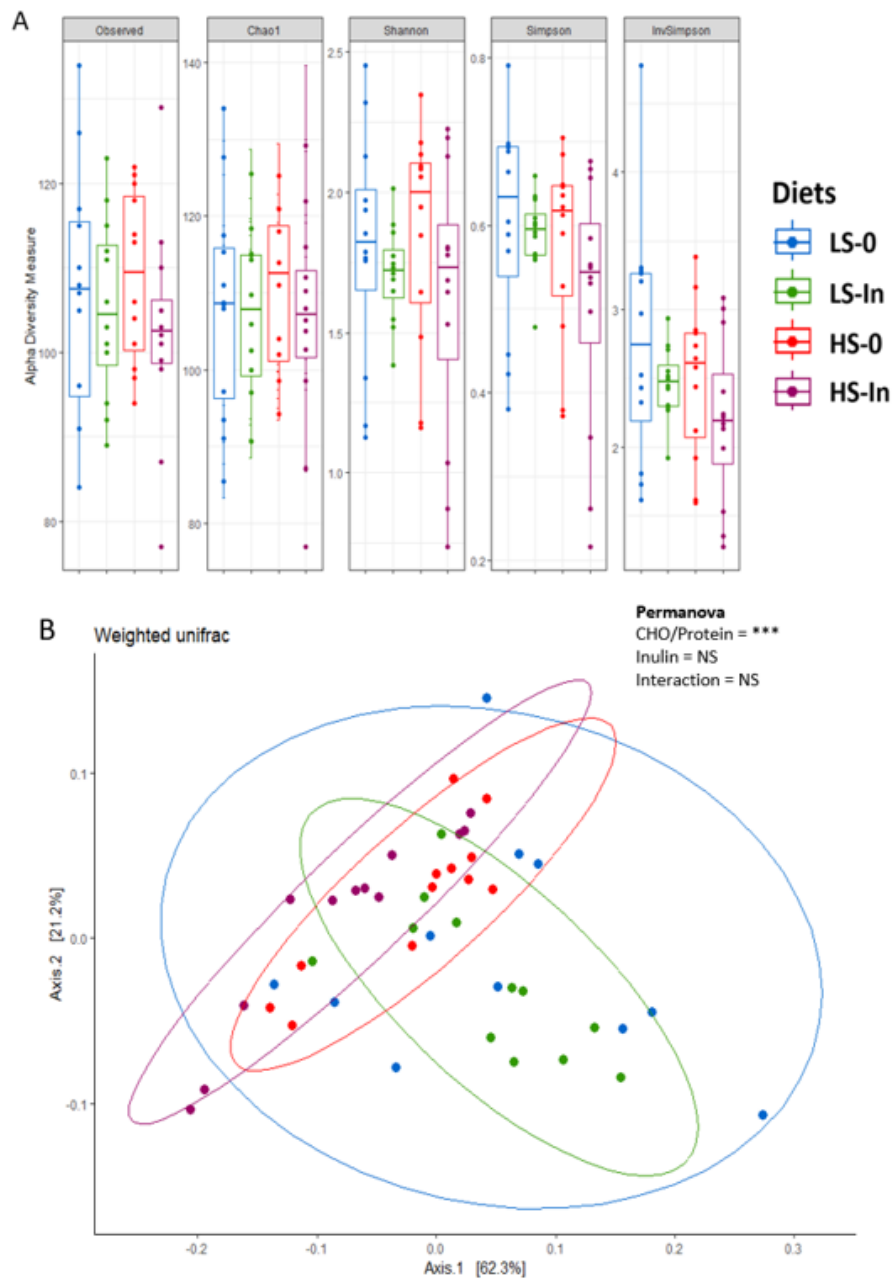
### Microbiota composition in mid intestines

Alpha diversity was not significantly affected by the factors (Figure 2a). Beta diversity was measured using the weighted UniFrac dissimilarity index and visualized using PCOA ordination (Figure 2b). A two-way PERMANOVA showed a significant effect of starch on beta diversity ( $p = 0.003$ ).

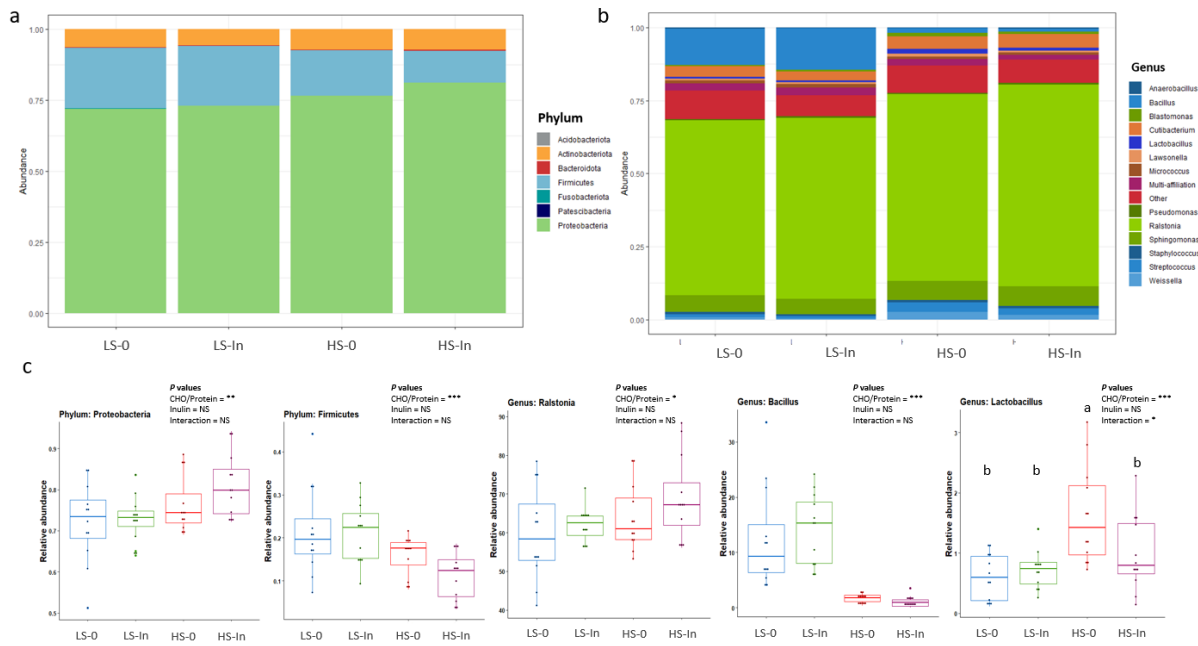
We identified 239 OTUs belonging to 7 phyla (Figure 3a), and 100 genera. The top 13 genera are shown in Figure 3b. *Proteobacteria* (75,64 ± 4,09 %), *Firmicutes* (17.48 ± 4,80 %) and *Actinobacteriota* (6.56 ± 0.82 %) were the most abundant phyla regardless of the experimental group. A significantly lower *Firmicutes/Proteobacteria* ratio ( $p=0.007$ ) (Figure S4) was observed for the high-starch groups due to a significant increase of relative abundance of *Proteobacteria* (+6.27 ± 2.65 %,  $p=0.006$ ) and a significant decrease of the *Firmicutes* proportion (-7.63 ± 3.14 %,  $p=0.001$ ) in the high-starch groups (HS-0 and HS-In) (Figure 3c). At genus level, the most abundant genera in the *Proteobacteria* were the *Ralstonia* genus (63.67 ± 3.91 %) and *Sphingomonas* (6.18 ± 0.70 %) while in *Firmicutes* the most abundant genera were represented by *Bacillus* (7.33 ± 6.94 %), *Streptococcus* (1.83 ± 0.78 %), *Weissella* (1.37 ± 0.79 %),

*Enterococcus* ( $1.02 \pm 0.55$  %), and *Lactobacillus* ( $0.99 \pm 0.53$  %). Twenty-three genera were significantly affected either by the CHO/protein ratio or inulin (Table 4). The relative abundance of 15 bacterial genera were significantly increased by the factor CHO/Protein ratio: *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Cutibacterium*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Blastomonas*, *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Kocuria*, *Leuconostoc*, *Lacticaseibacillus*, *Brochothrix*, *Abiotrophia*, *Atopobium*, and *Kytococcus*. Among them, 9 genera belonging to the Lactic-Acid Bacteria (LAB) were increased by the high-starch diet. While 5 genera were decreased by the factor starch: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Floricoccus*, *Aneurinibacillus*, including 2 LAB. Finally, only 4 genera were affected by inulin, 3 of them shown lower proportion: *Streptococcus*, *Weissella*, and *Peptoniphilus* while higher proportion of *Porphyrobacter* were observed. Finally, CHO/Protein: inulin interaction was found for *Lactobacillus* genus: the use of 2% inulin led to an increase of the proportion in the low-starch groups (LS-0, LS-In), and a decrease of the proportion in high-starch groups (Figure 3c).

In order to evaluate whether some bacterial taxa could distinguish between the HS and LS groups (independently of the use of inulin) a PLS-DA was performed (Figure 4a). The change in the CHO to protein ratio induced a clear separation of the bacterial communities. Therefore, the top 15 contributing OTUs were identified (Figure 4b). The most discriminant OTUs within high-starch group were *Streptococcus lutetiensis* (OTU 10, 205, 462), *Weissella cibaria* (OTU 307, 167, 12), *Lactobacillus mucosae* (OTU 74), and *Lactobacillus sp.* (OTU 50). In contrast, in the low-starch group, *Bacillus cytotoxicus* (OTU 93, 6, 634), *Enterococcus cecorum* (OTU 22, 605), *Floricoccus penangensis* (OTU 51), and *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (OTU 201) were the most discriminant.



**Figure 2:** Bacterial alpha diversity represented in terms of observed OTUs, Chao1, Shannon, Simpson, InvSimpson, in the mid-intestinal section of rainbow trout after 12 weeks of feeding. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin **(a)**. Beta diversity is presented by a PCOA representation (Bray-Curtis distance, Weighted-Unifrac analysis) in mid intestine section, according to the experimental diets **(b)**. Beta diversity was compared using a pairwise PERMANOVA test and data were considered statistically different for  $p < 0.05$ .  $n = 12$  fish per group.

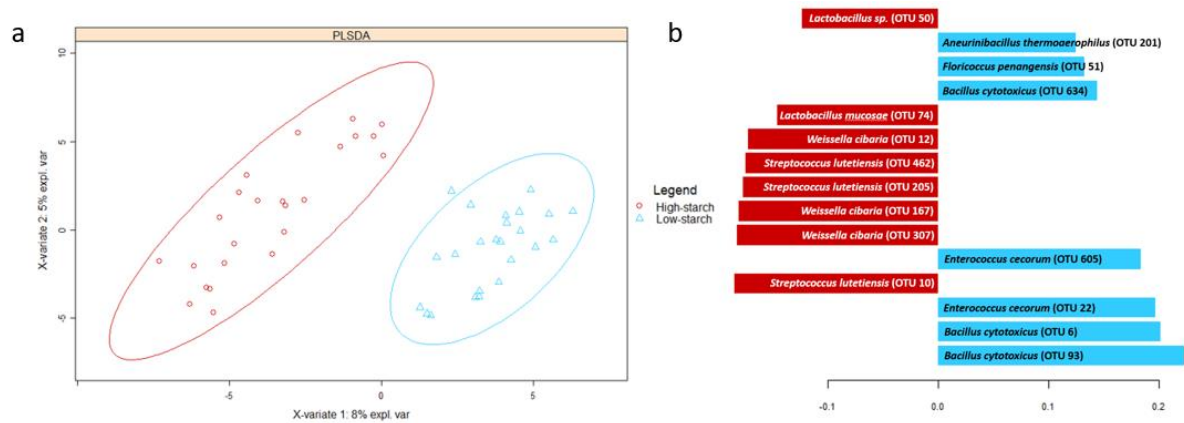


**Figure 3:** Microbial composition in the mid-intestinal section at phylum (a) and genus (b) levels after 12 weeks of feeding. In panel b, only the top 15 abundant genera are presented. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin. On panel c the relative abundance of the *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla and the relative abundances of the *Ralstonia*, *Bacillus*, and *Lactobacillus* genus are indicated. Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$  fish per group.

**Table 4:** Abundances of different genera significantly affected by experimental diets

Genera (%)	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
<i>Ralstonia</i>	59.74 ± 12.13	62.11 ± 4.40	63.88 ± 8.55	68.96 ± 10.82	*	NS	NS
<i>Bacillus</i>	12.45 ± 9.21	14.16 ± 6.40	1.66 ± 0.82	1.05 ± 1.02	***	NS	NS
<i>Sphingomonas</i>	5.78 ± 2.16	5.43 ± 1.61	6.53 ± 1.41	6.97 ± 2.22	*	NS	NS
<i>Cutibacterium</i>	3.77 ± 1.45	3.09 ± 1.18	4.29 ± 1.71	4.65 ± 1.96	*	NS	NS
<i>Streptococcus (LAB)</i>	1.09 ± 0.46	0.76 ± 0.31	3.15 ± 1.06	2.33 ± 1.29	***	*	NS
<i>Weissella (LAB)</i>	0.76 ± 0.68	0.44 ± 0.20	2.65 ± 1.14	1.64 ± 1.12	***	*	NS
<i>Enterococcus (LAB)</i>	1.52 ± 0.96	1.69 ± 0.68	0.49 ± 0.19	0.39 ± 0.35	***	NS	NS
<i>Lactobacillus (LAB)</i>	0.62 ± 0.38 <b>b</b>	0.72 ± 0.31 <b>b</b>	1.62 ± 0.81 <b>a</b>	0.99 ± 0.62 <b>b</b>	***	NS	*
<i>Blastomonas</i>	0.59 ± 0.18	0.51 ± 0.29	1.07 ± 0.56	0.79 ± 0.28	***	NS	NS
<i>Limosilactobacillus (LAB)</i>	0.43 ± 0.25	0.37 ± 0.25	0.72 ± 0.41	0.7 ± 0.49	**	NS	NS
<i>Ligilactobacillus (LAB)</i>	0.26 ± 0.31	0.22 ± 0.27	0.52 ± 0.55	0.51 ± 0.58	*	NS	NS
<i>Kocuria</i>	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.15	0.27 ± 0.2	0.31 ± 0.23	*	NS	NS
<i>Lactococcus (LAB)</i>	0.19 ± 0.14	0.22 ± 0.17	0.11 ± 0.20	0.03 ± 0.06	**	NS	NS
<i>Leuconostoc (LAB)</i>	0.08 ± 0.13	0.03 ± 0.05	0.21 ± 0.24	0.12 ± 0.14	*	NS	NS
<i>Floricoccus</i>	0.11 ± 0.11	0.20 ± 0.10	0.06 ± 0.10	0.03 ± 0.11	***	NS	NS
<i>Porphyrobacter</i>	0.04 ± 0.05	0.09 ± 0.07	0.08 ± 0.11	0.13 ± 0.09	NS	*	NS
<i>Peptoniphilus</i>	0.17 ± 0.23	0.05 ± 0.07	0.09 ± 0.11	0.02 ± 0.04	NS	*	NS
<i>Lacticaseibacillus (LAB)</i>	0 ± 0	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.05	0.03 ± 0.05	*	NS	NS
<i>Brochothrix (LAB)</i>	0 ± 0	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.05	*	NS	NS
<i>Aneurinibacillus</i>	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.06	0 ± 0	0 ± 0	**	NS	NS
<i>Abiotrophia (LAB)</i>	0.01 ± 0.01	0 ± 0	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.03	*	NS	NS
<i>Atopobium</i>	0.01 ± 0.01	0 ± 0	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.05	*	NS	NS
<i>Kytococcus</i>	0 ± 0	0 ± 0	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04	*	NS	NS

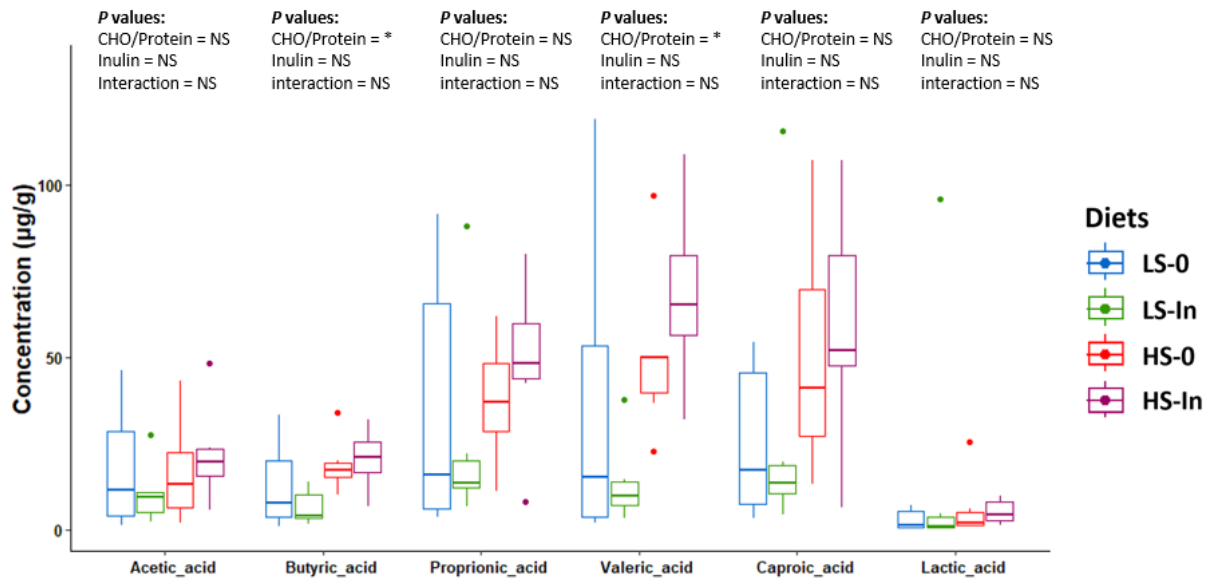
Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS not significant. P<0.05 \*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*.



**Figure 4:** PLS-DA analysis for fish fed the high-starch and low-starch diets (independently of inulin) based on OTU abundance (a). Each red points or blue triangles represent a sample. Samples can be discriminated according to experimental group on component 1. Contribution level of the top 15 OTUs are presented (b). Red bars correspond to the high-starch group and blue bars to the low-starch group. n=12 fish per group.

#### Short-chain fatty acids in mid intestines digestive contents

Short-chain fatty acid and Lactic acid concentration were measured in the digestive-contents (Figure 5). A significant increase of butyric acid ( $p=0.014$ ), and valeric acid ( $p=0.011$ ) were detected in the high-starch groups while no significant differences were detected for acetic, propionic, and caproic acids, as well as the lactic acid.



**Figure 5:** Levels of acetic acid, butyric acid, propionic acid, valeric acid, caproic acid as well as lactic acid were measured ( $\mu\text{g}$ ) relative to the mass of the mid-intestinal digestive contents (g) with SIFT-MS mass spectrometry. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin. Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by an asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 6$  fish per group.

### Expression of genes involved in liver metabolism

We investigated the expression of several genes implicated in glycolysis, gluconeogenesis, lipogenesis, and cholesterol biosynthesis in liver (Table 5) and SCFA uptake in intestine (Table 6).

**Liver:** A two-way ANOVA revealed that there was a significant interaction (CHO/Protein: inulin) effect on the expression of *glut2b*, a gene involved in glucose transport. The mRNA levels of genes implicated in the first (*gcka*, *gckb*), the third (*pfkla*, *pfklb*) and last (*pk*) glycolysis steps were measured. Glucokinase paralogue *gcka* expression was significantly higher ( $p = 7.42e^{-08}$ ) in high starch groups while a significant interaction effect was observed for the expression of the second paralogue *gckb* ( $p = 1.06e^{-09}$ ). We also detected an interaction effect on the *pfkla*, *pfklb* gene expression and *pk* expression involved in glycolysis. These interactions showed an up-regulation of these genes with 2% inulin in the low-starch groups and a down-regulation in high-starch groups. Regarding the gluconeogenesis pathway, the expression of *pck1*

( $p=0.04$ ) and *fbp1b1* ( $p=0.0024$ ) genes were significantly down-regulated in the two high-starch groups (HS-0, HS-In). A significant interaction was detected for both *fbp1b1* and *g6pcb2a* genes. This interaction showed a higher expression in the low-starch groups with 2% inulin and a lower expression in the high-starch groups with 2% inulin. Finally, only the *fbp1a* gene was significantly affected by inulin. Regarding lipogenesis pathway, significant interactions were detected for mRNA levels of *serbf1* ( $p=4.50e^{-04}$ ), *aclyb* ( $p=1.2e^{-03}$ ), and *aclyc* ( $p=3.2e^{-04}$ ). These genes were indeed up-regulated with 2% inulin in the low-starch and down-regulated in the high-starch groups. High CHO/protein levels induced a significant decrease of the *aca-ba* gene expression. Several genes involved in cholesterol biosynthesis, including *srepb2b*, *hmgcrb*, *dhcr7a* were studied. Systematically, the high CHO/protein level led systematically to a down-regulation of these genes.



**Table 5:** mRNA levels of genes involved in different metabolic pathways in liver

Liver gene expression	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values			
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction	
Glucose transport	<i>glut2a</i>	0.75 ± 0.46	1.11 ± 0.50	1.16 ± 1.13	0.70 ± 0.63	NS	NS	NS
	<i>glut2b</i>	0.79 ± 0.71 <b>b</b>	2.12 ± 1.67 <b>a</b>	1.13 ± 0.65 <b>ab</b>	0.82 ± 0.86 <b>b</b>	NS	NS	**
Glycolysis	<i>gcka</i>	0.24 ± 0.35	2.59 ± 4.09	17.89 ± 8.13	12.07 ± 10.43	***	NS	NS
	<i>gckb</i>	0.27 ± 0.58 <b>c</b>	1.53 ± 1.34 <b>bc</b>	15.03 ± 7.15 <b>a</b>	5.58 ± 3.86 <b>b</b>	***	**	***
	<i>pfkla</i>	1.03 ± 1.05 <b>b</b>	2.71 ± 2.30 <b>a</b>	1.13 ± 0.62 <b>b</b>	0.73 ± 0.72 <b>b</b>	*	NS	*
	<i>pfklb</i>	0.97 ± 0.81 <b>b</b>	2.43 ± 2.15 <b>a</b>	1.33 ± 0.75 <b>ab</b>	0.84 ± 0.85 <b>b</b>	NS	NS	*
	<i>pk</i>	0.93 ± 0.81 <b>b</b>	2.23 ± 1.56 <b>a</b>	1.05 ± 0.74 <b>b</b>	0.67 ± 0.55 <b>b</b>	*	NS	**
Gluconeogenesis	<i>pck1</i>	1.85 ± 1.62	2.26 ± 2.42	0.98 ± 1.26	0.94 ± 1.38	*	NS	NS
	<i>pck2</i>	1.26 ± 1.31	2.09 ± 2.22	1.44 ± 0.80	0.96 ± 1.32	NS	NS	NS
	<i>fbp1a</i>	0.59 ± 0.52	1.72 ± 1.44	0.76 ± 0.81	1.13 ± 1.48	NS	*	NS
	<i>fbp1b1</i>	1.11 ± 1.21 <b>ab</b>	2.32 ± 1.68 <b>a</b>	0.76 ± 0.45 <b>b</b>	0.59 ± 0.68 <b>b</b>	**	NS	*
	<i>fbp1b2</i>	1.35 ± 1.71	1.97 ± 1.47	1.01 ± 0.76	0.46 ± 0.38	*	NS	NS
	<i>g6pca</i>	1.07 ± 1.18	2.45 ± 2.01	1.20 ± 0.83	1.01 ± 1.10	NS	NS	NS
	<i>g6pcb1b</i>	1.09 ± 0.70	1.31 ± 1.28	1.28 ± 1.00	1.32 ± 1.25	NS	NS	NS
	<i>g6pcb2a</i>	0.59 ± 0.65 <b>b</b>	2.75 ± 2.58 <b>a</b>	2.55 ± 2.08 <b>ab</b>	0.88 ± 1.23 <b>ab</b>	NS	NS	**
Lipogenesis	<i>srebf1</i>	0.61 ± 0.77 <b>b</b>	2.77 ± 2.10 <b>a</b>	1.90 ± 1.34 <b>ab</b>	0.89 ± 1.27 <b>b</b>	NS	NS	***
	<i>g6pdb</i>	0.67 ± 0.66	2.11 ± 1.75	1.07 ± 0.75	1.02 ± 1.49	NS	NS	NS
	<i>aclyb</i>	0.76 ± 0.66 <b>b</b>	1.60 ± 1.03 <b>ab</b>	2.16 ± 1.37 <b>a</b>	0.80 ± 1.01 <b>b</b>	NS	NS	**
	<i>aclyc</i>	0.85 ± 0.81 <b>b</b>	2.76 ± 2.33 <b>a</b>	2.18 ± 1.29 <b>ab</b>	0.75 ± 0.52 <b>b</b>	NS	NS	***
	<i>aca-aa</i>	1.20 ± 1.72	2.67 ± 2.74	3.28 ± 2.89	2.65 ± 3.29	NS	NS	NS
	<i>aca-ba</i>	1.59 ± 1.37	2.84 ± 2.27	0.84 ± 0.53	0.80 ± 0.75	**	NS	NS
	<i>fasna</i>	0.81 ± 0.48	1.06 ± 0.56	1.43 ± 1.17	1.37 ± 1.70	NS	NS	NS
	<i>fasnb</i>	1.24 ± 1.00	1.40 ± 0.503	1.25 ± 0.81	1.22 ± 1.06	NS	NS	NS
Cholesterol biosynthesis	<i>srebp2a</i>	1.05 ± 1.15	1.79 ± 1.20	1.19 ± 0.59	1.06 ± 1.15	NS	NS	NS
	<i>srebp2b</i>	1.04 ± 0.90	1.70 ± 1.18	0.88 ± 0.35	0.70 ± 0.63	*	NS	NS
	<i>hmgcra</i>	0.94 ± 0.74	1.19 ± 0.80	1.11 ± 0.85	1.01 ± 1.12	NS	NS	NS
	<i>hmgcrb</i>	1.58 ± 1.21	1.26 ± 0.84	0.92 ± 0.59	0.70 ± 0.63	*	NS	NS
	<i>dhcr7a</i>	1.34 ± 0.99	1.43 ± 1.09	0.77 ± 0.59	0.76 ± 0.78	*	NS	NS
	<i>dhcr7b</i>	0.99 ± 0.41	1.16 ± 0.85	0.49 ± 0.22	0.85 ± 0.78	NS	NS	NS

Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS, not significant. P<0.05\*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*. *glut2a* and *glut2b*: glucose transporter paralogs. *gcka* and *gckb*: glucokinase paralogs. *pfkla* and *pfklb*: 6-phosphofructokinase paralogues. *Pk*: pyruvate kinase. *pck1* and *pck2*: phosphoenolpyruvate carboxykinase paralogs. *fbp1a*, *fbp1b1*, and *fbp1b2*: fructose 1.6-bisphosphatase paralogues. *g6pca*, *g6pcb1b*, and *g6pcb2a*: glucose-6-phosphatase paralogs. *srebf1*: sterol regulatory element binding factor 1. *g6pdb*: glucose-6-phosphatase dehydrogenase. *aclyb*, and *aclyc*: adenosine triphosphate citrate lyase paralogues. *aca-aa* and *aca-ba*: acetylcoA carboxylase paralogues. *fasna* and *fasnb*: fatty acid synthase paralogs. *srebp-2a* and *srebp-2b*: sterol regulatory element-binding protein 2 paralogues. *hmgcra*, and

*hmgcrb*: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase paralogues. *dhcr7a*, and *dhcr7b*: 7-dehydrocholesterol reductase paralogues.

**Table 6:** mRNA levels of free fatty acid receptors (FFAR) in mid-intestine

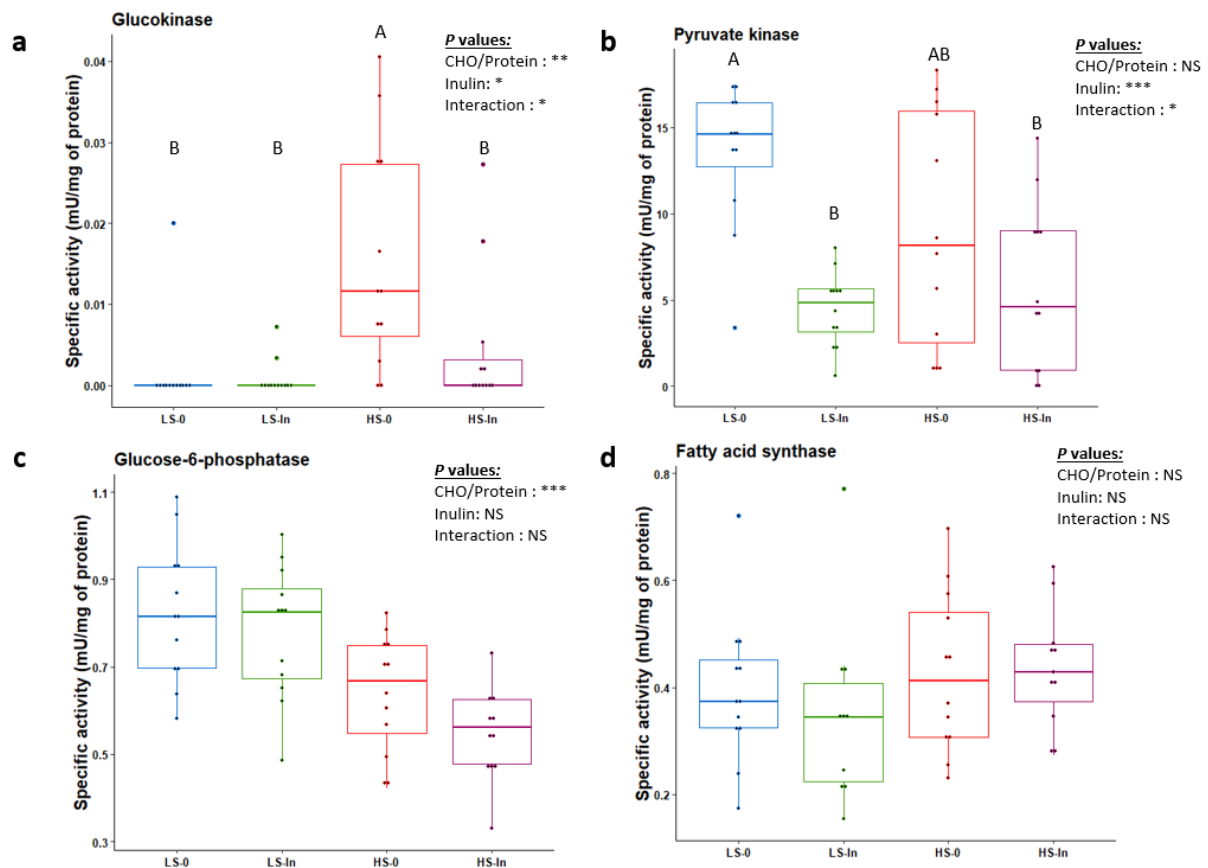
Free fatty acid receptors	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
<i>ffar1</i>	1.51 ± 1.16	1.05 ± 1.20	0.48 ± 0.46	0.50 ± 0.40	**	NS	NS
<i>ffar2a1a</i>	1.52 ± 1.06	1.15 ± 1.28	0.57 ± 0.59	0.56 ± 0.39	**	NS	NS
<i>ffar2a2</i>	1.63 ± 1.23	1.14 ± 1.39	0.34 ± 0.26	0.47 ± 0.32	***	NS	NS
<i>ffar2b1.1</i>	1.36 ± 1.01	1.13 ± 1.37	0.41 ± 0.43	0.51 ± 0.40	**	NS	NS
<i>ffar2b1.2</i>	1.61 ± 1.18	1.12 ± 1.45	0.52 ± 0.52	0.63 ± 0.38	**	NS	NS
<i>ffar2b2a</i>	1.65 ± 1.21	1.14 ± 1.57	0.42 ± 0.42	0.48 ± 0.29	**	NS	NS
<i>ffar2b2b1</i>	1.82 ± 1.40	1.03 ± 1.32	0.41 ± 0.28	0.53 ± 0.37	**	NS	NS

Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS, not significant. P<0.05 \*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*.

**Mid-intestine:** The mRNA expression of the SCFA intestinal receptors i.e FFAR receptors were analyzed in mid-intestine (Table 6). We observed that the high CHO/protein levels resulted in a higher expression of every gene coding for *ffar*. Conversely, inulin did not affect the expression of these genes.

#### Hepatic enzymatic activities

To better understand the effects of CHO/Protein ratio and inulin on the liver metabolism we evaluated the specific activity of four key enzymes. We detected a CHO/Protein: inulin interaction for both glucokinase and pyruvate kinase (Figures 6a and 6b). The glucose-6-phosphatase activity was decreased significantly due to high starch ( $p=8.806e^{-05}$ ) (Figure 6c). The key enzyme involved in lipogenesis, fatty Acid Synthase (FAS), was not affected by any of the factors or the interaction between them (Figure 6d).



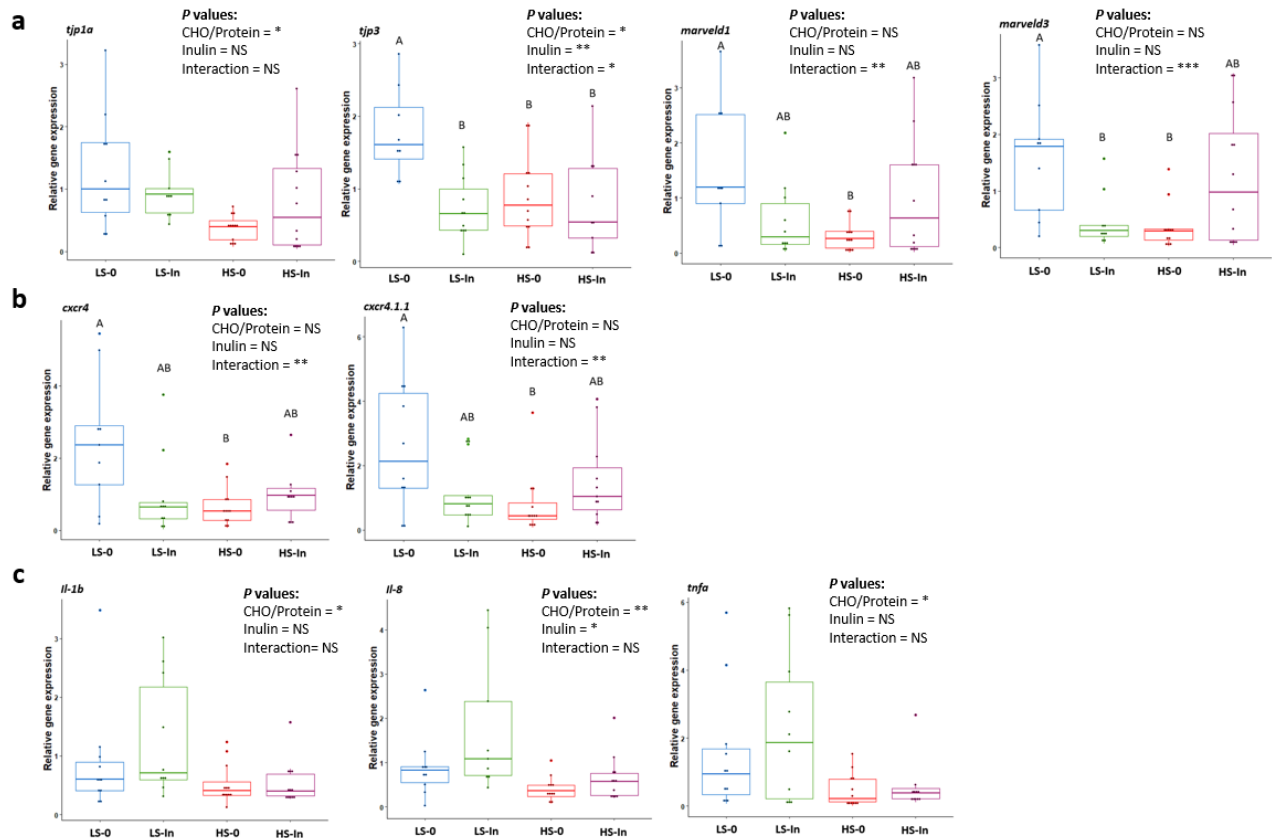
**Figure 6:** Hepatic enzymatic activities of glucokinase (**a**), pyruvate kinase (**b**), glucose-6-phosphatase (**c**), and fatty-acid synthase (**d**) after 12 weeks of feeding. Enzymatic activities were measured in liver samples relative to the average of milligram of proteins. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin. Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by an asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$  fish per group.

### Immune response to the starch and inulin factors

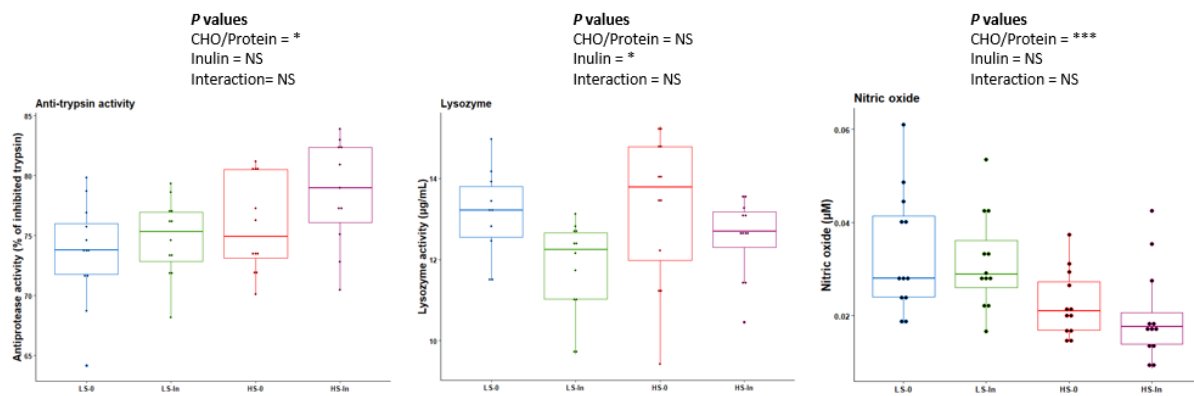
**Liver:** The hepatic expression level of three genes coding for cytokines i.e interleukin 1 beta (*il1b*), interleukin 8 (*il8*), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (*tnfa*) were measured. High starch diets (HS-0, HS-In) had significantly lowered the expression of *il1b*, *il8*, and *tnfa* (*il1b*:  $p = 0.014$ ; *il8*:  $p = 0.004$ ; *tnfa*:  $p = 0.016$ ) (Figure 7a). In addition, the expression of *il8* was also higher in the 2% inulin groups (LS-In, HS-In) ( $p = 0.040$ ).

**Intestine:** Two genes associated with chemokines receptors i.e. *cxcr4*, and *cxcr4.1.1*, were studied in mid intestine showing significant interaction between the factors starch and inulin (*cxcr4*:  $p=8.18e^{-03}$ , *cxcr4.1.1*:  $p=9.82e^{-03}$ ) (Figure 7b). Moreover, the expression of four genes coding for tight junction proteins i.e. *tjp1a*, *tjp3*, *marveld1* and *marveld3* were significantly affected by the diets. A significant decrease of the expression of *tjp1a* ( $p=1.56e^{-03}$ ) was evident in the high-starch group and a CHO/Protein: inulin interaction effect was observed on the expression of *tjp3* ( $p=1.3e^{-02}$ ), *marveld1* ( $p=4.16e^{-03}$ ) and *marveld3* ( $p=6.00e^{-04}$ ) genes (Figure 7c).

**Plasma:** Three plasma markers were measured to understand the immune and oxidative stress response (Figure 8). In the high-starch groups (HS-0, HS-In), we observed that the plasmatic activity of anti-trypsin was significantly increased ( $p=0.013$ ) in the high-starch and the plasma nitric oxide concentration was significantly decreased ( $p=0.001$ ). Inulin dietary supplementation decreased the plasma lysozyme activity ( $p=1.258 e^{-02}$ ).



**Figure 7:** Liver mRNA expression levels of Mid-intestinal mRNA expression levels of tight-junction protein associated genes (*tjp1a*, *tjp3*, *marveld1*, and *marveld3*) **(a)**, mid-intestine mRNA expression levels of C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 paralogues (*cxcr4*, and *cxcr4.1.1*) **(b)**, *il1b*, *il8*, and *tnfa* **(c)** after 12 weeks of feeding. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin. Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by an asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$  fish per group.



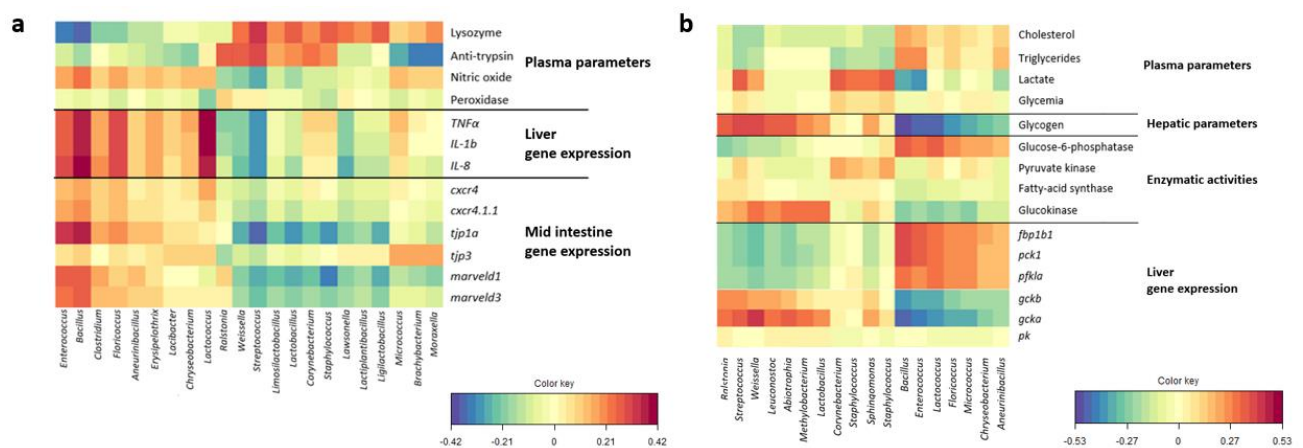
**Figure 8:** Plasma immune markers after 12 weeks of feeding. Feeding groups are symbolized as LS-0: Low-starch 0% inulin; LS-In: low-starch 2% inulin; HS-0: High-starch 0% inulin; and HS-In: High-starch 2% inulin. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Statistical differences were analyzed with a two-way ANOVA test and were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by an asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$  fish per group.

### Correlation between OTU abundances with immune and metabolic parameters

We observed that the *Enterococcus*, *Bacillus*, *Floricoccus*, and *Lactococcus* were positively correlated with the expression of some hepatic cytokines (*tnfa*, *il1b*, *il8*) as well as the expression of tight junction protein (*tjp1a*, *tjp3*, *marveld1*, *marveld3*) coding genes in the mid intestine (Figure 9a). Conversely, the genera *Weissella*, *Streptococcus*, *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Lawsonella*, *Lactiplantibacillus*, *Ligilactobacillus*, and *Moraxella* were positively correlated with the

lysozyme and anti-trypsin plasma activities. Finally, *Ralstonia* genera was positively correlated with the plasma anti-trypsin activity.

*Ralstonia*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Abiotrophia*, *Methylobacterium* and *Lactobacillus* were positively correlated the expression of *gcka* gene, the enzymatic activity of glucokinase and glycogen level in the liver (Figure 9b). *Corynebacterium*, *staphylococcus*, *Sphingomonas*, and *Staphylococcus* were positively correlated with plasma lactate concentration. Conversely, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Floricoccus*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium* and *Aneurinibacillus* were positively associated with the feed efficiency, plasma metabolites i.e. cholesterol, lactate and triglycerides, as well as, the enzymatic activity of glucose-6-phosphatase in the liver, and the expression of *fbp1b1*, *pck1*, and *pfkla* genes in liver.



**Figure 9:** Correlations between OTU abundances and immune markers (a), and metabolic parameters (b).

Heatmap correlations, were calculated using regularized canonical correlation analysis (rCCA). n=12 fish per group.

## Discussion

In the last decade, there has been extensive research on the use of plant based ingredients in aquafeed in order to achieve the sustainability of aquaculture (Kok et al., 2020; Troell et al., 2014; Turchini et al., 2009). In this context, we recently shown that the use of a high-starch diet in a 100% plant-based diet did not resulted in adverse effects on the rainbow trout metabolism, but did not led to growth improvements (Raphael Defaix et al., 2023). Interestingly, the use of prebiotics such as inulin has already been

investigated in teleosts and could have beneficial effects associated with a high-starch diet (T. Wang et al., 2021), but little is known about its effect on host metabolism and immunity, in contrast to mammals (Hoseinifar et al., 2015; Porter et al., 2022). In this study, we wanted to understand the effects of inulin supplementation in rainbow trout fed a diet containing either high or low CHO/ protein ratio, with the basal diet comprising of 100% plant-based ingredients. Thus, we analyzed the intestinal microbiota, the host metabolism, growth parameters, and some immune markers.

### **The use of inulin did not significantly affect the gut microbiota in contrast to the use of a high CHO/ protein ratio in rainbow trout fed a 100% plant-based diet**

The effect of inulin (or non-digestible polysaccharides) is mainly mediated by the intestinal microbiome via the production of bacterial metabolites such as SCFA or lactate (Den Besten et al., 2013; Reddy et al., 2008). Moreover, a high CHO/protein ratio can affect the rainbow trout gut microbiota and in particular the *firmicutes/proteobacteria* ratio as well as the lactic-acid bacteria (Raphael Defaix et al., 2023). In our study, the intestinal microbiota was dominated by *Proteobacteria* and *Firmicutes* regardless the diets, as previously described in salmonids (Raphael Defaix et al., 2023; Gajardo et al., 2017; Li et al., 2021; Lokesh et al., 2023, 2022; Villasante et al., 2022; Weththasinghe et al., 2022). Interestingly, in humans, the *Firmicutes* phyla is specialized in the degradation of non-digestible polysaccharides (Flint et al., 2014; Ze et al., 2012). At genus level, *Ralstonia* (from *Proteobacteria*) dominates the gut microbiota. *Ralstonia* has already been described in the intestinal communities of rainbow trout (Lokesh et al., 2023; Rasmussen et al., 2022), in tilapia (*Oreochromis niloticus*), in goldfish (*Carassius auratus*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) (Bai et al., 2019; Chen et al., 2023; Zhou et al., 2021). However, in salmonids other genus, such as *photobacterium* or *vibrio* belonging to the *proteobacteria* are found in high abundance in the intestinal microbiota (Li et al., 2021; Weththasinghe et al., 2022). Interestingly we observed that the intestinal microbiota has been strongly modified by the change in the CHO/protein ratio in the fish fed with a 100% plant-based diet as previously shown by Defaix et al (Raphael Defaix et al., 2023). Indeed, the relative abundances of *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla were strongly affected

by the change in the CHO/protein ratio, confirmed by the decrease of the *Firmicutes* / *Proteobacteria* ratio.

In the high-starch groups, the decrease in the *Firmicutes* / *Proteobacteria* ratio may seem surprising since the level of digestible carbohydrates is elevated in these groups and it is known that many bacteria belonging to the *firmicutes* are known to have the ability to encode for carbohydrate-active enzymes allowing the degradation of polysaccharides (Kaoutari et al., 2013). However, this decrease may be associated with the significant lower abundances of the *Bacillus* genus in the high-starch groups. Although in fish, some species of bacilli such as *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* are known to degrade polysaccharides (Manzo et al., 2011), *Bacilli* found in this study such as *Bacillus cytotoxicus* in particular in low-starch groups (figure 4b) has not been demonstrated. Conversely, in the high-starch groups, many lactic acid bacteria belonging to the *firmicutes* groups were observed in higher proportion. Interestingly, these bacteria are known to metabolize dietary plant glucosides and externalize their bioactive phytochemicals (Theilmann Mia C, 2017). Additionally, these lactic-acid bacteria (LAB) were found in higher proportion in rainbow trout fed with plant-based diet in comparison to a FM/FO diet (Pérez-Pascual et al., 2021). These LAB, in particular *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococci*, can present a symbiotic relationship with the host (Pessione, 2012) and are able to produce lactate through homolactic acid fermentation (Pessione, 2012; Wolfe, 2015). Interestingly, two SCFAs *i.e.* butyric acid, and valeric acid were found to be higher in high starch groups according to previous work (Raphael Defaix et al., 2023). The production of key cross-talk molecules such as SCFAs, in particular butyric acid, may have several beneficial effects on the fish gut health and are known to improve immunity (Abdel-Latif et al., 2020; Tawfick et al., 2022), and an enhancement of the glucose homeostasis (Wang et al., 2021). In contrast, we observed that the microbiota of trout fed with the low CHO/protein ratio presented a lower levels of LAB and higher proportion of *Enterococcus* and *Bacillus cytotoxicus*, which could be opportunistic pathogens (Cairo et al., 2022; Rodriguez-Estrada et al., 2013) and could have detrimental effects on trout gut health. There were also some effects of inulin on the intestinal microbiota. Indeed, four genera were modified by the use of inulin in contrast to previous studies on fish



where inulin strongly affected the gut microbiota including rainbow trout (Menanteau-Ledouble et al., 2022), and Nile tilapia (Wang et al., 2021). Concerning *Lactobacillus*, a CHO/Protein: inulin interaction was observed. This result requires further investigations to elucidate the potential role of inuline. Additionally, we did not record a significant change in the SCFAs and lactic acid production with the use of inulin unlike a previous work in tilapia where the authors observed an increase of SCFA production in tilapia associated with a high-starch diet (Wang et al., 2021).

In order to detect if the higher production of SCFA in the group fed with high CHO/protein ratio can act on the host metabolism, we studied the expression of the FFAR encoding genes on the mid-intestine. Indeed, these G protein-coupled receptors participate in both immune and metabolic regulation after activation by SCFA (Priyadarshini et al., 2018). In humans, the activation of FFAR lead to signal molecules production ( $G\alpha_{q/11}$  or  $G\alpha_{i/o}$ ) enhancing the secretion of insulin by  $\beta$ -pancreatic cells (Prentki et al., 2013). These classes of receptors have already been characterized in the rainbow trout intestine, and were found to be regulated when the fish were fed with a plant-based diet (Lokesh et al., 2022; Roy et al., 2023). Interestingly, we observed that all the FFAR receptors (*ffar1*, *ffar2a1*, *ffar2a1a*, *ffar2b1a*, *ffar2b1b*, *ffar2b2a*, and *ffar2b2b1*) in mid-intestine were significantly down-regulated by the high CHO/protein ratio. Inulin had no impact on the expression of these genes. In a previous studies, the *ffar2b1a* (previously *ffar31*) expression was significantly increased in trout fed a 100% plant-based diet with inulin (Lokesh et al., 2022). Moreover, it is known that the chronic stimulation (here during 12 weeks of feeding) of G protein-coupled receptors lead to the recruitment of  $\beta$ -arrestins preventing further stimulation of the downstream signaling pathways (Gainetdinov et al., 2004; Rajagopal and Shenoy, 2018). In mid intestine, the decrease in the expression of these key receptors therefore probably reflects the desensitization (even remains to be demonstrated in fish) of these receptors after being stimulated by SCFA, demonstrating the high reactivity of FFARs in the presence of endogenous ligands in rainbow trout in mid intestine.

## **Effect of interactions between starch and inulin in the host metabolism of rainbow trout fed 100% plant-based diets**

Increasing the CHO proportion by decreasing the proportion of plant protein in the high-starch diet did not affect the final weight of fish but resulted in an increase of the protein efficiency ratio as shown in our previous study [35]. CHO could prevent the protein catabolism for energy needs, as shown previously in fish fed with marine ingredients (Kamalam et al., 2017), and now in trout with plant based raw material (Raphael Defaix et al., 2023). But, unexpectedly, feeding rainbow trout with a diet supplemented with 2% inulin caused a decrease in the specific growth rate, final body weight, and feed efficiency at the end of the 12-weeks. Conversely, previous studies on rainbow trout did not observe a decrease of growth when fish were fed with 2% inulin in a 100% plant-based diet (Lokesh et al., 2023, 2022).

Rainbow trout are known to be “low users” of CHO when fed with a FM/FO diet. High levels of CHO generally lead to a persistent post-prandial hyperglycemia (Moon, 2001; Polakof et al., 2012; Song et al., 2018a), explained in part, by a deregulation of gluconeogenesis pathways (S Panserat et al., 2000). In this study, the high-starch diet, in combination with a 100% plant-based diet, did not induce post-prandial hyperglycemia, suggesting an efficient glucose homeostasis, which we previously observed in trout fed a 100% plant-based diet (Raphael Defaix et al., 2023). Interestingly, the use of these 2-factors experiments led to many significant interactions at molecular levels such as the glycolysis, gluconeogenesis, and lipogenesis pathways. Indeed, we observed an up-regulation of multiple genes in fish fed with the low-starch groups and inulin suggesting that inulin could induce a stimulation of the host’s metabolism with a low carbohydrate diet, already observed in a 100% plant-based diet (Lokesh et al., 2022). In contrast, no significant differences were observed in the high-starch groups with the inulin intake. This could be explained by the strong effect of the high-starch diets on the microbiota composition and on the expression of many genes, limiting the potential effect of inulin. A significant interaction was measured for the *pk* mRNA expression along with a significant interaction effect on the pyruvate kinase enzymatic activity but not in the same way; indeed, surprisingly, in fish fed low starch, the increase of *pk* mRNAs is associated with a decrease of pyruvate kinase activity. In trout this gene is already known to be atypically

controlled with high-starch diets, with a lower expression of the *pk* gene and a paradoxical increase of pyruvate kinase activity (Enes et al., 2009; Panserat et al., 2001; Skiba-Cassy et al., 2013). On the other hand, surprisingly also but not for the same reasons, the use of inulin in the high-starch diet resulted in a significant decrease of the glucokinase enzymatic activity, which can be caused by the significant decrease of the *gckb* gene expression.

Interestingly, while the poor glucose homeostasis in rainbow trout fed with fish meal and fish oil (FM/FO) is in part explained by a non-downregulation of the gluconeogenesis pathway with high levels of CHO (Marandel et al., 2015; Skiba-Cassy et al., 2013; Song et al., 2018b), we did not observe higher expression of *g6pcb2* genes related to gluconeogenesis in the high-starch groups. Additionally, a decrease of glucose-6-phosphatase enzymatic activity was observed with the high-starch diet. These observations suggest the existence of an efficient glucose homeostasis which may be explained in part why no post-prandial hyperglycemia was detected in plasma.

Regarding lipid metabolism at the interface with the glucose metabolism, significant interaction CHO/Protein: inulin was observed for lipogenesis. In fact, dietary inulin supplementation induced an up-regulation of *serbf1*, *aclyb*, and *aclyc* genes in fish fed the low-starch diets. In fish fed high-starch diets, these genes were down-regulated. Additionally, as previously shown in trout fed plant-based diets (Raphael Defaix et al., 2023), the use of a high-starch diet did not result in a higher activity of the fatty acid synthase, with no change in the *fasna* and *fasnb* mRNA expression, while usually the use of a high-starch diet with FM/FO induces an increase of the lipogenesis pathway (Song et al., 2018a, 2018b). Moreover, a decrease of plasma triglycerides was observed with the use of high-starch diets. Finally, no differences in the final body lipid content (Figure S3) were observed, showing that with a 100% plant-based diet the dietary starch in excess does not appear to have been stored as fat (only an expected increase of glycogen was found). In plasma, there was also a significant decrease in cholesterol levels, and it was consistent with the down-regulation of genes related to cholesterol biosynthesis in liver. The lower cholesterol level could be linked to the higher proportion of intestinal LAB, and in particular the presence of *Lactobacillus* species in the high-starch diet. Indeed the presence of this bacteria and the

production of SCFA have already been linked to a decrease of the cholesterol biosynthesis in human (Khare and Gaur, 2020).

### **Effects of the CHO/protein ratio and inulin on the immunological status**

In carnivorous fish species, the use of plant-based diets, containing for instance pea (Penn et al., 2011) or soybean protein (Kononova et al., 2019), may induce enteritis of the digestive tract due to the presence of anti-nutritional factors (i.e. non-starch polysaccharides, lectins, tannins) (Francis et al., 2001). In Salmonids, enteritis can lead to an increase in intestinal epithelial permeability, which can induce an inflammation and leukocyte infiltrations of *lamina propria* (Sahlmann et al., 2013). Moreover, the use of a high CHO diet increased the intestinal permeability and induce inflammation in chinese perch (Y. Zhang et al., 2020), and largemouth bass (Zhou et al., 2021). Thus, we studied tight junction proteins (*tjp*) gene expression in mid-intestine. These genes tighten the junctions between epithelial cells to prevent the passage of pathogens through the epithelial barrier, inducing the host's immune response (Chasiotis et al., 2012). In our study, we observed a reduction in *tjp1a* expression in the high-starch diet and down regulation of *tjp3* expression in fish fed with the diets supplemented with inulin. Additionally, two genes coding for tight-junction associated transmembrane proteins, *marveld1* and *marveld3*, were significantly affected by the interaction between starch and inulin, with a reduction of these genes' expression for HS-0 in comparison with LS-0. The lower expression of these genes in the HS-0 group could be a direct effect of the reduction of antinutritional factors known to cause epithelial damage. Moreover, the use of a high-starch diet did not induce an up-regulation of the *tjp* genes.

We also studied the effects of the change in the CHO/protein ratio as well as the inulin factors on immunity actors in intestinal mucosa and liver. Indeed, the presence of anti-nutritional factors in the diet can induce innate immune response of epithelial cells and in the liver (Owczarek et al., 2016; Turvey and Broide, 2010; Zhao et al., 2022). In this study, a significant decrease of plasma nitric oxide (NO) in fish fed with the high-starch diet was also observed. Interestingly, NO is involved in immune defense in rainbow trout (WANG et al., 2001), and is particularly linked to the activation of macrophages in site of inflammation in fish (Wiegertjes et al., 2016). Further studies must be made to assess the inflammatory

status of trout, but these results may suggest that the diets formulated with a high CHO/plant protein ratio can have partially reduce the inflammation. Moreover, induction of NO can led the activation of gene encoding for pro-inflammatory receptors, such as *cxcr4* and *cxcr4.1.1* (Döring et al., 2014; Pawig et al., 2015). In mid intestine, significant interaction between factors was detected for both *cxcr4* and *cxcr4.1.1* gene expression with a lower expression in the HS-0 diet than the LS-0 diet. This result may also be related with the lower proportion of plant protein containing antinutritional factors in the HS-0 group, as antinutritional factors are known to cause enteritis in salmonids (Urán et al., 2009).

While the use of anti-nutritional factors can led to mucosal inflammation (Owczarek et al., 2016), a high-starch diet in rainbow trout may also result in higher production of liver pro-inflammatory cytokines (Zhao et al., 2022), the liver in teleost being known to be involved in immune responses in teleosts (Oskar M. Løken et al., 2020; Pignatelli et al., 2014). Interestingly, here, high starch diets induced a significant decrease of the *il1b*, *il8*, and *tnfa* genes, suggesting that reducing of the proportion of plant-proteins may result in a decrease of cytokines responses in the liver. We also observed, surprisingly, that the dietary inclusion of inulin induced an increase in the *il8* expression in the liver. Activation of *il8* may result from tissue damage or infection, which may highlight a potential unexpected adverse effect of dietary inulin.

Finally, as an integrative biomarker of immune status in fish, we analyzed the lysozyme known to play a key role in innate immunity by eliminating pathogens (Saurabh and Sahoo, 2008): lysozyme is produced and secreted by granulocytes and monocytes during pathogens and parasites infection (Fernández-Montero et al., 2021; Guardiola et al., 2014; Watts et al., 2001). In our study, we did not observe any difference between the high and low starch groups, but a reduction of this enzymatic activity was observed in the inulin groups. This result with inulin was unexpected since most studies using prebiotics or probiotics in fish have led to an enhancement of the lysozyme activity (Rohani et al., 2022).

In conclusion, in our experiment, the high CHO/protein ratio in a full plant-based diet appears to be beneficial for the health of fish regarding the gut integrity (through tight junction expression genes) and the reduction in the production of pro-inflammatory cytokines in liver. Conversely, inulin reduced lysozyme activity and had no beneficial effect on several immune markers.

## **Conclusions**

To summarize, incorporating a high amount of starch into a 100% plant-based diet is a promising approach to replace the marine resources in aquaculture feeds. Notably, the inclusion of high-starch diets did not have adverse effects on growth and instead resulted in favorable changes in the intestinal microbiota, short-chain fatty acid (SCFA) production, and glucose metabolism, as previously observed. Additionally, the use of a high amount of starch in the plant-based diet did not elicit an acute inflammatory response. However, the introduction of dietary inulin yielded unexpected outcomes. Inulin had a negative impact on growth, leading to reduced feed efficiency. The potential beneficial role of dietary inulin in aquaculture appears to be less clear and requires further investigation, particularly when used in conjunction with a high-starch diet.

## **List of abbreviations**

CHO: carbohydrates; LS: low-starch; HS: high-starch; LS-0: low-starch with 0% inulin; LS-In: low-starch with 2% inulin; HS-0: high-starch with 0% inulin; HS-In: high-starch with 2% inulin; SCFA: Short-Chain Fatty Acid; ffar: free fatty acid receptor; FM: Fish meal; FO: Fish Oil; FBM: Final body mass; SGR: Specific growth rate; FE: Feed efficiency; PER: Protein efficiency ratio; DGI: Daily growth intake; DM: Dry Matter; SD: Standard deviation; OTU: Operational taxonomic unit; PLS-DA: Partial Least Squares – Discriminant Analysis; bp: base-pair; PCOA: Principal Correspondence Analysis; 16S rRNA: 16S ribosomal Ribonucleic acid; PCR: Polymerase Chain Reaction; PERMANOVA: Permutational Analysis of Variance; FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution; LAB: Lactic-Acid bacteria; Cq: quantification cycle; NO: Nitric oxide.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate.**

No submission to the bioethics committee has been made since the energy and nutritional needs of the animals have been covered. Moreover, all the samples were taken post mortem.

### **Availability of data and material**

All sequence data are available at the NCBI sequence read archive under accession numbers PRJNA953773, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA953773/>

### **Competing interests**

We declare no conflicts of interest

### **Funding**

This study was funded by the CD40 (Departmental Council of the Landes) and the “Université de Pau et Pays de l’Adour “(UPPA).

### **Authors’ contributions**

RD designed and performed the wet lab experiments, data analysis and drafted the first version of the manuscript with subsequent editing by coauthors. KR and SP conceived, designed and coordinated the study. JL contributed to the microbiota analysis and made the first corrections of the first version of the manuscript. MLB and TP performed the SCFA analysis. FT formulated the diets and overlooked the feeding experiment. LF and SS contributed to the analysis of the inflammatory markers. JR contributed to the FFAR analysis. VV, AS, SB, collected samples and performed wet lab experiments. All authors contributed to the review of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, doi: 10.15454/1.5572369328961167E12) and Sigenae group for providing help on computing and storage resources. Thanks to Galaxy instance of the Sigenae group <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>. We thank Frédéric Terrier, Franck Sandres and Anthony Lanuque for the fish rearing at the Donzacq experimental fish farm (INRAE, France).

### **References**

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M., 2020. Benefits of Dietary Butyric Acid, Sodium Butyrate, and Their Protected Forms in Aquafeeds: A Review. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 28, 421–448. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899>

Anderson, M.J., 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance ( PERMANOVA ) . Wiley StatsRef Stat. Ref. Online 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>

Anguiano, M., Pohlenz, C., Buentello, A., Gatlin, D.M., 2013. The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). Br. J. Nutr. 109, 623–629. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001754>

Bai, Z., Ren, T., Han, Y., Rahman, M.M., Hu, Y., Li, Z., Jiang, Z., 2019. Influences of dietary selenomethionine exposure on tissue accumulation, blood biochemical profiles, gene expression and intestinal microbiota of *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 218, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2018.12.001>

Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. Physiol. Rev. 70, 567–590. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1990.70.2.567>

Butt, R.L., Volkoff, H., 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. Front. Endocrinol. (Lausanne). 10, 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>

Cairo, J., Gherman, I., Day, A., Cook, P.E., 2022. *Bacillus cytotoxicus*—A potentially virulent food-associated microbe. J. Appl. Microbiol. 132, 31–40. <https://doi.org/10.1111/jam.15214>

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knaufl, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes 57, 1470–81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403.Additional>

Chasiotis, H., Kolosov, D., Bui, P., Kelly, S.P., 2012. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. Respir. Physiol. Neurobiol. 184, 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.020>

Chen, J., Li, Q., Tan, C., Xie, L., Yang, X., Zhang, Q., Deng, X., 2023. Effects of enrofloxacin's exposure on the gut microbiota of Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 46, 101077. <https://doi.org/10.1016/J.CBD.2023.101077>



De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G., 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut- brain neural circuits. *Cell* 156, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>

Defaix, R., Lokesh, J., Behec, M. Le, Surget, A., Biasutti, S., Terrier, F., Pigot, T., 2023. High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet. *bioRxiv*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2023.05.02.539058>

Demigné, C., MORAND, C., LEVRAT, M.-A., BESSON, C., MOUNDRAS, C., REMESY, C., 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 44, 515–521. <https://doi.org/10.1080/15216549800201542>

Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

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>

Döring, Y., Pawig, L., Weber, C., Noels, H., 2014. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* 5 JUN, 1–23.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00212>

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy

Solution.

Bioinformatics 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

F., R., B., G., A., S., K.-A., L.C., 2017. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. PLoS Comput. Biol. 13, 1–14.

FAO, 2022. WORLD FISHERIES AND

AQUACULTURE.

Fernández-Montero, Torrecillas, S., Acosta, F., Kalinowski, T., Bravo, J., Sweetman, J., Roo, J.,

Makol, A., Docando, J., Carvalho, M., Izquierdo, M.S., Montero, D., 2021. Improving greater amber jack (*Seriola dumerili*) defenses against monogenean parasite *Neobenedenia girellae* infection through functional dietary additives. Aquaculture 534.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736317>

Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P., 2014. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. Proc. Nutr. Soc. 760, 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>

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)

Frohn, L., Peixoto, D., Guyomar, C., Teixeira, C., Terrier, F., Aguirre, P., 2023. Yeast extract improves growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fishmeal-free diet and modulates the hepatic and distal intestine transcriptomic profile.

Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. Annu. Rev. Neurosci. 27, 107–144.

<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>

Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogh, A., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Appl. Environ. Microbiol. 83.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>

Good, C.A., Kramer, H., Somogyi, M., 1933. the Determination of Glycogen. J. Biol. Chem. 100, 485–491. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75966-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75966-8)

Guardiola, F.A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 40, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.018>

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Sun, Y.Z., 2015. Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365> 23, 315–328. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365>

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Rostami, H.K., Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquac. Nutr. 17, 498–504. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2010.00828.X>  
<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>, n.d.

Ibrahem, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol. 29, 241–246. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2010.03.004>

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 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>

Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B., 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 11, 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>

Khare, A., Gaur, S., 2020. Cholesterol-Lowering Effects of *Lactobacillus* Species. Curr. Microbiol. 77, 638–644. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w>

Kok, B., Malcorps, W., Tlustý, M.F., Eltholth, M.M., Auchterlonie, N.A., Little, D.C., Harmsen, R., Newton, R.W., Davies, S.J., 2020. Fish as feed: Using economic allocation to quantify the Fish in - Fish-out ratio of major fed aquaculture species. *Aquaculture* 528, 735474.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735474>

Kononova, S. V., Zinchenko, D. V., Muranova, T.A., Belova, N.A., Miroshnikov, A.I., 2019. Intestinal microbiota of salmonids and its changes upon introduction of soy proteins to fish feed. *Aquac.Int.* 27, 475–496. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00341-1>

LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Fact.* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>

Li, Y., Bruni, L., Jaramillo-Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., 2021. Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00071-3>

Lokesh, J., Delaygues, M., Defaix, R., Le Behec, M., Pigot, T., Dupont Nivet, M., Kerneis, T., Labbé, L., Goardon, L., Terrier, F., Panserat, S., Ricaud, K., 2023. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *Br. J. Nutr.* 1–40. <https://doi.org/10.1017/s0007114523000120>

Lokesh, J., Ghislain, M., Reyrolle, M., Le Behec, M., Pigot, T., Terrier, F., Roy, J., Panserat, S., Ricaud, K., 2022. Prebiotics modify host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a total plant-based diet: Potential implications for microbiome-mediated diet optimization.

*Aquaculture* 561, 738699. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738699>

Lühns, H., Gerke, T., Müller, J.G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberger, F., Scheppach, W., Menzel, T., 2009. Butyrate Inhibits NF- $\kappa$ B Activation in Lamina Propria Macrophages of Patients with Ulcerative Colitis. <http://dx.doi.org/10.1080/003655202317316105> 37, 458–466.

<https://doi.org/10.1080/003655202317316105>

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: Robust and fastclustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2014, 1–13.

<https://doi.org/10.7717/peerj.593>

Manzo, N., D'Apuzzo, E., Coutinho, P.M., Cutting, S.M., Henrissat, B., Ricca, E., 2011. Carbohydrate-active enzymes from pigmented Bacilli: A genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. BMC Microbiol. 11, 198. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-198>

Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2015. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A gene duplication trail. Physiol. Genomics 47, 253–263.

<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One 8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Menanteau-Ledouble, S., Skov, J., Lukassen, M.B., Rolle-Kampczyk, U., Haange, S.-B., Dalsgaard, I., von Bergen, M., Nielsen, J.L., 2022. Modulation of gut microbiota, blood metabolites, and disease resistance by dietary  $\beta$ -glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Microbiome 4. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00209-5>

<https://doi.org/10.1186/s42523-022-00209-5>

Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 129, 243–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5)

Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes 7, 189–200.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>

Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N., Kyrpides, N.C., Pati, A., 2015. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by illumina Phix control. Stand. Genomic Sci. 10, 1–4.

<https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-18>

Nastasi, C., Candela, M., Bonefeld, C.M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., Biagi, E., Andersen, M.H., Brigidi, P., Ødum, N., Litman, T., Woetmann, A., 2015. The effect of short-chain fatty acidson human monocyte-derived dendritic cells. *Sci. Rep.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep16148>

Nishina, P.M., Freedland, R.A., 1990. Effects of Propionate on Lipid Biosynthesis in Isolated RatHepatocytes. *J. Nutr.* 120, 668–673. <https://doi.org/10.1093/JN/120.7.668>

Ortiz, L.T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M.L., Treviño, J., Tejedor, J.L., Alzueta, C., 2013. Effectsof inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 19, 475–482. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2012.00981.X>

Oskar M. Løken, H?avard Bjørgen, Ivar Hordvik, Erling O. Koppang, 2020. A teleost structural analogue to the avian bursa of Fabricius. *J. Anat.* 798–808. <https://doi.org/10.1111/joa.13147>

Owczarek, D., Rodacki, T., Domagała-rodacka, R., Cibor, D., Mach, T., Owczarek, D., Domagała-rodacka, R., 2016. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases 22, 895–905. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.895>

Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Kaushik, S., 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) 11, 22–29.

Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.13.2351>

Pawig, L., Klasen, C., Weber, C., Bernhagen, J., Noels, H., 2015. Diversity and inter-connections in theCXCR4 chemokine receptor/ligand family: Molecular perspectives. *Front. Immunol.* 6, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00429>

Peixoto, D., Machado, M., Azeredo, R., Costas, B., 2022. Chronic Inflammation Modulates Opioid Receptor Gene Expression and Triggers Respiratory Burst in a Teleost Model. *Biology (Basel)*.11. <https://doi.org/10.3390/biology11050764>

Penn, M.H., Bendiksen, E.A., Campbell, P., Krogdahl, A.S., 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 310, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.040>

Pérez-Pascual, D., Pérez-Cobas, A.E., Rigaudeau, D., Rochat, T., Bernardet, J.-F., Skiba-Cassy, S., Marchand, Y., Duchaud, E., Ghigo, J.-M., 2021. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00107-2>

Perler, B.K., Friedman, E.S., Wu, G.D., 2023. The Role of the Gut Microbiota in the Relationship Between Diet and Human Health. *Annu. Rev. Physiol.* 85, 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031522-092054>

Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>

Pignatelli, J., Jørgensen, L.V.G., Castro, R., Abo, B., 2014. Early Immune Responses in Rainbow Trout Liver upon Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Infection 9, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111084>

Polakof, S., Álvarez, R., Soengas, J.L., 2010. Gut glucose metabolism in rainbow trout: Implications in glucose homeostasis and glucosensing capacity. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, 19–32. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00005.2010>

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 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 Immunol.* 127, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.055>

Prentki, M., Matschinsky, F.M., Madiraju, S.R.M., 2013. Metabolic signaling in fuel-induced

insulinsecretion. *Cell Metab.* 18, 162–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.018>

Priyadarshini, M., Navarro, G., Layden, B.T., 2018. Gut microbiota: FFAR reaching effects on islets. *Endocrinology* 159, 2495–2505. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00296>

R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna., 2018.

Rajagopal, S., Shenoy, S.K., 2018. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell. Signal.* 41,9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>

Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., von Gersdorff Jørgensen, L., Forberg, T., Zuo, S., Kania, P.W., Buchmann, K., Kristiansen, K., Bojesen, A.M., Limborg, M.T., 2022. Integrative analyses of probiotics, pathogenic infections and host immune response highlight the importance of gut microbiota in understanding disease recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 132, 3201–3216. <https://doi.org/10.1111/jam.15433>

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>

Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bakke, A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquac. Nutr.* 16, 117–136. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2009.00731.X>

Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2013. Effects of Inactivated *Enterococcus faecalis* and Mannan Oligosaccharide and Their Combination on Growth, Immunity, and Disease Protection in Rainbow Trout. *Chang. Publ. Wiley* 75, 416–428. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.799620>

Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., Ferdous, Z., Siddik, M.A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., Shahjahan, M., 2022a. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 120, 569–589. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.037>



Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., Ferdous, Z., Siddik, M.A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., Shahjahan, M., 2022b. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 120, 569–589. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.12.037>

Roy, J., Baranek, E., Marandel, L., 2023. Characterization of free fatty acid receptor family in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): towards a better understanding of their involvement in fatty acid signalisation. *BMC Genomics* 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09181-z>

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 Immunol.* 34, 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.031>

Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immunosystem. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2007.01883.X>

Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., Seiliez, I., 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 109, 1359–1372. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003352>

Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M., Abadi, Z.H., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 316–321. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2011.11.023>

Song, X., Marandel, L., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018a. Hepatic glucose metabolic responses to digestible dietary carbohydrates in two isogenic lines of rainbow trout. *Biol. Open* 7. <https://doi.org/10.1242/bio.032896>

Song, X., Marandel, L., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I.,

Panserat, S., 2018b. Regulation by dietary carbohydrates of intermediary metabolism in liver and muscle of two isogenic lines of rainbow trout. *Front. Physiol.* 9, 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01579>

Soty, M., Penhoat, A., Amigo-Correig, M., Vinera, J., Sardella, A., Vullin-Bouilloux, F., Zitoun, C., Houberdon, I., Mithieux, G., 2015. A gut-brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol. Metab.* 4, 106–117.

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.009>

Syed Raffic Ali, S., Ambasankar, K., Praveena, P.E., Nandakumar, S., Saiyad Musthafa, M., 2018. Effect of dietary prebiotic inulin on histology, immuno-haematological and biochemical parameters of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquac. Res.* 49, 2732–2740. <https://doi.org/10.1111/are.13734>

Tawfick, M.M., Xie, H., Zhao, C., Shao, P., Farag, M.A., 2022. Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics. *Int. J. Biol. Macromol.* 208, 948–961. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.218>

Theilmann Mia C, 2017. *Lactobacillus acidophilus* Metabolizes Dietary Plant Glucosides and Externalizes Their Bioactive Phytochemicals 8, 1–15.

Tiengtam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P., Boonanuntanasarn, S., 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 207, 120–129.

<https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2015.05.008>

Troell, M., Naylor, R.L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P.H., Folke, C., Arrow, K.J., Barrett, S., Crépin, A.S., Ehrlich, P.R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S.A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B.H., Xepapadeas, T., De Zeeuw, A., 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13257–13263.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1404067111>

Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>

Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>

Urán, P.A., Schrama, J.W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J.H.W.M., Koppe, W., Verreth, J.A.J., 2009. Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 15, 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00615.x>

Véron, V., Panserat, S., Le Boucher, R., Labbé, L., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Médale, F., 2016. Long-term feeding a plant-based diet devoid of marine ingredients strongly affects certain key metabolic enzymes in the rainbow trout liver. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 771–785. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0174-2>

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*). *Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.04.003>

WANG, T., WARD, M., GRABOWSKI, P., SECOMBES, C.J., 2001. Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* 358, 747–755. <https://doi.org/10.1042/BJ3580747>

Wang, T., Zhang, N., Yu, X.B., Qiao, F., Chen, L.Q., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2021. Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br. J. Nutr.* 126, 161–171. <https://doi.org/10.1017/S000711452000402X>

Wang, T., Zhang, N., Yu, X.B., Qiao, F., Chen, L.Q., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2020. Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1017/S000711452000402X>

Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., 2001. Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79,

570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x>

Weththasinghe, P., Rocha, S.D.C., Øyås, O., Lagos, L., Hansen, J.Ø., Mydland, L.T., Øverland, M., 2022.

Modulation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiota composition and predicted metabolic

capacity by feeding diets with processed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae

meals and fractions. *Anim. Microbiome* 4. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00161-w>

Wiegertjes, G.F., Wentzel, A.S., Spaink, H.P., Elks, P.M., Fink, I.R., 2016. Polarization of

immuneresponses in fish: The ‘macrophages first’ point of view. *Mol. Immunol.* 69, 146–156.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.026>

Wolfe, A.J., 2015. Glycolysis for the microbiome generation. *Metab. Bact. Pathog.* 1–

16. <https://doi.org/10.1128/9781555818883.ch1>

Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for

thedeградation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>

Zhang, Y., Liang, X.F., He, S., Chen, X., Wang, J., Li, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Li, L., Alam, M.S., 2020.

Effects of High Carbohydrate Diet-Modulated Microbiota on Gut Health in Chinese Perch. *Front.*

*Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575102>

Zhao, W., Wei, H.-L., Wang, Z.-Q., He, X.-S., Niu, J., 2022. Effects of Dietary Carbohydrate Levels on

Growth Performance, Body Composition, Antioxidant Capacity, Immunity, and Liver Morphology in

*Oncorhynchus mykiss* under Cage Culture with Flowing Freshwater. *Aquac. Nutr.* 2022, 1–11.

<https://doi.org/10.1155/2022/7820017>

Zhou, Y.L., He, G.L., Jin, T., Chen, Y.J., Dai, F.Y., Luo, L., Lin, S.M., 2021. High dietary starch impairs

intestinal health and microbiota of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* 534,

736261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736261>

Muscle	Low-starch	Low-starch	High-starch	High-starch	Starch	P value	
	0% inulin	2% inulin	0% inulin	2% inulin		Inulin	S:I
<b>Glucose transport</b>							
<i>glut4a</i>	0.69 ± 0.44	0.79 ± 0.35	0.98 ± 0.37	0.81 ± 0.45	NS	NS	NS
<i>glut4b</i>	1.47 ± 1.07	1.91 ± 1.67	2.25 ± 1.46	1.39 ± 0.52	NS	NS	NS
<b>Glycolysis</b>							
<i>hk</i>	0.60 ± 0.33 <b>b</b>	1.22 ± 0.58 <b>a</b>	1.47 ± 1.07 <b>ab</b>	1.00 ± 0.85 <b>ab</b>	NS	NS	*
<i>pfkmaa</i>	1.33 ± 1.10	1.41 ± 0.65	1.40 ± 0.89	1.65 ± 1.56	NS	NS	NS
<i>pfkmab</i>	1.27 ± 0.99	1.30 ± 0.80	2.73 ± 1.38	1.82 ± 1.47	**	NS	NS
<i>pfkmba</i>	1.21 ± 1.11	1.46 ± 0.70	2.27 ± 1.06	1.65 ± 0.99	*	NS	NS
<i>pfkmbb</i>	1.89 ± 2.27	1.01 ± 0.45	2.47 ± 1.51	2.14 ± 1.02	NS	NS	NS
<i>pkmab</i>	1.04 ± 0.43	0.97 ± 0.31	1.31 ± 0.54	0.95 ± 0.54	NS	NS	NS
<i>pkmba</i>	1.02 ± 0.69	1.07 ± 0.50	1.58 ± 0.69	1.20 ± 0.84	NS	NS	NS
<i>pkmbb</i>	1.08 ± 0.74	1.19 ± 0.70	2.04 ± 0.85	1.45 ± 0.94	*	NS	NS
<b>Beta oxydation</b>							
<i>hadh</i>	1.50 ± 0.94	1.08 ± 0.41	1.49 ± 0.67	1.28 ± 0.63	NS	NS	NS
<i>cpt1a</i>	1.40 ± 1.10	2.81 ± 2.27	2.35 ± 1.36	1.84 ± 1.20	NS	NS	*
<i>acox3</i>	1.15 ± 0.82	1.79 ± 1.26	1.82 ± 0.94	1.16 ± 0.66	NS	NS	*

**Tableau 12** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de muscles de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes LS-0, LS-In, HS-0, et HS-In, 6 heures après le dernier repas. Les données sont présentées moyenne ± écart type (n=12). Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA deux voies. NS : pas significatif,  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*. *glut4a* and *glut4b*: glucose transporter 4 paralogues. *hk*: hexokinase. *pfkmaa*, *pfkmab*, *pfkmba*, and *pfkmbb*: 6-phosphofructokinase muscle type paralogues. *pkmab*, *pkmba*, and *pkmbb*: pyruvate kinase muscle type. *hadh*: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *cpt1a* : carnitine palmitoyl transferase 1. *acox3*: acylCoA oxidase paralogues. Les résultats sont normalisés avec le gène de référence *ef1a*.

### 3.4. Données additionnelles article 2 :

**Ci-après, sont ajoutées des données complémentaires qui n'ont pas été incluses dans l'article. Chaque tableau est suivi d'une courte explication.**

Lors de cette deuxième étude, l'effet des deux facteurs (glucides / protéines et inuline) sur l'expression relative de gènes impliqués dans le transport de glucose, et sur les voies métaboliques de la glycolyse et de la bêta oxydation a été étudié dans les échantillons de muscles (**tableau 12**). Contrairement à la première étude où aucun effet n'avait été mesuré, dans cette seconde étude, des effets sur plusieurs gènes sont observés : l'utilisation d'un fort ratio glucides / protéines induit une diminution de l'expression des gènes *pfkmab*, *pfkmba*, et *pkmbb*. D'autre part, concernant la voie de la glycolyse, l'apport d'inuline est associé à une augmentation significative de l'expression du gène codant pour l'hexokinase (*hk*), mais uniquement chez les groupes « low-starch ». De plus amples études sont nécessaires (tests d'activités enzymatiques, par exemple) pour pouvoir conclure sur l'effet de ces facteurs sur la voie métabolique de la glycolyse musculaire. Enfin, des interactions significatives entre ces deux facteurs (glucides / protéines et inuline) sont observées pour les gènes *cpt1a* et *acox3* impliqués dans la voie de la bêta oxydation.

Comme lors de la première expérimentation, l'étude de l'expression relative de l'expression de différents gènes dans les tissus adipeux ne semble pas révéler de changement majeur au niveau des voies métaboliques de la glycolyse, de la lipogenèse, de la bêta oxydation, et du transport de glucose (**Tableau 13**). Toutefois, une interaction significative est observée pour le gène *glut4a*, dont l'expression est plus faible chez le groupe HS-0 comparé au groupe LS-0. Dans ces tissus, une diminution significative de l'expression du gène *pfkla* est observée chez les groupes HS. Enfin, une interaction significative est obtenue pour le gène *aclyb* montrant une plus faible expression pour le groupe HS-0 en comparaison avec le groupe LS-0. Par contre, aucun effet de l'apport en inuline n'a été trouvé.

Adipose tissue	Low-starch	Low-starch	High-starch	High-starch	P value		
	0% inulin	2% inulin	0% inulin	2% inulin	Starch	Inulin	S:I
<b>Glucose transport</b>							
<i>glut4a</i>	1.19 ± 0.43 <b>a</b>	0.97 ± 0.54 <b>ab</b>	0.54 ± 0.20 <b>b</b>	0.91 ± 0.61 <b>ab</b>	*	NS	*
<i>glut4b</i>	1.09 ± 0.49	0.93 ± 0.85	0.62 ± 0.65	0.80 ± 0.64	NS	NS	NS
<b>Glycolysis</b>							
<i>hk</i>	1.01 ± 0.65	0.88 ± 0.78	0.78 ± 0.75	0.49 ± 0.25	NS	NS	NS
<i>pfkia</i>	1.90 ± 1.32	0.76 ± 0.42	2.06 ± 1.06	1.95 ± 1.43	*	NS	NS
<i>pfkib</i>	1.50 ± 1.02	1.86 ± 2.27	1.45 ± 1.07	1.62 ± 1.61	NS	NS	NS
<b>Lipogenesis</b>							
<i>aclya</i>	0.92 ± 0.25	0.95 ± 0.44	0.77 ± 0.31	1.00 ± 0.54	NS	NS	NS
<i>aclyb</i>	1.09 ± 0.48 <b>a</b>	0.79 ± 0.42 <b>ab</b>	0.47 ± 0.20 <b>b</b>	0.70 ± 0.52 <b>ab</b>	**	NS	*
<i>fasna</i>	0.80 ± 0.49	0.74 ± 0.44	0.88 ± 0.65	0.60 ± 0.23	NS	NS	NS
<i>fasnb</i>	1.04 ± 0.41	0.88 ± 0.56	0.61 ± 0.29	0.82 ± 0.53	NS	NS	NS
<b>Beta oxydation</b>							
<i>hadh</i>	1.31 ± 0.90	1.32 ± 1.01	0.92 ± 0.50	1.76 ± 0.97	NS	NS	NS
<i>g6pdh</i>	1.05 ± 0.41	1.04 ± 0.57	1.05 ± 0.43	1.62 ± 1.16	NS	NS	NS
<i>cpt1a</i>	0.74 ± 0.59	0.78 ± 0.64	0.43 ± 0.20	0.66 ± 0.59	NS	NS	NS
<i>acox1a</i>	1.31 ± 0.96	1.64 ± 0.90	1.77 ± 0.82	1.79 ± 1.07	NS	NS	NS

**Tableau 13** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons de tissus adipeux de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes LS-0, LS-In, HS-0, et HS-In, 6 heures après le dernier repas. Les données sont présentées moyenne ± écart type (n=12). Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA deux voies. NS : pas significatif,  $P < 0.05$  \*.  $P < 0.01$  \*\*.  $P < 0.001$  \*\*\*. *glut4a* and *glut4b*: glucose transporter 4 paralogues. *hk*: hexokinase. *pfkla* et *pfkib*: 6-phosphofructokinase. *pk*: pyruvate kinase. *aclya* et *aclyb*: adenosine triphosphate citrate lyase. *fasna*, et *fasnb* : fatty acid synthase. *hadh*: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *g6pdh* : glucose-6-phosphate dehydrogenase. *cpt1a* : carnitine palmitoyl transferase 1 paralogues *acox1a* : acylCoA oxidase paralogues. Les résultats sont normalisés avec le gène de référence *ef1a*.

Dans les tissus intestinaux, une diminution de l'expression relative de *glut2b* est observée dans le *midgut* et le *hindgut*, pour les groupes HS ; alors qu'une augmentation de l'expression du gène *pfkla* est mesurée chez ces mêmes groupes dans le *midgut* (**Tableau 14**). L'expression d'un gène codant pour la maltase, enzyme endogène intervenant dans la dégradation du maltose (polymère formé de deux molécules de glucose) a également été testée. Dans le *midgut*, une interaction significative ayant pour résultat une diminution de l'expression de ce gène pour le groupe HS-0 par rapport au groupe LS-0 est observée. Enfin, une diminution de l'expression du gène *pfklb* codant pour la 6-phosphofructokinase est observée avec l'inuline. Toutefois, à nouveau, des études complémentaires (activités enzymatiques, taux de protéines) seront nécessaires pour conclure sur l'effet de ces deux facteurs (glucides / protéines et inuline) sur les voies métabolites des intestins proximaux et distaux.



Intestinal tissues	Low-starch	Low-starch	High-starch	High-starch	P value		
	0% inulin	2% inulin	0% inulin	2% inulin	Starch	Inulin	S:I
<b>Midgut</b>							
<i>glut2a</i>	1.41 ± 1.07	1.11 ± 0.79	1.07 ± 1.02	0.63 ± 0.47	NS	NS	NS
<i>glut2b</i>	0.77 ± 0.52	0.57 ± 0.50	0.28 ± 0.26	0.33 ± 0.28	**	NS	NS
<i>pfkla</i>	0.59 ± 0.42	1.18 ± 0.88	0.66 ± 0.53	1.19 ± 0.64	NS	**	NS
<i>pfklb</i>	0.88 ± 0.69	0.80 ± 0.41	0.70 ± 0.32	0.85 ± 0.50	NS	NS	NS
<i>pk</i>	1.08 ± 0.87	0.69 ± 0.60	1.05 ± 0.59	1.13 ± 0.52	NS	NS	NS
<i>Maltase</i>	1.14 ± 0.61 <b>a</b>	0.83 ± 0.41 <b>ab</b>	0.59 ± 0.27 <b>b</b>	0.90 ± 0.43 <b>ab</b>	NS	NS	*
<b>Hindgut</b>							
<i>glut2a</i>	0.74 ± 0.40	1.40 ± 1.59	1.52 ± 1.32	1.71 ± 1.27	NS	NS	NS
<i>glut2b</i>	0.93 ± 0.62	0.43 ± 0.42	2.62 ± 2.28	2.67 ± 2.29	***	NS	NS
<i>pfkla</i>	1.11 ± 0.78	1.39 ± 1.03	1.01 ± 0.92	1.54 ± 1.02	NS	NS	NS
<i>pfklb</i>	1.45 ± 1.07	0.65 ± 0.33	1.14 ± 0.70	0.70 ± 0.71	NS	*	NS
<i>pk</i>	0.91 ± 0.72	0.85 ± 0.82	1.16 ± 0.88	0.82 ± 0.39	NS	NS	NS
<i>Maltase</i>	0.45 ± 0.20	0.43 ± 0.24	0.95 ± 0.63	0.30 ± 0.19	NS	NS	NS

**Tableau 14** : Expressions relatives de gènes d'intérêt dans les échantillons d'intestin proximal (Midgut) et distal (Hindgut) de truites arc-en-ciel, nourries avec les régimes LS-0, LS-In, HS-0, et HS-In, 6 heures après le dernier repas. Les données sont présentées moyenne ± écart type (n=12). Les différences statistiques sont calculées par une ANOVA deux voies. NS : pas significatif,  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*. *glut2a* and *glut2b*: glucose transporter paralogues. *pfkla* and *pfklb*: 6-phosphofructokinase paralogues. *pk*: pyruvate kinase. Les résultats sont normalisés avec le gène de référence *beta actine*.

### 3.5. Résumé du troisième article :

#### **« Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet » *Scientific Reports* (Prêt pour soumission)**

##### Objectif :

Dans le cadre de travaux visant à étudier l'utilisation d'un régime 100 % végétal chez la truite arc-en-ciel, la capacité d'adaptation ou plasticité du microbiote est un facteur clé. En effet, alors que le microbiote de la truite « en milieu naturel » présente de grandes capacités protéolytiques, un microbiote adapté à la dégradation de composés végétaux pourrait permettre d'améliorer la dégradation de ces molécules. De plus, la production de métabolites bactériens (acides gras à chaîne courte) issus de la fermentation des glucides non-digestibles peut améliorer la croissance des poissons, mais aussi induire une stimulation du métabolisme, et être bénéfique pour le bien-être de l'animal. Nous avons donc voulu déterminer, en mettant en place cette nouvelle expérimentation, si les variations du microbiote intestinal observées après 12 semaines d'élevage avec un fort ratio de glucides/protéines (voir articles 1 et 2) pouvaient être retrouvées après 3 semaines d'élevage seulement.

##### Plan expérimental :

Dans le cadre de cette expérience, deux régimes alimentaires « high-starch » (HS), et « low-starch » (LS) similaires à ceux formulés lors de la première expérimentation ont été utilisés. Le régime HS présente 18 % de glucides digestibles, et 42 % de protéines. Le régime LS est lui composé de 3 % de glucides digestibles et 51 % de protéines. Ces régimes alimentaires ont été distribués sur une période courte de 3 semaines. Pour cette étude, 81 truites arc-en-ciel de 56 g ont été utilisées par condition (3 bacs contenant chacun 27 poissons). Pendant la période expérimentale, les paramètres zootechniques ont été mesurés. Afin d'étudier l'effet des régimes sur le microbiote intestinal, les contenus digestifs, ainsi que le microbiote associé au mucus ont été prélevés (12 poissons par groupe, 4 par bac), 6 heures après le dernier repas. De plus, plusieurs paramètres métaboliques ont aussi été étudiés. Pour cela, le foie et le plasma ont été prélevés.



### Résultats et conclusion :

À l'issue des 3 semaines d'élevage, aucune différence zootechnique n'a été observée entre les groupes expérimentaux. Comme attendu, une diminution significative des indices d'alpha diversité est observée dans les échantillons de mucus, en comparaison avec les échantillons de contenus digestifs. Par ailleurs, une modification significative de la bêta diversité est observée entre les régimes HS et LS uniquement au sein des échantillons de contenus digestifs, confirmée par la claire séparation des ellipses de PLSDA. Dans tous les échantillons, les phyla majoritaires sont les *Proteobacteria* et *Firmicutes*. Une proportion importante de *Firmicutes* (~45 %) est observée dans les échantillons de mucus, expliquée par la présence des bactéries du genre *Mycoplasma*. Dans les échantillons de contenus digestifs, le phylum *Proteobacteria* est largement majoritaire (~80 %), représenté principalement par les bactéries du genre *Ralstonia*. Cependant, aucune différence significative du ratio *Firmicutes* / *Proteobacteria* n'a été observée entre les poissons nourris avec le régime HS et ceux nourris avec le régime LS, mais un effet significatif sur l'abondance des bactéries lactiques et sur le genre *Bacillus* a été observé, ce qui démontre une modulation rapide du microbiote.

Même si l'expérience est centrée sur le microbiote intestinal, plusieurs paramètres métaboliques ont été étudiés. Comme précédemment, il n'est toujours pas observé d'hyperglycémie post-prandiale chez les truites nourries avec le régime HS. Par contre, de manière inattendue (par rapport à nos précédents résultats) une concentration de triglycérides plasmatiques a été trouvée largement supérieure chez les poissons nourris avec HS. Comme attendu, une forte augmentation de l'expression relative des deux gènes paralogues *gcka*, et *gckb*, codant pour la glucokinase est observée dans le foie chez le groupe HS. Enfin, alors qu'aucune différence n'est notée entre les groupes concernant l'expression relative des deux gènes paralogues *fasna* et *fasnb*, codant pour l'acide gras synthase, et une diminution significative de l'expression de plusieurs gènes (*pck1*, *fbp1b2*, *g6pca*, *g6pcb1b*) impliqués dans la voie métabolique de la néoglucogenèse est observée.



**Conclusion du troisième article :**

Le remplacement partiel des protéines par des glucides digestibles dans un régime 100 % végétal semble induire une adaptation rapide (3 semaines) du microbiote intestinal au niveau des contenus digestifs de l'intestin proximal. Cette étude met en évidence la plasticité élevée du microbiote intestinal chez la truite, ce qui plaide pour l'utilisation d'ingrédients végétaux et de glucides digestibles dans les aliments aquacoles. Par contre, contrairement à ce qui est constaté lors des deux premières expériences, une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie de la néoglucogénèse est observée, ainsi qu'une absence d'hyperglycémie post-prandiale et une augmentation significative de l'expression des gènes de la glucokinase hépatique. Ces données montrent, comme pour le microbiote, qu'il y a une adaptation rapide du métabolisme glucidique chez les truites nourries avec glucides.



## **Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet**

Raphaël Defaix, Jep Lokesh, Anne Surget, Frédéric Terrier, Stéphane Panserat, Karine Ricaud\*

Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

\*corresponding author

raphael.defaix@inrae.fr ; lokesh.jep@inrae.fr ; anne.surget@inrae.fr ; frederic.terrier@inrae.fr ; stephane.panserat@inrae.fr ; karine.brugirardricaud@univ-pau.fr

### **Abstract:**

Short-term adaptation of the microbiota could promote nutrient degradation and the host health. While numerous studies are currently undertaking feeding trials using sustainable diets for the aquaculture industry, the extent to which the microbiota adapts to these novel diets is poorly described. The incorporation of carbohydrates (CHO) within a 100% plant-based diet could offer a novel, cost-effective energy source that is readily available, potentially replacing the protein component in the diets. In this study, we investigated the short-term (3 weeks) effects of a high CHO, 100 % plant-based diet on the and mucosal and digesta associated microbiota diversity and composition, as well as several metabolic parameters.

We highlighted that the mucosa is dominated by *Mycoplasma* (44.86 %). While the diets did not have significant effects on the main phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*), after 3 weeks, a lower abundance of *Bacillus* genus, and higher abundances of three lactic-acid bacteria were demonstrated in digesta. In addition, no post-prandial hyperglycemia was observed with high carbohydrate intake. These results provide evidence for the rapid adaptation of the gut microbiota and host metabolism to high CHO in combination with 100 % plant ingredients in rainbow trout.



## Introduction

At a time when the environmental impact of fishmeal and fish oil production is well established, and the price of these raw materials is on a rise, a large number of alternative ingredients are being studied for their suitability in aquafeeds (insect meal and oil, microalgae, yeast, use of animal by-products, vegetable meal and oil, etc.) (Hua et al., 2019; Naylor et al., 2009; Troell et al., 2014). But none of these alternatives is a total and satisfactory replacement for fishmeal and fish oil. Indeed, these alternatives lead to slower rate of fish growth, may induce chronic diseases, may not be producible on a global scale, and may raise new ethical issues (competition with human nutrition, for example). However, over the last few decades, the proportion of fishmeal and fish oil in aquaculture feeds has fallen significantly, and has been largely replaced by plant-based ingredients (Ytrestøl et al., 2015b). Plant based ingredients are attractive because they are easy to produce in large quantities (lower environmental impact compared to fishmeal and fish oil), and are less expensive than fishmeal and fish oil. However, the total replacement of fishmeal and fish oil by 100% plant ingredients leads to reduced growth (Panserat et al., 2009a), as well as inflammation of the digestive tract due to the presence of anti-nutritional factors (Urán et al., 2009). In this context, the partial replacement of plant proteins by 18% digestible carbohydrates in a 100% plant-based diet could have several benefits. Carbohydrates are an inexpensive energy source, available in very large quantities, and could therefore replace certain proportion of proteins in the diet ultimately reducing the price of aquafeed, or even improve trout growth and feed intake (W. Zhao et al., 2020). While previously the microbiota of carnivorous fish was described as having mainly proteolytic bacteria (Bairagi et al., 2002; Liu et al., 2016), and low adaptive capacity (Karasov et al., 2011; Ray et al., 2012), new data challenge this theory. First, the partial replacement of fishmeal by vegetable meal resulted to a higher *Firmicutes* / *Proteobacteria* ratio with a higher abundance of lactic acid bacteria (LAB) (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*) (Desai et al., 2012; Ingerslev et al., 2014; Pérez-Pascual et al., 2021). Second, use of 100% plant-based diets for 12 weeks have recently been tested in rainbow trout (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023; Lokesh et al., 2023, 2022) and have also highlighted the modulation of LAB composition in the fish mid-intestine. This modulation appears to occur primarily in the digestive contents, where the microbiota is actively breaking down food (Legrand et al., 2021). Members of the LAB group are known to be able to internalize plant compounds (Pathak et al., 2018), and releasing metabolites that can have beneficial effects for the host (SCFA, lactate, vitamins) (LeBlanc et al., 2017; Oliphant and Allen-Vercoe, 2019; Pessione, 2012). Moreover, some of these LAB have amylolytic capacities (Reddy et al., 2008), which favors the degradation and recovery of nutrients. Long term diet influences the diversity of gut microbiota in rainbow trout (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023; Ingerslev et al., 2014; Lokesh et al., 2023; Pérez-Pascual et al., 2021; Serra et al., 2021) but it remains unclear how quickly the fish gut microbiome responds to short-term diet changes. In

humans, few days are enough to detect modification in microbiota community after an important diet change (David et al., 2014). Interestingly, when pigs are fed a diet with high resistant starch, changes in microbiota composition and SCFA concentrations are observed after two weeks (Haenen et al., 2013).

The objective of this study is to ascertain whether alterations in microbiota and metabolic parameters resulting from a 12-week long-term consumption of a 100% plant-based diet with a high carbohydrate/protein ratio can be detected as early as 3 weeks into the feeding diet. The samples are taken after 3 weeks. Indeed, the evidence of short-term plasticity in the microbiota could support the use of plant-based diets in rainbow trout, and will provide deeper insights into the significance of an early manipulation of the microbiota. We hypothesize that, an intestinal microbiota could help to promote the degradation of the plant-based ingredients and high CHO and could have beneficial effects on the host's immune status via the production of certain bacterial metabolites. Moreover, in rainbow trout, the use of 18% digestible carbohydrates remains a challenge, since metabolic disorders are frequently observed in this carnivorous species (Kamalam et al., 2017).

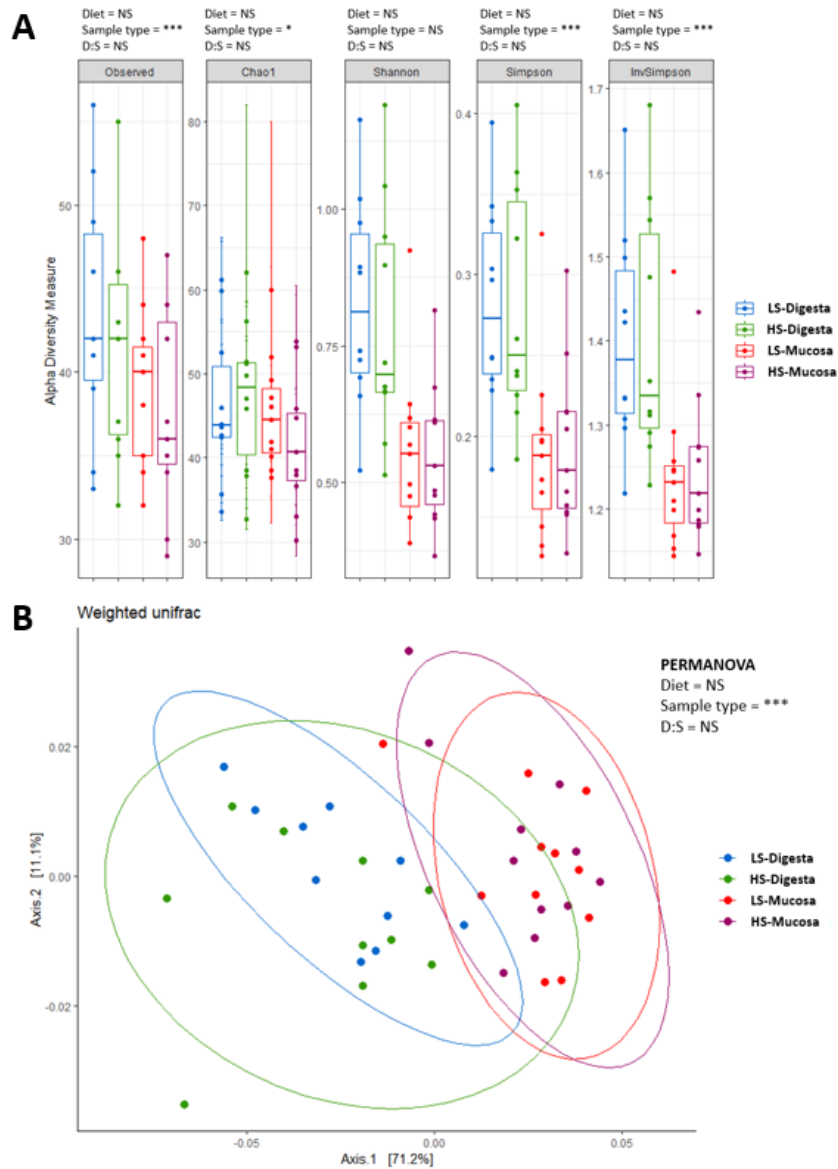
## Results

### *Microbial composition in the midgut mucosa and digesta*

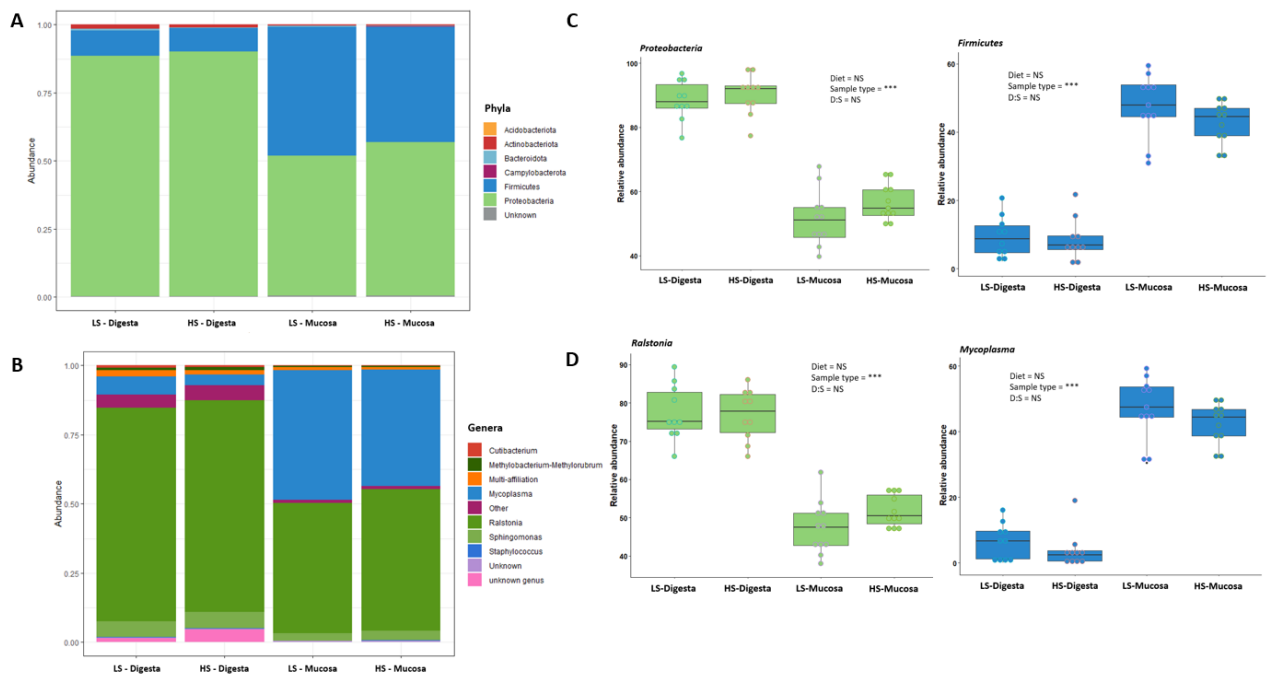
Alpha diversity measures depending on diets were calculated in the midgut mucosa and digesta (**Figure 1A**). Firstly, while the diets did not affect the alpha diversity indices. A significant decrease in the OTUs observed ( $P = 2.643e-4$ ) and Chao1 ( $P = 0.0112$ ) indices were observed in the mucosa. Secondly, no effect on the Shannon index was observed. Thirdly, a significant increase of the Simpson ( $P = 5.973e-10$ ) and InvSimpson ( $P = 2.707e-12$ ) indices were observed in the mucosa, compared to the digesta. Beta diversity was calculated using *UniFrac* dissimilarity index and visualized using PCoA (**Figure 1B**). Comparison of the groups using a two-way PERMANOVA showed a significant effect of sample type ( $P = 0.001$ ), and no effect of the diet.

A total of 102 OTU (Operational Taxonomic Units) has been detected. The three most abundant phyla among the groups were the *Proteobacteria*, the *Firmicutes*, and the *Actinobacteria* (**Figure 2A**). A significant higher relative abundance of the *Proteobacteria* phylum (+ 35.25,  $P = 2.2e-16$ ) was observed in the digesta as well as a significant lower abundance of the *Firmicutes* phylum (- 36.15 %,  $P = 2.2e-16$ ) (**Figure 2B**). No change due the diets were observed in the relative abundance of the main phyla. At the genus level, the top 10 bacterial genera are shown in **Figure 2C**, including the genera *Ralstonia*, *Mycoplasma*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, and *Methylobacterium*. We observed a significant higher proportion of *Ralstonia* in digesta (+ 27.62 %,  $P = 2.2e-16$ ) which explains the higher abundance of *Proteobacteria*, while the proportion of *Mycoplasma* from *Firmicutes* (+ 39.74 %,  $P = 2.2e-16$ ) was larger in mucosa than in digesta (**Figure 2D**). Among the two main genera detected in

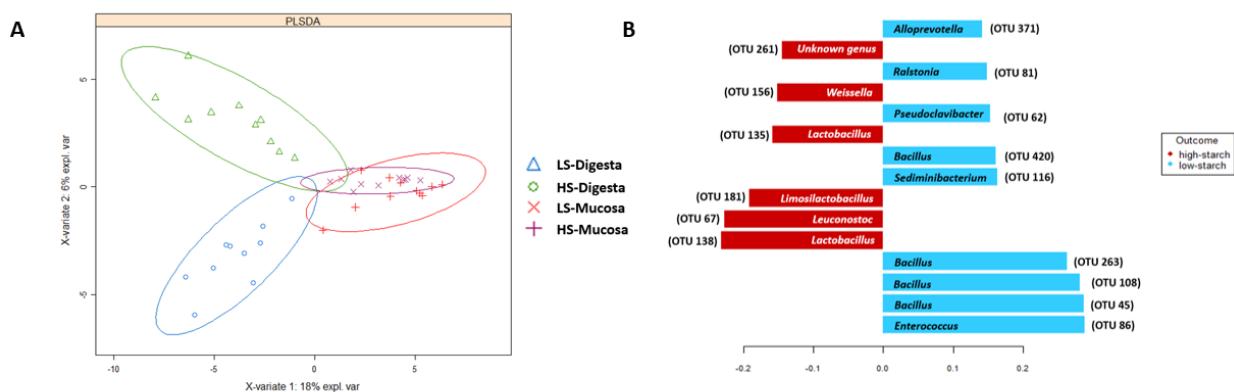
digesta and mucosa, no change due to the diets was observed. However, the use of a partial square discriminant analysis (PLS-DA) allowing to understand the dissimilarity of the diet groups in term of their microbial composition highlighted a significant separation of the two mucosal groups with the two digesta groups but also a clear separation of the HS-Digesta and LS-Digesta groups (**Figure 3A**). Therefore, the top 15 contributing OTUs were identified (**Figure 3B**). The most discriminant OTUs within the high-starch (digesta) group were *Enterococcus* (OTU 86), *Bacillus* (OTU 45, 108, 263, 420), *Sedimibacterium* (OTU 116), *Pseudoclavibacter* (OTU 62), *Ralstonia* (OTU 81), and *Alloprevotella* (OTU 371). In contrast, the most discriminant OTUs in low-starch (digesta) group were *Lactobacillus* (OTU 138), *Leuconostoc* (OTU 67), *Limosilactobacillus* (OTU 181), *Lactobacillus* (OTU 135), *Weissella* (OTU 156), and an unknown genus (OTU 261). Furthermore, while no significant differences were observed in the phyla abundances between the high-starch and low-starch groups in the digesta (data not shown), some significant differences have been found at the genus level (table 2). Indeed, 8 bacterial genera were significantly affected by the diets (**Table 1**). In high-starch diet, in digesta, we observed a significant higher proportion of *Streptococcus* (+0.187 %,  $P = 0.048$ ), *Veillonella* (+0.022 %,  $P = 0.049$ ), *Leuconostoc* (+0.117 %,  $P = 0.020$ ), *Limosilactobacillus* (+0.087 %,  $P = 0.048$ ); and a lower proportion of *Bacillus* (-0.810 %,  $P = 2.52e-05$ ), *Enterococcus* (-0.277 %,  $P = 1.69e-05$ ), *Brachybacterium* (-0.015 %,  $P = 0.046$ ), and *Escherichia-Shigella* (-0.011 %,  $P = 0.03$ ).



**Figure 1:** Alpha diversity measure represented by the OTUs observed, Chao1, Shannon, Simpson, and InvSimpson indexes, in midgut digesta and mucosa (**A**). Beta diversity measure presented by a PCOA representation (Weighted Unifracs analysis) in digesta and mucosa (**B**). The alpha and beta diversity measures were assessed from rainbow trout fed either with the high-starch diet or the low-starch diet for 3 weeks. Alpha diversity differences were analyzed with the two-way ANOVA and were considered statistically significant if  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*. Beta diversity was compared using a pairwise PERMANOVA test and data were considered statistically different if  $p < 0.05$ .  $n = 12$  fish per group.



**Figure 2:** Microbial composition in midgut digesta and mucosa at phylum (A) and genus (B) levels. At genus level, only the top 10 genera were presented. The relative abundance of the two main phyla (*Proteobacteria*, and *Firmicutes*), were presented in panel C. The relative abundance of the two main genera (*Ralstonia* and *Mycoplasma*) were presented in panel D. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test and were considered statistically significant if  $P < 0.05$ . Significant differences are represented by asterisk.  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*.  $n = 12$  fish per group.



**Figure 3:** PLS-DA analysis based on the OTU abundances for fish fed 3 weeks either with the high-starch diet or the low-starch diet, in the midgut digesta and mucosa (A). Contribution level of the top 15

bacteria genera discriminating the diet groups in the midgut digesta, are presented in panel **B**. The bar length represents the significance of the variable in the model. n=12 fish per group.

**Table 1:** Relative abundances of genera significantly affected by the diets in midgut digesta.

Genera	Low-starch	High-starch	P value
<i>Bacillus</i>	8.13e-3 ± 4.56e-3	3.00e-5 ± 7.00e-5	***
<i>Streptococcus</i>	2.07e-3 ± 1.08e-3	3.91e-3 ± 2.53e-3	*
<i>Veillonella</i>	9.00e-5 ± 1.40e-4	3.10e-4 ± 3.00e-4	*
<i>Enterococcus</i>	2.77e-3 ± 1.51e-3	0 ± 0	***
<i>Leuconostoc</i>	4.30e-4 ± 5.60e-4	1.60e-3 ± 1.30e-3	*
<i>Limosilactobacillus</i>	3.50e-4 ± 4.00e-4	1.22e-3 ± 1.24e-3	*
<i>Brachybacterium</i>	1.60e-4 ± 2.20e-3	1.00e-5 ± 1.00e-5	*
<i>Escherichia-Shigella</i>	1.10e-4 ± 1.40e-4	0 ± 0	*

Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a one-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS not significant. P<0.05 \*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*.

#### *Zotechnical parameters, whole-body composition, hepatic and plasmatic parameters*

At the end of the 3 weeks feeding trial, the partial replacement of protein by 18 % CHO in a 100 % plant-based diet did not result in a decrease of the final body weight (**Table 2**). Moreover, no change in the final whole-body composition was observed (i.e. dry matter, crude protein, crude lipids, gross energy). Interestingly, a significant increase of the average liver weight (hepatosomatic index) was detected in the group fed with the high-starch diet (+ 0.29 %, P = 1.036e-04). In addition, the concentration of several plasmatic metabolites sampled 6 hours after the last meal was assessed in the plasma. The blood glucose test revealed no post-prandial hyperglycemia in the group fed high-starch diet. However, a significant higher concentration of triglycerides was measured with the high-starch group (+ 3.64 g/L, P = 1.656e-05), and no significant difference was observed in the plasma lactate concentration.

**Table 2:** Whole body composition, hepatic, and plasma parameters in rainbow trout fed 3 weeks with the high-starch or low-starch diets.

	Low-starch	High-starch	P value
<b>Zotechnical parameters</b>			
Initial average weight (g)	56.53 ± 0.63	56.94 ± 0.88	NS
Final average weight (g)	95.61 ± 5.45	92.02 ± 1.59	NS
<b>Whole body composition</b>			
Dry matter (DM) (%)	32.71 ± 0.27	31.82 ± 1.07	NS
Crude protein (% DM)	48.50 ± 0.22	48.53 ± 1.12	NS
Crude lipids (% DM)	41.94 ± 1.49	42.91 ± 0.56	NS
Gross energy (kJ kg <sup>-1</sup> of DM)	28.85 ± 0.31	29.04 ± 0.21	NS
<b>Hepatic parameters</b>			
Hepatosomatic index (%)	1.42 ± 0.14	1.71 ± 0.15	***
<b>Plasma parameters</b>			
Glycemia (g/L)	0.97 ± 0.21	0.89 ± 0.17	ns
Triglycerides (g/L)	3.73 ± 1.54	7.37 ± 1.36	***
Lactate (g/L)	0.91 ± 0.41	1.19 ± 0.42	ns

Zotechnical parameters and whole-body composition are presented as mean ± SD, n=3 tanks. Hepatic parameters and plasma parameters are presented as mean ± SD, n=12 fish. Statistical differences were analyzed with a one-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS not significant. P<0.05 \*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*.

#### *Hepatic gene expression*

We evaluated the mRNA levels for genes involved in glucose transport, and in the glycolysis, gluconeogenesis, and lipogenesis in liver (**Table 3**). Firstly, no statistical change was observed for the glucose transport genes *glut2a* and *glut2b*. Secondly, a significant increase of the relative expression of the *gcka* (+11.88,  $P = 1.185e-3$ ) and *gckb* (+13.34,  $P = 1.736e-4$ ) encoding for glucokinase was observed in the high-starch group. No differences were observed in the expression of *pfkla*, *pfklb*, and *pk* involved in glycolysis. Thirdly, we observed a significant lower expression of *pck1* (-1.14,  $P = 0.042$ ), *fbp1b2* (-0.43,  $P = 0.044$ ), *g6pca* (-0.25,  $P = 0.015$ ), and *g6pcb1b* (-1.17,  $P = 0.003$ ) implied in the gluconeogenesis pathways in high-starch diet. Finally, the use of high-starch diet did not affect the fatty acid synthase encoding genes (*fasna*, *fasnb*).

**Table 3:** mRNA levels of hepatic genes of rainbow trout fed 3 weeks with the high-starch or the low-starch diet.

	Low-starch	High-starch	P value
<b>Glucose transport</b>			
<i>glut2a</i>	1.35 ± 0.27	1.27 ± 0.27	NS
<i>glut2b</i>	1.24 ± 0.59	0.98 ± 0.30	NS
<b>Glycolysis</b>			
<i>gcka</i>	0.23 ± 0.20	12.11 ± 10.43	**
<i>gckb</i>	0.21 ± 0.15	13.55 ± 9.62	***
<i>pfkla</i>	0.92 ± 0.41	0.77 ± 0.40	NS
<i>pfklb</i>	0.92 ± 0.56	0.95 ± 0.32	NS
<i>pk</i>	1.24 ± 0.51	0.91 ± 0.31	NS
<b>Gluconeogenesis</b>			
<i>pck1</i>	2.07 ± 1.60	0.93 ± 0.87	*
<i>pck2</i>	1.28 ± 1.00	1.44 ± 0.84	NS
<i>fbp1b1</i>	0.74 ± 0.38	0.67 ± 0.13	NS
<i>fbp1b2</i>	1.36 ± 0.38	0.93 ± 0.59	*
<i>g6pca</i>	0.85 ± 0.26	0.60 ± 0.15	*
<i>g6pcb1b</i>	1.97 ± 1.07	0.80 ± 0.60	**
<i>g6pcb2a</i>	1.01 ± 0.65	1.30 ± 0.83	NS
<b>Lipogenesis</b>			
<i>fasna</i>	1.03 ± 0.81	1.93 ± 1.33	NS
<i>fasnb</i>	1.06 ± 0.83	1.64 ± 0.77	NS

Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). Statistical differences were analyzed with a one-way ANOVA test and were considered statistically significant for P<0.05. NS, not significant. P<0.05\*. P<0.01 \*\*. P<0.001 \*\*\*.

## Discussion

Our knowledge of microbial diversity and our understanding of the functions of the microbiota have enabled us to initiate research aimed at modulating the intestinal microbiota of salmonids. As part of the development of a new, more sustainable and less expensive aquaculture diet (Hua et al., 2019; Naylor et al., 2009; Troell et al., 2014), the adaptability or plasticity of the microbiota is a key factor that needs to be studied. Indeed, in the context of projects aimed at feeding farmed fish with 100% plant-ingredients, a microbiota adapted to the fermentation of plant compounds could not only improve their degradation and nutrient recovery (Semova et al., 2012), but also produce bacterial



metabolites that could be beneficial to the host's metabolic functions and immune status (Abdel-Latif et al., 2020; Daisley et al., 2021; LeBlanc et al., 2017; Oliphant and Allen-Vercoe, 2019). Moreover, the use of a high CHO / Protein ratio in a 100 % plant-based diet could be interesting in order to make a partial replacement of the dietary protein as it is known to modify the rainbow trout microbiota in a long-term (12 weeks) feeding trial (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023).

We first studied the differences in the diversity and composition of the microbiota in the digesta and in the mucosa, regardless of the diets. We observed a decrease of the number of OTU in the mucosa, as previously described (Gajardo et al., 2017; Lokesh et al., 2023; Daniel L. Merrifield et al., 2009; Wu et al., 2010). In addition, in the mucosa samples, two major genera (*Ralstonia* (49.51 %) and *Mycoplasma* (44.86 %)) are almost equally abundant, while in digesta the *Ralstonia* (77,13 %) genus is more abundant, explaining the higher Simpson and InvSimpson indices in mucosa. Interestingly, in mucosa a significant proportion of *Mycoplasma* was observed, which is frequently observed in salmonids. It is known that *Mycoplasma* are bacteria with a reduced genome, with a lack of pathogenicity genes in salmonids strains, that can adhere to the host cell surface or even invading the host cell in order to develop a mutualistic relationship in salmonids (Rasmussen et al., 2021; Rottem, 2003). In fact, *Mycoplasma* strains in salmonids may provide vitamins or essential amino acids to the host (Rasmussen et al., 2023). Furthermore, authors have observed a positive correlation between *Mycoplasma* and infection status in Atlantic salmon and hypothesized that the observation of these bacteria could be used as a biomarker for monitoring health in Atlantic salmon (Bozzi et al., 2021).

In this study, we also wanted to study the effect of the diets (*i.e.* an increase of the CHO/protein ratio) on the midgut microbiota after 3 weeks of feeding, and to compare the results with previous studies using the same experimental diets, but in fish fed during 12 weeks (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023). Firstly, we observed that in digesta, part where most of the nutrients are broken down, three phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*), were the most abundant at 3 weeks, which is what is also observed at 12 weeks. Nonetheless, although the high-starch diet leads to a notably elevated *Firmicutes/Proteobacteria* ratio after 12 weeks, primarily driven by substantial effects on the *Ralstonia* (*Proteobacteria*) and *Bacillus* (*Firmicutes*) genera, no significant alterations in the principal phyla were observed after 3-weeks. In fact, while no effect on the relative abundance of *Ralstonia* is observed in this study, a significant lower proportion of *Bacillus* described at 12 weeks is also observed at 3 weeks in the high-starch diet. Interestingly, some *Bacillus* species (*i.e.* *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, or *Bacillus cereus*) have been described as protease producing bacteria in fish microbiota (Banerjee and Ray, 2017). Additionally, after 3 weeks feeding with the high-starch 100 % plant-based diet, several significant effects were observed on LAB, with higher proportion of *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus*, and lower proportion of *Enterococcus*. The effect of high-starch diet on the Lactic Acid Bacteria have also been described when

the rainbow trout were fed during 12 weeks with high starch level (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023). Interestingly, in this previous study, the effect of the high-starch diet on the gut microbiota was correlated with a higher production of key bacterial metabolites (butyrate, valerate, lactate), and positive effects were observed at 12 weeks on several inflammatory makers (lower pro-inflammatory cytokine production, lower nitric oxide levels). In addition, the effect of 100 % plant-based diets on the lactic acid bacteria (*Streptococcus*, *Weissella*) abundances have been demonstrated in rainbow trout (Lokesh et al., 2023). To conclude, the partial replacement of plant protein by 18% CHO showed some interesting effects on the bacterial genera illustrated by the high abundances of amylolytic- bacteria and lower abundances of the proteolytic bacteria during a 3 weeks trial. These effects are also observed, to a greater extent, after 12 weeks of experimentation, where a systematic decrease in the proportion of *Bacillus* is observed with a high-starch diet, and an increase in the abundance of many lactic bacteria.

Furthermore, in this study some metabolic markers were also studied in order to highlight the short-term adaptation of rainbow trout to the experimental diet. Interestingly, the use of high-starch in a 100 % plant-based diet did not lead to a persistent post-prandial hyperglycemia as previously observed with the long-term feeding experiment (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023), confirming that the fish can rapidly adapt to high levels of carbohydrates in a 100% plant based-diet. In general, rainbow trout are carnivorous fish recognized as “low users” of CHO when used to replace part of the protein in a FM/FO diet (Kamalam et al., 2017; Moon, 2001; Polakof et al., 2012; Song et al., 2018a). This phenotype is explained in part by the non-inhibition of the glucose biosynthesis through the gluconeogenesis pathway, even with dietary carbohydrate intake (S. Panserat et al., 2000). Interestingly, we firstly observed in the high-starch group, a higher expression of the two paralogues *gcka* and *gckb*, encoding for glucokinase involved in the glycolysis pathway. Although this “marker” is not sufficient to draw broad conclusions, and other analyses need to be carried out (e.g. enzymatic activities or proteomics), this is the first evidence of the effects of CHO in the intermediary metabolism after 3 weeks of feeding with high-starch diet. Indeed, rainbow trout fed with the same high-starch diet for 12 weeks displayed elevated expression levels of *gcka* and *gckb*. These elevated expressions correlated with increased enzymatic activities of glucokinase and pyruvate kinase (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023). Interestingly, four genes (*pck1*, *fbp1b2*, *g6pca*, and *g6pcb1b*) implicated in the gluconeogenesis pathway were down-regulated with the high-starch diet. The down regulation of *pck1* and *fbp1b1*, and a concurrent lower glucose-6-phosphatase levels were already described in our long term feeding trial (Raphael Defaix et al., 2023), while in a FM/FO diets, the gluconeogenesis gene expression are not down regulated with the use of 18 % CHO (Marandel et al., 2015). In this study, the lower expression of several genes of the gluconeogenesis pathway with the high-starch diet may explain, in part, there was no post-prandial hyperglycemia in trout. Indeed, our

data could illustrate the interesting and rapid adaptation to the metabolic use of CHO in a 100 % plant-based diet. However, in this study, we also observed a higher plasma triglycerides level in the high-starch diet. This result is surprising because while a higher triglycerides concentration was observed when the FM/FO diet with high CHO/protein ratio was fed to rainbow trout (Song et al., 2018b), a lower triglycerides concentration have been observed in rainbow trout fed for 12 weeks with the high CHO/protein ratio in combination with a 100 % plant-based diet (Raphaël Defaix et al., 2023). It would therefore be interesting to carry out sampling kinetics to understand how the metabolism adapts to the use of these diets.

### **Conclusion**

In summary, the high CHO/protein ratio in a 100 % plant-based diet, had a significant effect on the intestinal microbiota in digesta after 3 weeks of study. Indeed, the high-starch diet led to a lower abundance of *Bacillus* genus (with potential proteolytic capacities in fish), and led to an increase of the Lactic-acid bacteria abundances i.e. *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus* (previously described with amylolytic capacities in fish). The 3-week feeding effects on these genera was interesting since it demonstrates for the first time the evidence of the rapid adaptation to the high CHO and 100 % plant-based diet, that could help the fish break down these nutrients rapidly and could encourage the use of this alternative diet for rainbow trout aquaculture. It would be interesting to perform a kinetic study of the microbiota in order to better understand the plasticity of the gut microbiota in rainbow trout. Moreover, no metabolic disorders (i.e. post-prandial hyperglycemia) were observed with the use of high-starch diet suggesting metabolic adaptation. Finally, considering the potential for swift and replicable modulation of the gut microbiota, our findings could serve as a catalyst for future exploration into intestinal modulation using probiotics or prebiotics in rainbow trout fed alternative and more sustainable diets.

## **Methods**

### **Ethical approval**

The feeding experiment was conducted in accordance with the guidelines laid down by French and European legislation for the use and care of laboratory animals (Decree no. 2013-36, February 1st 2013 and Directive 2010/63/EU, respectively). The fish handling protocols and the sampling procedures were described by the INRAE ethics committee (INRAE, 2002-36, April 14, 2002). The INRAE experimental station (Donzacq, Landes, France) is certified to conduct animal experiments under the license number A40-228.1 by the French veterinary service, which is a competent authority.

### **Diet and experimental setup**

As part of this experiment, two “high-starch” (HS) and “low-starch” (LS) diets containing 100 % plant based ingredients, similar to those formulated in previous studies were used (Raphael Defaix et al., 2023; Raphaël Defaix et al., 2023). The high-starch diet corresponding to a high CHO / protein ratio was formulated with 18% digestible carbohydrates and 42% protein. The low-starch diet corresponding to a low CHO / protein ratio is composed of 3% digestible carbohydrates, and 51% protein. Description of the diets are given in **Supplementary table 1**. The isolipidic (25,07 % crude fat) and isoenergetic (25,40 KJ.g dry matter) experimental diets, are adjusted to meet the nutritional requirement of rainbow trout, and were produced as extruded pellets. The fish were fed manually twice a day (with an interval of 8 h) during 3 weeks. Three tanks (130 L) were used, each on containing 27 juvenile rainbow trout (initial weight: 57 g). The fish mortality was checked every day, and all fish in the tank were weighted at the beginning and at the end of the experiment to evaluate the growth and zootechnical parameters.

### **Sampling**

At the end of the 3 weeks rearing, four fish per tank (twelve per group) were randomly sampled, 6 hours after the last meal (the peak of the postprandial regulation of metabolism in trout (Polakof et al., 2012)). The fish were anaesthetized with benzocaine (50 mg-L) before being euthanized with a benzocaine overdose of 150 mg-L, followed by blood collection for plasma isolation. For microbiota study, the digestive contents (digesta) and mucus-associated microbiota (mucosa) were collected from the midgut, and immediately frozen in liquid nitrogen as previous described (Raphael Defaix et al., 2023). Additionally, livers were sampled.

### **Diets and whole-body composition**

Dry matter was obtained by drying the samples at 105°C for 24h. The weight of the post-dried samples was subtracted from the pre-dried samples. Ash content was measured by incinerating the samples at 550°C for 16h. Starch contents was determined using the Megazyme© (Bray, Wicklow, Ireland) total starch assay procedure. Protein content was measured by the Kjeldahl™ method (FOSS, Denmark). Lipid content was determined by the Soxtherm method (Gerhardt analytical systems, Königswinter,

Germany). Gross energy was measured with an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Heitersheim Gribheimer, Germany).

### **Quantification of plasma metabolites**

Commercial kits were used to determine the levels of glucose (Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France), triglycerides (Sobioda), and lactate (Sobioda). These kits were adapted to 96-well plate format according to the manufacturer's instructions.

### **Microbiota composition analysis**

#### *DNA extraction*

The DNA extraction was performed on 200mg digestive contents from the midgut region, using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions. DNA quality was assessed for purity, and quantified with a microplate spectrophotometer (Epoch2, BioTek, France).

#### *Generation of the 16S rRNA sequencing libraries*

The first step PCR was performed using 12.5µL of KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Boulogne-Billancourt, France), 5 µL of 1 µM forward primer (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG -3'), 5 µL of 1 µM reverse primer (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'), and 2.5µL of the extracted DNA (5 ng/µL). The thermocycling condition included a pre-incubation step of 3 min at 95°C, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30sec, hybridization at 55°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 30 sec, with a final extension step at 72°C for 5 min. Controls, including, *Escherichia coli*, and ultra-pure water were also added to the run. Additionally, DNA extracted from diet samples and water from the tanks were also included in the PCR. Amplification of the PCR products were confirmed using gel electrophoresis. The products were then sent to the genomic platform of Bordeaux (PGTB, Bordeaux, France). Libraries were prepared according to the standard protocol recommended by Illumina (Illumina, CA, USA). Index PCR was used to add the unique dual indexes to the sequences using the Nextera XT index kit according to the manufacturer's recommendation (Illumina). The thermocycling conditions were the same as in step 1, except for PCR that was performed on 8 cycles. After PCR cleaning, libraries were quantified using the KAPA library quantification kit for Illumina platforms (Roche). Libraries were pooled at an equimolar concentration (4nM) and sequenced on a MiSeq platform using a 250 bp Paired End Sequencing Kit v2 (Illumina).

#### *Sequence data analysis*

The FROGS pipeline was used to perform the initial analysis of the sequence data (Escudié et al., 2018). The forward and reverse reads of each sample were merged, the adapter sequences were trimmed, and the sequences with long ambiguous bases (N) were removed. After the quality filter steps, the resulting sequences, were used for the downstream analysis. To group together amplicons with a

maximum of one nucleotide difference between two amplicons, the clustering swarm protocol was used (Mahé et al., 2014). Clusters having an abundance less than 0.005% and not present in at least 4 samples were removed. The PhiX database was used to remove the sequences corresponding to chloroplast and mitochondria (Mukherjee et al., 2015). The taxonomic affiliation was made with the silva138.1 pintail 100 16S reference database ("https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/," n.d.).

### **Gene expression analysis**

RNA from liver were extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). One µg of RNA was converted to cDNA with the superscript III reverse transcriptase enzyme (Invitrogen, Waltham, USA) and random primers (Promega, Madison, WI, USA). After the reverse transcription step, cDNA was diluted 80-fold for liver, before being used in quantitative real-time (q) PCR. The RT-qPCR were performed in 384 well-plates in a C1000 Touchtm thermal cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using PerfeCTa SYBR green (VWR, Radnor, PA, USA). The total volume of reaction was 6 µL, including 2µL of diluted cDNA mixed with 0.24 µL each of forward and reverse primer (10 µM), 0.52 µL of RNase-free water, and 3 µL of SYBR green. Thermocycling conditions included a pre-incubation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15sec, annealing at 60°C for 10sec, and extension at 72°C for 15sec. A Melt curve analysis was performed at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each RT-qPCR included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification), a standard curve in triplicate (a range of dilution of cDNA from a pool of all cDNA samples), and negative controls in duplicate (reverse transcriptase-free samples and RNA-free samples). The relative quantification of gene expression was carried out by the Bio-Rad CFX Maestro software (Version 4.0.2325.0418). Cq (Quantification cycle) values were further converted to relative quantities. Elongation factor 1 alpha (*eef1a*) and *gapdh* were used as reference. The list of genes of interest studied is available in **Supplementary table 2**.

### **Statistical analysis**

Zootechnical parameters, including initial and final body weight, were calculated per tank (n=3). The hepatosomatic index (liver weight\*100/fish weight) were obtained during the final sampling of the trial (n=12 fish per condition/diet). All data are presented as mean ± standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using the R software (version 4.0.3) ("R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna," 2018). Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance was tested using Bartlett's test. All data were analyzed using a one- or two-ways ANOVA, with CHO/Protein ratio and sample type (digesta, mucosa) as factors. Tukey's HSD was used as post hoc test. Results with a *P*-value < 0.05 were considered significant. The microbial composition was analyzed

using the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). Beta-diversity was analyzed with the UniFrac dissimilarity index using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)(Anderson, 2017). The mixOmics package was used to perform a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to determine the most discriminant OTUs (F. et al., 2017).

## **Declarations**

## **Acknowledgements**

This research was funded by the CD40 (Departmental Council of the Landes) and the “Université de Pau et Pays de l’Adour “(UPPA). We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, doi:10.15454/1.5572369328961167E12) and Sigenae group for providing help on computing and storage resources. Thanks to Galaxy instance of the Sigenae group <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>. We thank Anthony Lanuque for the fish rearing at the Donzacq experimental fish farm (INRAE, France).

## **Author contributions**

Conceived and designed the experiments: R.D., S.P., K.R. Performed the fish trial: F.T. Performed the experiments and analyzed the data: R.D., J.L., A.S. Critically evaluated all the data and edited the manuscript: R.D., J.L., A.S., F.T., S.P., K.R. Wrote the paper: R.D., J.L., S.P., K.R.

## **Data availability statement**

All sequence data are available at the NCBI sequence read archive under accession numbers: PRJNA1007474

## **References**

- Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M., 2020. Benefits of Dietary Butyric Acid, Sodium Butyrate, and Their Protected Forms in Aquafeeds: A Review. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 28, 421–448.  
<https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899>
- Anderson, M.J., 2017. *Permutational Multivariate Analysis of Variance ( PERMANOVA )* . Wiley StatsRef Stat. Ref. Online 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from

- fishdigestive tracts. *Aquac. Int.* 10, 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1021355406412>
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis* 72. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0441-8>
- Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2021. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2>
- Daisley, B.A., Koenig, D., Engelbrecht, K., Doney, L., Hards, K., Al, K.F., Reid, G., Burton, J.P., 2021. Emerging connections between gut microbiome bioenergetics and chronic metabolic diseases. *Cell Rep.* 37, 110087. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110087>
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A. V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet Rapidly Alters the Human Gut Microbiota. *Nature* 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>. Diet
- Defaix, Raphael, Lokesh, J., Behec, M. Le, Surget, A., Biasutti, S., Terrier, F., Pigot, T., 2023. High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet. *bioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2023.05.02.539058>
- Defaix, Raphaël, Lokesh, J., Frohn, L., Le Behec, M., Pigot, T., Véron, V., Surget, A., Biasutti, S., Terrier, F., Skiba-Cassy, S., Roy, J., Panserat, S., Ricaud, K.B., 2023. Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant-based diet. *Res. Sq.*
- 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>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- F., R., B., G., A., S., K.-A., L.C., 2017. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple



data integration. PLoS Comput. Biol. 13, 1–14.

Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Appl. Environ. Microbiol. 83.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>

Haenen, D., Zhang, J., da Silva, C.S., Bosch, G., van der Meer, I.M., van Arkel, J., van den Borne, J.J.G.C., Gutiérrez, O.P., Smidt, H., Kemp, B., Müller, M., Hooiveld, G.J.E.J., 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine 1–3. J. Nutr. 143, 274–283. <https://doi.org/10.3945/jn.112.169672>

<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>, n.d.

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. Review 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>

Ingerslev, H.C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L., 2014. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. Aquaculture 424–425, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>

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 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>

Karasov, W.H., Martínez Del Rio, C., Caviedes-Vidal, E., 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. Annu. Rev. Physiol. 73, 69–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142152>

LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. Microb. Cell Fact. 16, 1–10.

[https://doi.org/10.1186/s12934-](https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z)

017-0691-z

Legrand, T.P.R.A., Wos-Oxley, M.L., Wynne, J.W., Weyrich, L.S., Oxley, A.P.A., Thibault, C., Legrand, P.R.A., 2021. Dead or alive: microbial viability treatment reveals both active and

- inactive bacterial constituents in the fish gut microbiota. *J. Appl. Microbiol.*  
<https://doi.org/10.1111/jam.15113>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Lokesh, J., Delaygues, M., Defaix, R., Le Behec, M., Pigot, T., Dupont Nivet, M., Kerneis, T., Labbé, L., Goardon, L., Terrier, F., Panserat, S., Ricaud, K., 2023. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *Br. J. Nutr.* 1–40. <https://doi.org/10.1017/s0007114523000120>
- Lokesh, J., Ghislain, M., Reyrolle, M., Le Behec, M., Pigot, T., Terrier, F., Roy, J., Panserat, S., Ricaud, K., 2022. Prebiotics modify host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a total plant-based diet: Potential implications for microbiome-mediated diet optimization. *Aquaculture* 561, 738699. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738699>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014, 1–13.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2015. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A gene duplication trail. *Physiol. Genomics* 47, 253–263.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Merrifield, D.L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S.J., Baker, R.T.M., 2009. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* 40, 1064–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02200.x>
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol.* - B Biochem. Mol. Biol. 129, 243–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5)
- Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N., Kyrpides, N.C., Pati, A., 2015. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by illumina Phix control. *Stand. Genomic Sci.* 10,

1–4. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-18>

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–15110.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>

Oliphant, K., Allen-Vercoe, E., 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* 7, 1–15.

<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>

Panserat, S., Hortopan, G.A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., Corraze, G., 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294, 123–131.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>

Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* 11, 22–29.

[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00067-4)

Pathak, S., Kesavan, P., Banerjee, Anushka, Banerjee, Antara, Celep, G.S., Bissi, L., Marotta, F., 2018. Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. *Polyphenols Mech. Action Hum. Heal. Dis.* 347–359.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00025-8>

Pérez-Pascual, D., Pérez-Cobas, A.E., Rigaudeau, D., Rochat, T., Bernardet, J.-F., Skiba-Cassy, S., Marchand, Y., Duchaud, E., Ghigo, J.-M., 2021. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00107-2>

<https://doi.org/10.1186/s42523-021-00107-2>

Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows.

*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 1015–1045.

<https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna., 2018.

Rasmussen, J.A., Kiilerich, P., Madhun, A.S., Waagbø, R., Lock, E.J.R., Madsen, L., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2023. Co-diversification of an intestinal *Mycoplasma* and its salmonid host. ISME J. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01379-z>

Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., Duchêne, D.A., Puetz, L.C., Delmont, T.O., Sveier, H., Jørgensen, L. von G., Præbel, K., Martin, M.D., Bojesen, A.M., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2021. Genome-resolved metagenomics suggests a mutualistic relationship between *Mycoplasma* and salmonid hosts. Commun. Biol. 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02105-1>

Ray, A.K., Ghosh, K., Ringø, E., 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. Aquac. Nutr. 18, 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amylolytic bacterial lactica cid fermentation - A review. Biotechnol. Adv. 26, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>

Rottem, S., 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. Physiol. Rev. 83, 417–432. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2002>

Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., MacKey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. CellHost Microbe 12, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>

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, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80138-y>

Song, X., Marandel, L., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018a. Hepatic glucose metabolic responses to digestible dietary carbohydrates in two isogenic lines of rainbow trout. Biol. Open 7. <https://doi.org/10.1242/bio.032896>

Song, X., Marandel, L., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018b. Regulation by dietary carbohydrates of intermediary metabolism in liver and muscle of two isogenic lines of rainbow trout. Front. Physiol. 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01579>

Troell, M., Naylor, R.L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P.H., Folke, C., Arrow, K.J., Barrett, S., Crépin, A.S., Ehrlich, P.R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S.A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky,

S., Scheffer, M., Walker, B.H., Xepapadeas, T., De Zeeuw, A., 2014. Does aquaculture address resilience to the global food system? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13257–13263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404067111>

Urán, P.A., Schrama, J.W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J.H.W.M., Koppe, W., Verreth, J.A.J., 2009. Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 15, 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00615.x>

Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y., Wang, G., 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 303, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.025>

Ytrestøl, T., Aas, T.S., Åsgård, T., 2015. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>

Zhao, W., Xie, J.J., Fang, H.H., Liu, Y.J., Tian, L.X., Niu, J., 2020. Effects of corn starch level on growth performance, antioxidant capacity, gut morphology and intestinal microflora of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture* 524, 735197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735197>

**Pas de données additionnelles pour cette étude.**



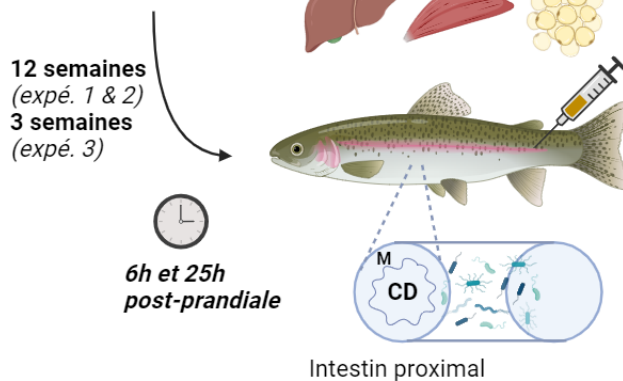
# Chapitre 4 : Discussion générale

---



## Résumé des objectifs

**Aliment 100% végétal**  
**+ Fort en amidon / faible en protéines**  
**+ Prébiotique**



CD : Contenus Digestifs  
M : Mucus

### Métabolisme

- *Foie* : voie de la glycolyse, néoglucogénèse, lipogénèse, bêta oxydation, métabolisme du cholestérol, taux de glycogène
- *Muscles* : voie de la glycolyse, bêta oxydation
- *Tissus adipeux* : glycolyse, lipogénèse, bêta oxydation
- *Tissus intestinaux* : glycolyse, récepteurs *FFAR*
- *Plasma* : glycémie, triglycérides, lactate, cholestérol

### Inflammation

- *Foie* : cytokines pro-inflammatoires
- *Plasma* : lysozyme, oxyde nitrique, anti-trypsine, peroxydase
- *Tissus intestinaux* : protéines inter-membranaires

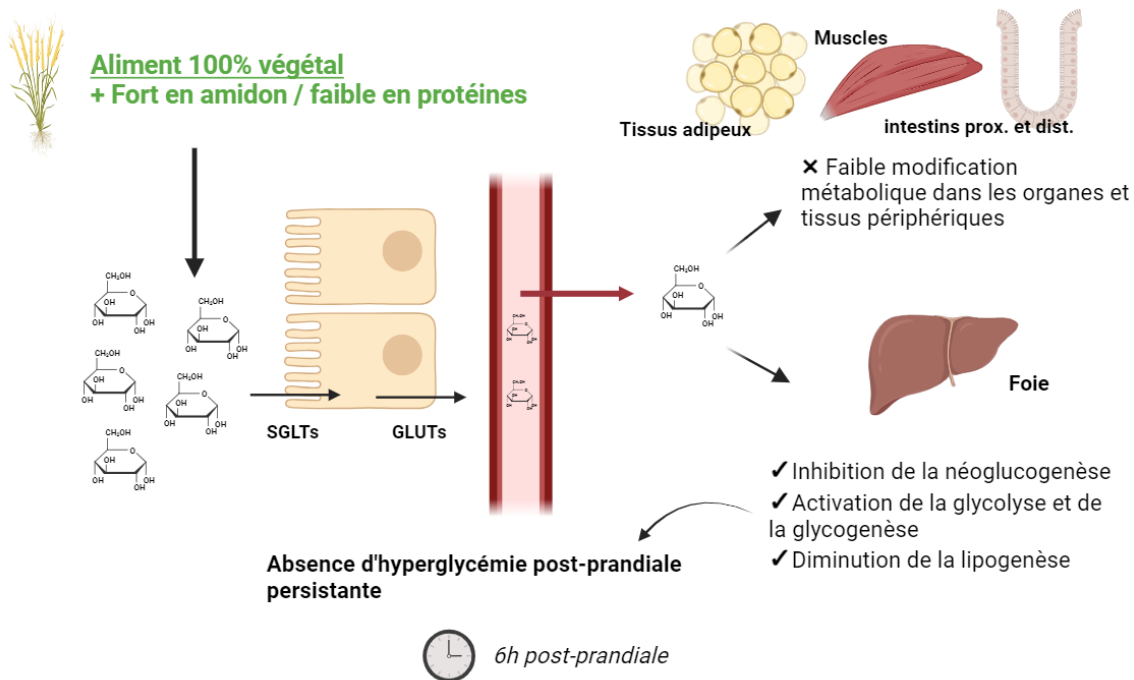
### Microbiote

- *Contenus digestifs* : analyse composition bactérienne (16S), analyse des AGCC (SIFT-MS)
- *Mucus* : analyse de la composition bactérienne (16S), analyse de l'architecture microintestinale (TEM)

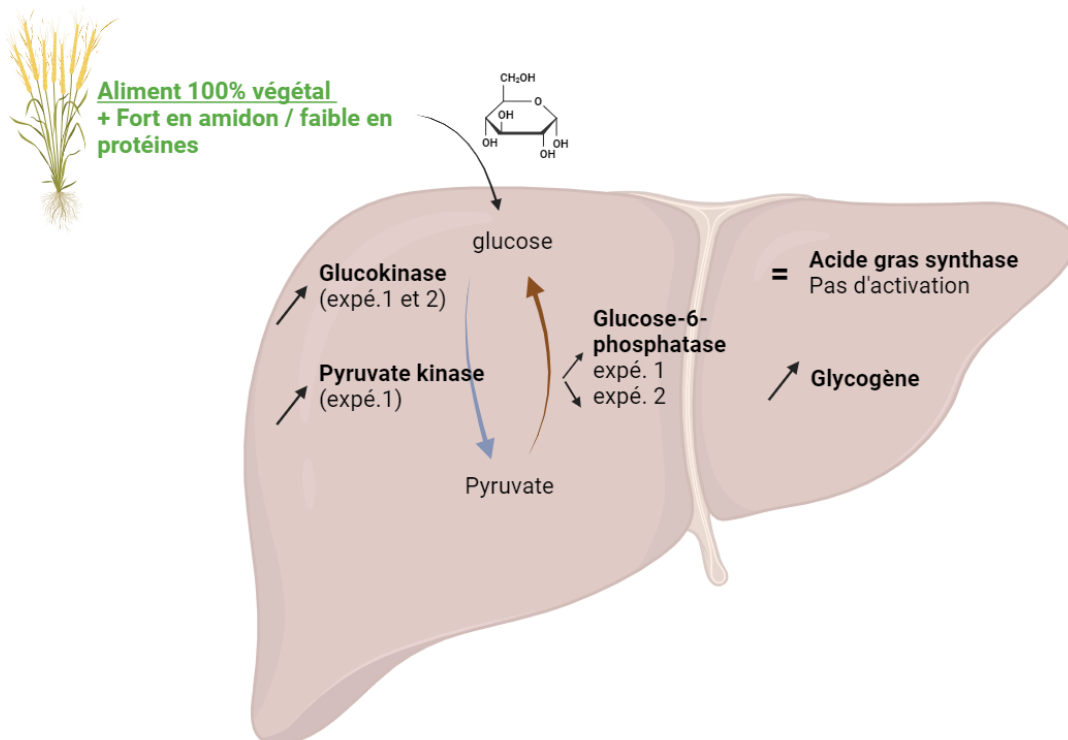
**Figure 62** : Résumé des objectifs et des analyses réalisées lors de la thèse.

## 4.1. Discussion

Cette thèse a pour but de comprendre le rôle du microbiote intestinal dans les mécanismes physiologiques de la truite arc-en-ciel lorsqu'elle est nourrie avec un régime 100% végétal, riche en glucides digestibles, associé à une baisse du taux de protéines végétales (**Figure 62**). En effet, le rôle essentiel du microbiote intestinal des vertébrés dans la dégradation des nutriments est maintenant largement connu (Valdes et al., 2018). Les bactéries sont en capacité de fournir des vitamines, des acides gras et des nutriments à l'hôte (Dhanasiri et al., 2011), ce qui peut affecter la morphologie de l'intestin (Taschuk and Griebel, 2012) et être impliquées au niveau immunitaire (Geuking et al., 2014). La composition du régime alimentaire est un facteur important qui peut modifier à la fois le microbiote intestinal (sa structure et sa fonction métabolique), la réponse métabolique, et plus généralement, la physiologie de l'hôte chez les poissons (Ingerslev et al., 2014; Naya-Català et al., 2021; Yang et al., 2021). Bien que la diversité du microbiote intestinal des poissons ait été caractérisée au cours de la dernière décennie (Heikkinen et al., 2006; Mansfield et al., 2010; Nayak, 2010; Pérez et al., 2010; Tapiapaniagua et al., 2010; Ward et al., 2009), l'effet des changements dans la composition des nutriments liés au niveau de glucides digestibles (amidon) et de protéines doit être étudié, afin d'améliorer l'utilisation de ces ingrédients végétaux. Par conséquent, l'objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet du ratio glucides/protéines chez la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime 100% végétal, sur le microbiote intestinal et le métabolisme, à long terme (après 12 semaines de nutrition), et à court terme (3 semaines de nutrition). De plus, l'effet cumulée de la supplémentation en inuline et de variations du ratio glucides/protéines a aussi été évalué. Ces différentes approches sont intéressantes car, si l'utilisation d'un régime à haute teneur en amidon et son effet important sur le microbiote ont déjà été étudiés dans des régimes contenant des farines et des huiles de poisson (Huang et al., 2021; T. Wang et al., 2021; Y. Zhang et al., 2020), ils n'ont jamais été étudiés avec un régime 100% végétal.



**Figure 63** : Schéma récapitulatif de l'effet de l'aliment riche en glucides, 100% végétal, dans le foie, le muscle, le tissu adipeux et l'intestin.



**Figure 64** : Focus sur le foie, centre du métabolisme intermédiaire - effets de l'aliment riche en glucides sur l'activité enzymatique de la glucokinase, de la pyruvate kinase, de la glucose-6-phosphatase, de l'acide gras synthase et sur le stockage de glycogène.

#### 4.1.1. Incorporation prometteuse de glucides digestibles dans un aliment sans farines et huiles de poisson chez un poisson carnivore : pas de modification des performances de croissance et absence de problèmes métaboliques

Les travaux de cette thèse ont montré que l'incorporation de glucides digestibles (sous forme d'amidon) à un niveau élevé (20%) n'entraînait pas d'effets négatifs sur les performances de croissance de la truite (articles 1 et 2). Cette observation - à confirmer sur un temps plus long d'élevage, et à d'autres stades de développement (voir les perspectives) - montre qu'il est possible d'incorporer des glucides digestibles afin de diminuer la quantité de protéines végétales dans l'aliment (et ses possibles facteurs antinutritionnels associés), mais aussi de réaliser une épargne protéique importante pour la filière aquacole (Naylor et al., 2009). Toutefois, nous n'avons pas vu d'amélioration des performances de croissance avec l'utilisation de glucides digestibles, ce qui aurait été encore plus intéressant.

L'absence d'effet négatif du fort taux de glucides sur les performances de croissance des truites est assez surprenante quand on compare avec des aliments à base de farines et d'huiles de poisson pour lesquels l'apport de 20% de glucides est souvent associé à une baisse de la croissance (Kamalam et al., 2017; Polakof et al., 2012). Mais l'absence d'hyperglycémie post-prandiale chez les truites nourries avec 20% de glucides est encore plus remarquable car (**Figure 63**), quand les truites sont nourries avec un aliment « classique » et contenant 20% de glucides, une glycémie postprandiale supérieure à 1g/L, 6h après le dernier repas, est observée dans tous les cas (Callet et al., 2020; Hemre, Mommsen, 2002; Kamalam et al., 2012; Marandel et al., 2015; Polakof et al., 2012). Cette bonne régulation de l'homéostasie glucidique post-prandiale est associée à une régulation remarquable des principaux acteurs du métabolisme du glucose (glycolyse, néoglucogenèse et glycogénèse) dans le foie, ainsi qu'à une absence d'induction de la lipogenèse hépatique, ce qui, encore une fois, est différent des observations précédentes (Song et al., 2018b, 2018a) (**Figure 64**). L'absence d'induction de la lipogenèse hépatique, associée normalement à des excès de glucose (Yong Jeon et al., 2022), conforte l'idée qu'ici, la truite n'a pas de problème pour utiliser 20% de glucides. Par contre, nos données n'ont pas permis de révéler si d'autres tissus fortement utilisateurs de glucose, comme le muscle (Seilliez et al., 2011) et le tissu adipeux (Kamalam et al., 2012), ou impliqués dans le « *glucose sensing* » (et la sécrétion des hormones comme l'insuline et le glucagon) du pancréas (Sergio Polakof et al., 2010), ou de l'hypothalamus (Otero-Rodiño et al., 2019) ont été dans le cas présent plus efficaces.



En faisant un focus sur la composition de l'aliment et le métabolisme de l'hôte (la discussion sur le microbiote - et son rôle - se fera dans les deux chapitres suivants), nous pouvons émettre des hypothèses afin d'expliquer la bonne utilisation métabolique des glucides chez la truite nourrie avec un aliment 100% végétal, contrairement aux truites nourries avec un aliment « classique ». Il est reconnu que l'aliment végétal (par rapport à un aliment à base de farines et huiles de poisson) apporte des macro- et micro-nutriments en quantité et qualité différentes, qui peuvent avoir des conséquences sur l'utilisation métabolique du glucose par l'hôte.

L'utilisation du glucose ne dépend pas seulement de l'apport en glucides mais aussi des potentielles interactions avec les autres nutriments apportés (Heer and Egert, 2015; Hemre, Mommsen, 2002). Ainsi, un apport élevé en lipides ou en certains types d'acides gras peut amener à une insulino-résistance (Yuan et al., 2020). Idem avec certains acides aminés (en particulier les acides aminés ramifiés), qui sont souvent liés à une modification du métabolisme glucidique (Nishitani et al., 2005). Dans cette thèse l'aliment 100% végétal diffère au niveau de la qualité des protéines et des lipides, même si la formulation essaie de limiter au maximum ces différences. En effet, certaines protéines végétales contiennent des profils en acides aminés différents, nécessitant un apport en acides aminés de synthèse (lysine, méthionine, cystéine) et donc une biodisponibilité modifiée (Gatlin et al., 2007). De même, les huiles végétales, comme l'huile de lin, de tournesol, ou de soja peuvent présenter des taux d'acides gras polyinsaturés (oméga -3 et oméga -6) très différents de ceux retrouvés dans les huiles de poisson (Turchini et al., 2009). Par ailleurs, bien que de nombreux micro-nutriments soient ajoutés dans les formulations alimentaires, il n'est pas évident que l'apport en minéraux ou vitamines soit optimisé par l'utilisation des nouveaux aliments (Hossain et al., 2023; Oliva-Teles, 2012). Or, de nombreuses études ont pu démontrer l'importance de ces micronutriments pour l'amélioration des performances de croissance des poissons et de leur santé (Hossain et al., 2016; Oliva-Teles, 2012; Wang et al., 2019). Il est aussi tout à fait possible que ces micronutriments jouent un rôle particulier pour l'utilisation métabolique des glucides. Finalement, ce qui caractérise en particulier les aliments végétaux c'est l'apport plus important en fibres (Soleimanian et al., 2022). Chez les poissons herbivores ou omnivores, les polysaccharides non-digestibles peuvent être fermentés et utilisés comme sources énergétiques, par le biais des bactéries du microbiote intestinal ayant des capacités cellulolytiques, et amylolytiques (Banerjee and Ray, 2017; Mountfort et al., 2002; Ray et al., 2010; Saha et al., 2006). Même si nous sommes, ici, en présence d'un animal carnivore, nous pouvons supposer que le microbiote intestinal pourrait également jouer un rôle clé dans la dégradation des composés végétaux, et améliorer, d'autant plus, la dégradation de ces glucides digestibles (amidon) présents dans les aliments utilisés lors de nos expérimentations détaillées dans le chapitre suivant.



Nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse d'un effet positif de la matrice « aliment végétal » sur la digestibilité des glucides (étude qui aurait pu être réalisée lors de cette thèse). Il est toutefois à noter qu'avec un taux d'incorporation de 20% de glucides dans des aliments extrudés, la digestibilité des glucides a toujours été élevée (>90%), quel que soit l'aliment aquacole (Krogdahl et al., 2004) et ne semble donc pas être une des hypothèses les plus probables pour expliquer les variations d'utilisation des glucides entre les expériences de cette thèse et celles de la littérature. On ne peut cependant pas écarter la possibilité d'une expression plus élevée des enzymes digestives, comme l'amylase et la maltase (Krogdahl and Bakke-McKellep, 2005), en présence d'un aliment végétal (par rapport à un aliment à base de farines et huiles de poisson) permettant une digestibilité et une biodisponibilité plus rapide du glucose, et ainsi une régulation de l'homéostasie glucidique plus efficace.

**En conclusion, la modification de la teneur en certains nutriments (acides aminés, acides gras, micronutriments) dans les aliments 100% végétaux a permis une meilleure utilisation métabolique du glucose chez la truite arc-en-ciel nourrie avec ces aliments. Il est admis que les poissons omnivores (tilapia) ou herbivores (carpes) utilisent les glucides en plus grande quantité (jusqu'à 35-40%) (Boonanuntanasarn et al., 2018; Cai et al., 2018; Wu et al., 2016; Zhang et al., 2023; Zhou et al., 2013). Il est possible que cette utilisation, plus efficace chez les poissons omnivores et herbivores, soit liée à la composition de leurs aliments qui sont « naturellement » beaucoup plus riches en végétaux.**





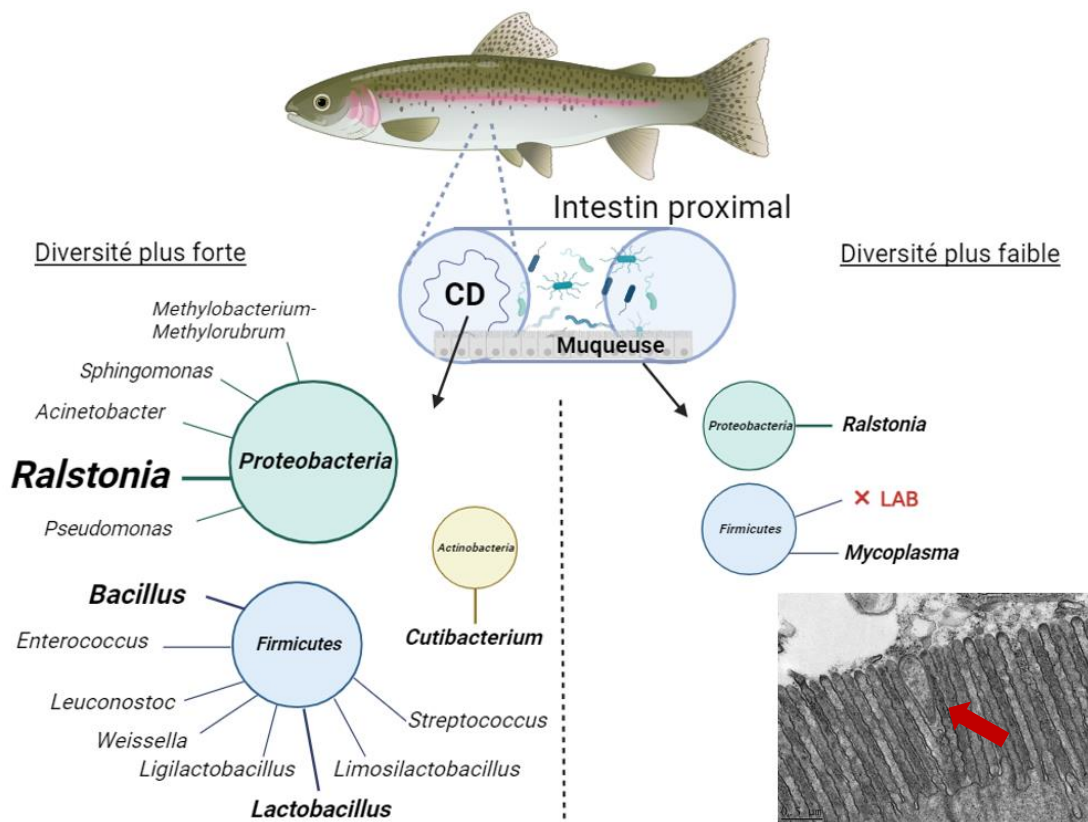
#### 4.1.2. Incorporation de glucides digestibles dans un aliment sans farines et huiles de poisson chez un poisson carnivore : effet sur la diversité du microbiote intestinal

Lors de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de régimes contenant un fort ratio glucides/protéines dans un aliment 100% végétal, pouvait entraîner une modification de la diversité et de la composition du microbiote intestinal. Ainsi, les bactéries capables de dégrader ces nutriments (en particulier les glucides digestibles tels que l'amidon mais aussi les fibres non-digestibles) (Kaoutari et al., 2013) pourraient utiliser ces substrats tout en produisant des molécules clés dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte, pouvant participer au moins partiellement aux changements métaboliques observés (LeBlanc et al., 2017).

Tout d'abord, les travaux visant à étudier la diversité des communautés microbiennes du tube digestif ayant débuté depuis une petite décennie, et rarement avec des régimes végétaux, il était important de nous intéresser au microbiote conservé des salmonidés ou « *core microbiota* ».

##### **Microbiote conservé des salmonidés**

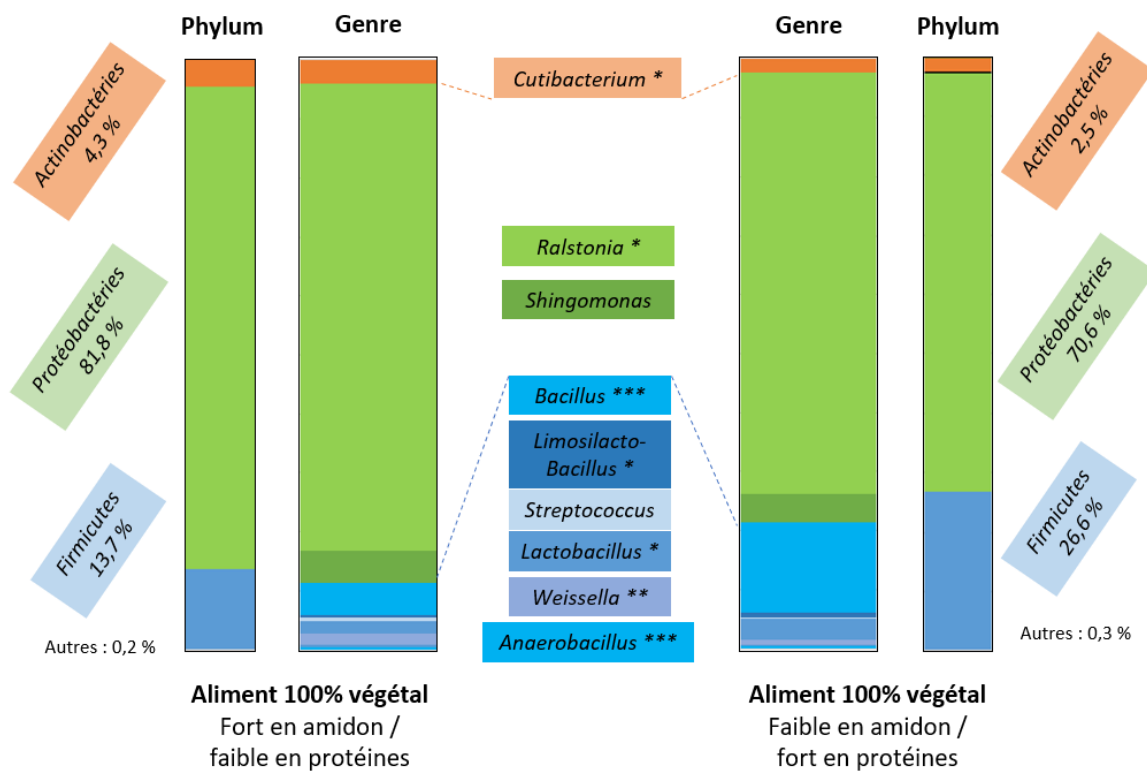
Les résultats obtenus dans nos trois études sont venus confirmer les études précédentes. Ainsi, indépendamment du régime et des groupes expérimentaux, les bactéries des phyla *Proteobacteria* et *Firmicutes* y sont majoritaires (Gajardo et al., 2017; Hines et al., 2022; Li et al., 2021; Lokesh et al., 2023, 2022; Villasante et al., 2022). Au niveau phylogénétique inférieur, le phylum *Proteobacteria* est dominé par les bactéries du genre *Ralstonia* (dans nos 3 études) tandis que le genre *Mycoplasma* domine les *Firmicutes* dans les 2 études où nous avons étudié le microbiote associé aux contenus digestifs et le microbiote associé aux mucus (articles 1 et 3). De plus, les résultats obtenus au cours de cette thèse nous permettent de démontrer que, quel que soit le régime alimentaire, une différence significative entre le microbiote associé aux contenus digestifs et celui associé au mucus, a été observée, conformément à des travaux antérieurs sur les mammifères et les poissons (Bruni et al., 2022; Gajardo et al., 2017, 2016; Li et al., 2021). La plupart des études portant sur l'effet de l'alimentation sur le microbiote intestinal chez les poissons se sont concentrées uniquement sur les contenus digestifs ou sur la muqueuse, voir les deux en même temps. L'étude d'un seul ou d'un mix des deux pourrait entraîner une mauvaise interprétation de la réponse du microbiote intestinal aux changements d'aliments. Il est intéressant de noter que dans cette thèse (articles 1 et 3), *Ralstonia* domine le microbiote des contenus digestifs alors que *Mycoplasma* est très abondant dans les échantillons de mucus (Bozzi et al., 2021; Lokesh et al., 2023). *Ralstonia* est déjà décrite occasionnellement dans les communautés intestinales de la truite arc-en-ciel (Kim et al., 2007; Lokesh et al., 2023; Rasmussen et al., 2022) mais également celles du tilapia (*Oreochromis niloticus*), du poisson rouge (*Carassius auratus*) et du black-bass (« largemouth bass ») (*Micropterus salmoides*) (Bai et al., 2019; Chen et al., 2023; Huang et al., 2021).



**Figure 65** : Microbiote conservé (*core microbiota*) chez la truite arc-en-ciel nourrie avec un aliment riche en glucides, 100% végétal. La flèche rouge montre une forme pouvant correspondre à une bactérie du genre *Mycoplasma*. Image prise par microscopie électronique à transmission (grossissement 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Mais ce n'est pas le cas dans la plupart des études sur le microbiote intestinal des salmonidés. Toutefois, une étude sur la grande sériole (*Seriola lalandi*) a permis aux auteurs d'identifier à la fois les bactéries actives et inactives, et a montré que *Ralstonia* était plus abondante après élimination des bactéries mortes (Legrand et al., 2021). S'agit-il d'une bactérie présente dans nos environnements d'élevage ? En effet, au sein de nos installations expérimentales, nous avons pu observer la présence de ce genre bactérien dans les échantillons d'eau des bassins mais également dans les aliments donnés aux poissons. Concernant le genre *Mycoplasma*, sa classification a récemment été changée. *Mycoplasma*, qui appartient à la famille des *Mycoplasmataceae*, famille précédemment membre du phylum des *Tenericutes*, a été reclassifiée comme membre des *Firmicutes*, en particulier dans la classe des *Bacilli* (Parks et al., 2018). Le genre *Mycoplasma* peut même quelques fois dominer le microbiote intestinal des salmonidés, en particulier dans le microbiote associé au mucus mais également lorsque les 2 compartiments sont analysés ensemble (Cheaib et al., 2021; Holben et al., 2002; Llewellyn et al., 2016; Lokesh et al., 2022).

Il a été suggéré que ce genre bactérien est souvent étroitement associé à l'hôte en raison de sa vulnérabilité liée à la perte de paroi cellulaire (Razin, 1992). Cette hypothèse est cohérente avec la dominance de ce genre dans le microbiote associé au mucus dans nos travaux, sauf pour l'expérimentation 2 où nous avons décidé de nous intéresser uniquement au microbiote associé aux contenus digestifs. Chez les poissons, le genre *Mycoplasma* a été identifié comme bactéries commensales et non comme pathogènes (comme cela peut être le cas chez d'autres animaux). En effet, la caractérisation récente du génome de 3 espèces du genre *Mycoplasma* issues de saumon suggère un mécanisme de coévolution important entre le saumon et les souches de *Mycoplasma* (Rasmussen et al., 2021). Les souches trouvées chez le saumon et la truite sont très proches d'une souche pathogène intracellulaire humaine respiratoire et urogénitale *Mycoplasma penetrans* (Rasmussen et al., 2021). En outre, une étude utilisant l'hybridation *in situ* a permis de démontrer que les souches de *Mycoplasma* chez le saumon sont intracellulaires (Cheaib et al., 2021). De plus, l'absence de gènes de pathogénicité dans les souches de salmonidés (Rasmussen et al., 2021) suggère une relation mutuellement bénéfique, comme cela a été observé chez l'espadon où le genre *Mycoplasma* lui fournit de la biotine dans un environnement pauvre en nutriments (Lian et al., 2020) et participe à la défense de l'hôte (Bozzi et al., 2021). Nous avons également observé des structures morphologiques ressemblant au genre *Mycoplasma* (**Figure 61 & 65**) sur les microvillosités des cellules épithéliales, avec une forme de goutte caractéristique d'une bactérie intracellulaire appartenant au genre *Mycoplasma* (Rottem, 2003). Il est aujourd'hui nécessaire de se pencher sur le rôle de ces bactéries au vu de leur coévolution forte avec les poissons.

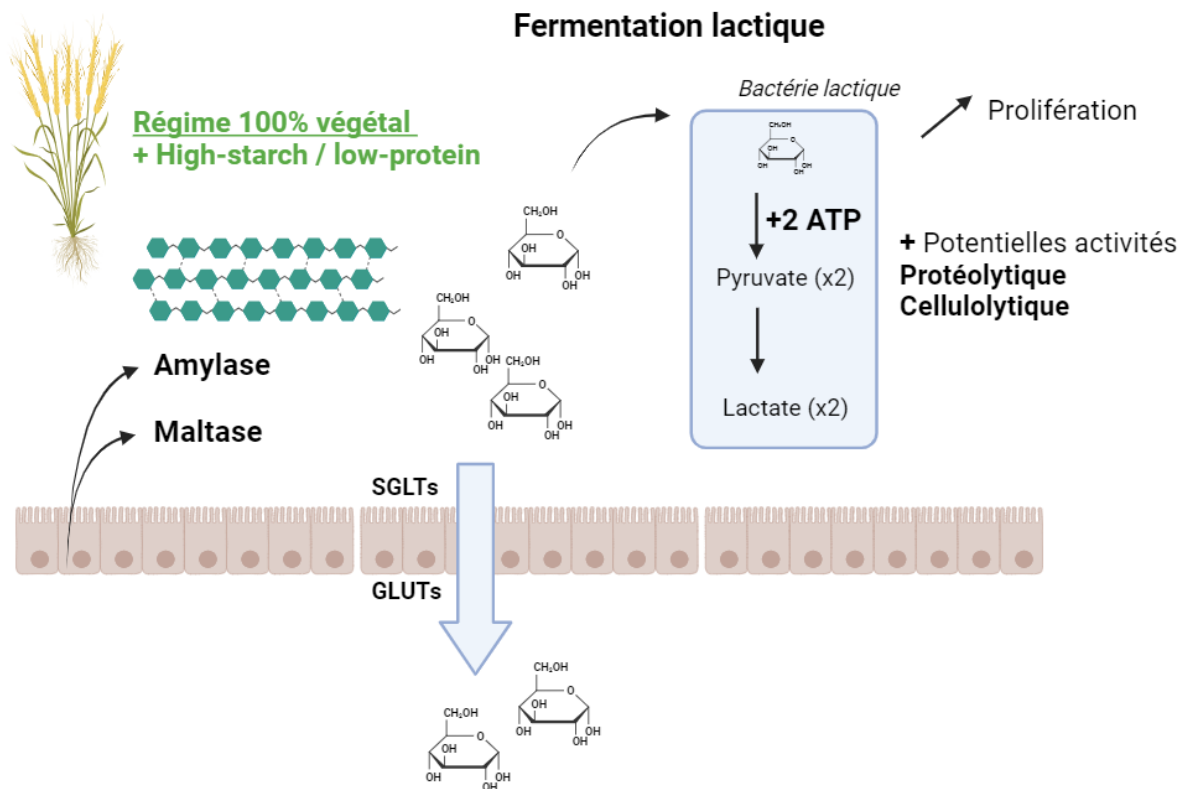


**Figure 66 :** Représentation de l'effet de l'utilisation de l'aliment riche en glucides, sur la composition du microbiote intestinal, au niveau des phyla et au niveau des genres, de la truite arc-en-ciel dans les contenus digestifs. Données issues de la première expérimentation.

Dans nos études, la présence de *Mycoplasma* dans les mucus des truites pourrait donc être le signe d'un microbiote en « bonne santé » et avec le recul, il aurait été pertinent de nous intéresser au microbiote associé au mucus dans notre deuxième étude, d'autant plus avec la supplémentation en inuline.

### **Effet du ratio glucides/protéines sur la composition et la diversité du microbiote intestinal**

Concernant l'effet de l'aliment sur la diversité du microbiote intestinal, nous avons observé qu'il dépendait de l'origine de l'échantillon. Le microbiote associé aux contenus digestifs est plus affecté par le régime alimentaire que le microbiote associé au mucus (articles 1 et 3). Ainsi une diminution significative de la diversité (alpha et bêta pour l'article 1, bêta uniquement pour les articles 2 et 3) et de la richesse microbienne a été observée dans les contenus digestifs des truites nourries avec un régime riche en amidon, comme décrit précédemment chez les poissons nourris avec un taux élevé d'amidon associé à des farines et huiles de poisson (Gajardo et al., 2017; Huang et al., 2021; Morrison and Preston, 2016). Inversement, aucun changement dans les diversités alpha et bêta n'a été observé dans les échantillons de mucus, suggérant que le microbiote associé à celui-ci n'est pas modifié et est plus résistant aux changements de régime alimentaire. Ainsi, il a déjà été démontré que les microorganismes transitoires dans les contenus digestifs sont influencés par de multiples facteurs abiotiques tels que le régime alimentaire ou l'environnement, tandis que la muqueuse contient davantage de microbes résidents qui sont plus influencés par l'hôte (Legrand et al., 2021). Apparemment, chez la truite arc-en-ciel, les bactéries capables d'utiliser les glucides alimentaires sont plus abondantes dans les contenus, comme cela a été observé précédemment (Lokesh et al., 2023). Si chez les mammifères, le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* est utile pour comprendre le lien avec le régime alimentaire, chez les poissons, le rapport *Firmicutes/Proteobacteria* est plus pertinent en raison de la faible abondance des *Bacteroidetes* dans le microbiote des poissons (Desai et al., 2012). Cette différence peut s'expliquer par la forte abondance des phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria* dans le microbiote intestinal des salmonidés. La haute teneur en amidon (correspondant à un rapport glucides/protéines élevé) a conduit à une augmentation de l'abondance des *Proteobacteria*, mais aussi des *Actinobacteria* (troisième phyla dans nos travaux), et à une diminution des *Firmicutes* (**Figure 66**) entraînant une diminution du rapport *Firmicutes/Proteobacteria*, dans nos deux premières études (les différences observées dans la troisième expérimentation pouvant être liées à la durée de l'expérimentation, elles seront discutées dans un paragraphe séparé). Ceci a déjà été décrit chez les salmonidés nourris avec des régimes à base de FM/FO (Gajardo et al., 2017; Huang et al., 2021; Morrison and Preston, 2016).



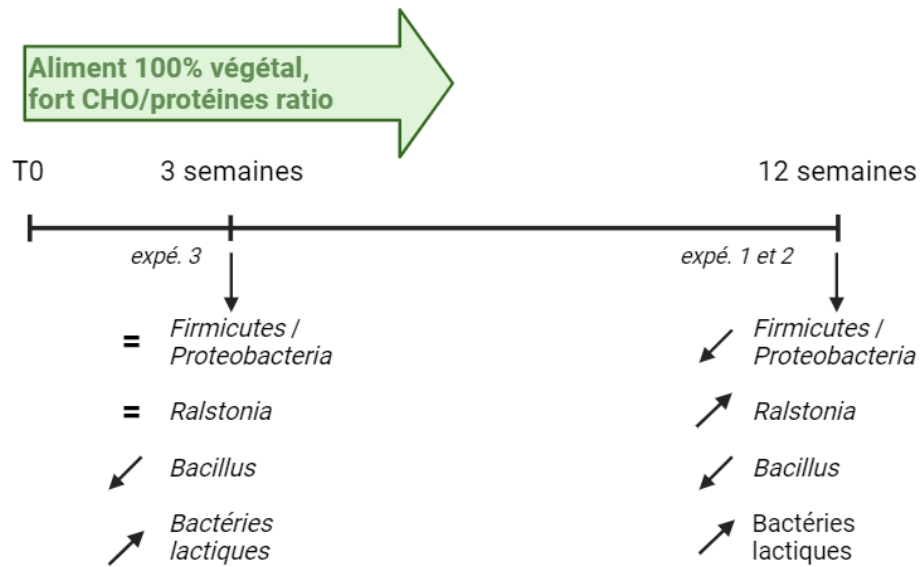
**Figure 67** : Hypothèse quant à la prolifération des bactéries lactiques en présence d'un aliment riche en glucides, 100% végétal. Utilisation métabolique du glucose comme source énergétique chez les bactéries lactiques.

Dans les groupes expérimentaux à forte teneur en amidon, la diminution du rapport *Firmicutes/Proteobacteria* peut sembler surprenante, étant donné le niveau élevé de glucides digestibles dans ces groupes, et qu'il est avéré que de nombreuses bactéries appartenant aux *Firmicutes* ont la capacité de coder pour des enzymes actives sur les glucides digestibles (CAZymes), permettant la dégradation des polysaccharides (Kaoutari et al., 2013). Cependant, cette diminution peut être associée aux abondances significativement plus faibles du genre *Bacillus*, dans les groupes à forte teneur en amidon (et cela pour les 3 études).

Ainsi, cette diminution pourrait partiellement s'expliquer par le fait que les bactéries *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus* ont été décrites chez les poissons comme productrices de protéases (Banerjee and Ray, 2017; Das et al., 2014; Esakkiraj et al., 2009). Toutefois, certaines espèces comme *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* sont également connues pour dégrader les polysaccharides (Manzo et al., 2011), ce qui montre la complexité de telles études sur le microbiote. Qu'en est-il des bactéries du genre *Bacillus* identifiées dans nos études ? Sont-elles productrices de protéases ou capables de dégrader les polysaccharides, ou les deux ? Cet exemple montre également les limites des analyses du microbiote par l'approche métagénomique 16S et va nécessiter des futures études pour comprendre le rôle de ces bactéries (voir Perspectives). Par conséquent, dans un régime riche en amidon présentant une quantité plus faible de protéines végétales, il n'est pas surprenant d'observer la diminution de l'abondance de ce genre bactérien.

De plus, et c'est le cas pour nos 3 études, plusieurs membres du groupe des bactéries lactiques appartenant aux *Firmicutes* ont été identifiées comme plus abondantes avec le ratio glucides/protéines élevé, *Limosilactobacillus* par exemple. Il est intéressant de noter que ces bactéries sont connues pour métaboliser les glucides digestibles (comme l'amidon) et extérioriser leurs composés phytochimiques bioactifs (Theilmann et al., 2017). En outre, ces bactéries lactiques ont été trouvées en plus grande proportion chez les truites arc-en-ciel nourries avec un régime à base de plantes par rapport à un régime FM/FO (Ingerslev et al., 2014; Lokesh et al., 2023; Pérez-Pascual et al., 2021). De plus, chez les poissons herbivores et omnivores, la présence en grande quantité de ces bactéries lactiques a déjà été démontrée (Bucio et al., 2006; Hagi et al., 2004; Pardesi et al., 2022). Ces différentes bactéries lactiques, en particulier *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, peuvent présenter une relation symbiotique avec l'hôte (Pessione, 2012) et sont capables de produire du lactate par fermentation lactique (Pessione, 2012; Wolfe, 2015) (**Figure 67**).





**Figure 68** : Comparaison de la modulation du microbiote intestinal associé aux contenus digestifs, après 3 semaines et 12 semaines de nutrition avec l'aliment riche en glucides, 100% végétal.

Des différences d'abondance, dont différents membres des LAB, ont été identifiées comme discriminantes pour expliquer les séparations observées entre les communautés microbiennes des truites avec un faible ou fort ratio glucides/protéines suggérant un rôle important à étudier dans le cadre de l'amélioration de l'utilisation des régimes végétaux chez les salmonidés (cf. Perspectives). Toutefois, il est important de rappeler que suite à la préparation des aliments (extrusion), la majorité de l'amidon est directement dégradée par les amylases de la truite (au-dessus de 90%), et qu'il ne reste qu'une faible proportion d'amidon accessible au microbiote intestinal.

### **Comparaison des effets du ratio glucides/protéines sur le microbiote intestinal à court terme**

Notre troisième étude nous a permis d'évaluer si, après seulement 3 semaines d'un régime avec un ratio élevé glucides/protéines, une modulation rapide du microbiote est remarquée. En effet, il a été clairement démontré que les modifications nutritionnelles influencent à long terme la diversité du microbiote intestinal chez la truite arc-en-ciel (Ingerslev et al., 2014; Li et al., 2021; Lokesh et al., 2023, 2022; Pérez-Pascual et al., 2021; Terova et al., 2021; Weththasinghe et al., 2022). Cependant, on ne perçoit pas encore clairement si le microbiote intestinal des poissons répond rapidement ou non aux changements de régime après le changement d'alimentation. Chez l'homme, quelques jours suffisent pour détecter une modification des communautés microbiennes après un changement drastique de régime alimentaire (David et al., 2014). De plus, il est intéressant de noter que lorsque des porcs sont nourris avec un régime à haute teneur en amidon résistant, des changements dans la composition du microbiote et dans les concentrations en acides gras saturés sont observés, dès deux semaines après leur introduction (Haenen et al., 2013). Dans notre étude, nous confirmons, comme dit précédemment, la prédominance des phyla *Proteobacteria* et *Firmicutes* composés majoritairement et respectivement par les genres *Ralstonia* et *Mycoplasma* ainsi que les différences observées au niveau des microbiotes associés au mucus ou aux contenus digestifs. Ainsi, dès trois semaines, une augmentation de l'abondance de certaines bactéries lactiques a été observée pour le groupe nourri avec le fort ratio glucides/protéines (*Ligilactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus*), genres bactériens déjà décrits dans nos deux autres études à long terme (**Figure 68**). Cela suggère une modulation rapide du microbiote intestinal en faveur de bactéries connues pour avoir des capacités amylolytiques, notamment via la production d'amylases (Reddy et al., 2008; Xu et al., 2020). Nous confirmons également, dès 3 semaines, la diminution du genre *Bacillus*, déjà observée lors de nos deux premières études. Des différences majeures sont observées avec nos études à long terme : il n'y a pas de diminution du ratio *Firmicutes/Proteobacteria* qui s'explique au moins partiellement, par une absence d'augmentation du genre *Ralstonia*, contrairement à ce que nous avons observé dans nos études à long terme.



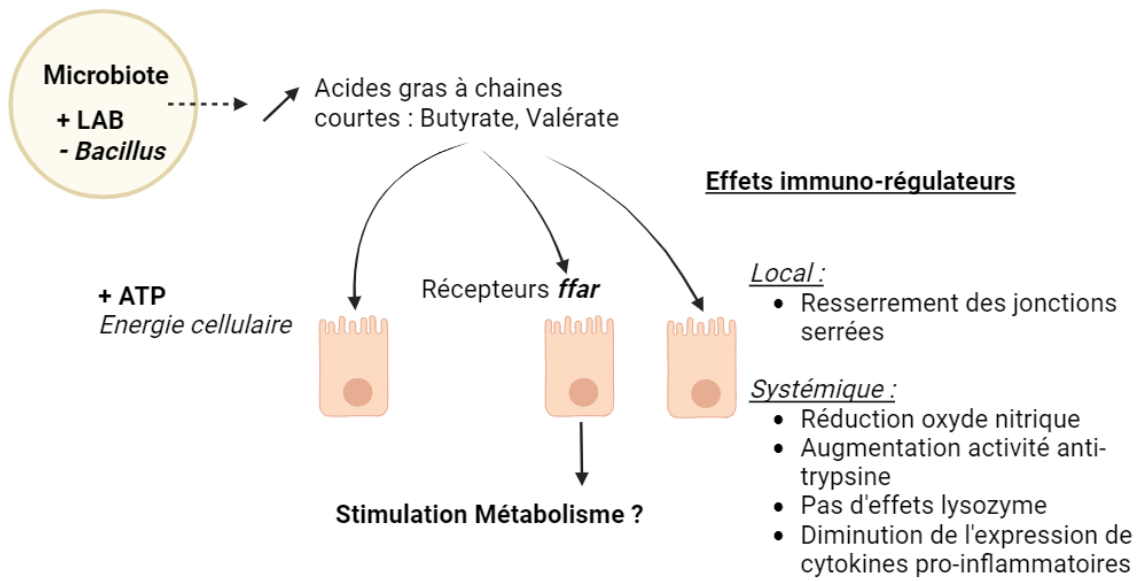
Cette bactérie, non systématiquement observée dans les communautés microbiennes des salmonidés, pourrait provenir de l'environnement ou de l'aliment et nécessiterait une plus grande période d'alimentation pour proliférer dans le tractus intestinal des truites présentes dans nos installations expérimentales. De plus, les communautés microbiennes observées dans le mucus sont très proches de celles identifiées dans la première étude à long terme, suggérant une stabilité de ce microbiote associé à ce compartiment et une plus forte résilience au changement d'alimentation.

**En conclusion, l'utilisation d'un régime 100 % végétal associé à un ratio élevé glucides/protéines chez la truite arc-en-ciel, modifie la diversité des communautés microbiennes associées aux contenus digestifs et non au mucus, plus résilientes au changement alimentaire. Des bactéries membres de la familles des LAB, sont connues, en particulier, pour leurs capacités amylolytiques grâce, notamment à la présence de nombreux gènes codant pour des CAZymes (glycosides hydrolases) (Kaoutari et al., 2013). Elles sont présentes en plus grande abondance chez les truites nourries avec un ratio élevé glucides/protéines et ce, dès 3 semaines, suggérant une adaptation rapide du microbiote intestinal à ces glucides. Ces bactéries lactiques sont de plus, présentes en grande proportion chez les poissons herbivores et omnivores (Bucio et al., 2006; Hagi et al., 2004; Pardesi et al., 2022). Pour finir, ces bactéries sont connues également pour leur production d'acides gras à chaîne courte, molécules clés du dialogue microbiote-hôte.**



#### 4.1.3. Les acides gras à chaîne courte et autres métabolites bactériens, des molécules clés dans le dialogue moléculaire microbiote-hôte ?

Pour expliquer en partie l'interaction entre le microbiote et l'hôte, les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont des candidats pertinents : ce sont des produits de la fermentation de glucides non digestibles (mais aussi des glucides digestibles) qui deviennent disponibles pour le microbiote intestinal (Martin-Gallausiaux et al., 2021; Morrison and Preston, 2016). En outre, les AGCC peuvent également être produits par la fermentation d'acides aminés (Morrison and Preston, 2016). L'effet bénéfique des AGCC et d'autres métabolites bactériens (lactate, vitamines, etc.) notamment produits par les bactéries lactiques, sur le métabolisme et la santé de l'hôte, est très bien décrit chez les mammifères, mais peu étudié chez les poissons (Abdel-Latif et al., 2020; Scott et al., 2013). De manière plus précise, les AGCC servent de source d'énergie pour les cellules épithéliales (Bergman, 1990; Sakata and Yajima, 1984) et conduisent à l'activation des récepteurs d'acides gras libres (*ffar*). Les AGCC sont également transportés vers le foie via la veine porte et sont impliqués dans différentes voies métaboliques : lipogenèse *de novo*, production de cholestérol, stockage des lipides (Demigné et al., 1995; Giudetti and Gnoni, 1997; Hara et al., 1999), ainsi que dans l'homéostasie du glucose par la régulation des gènes de la gluconéogenèse (De Vadder et al., 2014; Soty et al., 2015). En outre, les AGCC jouent un rôle important dans la régulation de l'intégrité de la barrière épithéliale de la muqueuse intestinale (Patrice D. Cani et al., 2008) et ont des fonctions anti-inflammatoires (Lührs et al., 2009; Nastasi et al., 2015).



**Figure 69 :** Hypothèses liées à l'augmentation de la concentration en acides gras à chaîne courte chez les truites nourries avec l'aliment riche en glucides : effet potentiel sur l'énergie cellulaire, la stimulation du métabolisme de l'hôte, et la régulation de l'inflammation au niveau local et systémique.

Dans nos deux premières études, il est intéressant de noter que deux AGCC, le butyrate et le valérate, sont plus abondants dans les groupes à forte teneur en amidon. Cette production de molécules clés du dialogue moléculaire microbiote-hôte, en particulier le butyrate, peut avoir plusieurs effets bénéfiques sur la santé intestinale des poissons, et est connue pour améliorer l'immunité (Abdel-Latif et al., 2020; Tawfick et al., 2022) et pour renforcer l'homéostasie du glucose (T. Wang et al., 2021) (**Figure 69**). Cette augmentation pourrait également expliquer en partie la meilleure utilisation du glucose décrite précédemment, cela nécessiterait des études complémentaires. Dans nos études, l'augmentation de la production d'AGCC pourrait être associée à la plus grande présence des bactéries lactiques. Cette augmentation de la production d'acides gras à chaîne courte pourrait s'expliquer, du moins partiellement, par la plus grande abondance des bactéries lactiques observées. Toutefois, cette hypothèse doit être contrebalancée par le fait que certaines bactéries protéolytiques sont aussi capables de produire des métabolites bactériens comme par exemples des acides gras à chaîne courte ramifiée (iso butyrate, iso valérate) (Scott et al., 2013). Il aurait été néanmoins intéressant de détecter également la présence des AGCC lors de notre troisième étude pour confirmer, éventuellement ces augmentations sur une durée d'alimentation plus courte.

Comme indiqué en début de paragraphe, les AGCC ou autres métabolites participent également à la bonne santé de l'animal en ayant des propriétés immuno-régulatrices. Or, la présence de facteurs antinutritionnels contenus dans les ingrédients végétaux peut entraîner chez les salmonidés une baisse de la croissance probablement due à une plus faible prise alimentaire mais aussi à une inflammation chronique de la muqueuse intestinale, appelée entérite (Sahlmann et al., 2013). Chez les salmonidés, l'entérite peut entraîner une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal, ce qui induirait une inflammation et des infiltrations leucocytaires dans la *lamina propria* (Sahlmann et al., 2013). De plus, l'utilisation d'un régime riche en glucides augmente la perméabilité intestinale et induit une inflammation chez les perches chinoises (Y. Zhang et al., 2020) et l'achigan à grande bouche (Huang et al., 2021). Nous avons donc étudié l'expression de gènes codant pour des protéines de la jonction serrée (*tjp*) dans l'intestin. Ces gènes resserrent les jonctions entre les cellules épithéliales pour empêcher le passage des microorganismes pathogènes à travers la barrière épithéliale, induisant la réponse immunitaire de l'hôte (Chasiotis et al., 2012). Dans notre deuxième étude, nous avons observé une réduction de l'expression de *tjp1a* dans le régime avec un ratio élevé glucides/protéines, tout comme celle des gènes *marveld1* et *marveld3*, codant pour des protéines transmembranaires des jonctions serrées. La diminution de l'expression de ces gènes pourrait être directement liée à la réduction des facteurs antinutritionnels connus pour causer des dommages sur les cellules épithéliales (Huang et al., 2021). En effet, la présence de facteurs antinutritionnels dans le régime alimentaire peut induire une réponse immunitaire innée des cellules épithéliales et du foie (Owczarek et al., 2016; Zhao et al., 2018, 2022).





Dans notre étude, une diminution significative de l'oxyde nitrique (NO) plasmatique chez les poissons nourris avec un ratio glucides/protéines élevé a également été observée. Il est intéressant de noter que NO est impliqué dans la défense immunitaire chez la truite arc-en-ciel (Wang et al., 2001), et qu'il est particulièrement lié à l'activation des macrophages dans les sites d'inflammation chez les poissons (Wiegertjes et al., 2016). D'autres études doivent être réalisées pour évaluer le statut inflammatoire des truites, mais ces résultats suggèrent que les régimes formulés avec un fort ratio glucides/protéines peuvent réduire partiellement l'inflammation. En outre, l'induction de NO peut induire l'activation de gènes codant pour des récepteurs pro-inflammatoires, tels que *cxcr4* et *cxcr4.1.1* (Döring et al., 2014; Yasuoka et al., 2008). Dans notre étude, ces gènes sont plus faiblement exprimés avec le régime riche en glucides et cela pourrait également être lié à la plus faible proportion de protéines végétales.

Comme dit précédemment, la présence de facteurs antinutritionnels peut conduire à une inflammation des muqueuses (Iwashita et al., 2008). Un régime riche en amidon chez la truite arc-en-ciel peut également entraîner une production plus élevée de cytokines pro-inflammatoires dans le foie (Zhao et al., 2022), le foie des téléostéens étant connu pour être impliqué dans les réponses immunitaires (Oskar M. Løken et al., 2020; Pignatelli et al., 2014). Il est intéressant de noter que le fort ratio glucides/protéines a induit une diminution significative des gènes *il1b*, *il8* et *tnfa*, ce qui suggère que la réduction de la proportion de protéines végétales peut entraîner une diminution des réponses des cytokines dans le foie. Cela pourrait être lié à la plus forte abondance des bactéries lactiques dont certaines espèces (*Lactobacillus johnsonii*, *Ligilactobacillus*, et *Limosilactobacillus*) entraînent une diminution de nombreux facteurs pro-inflammatoires et limitent la sévérité de l'entérite chez le poulet (Azad et al., 2018; Shojadoost et al., 2022). Une analyse par corrélation entre le microbiote et les paramètres nous a permis d'identifier une corrélation négative entre certaines bactéries lactiques (par exemple *Weisselia* et *Limosilactobacillus* entre autres) et les gènes codant les cytokines pro-inflammatoires. C'est l'inverse pour *Clostridium*, corrélée positivement à l'expression de ces gènes et qui a été décrite comme pouvant induire une entérite chez la poule (Golder et al., 2011), et présente en plus faible abondance chez nos truites nourries avec le régime riche en glucides. En outre, l'augmentation de la proportion en AGCC peut également jouer un rôle important dans la diminution des facteurs pro-inflammatoires. En effet, chez l'homme, comme chez les poissons, les AGCC produits par exemple par les bactéries lactiques (LeBlanc et al., 2017; Oliphant and Allen-Vercoe, 2019), sont connus pour pouvoir induire la stimulation du système immunitaire (Dawood et al., 2020; Kamada et al., 2013; Li et al., 2020). Chez le poisson, le butyrate entraîne une amélioration des paramètres de croissance et de l'architecture micro-intestinale (longueur et nombre des microvillosités). Il augmente aussi la sécrétion d'enzymes digestives, présente des propriétés antioxydantes, et induit une diminution de l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (Abdel-Latif et al., 2020).



Afin de détecter si la production plus élevée d'AGCC dans le groupe nourri avec un fort rapport glucides/protéines peut agir également sur le métabolisme de l'hôte, nous avons étudié l'expression des gènes codant pour les FFAR dans le milieu de l'intestin. En effet, ces récepteurs couplés aux protéines G, participent à la fois à la régulation immunitaire et à la régulation métabolique après activation par les AGCC (Priyadarshini et al., 2018). Chez l'homme, l'activation des FFAR conduit à la production de molécules de signalisation ( $G\alpha q/11$  ou  $G\alpha i/o$ ) favorisant la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Prentki et al., 2013). Ces classes de récepteurs ont déjà été caractérisées dans l'intestin de la truite arc-en-ciel et il a été démontré qu'elles étaient régulées lorsque les poissons étaient nourris avec un régime à base de plantes (Lokesh et al., 2023, 2022; Roy et al., 2023). Nous avons ici observé que le ratio glucides/protéines élevé entraîne une diminution d'expression des gènes codant tous les récepteurs FFAR (*ffar1*, *ffar2a1*, *ffar2a1a*, *ffar2b1a*, *ffar2b1b*, *ffar2b2a* et *ffar2b2b1*). En outre, il est connu que la stimulation chronique (ici pendant 12 semaines d'alimentation) des récepteurs couplés aux protéines G, conduit au recrutement de  $\beta$ -arrestines empêchant une stimulation supplémentaire des voies de signalisation en aval (Gainetdinov et al., 2004; Rajagopal and Shenoy, 2018). Dans l'intestin proximal (midgut), la diminution de l'expression de ces récepteurs clés reflète donc probablement leur désensibilisation (ce qui reste à démontrer chez les poissons) après avoir été stimulés par les AGCC. Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains prébiotiques augmentent la production d'AGCC via le microbiote intestinal modifiant le métabolisme glucidique chez la brème, le bar, le sar et le tilapia (Chen et al., 2022; Guerreiro et al., 2018, 2015; T. Wang et al., 2022). Ainsi, des corrélations similaires entre les abondances bactériennes et des paramètres métaboliques ont été observées lors des deux premières études. Même si ce n'est pas forcément lié aux AGCC, la bactérie lactique *Weissella*, dont on sait qu'elle est plus abondante dans les groupes avec un fort ratio glucides/protéines, est systématiquement positivement corrélée à l'activité de la glucokinase et à la quantité de glycogène stockée dans le foie. De plus, les bactéries non-lactiques du genre *Bacillus* sont, elles, négativement corrélées aux activités enzymatiques de la glucokinase, pyruvate kinase, ou encore à la quantité de glycogène stockée dans le foie. En outre, des corrélations entre des paramètres métaboliques et l'abondance de différentes bactéries lactiques (*Weissella*, *Lactobacillus*) ont également été mises en évidence chez les truites nourries avec des régimes 100% végétaux (Lokesh et al., 2023, 2022). Toutefois, ce ne sont que des corrélations, identifiées certes dans nos différentes expérimentations mais qui nécessitent des études supplémentaires pour comprendre l'effet du microbiote intestinal les mécanismes sous-jacents, qu'il s'agisse de l'effet sur le métabolisme, ou sur le système immunitaire.



**En conclusion, la modification des communautés bactériennes du microbiote observée chez les truites nourries avec le fort ratio glucides/protéines, en lien avec une abondance relative de bactéries lactiques plus élevée mais également une plus forte production d'acides gras à chaîne courte, pourrait participer à la bonne régulation de l'homéostasie glucidique. De plus, ces modifications semblent également être bénéfiques pour la santé des poissons, en ce qui concerne l'intégrité de l'intestin (par l'expression des gènes de la jonction serrée) et la réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le foie.**

#### **4.1.4 La supplémentation du prébiotique inuline dans un régime 100% végétal - bien que prometteuse dans des études antérieures - n'a pas eu les effets attendus chez la truite nourrie avec un ratio glucides/protéines élevé**

L'un des objectifs de la thèse était d'étudier l'effet de la supplémentation en inuline dans un régime à faible ou fort ratio glucides/protéines (étude 2). En effet, l'inuline est largement utilisée en aquaculture pour ses effets bénéfiques. L'inuline est connue pour améliorer les performances de croissance des poissons (Ibrahim et al., 2010; Ringø et al., 2010; Rohani et al., 2022; Tiengtam et al., 2015) et pour être associée à une plus grande activité des enzymes digestives intestinales telles que la protéase, l'amylase et la lipase, conduisant à une meilleure disponibilité des nutriments pour l'hôte et pour le microbiote (Anguiano et al., 2013; Soleimani et al., 2012). En outre, l'utilisation de l'inuline est connue pour induire un changement dans la diversité des microorganismes tels que les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Weissella*) et le genre *Bacillus* (Hoseinifar et al., 2011; Lokesh et al., 2022). Cette modulation du microbiote par l'utilisation de prébiotiques peut induire la prolifération de bactéries intestinales bénéfiques qui stimulent la réponse immunitaire et limitent la prolifération de bactéries pathogènes (Ortiz et al., 2013; Soleimani et al., 2012; Syed Raffic Ali et al., 2018; Tiengtam et al., 2015). De plus, il a été démontré que l'incorporation d'inuline dans l'alimentation réduit les troubles métaboliques induits par un régime riche en glucides chez le tilapia, via la modification de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques et immunitaires (T. Wang et al., 2021), ce qui suggère une meilleure utilisation d'un niveau élevé de glucides alimentaires. L'utilisation de l'inuline en combinaison avec un régime 100% végétal (sans supplémentation en glucides) a également été testée chez la truite arc-en-ciel juvénile (Lokesh et al., 2023, 2022). Ces études ont montré que l'utilisation de 2% d'inuline entraînait une expression plus élevée de plusieurs gènes impliqués dans différentes voies métaboliques (c'est-à-dire la gluconéogenèse et la glycolyse), et une expression plus élevée des gènes des récepteurs d'acides gras (*ffar*) dans le foie.



De plus, dans les groupes supplémentés en inuline, des abondances différentielles de *Lactobacillus* et de *Bacillus* ont été observées, ce qui pourrait indiquer un "axe prébiotiques-microbiome-hôte". L'ensemble de ces études a montré que l'inuline pourrait être un ingrédient prometteur, à incorporer dans un régime alimentaire à base de plantes à 100% et à forte teneur en glucides. Fort des résultats encourageants de la supplémentation d'inuline dans un régime 100 % végétal, mais également de l'effet du ratio glucides/protéines dans notre première expérimentation, nous avons souhaité combiner les deux en espérant un effet synergique.

De façon surprenante, les effets bénéfiques de l'incorporation d'inuline, observés précédemment, n'ont pas été démontrés dans notre étude. Au contraire, la supplémentation en inuline a été associée à une diminution significative des performances de croissance (et cela indépendamment du ratio glucides/protéines) et à une baisse de l'efficacité alimentaire. L'inuline n'a eu que peu d'effets sur la composition du microbiote, sur la production AGCC dans l'intestin, et n'a pas eu d'effets bénéfiques ni sur les paramètres du métabolisme du glucose, ni sur le statut inflammatoire.

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses (non exclusives les unes par rapport aux autres) afin d'expliquer ces données surprenantes : **(i)** L'aliment testé ici est un aliment 100% végétal qui contient beaucoup plus de fibres (et prébiotiques) qu'un aliment avec farines et huiles de poisson. Il est possible que l'apport de 2% d'inuline puisse être dilué par les fibres de l'aliment, et n'entraîne donc pas de modifications significatives du microbiote et du métabolisme. **(ii)** L'inuline est un prébiotique utilisé chez l'homme pour réduire certaines maladies métaboliques (obésité, maladies cardiovasculaires, diabètes) (Delzenne et al., 2011; Fernandes et al., 2017; Vandeputte et al., 2017) ; elle diminue le syndrome métabolique chez le tilapia (poisson omnivore) nourri avec plus de 40% de glucides (Wang et al., 2021). Lors de cette thèse, nous n'avons pas détecté de dérégulation de l'homéostasie glucidique et lipidique chez la truite nourrie avec un taux élevé en glucides ; on peut donc supposer que l'effet prometteur de l'inuline sur le métabolisme ne peut se révéler avec les études présentes. **(iii)** Si nous recherchons les effets de l'inuline sur le microbiote intestinal en comparant les deux aliments, il faut souligner ici qu'il existe déjà des effets importants du ratio glucides/protéines sur l'abondance de nombreuses bactéries du microbiote. Cet effet important pourrait avoir partiellement « masqué » l'effet potentiellement existant, mais faible, de l'inuline sur l'abondance de certaines bactéries intestinales.

**Il est important de noter ici que ces hypothèses concernant les effets surprenants de l'inuline sont malgré tout assez fragiles et nécessitent des travaux complémentaires (voir le chapitre Perspectives) pour avoir une vision plus précise de l'effet de l'inuline chez la truite nourrie avec ou sans glucides dans un aliment 100% végétal.**





## 4.2. Perspectives

En combinant des approches de métagénomique 16S pour l'étude du microbiote intestinal, des études moléculaires du métabolisme mais aussi de nutrition, le travail de cette thèse nous a permis d'identifier un certain nombre de pistes pour améliorer l'utilisation des régimes 100% végétaux chez la truite arc-en-ciel dans un contexte de développement spectaculaire de l'aquaculture et la nécessité de proposer des nouveaux aliments dépourvus de farines et huiles de poisson.

### De nouvelles pistes de recherche

Des travaux étudiant l'ajout de glucides digestibles dans des aliments aquacoles et leur effet sur le microbiote intestinal, existent pour de nombreuses espèces de poissons mais leur incorporation n'a jamais été testée dans des régimes 100% végétaux, en particulier chez des espèces carnivores.

*Des aliments encore plus riches en glucides...*

Ainsi, l'incorporation de glucides digestibles (sous forme d'amidon) à un niveau élevé (20%) n'entraîne pas d'effets négatifs sur les performances de croissance de la truite. Il est donc possible d'incorporer ces glucides digestibles et de diminuer les protéines végétales et leurs facteurs nutritionnels associés. Il est maintenant nécessaire de le confirmer dans d'autres conditions, notamment sur des temps plus longs, à différents stades de développement, mais également avec des taux d'incorporation glucidiques plus élevés.

*Vers l'incorporation de glucides à différents stades de développement et l'élaboration de nouvelles stratégies nutritionnelles...*

En effet, quelles seraient les réponses de la truite si nous incorporions des niveaux plus élevés de glucides (25, 30%, etc.) dans son alimentation ? De tels niveaux d'incorporation de glucides chez les truites juvéniles sont associés à des troubles métaboliques lorsqu'ils sont ajoutés à un aliment à base de farines et huiles de poisson mais ce n'est pas le cas pour les géniteurs mâles et femelles qui s'adaptent bien à de tels niveaux d'incorporation (Callet et al., 2020; Favalier et al., 2023). Il serait donc pertinent de tenter une approche similaire à celle réalisée dans le cadre de cette thèse, à différents stades du développement : truites juvéniles, géniteurs, mais aussi effet sur le sexe et bien sûr au stade alevin. Ici, nous avons testé deux durées d'expérimentations sur des truites juvéniles, à savoir, 3 et 12 semaines de nutrition. Mais, dans un contexte de remplacement total des farines et huiles de poisson, il sera nécessaire dans un futur proche, que nous soyons en mesure de proposer des régimes 100% végétaux dès le premier repas. Cependant, il est encore difficile de proposer un régime dépourvu de farines et huiles de poisson, à ce stade, sans avoir d'effets négatifs sur les poissons.



Ainsi, nous avons, dans cette thèse, nourri dès le premier jour les truites avec des glucides dans un régime 100% végétal (sans farines et huiles de poisson) afin de tester si une adaptation à plus long terme pouvait être observée. Malheureusement, l'expérimentation n'a pas pu être menée à terme à cause de problèmes sanitaires (déformations, mortalités) apparus au bout de 2 mois d'alimentation après le premier repas. Cette alimentation « premier repas » avec glucides et sans farines et huiles de poisson pose encore de nombreuses questions. Nous devrions peut-être commencer cette alimentation plus tardivement (1 mois après le premier repas, par exemple) afin de faciliter l'adaptation, à long terme ou alors les alimenter dès le premier repas, avec un aliment riche en glucides sans ressources marines, mais pendant un temps court afin de mettre en place une programmation nutritionnelle du métabolisme (du glucose en particulier) (Panserat et al., 2019). Idéalement, il s'agirait d'identifier la limite maximale d'incorporation de glucides digestibles selon les stades de développements afin de baisser la quantité de protéines végétales dans l'aliment, sans conséquences négatives sur la croissance, la qualité de la chair, la robustesse, la santé et le bien-être du poisson.

#### *Détermination des bactéries intestinales liées à l'amélioration de l'utilisation des glucides...*

Dans ce contexte, étudier le microbiote intestinal, celui-ci jouant un rôle majeur dans la physiologie de l'hôte, en particulier sur le métabolisme et la santé (via la modulation des paramètres immunitaires), était donc requis dans notre étude, et ces travaux doivent être poursuivis.

Nous avons identifié les bactéries composant le microbiote intestinal conservé de la truite arc-en-ciel en accord avec des travaux antérieurs mais également celles modifiées par le ratio glucides/protéines comme, par exemple, certaines bactéries lactiques. Un certain nombre de genres bactériens (*LAB*, *Bacillus* mais aussi *Mycoplasma*, *Ralstonia*...) semblent prometteurs pour améliorer l'utilisation de nos régimes. Toutefois, l'analyse du microbiote uniquement par l'approche métagénomique 16S, est une limite pour nos travaux. S'il s'agit d'une étape obligatoire, dans un premier temps pour avoir une idée de la diversité du microbiote intestinal, elle ne nous permet pas de connaître les capacités métaboliques des bactéries présentes. Il sera donc essentiel de combiner ces études à des approches de métagénomique non ciblées (« shotgun »). Ces méthodes, plus coûteuses, mais beaucoup plus complexes dans leurs analyses bio-informatiques, permettent selon la profondeur de séquençage d'avoir des informations concernant les voies métaboliques présentes dans les génomes bactériens comme par exemple les gènes codant les CAZymes. Elles permettent aussi de reconstituer l'ensemble des génomes bactériens et donc leurs potentiels fonctionnalités. De plus, consistant en un séquençage de tous les ADN présents, il sera nécessaire d'identifier le moment propice de prélèvement afin d'éviter de séquencer l'ADN présent dans les aliments avant leur totale digestion, mais aussi d'éviter que le séquençage soit contaminé par de l'ADN eucaryote, venant des cellules de la truite.



Enfin, si nous avons des informations sur la fonctionnalité du microbiote intestinal, nous pourrions également identifier quelles fonctions sont exprimées. Il serait très intéressant de réaliser au niveau intestinal, une analyse par RNA-seq, voir même dual-RNA, pour étudier le transcriptome exprimé par la truite en réponse à nos régimes, mais également celui du microbiote intestinal.

Une autre approche pourrait être d'isoler, par méthode culturale, les bactéries candidates identifiées lors de nos études afin, d'une part, de séquencer directement leurs génomes (approche beaucoup plus simple et peu coûteuse), mais également de les cultiver en présence ou non d'amidon pour évaluer leur capacité à le dégrader. Cela serait particulièrement pertinent dans le cas des bactéries du genre *Mycoplasma* identifiées dans les échantillons de mucus. La présence de cette bactérie est très intéressante chez les salmonidés car une relation symbiotique semble s'être mise en place (cf. Discussion) et nous avons identifié des structures de la forme connue des *Mycoplasma* dans des analyses de microscopie électronique. Il est néanmoins nécessaire de confirmer leur présence notamment par hybridation *in situ*, et ainsi démontrer leur localisation intracellulaire afin d'étudier leur rôle fonctionnel.

#### *Vers une analyse plus approfondie du microbiote intestinal ...*

Lors de cette thèse, nous avons choisi d'étudier l'effet des régimes alimentaires sur les populations microbiennes de l'intestin proximal (« *midgut* ») car cette région est impliquée dans la dégradation et l'absorption des nutriments chez la truite arc-en-ciel. Néanmoins, il serait également intéressant d'étudier les communautés microbiennes présentes dans les caeca pyloriques (« *foregut* »). En effet, chez les salmonidés, le rôle des caeca pyloriques, reste encore méconnu. Cependant, les multiples appendices pourraient abriter des microorganismes, éventuellement impliqués dans les premières dégradations des aliments. De plus, dans la littérature (Kokou et al., 2019), il a déjà été noté que chez les salmonidés, de grands changements étaient observés entre les populations microbiennes des caeca pyloriques, en plus de l'intestin proximal. Concernant l'intestin distal (« *hindgut* »), il semblerait que peu de différences aient été remarquées entre l'intestin proximal et distal (Ricaud et al., 2018), il n'est sans doute pas nécessaire de l'analyser dans nos prochaines études.

De plus, nous avons comparé l'effet des glucides à court (3 semaines) ou à long terme (12 semaines). Certaines différences observées dans les abondances relatives à long terme ont été confirmées dans l'étude à court terme, suggérant une adaptation rapide du microbiote intestinal aux nouveaux substrats tout comme l'effet sur le métabolisme glucidique. Il serait ici pertinent de réaliser une réelle cinétique d'implantation (ou modulation) du microbiote intestinal dès les premiers jours après le changement d'alimentation. Elle pourrait être couplée à différents stades de développement et/ou à des teneurs plus élevées en glucides digestibles (et donc moins de protéines végétales).



Cela serait d'autant plus pertinent en la combinant avec des études sur le métabolisme car nous avons pu noter que les réponses à court terme au niveau de la glycolyse correspondaient à ce qui était observé à long terme. De plus, une augmentation du taux de triglycérides a été remarquée dans les plasmas de ces poissons, alors que dans l'étude à long terme c'est une stagnation ou une diminution qui est mise en évidence. Il sera donc intéressant d'étudier également les réponses métaboliques pendant ces études pour expliquer ces résultats.

À terme, en ayant des informations fonctionnelles sur le microbiote intestinal, mais également sur sa cinétique d'implantation, nous pourrions être en mesure de « programmer » le microbiote afin qu'il soit directement adapté à des substrats végétaux, en inoculant les aliments avec des souches bactériennes capables de dégrader les glucides et les fibres non digestibles. Ces souches bactériennes seraient considérées comme probiotique avec par exemple des capacités amylolytiques.

Enfin, afin de mieux connaître le microbiote intestinal et sa régulation par les glucides, différentes approches pourraient être combinées pour avoir une vision exhaustive de l'écosystème intestinal et de sa fonctionnalité, à travers une approche multi-omique (métagénomique, métatranscriptomique, métabolomique, épigénomique).

#### *Etudier la relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire...*

Un autre rôle clé du microbiote intestinal est son implication dans la maturation et la stimulation du système immunitaire participant à une meilleure santé et robustesse, paramètres essentiels en élevage (concept « one health »). Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier l'effet combiné du ratio glucides/protéines élevé avec une supplémentation en inuline, identifiée dans des études précédentes comme bénéfique pour la santé des poissons (T. Wang et al., 2021) et ayant des résultats prometteurs au laboratoire (Lokesh et al., 2023, 2022). Ces résultats obtenus avec l'inuline ont été décevants, alors même que des études ont montré que l'inuline favorise l'utilisation des glucides, déjà observés chez les mammifères (Nakajima et al., 2022) mais également chez le tilapia (T. Wang et al., 2021). Dans notre étude, l'utilisation d'inuline aura néanmoins permis d'observer, pour la première fois, l'effet de ce ratio glucides/protéines sur certains paramètres immunitaires qui diminuent dans ce contexte de ratio élevé. Si ces données sont intéressantes, l'absence de contrôle positif d'inflammation ne nous permet pas de conclure de façon précise. Ces travaux devront être poursuivis en collaboration avec des équipes de recherche spécialisées dans l'immunité des poissons car nous nous sommes heurtés à un manque de connaissances. Nous pourrions, par exemple, identifier et quantifier par cytométrie de flux, la présence et l'activité de cellules immunitaires présentes au niveau de l'intestin.





Comme décrit dans le manuscrit, afin d'expliquer l'effet du microbiote intestinal sur le métabolisme, mais aussi l'immunité de la truite arc-en-ciel, des molécules clés du dialogue moléculaire microbiote-hôte ont été identifiées. Il s'agit des AGCC, largement décrits dans ce manuscrit. Nous avons observé une augmentation de leur production avec un ratio élevé glucides/protéines. Cependant, à ce stade, nous n'avons aucune preuve que cette augmentation est liée à la présence de bactéries lactiques en plus grande abondance ou à d'autres genres présentant des abondances différentes (*Bacillus* ou *Ralstonia*). Ces bactéries pourraient être inoculées à des truites (voire à des truites axéniques) et les concentrations en AGCC et pourraient être analysées. Une autre approche pertinente pourrait être le recours à des lignées intestinales dans lesquelles nous aurions supplémenté en AGCC pour identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents, voire les bactéries elles-mêmes. Dans nos études, nous nous sommes uniquement intéressés aux AGCC ainsi qu'à certains dérivés du lactate. Mais qu'en est-il des autres métabolites bactériens connus (comme les acides aminés ou les vitamines) qui pourraient être impliqués dans ce dialogue moléculaire microbiote-hôte ? Une approche métabolomique sera ici pertinente pour identifier des nouvelles molécules.

#### *Vers des recherches plus appliquées...*

Ces différentes approches fondamentales pourraient être effectuées en parallèle d'approches plus appliquées. Notre étude a été réalisée en utilisant de l'amidon de blé comme source de glucide digestible. Mais qu'en serait-il si nous le remplaçons par de l'amidon de riz ou de maïs ? Aurions-nous les mêmes résultats ? Si tel était le cas, les ressources pourraient être trouvées localement, par exemple l'amidon de riz en Asie, ce qui aurait un impact positif sur le coût de l'aliment (qui peut atteindre aujourd'hui 60% du coût total de production), mais également d'un point de vue durable (économie circulaire). D'autres molécules appelées aussi « micro-nutriments fonctionnels » pourraient être testées en ciblant des molécules connues pour avoir des effets positifs sur l'utilisation des glucides, grâce à leurs actions antioxydantes, inducteurs de la glycolyse, de sécrétion d'insuline, ou améliorant l'insulino-résistance. Parmi ces molécules, nous pensons à d'autres prébiotiques, comme le  $\beta$ -glucane (Menanteau-Ledouble et al., 2022), à des vitamines spécifiques (Ibrahim et al., 2010; H. Wang et al., 2022; Wang et al., 2019) ou à des flavonoïdes (Frag et al., 2021) qui seraient à tester dans ces nouveaux aliments riches en glucides.



### **4.3. Conclusion**

Cette thèse s'intègre dans un contexte de développement rapide de l'aquaculture et de nécessité à remplacer totalement les farines et huiles de poisson, notamment par des ingrédients végétaux. Nos travaux contribuent à une meilleure connaissance du microbiote intestinal mais également du métabolisme des truites nourries avec des régimes végétaux associés à un ratio élevé glucides/protéines. Nos études fournissent, en outre, de nombreuses perspectives dans la compréhension des mécanismes reliant le microbiote intestinal à la physiologie de son hôte.



## Bibliographie

---

- A. Maar, M. A. E. Mortimer, Lingen, I. Van der, 1966. Fish Culture in Central East Africa [WWW Document]. FAO. URL [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=03\\_bCk7uByYC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Fish+Culture+in+Central+East+Africa.+FAO,+Rome&ots=riOCIB6feM&sig=FjwCByBWKvN3GwYfmqHvSJOz1zg&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Romans&f=false](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=03_bCk7uByYC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Fish+Culture+in+Central+East+Africa.+FAO,+Rome&ots=riOCIB6feM&sig=FjwCByBWKvN3GwYfmqHvSJOz1zg&redir_esc=y#v=onepage&q=Romans&f=false) (accessed 4.13.23).
- Aas, T.S., Åsgård, T., Ytrestøl, T., 2022. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2020. *Aquac. Reports* 26. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101316>
- Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M., 2020. Benefits of dietary butyric acid, sodium butyrate, and their protected forms in aquafeeds: A review. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 28, 421–448. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899>
- Abdel-Latif, H.M.R., Hendam, B.M., Shukry, M., El-Shafai, N.M., El-Mehasseb, I.M., Dawood, M.A.O., Abdel-Tawwab, M., 2021. Effects of sodium butyrate nanoparticles on the hemato-immunological indices, hepatic antioxidant capacity, and gene expression responses in *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 119, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.039>
- Adak, A., Khan, M.R., 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Adams, M.B., Nowak, B.F., 2003. Amoebic gill disease : sequential pathology in cultured Atlantic salmon , *Salmo salar* L . 601–614.
- Adeva-Andany, M.M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., Ameneiros-Rodríguez, E., 2016. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 5, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- Anderson, M.J., 2017. Permutational Multivariate Analysis of Variance ( PERMANOVA ) . Wiley StatsRef Stat. Ref. Online 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Anguiano, M., Pohlenz, C., Buentello, A., Gatlin, D.M., 2013. The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Br. J. Nutr.* 109, 623–629. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001754>
- Armenta, R.E., Valentine, M.C., 2013. Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: An overview of recent advances. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 167–182. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2154-3>
- Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R.E., Sperstad, S., Ringø, E., 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture* 326–329, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K., Honda, K., 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* (80-. ). 331, 337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- Aubin, J., Gatesoupe, F.-J., Labbé, L., Luc Lebrun, 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* Walbaum ). *Aquac. Res.* 36, 758–767.

- Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., Yin, J., 2018. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed Res. Int.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Bai, Z., Ren, T., Han, Y., Rahman, M.M., Hu, Y., Li, Z., Jiang, Z., 2019. Influences of dietary selenomethionine exposure on tissue accumulation, blood biochemical profiles, gene expression and intestinal microbiota of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 218, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2018.12.001>
- Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquac. Int.* 10, 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1021355406412>
- Bakke, A.M., Glover, C., Krogdahl, Å., 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *The Multifunctional Gut of Fish, Fish Physiology*, vol. 30.
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis* 72. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0441-8>
- Baños, N., Baró, J., Castejón, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., 1998. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul. Pept.* 77, 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00041-X)
- Barange, M., Coetzee, J., Takasuka, A., Hill, K., Gutierrez, M., Oozeki, Y., Lingen, C. van der, Agostini, V., 2009. Habitat expansion and contraction in anchovy and sardine populations. *Prog. Oceanogr.* 83, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.07.027>
- Bastard, Q. Le, Chapelet, G., Javaudin, F., Lepelletier, D., Batard, E., 2020. The effects of inulin on gut microbial composition : a systematic review of evidence from human studies 403–413.
- Bastías, R., Higuera, G., Sierralta, W., Espejo, R.T., 2010. A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus* 12, 990–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02143.x>
- Begley, T.P., Downs, D.M., Ealick, S.E., Taylor, S., Campobasso, N., 1999. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 293–300.
- Berggren, Å., Jansson, A., Low, M., 2019. Approaching ecological sustainability in the emerging insects-as-food industry. *Trends Ecol. Evol.* 34, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.11.005>
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 567–590. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1990.70.2.567>
- Bergot, F., 1981. Etude de l'utilisation digestive d'une cellulose purifiée chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) et la carpe commune (*Cyprinus carpio*). *Reprod. Nutr. Développement* 21, 83–93. <https://doi.org/10.1051/rnd:19810107>
- Beveridge, M.C., Little, D., 2002. The history of aquaculture in traditional societies. In *Ecological Aquaculture: The Evolution of the Blue Revolution*.
- Bisschop, P.H., Arias, A.M.P., Ackermans, M.T., Endert, E., Pijl, H., Kuipers, F., Meijer, A.J., Sauerwein, H.P., Romijn, J.A., 2000. The effects of carbohydrate variation in isocaloric diets on glycogenolysis and gluconeogenesis in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1963–1967. <https://doi.org/10.1210/jc.85.5.1963>



- Bjørger, 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 Immunol.* 107, 172–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.032>
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Boonanuntanasarn, S., Jangprai, A., Kumkhong, S., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Burel, C., Marandel, L., Panserat, S., 2018a. Adaptation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates: New insights from a long term nutritional study. *Aquaculture* 496, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.011>
- Boonanuntanasarn, S., Kumkhong, S., Yoohat, K., Plagnes-Juan, E., Burel, C., Marandel, L., Panserat, S., 2018b. Molecular responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture* 482, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.032>
- Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozłowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., Michel, C., 2005. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J. Appl. Microbiol.* 99, 201–212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x>
- Boyd, C.E., D’Abramo, L.R., Glencross, B.D., Huyben, D.C., Juarez, L.M., Lockwood, G.S., McNevin, A.A., Tacon, A.G.J., Teletchea, F., Tomasso, J.R., Tucker, C.S., Valenti, W.C., 2020. Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *J. World Aquac. Soc.* 51, 578–633. <https://doi.org/10.1111/jwas.12714>
- Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2021. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brauge, C., Corraze, G., Médale, F., 1995. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 111, 117–124. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98527-N](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98527-N)
- Brown, R.M., Wiens, G.D., Salinas, I., 2019. Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 86, 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.079>
- Bruce, T.J., Neiger, R.D., Brown, M.L., 2018. Gut histology, immunology and the intestinal microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed process variants of soybean meal. *Aquac. Res.* 49, 492–504. <https://doi.org/10.1111/are.13480>
- Bruni, L., Milanović, V., Tulli, F., Aquilanti, L., Parisi, G., 2022. Effect of diets containing full-fat *Hermetia illucens* on rainbow trout microbiota: A dual cultivation-independent approach with DGGE and NGS. *Aquaculture* 553, 738109. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738109>

- Buchmann, K., Secombes, C.J., 2022. Principles of Fish Immunology, Principles of Fish Immunology. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1>
- Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J.W., Verreth, J., Rombouts, F.M., 2006. Presence of *Lactobacilli* in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. *Food Microbiol.* 23, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.06.001>
- Buddington, R.K., Hilton, J.W., 1987. Intestinal adaptations of rainbow trout to changes in dietary carbohydrate. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 253, 489–496. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1987.253.4.g489>
- Butt, R.L., Volkoff, H., 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial Flora of Fishes : A Review. *Microb. Ecol.* 21–41.
- Cai, W., Liang, X. fang, Yuan, X., Liu, L., He, S., Li, J., Li, B., Xue, M., 2018. Different strategies of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) responding to insufficient or excessive dietary carbohydrate. *Aquaculture* 497, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.042>
- Cairo, J., Gherman, I., Day, A., Cook, P.E., 2022. *Bacillus cytotoxicus*—A potentially virulent food-associated microbe. *J. Appl. Microbiol.* 132, 31–40. <https://doi.org/10.1111/jam.15214>
- Calder, P.C., Yaqoob, P., 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *BioFactors* 9. <https://doi.org/10.1002/biof.42>
- Callet, T., Hu, H., Larroquet, L., Surget, A., Liu, J., Plagnes-juan, E., Maunas, P., Turonnet, N., Mennigen, J.A., Bobe, J., Burel, C., Corraze, G., Panserat, S., Marandel, L., 2020. Exploring the Impact of a Low-Protein High-Carbohydrate Diet in Mature Broodstock of a Glucose-Intolerant Teleost , the Rainbow Trout. *Front. Physiol.* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00303>
- Cani, Patrice D, Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>.Additional
- Cani, Patrice D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Burcelin, R., 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. <https://doi.org/10.2337/DB07-1403>
- Cantarel, B.L., Lombard, V., Henrissat, B., 2012. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>
- Capilla, E., Díaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J.E., Keller, K., Planas, J. V., 2004. Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 287, 348–357. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00538.2003>
- Carlson, J.M., Leonard, A.B., Hyde, E.R., Petrosino, J.F., Primm, T.P., 2017. Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad - spectrum antibiotic 143–154.
- Caruso, M.A., Sheridan, M.A., 2011. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 227–247. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.06.014>
- Catalán, N., Villasante, A., Wacyk, J., Ramírez, C., Romero, J., 2017. Fermented soybean meal increases Lactic Acid Bacteria in gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* ).

- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Ángeles Esteban, M., 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 663–668. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2007.10.002>
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M. ángel, Esteban, M. ángeles, 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>
- Chang, H.C., Seidman, I., Teebor, G., Lane, M.D., 1967. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: Relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 682–686. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90369-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90369-5)
- Chang, P. V, Hao, L., Offermanns, S., Medzhitov, R., 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *PNAS* 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chasiotis, H., Kelly, S.P., 2011. General and comparative endocrinology effect of cortisol on permeability and tight junction protein transcript abundance in primary cultured gill epithelia from stenohaline goldfish and euryhaline trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2011.04.023>
- Chasiotis, H., Kolosov, D., Bui, P., Kelly, S.P., 2012. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.020>
- Cheaih, B., Yang, P., Kazlauskaitė, R., Lindsay, E., Heys, C., Dwyer, T., De Noa, M., Schaal, P., Sloan, W., Ijaz, U.Z., Llewellyn, M.S., 2021. Genome erosion and evidence for an intracellular niche – exploring the biology of mycoplasmas in Atlantic salmon. *Aquaculture* 541, 736772. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736772>
- Chellapandi, P., Bharathi, M., Sangavai, C., Prathiviraj, R., 2018. *Methanobacterium formicicum* as a target rumen methanogen for the development of new methane mitigation interventions : A review. *Vet. Anim. Sci.* 6, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.001>
- Chen, J., Li, Q., Tan, C., Xie, L., Yang, X., Zhang, Q., Deng, X., 2023. Effects of enrofloxacin's exposure on the gut microbiota of Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 46, 101077. <https://doi.org/10.1016/J.CBD.2023.101077>
- Chen, W.L., Ge, Y.P., Sun, M., He, C.F., Zhang, L., Liu, W. Bin, Li, H.X., Li, X.F., 2022. Insights into the correlations between prebiotics and carbohydrate metabolism in fish: Administration of xylooligosaccharides in *Megalobrama amblycephala* offered a carbohydrate-enriched diet. *Aquaculture* 561, 738684. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738684>
- Chimits, P., 1957. Tilapia in ancient Egypt. *FAO Fisheries Bulletin* 10:211–5.
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.* 61, 132–172. <https://doi.org/10.1159/000417529>
- Choi, K., Weber, J., 2015. Pushing the limits of glucose kinetics : how rainbow trout cope with a carbohydrate overload 2873–2880. <https://doi.org/10.1242/jeb.125716>

- Clements, K.D., Angert, E.R., Montgomery, W.L., Choat, J.H., 2014. Intestinal microbiota in fishes: What's known and what's not. *Mol. Ecol.* 23, 1891–1898. <https://doi.org/10.1111/mec.12699>
- Conde-Sieira, M., Ceinos, R.M., Velasco, C., Comesaña, S., López-Patiño, M.A., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2018. Response of rainbow trout's (*Oncorhynchus mykiss*) hypothalamus to glucose and oleate assessed through transcription factors BSX, ChREBP, CREB, and FoxO1. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 204, 893–904. <https://doi.org/10.1007/s00359-018-1288-7>
- Conde-Sieira, M., Muñoz, J.L.P., López-Patiño, M.A., Gesto, M., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2014. Oral administration of melatonin counteracts several of the effects of chronic stress in rainbow trout. *Domest. Anim. Endocrinol.* 46, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.10.001>
- Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., Valente, L.M.P., 2015. Potential capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyper-glycaemia. *Aquaculture* 438, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.042>
- Constantinescu, R., Mireşan, V., Coşie, V., Friş, G., Cocan, D.I., 2015. Anatomical particularities of the dentition in some fish species from the Salmonidae family. *AAFL Bioflux*.
- Costa-Pierce, B.A., 2022. The Anthropology of Aquaculture. *Front. Sustain. Food Syst.* 6, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.843743>
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2012. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cottrell, R.S., Blanchard, J.L., Halpern, B.S., Metian, M., Froehlich, H.E., 2020. Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030. *Nat. Food* 1, 301–308. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0078-x>
- Cruz-Garcia, L., Minghetti, M., Navarro, I., Tocher, D.R., 2009. Molecular cloning, tissue expression and regulation of liver X Receptor (LXR) transcription factors of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 153, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.02.001>
- Cunningham, M., Azcarate-peril, M.A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H.D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M.I., Steinert, R.E., Swanson, K.S., Sinderen, D. Van, 2021. Trends in Microbiology Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends Microbiol.* 29, 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>
- Dai, W., 2015. Amino acids regulate hepatic intermediary metabolism-related gene expression via mTORC1-dependent manner in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 234.
- Daisley, B.A., Koenig, D., Engelbrecht, K., Doney, L., Hards, K., Al, K.F., Reid, G., Burton, J.P., 2021. Emerging connections between gut microbiome bioenergetics and chronic metabolic diseases. *Cell Rep.* 37, 110087. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110087>
- Das, P., Mandal, S., Khan, A., Manna, S.K., Ghosh, K., 2014. Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish J. Zool.* 38, 79–88. <https://doi.org/10.3906/zoo-1205-3>
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A. V., Devlin, A.S.,

- Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly alters the Human gut microbiota. *Nature* 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>.Diet
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A. V, Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2013. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Elbially, Z.I., Abdelhamid, A.I., 2020. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. *J. Therm. Biol.* 88, 102500. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102500>
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Dossou, S., Moss, A.S., 2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.047>
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G., 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>
- Defaix, Raphael, Lokesh, J., Behec, M. Le, Surget, A., Biasutti, S., Terrier, F., Pigot, T., 2023. High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740049>
- Defaix, Raphaël, Lokesh, J., Frohn, L., Le Behec, M., Pigot, T., Véron, V., Surget, A., Biasutti, S., Terrier, F., Skiba-Cassy, S., Roy, J., Panserat, S., Ricaud, K.B., 2023. Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch , 100 % plant- based diet. *Journal of animal Science and Biotechnology*.
- Del Sol Novoa, M., Capilla, E., Rojas, P., Baró, J., Gutiérrez, J., Navarro, I., 2004. Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.005>
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Cani, P.D., 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: Consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb. Cell Fact.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S10>
- Demigné, C., MORAND, C., LEVRAT, M.-A., BESSON, C., MOUNDRAS, C., REMESY, C., 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 44, 515–521. <https://doi.org/10.1080/15216549800201542>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- 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>
- Dhanasiri, A.K.S., Brunvold, L., Brinchmann, M.F., Korsnes, K., Bergh, Ø., Kiron, V., 2011. Changes in the Intestinal

- Microbiota of Wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. Upon Captive Rearing. *Microb. Ecol.* 61, 20–30. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9673-y>
- Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Da Conceição, L.E.C., Gomes, E.F., Dinis, M.T., 2004. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquac. Res.* 35, 1122–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01135.x>
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley, G., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) 1. *Am. Soc. Anim. Sci.* 3226–3234. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1428>
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.015>
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., Bultman, S.J., 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 13, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Doré, J., Blottière, H., 2015. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.002>
- Döring, Y., Pawig, L., Weber, C., Noels, H., 2014. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* 5 JUN, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00212>
- Drew, M.D., Borgeson, T.L., Thiessen, D.L., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138, 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.019>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Ekmann, K.S., Dalsgaard, J., Holm, J., Campbell, P.J., Skov, P. V., 2013. Effects of dietary energy density and digestible protein:energy ratio on de novo lipid synthesis from dietary protein in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quantified with stable isotopes. *Br. J. Nutr.* 110, 1771–1781. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001281>
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., Flavell, R.A., 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>
- Enes, P., Panserat, A.S., Kaushik, A.S., Oliva-Teles, A.A., 2008. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2011. Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2011.579363> 19, 201–215.

<https://doi.org/10.1080/10641262.2011.579363>

- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Esmaili, M., 2017. Effects of fish meal replacement with meat and bone meal using garlic ( *Allium sativum* ) powder on growth , feeding , digestive enzymes and apparent digestibility of nutrients and fatty acids in juvenile rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* Walbaum , 1792 1–10. <https://doi.org/10.1111/anu.12491>
- Estrada, U.R.-, Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac. Sci.* 57, 609–617.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Le Cae, K.-A., 2017. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13, 1–14.
- Fang, Q., Hu, J., Nie, Q., Nie, S., 2019. Trends in Food Science & Technology Effects of polysaccharides on glycometabolism based on gut microbiota alteration. *Trends Food Sci. Technol.* 92, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.015>
- FAO/WHO., 2023. Food Safety is Everyone ’ s Business at Home 2.
- FAO, 2022. In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022, In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc0463en>
- FAO, 2018. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050.
- FAO, 2012. WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE.
- Farag, M.R., Abdelnour, S.A., Patra, A.K., Dhama, K., Dawood, M.A.O., Elnesr, S.S., Alagawany, M., 2021. Propolis: Properties and composition, health benefits and applications in fish nutrition. *Fish Shellfish Immunol.* 115, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.010>
- Favalier, N., Surget, A., Véron, V., Maunas, P., Turonnet, N., Terrier, F., Panserat, S., Marandel, L., 2023. Rainbow trout neomales broodstocks are able to eat and use a high carbohydrate diet during a complete reproductive cycle. *bioRxiv* 2023.02.20.529192. <https://doi.org/10.1101/2023.02.20.529192>
- Felip, O., Blasco, J., Ibarz, A., Martín-Pérez, M., Fernández-Borràs, J., 2015. Diets labelled with 13C-starch and 15N-protein reveal daily rhythms of nutrient use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 179, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.016>
- Fernandes, R., do Rosario, V.A., Mocellin, M.C., Kuntz, M.G.F., Trindade, E.B.S.M., 2017. Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. *Clin. Nutr.* 36, 1197–1206. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.10.003>
- Fernández-Montero, Torrecillas, S., Acosta, F., Kalinowski, T., Bravo, J., Sweetman, J., Roo, J., Makol, A., Docando, J., Carvalho, M., Izquierdo, M.S., Montero, D., 2021. Improving greater amberjack (*Seriola dumerili*)

- defenses against monogenean parasite *Neobenedenia girellae* infection through functional dietary additives. *Aquaculture* 534. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736317>
- Fernández, F., Miquel, A.G., Córdoba, M., Varas, M., Metón, I., Caseras, A., Baanante, I. V., 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 343, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.057>
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 121–131. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P., 2014. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 760, 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Folch, LEES, M., STANLEY1, G.H.S., 1953. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES.
- Forbes, J.L.I., Kostyniuk, D.J., Mennigen, J.A., Weber, J.M., 2019. Glucagon regulation of carbohydrate metabolism in rainbow trout: In vivo glucose fluxes and gene expression. *J. Exp. Biol.* 222. <https://doi.org/10.1242/jeb.211730>
- FranceAgriMer, 2021. Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2021. FranceAgriMer 40.
- 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)
- Frohn, L., Peixoto, D., Guyomar, C., Teixeira, C., Terrier, F., Aguirre, P., 2023. Yeast extract improves growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a fishmeal-free diet and modulates the hepatic and distal intestine transcriptomic profile.
- Fuller, R.O.Y., 1992. History and development of probiotics 1–8.
- Fung, T.C., Olson, C.A., Hsiao, E.Y., 2017. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Publ. Gr.* 20. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S., 1993. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>
- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., Merrifield, D.L., Sørum, H., 2016a. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/srep30893>
- Gatesoupe, F.J., 2007. Live yeasts in the gut : Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish



- health and development 267, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005>
- Gatlin, 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., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquac. Res.* 38, 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L., Kaushik, S., 2001. Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod. Nutr. Dev.* <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.1051/rnd:2001103>
- German, D.P., 2011. FOOD ACQUISITION AND DIGESTION | Digestive Efficiency. *Encycl. Fish Physiol. From Genome to Environ.* Vol. 1-3 1–3, 1596–1607. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00142-8>
- Geuking, M.B., Köller, Y., Rupp, S., Mccoy, K.D., Geuking, M.B., Köller, Y., Rupp, S., Mccoy, K.D., Geuking, M.B., Köller, Y., Rupp, S., Mccoy, K.D., 2014. The interplay between the gut microbiota and the immune system The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes* 0976. <https://doi.org/10.4161/gmic.29330>
- Geurden, I., Aramendi, M., Zambonino-Infante, J., Panserat, S., 2007. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: Effect on dietary glucose utilization in juveniles. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, 2275–2283. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00444.2006>
- Gibson, G.L.E.Y.R., Roberfroid, M.B., 1995. Critical Review Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics.
- Giudetti, A.M., Gnoni, G. V., 1997. SHORT-TERM EFFECT OF DEXAMETHASONE ON FATTY ACID AND CHOLESTEROL SYNTHESIS IN ISOLATED RAT t IEPATOCYTES. *Angew. Chemie Int. Ed.* 6(11), 951–952. 3, 10–27.
- Golder, H.M., Geier, M.S., Forder, R.E.A., Hynd, P.I., Hughes, R.J., 2011. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. *Br. Poult. Sci.* 52, 500–506. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.587183>
- Good, C.A., Kramer, H., Somogyi, M., 1933. the Determination of Glycogen. *J. Biol. Chem.* 100, 485–491. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75966-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75966-8)
- Gross, D.N., Wan, M., Birnbaum, M.J., 2009. The role of the hypothalamus in the regulation of metabolism. *Curr. Diab. Rep.* 9, 24–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11892-009-0034-5>
- Gu, M., Pan, S., Li, Q., Qi, Z., Deng, W., Bai, N., 2021. Protective effects of glutamine against soy saponins-induced enteritis, tight junction disruption, oxidative damage and autophagy in the intestine of *Scophthalmus maximus* L. *Fish Shellfish Immunol.* 114, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.013>
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.018>
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2018. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquac.* 10, 800–832. <https://doi.org/10.1111/raq.12201>

- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2015. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. *Aquaculture* 441, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.015>
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A., 2014. Water temperature does not affect protein sparing by dietary carbohydrate in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquac. Res.* 45, 289–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03226.x>
- Guerreiro, I., Serra, C.R., Enes, P., Couto, A., Salvador, A., Costas, B., Oliva-Teles, A., 2016. Effect of short chain fructooligosaccharides (scFOS) on immunological status and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared at two temperatures. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.032>
- Haenen, D., Zhang, J., da Silva, C.S., Bosch, G., van der Meer, I.M., van Arkel, J., van den Borne, J.J.G.C., Gutiérrez, O.P., Smidt, H., Kemp, B., Müller, M., Hooiveld, G.J.E.J., 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine1-3. *J. Nutr.* 143, 274–283. <https://doi.org/10.3945/jn.112.169672>
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234, 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.018>
- Hall, J.R., Richards, R.C., MacCormack, T.J., Ewart, K.V., Driedzic, W.R., 2005. Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1730, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.07.001>
- Hamer, Preter, D., Windey, Verbeke, 2011. Functional analysis of colonic bacterial metabolism : Relevant to health ? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00048.2011>
- Han, H.S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* 48, 1–10. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s002489900158>
- Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., Kiriya, S., 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J. Nutr.* 129, 942–948. <https://doi.org/10.1093/jn/129.5.942>
- Hardt, W., 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.003>
- Hardy, R.W., 2006. Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for Aquaculture. *Av. en Nutr. Acuícola VIII. VIII Simp. Int. Nutr. Acuícola.* 410–419.
- Hardy, R.W., S.J. Kaushik, 2022. *Fish Nutrition*, Elsevier, Academic Press. fishmeal.
- Heer, M., Egert, S., 2015. Nutrients other than carbohydrates: their effects on glucose homeostasis in humans. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 31, 14–35. <https://doi.org/10.1002/DMRR.2533>
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., von Wright, A., 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 259–268.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.012>

- Helander, Wright, Sandholm, 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel. Trends Food Sci. Technol. 8, 146–150.
- Hellerstein, M.K., 1999. De novo lipogenesis in humans: Metabolic and regulatory aspects. Eur. J. Clin. Nutr. 53, s53–s65. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600744>
- Hemre, Mommsen, K., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes G-I. Aquaculture Nutrition 686, 533–538. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.686.72>
- Hersi, M.A., Genc, E., Pipilos, A., Keskin, E., 2023. Effects of dietary synbiotics and biofloc meal on the growth, tissue histomorphology, whole-body composition and intestinal microbiota profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured at different salinities. Aquaculture 570, 739391. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739391>
- Hidalgo, M., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture Volume 170, 267–283. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00413-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X).
- Hines, I.S., Santiago-Morales, K.D., Ferguson, C.S., Clarrington, J., Thompson, M., Rauschenbach, M., Levine, U., Drahos, D., Aylward, F.O., Smith, S.A., Kuhn, D.D., Stevens, A.M., 2022. Steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed probiotic during the earliest developmental stages have enhanced growth rates and intestinal microbiome bacterial diversity. Front. Mar. Sci. 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1021647>
- Hodar, A.R., Vasava, R., Joshi, N.H., Mahavadiya, D.R., 2020. Fish meal and fish oil replacement for alternative sources: a review. J. Exp. Zool. India 23, 13–21.
- Holben, W.E., Williams, P., Saarinen, M., Särkilahti, L.K., Apajalahti, J.H.A., 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. Microb. Ecol. 44, 175–185. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-1011-6>
- Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., Naito, M., Enomoto, K., Watanabe, S., Mak, T.W., Nakano, T., 2004. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. J. Clin. Invest. 113, 1774–1783. <https://doi.org/10.1172/JCI20513>
- Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Sun, Y.Z., 2015. Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365> 23, 315–328. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365>
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Rostami, H.K., Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquac. Nutr. 17, 498–504. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2010.00828.X>
- Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Caipang, C.M., 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. Aquac. Res. 48, 1380–1391. <https://doi.org/10.1111/are.13239>
- Hossain, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N.M., 2016. Dietary nucleotide administration influences growth, immune responses and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). Aquaculture 455, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.008>

- Hossain, M.S., Small, B.C., Kumar, V., Hardy, R., 2023. Utilization of functional feed additives to produce cost-effective, ecofriendly aquafeeds high in plant-based ingredients. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/RAQ.12824>
- <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>, n.d.
- <https://www.indexmundi.com/commodities/>, n.d.
- Hu, H., Kortner, T.M., Gajardo, K., Chikwati, E., Tinsley, J., Krogdahl, Å., 2016. Intestinal fluid permeability in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is affected by dietary protein source 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167515>
- Hu, Y., Shang, H., Tong, H., Nehlich, O., Liuc, W., Zhao, C., Yu, J., Wang, C., Trinkaus, E., Richards, M.P., 2009. Stable isotope dietary analysis of the Tianyuan 1 early modern human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10971–10974. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904826106>
- 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., 2019a. 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>
- 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., 2019b. Review 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>
- Huang, X.-Z., 2013. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. *World J. Clin. Pediatr.* 2, 46. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v2.i4.46>
- Huang, X., Zhong, L., Kang, Q., Liu, S., Feng, Y., Geng, Y., Chen, D., Ou, Y., Yang, S., Yin, L., Luo, W., 2021. A high starch diet alters the composition of the intestinal microbiota of Largemouth Bass *Micropterus salmoides*, which may be associated with the development of enteritis. *Front. Microbiol.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696588>
- Hugon, P., Dufour, J., Colson, P., Fournier, P., Sallah, K., Raoult, D., 2015. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect. Dis.* 15, 1211–1219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00293-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00293-5)
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 29, 241–246. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2010.03.004>
- Ingerslev, H.C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L., 2014. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>
- Inoue, M., Satoh, S., Maita, M., Kiron, V., Okamoto, N., 1998. Short communication Recovery from derangement of natural killer-like activity of leucocytes due to Zn or Mn deficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by the oral administration of these elements 1640, 233–236.
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>

- Issifu, I., Alava, J.J., Lam, V.W.Y., Sumaila, U.R., 2022. Impact of ocean warming, overfishing and mercury on European fisheries: A risk assessment and policy solution framework. *Front. Mar. Sci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.770805>
- Iwashita, Y., Yamamoto, T., Furuita, H., Sugita, T., Suzuki, N., 2008. Influence of certain soybean antinutritional factors supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal and liver morphology in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 74, 1075–1082. <https://doi.org/10.1111/J.1444-2906.2008.01627.X/METRICS>
- Jalabert, B., Fostier, A., 2010. La truite arc-en-ciel : biologie et élevage 323.
- Jane, J.L., 2004. Starch: structure and properties. Chemical and functional properties of food saccharides.
- 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. *Aquac. Res.* 50, 3493–3506. <https://doi.org/10.1111/are.14324>
- Jeong, Y.S., Kim, D., Lee, Y.S., Kim, H.J., Han, J.Y., Im, S.S., Chong, H.K., Kwon, J.K., Cho, Y.H., Kim, W.K., Osborne, T.F., Horton, J.D., Jun, H.S., Ahn, Y.H., Ahn, S.M., Cha, J.Y., 2011. Integrated expression profiling and Genome-Wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in Glucose-Regulated gene expression. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022544>
- Jiang, W., Zhou, X., Zhang, L., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S., Tang, L., Tang, W., Zhang, Y., Shi, H., Feng, L., 2019. Vitamin A deficiency impairs intestinal physical barrier function of fish. *Fish Shellfish Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.056>
- Jiang, Y., Xie, C., Yang, G., Gong, X., Chen, X., Xu, L., Bao, B., 2011. Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). *Aquac. Res.* 42, 499–505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02645.x>
- Jin, C., Padra, J.T., Sundell, K., Sundh, H., Karlsson, N.G., Lindén, S.K., 2015. Atlantic Salmon Carries a Range of Novel O-Glycan Structures Differentially Localized on Skin and Intestinal Mucins. *J. Proteome Res.* 14, 3239–3251. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00232>
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 41, 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.013>
- Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N., Núñez, G., 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 14, 685–690. <https://doi.org/10.1038/ni.2608>
- Kamalam, B.S., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2012. Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *J. Exp. Biol.* 215, 2567–2578. <https://doi.org/10.1242/jeb.070581>
- Kamalam, B.S., Médale, F., Larroquet, L., Corraze, G., Panserat, S., 2013a. Metabolism and fatty acid profile in fat and lean Rainbow trout lines fed with vegetable oil: Effect of carbohydrates. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076570>
- 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* 467, 3–27.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>

- Kamalam, B.S., Panserat, S., Aguirre, P., Geurden, I., Fontagné-dicharry, S., Médale, F., 2013b. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Selection for high muscle fat in rainbow trout induces potentially higher chylomicron synthesis and PUFA biosynthesis in the intestine. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 164, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.020>
- Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B., 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- Karasov, W.H., Martínez Del Rio, C., Caviedes-Vidal, E., 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 69–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142152>
- Karim, A.A., Norziah, M.H., Seow, C.C., 2000. Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chem.* 71, 9–36. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00130-8)
- Kastl, A.J., Terry, N.A., Wu, G.D., Albenberg, L.G., 2020. The structure and function of the human small intestinal microbiota: current understanding and future directions. *Cmgh* 9, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
- Kaushik, S.J., Panserat, S., Schrama, J.W., 2022. Carbohydrates. *Fish Nutr.* 555–591. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819587-1.00008-2>
- Khare, A., Gaur, S., 2020. Cholesterol-Lowering Effects of *Lactobacillus* Species. *Curr. Microbiol.* 77, 638–644. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w>
- Kim, D.H., Brunt, J., Austin, B., 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 102, 1654–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., Igarashi, M., 2019. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 134, 337–347. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00267-2)
- Kirchner, Séverine, Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 133, 2561–2564. <https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2561>
- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., De Scheemaker, G., 2012. Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquac. Nutr.* 18, 521–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00923.x>
- Kok, B., Malcorps, W., Tlustý, M.F., Eltholth, M.M., Auchterlonie, N.A., Little, D.C., Harmsen, R., Newton, R.W., Davies, S.J., 2020. Fish as feed: Using economic allocation to quantify the Fish in - Fish-out ratio of major fed aquaculture species. *Aquaculture* 528, 735474. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735474>
- Kokou, F., Sasson, G., Friedman, J., Eyal, S., Ovadia, O., Harpaz, S., Cnaani, A., Mizrahi, I., 2019. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish. *Nat. Microbiol.* 4, 2456–

2465. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0560-0>

- Kononova, S. V., Zinchenko, D. V., Muranova, T.A., Belova, N.A., Miroshnikov, A.I., 2019. Intestinal microbiota of salmonids and its changes upon introduction of soy proteins to fish feed. *Aquac. Int.* 27, 475–496. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00341-1>
- Krasnov, A., Teerijoki, H., Mölsä, H., 2001. Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1520, 174–178. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00258-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00258-5)
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 141, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.06.002>
- Krogdahl, Å., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* 11, 103–122. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2004.00327.X>
- Krogdahl, Å., Nordrum, S., Sørensen, M., Brudeseth, L., Røsjø, C., 1999. Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquac. Nutr.* 5, 121–133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00095.x>
- 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. *Aquac. Res.* 41, 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Krogdahl, Å., Sundby, A., Olli, J.J., 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229, 335–360. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00396-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00396-X)
- Król, E., Douglas, A., Tocher, D.R., Crampton, V.O., Speakman, J.R., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2016. Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics* 17, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2473-0>
- Kuei, C., Yu, J., Zhu, J., Wu, J., Zhang, L., Shih, A., Mirzadegan, T., Lovenberg, T., Liu, C., 2011. Study of GPR81, the lactate receptor, from distant species identifies residues and motifs critical for GPR81 functions. *Mol. Pharmacol.* 80, 848–858. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074500>
- Lavoie, C., Courcelle, M., Redivo, B., Derome, N., 2018. Structural and compositional mismatch between captive and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) parrs' gut microbiota highlights the relevance of integrating molecular ecology for management and conservation methods. *Evol. Appl.* 1–15. <https://doi.org/10.1111/eva.12658>
- 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, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117609>
- Leavens, K.F., Easton, R.M., Shulman, G.I., Previs, S.F., Birnbaum, M.J., 2009. Akt2 Is Required for Hepatic Lipid Accumulation in Models of Insulin Resistance. *Cell Metab.* 10, 405–418.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.004>

- LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Fact.* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M., 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lee, Y.S., Kim, T.Y., Kim, Y., Kim, S., Lee, S.H., Seo, S.U., Zhou, B.O., Eunju, O., Kim, K.S., Kweon, M.N., 2021. Microbiota-derived lactate promotes hematopoiesis and erythropoiesis by inducing stem cell factor production from leptin receptor+ niche cells. *Exp. Mol. Med.* 53, 1319–1331. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00667-y>
- Lee, Y.S., Kim, T.Y., Kim, Y., Lee, S.H., Kim, S., Kang, S.W., Yang, J.Y., Baek, I.J., Sung, Y.H., Park, Y.Y., Hwang, S.W., Eunju, O., Kim, K.S., Liu, S., Kamada, N., Gao, N., Kweon, M.N., 2018. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe* 24, 833-846.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.002>
- Legrand, T.P.R.A., Wos-Oxley, M.L., Wynne, J.W., Weyrich, L.S., Oxley, A.P.A., Thibault, C., Legrand, P.R.A., 2021. Dead or alive: microbial viability treatment reveals both active and inactive bacterial constituents in the fish gut microbiota. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.15113>
- Li, M., Hu, F.C., Qiao, F., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2020. Sodium acetate alleviated high-carbohydrate induced intestinal inflammation by suppressing MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 98, 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.024>
- Li, W., Liu, J., Tan, H., Yang, C., Ren, L., Liu, Q., Wang, S., Hu, F., Xiao, J., Zhao, R., Tao, M., Zhang, C., Qin, Q., Liu, S., 2018. Genetic effects on the gut microbiota assemblages of hybrid fish from parents with different feeding habits. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02972>
- Li, X., Yu, Y., Feng, W., Yan, Q., Gong, Y., 2012. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae 50, 29–37. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1340-1>
- Li, Y., Bruni, L., Jaramillo-Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., 2021. Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00071-3>
- Lian, C.A., Yan, G.Y., Huang, J.M., Danchin, A., Wang, Y., He, L.S., 2020. Genomic characterization of a novel gut symbiont from the Hadal Snailfish. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02978>
- Liang, L., Liu, L., Zhou, W., Yang, C., Mai, G., Li, H., Chen, Y., 2022. Gut microbiota-derived butyrate regulates gut mucus barrier repair by activating the macrophage/WNT/ERK signaling pathway. *Clin. Sci.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/CS20210778>
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms : Mucins , Antimicrobial Peptides , and Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315>
- Linden, A.G., Li, S., Choi, H.Y., Fang, F., Fukasawa, M., Uyeda, K., Hammer, R.E., Horton, J.D., Engelking, L.J., Liang,



- G., 2018. Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *J. Lipid Res.* 59, 475–487. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081836>
- Lindsay, G.J.H., Walton, M.J., Adron, J.W., Fletcher, T.C., Cho, C.Y., Cowey, C.B., 1984. The growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility. *Aquaculture* 37, 315–334. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90297-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90297-7)
- Ling, S.W., 1977. *Aquaculture in Southeast Asia: A historical overview*. University of Washington Press, Seattle.
- Liu, B., Qian, J., Wang, Q., Wang, F., Ma, Z., Qiao, Y., 2014. Butyrate protects rat liver against total hepatic ischemia reperfusion injury with bowel congestion. *PLoS One* 9, 2–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106184>
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., Sutton, S.W., Li, X., Su, J.Y., Mirzadegan, T., Mazur, C., Kamme, F., Lovenberg, T.W., 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* 284, 2811–2822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806409200>
- Liu, D., Zhang, Z., Song, Y., Yang, J., Lu, Y., Lai, W., Wu, Z., Zhao, D., Lin, H., Zhang, Y., Zhang, J., Li, S., 2023. Effects of salinity on growth, physiology, biochemistry and gut microbiota of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquat. Toxicol.* 258, 106482. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106482>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., Zhou, Z., 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil 15–29. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000610>
- Lkka, G., Austb, L., Falk, K., Bjerckås, I., Koppang, E.O., 2013. Intestinal morphology of the wild atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Morphol.* 274, 859–876. <https://doi.org/10.1002/jmor.20142>
- Llewellyn, M.S., McGinnity, P., Dionne, M., Letourneau, J., Thonier, F., Carvalho, G.R., Creer, S., Derome, N., 2016. The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *ISME J.* 10, 1280–1284. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.189>
- Lokesh, J., Delaygues, M., Defaix, R., Le Behec, M., Pigot, T., Dupont Nivet, M., Kerneis, T., Labbé, L., Goardon, L., Terrier, F., Panserat, S., Ricaud, K., 2023. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *Br. J. Nutr.* 1–40. <https://doi.org/10.1017/s0007114523000120>
- Lokesh, J., Ghislain, M., Reyrolle, M., Le Behec, M., Pigot, T., Terrier, F., Roy, J., Panserat, S., Ricaud, K., 2022. Prebiotics modify host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a total plant-based diet: Potential implications for microbiome-mediated diet optimization. *Aquaculture* 561, 738699. <https://doi.org/http://10.1016/j.aquaculture.2022.738699>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lührs, H., Gerke, T., Müller, J.G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberger, F., Scheppach, W., Menzel, T., 2009.

- Butyrate inhibits NF- $\kappa$ B activation in *lamina propria* macrophages of patients with ulcerative colitis. <http://dx.doi.org/10.1080/003655202317316105> 37, 458–466. <https://doi.org/10.1080/003655202317316105>
- Luna, G.M., Quero, G.M., Kokou, F., Kormas, K., 2022. Time to integrate biotechnological approaches into fish gut microbiome research. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.018>
- M. Hartviksen, J.L.G. Vecino, E. Ringø, A.-M. Bakke, S. Wadsworth, Å. Krogdahl, K. Ruohonen, A.K., 2014. Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth. *Aquac. Nutr.* <https://doi.org/10.1111/anu.12087>
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R.S., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2017. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 476, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Mansfield, G.S., Desai, A.R., Nilson, S.A., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., Hill, J.E., 2010. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 307, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.014>
- Manzo, N., D’Apuzzo, E., Coutinho, P.M., Cutting, S.M., Henrissat, B., Ricca, E., 2011. Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: A genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. *BMC Microbiol.* 11, 198. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-198>
- Marandel, L., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Arbenoits, E., Soengas, J.L., Bobe, J., 2017. Evolutionary history of glucose-6-phosphatase encoding genes in vertebrate lineages: Towards a better understanding of the functions of multiple duplicates. *BMC Genomics* 18, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3727-1>
- Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2015. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A gene duplication trail. *Physiol. Genomics* 47, 253–263. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V.D., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., Furet, J.P., 2009. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
- Martens, E.C., Lowe, E.C., Chiang, H., Pudlo, N.A., Wu, M., McNulty, N.P., Abbott, D.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Gordon, J.I., 2011. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001221>
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H.M., Larraufie, P., Lapaque, N., 2021. Conference on diet and digestive disease symposium 2: Sensing and signalling of the gut environment: Scfa: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.* 80, 37–49. <https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Médale, F., Brauge, C., Vallee, F., Kaushik, S., 1995. Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. *Wat. Sci. Tech.* 31(10):185.
- Menanteau-Ledouble, S., Skov, J., Lukassen, M.B., Rolle-Kampczyk, U., Haange, S.-B., Dalsgaard, I., von Bergen, M., Nielsen, J.L., 2022. Modulation of gut microbiota, blood metabolites, and disease resistance by dietary  $\beta$ -glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Microbiome* 4. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00209-5>
- Merrifield, Daniel L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S.J., Baker, R.T.M., 2009. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* 40, 1064–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02200.x>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2009. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 32, 755–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01052.x>
- Mirghaed, A.T., Yarahmadi, P., Soltani, M., Paknejad, H., Hoseini, S.M., 2019. Dietary sodium butyrate (Butirex® C4) supplementation modulates intestinal transcriptomic responses and augments disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 92, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.046>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., Das, P., Paniprasad, K., Mohanta, K.N., 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: Effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquac. Nutr.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00866.x>
- Mondal, S., Roy, T., Ray, A.K., 2010. Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata*. *J. World Aquac. Soc.* 41, 369–377. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00378.x>
- Moon, T.W., 2004. Hormones and fish hepatocyte metabolism: “The good, the bad and the ugly!” *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 139, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.06.003>
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 129, 243–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5)
- Moon, T.W., 1988. Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* 66, 1059–1068. <https://doi.org/10.1139/z88-156>
- Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Mountfort, D.O., Campbell, J., Kendall, D., Clements, K.D., 2002. Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1374–1380. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1374>
- Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N., Kyrpides, N.C., Pati, A., 2015. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by illumina Phix control. *Stand. Genomic Sci.* 10, 1–4. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-18>

- Nagy, E., 2010. Update on Treatment Considerations. *Drugs* 70, 841–858.
- Nakajima, H., Nakanishi, N., Miyoshi, T., Okamura, T., Hashimoto, Y., Senmaru, T., Majima, S., Ushigome, E., Asano, M., Yamaguchi, M., Mori, J., Sakui, N., Sasano, R., Yamazaki, M., Hamaguchi, M., Fukui, M., 2022. Inulin reduces visceral adipose tissue mass and improves glucose tolerance through altering gut metabolites. *Nutr. Metab.* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00685-1>
- 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>
- Nash, C.E., 2011. The History of Aquaculture. *Hist. Aquac.* 1–227. <https://doi.org/10.1002/9780470958971>
- Nastasi, C., Candela, M., Bonefeld, C.M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., Biagi, E., Andersen, M.H., Brigidi, P., Ødum, N., Litman, T., Woetmann, A., 2015. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci. Rep.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep16148>
- Navarrete, P., Espejo, R.T., Romero, J., 2009. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 550–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>
- Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2012. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031335>
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T.W., Plisetskaya, E.M., Baños, N., Méndez, E., Planas, J. V., Gutiérrez, J., 1999. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: The evolution of their receptors. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 122, 137–153. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10163-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10163-3)
- Navarro, I., P.Rojas, E.Capilla, A.Albalat, J.Castillo, N.Montserrat, M.Codina, J.Gutierrez, 2002. Insights into insulin and glucagon responses in fish: fish growth and metabolism. *Environmental. Fish Physiol. Biochem.* 27 27, 205–216.
- Nawaz, A., Bakhsh javaid, A., Irshad, S., Hoseinifar, S.H., Xiong, H., 2018. The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. *Fish Shellfish Immunol.* 76, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.004>
- Naya-Català, F., do Vale Pereira, G., Piazzon, M.C., Fernandes, A.M., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Conceição, L.E.C., Pérez-Sánchez, J., 2021. Cross-Talk between intestinal microbiota and host gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Juveniles: Insights in Fish Feeds for Increased Circularity and Resource Utilization. *Front. Physiol.* 12, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.748265>
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–15110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>
- Nguyen Dang Giang, C., Sebesvari, Z., Renaud, F., Rosendahl, I., Hoang Minh, Q., Amelung, W., 2015. Occurrence and dissipation of the antibiotics sulfamethoxazole, sulfadiazine, trimethoprim, and enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam. *PLoS One* 10, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131855>
- Nishina, P.M., Freedland, R.A., 1990. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J.*

Nutr. 120, 668–673. <https://doi.org/10.1093/JN/120.7.668>

- Nishitani, S., Takehana, K., Fujitani, S., Sonaka, I., 2005. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 288, 1292–1300. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00510.2003>
- Nordrum, S., Olli, J.J., Røsjø, C., Holm, H., Krogdahl, Å., 2003. Effects of graded levels of medium chain triglycerides and cysteine on growth, digestive processes and nutrient utilization in sea water reared Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) under ad libitum feeding regime. *Aquac. Nutr.* 9, 263–274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00252.x>
- Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223–247. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00702-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00702-5)
- Oliphant, K., Allen-Vercoe, E., 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Oliva Teles, A., Couto, A., Enes, P., Peres, H., 2019. Dietary protein requirements of fish – a meta-analysis. *Rev. Aquac.* 1–33. <https://doi.org/10.1111/raq.12391>
- Olsen, R.L., Hasan, M.R., 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends Food Sci. Technol.* 27, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.003>
- Olsson, C., 2011. GUT ANATOMY AND MORPHOLOGY | Gut Anatomy. *Environ. Vol. 1-3* 1–3, 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00071-X>
- Olsvik, P.A., Lie, K.K., Jordal, A.E.O., Nilsen, T.O., Hordvik, I., 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Ono, H., Shimano, H., Katagiri, H., Yahagi, N., Sakoda, H., Onishi, Y., Anai, M., Ogihara, T., Fujishiro, M., Viana, A.Y.I., Fukushima, Y., Abe, M., Shojima, N., Kikuchi, M., Yamada, N., Oka, Y., Asano, T., 2003. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* 52, 2905–2913.
- Orlandi, K., Burrell, E.D., Bernhardt, C., 2017. Zoologischer anzeiger dietary differentiation in relation to mouth and tooth morphology of a neotropical characid fish community. *Zool. Anzeiger - A J. Comp. Zool.* 267, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.01.003>
- Ortiz, L.T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M.L., Treviño, J., Tejedor, J.L., Alzueta, C., 2013. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 19, 475–482. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2012.00981.X>
- Oskar M. Løken, Håvard Bjørgen, Ivar Hordvik, Erling O. Koppang, 2020. A teleost structural analogue to the avian bursa of Fabricius. *J. Anat.* 798–808. <https://doi.org/10.1111/joa.13147>
- Otero-Rodiño, C., Rocha, A., Sánchez, E., Álvarez-Otero, R., Soengas, J.L., Cerdá-Reverter, J.M., 2019. Sensing glucose in the central melanocortin circuits of rainbow trout: A morphological study. *Front. Endocrinol.*

- (Lausanne). 10, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00254>
- Owczarek, D., Rodacki, T., Domagała-rodacka, R., Cibor, D., Mach, T., Owczarek, D., Domagała-rodacka, R., 2016. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases 22, 895–905. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.895>
- Panserat, Rideau, Polakof, 2014. Nutritional regulation of glucokinase: A cross-species story. *Nutr. Res. Rev.* 27, 21–47. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000018>
- Panserat, S., Hortopan, G.A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., Corraze, G., 2009a. 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>
- Panserat, S., Kaushik, S., Médale, F., 2013. Rainbow trout as a model for nutrition and nutrient metabolism studies. *Trout: from physiology to conservation. Nov. Sci. Publ.* 131-153.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, G., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 1164–1170. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.5.r1164>
- Panserat, S, Médale, F., Brèque, J., Kaushik, S., 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 11, 22–29.
- Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000b. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* 11, 22–29. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00067-4)
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360. <https://doi.org/10.1242/JEB.204.13.2351>
- Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chavernac, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T.W., 2009b. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: A link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, 707–715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2009>
- Pardesi, B., Robertson, A.M., Lee, K.C., Angert, E.R., Rosendale, D.I., Boycheva, S., White, W.L., Clements, K.D., 2022. Distinct microbiota composition and fermentation products indicate functional compartmentalization in the hindgut of a marine herbivorous fish. *Mol. Ecol.* 1–16. <https://doi.org/10.1111/mec.16394>
- Pariset TJ, 1958. TUBERCULOSIS OF FISH. *Bacteriol. Rev.*
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.A., Hugenholtz, P., 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat. Biotechnol.* 36, 996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Parshukov, A.N., Fokina, N.N., Sukhovskaya, I. V., Kantserova, N.P., Lysenko, L.A., 2022. Infection and antibiotic

- treatment have prolonged effects on gut microbiota, muscle and hepatic fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 133, 1709–1724. <https://doi.org/10.1111/JAM.15674>
- Pascoe, E.L., Hauffe, H.C., Marchesi, J.R., Perkins, S.E., 2017. Network analysis of gut microbiota literature: An overview of the research landscape in non-human animal studies. *ISME J.* 11, 2644–2651. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.133>
- Pathak, S., Kesavan, P., Banerjee, Anushka, Banerjee, Antara, Celep, G.S., Bissi, L., Marotta, F., 2018. Metabolism of dietary polyphenols by human gut microbiota and their health benefits. *Polyphenols Mech. Action Hum. Heal. Dis.* 347–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00025-8>
- Paul, D., Bengal, W., 2016. Microorganisms and A-Amylase : a Concise Review. *Innovare J. Sci.* 4, 1–5.
- Pawig, L., Klasen, C., Weber, C., Bernhagen, J., Noels, H., 2015. Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: Molecular perspectives. *Front. Immunol.* 6, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00429>
- Payne, C.J., Turnbull, J.F., MacKenzie, S., Crumlish, M., 2022. The effect of oxytetracycline treatment on the gut microbiome community dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) over time. *Aquaculture* 560, 738559. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738559>
- Peixoto, D., Machado, M., Azeredo, R., Costas, B., 2022. Chronic Inflammation Modulates Opioid Receptor Gene Expression and Triggers Respiratory Burst in a Teleost Model. *Biology (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/biology11050764>
- Peng, L., He, Z., Chen, W.E.I., Holzman, I.A.N.R., Lin, J., Sinai, M., York, N., York, N., Al, P.E.T., 2007. Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. *Pediatr. Res.* 61, 37–41. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3>
- Penn, M.H., Bendiksen, E.A., Campbell, P., Krogdahl, A.S., 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 310, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.040>
- Peres, H., Oliva-teles, A., 2007. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth , feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass ( *Dicentrarchus labrax* ) 267, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.010>
- Peres, H., Oliva-teles, A., 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth , feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass ( *Dicentrarchus labrax* ) 256, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.010>
- Pérez-Pascual, D., Pérez-Cobas, A.E., Rigaudeau, D., Rochat, T., Bernardet, J.-F., Skiba-Cassy, S., Marchand, Y., Duchaud, E., Ghigo, J.-M., 2021. Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection. *Anim. Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00107-2>
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Múezquiz, J.L., 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol.* 3, 355–360. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>
- Perler, B.K., Friedman, E.S., Wu, G.D., 2023. The role of the gut microbiota in the relationship between diet and

- human health. *Annu. Rev. Physiol.* 85, 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031522-092054>
- Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Pignatelli, J., Jørgensen, L.V.G., Castro, R., Abo, B., 2014. Early immune responses in Rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Infection* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111084>
- Pillay, T.V.R., Kutty, M.N., 2005. *Aquaculture : principles and practices* 624.
- Plagnes-Juan, E., Lansard, M., Seilliez, I., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., 2008. Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.*
- Plan Aquacultures D' Avenir, 2022.
- Polakof S, Skiba-Cassy S, Choubert G, P.S., 2010. Insulin- induced hypoglycaemia is co-ordinately regulated by liver and muscle during acute and chronic insulin stimulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.*
- Polakof, Sergio, Álvarez, R., Soengas, J.L., 2010. Gut glucose metabolism in rainbow trout: Implications in glucose homeostasis and glucosensing capacity. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, 19–32. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00005.2010>
- Polakof, S., Médale, F., Larroquet, L., Vachot, C., Corraze, G., Panserat, S., 2011a. Insulin stimulates lipogenesis and attenuates beta-oxidation in white adipose tissue of fed rainbow trout. *Lipids* 46, 189–199. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3521-1>
- Polakof, S., Médale, F., Larroquet, L., Vachot, C., Corraze, G., Panserat, S., 2011b. Regulation of de novo hepatic lipogenesis by insulin infusion in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet. *J. Anim. Sci.* 89, 3079–3088. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3733>
- Polakof, S., Médale, F., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Panserat, S., 2010a. Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.01.003>
- Polakof, S., Moon, T.W., Aguirre, P., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2010b. Effects of insulin infusion on glucose homeostasis and glucose metabolism in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet. *J. Exp. Biol.* 213, 4151–4157. <https://doi.org/10.1242/jeb.050807>
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 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 Immunol.* 127, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.055>
- Prentki, M., Matschinsky, F.M., Madiraju, S.R.M., 2013. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab.* 18, 162–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.018>
- Priyadarshini, M., Navarro, G., Layden, B.T., 2018. Gut microbiota: FFAR reaching effects on islets. *Endocrinology* 159, 2495–2505. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00296>



- Qiang, J., He, J., Yang, H., Sun, Y.L., Tao, Y.F., Xu, P., Zhu, Z.X., 2017. Dietary lipid requirements of larval genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and effects on growth performance, expression of digestive enzyme genes, and immune response. *Aquac. Res.* 48, 2827–2840. <https://doi.org/10.1111/are.13117>
- R. Havenaar, 2010. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Benef. Microbes* 2, 103–114. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0003>
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna., 2018.
- Rajagopal, S., Shenoy, S.K., 2018. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell. Signal.* 41, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>
- Rasmussen, J.A., Kiilerich, P., Madhun, A.S., Waagbø, R., Lock, E.J.R., Madsen, L., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2023. Co-diversification of an intestinal *Mycoplasma* and its salmonid host. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01379-z>
- Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., Duchêne, D.A., Puetz, L.C., Delmont, T.O., Sveier, H., Jørgensen, L. von G., Præbel, K., Martin, M.D., Bojesen, A.M., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2021. Genome-resolved metagenomics suggests a mutualistic relationship between *Mycoplasma* and salmonid hosts. *Commun. Biol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02105-1>
- Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., von Gersdorff Jørgensen, L., Forberg, T., Zuo, S., Kania, P.W., Buchmann, K., Kristiansen, K., Bojesen, A.M., Limborg, M.T., 2022. Integrative analyses of probiotics, pathogenic infections and host immune response highlight the importance of gut microbiota in understanding disease recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 132, 3201–3216. <https://doi.org/10.1111/jam.15433>
- Rawles, S.D., Smith, S.B., Gatlin, D.M., 2008. Hepatic glucose utilization and lipogenesis of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) in response to dietary carbohydrate level and complexity. *Aquac. Nutr.* 14, 40–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00503.x>
- Ray, A.K., Ghosh, K., Ringø, E., 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquac. Nutr.* 18, 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Ray, A.K., Roy, T., Mondal, S., Ringø, E., 2010. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquac. Res.* 41, 1462–1469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02437.x>
- Razin, S., 1992. Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 423–431. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90241-F](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90241-F)
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M.A., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes Dev.* 14, 2819–2830. <https://doi.org/10.1101/gad.844900>

- 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. *Rev. Aquac.* 13, 537–555. <https://doi.org/10.1111/raq.12485>
- Reza, A., Abdolmajid, H., Abbas, M., Abdolmohammad, A.K., 2009. Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *J. World Aquac. Soc.* 40, 771–779. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x>
- Ricaud, K., Rey, M., Plagnes-Juan, E., Larroquet, L., Even, M., Quillet, E., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2018. Composition of intestinal microbiota in two lines of Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) divergently selected for muscle fat content. *Open Microbiol. J.* 12. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010308>
- Ringø, E., Birkbeck, T., 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry [WWW Document]. *Aquac. Res.* URL <https://web.p.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=1355557X&AN=5240467&h=9CbjRJKskpQpnO4AGahqBV2Efum2qGO%2BSsqmGBLI0Sal0RwXLAnMDpwRQhhTwV20GzKM2zFLE5TguDPy7WI5wA%3D%3D&crI=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=Er> (accessed 6.6.23).
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bakke, A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquac. Nutr.* 16, 117–136. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2009.00731.X>
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Olsen, R.E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H.L., Martinsen, L.L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., Merrifield, D.L., 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquac. Nutr.* 22, 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2013. Effects of inactivated *Enterococcus faecalis* and Mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity, and disease protection in Rainbow trout. *Chang. Publ. Wiley* 75, 416–428. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.799620>
- Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K., Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 1595–1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
- Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., Ferdous, Z., Siddik, M.A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., Shahjahan, M., 2022a. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 120, 569–589. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.037>
- Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.* 51, 422–430. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9037-9>
- Romero, J., Ringø, E., Merrifield, D.L., 2014. The gut microbiota of fish. *Aquac. Nutr. Gut Heal. Probiotics Prebiotics* 75–100. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>
- Rottem, S., 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 83, 417–432. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2002>

- Roy, J., Baranek, E., Marandel, L., 2023. Characterization of free fatty acid receptor family in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): towards a better understanding of their involvement in fatty acid signalisation. *BMC Genomics* 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09181-z>
- Roy, J., Mercier, Y., Tonnet, L., Burel, C., Lanuque, A., Surget, A., Larroquet, L., Corraze, G., Terrier, F., Panserat, S., Skiba, S., 2020. Rainbow trout prefer diets rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids DHA and EPA. *Physiol. Behav.* 213, 112692. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112692>
- Roy, J., Terrier, F., Marchand, M., Herman, A., Heraud, C., Surget, A., Lanuque, A., Sandres, F., Marandel, L., 2021. Effects of low stocking densities on zootechnical parameters and physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Biology (Basel)*. 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology10101040>
- Ruddle, K., and Zhong, G., 1988. Integrated Agriculture-Aquaculture in South China. The Dike-Pond System of the Zhujiang Delta. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sáez, A., Ots, E., García, C., Rodríguez-borregán, J.C., Miñambres, E., Sáez, A., Ots, E., García, C., Rodríguez-borregán, J.C., 2003. Pneumonia due to *Mycoplasma hominis* in a Healthy Adult. *Scand. J. Infect. Dis.* ISSN 5548. <https://doi.org/10.1080/0036554021000027005>
- Saha, S., Roy, R.N., Sen, S.K., Ray, A.K., 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* 380–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01442.x>
- 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 Immunol.* 34, 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.031>
- Sahraei, F., Ahari, H., Kakoolaki, S., 2019. Effect of *Bacillus subtilis* as a probiotic on protein, lipid content, and trypsin and chymotrypsin enzymes in rainbow trout biometry (*Oncorhynchus mykiss*) 141–153.
- Sakata, T., Yajima, T., 1984. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q. J. Exp. Physiol.* 69, 639–648. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1984.sp002850>
- Salze, G.P., Davis, D.A., 2015. Taurine: A critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture* 437, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.006>
- Samuelsen, T.A., Mjøs, S.A., Oterhals, Å., 2013. Impact of variability in fishmeal physicochemical properties on the extrusion process, starch gelatinization and pellet durability and hardness. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.10.009>
- Sandström, V., Chrysafi, A., Lamminen, M., Troell, M., Jalava, M., Piipponen, J., Siebert, S., van Hal, O., Virkki, V., Kummu, M., 2022. Food system by-products upcycled in livestock and aquaculture feeds can increase global food supply. *Nat. Food* 3, 729–740. <https://doi.org/10.1038/s43016-022-00589-6>
- Santigosa, E., García-meilán, I., Valentin, J.M., Pérez-sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Gallardo, M.A., 2011. Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 317, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.026>

- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Gallardo, M.A., 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.007>
- Santos, F., Wegkamp, A., Vos, W.M. De, Eddy, J., Santos, F., Wegkamp, A., Vos, W.M. De, Smid, E.J., Hugenholtz, J., 2008. High-Level Folate Production in Fermented Foods by the B 12 Producer *Lactobacillus* High-Level Folate Production in Fermented Foods by the B 12 Producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02719-07>
- Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., 2015. No Vacancy: How beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* 176, 139–148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2007.01883.X>
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* 69, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Seiliez, I., Gabillard, J.C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, 329–335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2008>
- Seiliez, I., Panserat, S., Lansard, M., Polakof, S., Plagnes-Juan, E., Surget, A., Dias, K., Larquier, M., Kaushik, S., Skiba-Cassy, S., 2011. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, 733–743. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00579.2010>
- Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., MacKey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe* 12, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>
- 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, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80138-y>
- Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J.I., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., Yamada, N., 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274, 35832–35839. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35832>
- Shojadoost, B., Alizadeh, M., Boodhoo, N., Astill, J., Karimi, S.H., Shoja Doost, J., Taha-Abdelaziz, K., Kulkarni, R., Sharif, S., 2022. Effects of treatment with *Lactobacilli* on necrotic enteritis in broiler chickens. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 14, 1110–1129. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09901-5/METRICS>
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem.* 36, 781–785. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00275-2)
- Singh, R.K., Balange, A.K., Ghughuskar, M.M., 2006. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus*

- mrigala* (Hamilton, 1822) fry. *Aquaculture* 258, 680–684.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.049>
- Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S., Staykov, Y., 2015. The importance of microalgae for aquaculture industry . Review . *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2, 81–84.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031>
- Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., Seiliez, I., 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 109, 1359–1372.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114512003352>
- Socol, C.R., Porto, L., Vandenberghe, D.S., Spier, M.R., Bianchi, A., Medeiros, P., Yamagishi, C.T., 2013. The potential of probiotics : A review. *Food Technol. Biotechnol* 48, 413–434.
- Soengas, J.L., Aldegunde, M., Andrés, M.D., 1995. Gradual transfer to sea water of rainbow trout: effects on liver carbohydrate metabolism. *J. Fish Biol.* 466–478.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W., 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: Changes with food deprivation and refeeding. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, 810–821. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00115.2006>
- Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M., Abadi, Z.H., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 316–321. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2011.11.023>
- Soleimanian, Y., Sanou, I., Turgeon, S.L., Canizares, D., Khalloufi, S., 2022. Natural plant fibers obtained from agricultural residue used as an ingredient in food matrixes or packaging materials: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21, 371–415. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12875>
- 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 Immunol.* 40, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Song, X., Marandel, L., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018a. Hepatic glucose metabolic responses to digestible dietary carbohydrates in two isogenic lines of rainbow trout. *Biol. Open* 7. <https://doi.org/10.1242/bio.032896>
- Song, X., Marandel, L., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018b. Regulation by dietary carbohydrates of intermediary metabolism in liver and muscle of two isogenic lines of rainbow trout. *Front. Physiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01579>
- Soty, M., Penhoat, A., Amigo-Correig, M., Vinera, J., Sardella, A., Vullin-Bouilloux, F., Zitoun, C., Houberdon, I., Mithieux, G., 2015. A gut-brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol. Metab.* 4, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.009>
- Steinberg, C.E.W., 2022. Aquatic Animal Nutrition. *Aquat. Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1007/978-3-030-87227-7>

- Stevens, J.R., Newton, R.W., Tlustý, M., Little, D.C., 2018. The rise of aquaculture by-products: Increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation. *Mar. Policy* 90, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.12.027>
- Stone, D.A.J., 2003. Dietary Carbohydrate Utilization by Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 337–369.
- Syed Raffic Ali, S., Ambasankar, K., Praveena, P.E., Nandakumar, S., Saiyad Musthafa, M., 2018. Effect of dietary prebiotic inulin on histology, immuno-haematological and biochemical parameters of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquac. Res.* 49, 2732–2740. <https://doi.org/10.1111/are.13734>
- Tacon, A.G.J., 1992. Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Subasinghe, R., 2006. USE OF FISHERY RESOURCES AS FEED INPUTS TO AQUACULTURE DEVELOPMENT : TRENDS AND POLICY IMPLICATIONS. FAO 114.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2013. Fish matters: Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev. Fish. Sci.* 21, 22–38. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Miyatake, H., Ukawa, M., 2010. Necessity of dietary taurine supplementation for preventing green liver symptom and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed nonfishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fish. Sci.* 76, 119–130. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0185-y>
- Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., Krishan, R., 2018. Fish gut microbiome : current approaches and future perspectives. *Indian J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0760-y>
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I.G., Lobo, C., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microb. Ecol.* 60, 310–319. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9680-z>
- Taschuk, R., Griebel, P.J., 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 129–141. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000096>
- Tawfick, M.M., Xie, H., Zhao, C., Shao, P., Farag, M.A., 2022. Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics. *Int. J. Biol. Macromol.* 208, 948–961. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.218>
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkänen, T.I., Mölsä, H., 2000. Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1494, 290–294. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00216-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00216-5)
- Terova, G., Gini, E., Gasco, L., Moroni, F., Antonini, M., Rimoldi, S., 2021. Effects of full replacement of dietary fishmeal with insect meal from *Tenebrio molitor* on rainbow trout gut and skin microbiota. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00551-9>

- Theilmann, M.C., Goh, Y.J., Nielsen, K.F., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Hachem, M.A., 2017. *Lactobacillus acidophilus* metabolizes dietary plant glucosides and externalizes their bioactive phytochemicals. MBio 8. [https://doi.org/10.1128/MBIO.01421-17/SUPPL\\_FILE/MBO006173598ST7.DOCX](https://doi.org/10.1128/MBIO.01421-17/SUPPL_FILE/MBO006173598ST7.DOCX)
- Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, 145–167. <https://doi.org/10.1002/jpln.200390023>
- Tian, L., Tan, P., Yang, L., Zhu, W., Xu, D., 2020. Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*). Aquaculture 528. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735470>
- Tientam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P., Boonanutanasarn, S., 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim. Feed Sci. Technol. 207, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2015.05.008>
- Tilman, D., Clark, M., 2014. Global diets link environmental sustainability and human health. Nature 515, 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- Timmons, M., Ebeling, J., 2010. Recirculating Aquaculture Systems, Aquaculture Production Systems.
- Titchenell, P.M., Lazar, M.A., Birnbaum, M.J., 2017. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. Trends Endocrinol. Metab. 28, 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
- Troell, M., Naylor, R.L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P.H., Folke, C., Arrow, K.J., Barrett, S., Crépin, A.S., Ehrlich, P.R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S.A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B.H., Xepapadeas, T., De Zeeuw, A., 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 13257–13263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404067111>
- Turchini, G.M., Francis, D.S., Du, Z.Y., Olsen, R.E., Ringø, E., Tocher, D.R., 2022. The lipids. Fish Nutr. 303–467. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819587-1.00003-3>
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. Rev. Aquac. 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. J. Allergy Clin. Immunol. 125, S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- UEMOFA, 2021. STRUCTURE DES PRIX DANS LA CHAÎNE D'APPROVISIONNEMENT. <https://doi.org/10.2771/866798>
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C., 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. J. Nutr. 141, 769–776. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
- Urán, P.A., Schrama, J.W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J.H.W.M., Koppe, W., Verreth, J.A.J., 2009. Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquac. Nutr. 15, 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00615.x>
- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D., 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. BMJ 361, 36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Sprenger, W., Haanstra, R., Forney, L.J., 1999. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species. FEMS Microbiol. Lett. 173, 189–194.

[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00071-3)

- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis, S., Verbeke, K., Raes, J., 2017. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut* 66, 1968–1974. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313271>
- Vasiljevic, T.Ā., Shah, N.P., 2008. Probiotics — From Metchnikoff to bioactives 18, 714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Véron, V., Panserat, S., Le Boucher, R., Labbé, L., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Médale, F., 2016. Long-term feeding a plant-based diet devoid of marine ingredients strongly affects certain key metabolic enzymes in the rainbow trout liver. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 771–785. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0174-2>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000>
- Viegas, I., Jarak, I., Rito, J., Carvalho, R.A., Metón, I., Pardal, M.A., Baanante, I. V., Jones, J.G., 2016. Effects of dietary carbohydrate on hepatic de novo lipogenesis in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Lipid Res.* 57, 1264–1272. <https://doi.org/10.1194/jlr.M067850>
- 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*). *Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.04.003>
- Vincent B. Young, 2012. The intestinal microbiota in health and disease Vincent. *Curr Opin Gastroenterol.* 88, 1–20. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834d61e9.The>
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout , *Onchorhynchus mykiss* , fry 258, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.002>
- Walker, A.W., Duncan, S.H., Leitch, E.C.M., Child, M.W., Flint, H.J., 2005. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3692–3700. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3692>
- Walton, M.J., Cowey, C.B., 1982. ASPECTS OF INTERMEDIARY METABOLISM IN SALMONID FISH. *Comp. Biochem. Physiol.* [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90201-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90201-2)
- Wang, A., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., Bindelle, J., 2021. Intestinal *Cetobacterium* and acetate modify glucose homeostasis via parasympathetic activation in zebrafish. *Gut Microbes* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1900996>
- Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquac.* 10, 626–640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Wang, H., Feng, Y., Ming, M., Song, J., Chen, Z., Xiao, Z., 2022. Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, hematological parameters, and heat shock protein-related genes by Vitamin C on common carp. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 258. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109362>
- Wang, J., Yan, X., Lu, R., Meng, X., Nie, G., 2017. Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review. *Aquac. Fish.* 2, 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.06.007>



- Wang, T., WARD, M., GRABOWSKI, P., SECOMBES, C.J., 2001. Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* 358, 747–755. <https://doi.org/10.1042/BJ3580747>
- Wang, T., Wu, H.-X., Li, W., Xu, R., Qiao, F., Du, Z.-Y., Zhang, M.-L., 2022. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) supplementation on metabolism, inflammatory response and gut microbiota of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high carbohydrate diet. *Fish Shellfish Immunol.* 130, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.052>
- Wang, T., Zhang, N., Yu, X.B., Qiao, F., Chen, L.Q., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2021. Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br. J. Nutr.* 126, 161–171. <https://doi.org/10.1017/S000711452000402X>
- Wang, T., Zhang, N., Yu, X.B., Qiao, F., Chen, L.Q., Du, Z.Y., Zhang, M.L., 2020. Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1017/S000711452000402X>
- Wang, W., Ishikawa, M., Koshio, S., Yokoyama, S., Dawood, M.A.O., Hossain, M.S., Moss, A.S., 2019. Effects of dietary astaxanthin and vitamin E and their interactions on the growth performance, pigmentation, digestive enzyme activity of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Aquac. Res.* 50, 1186–1197. <https://doi.org/10.1111/are.13993>
- Ward, N.L., Steven, B., Penn, K., Methé, B.A., Detrich, W.H., 2009. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles* 13, 679–685. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0252-4>
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., 2001. Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79, 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x>
- Weber, J.M., Shanghavi, D.S., 2000. Regulation of glucose production in rainbow trout: Role of epinephrine in vivo and in isolated hepatocytes. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 956–963. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.4.r956>
- Weththasinghe, P., Rocha, S.D.C., Øyås, O., Lagos, L., Hansen, J.Ø., Mydland, L.T., Øverland, M., 2022. Modulation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiota composition and predicted metabolic capacity by feeding diets with processed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meals and fractions. *Anim. Microbiome* 4. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00161-w>
- WFP, 2021. The Year in Review, 2021: World Food Programme 1–23.
- WFP, 2012. The Year in Review, 2012: World Food Programme 40.
- WHO, 2021. World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight. WHO Fact Sheet No. 311, WHO, Geneva. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2021).
- Wiegertjes, G.F., Wentzel, A.S., Spaank, H.P., Elks, P.M., Fink, I.R., 2016. Polarization of immune responses in fish: The ‘macrophages first’ point of view. *Mol. Immunol.* 69, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.026>
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L.J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J.A., De Vries, W.,

- Majele Sibanda, L., Afshin, A., Chaudhary, A., Herrero, M., Agustina, R., Branca, F., Lartey, A., Fan, S., Crona, B., Fox, E., Bignet, V., Troell, M., Lindahl, T., Singh, S., Cornell, S.E., Srinath Reddy, K., Narain, S., Nishtar, S., Murray, C.J.L., 2019. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet* 393, 447–492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)
- Wolfe, A.J., 2015. Glycolysis for the microbiome generation. *Metab. Bact. Pathog.* 1–16. <https://doi.org/10.1128/9781555818883.ch1>
- Wu, C., Ye, J., Gao, J., Chen, L., Lu, Z., 2016. The effects of dietary carbohydrate on the growth, antioxidant capacities, innate immune responses and pathogen resistance of juvenile Black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.030>
- Wu, G.D., 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (80-. ). 105. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Wu, P., Tian, L., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J., Xie, F., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Yang, J., Zhang, Y.A., Shi, H.Q., Feng, L., 2018. Sodium butyrate enhanced physical barrier function referring to Nrf2, JNK and MLCK signaling pathways in the intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 73, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.009>
- Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y., Wang, G., 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 303, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.025>
- Xie, M., Xie, Y., Li, Y., Zhou, W., Zhang, Z., Yang, Y., Olsen, R.E., Ringø, E., Ran, C., Zhou, Z., 2022. Stabilized fermentation product of *Cetobacterium somerae* improves gut and liver health and antiviral immunity of zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* 120, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.017>
- Xu, Q., Qiao, Q., Gao, Y., Hou, J., Hu, M., Du, Y., Zhao, K., Li, X., 2021. Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow. *Front. Nutr.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.701511>
- Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., 2020. Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control* 111, 107057. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107057>
- Yang, C., Jiang, M., Lu, X., Wen, H., 2021. Effects of dietary protein level on the gut microbiome and nutrient metabolism in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals* 11. <https://doi.org/10.3390/ani11041024>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Nakahara, M., Kodama, R., Sanke, T., Nakamura, Y., 2008. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: Induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. *BMC Cancer* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-340>
- Yong Jeon, Kim, Y.Y., Lee, G., Kim, J.B., 2022. Physiological and pathological roles of lipogenesis. *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* 63 Suppl 4, 395–400. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00786-y>
- Ytrestøyl, T., Aas, T.S., Åsgård, T., 2015a. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>

- Ytrestøyl, T., Aas, T.S., Åsgård, T., 2015b. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>
- Yuan, X., Wang, J., Yang, S., Gao, M., Cao, L., Li, X., Hong, D., Tian, S., Sun, C., 2020. Effect of the ketogenic diet on glycemic control, insulin resistance, and lipid metabolism in patients with T2DM: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Diabetes* 10. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-00142-z>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish 1–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>
- Zhang, B.Y., Cai, G.H., Yang, H.L., Jie, Q., Zi, N., Liu, Y., 2023. New insights on intestinal microorganisms and carbohydrate metabolism in fish. *Aquac. Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01262-w>
- Zhang, H., Ding, Q., Wang, A., Liu, Y., Teame, T., Ran, C., Yang, Y., He, S., Zhou, W., Olsen, R.E., Zhang, Z., Zhou, Z., 2020. Effects of dietary sodium acetate on food intake, weight gain, intestinal digestive enzyme activities, energy metabolism and gut microbiota in cultured fish: Zebrafish as a model. *Aquaculture* 523, 735188. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735188>
- Zhang, Y., Liang, X.F., He, S., Chen, X., Wang, J., Li, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Li, L., Alam, M.S., 2020. Effects of High Carbohydrate Diet-Modulated Microbiota on Gut Health in Chinese Perch. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575102>
- Zhao, J., Zhang, X., Liu, H., Brown, M.A., Qiao, S., 2018. Dietary protein and gut microbiota composition and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 20, 145–154. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180514145437>
- Zhao, R., Symonds, J.E., Walker, S.P., Steiner, K., Carter, C.G., Bowman, J.P., Nowak, B.F., 2020. Salinity and fish age affect the gut microbiota of farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 528, 735539. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735539>
- Zhao, W., Wei, H.-L., Wang, Z.-Q., He, X.-S., Niu, J., 2022. Effects of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, antioxidant capacity, immunity, and liver morphology in *Oncorhynchus mykiss* under cage culture with flowing freshwater. *Aquac. Nutr.* 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/7820017>
- Zhao, W., Xie, J.J., Fang, H.H., Liu, Y.J., Tian, L.X., Niu, J., 2020. Effects of corn starch level on growth performance, antioxidant capacity, gut morphology and intestinal microflora of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture* 524, 735197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735197>
- Zhou, C., Liu, B., Ge, X., Xie, J., Xu, P., 2013. Effect of dietary carbohydrate on the growth performance, immune response, hepatic antioxidant abilities and heat shock protein 70 expression of wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 1348–1356. <https://doi.org/10.1111/jai.12264>
- Zhou, Y.L., He, G.L., Jin, T., Chen, Y.J., Dai, F.Y., Luo, L., Lin, S.M., 2021. High dietary starch impairs intestinal health and microbiota of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* 534, 736261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736261>
- 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. *Aquac. Nutr.* 24, 644–665. <https://doi.org/10.1111/anu.12532>
- Zhu, T., Corraze, G., Plagnes-Juan, E., Skiba-Cassy, S., 2020. Cholesterol metabolism regulation mediated by SREBP-2, LXR $\alpha$  and miR-33a in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) both in vivo and in vitro. *PLoS One* 15, 1–23. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0223813>
- Zhu, X., Zhou, Y., Wang, Y., Wu, T., Li, X., Li, D., Tao, Y., 2017. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0788-y>
- Zipfel, C., 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>
- zu Ermgassen, E.K.H.J., Phalan, B., Green, R.E., Balmford, A., 2016. Reducing the land use of EU pork production: Where there's swill, there's a way. *Food Policy* 58, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2015.11.001>



## Annexes

---



## Liste des annexes

**Annexe 1** : Présentation congrès International Symposium of Fish Nutrition and Feeding (ISFNF-2022)

**Annexe 2** : Présentations diverses

**Annexe 3** : Article en collaboration : Lokesh J, Delaygues M, **Defaix R**, Le Behec M, Pigot T, Dupont-Nivet M, Kerneis T, Labbé L, Goardon L, Terrier F, Panserat S, Ricaud K. 2022. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *British Journal of Nutrition*. DOI: 10.1017/S0007114523000120

**Annexe 4** : « *Supplementary material* » de l'article 1 – « High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet ».

**Annexe 5** : « *Supplementary material* » de l'article 2 – « Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant- based diet». (Article en révision)

**Annexe 6** : « *Supplementary material* » de l'article 3 – « Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet». (Article prêt pour soumission)

**Annexe 7** : Liste des amorces utilisées lors des analyses d'expression de gènes par qPCR.





**Abstract :**

ID: 31391

**INCORPORATION OF CARBOHYDRATES IN A 100% PLANT-BASED DIET HAS A STRONG EFFECT ON THE GUT MICROBIOTA AND METABOLISM OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

R. Defaix<sup>1</sup>, J. Lokesh<sup>1</sup>, M. Ghislain<sup>2</sup>, M. Marchand<sup>1</sup>, V. Véron<sup>1</sup>, A. Surget<sup>1</sup>, S. Biasutti<sup>1</sup>, M. Le Behec<sup>2</sup>, F. Terrier<sup>1</sup>, T. Pigot<sup>2</sup>, S. Panserat<sup>1</sup>, K. Ricaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, INRAE, E2S UPPA, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>2</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM, CNRS, E2S UPPA, Institut des sciences analytiques et de Physicochimie pour l'environnement et les Matériaux, UMR5254, Hélioparc, 2 avenue Président Angot, 64053, PAU cedex 9, France

To ensure the sustainability of aquaculture, carnivorous fish such as rainbow trout must change their “menu” from a fish-based diet to one without fish ingredients. Feed manufacturers have typically replaced fish ingredients (oil and protein) with plant-based ingredients. However, there is still a major problem with the growth performance of fish fed with a 100% plant-based diet due to a decrease in feed intake and feed efficiency. In addition, in many fish species fed fishmeal and fish oil, the intake of digestible carbohydrates (CHO) can improve protein utilization for growth (protein sparing effect) and reduce nitrogen waste.

Therefore, for the first time, we incorporated high levels of digestible carbohydrates (high starch diet) into a 100% plant-based diet to alter the CHO/protein ratio in a 12-week feeding trial. We measured changes in the intestinal microbiome, Short-Chain Fatty Acid (SCFA) levels and metabolic responses in host metabolic organs, i.e., intestine and liver.

Digestible carbohydrates had a strong effect on alpha and beta diversity and intestinal abundance of 12 taxa, including *Ralstonia*, *Bacillus*, *Ligilactobacillus*, *Weissella* and *Anaerobacillus*, were significantly affected. High Levels of *Mycoplasma* were observed in the intestinal mucus. The change in microbial diversity might be linked to a change in SCFA production. Significant changes in SCFA production were also observed. Systemically, overall hepatic gene expression was significantly altered by the CHO/protein ratio. Up-regulation of *gcka*, *gckb*, *g6pcb2a* genes, down-regulation of *hadh*, *acox3*, *sreb2a*, and *cyp51a* genes, as well as various enzymatic activities (such as glucokinase or pyruvate kinase) and the level of glycogen stored in the liver were evident. Interestingly, strong correlations were observed between bacterial abundance and gene expression in the liver.

In conclusion, the inclusion of digestible carbohydrates in combination with a total plant-based diet, could be a promising way to improve the utilization of plant ingredients in rainbow trout. In addition, the relationship between intestinal microbiota and host metabolism needs further investigation to better understand fish nutrition.

## **Annexe 2** : Présentations diverses

### Présentation orale - **Journées de l'école doctorale ED 211**

- 3 minutes JED 2022

**R Defaix**, S Panserat, K Ricaud. Incorporation of carbohydrates in a 100% plant-based diet has a strong effect on the gut microbiota and metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

- 10 minutes JED 2023

**R Defaix**, S Panserat, K Ricaud. Effect of dietary carbohydrates and a prebiotic on the intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout fed with 100% plant-based diet.

### Participation au concours national **Ma thèse en 180 secondes**

**Annexe 3** : Article en collaboration : Lokesh J, Delaygues M, **Defaix R**, Le Behec M, Pigot T, Dupont-Nivet M, Kerneis T, Labbé L, Goardon L, Terrier F, Panserat S, Ricaud K. 2022. Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet. *British Journal of Nutrition*. DOI: 10.1017/S0007114523000120



## Interaction between genetics and inulin affects host metabolism in rainbow trout fed a sustainable all plant-based diet

Jep Lokesh<sup>1</sup>, Marine Delaygues<sup>1</sup>, Raphaël Defaix<sup>1</sup>, Mickael Le Behec<sup>2</sup>, Thierry Pigot<sup>2</sup>, Mathilde Dupont-Nivet<sup>3</sup>, Thierry Kerneis<sup>4</sup>, Laurent Labbé<sup>4</sup>, Lionel Goardon<sup>4</sup>, Frédéric Terrier<sup>1</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup> and Karine Ricaud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

<sup>2</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IMT Mines Ales, IPREM, Pau, France; Institut des sciences analytiques et de Physicochimie pour l'environnement et les Matériaux, UMR5254, Hélioparc, 2 avenue Président Angot, 64 053 PAU cedex 9, France

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78 350 Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>PEIMA, INRAE, Sizun, France

(Submitted 28 September 2022 – Final revision received 12 December 2022 – Accepted 6 January 2023)

### Abstract

Inulin affects nutrition and metabolism in many animals. Although inulin is widely used in the diet of teleosts, its mechanism of action is unknown. Here, we investigated the effect of inulin (2 %) on the intestinal microbiome and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for growth and survival when fed a 100 % plant-based diet (*suave*) and a control line (*temoin*). Metabolic responses to the two factors (line and inulin) in liver, intestine, muscle and adipose were tissue-specific, with line and interaction between the two factors influencing overall expression in liver. In the intestine, inulin and line and in muscle, line influenced the expression of metabolic genes. Microbiota between the mucus and digestive contents was significantly different, with genera from *Proteobacteria* being more abundant in the mucus, whereas genera from the *Firmicutes* and *Planctomycetes* being more abundant in contents. Effect of inulin and interaction between factors on the microbiome was evident in contents. The significant taxa of control and inulin-fed groups differed greatly with *Streptococcus* and *Weissella* being significantly abundant in the inulin-fed group. There was a general trend showing higher levels of all SCFA in *temoin* group with propionic acid levels being significantly higher. An operational taxonomic unit (OTU) belonging to the *Ruminococcaceae* was significantly abundant in *suave*. The tissue-specific correlations between OTU and gene expression may indicate the link between microbiome and metabolism. Together, these results suggest that line and inulin impact the gene expression in a tissue-specific manner, possibly driven by specific OTUs enriched in inulin-fed groups and *suave*.

**Key words:** Rainbow trout: Inulin: *Firmicutes*: SCFA: Microbiome: Sustainable diet: Metabolism

The rainbow trout is a cold-water carnivorous species with high commercial value. In a commercial setting, the diet of this species consists of a high proportion of protein and oil from marine fish<sup>(1)</sup>. The supply of these traditional fish feed ingredients is economically and ecologically unsustainable due to high fishing pressure, which directly leads to the collapse of wild fish stocks<sup>(1)</sup>. As an alternative, a feed consisting exclusively of plant-based ingredients has been developed and extensively tested to meet all the nutritional requirements of rainbow trout<sup>(2–4)</sup>. This next-generation sustainable diet formula is a major step towards achieving the Sustainable Development Goals (SDG14) set by the UN. However, these total plant-based diets are known to cause severe metabolic abnormalities such as

glucose intolerance and high visceral fat when fed to rainbow trout<sup>(5,6)</sup>.

To overcome this limitation, a genetic line (hereafter 'line') of fish that grow and survive better when fed a 100 % plant-based diet was developed through selective breeding (four generations)<sup>(3)</sup>. This line of fish is able to digest and metabolise the total plant-based diet better than the naïve fish and maintain a similar growth profile to fish fed conventional ingredients<sup>(3)</sup>. However, knowledge about metabolic adaptations, the intestinal microbiome and the interaction between diet, intestinal microbiome and host metabolism is unknown for the selected line (*suave*).

On the other hand, prebiotics such as inulin are potential modulators of various metabolic and immune processes in

**Abbreviations:** OTU, operational taxonomic unit.

\* **Corresponding author:** Karine Ricaud, email [karine.brugirardricaud@univ-pau.fr](mailto:karine.brugirardricaud@univ-pau.fr)



different animals, including fish<sup>(7)</sup>. Inulin is known to affect energy metabolism, regulation of inflammation and immune homeostasis in the intestine via its microbially derived metabolites (SCFA)<sup>(8,9)</sup>. Systemically, these dietary fibre-derived metabolites are transported to the liver via the portal vein and are involved in the pathways of fatty acid synthesis, oxidation and fat storage<sup>(10)</sup>. In addition, SCFA are known to affect glucose uptake in muscle and adipose tissue<sup>(11)</sup>. The members of the intestinal microbiome involved in the breakdown and utilisation of inulin in humans and livestock are well documented<sup>(12)</sup>. The microbial species encoding inulin-degrading functions may vary, but the mechanism of inulin degradation and utilisation by the microbiota, as well as receptor-mediated uptake and utilisation of SCFA by the host, are conserved in humans and other mammals<sup>(13,14)</sup>.

The effect of inulin on growth, disease resistance, immune parameters, digestive enzymes and metabolism has been demonstrated in teleosts with a wide range of dietary habits<sup>(15–18)</sup>. In rainbow trout, there are several studies demonstrating the beneficial effects of inulin on growth and immune status<sup>(19–21)</sup>. Recently, the involvement of inulin in metabolic processes in teleosts has also been demonstrated. Studies show that inulin can attenuate the negative metabolic syndrome caused by high-carbohydrate feeding in tilapia<sup>(22)</sup> and alter the expression of genes involved in various metabolic pathways in rainbow trout<sup>(4)</sup>. Taken together, these results suggest that the mechanism of action of inulin in teleosts may be similar to that in mammals. Given the overwhelming interest in exploiting these beneficial aspects of the interaction between inulin and the gut microbiome for better health and nutritional management in teleosts, a more detailed investigation of this aspect is warranted.

Therefore, in this study, we investigate the effects of inulin and line on the metabolism (via microbially derived SCFA) and microbiome of rainbow trout fed a 100% plant-based basal diet. To this end, two lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout (mean weight: 128.6 g ± 8.4) were fed a 100% plant-based basal diet containing either 2% inulin or devoid of it for a period of 120 days. In addition to growth and plasma parameters, host metabolic responses were measured by examining gene expression in various organs, including liver, intestine, muscle and adipose tissue. Since the established link between the inulin and the host is the microbially derived metabolites such as SCFA, we investigated the changes in the microbiome as well as the changes in the content of SCFA in the intestine. Changes in microvillar length are also reported, as inulin is known to affect these epithelial structures.

## Materials and methods

### Ethical approval

PEIMA INRAE facilities (Sizun, France) are authorised for animal experimentation under French regulation (D29–277–02). The fish handling and sampling were conducted in accordance with the guidelines of French and European legislation on the use and care of laboratory animals (Decree No. 2013–118 of 1 February 2013 and Directive 2010/63/EU, respectively). Experiments

were conducted under the animal experimentation authorisation of Karine Brugirard Ricaud and Laurent Labbé.

### Diet and experimental set-up

The feeding trial was conducted at the PEIMA fish breeding and rearing facility (INRAE, Sizun, France). Two genetic lines of rainbow trout (hereafter referred to as line) were used for the feeding trial, namely *temoin* (the INRAE synthetic strain; a domesticated strain maintained at the PEIMA facility with a large number of spawners and without artificial selection in order to maintain the genetic variability) and *suave* (a selected line from the synthetic strain obtained after four generations of selective breeding based on the ability to survive and grow when fed a 100% plant-based diet). A two-factorial design was used, with line and inulin intake as the factors. A total plant-based diet (containing only plant ingredients and vegetable oils supplemented with free amino acids) with (2%) or without (0%) inulin was prepared at the feed manufacturing facility (INRAE Donzacq). The dosage of inulin was decided based on our previous study<sup>(4)</sup>. The diets were isoproteic (about 45% crude protein), isolipidic (about 22% crude fat) and isoenergetic (about 24 kJ/kg DM) and were prepared to meet the nutritional requirements of rainbow trout<sup>(23)</sup>. The composition of the ingredients and the proximate composition of the diet are given in Table 1 and Supplementary Table 1, respectively.

Fifty juvenile rainbow trout with a stocking density of about 3.5 kg/m<sup>3</sup> were introduced into each of the 1800-litre fibreglass circular tanks. The average initial weight of the fish in each group is given in Table 2. During subsequent growth, number of fish was reduced once by random elimination to keep a density below 15 kg/m<sup>3</sup> in each tank. At the same time, early maturing males (at 1 year) were discarded. There was a total of four groups consisting of TVO: *temoin*-0% inulin; TVI: *temoin*-2% inulin; SVO: *suave*-0% inulin; and SVI: *suave*-2% inulin. Each group was allocated three tanks. Fish were reared under standard conditions during the experimental period, that is, water oxygen level of 9 mg/l, temperature between 6.0 and 18°C and pH of 6.5, water flow rate of 0.7 litre/s and natural photoperiod. The fish were fed by automatic feeder five times a day for 16 weeks. Total weight of fish in each tank was measured every 3 weeks to assess growth parameters. The amount of feed given was recorded daily to calculate the consumption index. The total amount of feed consumption increased steadily with growth and the feeding rate was adjusted accordingly.

### Sampling

At the end of the feeding experiment, we randomly sampled twelve fish per group (four/tank). The fish were first anaesthetised with tricaine methane sulfonate; (MS-222) (50 mg/l) and then euthanised with a higher dose of MS-222 (100 mg/l). The fish were weighed, and then blood samples were collected using heparinised syringes and tubes and centrifuged at 3000 g for 10 min to isolate the plasma. Plasma samples were stored at –20°C until analysis of plasma parameters. The liver was dissected and weighed. Muscle samples were also taken. Then the viscera were dissected out, and the adipose tissue was removed. The mid-intestine was cut open, and the digestive contents were

**Table 1.** Formulation of the diets used in the present study

Ingredient (%)	Inulin 0% (SVO, TVO)	Inulin 2% (SVI, TVI)
Wholewheat	5.70	5.70
Lupine flour	10.00	10.00
Maize gluten	8.49	8.49
Wheat gluten	15.00	15.00
Concentrated protein extract of peas (LYSAMINE®)	12.50	12.50
Concentrated faba bean protein extract	8.00	8.00
Traced soyabean meal	12.00	12.00
L-Lysine	0.50	0.50
L-Methionine	0.50	0.50
Palm oil	2.00	2.00
Linseed oil	6.00	6.00
Rapeseed oil	9.78	9.78
Soya lecithin powder	2.50	2.50
Dicalcium phosphate	2.00	2.00
Vitamin premix	1.50	1.50
Mineral premix	1.50	1.50
Astaxanthin	0.03	0.03
Inulin	0.00	2.00
Cellulose	2.00	0.00

separated from the mucus. The mucus samples were obtained by scraping with a glass slide. The contents and mucus were kept in separate tubes for microbiome analysis. Part of the mid-intestinal tissue was also collected for gene expression analysis. From a separate group of fish, 2/tank (6/group) intestinal content samples were collected for SCFA analysis. All samples (except for electron microscopy) were frozen with liquid N<sub>2</sub> and then stored at -80°C. Intestinal tissue (mid-intestine) was stored in 4% formaldehyde for electron microscopy.

#### Diet and whole-body proximate composition

The same protocol was used to analyse the nutrient composition of the diet and the whole body. The nutrient composition of the feed was performed with fresh samples, while the nutrient composition of the whole body was derived from freeze-dried samples. The moisture content of the samples was measured by drying the samples at 105°C for 24 h. The weight of the post-dried samples was subtracted from the weight of the pre-dried samples. The ash content of the samples was measured by burning the samples at 550°C for 16 h and subtracting the weight of the post-combusted samples from that of the pre-combusted samples. The energy content of the samples was measured using the adiabatic bomb calorimeter (IKA). Total lipids were measured by petroleum ether extraction using the Soxhmer system (Gerhardt analytical systems). Crude protein content was measured by the Kjeldahl method using the Kjeltak™ 8400 system (FOSS) after acid extraction.

#### Measurement of the plasma biochemical parameters

Plasma parameters were measured using commercial kits in combination with a microplate reader. Various biochemical plasma parameters such as glucose (Glucose RTU, bioMérieux)<sup>(24)</sup>, TAG (PAP 150, bioMérieux)<sup>(25)</sup>, cholesterol (Cholesterol RTU, bioMérieux)<sup>(26)</sup> and free fatty acids (NEFA C

Kit, Wako Chemicals)<sup>(27)</sup> were measured. Total free amino acid was quantified according to the method of Moore<sup>(28)</sup>, with glycine as standard.

#### Microbiome analysis

**DNA extraction.** DNA from the intestinal contents and mucus samples was extracted using the QIAamp fast DNA stool kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Some modifications were made to the protocol to achieve a better yield from the difficult-to-lyse bacterial cells<sup>(29)</sup>. The purity and integrity of the extracted DNA were assessed using the NanoDrop 2000c (Thermo) and an agarose gel, respectively.

#### Preparation of the 16s rRNA (V3–V4) sequencing libraries.

The sequencing libraries were prepared according to the standard protocol recommended by Illumina® (Illumina) and as described elsewhere<sup>(4,30)</sup>. Briefly, the V3 and V4 regions of the bacterial 16s rRNA gene were amplified using the recommended set of primers<sup>(31)</sup> linked to the Illumina® adaptor overhangs. The final primer pairs were as follows: Forward 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGG-GNGGCWGCAG-3' and Reverse 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTACHVGGGTATCTAATC-C-3'. The preparation of the library involved two stages of PCR. In the first stage, the PCR mix (25 µl) contained 12.5 µl of KAPA HiFi Master Mix (Roche) together with 5 µl each of forward and reverse primers (1 µM each) and 2.5 µl of DNA (about 100 ng). Reactions were performed in duplicate. Thermocycling conditions included pre-incubation for 3 min at 95°C, followed by thirty cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s. A final extension was performed at 72°C for 5 min. After PCR, duplicate reactions belonging to one sample were pooled and an aliquot was run on the agarose gel to confirm a positive reaction (about 550 bp). The positive control with a mock bacterial DNA (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard, Zymo Research Irvine) and a negative control with water were also included. The negative PCR control showed no visible band on the agarose gel after PCR. The PCR products were transported to La Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (PGTB) to perform the second-stage PCR. In the second stage, index PCR was performed to add sample-specific barcodes to the PCR products using the Nextera XT index kit according to the manufacturer's protocol (Illumina). The PCR set-up was the same as in stage 1 except that only eight cycles were used. PCR products were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter) and quantified using the KAPA library quantification kit for Illumina platforms (Roche) according to the manufacturer's instructions. The sequencing libraries were pooled equimolarly (4 nM) and sequenced using a 250-bp Paired-End Sequencing Kit v2 (Illumina).

**Sequence data analysis.** The paired-end sequencing data were analysed using the UPARSE pipeline<sup>(32)</sup> as described elsewhere<sup>(33)</sup>. The paired-end sequences were merged, and the primer binding sites were removed. Sequences were then quality-filtered using the maximum error rate strategy (threshold

**Table 2.** Growth parameters of rainbow trout (*temoin* and *suave*) fed with the control diet (O) and the diet supplemented with 2% inulin (I)

Growth parameters	TVO		TVI		SVO		SVI		P		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Line	Inulin	Line×Inulin
Feed efficiency*	0.91	0.04	0.91	0.04	0.91	0.02	0.90	0.05	0.9110	0.9110	0.8790
Initial body weight (g)	117.10	3.99	122.12	4.26	136.94	2.29	136.77	4.06	<b>4.45e-05</b>	0.2940	0.2650
Final body weight (bulk) (g)	487.83	20.68	505.17	3.51	555.33	11.85	550	18.48	<b>0.0002</b>	0.5010	0.2380
Hepatosomatic index (%)†	1.33	0.20	1.32	0.21	1.23	0.17	1.29	0.11	0.2420	0.3765	0.0985
Specific growth rate (%/d)‡	1.10	0.03	1.09	0.03	1.08	0.01	1.07	0.04	0.2610	0.7610	0.9760
Weight gain (g)§	369.96	18.99	383.04	7.52	418.39	10.63	413.56	20.04	<b>0.0020</b>	0.6521	0.3390
Survival rate (%)	100		100		100		100		0.3470	0.3470	0.3470

The data are presented as the mean  $\pm$  SD, *n*3 tanks except for the final body weight (*n*12) and hepatosomatic index (*n*12). Means between the groups were compared using a two-way ANOVA. A *P*-value < 0.05 is considered as significant and is presented in bold.

\* Feed efficiency = wet weight gain (g)/feed intake (g).

† Hepatosomatic index =  $100 \times (\text{liver weight}/\text{total body weight})$ .

‡ Specific growth rate =  $100 \times (\text{Ln}(\text{final body weight, g}) - \text{Ln}(\text{initial body weight, g}))/\text{d}$ .

§ Weight gain = final weight - initial weight (g).

= 1)<sup>(34)</sup>. The sequences from different samples were merged after being uniquely labelled, the dataset was dereplicated and the singletons were removed. Operational taxonomic unit (OTU) clustering was performed at 97% similarity. The raw reads were mapped to the OTU to create the OTU abundance table. Taxonomies were assigned using the SINTAX algorithm<sup>(35)</sup>. Assignments with < 0.8 confidence value were filtered out. A phylogenetic tree in Newick format was created. The OTU table, taxonomy table and phylogenetic tree were exported to the phyloseq package for downstream analysis<sup>(36)</sup>.

#### SCFA measurement

The SCFA measurements are performed as previously described<sup>(4)</sup>. Briefly, frozen intestinal content samples (1 g) were placed in glass bottles filled with clean air zero supplied by an F-DGS air zero generator (Evry). These bottles were connected to heated inlet line (100°C) of the SIFT-MS instrument via the sample inlet. To compensate for the dispersion in the bottle during SIFT-MS sampling, a Tedlar bag (Zefon International Inc.) filled with dry and clean zero air was connected to the bottle inlet. The closed bottle was incubated at 60°C  $\pm$  2 for 2 h before SIFT-MS analysis.

Full-scan mass spectra were recorded for each positive precursor ion ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{O}_2^{\&\times 25\text{CF}_3^+}$  and  $\text{NO}^+$ ) in a *m/z* range from 15 to 250 with an integration time of 60 s. Quantification was performed using the  $\text{NO}^+$  precursor ion as described before<sup>(37,38)</sup>.

#### Electron microscopy

Electron microscopic examinations were carried out at the Bordeaux Imaging Centre – University of Bordeaux, a core facility of the French network 'France Bio Imaging'. The processing and sectioning of the samples have been described in detail previously<sup>(4)</sup>. Mid-intestinal tissue samples were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) for 2 h before being stored at 4°C. Samples were then washed in phosphate buffer and fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer for 2 h in the dark (RT) and then washed. Then the samples were dehydrated and embedded in epoxy resin using the automated microwave tissue processor for electron microscopy (Leica EM AMW; Leica Microsystems). After

polymerisation, the samples were cut with a diamond knife (Diatome) on an ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems). After localisation of the regions of interest, ultrathin sections (70 nm) were picked up on copper grids and subsequently stained with UranylLess and lead citrate. The grids were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi) at 80 kV.

#### Gene expression analysis

RNA from liver, intestine and muscle was extracted using the TRIzol reagent method (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA from the adipose tissue was extracted using the RNeasy lipid tissue mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). The quality and quantity of the RNA were checked on a 1% agarose gel and a nanodrop (Thermo scientific), respectively. Two  $\mu\text{g}$  of RNA was converted to cDNA using the enzyme superscript III reverse transcriptase and random hexamers (Invitrogen). After reverse transcription, the cDNA was diluted 50-fold before being used in RT-qPCR.

RT-qPCR was performed on a LightCycler® 384 system (Roche Diagnostics) according to the protocol described previously (including primer details)<sup>(4)</sup>. The data normalisation was performed using geNorm<sup>(39)</sup>. The reference genes *eef1a* and *rna18s* were used to calculate the normalisation factor in liver and intestine, while a combination of *actb* and *gapdh* was used in muscle and *actb* and *eef1a* in adipose tissue.

#### Statistical analysis

Feeding efficiency, bulk fish weight and specific growth rate were measured per tank (*n* 3 per group). For SCFA and electron microscopy, two fish were sampled per tank (*n* 6 per group). All other parameters were measured on four individual fish per tank (*n* 12 per group).

All statistical analyses were performed using R software (version 3.6.3)<sup>(40)</sup> in combination with *phyloseq*<sup>(36)</sup>. The heat map was created with *heatmap*<sup>(41)</sup>. All data subjected to either one-way ANOVA or two-way ANOVA were tested for normal distribution and homogeneity of variances. If the data did not meet any of these assumptions, a non-parametric Kruskal–

Wallis test or a non-parametric equivalent of the factorial ANOVA (aligned rank transform ANOVA) was used.

$\alpha$ -diversity (observed OTU and Shannon index),  $\beta$ -diversity (Bray–Curtis dissimilarity index) and OTU compositions were calculated using the phyloseq package. The effects of two factors (inulin and line) on  $\alpha$ -diversity were calculated separately for the two sample types (i.e. contents and mucus) using two-way ANOVA. For the  $\beta$ -diversity measures, the homogeneity of sample dispersions between groups was checked using the *betadisper* function of the *vegan* package<sup>(42)</sup>. Permutative multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to test the significance of Bray–Curtis distance between samples belonging to different sample types (content and mucus) and to analyse the effect of the factors (inulin or line) on  $\beta$ -diversity in contents and mucus.

The effect of two factors (inulin and line) on the expression levels of each gene was analysed using two-way ANOVA. A similar approach was used to test the effect of experimental factors on microvilli length and SCFA levels. Based on the relative expression of the genes, a Bray–Curtis distance matrix was calculated and a group-wise comparison was performed using two-way PERMANOVA after checking the homogeneity of dispersions.

LEfSe (linear discriminant analysis effect size) was performed to identify the significant features (OTU) belonging to specific groups<sup>(43)</sup>. The p-values and linear discriminant analysis (LDA) score thresholds were set at 0.05 and 4, respectively. Regularised canonical correlation analysis was performed using the mixOmics package to understand the correlations between relative gene expression in different tissues and OTU abundances in content and mucus samples<sup>(44)</sup>. Zero-inflated OTU data were transformed using centred log transformation (clr) before analysis. Correlations with a value above 0.45 are shown.

## Results

### Diet and whole-body composition, growth and plasma parameters

In the present study, the composition of the various macronutrients did not differ between the control and experimental diets ( $P > 0.05$ ; online Supplementary Table 1). We also did not detect any effect of either factor (line and inulin) or the interaction between them on the proximate composition of the whole body ( $P > 0.05$ ; online Supplementary Table 2). The final bulk body weight and weight gain were significantly higher (10.77%) in *suave* ( $P < 0.05$ , Table 2). Similarly, there was a significant effect of line on plasma glucose ( $P = 0.0012$ ) and TAG ( $P = 0.0026$ ; Table 3).

### Expression of different genes involved in metabolism

We investigated the expression of several genes involved in amino acid metabolism, energy metabolism, fatty acid oxidation, fatty acid conversion, gluconeogenesis, glucose transport, glycolysis, lipogenesis and SCFA uptake in different tissues.

**Liver.** The hepatic gene expression profile is shown in Fig. 1(a). The overall (group-wise) expression was significantly affected

by line (PERMANOVA,  $P = 0.016$ ) and the interaction between line and inulin (PERMANOVA,  $P = 0.030$ ). Effect of factors and interaction ( $P < 0.05$ ) on expression of genes in different pathways is given below.

**Line:** Expression of genes of amino acid metabolism (*asat2* and *asat3*), gluconeogenesis (*fbp1b1*, *g6pca*, *g6pcb1b*, and *g6pcb2a*) and glycolysis (*pfkla*) was down-regulated in *suave*.

**Inulin:** Inulin-fed groups were showing an up-regulation of amino acid metabolism (*alat2* and *gdh3*), energy metabolism (*atp5a* and *cox4*) and fatty acid oxidation (*cpt1c* and *boad*).

**Interaction:** The expression of genes in amino acid metabolism (*asat1*), energy metabolism (*cox4* and *cs*), gluconeogenesis (*g6pcb2a*) and lipogenesis (*acly* and *g6pdbh*) were up-regulated in inulin-fed groups only in the *suave*. On the contrary, the expression of a fatty acid oxidation gene (*cpt1b*) was down-regulated in the *suave* when fed with inulin.

**Intestine.** The intestinal gene expression profile is shown in Fig. 1(b). The group-wise expression was significantly affected by both factors, line (PERMANOVA,  $P = 0.001$ ) and inulin (PERMANOVA,  $P = 0.001$ ). Effect of factors and interaction ( $P < 0.05$ ) on expression of genes in different pathways is given below.

**Line:** The expression of genes in amino acid metabolism (*asat1*, *asat2*, *asat3* and *gdh2*), energy metabolism (*cox2*, *cox4*, *cs*, *qcr2* and *sdbb*) and glycolysis (*pfkla* and *pfklb*) were significantly down-regulated in *suave*.

**Inulin:** The expression of genes involved in amino acid metabolism (*asat1*, *asat2*, *asat3*, *gdh2* and *gdh3*), energy metabolism (*atp5a*, *cox2*, *cox4*, *cs*, *qcr2* and *sdbb*) and glucose transport (*glut1ba* and *glut1bb*) were significantly down-regulated in the inulin-fed group.

**Interaction:** No significant interaction effect between the inulin and the line was found.

**Muscle.** The gene expression profile of muscle is shown in Fig. 2(a). The overall (group-wise) expression pattern was significantly affected by line (PERMANOVA,  $P = 0.004$ ). Effect of factors and interaction ( $P < 0.05$ ) on expression of genes in different pathways is given below.

**Line:** The expression levels of genes in amino acid metabolism (*alat2*, *asat3*, *gdh2* and *gdh3*), energy metabolism (*atp5a*, *cox2*, *cs* and *qcr2*), fatty acid oxidation (*cpt1a* and *cpt1d*), glucose transport (*glut1bb* and *glut4a*) and lipogenesis (*fas*) were significantly down-regulated in *suave*.

**Inulin:** The expression of *alat2* (amino acid metabolism), *cpt1a* (fatty acid oxidation) and *g6pdbh* (lipogenesis) was up-regulated in inulin-fed groups. On the other hand, the expression of a gene in glycolytic pathway (*bk1*) was down-regulated in inulin-fed group.

**Interaction:** The levels of *cpt1a* and *cpt1b* (fatty acid oxidation) was higher in inulin-fed group only in the *temoin*. On the other hand, *fas* (lipogenesis) was up-regulated in the inulin-fed *suave*.

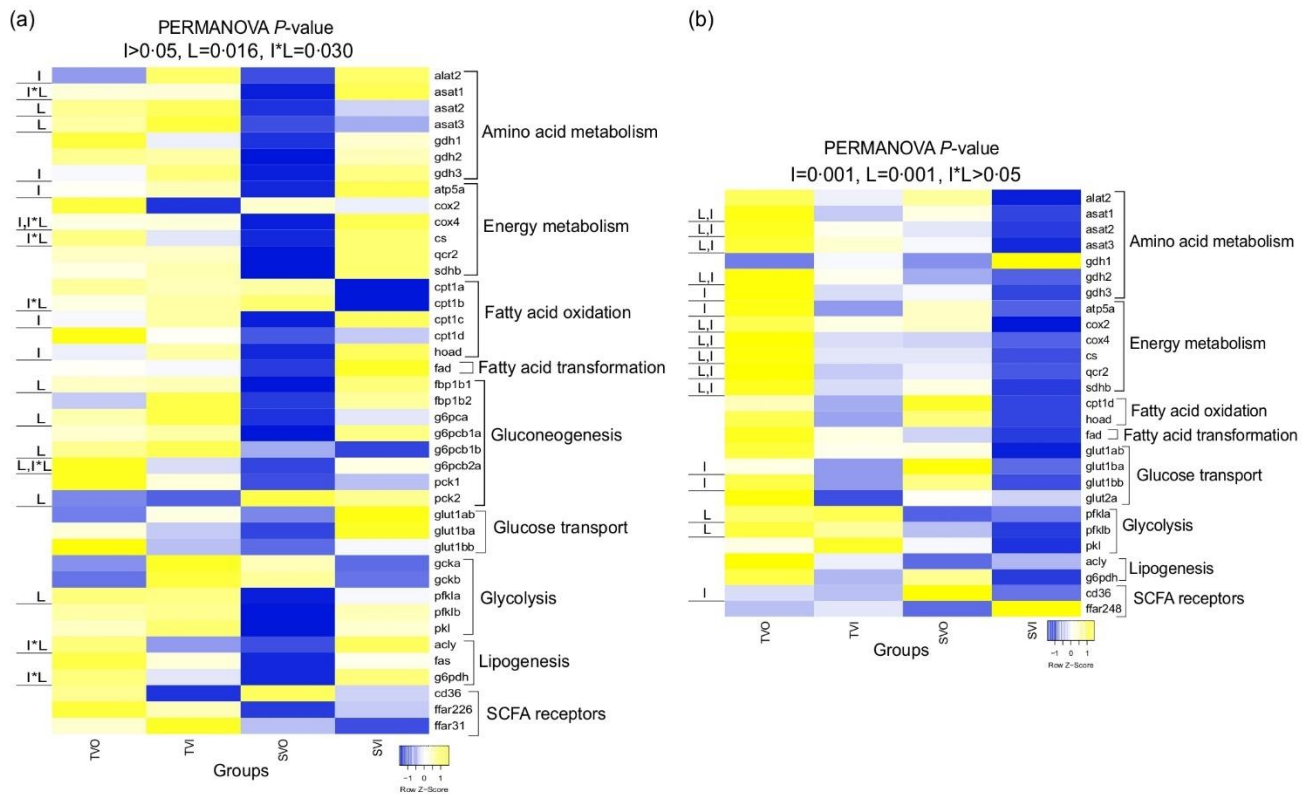
**Adipose.** The gene expression profile of adipose tissue is shown in Fig. 2(b). Group-wise expression profile was not affected by



**Table 3.** Plasma parameters in rainbow trout (*temoin* and *suave*) fed with the control diet (O) and the diet supplemented with 2% inulin (I)

Plasma parameters	TVO		TVI		SVO		SVI		P		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Line	Inulin	Line × Inulin
Cholesterol (g/l)	2.05	0.40	2.34	0.64	1.76	0.61	2.03	0.46	0.0547	0.0761	0.9376
Free fatty acids (mmol/l)	0.46	0.14	0.50	0.10	0.40	0.08	0.45	0.10	0.0846	0.1344	0.7853
Glucose (g/l)	0.66	0.08	0.72	0.10	0.75	0.08	0.77	0.08	<b>0.0012</b>	0.2459	0.1919
Total amino acids (μmol/ml)	4.54	0.76	4.49	0.59	5.26	2.69	4.31	1.63	0.9680	0.5563	0.5563
TAG (g/l)	3.86	1.30	4.03	1.78	2.57	1.04	2.86	1.10	<b>0.0026</b>	0.5519	0.8684

The data are presented as the mean ± SD, n 12. Means between the groups were compared using a two-way ANOVA. A *P*-value < 0.05 is considered as significant and is presented in bold.



**Fig. 1.** Heat map showing the relative expression of different genes involved in metabolism in (a) liver and (b) intestine of two lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout fed 0% and 2% inulin. The different feeding groups are symbolised as follows: TVO: *temoin*-0% inulin; TVI: *temoin*-2% inulin; SVO: *suave*-0% inulin; and SVI: *suave*-2% inulin. The effect of line and inulin on the expression of each gene was evaluated using two-way ANOVA. Significant effects ( $P < 0.05$ ) of either factor (line or inulin) or interaction are indicated on the left panel (I: effect of inulin; L: effect of line; I × L: interaction effect). The gene names and the pathways to which they belong are shown on the right panel. Group-wise differences in expression levels of all genes were statistically tested using PERMANOVA (liver  $P$ -value: I > 0.05, L = 0.016, I × L > 0.030; intestine  $P$ -value: I = 0.001, L = 0.001, I × L > 0.05) based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix derived using the relative expression levels and shown in the top panel.

any of the factors. Effect of factors and interaction ( $P < 0.05$ ) on expression of genes in different pathways is given below.

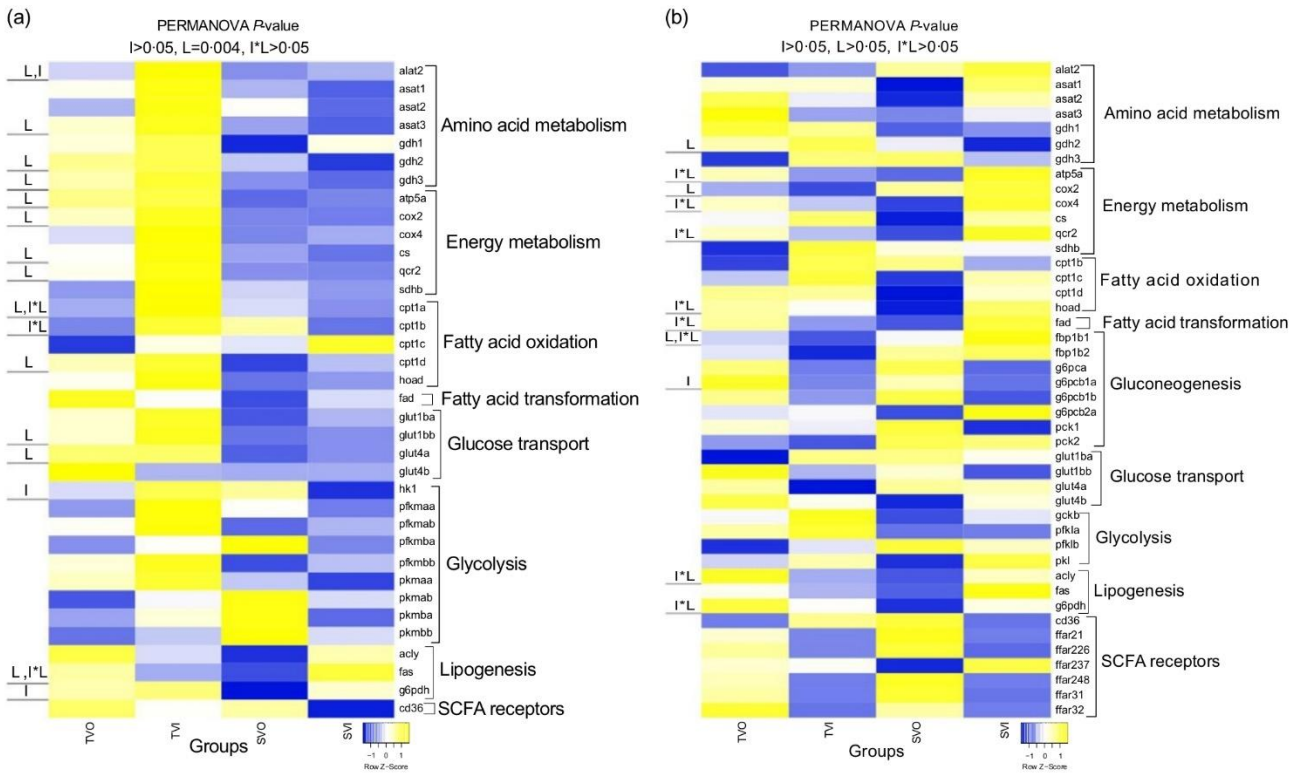
**Line:** The expression of *gdb2* (amino acid metabolism) was lower in *suave*, and the expression of *cox2* (energy metabolism) and *fbp1b1* (gluconeogenesis) was up-regulated in *suave*.

**Inulin:** The expression of *g6pcb1a* (gluconeogenesis) was down-regulated when fed inulin.

**Interaction:** The expression of genes of energy metabolism (*atp5*, *cox4* and *qcr2*), fatty acid oxidation and conversion (*hoad* and *fad*), gluconeogenesis (*fbp1b1*) and lipogenesis (*acly* and *g6pdh*) was up-regulated only in inulin-fed *suave*.

### Intestinal microbial diversity and composition

**Effect of sample type on the microbial diversity and composition.** We analysed the microbial diversity and composition in the two sample types, namely mucus and digestive contents (contents), separately. There was a significant effect of sample type on microbial diversity and composition. The  $\alpha$ -diversity of the contents was significantly higher than that of the mucus ( $P = 0.0002$ ). We found no significant effect of line or the inulin on  $\alpha$ -diversity measures (observed OTU and Shannon index) in the mucus or digestive contents ( $P > 0.05$ ) (Fig. 3(a)).



**Fig. 2.** Heat map showing the relative expression of different genes involved in metabolism in the muscle (a) and adipose (b) of two lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout fed 0% and 2% inulin. The different feeding groups are symbolised as follows: TVO: *temoin*-0% inulin; TVI: *temoin*-2% inulin; SVO: *suave*-0% inulin; and SVI: *suave*-2% inulin. The effect of line and inulin on the expression of each gene was evaluated using two-way ANOVA. Significant effects ( $P < 0.05$ ) of either factor (line or inulin) or interaction are indicated on the left panel (I: effect of inulin; L: effect of line; I × L: interaction effect). The gene names and the pathways to which they belong are shown on the right panel. Group-wise differences in expression levels of all genes were statistically tested using PERMANOVA ( $P$ -value:  $I > 0.05$ ,  $L = 0.004$ ,  $I \times L > 0.05$ ) based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix derived using the relative expression levels and shown in the top panel.

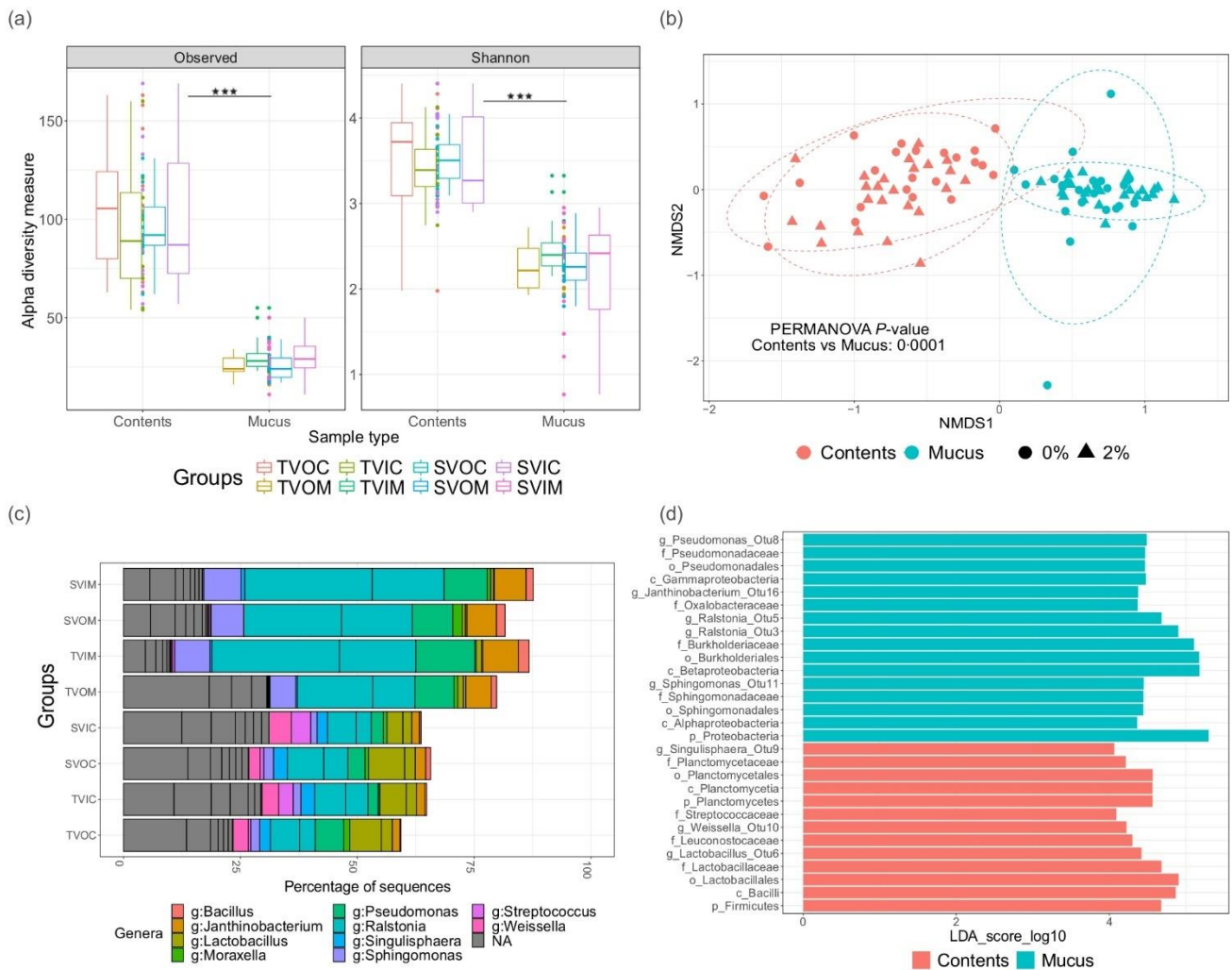
PERMANOVA of Bray–Curtis distances between samples shows a significant effect of sample type ( $P = 0.0001$ ), with the mucus and contents samples forming separate clusters. The individual samples are plotted in a two-dimensional space using NMDS (Fig. 3(b)).

The top twenty OTU in terms of total abundance (after removal of the genera *Mycoplasma* and *Streptophyta*) are shown in Fig. 3(c). These OTU include *Bacillus*, *Janthinobacterium*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Singulisphaera*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Weissella* and others. The different abundances of OTU between the mucus and the contents were analysed using LEfSe (Fig. 3(d)). The relative abundance of *Firmicutes* was significantly higher in the contents than in the mucus. Among this phylum, the families *Lactobacillaceae* (genus: *Lactobacillus*), *Leuconostocaceae* (genus: *Weissella*) and *Streptococcaceae* were the most important representatives. Phylum *Planctomycetes* was also a significant feature in the content, which comprised of one significant OTU in the genus *Singulisphaera*. On the other hand, *Proteobacteria* was the most abundant phylum in the mucus samples. Among this phylum, *Alphaproteobacteria* (genus: *Sphingomonas*), *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* (genus: *Pseudomonas*) were found in significantly higher amounts compared with the content. In

the *Betaproteobacteria* class, there were two significantly abundant families, including *Burkholderiaceae* (two OTU belonging to the genus *Ralstonia*) and *Oxalobacteriaceae* (genus: *Janthinobacterium*).

**Effect of inulin and line on the microbial  $\beta$ -diversity and composition.** Two-way PERMANOVA revealed that there was a significant effect of inulin and the interaction between inulin and the line on the  $\beta$ -diversity of the content samples ( $P: I = 0.026$ ;  $P: I \times L = 0.025$ ) (Fig. 4(a)). In contrast, mucus samples showed no such responses ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4(b)).

LEfSe analysis to identify the differentially abundant groups between two dietary conditions revealed thirteen features, nine of which belonged to the control group and four to the inulin-fed group. Two phyla were significantly abundant in the control group, including *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. Among the *Proteobacteria*, two families, namely *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* (genus: *Pseudomonas*), were significantly abundant (Fig. 4(c)). Significant OTU in the inulin-fed group included *Weissella* and *Streptococcus* (Fig. 4(c)). Comparison between the two lines revealed four features, three of which belonged to the *temoin* (genus: *Pseudomonas* and *Brevundimonas*) and one to the *suave* (family: *Ruminococcaceae*) (Fig. 4(d)).



**Fig. 3.** Plot of  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity, OTU composition and the discriminant features in the intestine of two lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout fed 0% and 2% inulin (*Mycoplasma* and *Streptophyta* OTU are filtered out). Feeding groups are symbolised as TVO: *temoin*-0% inulin; TVI: *temoin*-2% inulin; SVO: *suave*-0% inulin; and SVI: *suave*-2% inulin. (a)  $\alpha$ -diversity measures (observed OTU and Shannon index) in different feeding groups. Measurements were performed separately for the content (C) and mucus (M) samples. There was no statistically significant effect of inulin or line on the  $\alpha$  diversity measurement (two-way ANOVA;  $P > 0.05$ ). The differences between the mucus and content samples were significant for both the observed and Shannon indexes (one-way ANOVA;  $P = 0.0001$ ). (b)  $\beta$ -diversity calculated using the Bray–Curtis dissimilarity matrix is shown in a non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot. Sample types (content and mucus) are colour-coded. Feeding groups are represented by different shapes (0% inulin: sphere; 2% inulin: triangle). There was a significant effect of sample type (mucus and contents) on sample dispersion (PERMANOVA:  $P = 0.0002$ ). (c) Composition of the twenty most abundant OTU in the content (C) and mucus (M) samples. Taxonomies assigned to OTU are colour-coded (at genus level). OTU with grey colour indicate non-assignment of the taxonomy at the genus level. (d) LEfSe analysis showing the discriminant genera between the content and mucus samples (LDA score  $> 4$ ). OUT, operational taxonomic unit.

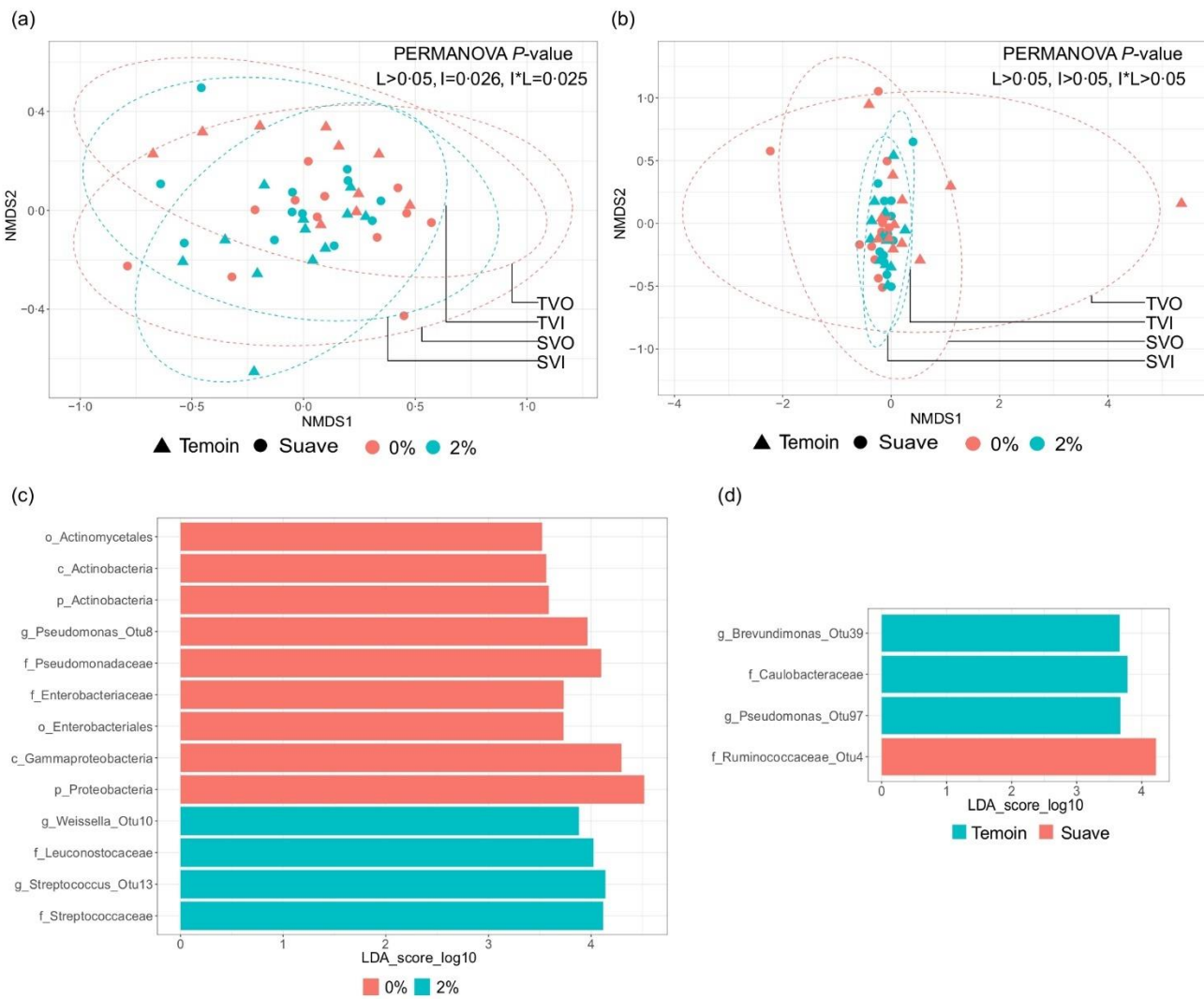
### Correlation between the operational taxonomic unit abundance and gene expression

**Liver *v.* content OTU:** The OTU belonging to *Lactobacillus*, *Weissella* and *Ruminococcaceae* showed a strong negative correlation with the genes involved in glycolysis, gluconeogenesis and fatty acid oxidation. *Moraxella* and *Bacillus* were showing a negative correlation with genes involved in lipogenesis, amino acid metabolism and energy metabolism (Fig. 5(a)). In contrast to the OTU belonging to *Lactobacillus*, *Bacillus* showed a positive correlation with some genes involved in glycolysis and fatty acid oxidation (Fig. 5(a)).

**Intestine *v.* content OTU:** The OTU belonging to *Pseudomonas* was positively correlated with genes involved

in many pathways, notably glycolysis, amino acid metabolism and energy metabolism. On the other hand, *Streptococcus* was negatively correlated with several pathways, most notable being the glucose transport, lipogenesis and amino acid metabolism (Fig. 5(b)). *Planctomycetaceae*, was negatively correlated with all genes, especially those involved in glycolysis (*pfkfb*), amino acid metabolism (*asat1* and *asat2*) and energy metabolism (*cox4*, *cs*, *atp5a* and *sdbb*) (Fig. 5(b)).

**Intestine *v.* mucus OTU:** *Ralstonia*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* were negatively correlated with genes involved in energy metabolism, amino acid metabolism, lipogenesis, glycolysis, fatty acid oxidation, fatty acid conversion and glucose transport (Fig. 5(c)). There was a positive



**Fig. 4.** NMDS and bar plot showing the dispersion of the samples in a multivariate space and the discriminating features belonging to different groups in the contents.  $\beta$ -diversity of the (a) content samples and (b) mucus samples calculated based on the Bray–Curtis dissimilarity index are shown using NMDS plot. Feeding groups are symbolised as TVO: *temoin*-0% inulin; TVI: *temoin*-2% inulin; SVO: *suave*-0% inulin; and SVI: *suave*-2% inulin. Groups fed with different levels of inulin are colour-coded, and the lines are represented by different shapes (*temoin*: triangle; *suave*: sphere). Statistical significance of group dispersion was analysed using two-way PERMANOVA (contents  $P$ -value:  $I = 0.026$ ,  $L > 0.05$ ,  $I \times L = 0.025$ ; mucus  $P$ -value:  $L > 0.05$ ,  $L > 0.05$ ,  $I \times L > 0.05$ ). LEfSe analysis showing the discriminating genera (c) between the fish fed with either control diet (0% inulin) or diet containing 2% inulin and (d) between the two lines of fish (LDA score > 4).

correlation between these OTU and one of the fatty acid oxidation genes (*cpt1d*) (Fig. 5(c)).

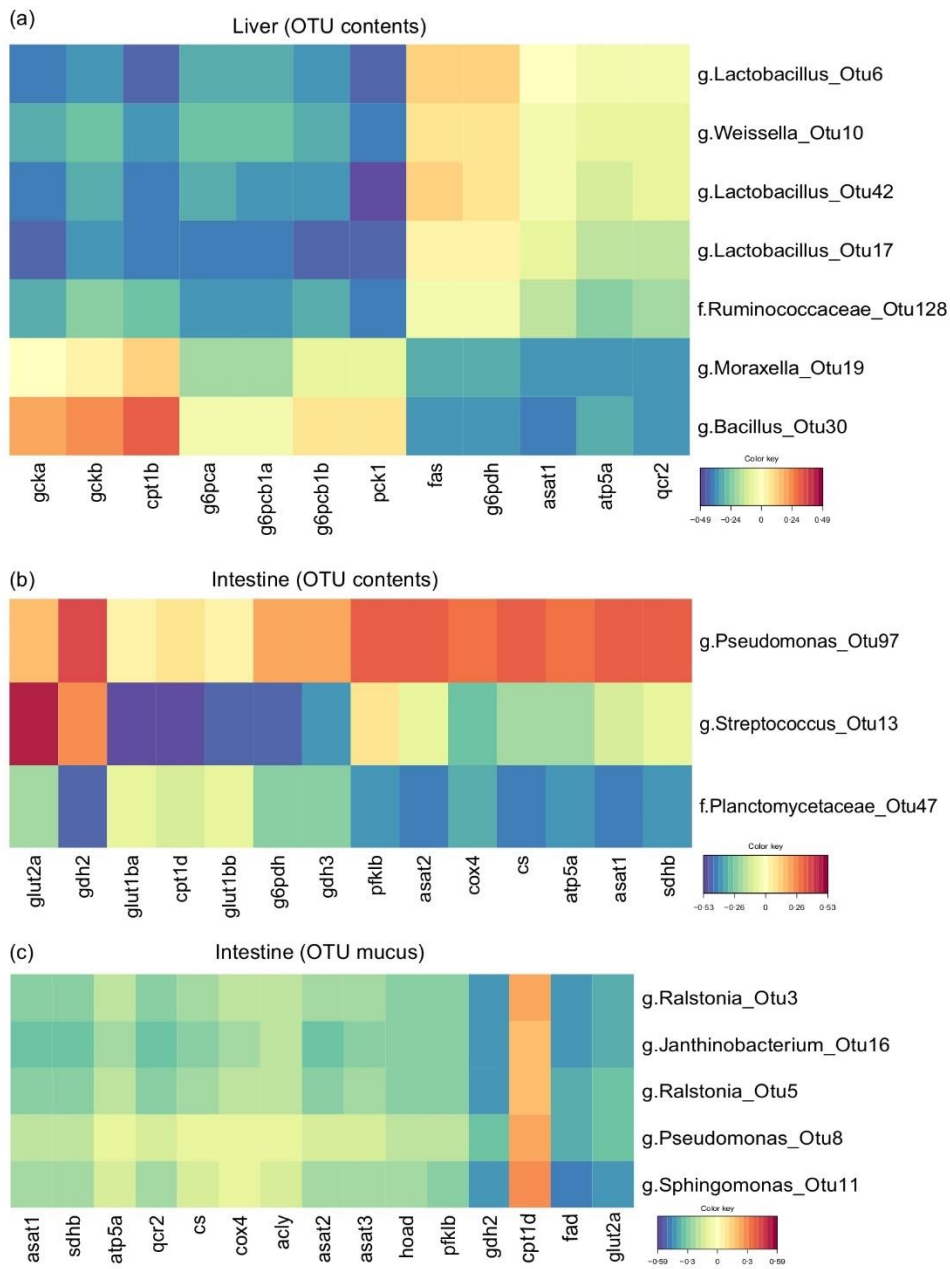
#### SCFA levels and microvilli length

The SCFA acetic acid, butyric acid, caproic acid, propionic acid and valeric acid were measured in the intestinal contents (Fig. 6(a)). There was a significant effect of line on the level of propionic acid ( $P = 0.034$ ). In general, the level of all SCFA was higher in *temoin*. Within the *temoin* line, the levels of all SCFA were generally higher in the inulin-fed group, except for butyric acid.

We observed a significant effect of both inulin and line on microvilli length (Fig. 6(b)). Microvilli were significantly longer in *suave* ( $P = 1.47 \times 10^{-15}$ ). On the other hand, they were significantly shorter in fish fed inulin ( $P = 2.22 \times 10^{-16}$ ).

#### Discussion

In the last decade, much research has been done on the diet–microbiome–host (metabolism) axis in mammals. One of the main focuses has been on the benefits of fibre-utilising bacteria and their metabolites (SCFA). In humans and livestock, a direct link has been established between dietary fibres and various metabolic processes in liver, skeletal muscle, intestine and adipose tissue<sup>(45)</sup>. Although there is great interest in harnessing the beneficial effects of prebiotic-derived microbial metabolites to improve aquatic animal health and metabolism, the prebiotic–microbiome–host axis is not well understood. Prebiotics such as inulin have been used in the diets of teleosts for decades, although not much is known about whether inulin has the same effect on host metabolism (via SCFA) in teleosts as it does in mammals. In addition, there is a lack of knowledge about the



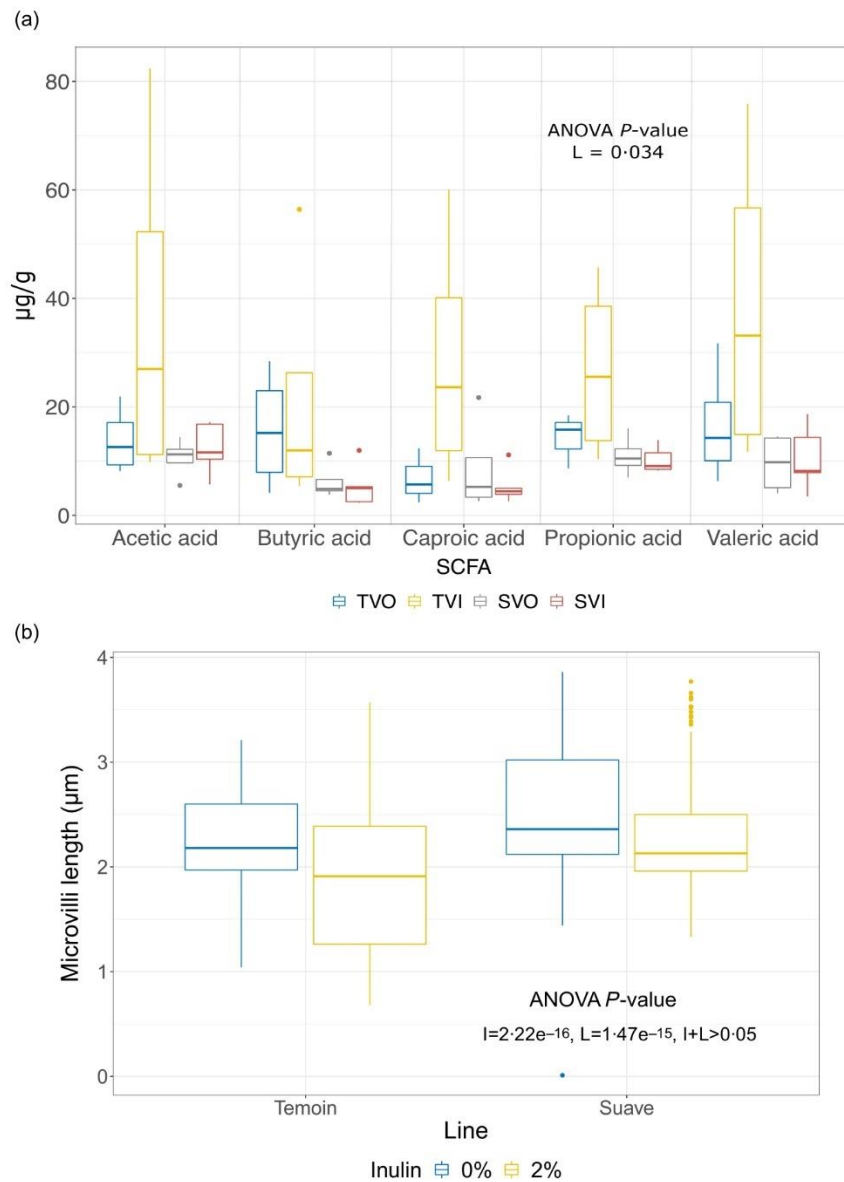
**Fig. 5.** Correlation between relative abundance of OTU found in intestinal content samples (Y-axis) and expression levels of different genes in the (a) liver and (b) intestine. (c) Correlation between relative abundance of OTU found in intestinal mucus samples (Y-axis) and expression levels of different genes in the intestine. The correlations were computed with rCCA (regularised canonical correlation analysis). Colour key shows the strength of the correlation. OTU, operational taxonomic unit.

effects of genotype on inulin degradation and utilisation and the bacterial groups that respond to inulin in teleosts. To address this, in the present study, we investigated the metabolic effects of feeding inulin (2 %) for 16 weeks to two different lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout.

*Growth and plasma parameters*

Final body weight was significantly higher in fish selected for better utilisation of the 100 % plant-based diet (*suave*), as

previously observed<sup>(3)</sup>. The lower growth rate in naïve lines of rainbow trout fed an all-plant diet has been attributed to a combination of factors, including lower feed intake and feed efficiency<sup>(3)</sup>. However, in the present study, feed acceptance and feed efficiency did not differ significantly between the two lines. It should be noted that there was a significant weight difference between the two lines before the start of the experiment. And this difference remained throughout the experiment. It was important to keep the age of the two lines the same at the beginning of the experiment, so the weight difference had to be



**Fig. 6.** (a) Levels of different SCFA including acetic acid, butyric acid, caproic acid, propionic acid and valeric acid in the mid-intestinal contents of two lines (*temoin* and *suave*) of rainbow trout fed 0% and 2% inulin. (b) Length of intestinal epithelial microvilli ( $\mu\text{m}$ ) in two lines (*suave* and *temoin*) of rainbow trout fed 0% and 2% inulin.

accepted<sup>(3,46)</sup>. Moreover, the significant difference between the lines in weight gain also underscores the fact that these two lines naturally grow at different rates<sup>(46)</sup>.

Inulin had no effect on growth parameters. This is interesting because inulin is known to positively affect the growth of many teleosts, including rainbow trout<sup>(21,47)</sup>. The source of inulin, the genetic background of the fish used in the experiment and the differences in basal diet could be the plausible reason for the discrepancies<sup>(48)</sup>. In addition, the species-specific microbiota and the intra-species differences in the intestinal microbial communities (observed in trout) could also lead to such discrepancies<sup>(4,49)</sup>.

We found a significant difference in plasma glucose and TAG levels between the two lines. It is likely that glucose uptake is not

as efficient in the *suave* because of its adaptation to a plant-based diet, which is generally rich in dietary fibre. Glucose uptake from the high-fibre diet is relatively slow compared with the low-fibre diet<sup>(50)</sup>. On the other hand, the higher TAG in *temoin* could be due to increased lipolysis, because carnitine palmitoyltransferase 1 was generally more highly expressed in liver and muscle of the *temoin* line.

#### Effect on the hepatic metabolism

In the liver, total group-wise gene expression was affected by line. Most of the tested genes in the different metabolic pathways showed lower expression in the *suave* compared with the *temoin*. Interestingly, selection of the fish on a plant-based diet

resulted in decreased glycolysis. A higher plasma glucose level in the *suave* also suggests a lower availability of glucose for hepatic glycolysis. Amino acid catabolism is one of the major metabolic pathways in rainbow trout, providing substrates necessary for energy metabolism<sup>(51)</sup>. In the present study, the expression of genes responsible for amino acid catabolism was also lower in the *suave*. In addition, genes involved in gluconeogenesis were also less expressed in *suave*. Taken together, these results could possibly indicate the use of prebiotic-derived substrates (SCFA) (instead of amino acids and glucose) for energy metabolism in *suave*. The involvement of SCFA (acetate) instead of glucose in the production of acetyl-CoA, which is required for the tricarboxylic acid cycle, has been reported previously<sup>(52)</sup>. Indeed, some genes (*cox4* and *cs*) involved in energy metabolism were affected by the interaction between line and inulin (higher expression only in inulin-fed *suave*), further supporting this assumption.

The overall gene expression was not significantly affected by inulin, although two genes of the fatty acid oxidation pathway showed high expression in the inulin groups. Inulin (via the action of various SCFA) has been shown to increase fatty acid oxidation in humans and other animals<sup>(53)</sup>. It is known that these metabolic changes in the liver are due to the activity of acetate and propionate, because butyrate is generally preferentially taken up by intestinal cells<sup>(45,54,55)</sup>. Although we did not measure the amount of the various SCFA in plasma or liver, the amount of SCFA in the intestine was generally higher in the inulin-fed groups, suggesting a possible relationship between inulin and fatty acid oxidation. Moreover, two genes of lipogenic metabolism were induced to a higher extent in the inulin-fed fish only in *suave*. This *suave*-specific induction contradicts the anti-lipogenic effect of inulin in mammals and needs further investigation<sup>(45,55)</sup>.

#### *Metabolic changes in the intestine*

Regarding the collective expression of all tested genes in the intestine, we observed a significant effect of line and inulin. In particular, there was a strong decrease in the expression of several genes involved in amino acid catabolism and energy metabolism in *suave*. Rainbow trout is a carnivorous teleost. The efficient use of amino acids compared with glucose and fatty acids to meet energy requirements is already well established in this species<sup>(56)</sup>. The lower expression of energy metabolism genes in the *suave* suggests that selection on a purely plant-based diet results in changes in the mechanisms of energy homeostasis due to reduced amino acid degradation and glycolysis. This observation contradicts what has been documented in mammals. SCFA are known to positively affect intestinal energy metabolism by introducing SCFA into the  $\beta$ -oxidation pathway, leading to the production of acetyl-CoA, which is used in energy metabolism<sup>(45)</sup>. Moreover, most of the metabolic effects in the intestine are mediated by butyrate, and intestinal butyrate levels were relatively low compared with other SCFA, suggesting that the dynamics of SCFA production and utilisation in the trout intestine may be different from those in mammals and need further investigation.

#### *Metabolic changes in the muscle*

The overall gene expression in muscle was significantly affected by line, and expression was significantly lower in *suave*. The major groups of genes that were down-regulated in *suave* include amino acid catabolism, energy metabolism and glucose transporters. *Suave* is reported to gain 35.3% weight within one generation when fed a plant-based diet. Also, in the present study, weight gain was higher (10%) in *suave* than in *temoin*, and these advantages in weight gain may be due to the sensory, morphological and metabolic changes that the selected line undergoes<sup>(46,57)</sup>. The expression pattern in the present study may be indicative of the metabolic changes undergone by this line. In contrast, the control line (*temoin*) fed a plant-based diet appears to metabolise the diet poorly. It is likely that energy metabolism in this group is subject to regulatory mechanisms involving molecules from fatty acid oxidation and amino acid catabolism<sup>(58)</sup>. In addition, the higher expression of genes for fatty acid oxidation and lower lipogenesis when fed inulin may again indicate the inability of the *temoin* group to efficiently utilise inulin.

Inulin had no significant effect on gene expression in muscle. An essential role of prebiotics and their derivatives (SCFA) in skeletal muscle metabolism has been demonstrated in humans by increased uptake and oxidation of fatty acids and decreased lipogenesis<sup>(54)</sup>. In addition, an increase in glucose uptake and retention of nitrogen (protein metabolism) has been suggested<sup>(54)</sup>. In the present study, the effect of inulin on the expression of genes for fatty acid oxidation, lipogenesis and glycolysis was not evident. This counterintuitive finding may be due to the fact that muscle is not the primary site of action for SCFA in carnivorous rainbow trout. Moreover, in addition to the direct effects of SCFA, metabolites released after hepatic assimilation of SCFA are known to have effects on metabolic processes in muscle<sup>(54)</sup>.

#### *Metabolic changes in adipose tissue*

There were no drastic group-wise changes in the expression of metabolic genes in adipose tissue. It should be noted that most of the genes that showed a change responded to the interaction effect of line and inulin. As observed in liver, lipogenic genes are up-regulated only in the inulin-fed group of *suave*. The effect of SCFA on lipogenic pathways in the adipose tissue is uncertain, as there are some studies showing a lipogenic effect of SCFA, whereas others show the opposite<sup>(59–61)</sup>. However, regardless of the effect on lipogenesis, higher levels of the fatty acid oxidation and energy metabolism are consistently observed<sup>(62,63)</sup>. These observations are very similar to those observed in the present study, in which genes were up-regulated in both the lipogenic pathway and fatty acid oxidation. It is likely that the higher fatty acid oxidation is in turn related to the higher energy metabolism observed in the same group of fish. This relationship between fatty acid oxidation and energy metabolism has been documented previously<sup>(63)</sup>. As for adipose tissue, only the *suave* appears to have adapted to utilise inulin, as has been described in mammals, which may be indicative of the metabolic changes experienced by the *suave* as a result of selection.

### Microbial mediation of prebiotic digestion

The effect of prebiotics (or dietary fibre) is mainly mediated by the intestinal microbiome via the production of metabolites such as SCFA. These microbial processes are carried out in mammals by different groups of microbes belonging to the phyla Bacteroidetes and Firmicutes<sup>(64)</sup>. The intestinal microbiome of rainbow trout is dominated by *Mycoplasma*<sup>(4,65)</sup> and is abundant in the mucus/epithelial samples<sup>(66)</sup>. Therefore, we separated the mucus and digestive content samples in the present study. As expected, *Mycoplasma* was a common group in the mucus samples, while the contents were abundant with *Streptophyta* (most likely of dietary origin), as the diet was entirely plant-based (online Supplementary Fig. 1).  $\beta$ -diversity indicated significantly different clustering of the samples depending on the sample type (either mucus or contents). Interestingly, these clusters persisted despite the removal of *Mycoplasma* and *Streptophyta* OTU, with high abundance of *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* and *Sphingomonas* (all belonging to Proteobacteria) in the mucus, while members belonging to Firmicutes (*Lactobacillus* and *Streptococcaceae*) and Planctomycetes (*Singulisphaera*) were a significant feature in the contents, indicating the adaptation of the microbes to the specific microenvironment (either mucus or contents). Together with these results, the significantly lower  $\alpha$  diversity in the mucus compared with the contents suggests that the contents may offer a nutrient-rich niche (high fibre) and harbour a higher diversity of bacterial populations compared with the mucus. In support of this idea, a prevalence of Firmicutes in high-fibre diets has already been described in many animals<sup>(64,67)</sup>. Although Planctomycetes are not a known species in the intestinal microbiome of animals, this group is known to contain an enzyme repertoire required for the degradation of polysaccharides<sup>(68)</sup>, suggesting their potential role in dietary fibre utilisation.

We also analysed the effect of inulin and line on the  $\beta$ -diversity of the mucosal microbiome and content separately. There was no effect of line on the  $\beta$ -diversity of the microbiome, but an OTU belonging to the Ruminococcaceae was a significant feature in *suave*, indicating the adaptability of this OTU to the intestinal environment of *suave*. A relationship between genotype and microbial population has been described in many species, including teleosts<sup>(69–71)</sup>. In addition, several species of *Ruminococcus* have been described as one of the most efficient fibre-degrading groups in ruminants<sup>(67)</sup>.

The significant effect of inulin was observed only in the contents further supporting the hypothesis that fibre-degrading bacteria are more abundant in the contents and that they respond more readily to dietary inulin compared with the mucosal microbiome. This type of differentiation between the mucosal and content microbiome in terms of response to dietary components has been observed previously in Atlantic salmon<sup>(72)</sup>.

### Correlation between the gene expression and microbial abundance

There were negative correlations between several genes (hepatic glycolysis and gluconeogenesis) and OTU belonging to *Lactobacillus*. On the other hand, a positive correlation of

these pathways with *Bacillus* OTU was observed. A similar finding has been previously reported in rainbow trout<sup>(4)</sup>. It needs to be investigated whether the abundance of *Lactobacillus* and *Bacillus* is related to the high plasma glucose levels observed in *suave*. Interestingly, the most abundant bacterial groups in the contents (OTU among Firmicutes) were not correlated with the expression of genes in the intestine. The OTU that were predominant in the mucosa were negatively correlated with the genes down-regulated in intestine (energy metabolism and amino acid catabolism) of *suave* fed with inulin. This counterintuitive down-regulation of energy metabolism genes in the intestine could be due to the uptake of SCFA by the mucosal microbiota, resulting in reduced availability of these metabolites to epithelial cells<sup>(73)</sup>.

### SCFA in intestine

It was evident that the levels of all the SCFA in general were higher in the intestinal content of *temoin* (especially in the inulin-fed group). This difference was significant in the case of propionic acid. It has been previously shown that the SCFA are absorbed by the intestinal cells quite rapidly after their release from the intestinal microbiome<sup>(45)</sup>. Presumably, the rate of absorption of the SCFA in the intestine of *suave* is higher due to their adaptation to a plant-based diet through selection (which is generally rich in SCFA). Measuring SCFA levels in multiple organs such as intestine, liver and blood simultaneously in the future studies would be more insightful.

SCFA receptor expression levels were not drastically modulated in any of the tissues studied. This underscores the need for a detailed study of the mechanisms involved in SCFA production, uptake by host cells and metabolism in the various organs of teleosts. Moreover, in the present study, no direct relationship can be established between the content of SCFA and their biological effect, because the measurement of SCFA in the intestine is complicated due to (1) complex molecular cross-feeding mechanisms, which in turn depend on the microbial composition<sup>(56)</sup> and (2) different SCFA have different sensitivities to different SCFA receptors and are therefore preferentially utilised by different organs<sup>(74)</sup>.

The length of the intestinal microvilli was higher in *suave*, and apparently this is an adaptation of the selected lineage to better nutrient absorption. This adaptation has been noted previously in several animals<sup>(75)</sup>. The relationship between the higher villus length and the higher weight gain in *suave* needs further investigation. However, we observed a decrease in microvillus length in the groups fed inulin. Although the reason for this decrease is not clear, a similar effect was observed in another carnivorous teleost, the gilthead seabream<sup>(76)</sup>.

### Conclusions and future perspectives

In summary, feeding 2% inulin to different lines of rainbow trout has a strong effect on the expression of several metabolic genes depending on the tissue. In the liver, the expression of several metabolic pathways is influenced by the line and the interaction between line and inulin, while in the intestine, both inulin and line influence the expression of metabolic genes. The overall expression in muscle was also influenced by line. From the





present study, microbial communities differed drastically in mucus and contents and line-specific and inulin-specific abundance profiles were observed only in contents. The high abundance of specific genera among Proteobacteria (in mucus) and Firmicutes (in contents) indicates their metabolic adaptation to the specific intestinal microenvironment. The high abundance of OTU among Firmicutes in fish fed 2% inulin may indicate their ability to degrade inulin, and the genomes of these groups need to be further studied. The association of an OTU belonging to the Ruminococcaceae with the selected line (*suave*) is interesting, and its involvement in the better utilisation of plant ingredients in *suave* needs further investigation. The correlation between several members of the Firmicutes and Proteobacteria and the expression of genes involved in different metabolic pathways in both the liver and the intestine (especially gluconeogenesis in the liver and amino acid metabolism and energy metabolism in the intestine) could be indicative of the diet–microbiome–host axis and should be a focus of future research.

### Acknowledgements

Imaging was performed at the Bordeaux Imaging Centre, a member of the National Infrastructure for Bioimaging in France (ANR-10-INBS-04). The authors thank Sabrina Lacomme for her TEM work on this project. The authors also thank the PEIMA fish experimental facility, Sizun, for the experimental set-up, monitoring of the experiment and sampling. The authors also thank Marianne Houssier and Michael Marchand for their help with sampling. The authors also thank Anne Surget for her help with whole-body composition analysis.

The current study was supported by the European Maritime and Fisheries Fund (FEAMP) AntiOB Grant to KR (22001230–00002811).

J. L. designed and performed the wet lab experiments and data analysis and drafted the first version of the manuscript. M. D. and R. D. performed the RNA extraction and qPCR experiments. M. L. B. and T. P. performed the SCFA quantification. M. D-N. designed the selection and maintenance of the selected line *suave*. T. K., L. L. and L. G. oversaw the feeding experiments and organised the sampling. F. T. formulated and manufactured the feed. K. B-R. and S. P. conceived and coordinated the study. All authors contributed to the review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

The authors declare no conflict of interest.

### Supplementary material

For supplementary material/s referred to in this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S0007114523000120>

### References

1. Tacon AGJ & Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146–158.
2. Le Boucher R, Quillet E, Vandeputte M, *et al.* (2011) Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): are there genotype–diet interactions for main production traits when fish are fed marine *v.* plant-based diets from the first meal? *Aquaculture* **321**, 41–48.
3. Callet T, Médale F, Larroquet L, *et al.* (2017) Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLoS One* **12**, e0186705.
4. Lokesh J, Ghislain M, Reyrolle M, *et al.* (2022) Prebiotics modify host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a total plant-based diet: potential implications for microbiome-mediated diet optimization. *Aquaculture* **561**, 738699.
5. Wacyk J, Powell M, Rodnick K, *et al.* (2012) Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture* **356–357**, 223–234.
6. Hua K & Bureau DP (2012) Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. *Aquaculture* **356–357**, 284–301.
7. Kolida S, Tuohy K & Gibson GR (2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* **87**, S193–S197.
8. Hu J, Lin S, Zheng B, *et al.* (2018) Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 1243–1249.
9. Schilderink R, Verseijden C & de Jonge WJ (2013) Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Front Immunol* **4**, 226.
10. He J, Zhang P, Shen L, *et al.* (2020) Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism. *Int J Mol Sci* **21**, 6356.
11. Barrera JG, Sandoval DA, D'Alessio DA, *et al.* (2011) GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 507–516.
12. Rivière A, Selak M, Geirnaert A, *et al.* (2018) Complementary mechanisms for degradation of inulin-type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among Bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation. *Appl Environ Microbiol* **84**, e02893–e02917.
13. Lindberg JE (2014) Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *J Anim Sci Biotechnol* **5**, 15.
14. Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**, 1401–1412.
15. Cerezuola R, Cuesta A, Meseguer J, *et al.* (2008) Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish Shellfish Immunol* **24**, 663–668.
16. Ahmdifar E, Akrami R, Ghelichi A, *et al.* (2011) Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comp Clin Pathol* **20**, 447–451.
17. Harmsen HJM, Raangs GC, Franks Alison H, *et al.* (2002) The effect of the prebiotic inulin and the probiotic bifidobacterium longum on the fecal microflora of healthy volunteers measured by FISH and DGGE. *Microb Ecol Health Dis* **14**, 212–220.
18. Eshaghzadeh H, Hoseinifar SH, Vahabzadeh H, *et al.* (2015) The effects of dietary inulin on growth performances, survival and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Aquac Nutr* **21**, 242–247.
19. Hunt AÖ, Çetinkaya M, Yılmaz FÖ, *et al.* (2019) Effect of dietary supplementation of inulin on growth performance, digestion enzyme activities and antioxidant status of rainbow trout



- (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Agric – Food Sci Technol* **7**, 1344–1353.
20. Reza A, Abdolmajid H, Abbas M, *et al.* (2009) Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *J World Aquac Soc* **40**, 771–779.
  21. Ortiz LT, Rebolé A, Velasco S, *et al.* (2013) Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr* **19**, 475–482.
  22. Wang T, Zhang N, Yu XB, *et al.* (2020) Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet. *Br J Nutr* **126**, 1–29.
  23. NRC (1993) *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, DC: National Academies Press.
  24. Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* **22**, 158–161.
  25. Rifai N, Warnick GR & Dominiczak MH (2000) *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington, DC: American Association for Clinical Chemical. pp. 848.
  26. Amundson DM & Zhou M (1999) Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J Biochem Biophys Meth* **38**, 43–52.
  27. Mulder C, Schouten JA & Popp-Snijders C (1983) Determination of free fatty acids: a comparative study of the enzymatic *v.* the gas chromatographic and the colorimetric method. *J Clin Chem Clin Biochem, Z Klin Chem Klin Biochem* **21**, 823–827.
  28. Moore S (1968) Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J Biol Chem* **243**, 6281–6283.
  29. Lokesh J & Kiron V (2016) Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Sci Rep* **6**, 19707–19707.
  30. Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (2012) [Internet]. [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) (accessed March 2021).
  31. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, *et al.* (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1.
  32. Edgar RC (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* **10**, 996–998.
  33. Lokesh J, Kiron V, Sipkema D, *et al.* (2019) Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals stage-specific microbial signatures. *MicrobiologyOpen* **8**, e00672.
  34. Edgar RC & Flyvbjerg H (2015) Error filtering, pair assembly, and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* **31**, 3476–3482.
  35. Edgar R (2016) SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv* 074161.
  36. McMurdie PJ & Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* **8**, e61217.
  37. Ghislain M, Costarramone N, Sotiropoulos JM, *et al.* (2019) Direct analysis of aldehydes and carboxylic acids in the gas phase by negative ionization selected ion flow tube mass spectrometry: quantification and modelling of ion–molecule reactions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **33**, 1623–1634.
  38. Ghislain M, Costarramone N, Pigot T, *et al.* (2020) High frequency air monitoring by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS): influence of the matrix for simultaneous analysis of VOCs, CO<sub>2</sub>, ozone and water. *Microchem J* **153**, 104435.
  39. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, 1–12.
  40. R Core Team. (2018) *R: A Language and Environment for Statistical Computing (Internet)*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
  41. Babicki S, Arndt D, Marcu A, *et al.* (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* **44**, W147–W153.
  42. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, *et al.* (2018) Vegan: Community Ecology Package. <https://cran.r-project.org/package=vegan> (accessed June 2021).
  43. Segata N, Izard J, Waldron L, *et al.* (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60–R60.
  44. Rohart F, Gautier B, Singh A, *et al.* (2017) mixOmics: an R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005752.
  45. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, *et al.* (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* **54**, 2325–2340.
  46. Le Boucher RR, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, *et al.* (2012) Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS ONE* **7**, e44898.
  47. Ibrahim MD, Fathi M, Mesalhy S, *et al.* (2010) Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol* **29**, 241–246.
  48. Song SK, Beck BR, Kim D, *et al.* (2014) Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol* **40**, 40–48.
  49. Pérez-Pascual D, Pérez-Cobas AE, Rigaudeau D, *et al.* (2021) Sustainable plant-based diets promote rainbow trout gut microbiota richness and do not alter resistance to bacterial infection. *Anim Microbiome* **3**, 47.
  50. Huang M, Zhao X, Mao Y, *et al.* (2021) Metabolite release and rheological properties of sponge cake after *in vitro* digestion and the influence of a flour replacer rich in dietary fibre. *Food Res Int* **144**, 110355.
  51. Polakof S, Panserat S, Soengas JL, *et al.* (2012) Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol B* **182**, 1015–1045.
  52. Shi L & Tu BP (2015) Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 125–131.
  53. Delzenne NM, Daubioul C, Neyrinck A, *et al.* (2002) Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br J Nutr* **87**, S255–S259.
  54. Frampton J, Murphy KG, Frost G, *et al.* (2020) Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab* **2**, 840–848.
  55. Liu L, Fu C & Li F (2019) Acetate affects the process of lipid metabolism in rabbit liver, skeletal muscle and adipose tissue. *Anim Open Access J MDPI* **9**, E799.
  56. Zhang LS & Davies SS (2016) Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med* **8**, 46.
  57. Luca F, Perry GH & Di Rienzo A (2010) Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr* **30**, 291–314.
  58. Véron V, Panserat S, Le Boucher R, *et al.* (2016) Long-term feeding a plant-based diet devoid of marine ingredients strongly affects certain key metabolic enzymes in the rainbow trout liver. *Fish Physiol Biochem* **42**, 771–785.



59. May KS & den Hartigh LJ (2021) Modulation of adipocyte metabolism by microbial short-chain fatty acids. *Nutrients* **13**, 3666.
60. Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, *et al.* (2016) Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. *J Clin Biochem Nutr* **59**, 207–214.
61. Li G, Yao W & Jiang H (2014) Short-chain fatty acids enhance adipocyte differentiation in the stromal vascular fraction of porcine adipose tissue. *J Nutr* **144**, 1887–1895.
62. den Besten G, Bleeker A, Gerding A, *et al.* (2015) Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes* **64**, 2398–2408.
63. Gao Z, Yin J, Zhang J, *et al.* (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **58**, 1509–1517.
64. Kaoutari AE, Armougom F, Gordon JI, *et al.* (2013) The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* **11**, 497–504.
65. Rasmussen JA, Villumsen KR, Duchêne DA, *et al.* (2021) Genome-resolved metagenomics suggests a mutualistic relationship between *Mycoplasma* and salmonid hosts. *Commun Biol* **4**, 1–10.
66. Cheaib B, Yang P, Kazlauskaitė R, *et al.* (2021) Genome erosion and evidence for an intracellular niche – exploring the biology of mycoplasmas in Atlantic salmon. *Aquaculture* **541**, 736772.
67. Terry SA, Badhan A, Wang Y, *et al.* (2019) Fibre digestion by rumen microbiota — a review of recent metagenomic and metatranscriptomic studies. *Can J Anim Sci* **99**, 678–692.
68. Kim JW, Brawley SH, Prochnik S, *et al.* (2016) Genome analysis of Planctomycetes inhabiting blades of the red alga *Porphyra umbilicalis*. *PLoS One* **11**, e0151883.
69. Ahern OM, Whittaker KA, Williams TC, *et al.* (2021) Host genotype structures the microbiome of a globally dispersed marine phytoplankton. *Proc Natl Acad Sci (Internet)* **118**, e2105207118.
70. Goodrich JK, Davenport ER, Clark AG, *et al.* (2017) The relationship between the human genome and microbiome comes into view. *Annu Rev Genet* **51**, 413–433.
71. Li W, Liu J, Tan H, *et al.* (2018) Genetic effects on the gut microbiota assemblages of hybrid fish from parents with different feeding habits. *Front Microbiol (Internet)* **9**, 2972.
72. Li Y, Bruni L, Jaramillo-Torres A, *et al.* (2021) Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim Microbiome* **3**, 8.
73. Rios-Covian D, Gueimonde M, Duncan SH, *et al.* (2015) Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol Lett* **362**, fnv176.
74. Priyadarshini M, Kotlo KU, Dudeja PK, *et al.* (2018) Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *Compr Physiol* **8**, 1091–1115.
75. Caspary WF (1992) Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr* **55**, 299S–308S.
76. Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, *et al.* (2013) Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish Shellfish Immunol* **34**, 1063–1070.

**Annexe 4 :** « *Supplementary material* » de l'[article 1](#) – « High carbohydrate to protein ratio promotes changes in intestinal microbiota and host metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant-based diet ».

**Supplementary table 1. (Article 1)** Product ions from the reaction of short-chain fatty acids and Lactic acid with  $H_3O^+$ ,  $NO^+$  and  $O_2^+$  precursor ions in Selected Ion Flow Tube - Mass Spectrometry (from LabSyft software)

	$H_3O^+$		$NO^+$		$O_2^+$	
	Product ion	m/z	Product ion	m/z	Product ion	m/z
Acetic acid	$CH_3COOH_2^+$	61	$CH_3COOH.NO^+$	90	$CH_3COOH^+$	60
					$CH_3CO^+$	43
Propionic acid	$C_2H_5COOH_2^+$	75	$C_2H_5COOH.NO^+$	104	$C_2H_5COOH^+$	74
	$C_2H_5CO^+$	57			$C_2H_4CO^+$	56
			$C_2H_5CO^+$	57	$C_2H_5COO^+$	73
					$CH_3COOH^+$	60
Butyric acid	$C_3H_7COOH_2^+$	89	$C_3H_7COOH.NO^+$	118	$C_3H_4COOH^+$	88
	$C_3H_7CO^+$	71			$C_2H_4COOH^+$	73
			$C_3H_7CO^+$	71	$C_2H_3O^+$	43
Valeric acid	$C_4H_9COOH_2^+$	103	$C_4H_9COOH.NO^+$	132	$CH_3COOH^+$	60
	$C_4H_9CO^+$	85			$CH_2CH_2COOH^+$	73
Lactic acid	$CH_3CHOH^+$	45	$NO+.CH_3CH(OH)COOH$	91	$CH_3CHOH^+$	45
	$CH_3CHOH+(H_2O)$	63			$CH_3CH(OH)CO^+$	73
		$CH_3CHOH(H_2O)_2$	81			

**Supplementary table 2. (Article 1)** Primer sequences and accession numbers for qPCR analysis.

Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans l'**Annexe 7** de la thèse.

**Supplementary table 3.** (Article 1) Whole-body composition in rainbow trout fed with 100% plant-based diet with high or low levels of dietary carbohydrates

Whole-body composition	High-Starch	Low-Starch	P value
Dry matter (DM) (%)	34.62 ± 1.43	35.83 ± 0.35	NS
Crude protein (% DM)	45.67 ± 1.51	45.89 ± 0.56	NS
Crude lipids (% DM)	48.23 ± 1.54	48.54 ± 0.38	NS
Gross energy (kJ kg <sup>-1</sup> of DM)	30.67 ± 0.16	30.48 ± 0.16	NS
Protein retention <sup>1</sup> (%)	42.48 ± 2.11	44.21 ± 0.81	NS
Protein gain <sup>2</sup> (mg/Kg ABW/day)	629.05 ± 36.21	664.88 ± 12.22	NS
Lipid retention <sup>1</sup>	53.65 ± 2.26	54.85 ± 0.90	NS
lipid gain <sup>2</sup> (mg/Kg ABW/day)	794.32 ± 33.17	824.78 ± 6.81	NS

Nutrient retention<sup>1</sup> (%) = (100 x Final carcass nutrient content. g - Initial carcass nutrient content. g) / Nutrient consumed. g). Nutrient gain<sup>2</sup> (mg/Kg ABW/day) = (100x (Final carcass nutrient content. g - Initial carcass nutrient content. g) / ((Initial + final biomass)/2) / Experiment duration (days)). Data are presented as mean ± SD (n=12 fish). statistical differences are calculated by one-ways ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant.  $P < 0.05$  \*.  $P < 0.01$  \*\*.  $P < 0.001$  \*\*\* .

**Supplementary table 4. (Article 1)** List of the top 30 most contributing OTU, discriminated by the diet on the midgut digesta samples, with the one-way ANOVA results.

OTU	N°	P value	OTU	N°	P value
<i>Streptococcus sp.</i>	91	0.02705 *	<i>Rickettsiella sp.</i>	41	0.0006024 ***
<i>Ligilactobacillus sp.</i>	402	0.02327 *	<i>Weissella cibaria</i>	13	0.0005407 ***
<i>Sphingomonas sp.</i>	71	0.02034 *	<i>Enterococcus cecorum</i>	47	0.0003606 ***
<i>Weissella sp.</i>	203	0.01683 *	<i>Ralstonia pickettii</i>	318	0.0002522 ***
<i>Cutibacterium sp.</i>	86	0.0158 *	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	191	0.0001872 ***
<i>Veillonella sp.</i>	468	0.01531 *	<i>Floribacillus penangensis</i>	116	0.0001543 ***
<i>Streptococcus sp.</i>	38	0.0152 *	<i>Lactococcus garvieae</i>	14	0.0001526 ***
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	0.01315 *	<i>Ralstonia pickettii</i>	139	8.115e-05 ***
<i>Weissella cibaria</i>	354	0.009947 **	<i>Bacillus licheniformis</i>	415	3.894e-05 ***
<i>Weissella cibaria</i>	357	0.00775 **	<i>Peptoniphilus koenoeneniae</i>	89	1.048e-05 ***
<i>Cutibacterium namnetense</i>	99	0.006641 **	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	55	8.026e-06 ***
<i>Rickettsiella sp.</i>	266	0.005159 **	<i>Ralstonia pickettii</i>	216	2.669e-06 ***
<i>Mycoplasma sp.</i>	246	0.003985 **	<i>Ralstonia pickettii</i>	63	1.255e-06 ***
<i>Weissella cibaria</i>	197	0.002171 **	<i>Bacillus licheniformis</i>	18	1.126e-06 ***
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	53	0.0008995 ***	<i>Ralstonia pickettii</i>	117	4.102e-07 ***

Statistical differences were calculated by one-ways ANOVA ( $P < 0.05$ ). NS not significant.  $P < 0.05$  \*.  $P < 0.01$  \*\*.  $P < 0.001$  \*\*\*.

**Annexe 5 :** « *Supplementary material* » de l'article 2 – « Exploring the effects of dietary inulin in rainbow trout fed a high-starch, 100% plant- based diet ». (Article en révision)

**Additional file 1:** (Article 2) Product ions from the reaction of short-chain fatty acids with  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{NO}^+$  and  $\text{O}_2^+$  precursor ions in selected Ion Flow Tube - Mass Spectrometry (from LabSyft software)

	$\text{H}_3\text{O}^+$		$\text{NO}^+$		$\text{O}_2^+$	
	Product ion	m/z	Product ion	m/z	Product ion	m/z
Acetic acid	$\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$	61	$\text{CH}_3\text{COOH.NO}^+$	90	$\text{CH}_3\text{COOH}^+$ $\text{CH}_3\text{CO}^+$	60 43
Propionic acid	$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}_2^+$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}^+$	75 57	$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH.NO}^+$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}^+$	104 57	$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}^+$ $\text{C}_2\text{H}_4\text{CO}^+$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}^+$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^+$	74 56 57 73
Caproic Acid	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}_2^+$ $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CO}^+$	119 99	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH.NO}^+$ $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CO}^+$	146 99	-	-
Butyric acid	$\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}_2^+$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}^+$	89 71	$\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH.NO}^+$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}^+$	118 71	$\text{CH}_3\text{COOH}^+$ $\text{C}_3\text{H}_4\text{COOH}^+$ $\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}^+$ $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$	60 88 73 43
Valeric acid	$\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}_2^+$ $\text{C}_4\text{H}_9\text{CO}^+$	103 85	$\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH.NO}^+$ $\text{C}_4\text{H}_9\text{CO}^+$	132 85	$\text{CH}_3\text{COOH}^+$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}^+$	60 73
Lactic acid	$\text{CH}_3\text{CHOH}^+$ $\text{CH}_3\text{CHOH}^+.(H_2O)$ $\text{CH}_3\text{CHOH}(H_2O)_2$	45 63 81	$\text{NO}^+.\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}^+$	91 73	$\text{CH}_3\text{CHOH}^+$ $\text{CH}_3\text{CO}^+$	45 43

**Additional file 2:** ([Article 2](#)) Primer sequences and used for RT-qPCR analysis.

Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans l'**Annexe 7** de la thèse.

**Additional file 3:** ([Article 2](#)) Whole-body composition of rainbow trout fed 100% plant-based diet with high or low levels of dietary carbohydrates and with or without 2% inulin during 12 weeks.

Whole-body composition	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
Dry matter (DM) (%)	32.78 ± 0.15	33.33 ± 1.16	33.07 ± 0.65	33.13 ± 0.38	NS	NS	NS
Ash (% DM)	6.07 ± 0.14	5.59 ± 0.13	5.73 ± 0.81	5.52 ± 0.48	NS	NS	NS
Crude Protein (% DM)	49.09 ± 0.41	47.47 ± 0.50	48.15 ± 1.73	47.80 ± 0.55	NS	NS	NS
Crude Lipids (% DM)	44.93 ± 0.84	46.19 ± 0.29	45.42 ± 1.91	45.70 ± 1.00	NS	NS	NS
Gross energy (kJ g <sup>-1</sup> of DM)	29.39 ± 0.41	29.85 ± 0.10	29.86 ± 0.55	29.73 ± 0.29	NS	NS	NS

**Additional file 4:** ([Article 2](#)) Abundances of different phyla in fish fed the experimental diets during 12 weeks.

Phyla	LS-0	LS-In	HS-0	HS-In	P values		
					CHO/ Protein	Inulin	Interaction
<i>Proteobacteria</i>	72.08 ± 9.79	72.93 ± 5.44	76.47 ± 6.87	81.07 ± 7.57	**	NS	NS
<i>Firmicutes</i>	21.40 ± 10.20	21.19 ± 6.95	15.99 ± 4.55	11.34 ± 5.44	***	NS	NS
<i>Actinobacteriota</i>	6.22 ± 2.65	5.56 ± 2.50	7.22 ± 3.33	7.25 ± 2.65	NS	NS	NS
<i>Bacteroidota</i>	0.22 ± 0.17	0.26 ± 0.40	0.24 ± 0.31	0.28 ± 0.22	NS	NS	NS
<i>Fusobacteriota</i>	0.06 ± 0.11	0.04 ± 0.07	0.05 ± 0.13	0.02 ± 0.04	NS	NS	NS
<i>Acidobacteriota</i>	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.06	0 ± 0	0.04 ± 0.10	NS	NS	NS
<i>Patescibacteria</i>	0.01 ± 0.04	0 ± 0	0.04 ± 0.08	0 ± 0	NS	NS	NS
<i>Firmicutes/Proteobacteria ratio</i>	0.32 ± 0.21	0.30 ± 0.12	0.21 ± 0.07	0.15 ± 0.08	**	NS	NS



**Annexe 6 :** « *Supplementary material* » de l'article 3 – « Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet ». (Article prêt pour soumission).

**Supplementary table 1.** (Article 3) Diet composition.

	Low-starch	High-starch
<b>Ingredients (%)</b>		
Wheat gluten	10.2	21.1
gelatinized wheat starch	-	14.83
Whole wheat	-	7.09
Lysamine pea protein concentrate	21.43	20
Soybean meal	15	-
Soybean protein concentrate	12	-
Corn gluten	7.23	5.44
Lupin flour	4.53	4.26
Cellulose	1.43	-
Rapeseed oil	11.03	11.84
Linseed Oil	6	5.29
Palm oil	2	2
Dicalcium Phosphate	2	2
L-Lysine	1	0.5
L-Methionine	1	0.5
Soy Lecithin powder	2.5	2.5
Premix Vitamins	1.16	1.16
Premix minerals	1.5	1.5
<b>Proximate composition (%)</b>		
Dry Mass (DM)	93.51	92.98
Starch (% DM)	2.67	18.03
Proteins (% DM)	50.63	42.07
Lipids (% DM)	25.54	24.61
Energy (KJ g <sup>-1</sup> DM)	25.78	25.01
Ash (% DM)	6.14	4.97

**Supplementary table 2** : (Article 3). Primer sequences and used for RT-qPCR analysis.

Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans l'**Annexe 7** de la thèse.

**Annexe 7** : Liste des amorces utilisées lors des analyses d'expression de gènes par qPCR.

<b>Metabolic pathway</b>	<b>Gene name</b>	<b>Forward primer (5'-3')</b>	<b>Reverse primer (5'-3')</b>	<b>Accession number (Genoscope. GenBank)/reference</b>
<b>Glucose transporter</b>	<i>glut2a</i>	GACAGGCACTCTAACCTA G	CTTCCTGCGTCTCTGTACTG	GSONMG000240930 01
	<i>glut2b</i>	CTATCAGAGAACGGTACA GGG	CAGGAAGGATGACACCACG	GSONMG000578530 01
	<i>glut4a</i>	CATCTTTGCAGTGCTCCTTG	CAGCTCTGTACTCTGCTTGC	GSONMG000672380 01
	<i>glut4b</i>	TCGGCTTTGGCTTCCAATA TG	GTTTGCTGAAGGTGTTGGA G	GSONMG000160980 01
<b>Glycolysis (liver type)</b>	<i>gcka</i>	CTGCCACCTACGTCTGT	GTCATGGCGTCCTCAGAGA T	GSONMG000337810 01
	<i>gckb</i>	TCTGTGCTAGAGACAGCCC	CATTTTGACGCTGGACTCCT	GSONMG000128780 01
	<i>pfkla</i>	GATCCCTGCCACCATCAGT A	GTAACCACAGTAGCCTCCCA	GSONMG000094590 01
	<i>pfklb</i>	AGTGCTCGCTGTAAGGTCT T	GTGATCCGGCCTTTCTGAAC	GSONMG000019750 01
	<i>pk</i>	CCATCGTCGCGGTAACAAG A	GCCCCTGGCCTTTCCTATGT	ContigAF246146.s.o m.10
<b>Glycolysis (muscle type)</b>	<i>hk</i>	CTGGGACGCTGAAGACCA GA	CGGTGCTGCATACCTCCTTG	AY864082
	<i>pfkmaa</i>	GTCAGTCTGTCCGGTAACC A	ATCTGGAGGGTTGATGTGG G	GSONMG000282370 01
	<i>pfkmab</i>	TCAGCGGAGGAGGCTAAT C	GACTCTGTGCAGTAGTCGT G	GSONMG000352460 01
	<i>pfkmba</i>	CTGGGCATGAAAAGGCGA T	GTCTTCTTGATGATGTGCTC CA	GSONMG000758870 01
	<i>pfkmbb</i>	CGGTCGTATCTTTGCCAAC ATG	TGTCCATTTCCACAGTGTC TATT	GSONMG000699100 01
	<i>pkmaa</i>	ACATTGCCCCCTACAGTTA C	AAGTGGAATGAATGGGAC GT	GSONMG000528880 01
	<i>pkmab</i>	TGCTGAGGGCAGTGACGT A	AGCTCCTCAAACAGCTGTCT G	GSONMG000393040 01
	<i>pkmba</i>	CAAGCCTGCCAACGATGTC	CAAGGAACAAGCACAACAC G	GSONMG000324760 01
	<i>pkmbb</i>	CAACTGTGACGAGAAGCA CC	GAGCCCAGAGTACCACCAT T	GSONMG000502700 01
<b>Gluconeogenesis</b>	<i>pck1</i>	ACAGGGTGAGGCAGATGT AGG	CTAGTCTGTGGAGGTCTAA GGGC	GSONMG000824680 01
	<i>pck2</i>	ACAATGAGATGATGTGACT GCA	TGCTCCATCACCTACAACCT	GSONMG000596430 01
	<i>fbp1a</i>	GACAGAGGACGACCCGTG	GTAAGTACCGGGTCCAACA T	GSONMT000019320 01

	<i>fbp1b1</i>	CTCTCAAGAACCTCTACAG CCT	TCAGTTCTCCCGTTCCCTTC	GSONMT000630510 01
	<i>fbp1b2</i>	ATCAGCAGGAATAGGTCG CG	CCTCCTCCAGCACGAATCTC	GSONMG000157010 01
	<i>g6pca</i>	GATGGCTTGACGTTCTCCT	AGATCCAGGAGAGTCCTCC	GSONMG000768430 01
	<i>g6pcb1 a</i>	GCAAGGTCCAAAGATCAG GG	GCCAATGTGAGATGTGATG GG	GSONMG000768410 01
	<i>g6pcb1 b</i>	GCTACAGTGCTCTCCTTCT G	TCACCCCATAGCCCTGAAA	GSONMG000660360 01
	<i>g6pcb2 a</i>	ATCGGACAATACACACAGA ACT	CAACTGATCTATAGCTGCTG CCT	GSONMG000130760 01
	<i>g6pcb2 b</i>	CCTCTGCTCTTCTGACGTA G	TGTCCATGGCTGCTCTTAG	GSONMG000148640 01
<b>Lipogenesis de novo</b>	<i>sreb1a</i>	CAGTTGCTGCTGTGTGACC T	TGATGTGTTGCTGTGGGAC T	XM_021624594.1
	<i>g6pdb</i>	TGTCACAGGGTCAACATAA TGC	AGCAGCAACATTGTGACAA GA	XM_021566624.1
	<i>aclya</i>	GGTGTGAGCGTTATGAAG CA	GATTCAGCCGCAATTCTA	XM_021624819.1
	<i>aclyb</i>	GACGGAAAAGTCCTGATC ATC	TGTGAGTCTCTGTGCCGAA G	XM_021557697.1
	<i>aclyc</i>	ACCGGTTCACAAATGGGAT A	CCAAGTCACCCAGAAAAGCA T	XM_021575392.1
	<i>aca-αa</i>	ACAGGACCCTAAAGCACA GG	GGTGAAAGAGGTGTCCAGG A	XM_021623125.1
	<i>aca-αb</i>	TCCAGTTCATGCTGCCTAC C	GCTTAATGTCCCGAGTGCG A	XM_021618451.1
	<i>aca-βa</i>	TCGCTCAGAATTCCGGGTA C	CGCGTGGTGATGGTTACAA T	XM_021605386.1
	<i>aca-βb</i>	TGAACAGCTTGGTAAACAG CC	TCTCGTGCATTCTACCAGGG	XM_021620987.1
	<i>fasna</i>	AGCTCGTACCTTCTGTTC C	ACAACAAGGCCGTTCTTCA G	XM_021576228.1
<i>fasnb</i>	CTGCTACAACCTGGAAACAC GC	ATCAAGGTAACGACACACC GT	XM_021581290.1	
<b>Fatty acids β- oxidation</b>	<i>hadh</i>	TTATCATGGACGGCTGGGT T	CAGCTCGTGTGATTCTGGG	XM_021573383.1
	<i>cpt1a</i>	CGTTAGCAATGCCTCACAG A	AACGGAACAGGTAGCGCTA T	XM_021607999.1
	<i>cpt1ba</i>	AGCAAGCTTGAATTGAATC CCT	CTTATGGCGCGCTTTATCCA	NM_001171855.1
	<i>cpt1bb</i>	GGTGTCCAGTTGCAGAAA GG	TGACTTTGGTTTCTCACAGT GG	NM_001124735.1
	<i>acox1a</i>	ACATCGTTTCATAGACTGC CAG	CTCAATCCTTATCCTCCATC CA	XM_021568071.1

	<i>acox3</i>	ACCTCCTCAGCCAACTACA C	CCTTAGCCACTCTCCTCTCG	XM_021577711.1
<b>Cholesterol synthesis</b>	<i>srebp2a</i>	AGACCCACACACGTTAATG CT	CTATGTGACTGTTCTGGGAT C	XM_021558053.1
	<i>srebp2b</i>	AATAGTCAACAACGCGAAC AGT	GGTTGGCAGTGTGAAGATT GA	XM_021625098.1
	<i>hmgcra</i>	GGAGGTGATCGTAGGCAC TG	GGCTATGCACCGTGTGATG G	XM_021622177.1
	<i>hmgcrb</i>	GTGTTGTTTCGGCTGCATG T	GCCATAACACGGGCAAAGT G	XM_021602157.1
	<i>idi1</i>	CGTCGAAACAGAATTGA GGTG	GCTCCAGTCTTCTGGTCGTT C	NM_001160619.1
	<i>cyp51a</i>	TAAGAGACTGAGCGCA AACA	TTATGAGAGCCAGCCCTAT GAG	XM_021560395.1
	<i>cyp51b</i>	CCTGGTCGATGGCTACTTC C	TGCTCTTCTGGGTGTAACCT C	XM_021572174.1
	<i>dhcr7a</i>	ACTGCCAGCTTTGTGCTCT A	ACCCATGGCAACTAACTGCT A	XM_021585986.1
	<i>dhcr7b</i>	AGTTGGCGTTGGTCAAGTA AC	TTCATGTAACGCTGGGCTG A	XM_021607019.1
<b>Cholesterol elimination</b>	<i>lxraa</i>	AGCAAGTGTGTACTCGTCA GA	GAAACGAACCTTCTGCTTG TC	NM_001159338
	<i>lxrab</i>	CAGAGTCAGGACCCCCAG AA	GTTGAGGTCTTCAGCAGCG C	XM_021585769.1
	<i>abca1a</i>	AACGAGGTTGGAGGTATC AATG	ACCGAATCTTCCAGAGCGT C	XM_021584015.1
	<i>abca1b</i>	GTCCATACCGGAGGTCCCA G	CAGGGAGCATTTTCTTGCG GC	XM_021561291.1
	<i>abcg4b</i>	AATCGTTCGGAGCTGGAGT G	GCATCCTCCAGTCCAGTAG G	XM_021619008.1
<b>Pro-inflammatory cytokines and chemokines receptors</b>	<i>il1b</i>	ACGGTTCGCTTCTCTTCTA CA	GCTCCAGTGAGGTGCTGAT GAA	AJ245925.2
	<i>il8</i>	GTCAGCCAGCCTTGTCGTT GT	CGTCTGCTTCCGTCTCAAT GC	NM_001124362.1
	<i>tnfa</i>	GGCGAGCATACCACTCCTC TGA	AGCTGGAACACTGCACCAA GGT	NM_001124362.1
	<i>cxcr4</i>	TCAAGAGTTCTGCTCGCCG	TCTGACTCTGTCGTTGTGGA C	XM_021594980.2
	<i>cxcr4.1.1</i>	GTTCCGTTTCCAGCACATTC T	ATGATGCAGTAGCAGGTGA GG	NM_001124342.2
<b>Tight junction proteins</b>	<i>tjp1a</i>	TCAGCTGCGCTATGATGAG G	GGTCGTAACGTAGAGGAGC G	XM_036980662.1
	<i>tjp3</i>	GGGACACAGCCGTGATAG TT	TGACACGCCATTGACCATG A	XM_031822609.1

	<i>marveld</i> 1	GGTGATCGGCATGATC T	GTGGCAGCCAGGTAGACTT T	XM_021576418.2
	<i>marveld</i> 3	TTCCACCAGCTCAAGCTAC C	GGGACTCTCAAACCCCGA A	XM_021586195.2
<b>FFARs</b>	<i>ffar1</i>	ACT GTT GCA CCT GAG TCT GG	GCT GGT CCT GGG TGA AGT TC	ENSOMYG00000041 396
	<i>ffar2a1</i> <i>a</i>	CCG AGT TCC TCT GCT CCA TC	TAG GTG ATG GGG AAG GCA AC	ENSOMYG00000004 986
	<i>ffar2a2</i>	GAC AAC TTC ACC CAG GAG CA	AGC AGA ACA CAC AGG CCA G	ENSOMYG00000030 315
	<i>ffar2b1</i> 1	TTT TCC ACA CAC AGT TGG CC	AGG TAG TGT TGT CGG CAT CT	ENSOMYG00000041 393
	<i>ffar2b1</i> 2	GTG TGG CCT TCC CTA TCA GA	GCA GGG CAC AAT GTA CAC AA	ENSOMYG00000041 387
	<i>ffar2b2</i> <i>a</i>	CCC ATC CAA CAC TCG CTG AA	TGA TGA CGA CGA TGC TCA GG	ENSOMYG00000030 493
	<i>ffar2b2</i> <i>b1</i>	TGA CCG CAA TCA GTG TCG AA	CCC AGA AGA AGA CGC TAG CC	ENSOMYG00000030 500
	<i>ffar2b2</i> <i>b2</i>	GTC CAG TAC CAT CAA CGC CA	CTG CAC ACT CTC CAA CAG GGT	ENSOMYG00000005 604
<b>Reference gene</b>	<i>ef1a</i>	TCCTCTGGTCGTTTCGCTG	ACCCGAGGGACATCCTGTG	XM_021567853.1
	<i>B-actin</i>	GATGGGCCAGAAAGACAG CTA	TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	-
	<i>gapdh</i>	CTGGAGAAGCCTGCCAGCT A	CCATGTGACCAGCTTGACG A	NM_001124209.1







## Résumé

L'augmentation de la demande en protéines animales, liée à l'augmentation de la population mondiale, requiert un développement important de l'aquaculture dans les prochaines décennies, afin de couvrir les besoins grandissant en poissons, considérés comme **la meilleure source de protéines animales** au vu de ses qualités nutritionnelles. Dans ce contexte, les farines et huiles de poisson, composants principaux des aliments aquacoles, ont progressivement été remplacés, en particulier, par des **ingrédients d'origine végétale**. Cependant, le remplacement total de farines et huiles de poisson n'est pas encore possible sans diminuer les performances de croissance et la survie des truites, à cause des déséquilibres en acides aminés et en micronutriments, et de la présence de facteurs antinutritionnels. L'incorporation d'une quantité importante de **glucides digestibles** pourrait réduire les protéines végétales dans l'alimentation des poissons et pourrait être une solution intéressante afin d'optimiser l'aliment sans farines et huiles de poisson.

L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier, pour la première fois, l'incorporation de glucides digestibles (à hauteur de 20%) dans un régime 100% végétal, modifiant ainsi le ratio glucides/protéines chez la truite arc-en-ciel. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé trois expérimentations afin de tester l'effet du ratio glucides/protéines sur le **microbiote intestinal**, le **métabolisme** de la truite à long terme (après 12 semaines de nutrition) ou à court terme (3 semaines de nutrition), ainsi que la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), molécules clés du dialogue moléculaire microbiote-hôte. De plus, l'effet cumulé de la supplémentation en inuline (prébiotique), et de variations du ratio glucides /protéines a également permis d'évaluer les effets de l'utilisation des glucides sur les **paramètres immunitaires**.

Le ratio élevé glucides/protéines a eu un effet important sur l'alpha et la beta diversité et sur l'abondance de différentes **bactéries lactiques**, mais aussi sur celle du genre *Bacillus*, à court et à long terme, dans le microbiote associé aux contenus digestifs. Le microbiote associé au mucus a été, lui, moins affecté par ce ratio. Le **changement dans la diversité microbienne** pourrait expliquer les différences observées dans la production des acides gras à chaîne courte, qui peuvent jouer un rôle important sur le métabolisme de l'hôte. Au niveau du métabolisme, l'introduction des glucides n'a pas diminué les performances de croissance des truites, et n'a pas été associée à un dysfonctionnement de **l'homéostasie glucidique** et du métabolisme intermédiaire. Une diminution de certains marqueurs inflammatoires a aussi été observée avec le fort ratio glucides/protéines. En revanche, l'incorporation du prébiotique inuline n'a pas eu d'effets positifs sur l'utilisation des glucides.

En conclusion, l'incorporation de glucides digestibles dans un aliment 100% végétal semble être une **voie prometteuse** pour optimiser l'utilisation des nouveaux aliments aquacoles, sans ressources marines, chez la truite arc-en-ciel.