

Laboratoire « Adaptation et Adaptabilité des Animaux et des Systèmes d'élevage »
Station d'Aquaculture Expérimentale de Palavas-les-Flots

Alain Vergnet & Béatrice Chatain

**CONVENTION MEEM 2016 relative au concours apporté par l'IFREMER au
Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie en
matière de maîtrise d'ouvrage et d'expertise aquacole
signée le 26 juillet 2016
Référence Ifremer : 16/1212569
PROJET CRECHE / ANNEE 2016**

Fiche Action : CREation CHEptels Experimentaux (CRECHE²⁰¹⁶)

Unité expérimentale pour évaluer le métabolisme énergétique



Deux objectifs sont visés dans cette partie piscicole qui consistent en la création et la caractérisation de lignées expérimentales, un matériel biologique spécifique développé et entretenu comme support de recherche pour l'ensemble de la communauté scientifique.

1. Création de la 3^e génération de domestication d'une lignée albinos

Le caractère « albinos » chez le bar est récessif et seuls les homozygotes pour ce caractère présentent le phénotype typique de l'albinisme.

La lignée F2 d'albinos homozygotes que nous utilisons pour créer cette F3, fait partie des cheptels expérimentaux de la plateforme expérimentale de l'Ifremer à Palavas-les-Flots depuis 2005. Elle a été développée et entretenue grâce aux financements récurrents de la convention socle DPMA-Ifremer et de certains partenaires institutionnels pour répondre à des besoins expérimentaux spécifiques :

- faciliter l'étude des mécanismes d'expression de la mélatonine car les récepteurs situés au niveau de la rétine sont plus accessibles du fait de l'absence de pigmentation
- augmenter la puissance statistique de certains dispositifs expérimentaux en étant utilisée comme témoin interne (suppression des effets environnementaux)
- détecter visuellement les homozygotes dans les essais de gynogenèse (Cf. CRECHE²⁰¹⁵) limitant ainsi le coût des analyses de génotypage qui est aujourd'hui la seule méthode pour les identifier (en moyenne 525 € par homozygote identifié, soit 50 animaux génotypés à 10,5 € l'analyse)
- pour travailler sur les étapes précoces du développement compte tenu de la transparence des albinos pendant les stades larvaires et faciliter les méthodes d'hybridation *in situ*

L'objectif visé ici en créant une F3, est de pérenniser cette lignée spécifique dont les femelles F2 sont aujourd'hui âgées de 5 ans et en atteindront 8 et les limites de leurs capacités de reproduction, quand les femelles de la F3 arriveront elles-mêmes en âge de se reproduire.

Le protocole que nous avons suivi pour générer cette F3 est résumé ci-dessous ; cette opération a été effectuée en janvier - février 2015 pendant la saison de ponte naturelle :

- Cryoconservation du sperme de 54 pères (20 paillettes / père) albinos homozygotes F2, un mois avant le croisement
- Suivi de l'évolution de la maturation d'une cinquantaine de mères d'origine Méditerranée-Ouest F3 pendant 2 mois
- Stimulation hormonale de 24 d'entre-elles pour synchroniser leurs pontes
- Obtention de 15 lots d'ovocytes par stripping et conservation des 13 meilleurs après contrôle qualité
- Fécondation *in vitro* des produits génitaux suivant un plan de croisement factoriel complet où chacune des 13 pontes est fécondée par chacun des 54 pères
- Mise en incubation puis en élevage en environnement commun, des descendants F3

Le tri des albinos a été effectué à l'âge de 5 mois (environ 5g) et 900 descendants produits mis en grossissement pour constituer le futur lot de géniteurs F3 ; ils ont aujourd'hui un poids moyen d'environ 100g. Les géniteurs mâles seront choisis en hiver 2017 et les géniteurs femelles au cours de l'hiver 2018. L'objectif final visé est une population F3 de 60 géniteurs de sexe-ratio équilibrée.

2. Caractérisation des bases physiologiques des stratégies énergétiques de phénotypes divergents pour leur efficacité alimentaire individuelle (EAi)

L'efficacité alimentaire (EA ; ratio entre la croissance en poids et la quantité d'aliment ingérée) est le premier critère à améliorer en terme d'efficacité économique et environnementale dans tous les élevages et notamment en pisciculture (Besson *et al.*, 2014). Ce caractère reste cependant impossible à évaluer chez les poissons car on ne sait pas mesurer l'ingéré individuel dans une dynamique d'alimentation de groupe. Pour pallier ce problème, nous avons donc utilisé un critère indirect qui lui est génétiquement corrélé chez le bar, la résistance au jeûne (Grima *et al.*, 2010) et développé des lignées divergentes pour valider sa pertinence (Cf. CRECHE²⁰¹³ et CRECHE²⁰¹⁴). Ce caractère n'induisant que des progrès relativement lents (Daulé *et al.*, 2014), nous avons développé une nouvelle méthode de mesure (directe cette fois) de l'EA individuelle (EAi) pour l'espèce, basée sur des résultats obtenus en 2013 chez le lapin par Drouilhet *et al.*, où la croissance individuelle sous conditions d'alimentation restreinte, est un critère très efficace de la sélection de l'EAi. Une infrastructure expérimentale mise au point dans le cadre de la convention DPMA CRECHE²⁰¹⁵, permet aujourd'hui d'évaluer l'ingéré individuel simultané d'une centaine de poissons (un poisson par aquarium) et un nouveau critère (l'EAi en isolement) qui nous l'espérons, sera plus efficace que la résistance au jeûne. Cet outil de phénotypage combinant une automatisation de l'alimentation individuelle et son rationnement, permet d'éviter la collecte journalière du non-ingéré et la caractérisation d'effectifs suffisants (quelques centaines de poissons) pour valider les bases génétiques de ce caractère et son utilisation dans les programmes de sélection. La méthode testée sur des lignées divergentes pour l'EA sélectionnées sur la résistance (perte de masse) au jeûne, a déjà permis de différencier des phénotypes plus ou moins efficaces en isolement.

L'objectif visé ici, est de caractériser le métabolisme énergétique de tels phénotypes pour comprendre comment il intervient dans l'expression de cette efficacité alimentaire différentielle mesurée dans ces conditions particulières. Trois approches complémentaires sont utilisées, *i.e.*, métabolique, biochimique et génomique : (a) la mesure du taux métabolique aérobie estimé de façon indirecte par respirométrie individuelle et de l'utilisation des substrats énergétiques, (b) l'analyse de la composition corporelle globale par analyse proximale classique et par spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) et (c) l'expression différentielle de gènes identifiés *via* du séquençage de transcriptome (RNA seq) sur des échantillons de foie, organe métabolique par excellence chez le bar.

Le matériel biologique utilisé est composé de 100 juvéniles de bar issus de 4 lignées sélectionnées pour leur divergence de croissance (1 pression de sélection ; 27 poissons C+ et 22 poissons C-) ou de résistance au jeûne (1,5 pression de sélection ; 26 J+ et 25 J-). Ces poissons marqués individuellement avec des PIT-Tag, ont été phénotypés pour leur EAi au poids de 30-50g en 2015, selon la méthode décrite dans CRECHE²⁰¹⁵ (chaque individu placé en aquarium individuel et nourris à 50% d'une ration standard) : EAi moyen = $0,90 \pm 0,20$ vs $0,77 \pm 0,42$ (C+ vs C-) et $0,68 \pm 0,29$ vs $0,80 \pm 0,23$ (J+ vs J-). Ces résultats laissent supposer que la sélection effectuée sur les caractères « croissance » ou « résistance au jeûne » a pu avoir un impact sur l'efficacité alimentaire individuelle mesurée dans ces conditions particulières. Les trois approches utilisées ici pour comprendre les stratégies énergétiques sous-jacentes à l'expression de cette efficacité seront donc étudiées en lien avec les effets supposés des lignées.

2.1. Approche métabolique : mesure du taux métabolique aérobie estimé de façon indirecte par respirométrie individuelle et de l'utilisation des substrats énergétiques

L'objectif ici, est de mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui sont à la base de la variation interindividuelle de l'efficacité alimentaire chez le bar et en particulier, le rôle du métabolisme énergétique. En production animale terrestre, ce phénomène est clairement établi chez le poulet et la vache laitière où le taux métabolique (« coûts de la vie ») et l'efficacité alimentaire sont fortement corrélés (Morrison & Leeson, 1978 ; Luiting et al., 1991 ; Nkrumah et al., 2007) : les individus les moins efficaces ont tendance avoir des taux métaboliques relativement plus élevés ce qui indiquerait qu'ils « gâchent » relativement plus leur énergie ingérée. Cependant, à ce jour, il n'existe aucune donnée chez les poissons.

L'étude, réalisée par le partenaire CNRS-UMR MARBEC, se concentre sur trois traits métaboliques majeurs :

- Le taux métabolique de base, appelé dans la littérature « standard metabolic rate » (SMR) chez les ectothermes, qui mesure des coûts minimaux nécessaires simplement pour se maintenir en vie (Fry, 1971 ; Chabot et al., 2016a,b).
- Le taux métabolique de routine, nommé « routine metabolic rate' » (RMR) qui est le taux métabolique moyen qui caractérise un animal relativement libre de ses mouvements et qui contient donc, les coûts liés à son comportement spontané (Killen et al., 2011).
- L'excrétion d'ammoniaque qui est une mesure directe de l'utilisation de protéines comme source d'énergie pour le métabolisme (Jobling, 1982). Le ratio entre la consommation d'oxygène et l'excrétion d'ammoniaque montre la proportion du métabolisme qui est supporté par le catabolisme des protéines en tant que carburant dans les mitochondries (McKenzie et al., 2014).

Les deux premiers traits énergétiques permettront d'évaluer si les différences d'efficacité alimentaire sont dues à des différences des coûts de la vie qu'ils soient les coûts de base pour « maintenir la machine » (SMR), ou les coûts qui sont liés à des différences comportementales entre individus (RMR), par exemple selon leur tempérament. Le troisième trait peut donner un aperçu de la façon dont les individus utilisent les protéines et les lipides dans leur nourriture (McKenzie et al., 2014) avec clairement, des possibles liens avec leur efficacité alimentaire (Hegarty et al., 2007).

Les taux métaboliques ont été mesurés par le biais des mesures de consommation d'oxygène des individus sur une période de 48 h (Chabot et al., 2016a,b) dans une infrastructure (décrite ci-après) mise au point spécifiquement pour cette étude et selon une méthode de 'intermittent stopped-flow respirometry' (Steffensen, 1989) qui est utilisé couramment par notre groupe (*e.g.* Dupont-Prinet et al., 2010 ; McKenzie et al., 2014). Les chambres métaboliques sont conçues pour pouvoir mesurer l'excrétion des déchets azotés, de façon ponctuelle en simultanée avec les mesures de consommation d'oxygène (McKenzie et al., 2014).

2.1.1. Matériel et méthodes

Création de l'infrastructure « Respirométrie Haut Débit » (RHD)

L'objectif était de construire un dispositif permettant d'évaluer rapidement et précisément, la consommation individuelle d'oxygène de plusieurs poissons en même temps pendant 48 h en absence de nourrissage et de pouvoir mesurer ponctuellement leur excrétion ammoniacquée individuelle. Un système automatisé de 17 chambres métaboliques équipées de 17 respiromètres individuels montés selon la méthode « intermittent stopped-flow » automatisée ;

McKenzie et al., 2007 ; 2012), a donc été conçu. Les contraintes techniques que nous nous sommes imposées ont été les suivantes :

1. La dynamique de circulation de l'eau dans les enceintes de mesure doit être la moins variable possible pour limiter les différences de comportement de nage (rhéotaxie positive chez le bar).
2. Les excréctions ammoniacuées des poissons doivent pouvoir être concentrées dans chaque enceinte.
3. La température de toutes les enceintes doit être similaire.
4. Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau reçue par chaque enceinte doivent répondre aux besoins physiologiques de base des poissons et être les plus similaires possibles entre les enceintes.
5. La structure doit être modulable et déplaçable pour optimiser son utilisation et l'adapter en fonction de la taille des poissons et des espèces étudiés à l'avenir.

Les choix que nous avons effectués pour répondre à chacune de ces contraintes ont été les suivants :

Point 1. Les chambres de respirométries individuelles sont construites en utilisant des boîtes de type « Tupper-ware » (HPP250S 3,4 L 297x118 mm). Celles-ci sont équipées de 2 pompes d'aquariophilie Eheim (EH1000220 Pompe compact 300 et EH1005225 Pompe universelle) dimensionnées pour assurer le brassage de l'eau dans l'enceinte du respiromètre et pour effectuer un rapide renouvellement de l'eau après la phase de mesure. Une cheminée de mesure placée sur le capot des boîtes permet d'évacuer l'eau de l'enceinte lors des renouvellements et de positionner la sonde de mesure de l'oxygène (Fig.1A).

Point 2. Les enceintes sont placées individuellement dans les bacs légèrement plus grands afin de permettre de concentrer individuellement les excréctions ammoniacuées de chaque poisson. Pendant cette phase, le renouvellement de l'eau est arrêté (Fig. 1B).

Point 3. Pour assurer l'homogénéité des températures entre les enceintes, celles-ci baignent dans un grand bassin où les eaux de différentes enceintes sont mélangées (Fig. 1B).

Point 4. L'eau d'alimentation du système est prélevée dans un grand bac thermo-régulé et oxygéné. Toutes les enceintes sont alimentées individuellement. Le système fonctionne en circuit ouvert (Fig. 1B).

Point 5. L'ensemble de ce dispositif expérimental est constitué de 3 bacs d'homogénéisation de la température. Ceux-ci sont installés sur une structure verticale réalisée en profilé polyester (Fig. 2). Il permettra, à l'avenir, d'accueillir 36 enceintes de respirométries dont le volume et la forme pourront être adaptés en fonction de la taille et de l'espèce de poisson étudié. La structure est par ailleurs légère et entièrement déplaçable pour optimiser son utilisation.

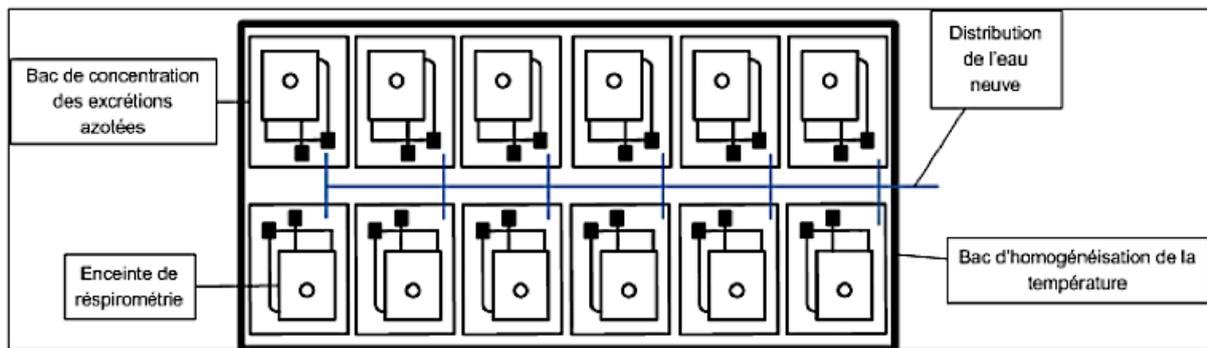
A**B**

Figure 1. Détail d'une chambre métabolique et schéma général du dispositif et de la circulation de l'eau.

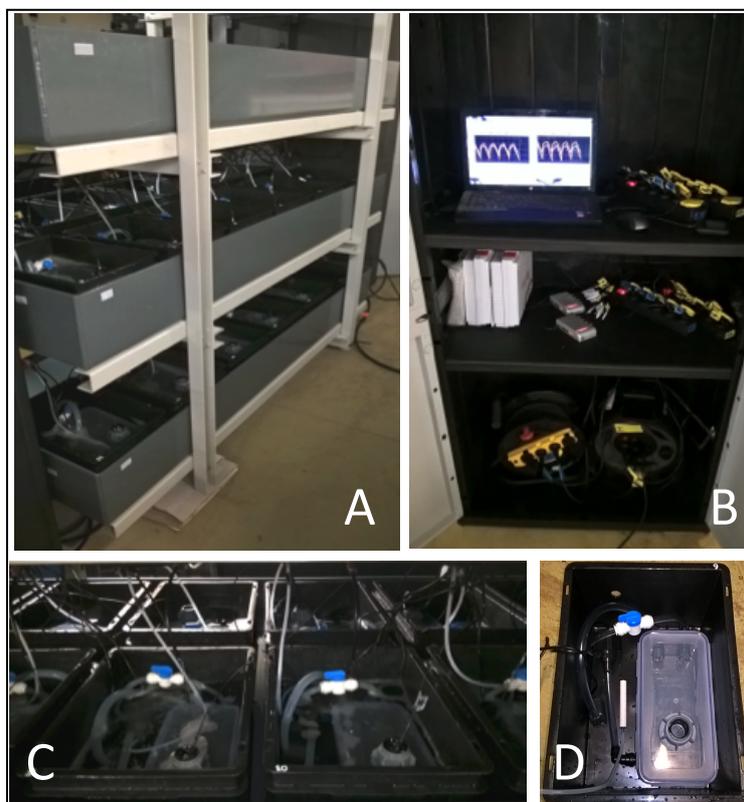


Figure 2. Détails du dispositif expérimental. A. Les 17 enceintes de mesure métabolique disposées sur 3 racks superposés ; B. Le matériel informatique enregistrant les données transmises par les sondes d'oxygène immergées dans chaque enceinte de mesure ; C. Détail de 8 enceintes de mesure immergées ; D. Détail d'une enceinte de mesure avant immersion

Mesures métaboliques

Elles ont été réalisées sur les poissons à 104 ± 34 g (masse moyenne \pm écart type) selon le protocole suivant :

- Un lot de 17 individus pris au hasard dans le bassin d'élevage (1.5 m^3), est placé dans un bassin à part pour subir 48 h de jeûne avant la mesure de respirométrie.
- Le jour du transfert vers le RHD, ils sont anesthésiés (200 ppm de Benzocaïne), pêchés avec une épuisette, identifiés individuellement par lecture de leur marque électronique, pesé sur une balance de précision (10^{-2} g), puis répartis dans les 17 chambres métaboliques individuelles (temps de manipulation < 2 min/poisson).
- Après les 48 h de mesure, les poissons sont à nouveau anesthésiés (200 ppm de Benzocaïne), pêchés avec une épuisette et remis en groupe dans leur bassin d'élevage.

Cette opération est réalisée tous les 3 jours sur un nouveau lot de 17 poissons (limite due au nombre de chambres métaboliques du RHD).

Les 17 chambres métaboliques sont conçues pour permettre liberté de mouvement à l'animal, mais dans un volume d'eau relativement limité (Svendsen et al., 2016 ; Figure 2D). Pour éviter le stress des animaux, ils sont transférés dans les chambres sans exposition à l'air (McKenzie et al., 2014) et toujours entre 15h00 et 16h00. Les chambres sont protégées de toute nuisance sonore et visuelle, par des bâches en plastique noir semi-opaque dans une pièce à part, calme, sombre et thermostatée à la température de l'eau ($21 \text{ }^\circ\text{C}$). L'objectif est de minimiser toute possibilité de perturbation ou de stress pour obtenir des mesures fiables de taux métabolique (Chabot et al., 2016b). Ces mesures fiables de la SMR requièrent par ailleurs, des mesures automatisées sur 48 h dans la chambre métabolique (Chabot et al., 2016b). Les poissons restent à jeun pendant les mesures (Chabot et al., 2016b).

Le système « intermittent stopped-flow » alterne deux « phases » dans un cycle qui se répète toutes les 30 minutes. Dans la phase « arrêtée » (durée = 20 min), la chambre ne reçoit pas d'eau et le poisson consomme l'oxygène qui est mesuré par une sonde d'oxygène optique (Firesting) et enregistré sur un ordinateur (McKenzie et al., 2014). Dans la seconde phase « circulation », un relai électronique met en marche une pompe qui crée un flux d'eau, propre et bien aérée dans la chambre et qui renouvelle l'oxygène et enlève les déchets (durée = 10 min). Chaque chambre est placée dans un bassin qui reçoit un flux d'eau propre, avec forte aération. Dix huit heures après l'introduction des poissons dans les respiromètres (donc entre 09h00 et 10h00 de la journée suivante), l'arrivée d'eau des enceintes peut être fermée pour mesurer l'accumulation d'ammoniaque due à l'excrétion des poissons pendant une période de 6 h (McKenzie et al., 2007 ; 2014). Des échantillons d'eau sont réalisés pour l'analyse d'ammoniaque (méthode spectrophométrique) sans perturber le poisson, grâce à un tuyau placé à demeure dans le bac (McKenzie et al., 2014). Suite aux mesures d'excrétion d'ammoniaque, l'eau des enceintes est renouvelée pour enlever l'ammoniaque.

Les taux de consommation d'oxygène et d'excrétion d'ammoniaque sont calculés comme décrit dans McKenzie et al. (2007 et 2014) en considérant les volumes d'eau, les solubilités des gaz et la masse de l'individu. Ils sont corrigés par la masse corporelle de l'individu et exprimés en $\text{mmol h}^{-1} \text{ individu}^{-1}$. Le RMR est calculé comme la moyenne des mesures de consommation d'oxygène pour les dernières 40 h de mesure pour éviter de possibles effets du stress de manipulation notamment au transfert. Le SMR est calculé pour chaque individu, comme le 15^e percentile des 80 mesures (1 par 30 min) prises pendant les 40 h (Chabot et al., 2016b). Le quotient ammoniacal (AQ) est calculé comme décrit également dans McKenzie et al., 2007 et 2014, par le ratio du taux d'excrétion d'ammoniaque et du taux de consommation d'oxygène quand mesurés simultanément pendant le période de 6 h.

Les possibles corrélations entre l'efficacité alimentaire et les différentes variables physiologiques ont été explorées par simples tests de Pearson et jugées significatives quand $P < 0,05$.

2.1.2. Résultats et discussion

Un jeu de données métaboliques complet a été collecté pour 96 des 100 individus.

Consommation d'oxygène

La figure 3 montre leur consommation moyenne d'oxygène pendant les 48 h de mesure et les périodes utilisées pour calculer le SMR, le RMR, l'excrétion d'ammoniaque et l'AQ. Elle indique que le taux métabolique est élevé pendant plus ou moins 7 h après placement des poissons dans les respiromètres. Ensuite, le RMR est plutôt stable pendant 40 h et pendant la période de mesure de l'excrétion d'ammoniaque.

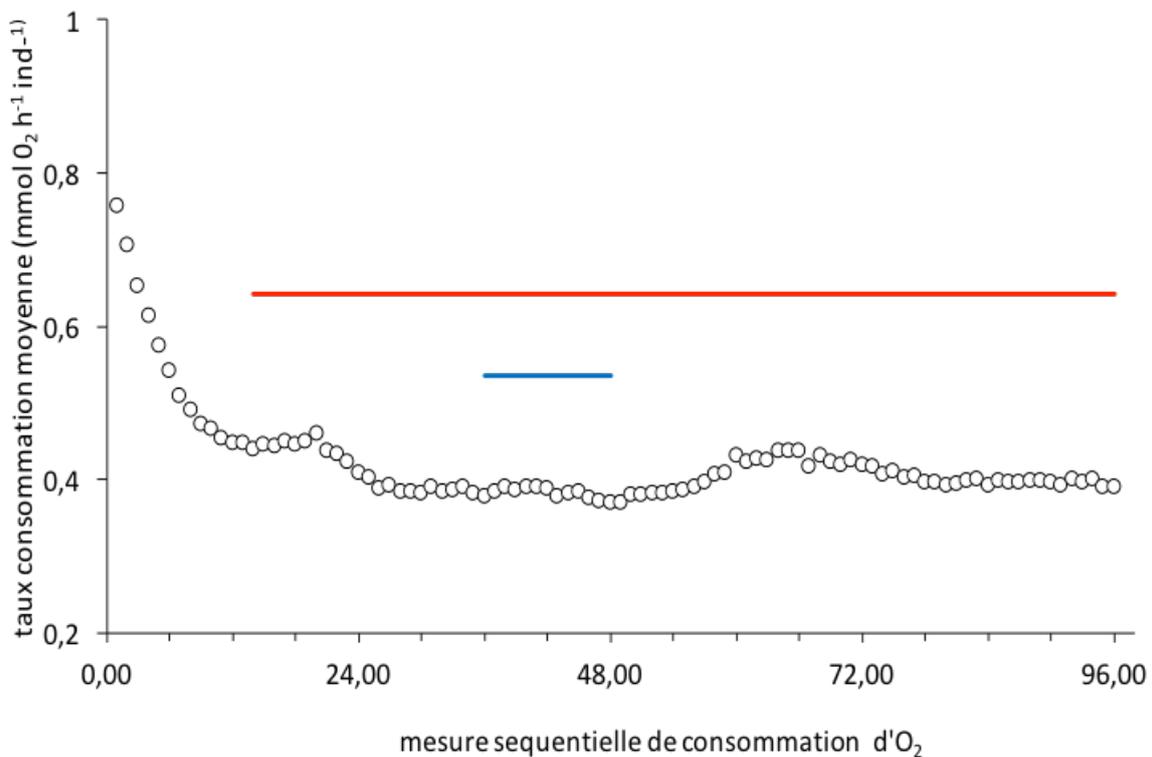


Figure 3. Moyenne de la consommation d'oxygène de 96 bars pendant 48 h après placement dans un respiromètre. Les mesures sont corrigées pour la masse et exprimées en $\text{mmol kg}^{-1} \text{individu}^{-1}$, pour une masse corporelle moyenne de 106 g (McKenzie et al., 2014). La ligne rouge indique la période utilisée pour mesurer les taux métaboliques standards et de routine ; la ligne bleue indique la période pendant laquelle l'excrétion d'ammoniaque a été mesurée.

Dans les analyses qui suivent seuls les individus qui avaient accepté de manger en aquarium individuel et n'avaient pas perdu de poids ($n=70$) ont été utilisés.

Taux métaboliques

Les données de RMR révèlent que l'efficacité alimentaire individuelle (EAI) et le RMR sont liés ($R^2=0,14$; Fig. 4A), mais que sous-jacent à ce phénomène, le RMR est aussi corrélé ($R^2=0,14$; Fig. 4B) à la masse des individus ; le phénomène est classique, les plus gros poissons ont un métabolisme de routine moins élevé. Lorsque l'on corrige le RMR par la masse des individus, pour obtenir les résidus du RMR, il n'y a plus de corrélations avec l'EAI ($R^2=0,02$; Fig. 4C). Le SMR et le RMR étaient très fortement corrélés entre les individus ($R = 0,89$), les mêmes patrons de résultats ont été obtenus pour les liens existants entre le SMR et l'EAI. Ces résultats sont inattendus si l'on s'en réfère aux connaissances sur les animaux terrestres où cette corrélation existe (Morrison & Leeson, 1978 ; Luiting et al., 1991 ; Nkrumah et al., 2007). Ils pourraient être dus au fait que les animaux ectothermes, tels que les poissons, ont des taux métaboliques beaucoup plus faibles que les endothermes comme les mammifères ou les volailles.

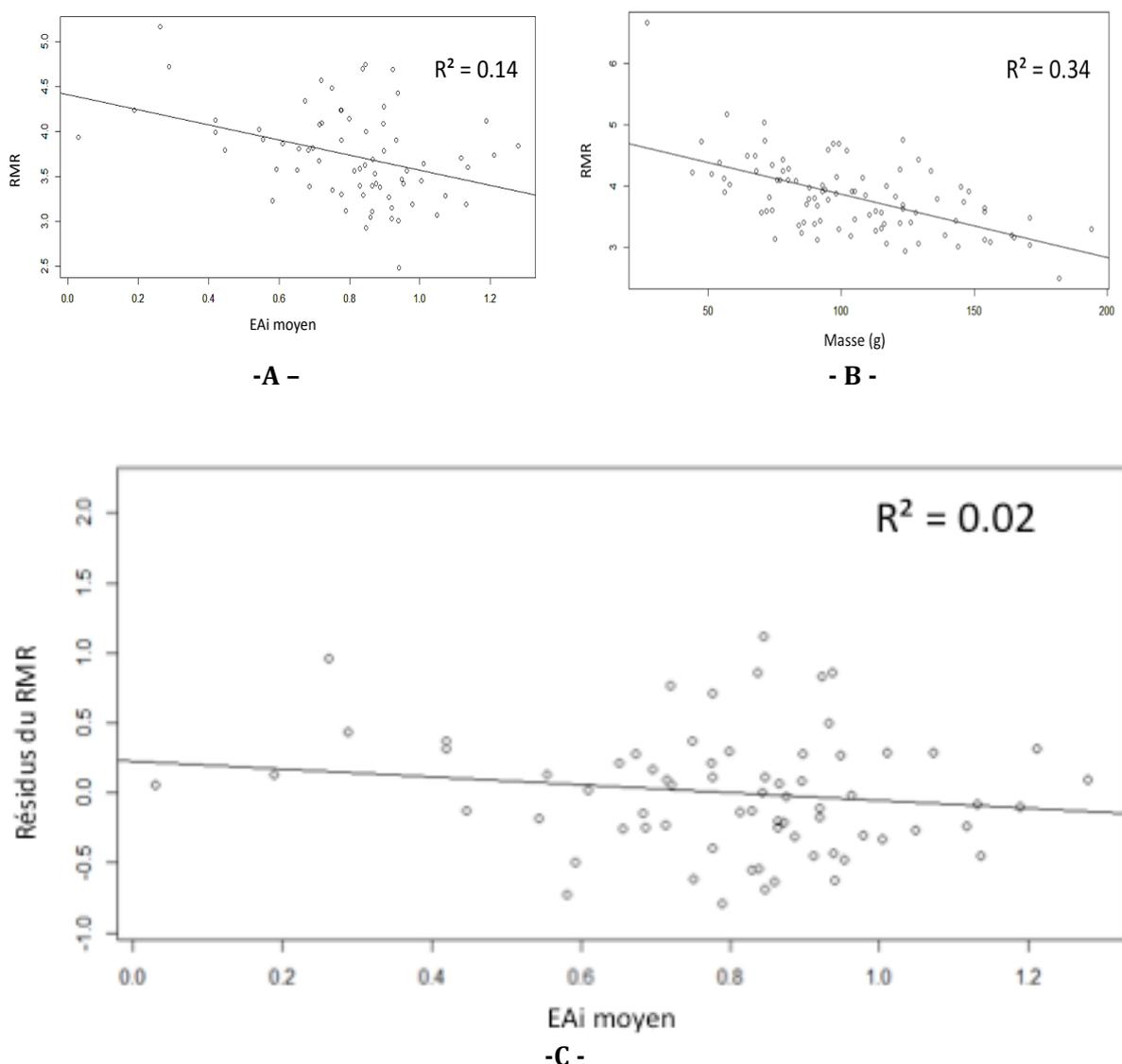


Figure 4. Relations, chez 70 juvéniles de bars, entre : (A) le taux métabolique (RMR) et l'efficacité alimentaire (EAI) ; (B) entre le taux métabolique (RMR) et la masse des poissons ; (C) entre les résidus du taux métabolique (résidus RMR) et l'efficacité alimentaire (EAI). Les mesures de RMR sont exprimés en $\text{mmol kg}^{-1}\text{h}^{-1}$. Les résidus sont en $\text{mmol kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ pour une masse corporelle moyenne de 106g (McKenzie et al., 2014).

Cependant, quand le RMR est corrigé pour l'effet de la masse et reporté à la masse moyenne des poissons en début d'expérience, 106g (McKenzie et al., 2014), on peut distinguer une différence de RMR entre lignées (Fig. 5 ; $F=3,69$; $ddl=3 \text{ \& } 88$; $p=0,014$) : les C+ ont un RMR plus bas ($3,75 \pm 0,32$) que les J+ ($4,00 \pm 0,40$) et les C- ($3,91 \pm 0,34$) et les J- ($3,97 \pm 0,47$), un RMR intermédiaire et équivalent. Ces résultats montrent deux choses intéressantes : (1) les individus qui grandissent vite (C+) ont en moyenne, des « coûts de la vie » mineurs et seraient donc moins « énergivores », (2) le « coût de la vie » relativement élevé des individus J+, pourrait expliquer pourquoi ils perdent plus de masse lors d'un jeûne que leurs congénères sélectionnés pour des pertes moindres (J-). De plus, comme l'efficacité alimentaire moyenne des C+ ($0,90 \pm 0,20$) est plus élevée que celle des J+ ($0,68 \pm 0,29$), ces résultats montreraient que le taux métabolique aurait bien un lien avec l'efficacité alimentaire chez les poissons. Le même patron de différences entre lignées a été noté pour le SMR montrant qu'elles sont davantage intrinsèques aux individus que liés à des niveaux différents d'activité spontanée.

Enfin, les RMR sont identiques pour les mâles (65%) et les femelles (35%) constituant les différents groupes ($F=0,0013$; $ddl=1 \text{ \& } 90$; $p=0,9716$).

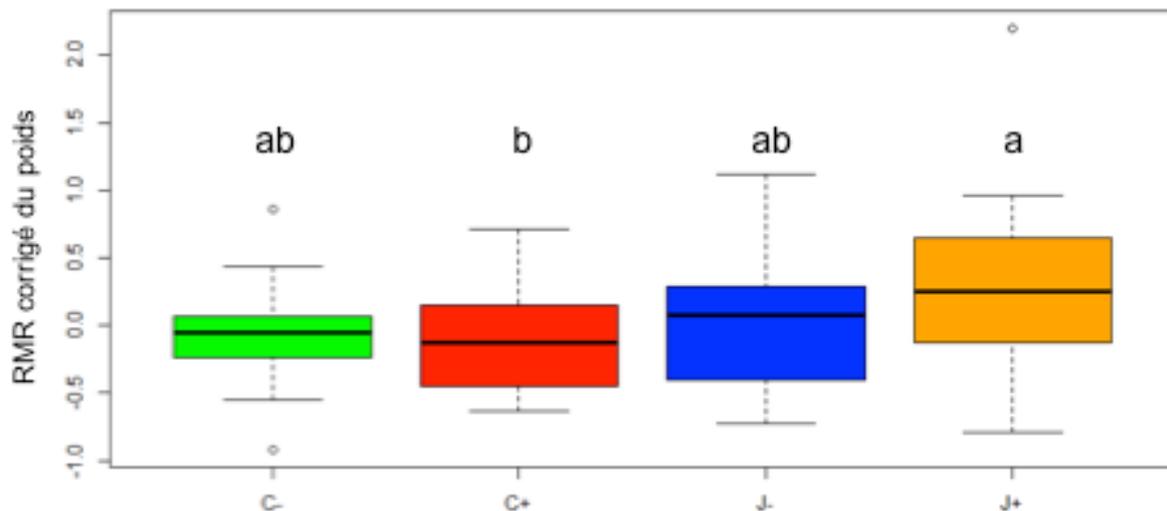


Figure 5. Taux métabolique (RMR) de 70 bars issus de 4 lignées sélectionnées pour leur forte (C+) ou faible (C-) croissance ou leur forte (J-) ou faible (J+) résistance (perte de poids) au jeûne. Les mesures de taux métabolique sont corrigées pour la masse et exprimées en $\text{mmol kg}^{-1} \text{ individu}^{-1}$ pour une masse corporelle moyenne de 106g (McKenzie et al., 2014).

Excrétion d'ammoniaque

La figure 6 montre qu'il n'existe pas, dans cette étude, de relation significative entre l'efficacité alimentaire et le quotient ammoniacal (AQ) alors qu'il est connu que le taux d'excrétion d'ammoniac et l'AQ diminuent pendant les premières phases de jeûne chez les poissons (Brett & Zala, 1975 ; McKenzie et al., 2007 et 2014) par le biais d'un effet « d'épargne protéine » où l'animal évite de brûler les protéines et utilise préférentiellement les lipides (McCue, 2006). Le fait que nous n'observions pas ce phénomène pourrait être dû au biais créé par une mesure seulement ponctuelle du taux d'excrétion d'ammoniac (après 40 h de jeûne, *i.e.*, 24 h avant le placement dans les respiromètres et 18 h dans les respiromètres). Malheureusement, à ce jour, il n'est possible de mesurer l'excrétion d'ammoniac des poissons de façon continue, comme on le fait pour la consommation d'oxygène.

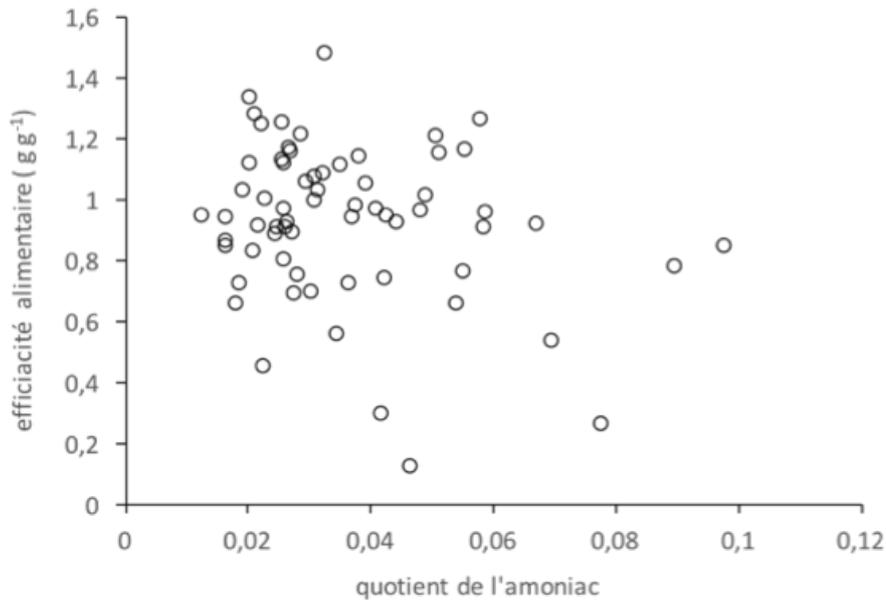


Figure 6. Relation entre le quotient d'ammoniac et l'efficacité alimentaire individuelle (EAI) de 70 bars. Les mesures de quotient d'ammoniac sont sans unité de mesure, parce qu'ils sont le ratio entre excrétion d'ammoniac et consommation d'oxygène (McKenzie et al., 2014). Il n'y a pas de relation significative ($P > 0,05$ corrélation de Pearson).

2.1.3. Conclusions sur la performance métabolique

L'ensemble des résultats de cette expérience montre que :

- Il est possible de mesurer, de façon fiable, le métabolisme énergétique d'un grand nombre de poissons simultanément avec la nouvelle technologie des sondes optodes.
- A niveau individuel, il n'a pas été possible de démontrer si l'efficacité alimentaire des bars dépendait de leurs coûts de vie, que ce soient les coûts de base pour « maintenir la machine » (SMR) ou les coûts qui sont liées à des différences comportementales entre les individus (RMR).
- A niveau des lignées, par contre, la lignée à croissance et EAI élevés (C+) a des taux moyens métaboliques plus faibles que la lignée caractérisée par une perte de masse importante pendant le jeûne et une EAI faible (J+).
- L'efficacité alimentaire des individus ne dépend pas de la proportion du métabolisme qui est supportée par le catabolisme des protéines.
- Les mâles et les femelles ont le même métabolisme de base.

2.2. Approche biochimique : analyse de la composition corporelle globale par analyse proximale classique et par spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR)

L'objectif général de cette approche est d'une part, d'évaluer les différences de composition proximale des poissons évalués pour leur efficacité alimentaire individuelle et d'autre part, évaluer la capacité d'un nouvel outil, la spectroscopie proche infra-rouge (SPIR) pour la prédiction de ces valeurs biochimique coûteuses sur un plan budgétaire (15 euros environ par échantillon) et chronophages (1 à 2 semaines avant délivrance des résultats). La

spectroscopique proche infra-rouge utilise les propriétés vibratoires des molécules pour évaluer des différences d'absorbance liée à la composition du tissu analysé.

Une analyse proximale globale a donc été réalisée par le laboratoire d'analyses agro-alimentaires LDM d'Alès et une analyse par SPIR par Ifremer. Les deux types de données doivent permettre de corréliser les compositions corporelles au taux métabolique et à l'efficacité alimentaire. Le SPIR devrait permettre de développer des équations de prédiction de la composition corporelle des poissons pour éviter, à l'avenir, les analyses proximales coûteuses.

2.2.1. Matériel et méthodes

Analyse des données de composition chimique des poissons

Les mêmes juvéniles de bar évalués pour leur efficacité alimentaire et mesurés pour leur métabolisme énergétique (§2.1), ont été sacrifiés (n=97). Lors de cet abattage, une biométrie a permis de recueillir le poids individuel des poissons et le poids de leurs viscères. Les poissons ont ensuite été envoyés congelés pour une analyse proximale globale et les résultats ont fait l'objet de corrélations, d'analyses de variances et de comparaisons multiples pour déterminer les relations entre les constituants détectés/mesurés et les autres paramètres évalués lors de cette étude (croissance, rapport viscéro-somatique, efficacité alimentaire, métabolisme énergétique), et pour évaluer les différences entre lignées et genre. Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel R (packages : 'GGally' ; 'aov' ; 'TukeyHSD' et 'HSD.test').

Acquisition des spectres proche infrarouge

Les broyats de poissons utilisés pour l'analyse proximale ont ensuite été analysés en spectroscopie proche infra-rouge. Pour ce faire, un monochromator NIRS 6500 (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD) a été utilisé pour balayer la réflectance de 400 à 2500 à des intervalles de 1 nm, en utilisant des coupelles en quartz (50 mm de diamètre) avec environ 6 g de broyat de poisson. Les données collectées *via* le logiciel IndicoPro (version 6), ont été sauvegardées comme la moyenne de 32 balayages et stockées comme coefficient d'absorbance = $\log(1/R)$, où R était la réflectance à chaque longueur d'onde et 1 la réflectance d'une référence céramique standard. Les spectres ont été acquis de façon aléatoire, chaque échantillon étant mesuré 10 fois et le spectre moyen a été stocké. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel WIN-ISI II (Infrasoft International, Port Matilda, PA), JUMP 7.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC), le logiciel et XLstat (Addinsoft, Paris, France).

Prétraitement des spectres

Les spectres ont été corrigés mathématiquement pour la diffraction de la lumière en utilisant la loi normale standard de la variable et la correction par détrérence (Barnes et al., 1989 ; Barnes et al., 1993). La dérivée seconde a été calculée sur 5 points de données et lissée en utilisant le lissage polynomial de Savitzky et Golay sur cinq points de données (Savitzky et Golay, 1964).

Analyse en composante principale

Avant le développement des modèles de calibration, une analyse des composantes principales (PCA) a été utilisée pour extraire des informations pertinentes de la matrice spectrale (n = 970). La distance généralisée de Mahalanobis (H) a été calculée sur les composantes principales extraites pour chaque échantillon. Cette distance statistique est utile pour définir les limites de la population et un indice de similarité entre les spectres (Shenk et al., 1996). Les spectres montrant des distances de Mahalanobis >3 sont rejetés de l'analyse.

Développement d'une calibration SPIR

A partir des échantillons restants suite à l'ACP, des équations de calibration des compositions corporelles ont été construites en utilisant l'algorithme de régression par moindres carrés partiels modifiés (MPLS) (Wold, 1973) du logiciel WinISI (Shenk et Westerhaus, 1991). Pour évaluer la qualité des modèles de calibration, plusieurs critères statistiques ont été collectés. Le coefficient de détermination RSQ, l'erreur standard de prédiction SEP (Standard Error of

prediction), le biais et le SEP corrigé du biais SEP(C). Le biais correspond à la moyenne des écarts entre la méthode de référence et la SPIR, il s'agit de l'erreur systématique entre les deux méthodes. Le SEP(C) est l'écart-type des écarts entre la mesure de référence et la mesure SPIR.

Les statistiques de calibration comprennent les paramètres suivants : le coefficient de détermination (R^2_c), l'erreur-type de calibration (SEC) et l'erreur-type de validation croisée (SECV). La validation croisée a été utilisée lors du développement des modèles de calibration afin de sélectionner le nombre optimal de variables latentes et de minimiser la sur-adaptation des équations (Wold, 1978). En plus du R^2_c , le « ratio performance to deviation » ($RPD_c = SD/SECV$) a été utilisé pour évaluer la qualité générale de l'ajustement obtenu pour chaque équation. Contrairement au SEC et au SECV, le RPD est indépendant des unités de paramètres et peut donc être comparée entre les paramètres (Sinnaeve et al., 1994). Un test Student (t) a été utilisé pour identifier des échantillons t -outlier pendant le développement de l'étalonnage. La détection des valeurs aberrantes était basée sur les résidus standardisés (= erreur/SECV) avec un seuil de 2,5. Deux passages d'élimination des valeurs aberrantes ont été utilisés (Burns et Ciurczak, 1992). L'erreur standard de prédiction (SEP), correspondant à l'écart-type des résidus, a été estimée en prédisant l'ensemble de validation à l'aide des modèles de calibration. Le rapport rendement/écart de prédiction (RPD_p) a également été calculé comme $RPD_p = SD_{val}/SEP$ (où SD_{val} était l'écart-type des échantillons de validation). La qualité de l'ajustement entre les valeurs de chimie humide (humidité, cendres, protéines, lipides et glucides) et NIRS a été évaluée à partir de la pente de régression linéaire, du R^2 et du biais.

La précision de prédiction des modèles a été évaluée par le RPD_p : des valeurs inférieures à 1,4 correspondaient à une calibration étalonnage inutilisable, des valeurs de RPD_p comprises entre 1,4 et 1,7 correspondent à un étalonnage utilisable pour du criblage brut et des valeurs supérieures à 4 indiquent que l'étalonnage peut être utilisé pour des analyses de contrôle de qualité (Kovalenko et al., 2006).

2.2.2. Résultats et discussion

Analyse des données de composition chimique des poissons

Le tableau 1 et la figure 6 synthétisent les résultats les plus représentatifs des analyses statistiques effectuées.

Tableau 1. Statistiques descriptives, résultats d'analyse de variance, des compositions corporelles, du poids individuel à l'abattage, du poids de viscères et des variables d'efficacité alimentaire individuelle (EAI) en fonction des lignées (C-, C+, J-, J+) et du sexe (femelle, mâle). CV = coefficient de variation.

	Humidité % (CV) Tukey's group	Cendres % (CV) Tukey's group	Protéines % (CV) Tukey's group	Lipides % (CV) Tukey's group	Glucides % (CV) Tukey's group	EAI moyenne Tukey's group	EAI max Tukey's group
C- (n=21)	61 (0,05) b	4,6 (0,13) ab	16,4 (0,04) a	16,7 (0,18) ab	1,15 (1,17) a	0,77 (0,42) ab	0,89 (0,34) a
C+ (n=26)	61 (0,04) ab	4,3 (0,17) a	16,4 (0,04) a	17,3 (0,15) ab	1,52 (0,73) a	0,9 (0,2) b	1,01 (0,23) a
J- (n=26)	59 (0,05) a	4,3 (0,13) ab	16,4 (0,04) a	18,6 (0,13) b	1,8 (1,06) a	0,8 (0,23) ab	0,91 (0,24) a
J+ (n=25)	62 (0,04) b	4,8 (0,19) b	16,6 (0,06) a	15,4 (0,16) a	1,5 (1,03) a	0,68 (0,29) a	0,81 (0,31) a
Femelle (n=35)	60 (0,05) a	4,5 (0,15) a	16,5 (0,04) a	17 (0,17) a	1,51 (1,13) a	0,81 (0,23) a	0,92 (0,27) a
Mâle (n=63)	61 (0,05) a	4,5 (0,17) a	16,4 (0,05) a	17 (0,16) a	1,51 (0,92) a	0,78 (0,32) a	0,9 (0,28) a
Pr > F	0,008	0,055	0,909	0,001	0,712	0,091	0,237

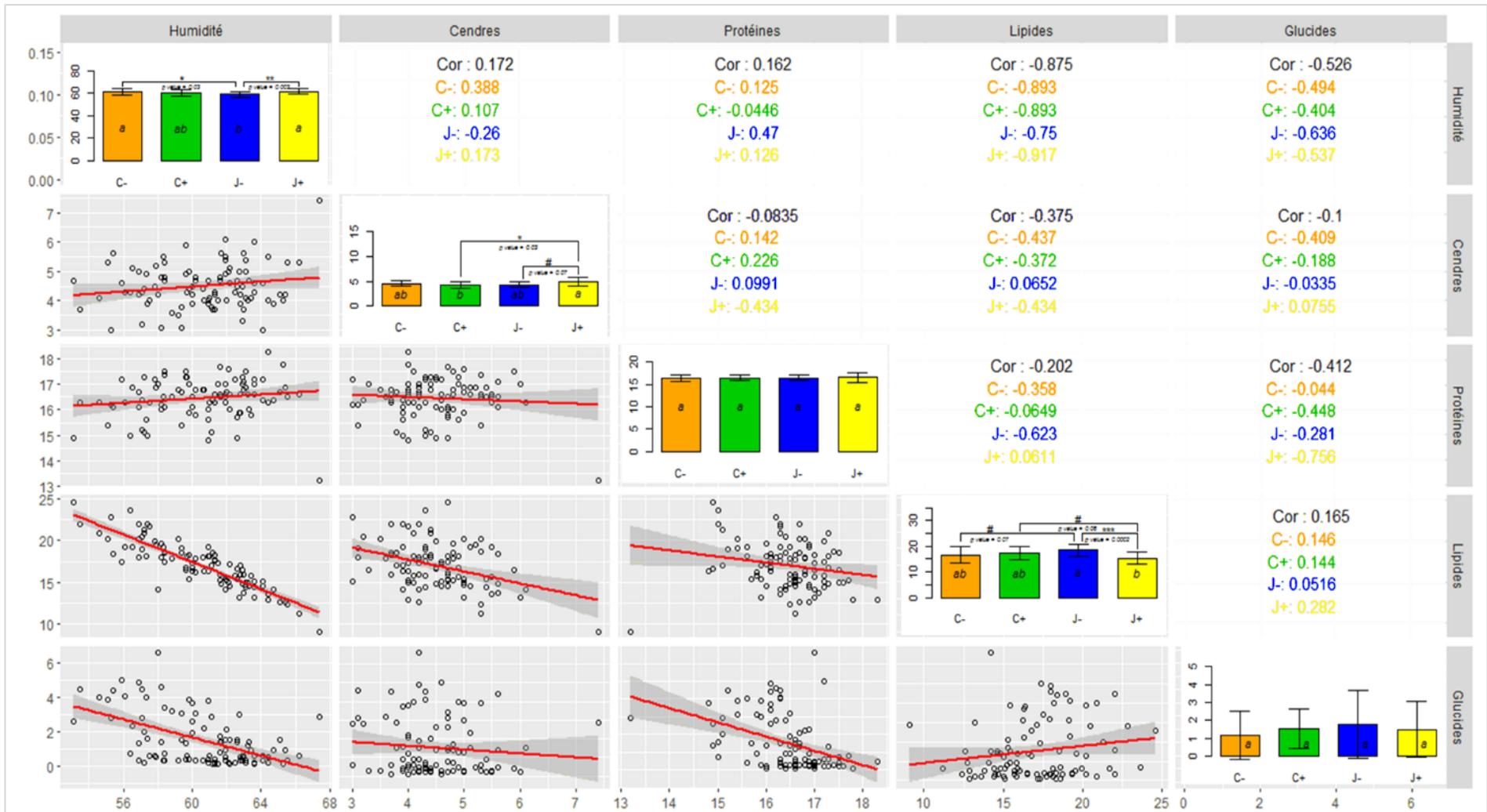


Figure 6. Au-dessus de la diagonale: corrélations entre les compositions corporelles, globales (en noir), pour la lignée C- (en orange), la lignée C+ (en vert), la lignée J- (en bleu) et la lignée J+ (en jaune). En dessous de la diagonale: nuage de points des compositions corporelles deux à deux; droite de régression (en rouge) avec son enveloppe de confiance ($p > 0.95$) en grisée. Sur la diagonale: barplot par lignée (C- en orange; C+ en vert; J- en bleu; J+ en jaune).

L'analyse de variance révèle que les lipides varient de façon très significative entre les lignées ($p = 0,001$, $F_{3,94} = 4,899$) ; elle est notamment très significative entre les lignées J+ vs J- ($p = 0,002$). On remarque aussi, une différence significative entre les lignées pour la teneur en eau ($p = 0,008$, $F_{3,94} = 3,669$) et en particulier entre les lignées J+ vs J- ($p = 0,003$) et J- vs C- ($p = 0,03$). Cette différenciation entre les lignées J+ et J- est cohérente avec l'attendu car il avait déjà été remarqué que le lignée tolérante au jeûne était plus grasse (CRECHE²⁰¹⁴, CRECHE²⁰¹⁵, Grima et al., 2010). Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les lignée C+ et C- contrairement à l'attendu (CRECHE²⁰¹⁴, CRECHE²⁰¹⁵).

On observe également, une corrélation négative globale et bien connue entre la teneur en eau et la teneur en lipide (-0,88). Cependant, cette corrélation est variable au niveau intra-lignée. Elle est très forte chez la lignée contre-sélectionnée pour la tolérance au jeûne J+ (-0,92) et plus mesurée chez la lignée sélectionnée pour la tolérance au jeûne J- (0,75). Elle est identique pour les deux autres lignées C+ et C- (0,89). Les corrélations entre les autres constituants sont faibles. Cette différence de corrélation entre J+ et J- pourrait résulter de l'effet de la sélection divergente pour la tolérance au jeûne.

Les corrélations avec les autres paramètres évalués (métabolisme, croissance) sont toutes très faibles (-0,2 - 0,3) excepté pour la corrélation entre le taux de glucides et le poids de viscère (0,45) et entre le taux de glucides et le rapport viscéro-somatique (0,46).

Dans l'étude, nous observons un sexe ratio biaisé vers le nombre de mâle (65%). Hormis pour les variables de poids (aux différentes biométries) où les femelles sont supérieures aux mâles, aucune différence significative entre les mâles et femelles n'est observée pour les compositions chimiques ou l'activité métabolique.

Enfin, les corrélations entre efficacité alimentaire individuelle et composition corporelle sont faibles, avec au mieux $RE_{Aimox}/Protéine = -0,31$ et $RE_{Aimoy}/humidité = 0,33$, et non significatives au sein de chaque lignée.

Description des données spectrales

Au final, 10 spectres par broyat de poissons ont été collectés, soit 970 spectres d'absorbance proche infrarouge au total sur les 97 échantillons de poissons (Fig. 7A et 7B). Les prétraitements mathématiques décrits ont été appliqués.

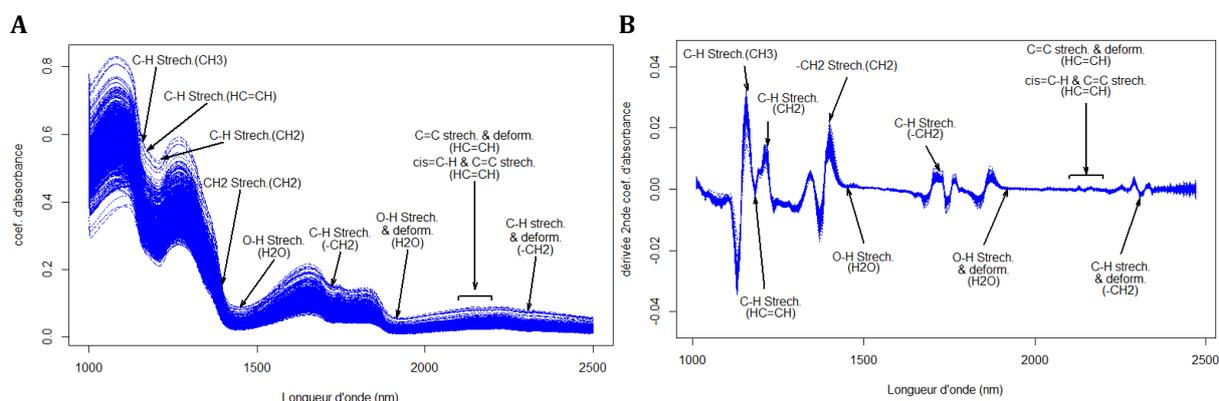


Figure 7. Spectres absorptions. A : coefficient d'absorbance en fonction de la longueur d'onde. B : dérivée 2^{de} du coefficient d'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Les flèches indiquent la (ou les) longueur(s) d'onde associée(s) à l'action vibratoire de l'excitation lumineuse sur les liaisons moléculaires principales.

Analyse en composante principale

Les trois premières composantes principales de l'ACP expliquent respectivement 28%, 11% et 10% de la variance spectrale. Cette ACP, présentée dans la figure 8, révèle la présence de 47 spectres en dehors de l'enveloppe de confiance à 95%. Cependant, il en résulte l'élimination de 2 poissons, la résultante de leur spectre présentant des distances de Mahalanobis supérieures à 3 : 1 individu de la lignée J+ (H = 4,5) et 1 individu de la lignée J- (H = 7,7). Cependant l'ACP ne révèle pas de différenciation significative entre les lignées.

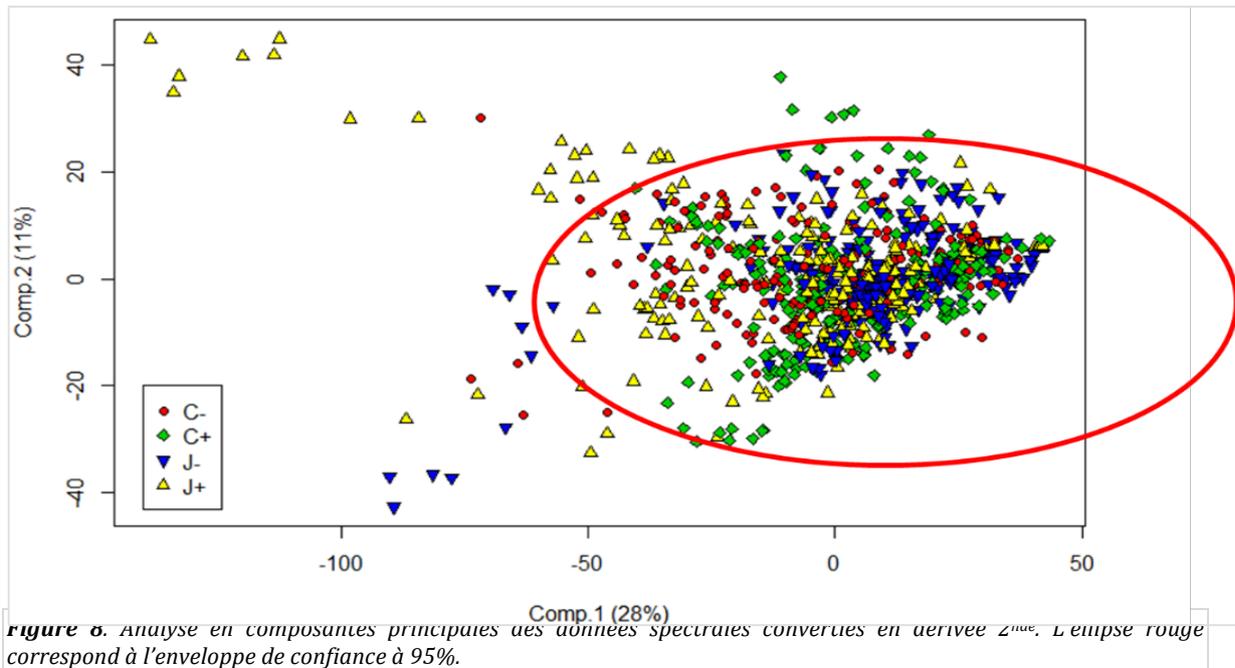


figure 8. Analyse en composantes principales des données spectrales converties en dérivée 2^{me}. L'ellipse rouge correspond à l'enveloppe de confiance à 95%.

Calibration de modèles de prédiction des compositions corporelles du bar

Au total, les spectres moyens des 95 individus, possédant au moins 6 mesures « non outliers », ont été obtenus et utilisés pour bâtir les modèles de calibrations.

- *Humidité*

Le modèle de calibration pour l'humidité relative des échantillons donne un R^2_C et un R^2_P de respectivement 0,85 et 0,81. Pour ce modèle, le RPD_P est de 2 (donc supérieur à 1,4, mais inférieur à 4) et une SEP de 1,97% avec une pente de régression de 0,95 entre les valeurs prédites par le laboratoire et NIR (Fig. 9A). Comparé aux étalonnages obtenus dans la littérature pour l'humidité (Cozzolino et al., 2005, Udine et al., 2006), ce modèle apparaît donc suffisamment efficace pour un contrôle brut.

- *Cendre*

Le modèle de calibration pour les cendres donne un R^2_C et un R^2_P de respectivement 0,13 et 0,09. Pour ce modèle, le RPD_P est de 1,03 (donc très inférieur à 1,4) et une SEP de 0,70%, avec une pente de régression de 0,61 entre les valeurs prédites par le laboratoire et NIR (Fig. 9B). Ce modèle est très mauvais et ne permet pas même d'envisager une utilisation pour du screening brut car les écarts observés entre les valeurs prédites et de laboratoire sont trop importantes.

- *Protéines*

Le modèle de calibration pour la teneur en protéines des échantillons donne un R^2_C et un R^2_P de respectivement 0,27 et 0,04. Ce qui est également très mauvais, avec de plus un RPD_P de 1,21 et une SEP de 0,67%, avec une pente de régression de 0,42 entre les valeurs prédites par le laboratoire et NIR (figure 4C). Comme pour la teneur en cendres, le modèle de prédictions par SPIR de la teneur en protéine est inutilisable. On note cependant que la calibration de la teneur en protéine est possible chez la truite avec un R^2_P de 0,86 (Rasco et al., 1991).

- *Lipides*

Le modèle de calibration pour la teneur en lipides des échantillons donne un R^2_c et un R^2_p de respectivement 0,81 et 0,85, ce qui est relativement satisfaisant. Pour ce modèle, le RPD_p est de 2,47 (donc satisfaisant également), une SEP de 1,54% et une pente de régression de 0,97 entre les valeurs prédites par le laboratoire et NIR (Fig. 9D). Ce modèle apparaît donc relativement bon pour prédire la teneur en lipides et pourrait être utilisé en screening brut pour des applications en génétique par exemple. Cependant, il est comparable au modèle développé chez le Hareng (Nielsen et al., 2005 : $R^2_p = 0,76 - 0,85$) et meilleur que certains modèles développés chez la truite (Rasco et al., 1991 : $R^2_p = 0,69$).

- *Glucides*

Le modèle de calibration pour la teneur en glucides donne un R^2_c et un R^2_p de respectivement 0,43 et 0,15. Comme pour les cendres et les protéines, le modèle de calibration est mauvais, avec un RPD_p de 1,07, une SEP de 1,26% et une pente de régression de 0,26 entre les valeurs prédites par le laboratoire et NIR (Fig. 9C). Le modèle résultant est donc inutilisable.

Tableau 2 Synthèse des paramètres des modèles de calibration pour la prédiction des compositions corporelles du bar. N_c = nombre d'échantillons dans le modèle de calibration ; SEC = erreur standard de calibration ; R^2_c = coefficient de détermination multiple de calibration ; SECV = erreur standard de cross-validation ; RPD_c = « ratio performance to deviation » de la calibration ; N_p = nombre d'échantillons de cross-validation ; SEP = erreur standard de prédiction ; R^2_p = coefficient de détermination multiple de prédiction ; RPD_p = « ratio performance to deviation » de la prédiction.

Constituent	Calibration					Prédiction			
	N_c	SEC	R^2_c	SECV	RPD_c	N_p	SEP	R^2_p	RPD_p
Humidité	79	1,03	0,85	1,97	1,52	97	1,97	0,81	2,00
Cendres	76	0,63	0,13	0,70	1,05	97	0,70	0,09	1,03
Protéines	68	0,38	0,27	0,67	1,15	97	0,67	0,04	1,21
Lipides	79	0,98	0,81	1,54	1,82	97	1,54	0,78	2,47
Glucides	65	0,73	0,43	1,26	1,19	97	1,26	0,15	1,07

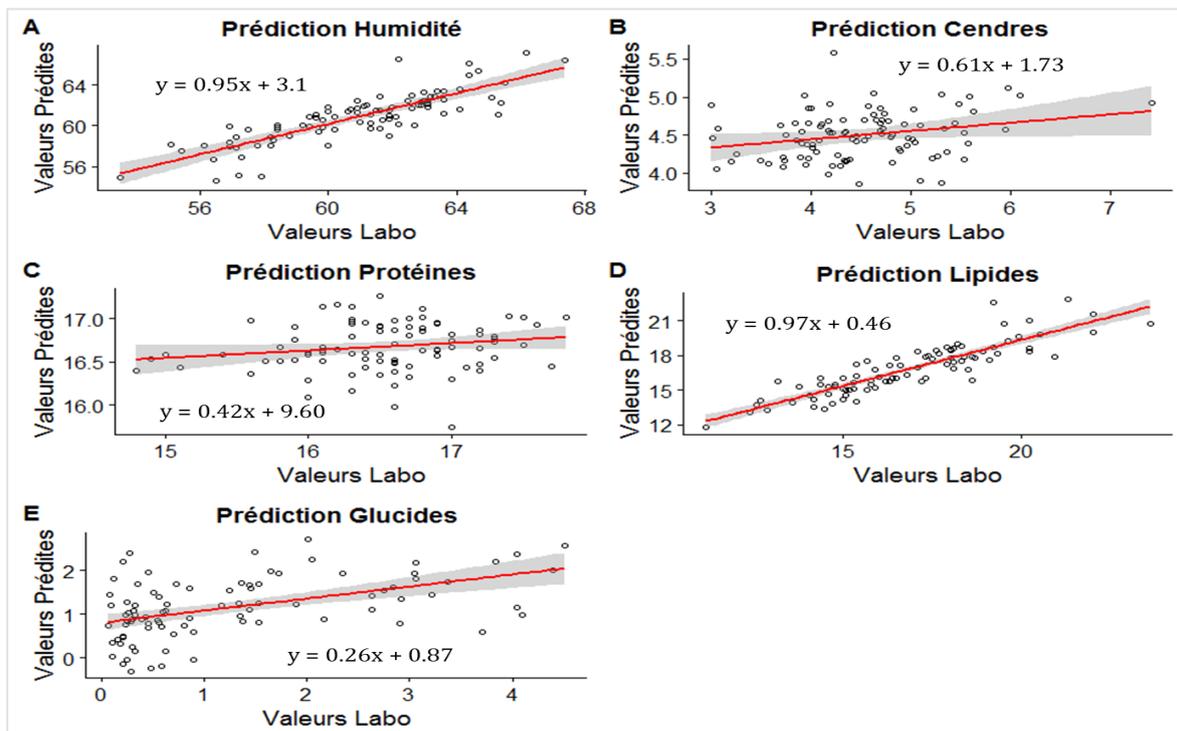


Figure 9. A-E. Régressions linéaires entre les valeurs mesurées en laboratoire et les valeurs prédites par les modèles PLS de prédictions à partir des données SPIR.

2.2.3. Conclusions sur la composition corporelle et l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge

L'efficacité alimentaire individuelle ne semble que très faiblement corrélée à la composition corporelle des poissons mesurées par analyse chimique ; au mieux une corrélation de -0,31 avec la teneur en protéines et de 0,33 avec la teneur en eau.

L'analyse chimique a cependant permis de révéler des différences entre les lignées divergentes J+ et J- pour la teneur en lipides et la teneur en eau, très corrélée avec cette dernière. Ce résultat correspond aux attentes, compte tenu des analyses précédentes utilisant des analyses par *Fatmeter* (Distell) qui montraient des différences significatives de taux de gras entre les deux lignées (CRECHE²⁰¹⁴, CRECHE²⁰¹⁵, Grima et al., 2010).

Le développement de modèle de prédiction par SPIR des analyses chimiques de compositions corporelles à partir des données CRECHE²⁰¹⁶ donne un résultat mitigé. Nous montrons en pratique la possibilité de développer des modèles utilisables en routine pour la teneur en eau et la teneur en lipides des échantillons, mais aucun modèle convenable n'a pu être établi pour la teneur en protéines, en glucides et en cendres. Une seconde limite à souligner, est que la mise en place d'un tel outil pour la teneur en lipides est concurrencée par la technologie existante par *Fatmeter* (Distell). Ce dernier permet une évaluation avec un R² de prédiction autour de 0,6 donc moins bon que celui que nous obtenons ici (0,78), mais avec une praticité d'utilisation largement supérieure à la procédure mise en place dans cette étude.

En perspective, l'utilisation du SPIR nécessite *a minima* un développement plus avant des procédures, avec peut-être des outils mieux adaptés au terrain et surtout avec des échantillonnages de calibration beaucoup plus conséquents que ceux mis en œuvre dans cette étude de faisabilité.

2.3. Approche transcriptomique haut-débit : expression différentielle de gènes identifiés *via* un séquençage de transcriptome (RNA-seq)

Une analyse transcriptomique haut-débit (RNA-seq ; Wang et al., 2009) a été entreprise dans le but de définir un phénotype moléculaire d'expression génique correspondant aux divergences phénotypiques observées entre chacune des lignées considérées.

2.3.1. Matériel et méthodes

Au cours de l'abattage effectué pour réaliser les analyses proximales (§2.2), le foie des mêmes 97 poissons évalués pour leur EAI, leur métabolisme énergétique et leur composition corporelle, ont été sacrifiés, puis prélevés. Cet échantillonnage ainsi que sa conservation, l'extraction et le contrôle qualité des ARN, ont été pris en charge et réalisés par le partenaire UM-UMR ISEM sur ses plateformes dédiées. La construction des banques d'ADN complémentaire (ADNc, établies avec le kit Illumina TruSeq Stranded mRNA), la vérification de leur qualité, le séquençage et le pré-traitement bioinformatique ont été sous-traités sur la plateforme GET Génomique et Transcriptomique à Toulouse (<http://www.genotoul.fr/index.php?id=151>). Le séquençage a été réalisé sur 5 lignes de séquenceur haut-débit Illumina HiSeq3000. Les lectures de séquences ('reads') ont été réalisées en 'paired-end' (double séquençage ; 2x150 paires de base).

Après élimination des séquences de mauvaise qualité avec TRIMMOMATIC (Bolger et al., 2014), les données ont été analysées à travers un pipeline bioinformatique dédié à la détection de différences d'expression génique. Ce pipeline fait appel aux outils suivants : (a) HISAT2 (Kim et

al., 2015) pour l'alignement des reads sur le génome de référence du bar (Tine et al., 2014), (b) CUFFLINKS 2.0 (Trapnell et al., 2012) pour l'assemblage des reads de chaque individu en transcrits de gènes et leur comptage *i.e.*, la reconstitution des transcrits détectés et assemblés chez chaque individu, (c) CUFFMERGE (Trapnell et al., 2012) qui permet de reconstruire un transcriptome synthétique commun à tous les individus, (d) CUFFDIFF2 (Trapnell et al., 2013) pour le calcul des différences d'expression génique entre lignées. Les résultats de cette dernière analyse ont été ensuite visualisés à l'aide du package CUMMERBUND 3.4 (Trapnell et al., 2012) dans l'environnement R (<https://www.r-project.org/>) et de scripts dédiés. Les travaux bioinformatiques ont été réalisés sur la plateforme MBB hébergée par le partenaire UM-UMR ISEM (<http://mbb.univ-montp2.fr/MBB/index.php>). Un second pipeline d'analyses récemment proposé par Perteza et al. (2016) qui suit une stratégie d'analyse identique des différences d'expression génique a également été utilisé. Les résultats étant tout à fait similaires, ils ne seront pas évoqués ici à l'exception d'un transcrit (gène) important non détectée *via* le processus décrit ci-dessus.

2.3.2. Résultats et discussion

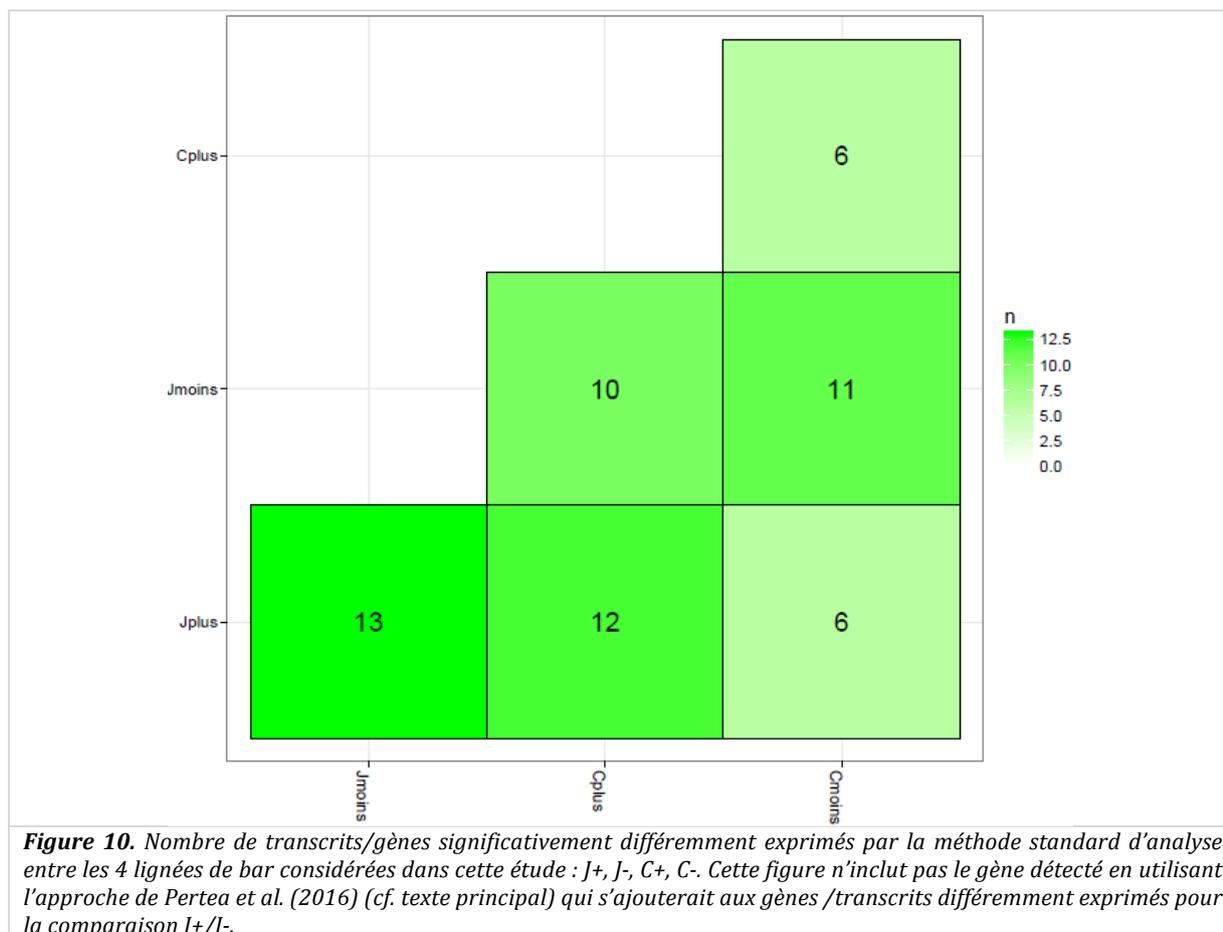
Seuls 54 individus sur 95, ont fourni des ARN possédant un critère de qualité suffisant pour la réalisation de banques ADNc et ainsi permettre un séquençage correct. Cette observation inattendue est potentiellement liée une forte présence de lipides dans le foie, lipides qui auraient modifié les conditions de conservation des ARN dans ce tissu. Soixante-cinq banques d'ADNc ont été constituées à partir de ces 54 individus afin d'obtenir des répliquas de séquençage de certains individus et s'assurer que les résultats issus de deux banques d'un même individu choisi au hasard étaient similaires. Laissant de côté ces répliquas, ces 54 individus se décomposent phénotypiquement pour les 4 lignées en 13 individus J-, 19 individus J+, 13 individus C- et 9 individus C+. Les phénotypes ont été distribués aléatoirement sur les lignes de séquençage.

Suite à des problèmes techniques sur la plateforme GET, certains individus ont été moins séquencés que les autres et, par prudence, mis de côté afin de limiter les biais dans les interprétations biologiques. Ainsi finalement, 9 individus J-, 13 J+, 8 C- et 7 C+ (N = 37) pour lesquels une profondeur de séquençage minimale de 9,3 millions de reads.ind⁻¹ a été obtenue, sont considérés dans la suite des analyses.

Comparaison des 4 lignées

L'analyse simultanée des 4 lignées (N = 37) a permis d'identifier un certain nombre de gènes ou transcrits dont les expressions varient significativement entre couples de lignées (Fig. 10). Ce nombre de gènes est limité, avec au plus 13 gènes/transcrits significativement différemment exprimés entre lignées (au seuil $\alpha = 0.05$, correction pour tests multiples incluse).

Comme les comparaisons entre lignées J+/J- et C+/C- sont les seules biologiquement pertinentes, seuls les transcrits/gènes différemment exprimés dans ces deux cas seront brièvement discutés ci-après.



Gènes et transcrits impliqués dans la différence C+/C-

Sur 6 transcrits détectés comme significativement différemment exprimés, 5 relèvent de gènes pour lesquels une annotation fonctionnelle claire est disponible (*A2ML1*, *GK*, *MYH11*, *EGR1*, *MOG*). Le dernier transcrit relève d'une classe d'éléments répétés dite 'U3-repeat box'. Ces éléments sont connus pour moduler positivement ou négativement la transcription de gènes ou de rétrovirus présents dans les génomes (rôle en tant que 'enhancer' et/ou comme 'small non-coding RNA'), mais leur expression dans les hépatocytes n'a été étudiée, à notre connaissance, qu'à de rares occasions (*e.g.*, Yamaguchi et al., 2003) et encore moins chez les poissons où leur expression a été étudiée en liaison avec la réponse thermique des espèces (Alvarez et al., 2004), mais pas directement la croissance. Une activité mitogène et donc dans la prolifération cellulaire, est néanmoins prouvée (Srivastava et Pollard, 1999) et les différences significatives d'expression entre lignées C+ et C- peuvent être perçues comme sous-jacentes du renouvellement cellulaire lié à la croissance chez le bar.

Parmi les gènes détectés comme significativement exprimés entre lignées C+ et C- dans notre étude, les liens de certains d'entre eux avec la croissance chez les poissons sont connus ou potentiels. Un rôle est connu dans le cas de la glucokinase (*GK*, impliqué dans l'utilisation du glycogène et donc du métabolisme des sucres) pour laquelle des différences d'expression ont été maintes fois notées récemment (Li et al. 2016 ; Malandrakis et al. 2016 ; Panserat et al. 2014). Un rôle connu - mais de façon bien moins détaillé - existe certainement aussi pour *MYH11* (myosin heavy chain-11) dont la différence interindividuelle d'expression dans le foie, mais également dans le muscle, est impliquée dans les variations de croissance chez le saumon (*Salmo salar* ; Churova et al. 2015). Le rôle des myosines dans des différences de croissance est courant dans la littérature, mais il est normalement évoqué uniquement dans le muscle. Un rôle est potentiel pour *A2ML1* (alpha-2 macroglobuline-1, une glycoprotéine) qui malgré des rôles

physiologiques multiples dont celle majeure d'inhiber des protéases et de posséder dans le foie la capacité d'activer de nombreuses molécules comme *bFGF* (basic fibroblast growth factor) sécrété dans les adipocytes du foie (Rehman et al. 2013). Cette dernière joue un rôle dans le renforcement de la production osseuse et dans l'indice de masse corporelle (Kühn et al., 2012). Même si nous ne pouvons citer d'étude chez les poissons, des mutations liées à *A2ML1* ont été tout récemment montré comme entraînant des retards de croissance et autre altérations osseuses chez l'homme (Vissers et al., 2015). De façon moins nette, des liens entre croissance et expression différentielle de *EGR1* (early growth response protein 1-like; un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme général du foie et dans son homéostasie) ont été montré chez le poulet (Yin et al., 2016). De façon plus intéressante ici, il a été montré un rôle régulateur de *EGR1* sur le facteur hépatocytaire de croissance (*HGF*) qui est également régulé par *MOG* (myelin-oligodendrocyte glyco isoform 1), un autre des gènes détecté comme significativement exprimé dans la présente étude. Comme *HGF* a lui-même une activité mitogénique, ceci suggère également un rôle de l'ensemble de ces molécules sur la prolifération cellulaire et tissulaire.

Gènes et transcrits impliqués dans la différence J+/J-

Sur 13 transcrits détectés comme significativement différemment exprimés, 11 relèvent de gènes pour lesquels une annotation fonctionnelle claire est disponible. Il s'agit des gènes *FGF1** (fibroblast growth factor 1), *TDH** (L- threonine mitochondrial-like), *COL12A1** (collagen α 1), *PFKFB1** (6-phosphofructo-2-kinase fructose-biphosphatase), *CYP2R1* (vitamin d 25-hydroxylase), deux CGRP ou précurseurs de gènes liés à la calcitonine, *TGM2** (proteine-glutamine γ -glutamyltransférase 2), *TTC25* (tetratricopeptide repeat protein 25) et deux précurseurs de l'hepcidine*.

Les gènes ou produits de ces gènes comme par ex. des peptides ou des hormones qui ont fait l'objet d'étude chez les poissons pour des métabolismes impliquant le foie, sont indiqués par un astérisque dans la liste précédente. Certains de ces gènes sont particulièrement intéressants car ils relèvent de l'homéostasie générale du fonctionnement hépatique (régulation de la bile, du métabolisme des lipides) comme *FGF1* (Tsai et al., 2013) et d'autres ont été montrés comme particulièrement sensibles à des manipulations caloriques comme par exemple le collagène dont la taille des fibrilles est modifiée dans le foie et vraisemblablement en relation avec le métabolisme des lipides (Berilil et al., 2011), ou *PFKFB1* dont l'expression est modifiée lors du jeûne (Metón et al., 1999) et qui est essentiel dans la régulation de la fructose-2,6-biphosphate. Cette dernière enzyme est elle-même un activateur de la voie métabolique de la glycolyse et un inhibiteur de celle de la néoglucogenèse. Ces voies métaboliques sont différemment affectées chez les lignées J+ et J- de bar (McKenzie et al., 2014, et résultats non publiés). Des constats similaires liant restriction et manipulation caloriques valent pour *TDH* qui impliquent le métabolisme d'un acide aminé essentiel, la L-thréonine, qui est un régulateur de la néoglucogenèse (Hetenyi et al., 1984; Guerranti et al., 2001; Fortes Silva et al., 2012) différenciant individus J+ et J- chez le bar (McKenzie et al., 2014). *TGM2* – une transglutaminase – est connue comme réagissant à la restriction calorique chez les téléostéens et pour être impliquée dans la régulation métabolique des protéines (Panserat et al., 2009). On sait par ailleurs que son expression peut avoir un lien avec la perte de masse chez l'homme, mais aussi une relation avec la fibrose hépatique dépendante des FGF pour lesquelles *FGF1* ou des gènes liés à la production du collagène, ont été mentionnés précédemment (e.g., Brown et al., 2003; Krushitz et al., 2016).

A travers ce dernier exemple, on comprend qu'au-delà de la différence d'expression des gènes pris indépendamment, il existe une opportunité de prendre en compte leurs patrons de co-expression (ici *TGM2*, *COL12A1* et *FGF1*), mais d'autres cas peuvent être cités dans nos données. Par exemple, il semble exister un lien entre le collagène et certaines hepcidines dont un rôle est le métabolisme du fer dans l'organisme (e.g., DeLima et al. 2012, mais cette régulation métabolique du fer par les hepcidines semblent affecter certaines voies métaboliques. Chez la

souris par exemple, il a été démontré qu'elles sont impliquées dans la régulation de la néoglucogenèse (Vecchi et al., 2014) ce qui n'a jamais été mis en évidence chez les poissons même si – anecdotiquement – un lien avec le jeûne et le métabolisme de la néoglucogenèse a été noté à une occasion chez *Pagrus major* (Mohapatra et al. 2015).

Le rôle des autres gènes détectés comme significativement différemment exprimés entre individus des lignées J+ et J- est plus difficile à établir. *TTC25* n'a pas été étudié chez les poissons à notre connaissance, mais un rôle de ce tétratricopeptide associé à des phénomènes liés à la restriction calorique, a été décrit chez le rat (Arias et Cartee, 2005). Les CGRP sont connus chez les poissons (*e.g.*, Martinez-Álvarez et al., 2008), mais les études sont principalement en lien avec l'osmorégulation et la régulation des fonctions rénales (Hay et Dickerson, 2010) ou cardiaques chez les mammifères. Toutefois, des liens entre ces hormones et la régulation de la prise alimentaire sont étudiés depuis longtemps, mais pas au niveau du foie (système nerveux central, intestin) (*e.g.*, Krahn et al., 1984 ; Lutz et al., 1997, Havel, 2001). Il est difficile dans notre étude de savoir si la différence significative d'expression est due au tissu hépatique lui-même ou au sang y circulant. Pour sa part, *CYP2R1* est un gène présent chez les poissons (Goldstone et al., 2010) qui est sensé participer à l'activation de la vitamine D et donc à la minéralisation des tissus *via* la régulation du calcium circulant dans le sang (Jones et al., 2014). Son expression est assez spécifique du foie chez la souris, mais son rôle précis chez cette dernière reste assez mal compris (Zhu et DeLuca, 2012 ; Jones et al., 2014). Indépendamment de participer à la minéralisation, il est suggéré depuis assez longtemps, un antagonisme de régulation entre vitamines A et D (Rohde et al., 1999 ; Rohde et DeLuca, 2005). La vitamine A est stockée dans le foie et participe à la régulation des métabolismes du glucose et des lipides dans cet organe. Une récente étude a montré que le métabolisme de la vitamine était relié à l'efficacité alimentaire (Zhao et al., 2016) ; il est donc possible de se demander si le métabolisme différentiel de la vitamine D chez le bar, piloté par *CYP2R1*, pourrait influencer celui de la vitamine A et donc l'efficacité alimentaire de cette espèce. Des liens entre calcitonine - ici vues *via* les précurseurs de type CGRP évoqués précédemment - et métabolisme de la vitamine D, sont connus chez le rat (*e.g.*, Ikeda et al., 1989), mais restent néanmoins peu clairs (Hu et al., 2015). Rien n'indique pleinement que la régulation de ces métabolismes soit similaire chez les organismes aquatiques et terrestres (Rao et Raghuramulu, 1999 ; Bouillon et Suda, 2014).

Enfin, un gène supplémentaire a été détecté en utilisant l'approche décrite dans Perlea et al. (2016), l'apolipoprotéine B100 (APOB100). L'apolipoprotéine B100 produite par le foie est localisée à la surface des VLDL (very low density lipoproteins, en fait des vésicules principalement constituées à leur surface d'apolipoprotéines, de cholestérol et de triglycérides) qui participent au transport des lipides dans le sang (Havel, 1975). Des différences d'expression impliquant APOB100 en lien avec la tolérance au jeûne ont déjà été notées chez les poissons (*Onchorhynchus mykiss* ; Salem et al., 2007). Des liens entre régulation de la masse corporelle et production d'apolipoprotéine B sont rapportés chez l'homme (*e.g.*, Sävendahl et Underwood, 1999) ou chez certains poissons dans le cas de diètes modifiées (Li et al., 2014), tout comme est rapportée le rôle d'APOB100 sur l'hyperlipidémie du foie chez la souris ou le rat (*i.e.*, en dehors d'un rôle dans le transport *sensu stricto*, APOB100 permet la régulation même de ce transport et d'éviter l'accumulation des lipides dans le foie ; Ihara et al., 1998, Pan et al., 2004 ; Brodsky et Fisher, 2008). Ce phénomène d'hyperlipidémie du foie est une conséquence classique du jeûne. Comme les poissons utilisent les lipides comme source d'énergie majeure (Watanabe, 1982), il est possible de penser qu'une différence significative d'expression pour ce gène chez le bar puisse participer au patron d'utilisation différentielle des lipides noté entre les individus J+ et J- au cours du jeûne (McKenzie et al., 2014). Par contre, un taux de lipides différent dans le foie chez les individus J+ et J- n'a pas été testé à ce jour.

2.3.3. Conclusions sur l'expression différentielle

Peu de gènes ou transcrits ont été identifiés comme caractérisant significativement les 4 lignées de bar les unes par rapports aux autres. Ceci était partiellement attendu puisque les lignées J+/J- et C+/C- sont encore dans leur 1^{ères} générations de sélection pour lesquelles les déterminismes moléculaires liés aux divergences phénotypiques pour la résistance au jeûne ou la croissance n'ont pas encore subi pleinement l'effet de la sélection. Ce nombre de gènes/transcrits doit être également relativisé par le fait (i) qu'un seul organe a été analysé alors que la régulation de l'expression est largement différente d'un organe à un autre quel que soit l'organisme considéré (*i.e.*, un gène non significativement différemment exprimé dans le foie peut l'être dans un autre organe), et (ii) que dans le cas des lignées J+/J-, l'étude a porté sur des individus échantillonnés lors d'une phase d'élevage standard. Il peut être attendu pour ces lignées que d'autres différences d'expression significatives apparaissent lors d'un challenge de jeûne, tant dans le foie que dans d'autres organes (*e.g.*, muscle, intestin). En conséquence, le nombre de gènes impliqués dans les différences interlignées, est certainement sous-évalué ici car la caractérisation des lignées n'est faite que sur un organe et pour une condition. Des études plus complètes devront être entreprises afin de caractériser l'ensemble des gènes impliqués dans la différence J+/J- ou C+/C- et permettre des analyses fonctionnelles plus poussées.

Cependant, malgré un faible nombre de gènes/transcrits détectés comme significativement différemment exprimés, ceux-ci semblent biologiquement pertinents. Un certain nombre d'entre eux ou leur produit définitif d'expression (*e.g.*, une hormone), ont été montrés comme répondant à des challenges de jeûne ou de restriction calorique chez d'autres espèces de poissons parfois, mais plus généralement chez d'autres vertébrés modèles comme l'homme ou la souris. Ces divers challenges peuvent avoir un lien avec la régulation de la néoglucogenèse qui semble fortement impliquée dans la distinction J+/J- chez le bar (McKenzie et al., 2014). Il nous semble donc avoir identifié des candidats substantiels et rationnels pour les traits considérés, en particulier dans le cas des lignées J+/J- où les gènes identifiés appartiennent à des mécanismes interdépendants relevant de la restriction calorique qu'est le jeûne. Une identification d'un plus grand nombre de candidats dans quelques autres organes clés permettrait d'étayer ces premiers résultats en permettant de mieux comprendre les patrons de co-expressions géniques, la place des différents métabolismes et de la néoglucogenèse en particulier dans la tolérance au jeûne et de construire à termes des programmes de sélection génomique ciblés.

2.4. Conclusions générales sur la caractérisation de l'efficacité alimentaire

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude sur l'efficacité alimentaire individuelle du bar évaluée en isolement et sous alimentation restreinte (50% de la ration standard), souligne les points marquants suivants :

Mécanismes physiologiques

A l'échelle de l'individu, l'efficacité alimentaire :

- ne dépend pas du coût de vie, que ce soit le coût de base pour « maintenir la machine » (SMR) ou le coût lié à des différences comportementales entre individus (RMR) ; les mâles et les femelles montrent par ailleurs, le même métabolisme de base
- ne dépend pas de la proportion du métabolisme supportée par le catabolisme des protéines
- ne semble que très faiblement corrélée à la composition corporelle des poissons mesurées par analyse chimique ; au mieux une corrélation de -0,31 avec le taux de protéines et de 0,33 avec le taux d'humidité

A l'échelle des populations sélectionnées :

- la lignée à forte croissance (C+), caractérisée par une EAI élevée, présente des taux métaboliques plus faibles que la lignée caractérisée par une perte de masse importante pendant le jeûne (J+), une EAI faible, une teneur corporelle en lipides inférieure et une teneur en eau supérieure par rapport à la lignée divergente pour le même caractère (J-). Ce dernier résultat corrobore des analyses précédentes utilisant le *Fatmeter* (Distell) et qui montraient des différences significatives de taux de gras musculaire entre les lignées J- et J+
- peu de gènes ou de transcrits sont exprimés différemment au niveau du foie (partiellement attendu puisque les lignées J+/J- et C+/C- sont encore dans leurs 1^{ères} générations de sélection) ; ils représentent cependant des candidats substantiels et rationnels pour les traits considérés, en particulier dans le cas des lignées J+/J- où les gènes identifiés appartiennent à des mécanismes interdépendants relevant de la restriction calorique qu'est le jeûne

Développements technologiques

- Il est possible de mesurer, de façon fiable, le métabolisme énergétique d'un grand nombre de poissons simultanément avec la nouvelle technologie des sondes optodes (méthode RHD développée ici).
- Le développement de modèles de prédiction par SPIR des analyses chimiques de compositions corporelles semble mitigé. En pratique, il est possible de développer des modèles utilisables en routine pour la teneur en eau et la teneur en lipides des échantillons, mais aucun modèle convenable n'a pu être établi pour la teneur en protéines, en glucides et en cendres. Une seconde limite à souligner, est que la mise en place d'un tel outil pour la teneur en lipides est concurrencée par la technologie existante par *Fatmeter* (Distell). Ce dernier permet une évaluation avec un R^2 de prédiction autour de 0,6 donc moins bon que celui que nous obtenons ici (0,78), mais avec une praticité d'utilisation largement supérieure à la procédure mise en place dans cette étude.

Perspectives

Concernant les résultats sur le métabolisme : des recherches ultérieures sont nécessaires pour mieux comprendre en quoi la façon de mesurer l'efficacité alimentaire individuelle (isolement des poissons et alimentation restreinte à 50%) affectés les résultats. Dans ces conditions très particulières, en effet, certains individus ne s'adaptent que difficilement voire jamais à l'isolement et refusent de manger leur ration soit partiellement, soit complètement.

Concernant l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) pour prédire les compositions corporelles : il faudra *a minima*, développer plus avant les procédures, avec peut-être des outils mieux adaptés au terrain et surtout avec des échantillonnages de calibration beaucoup plus conséquents que ceux mis en œuvre dans cette étude de faisabilité.

Concernant le génome : l'identification d'un plus grand nombre de candidats dans quelques autres organes clés permettrait d'étayer les premiers résultats obtenus ici en permettant de mieux comprendre les patrons de co-expressions géniques, la place des différents métabolismes et de la néoglucogenèse en particulier dans la tolérance au jeûne et de construire à termes des programmes de sélection génomique ciblés.

3. Références citées

- Alvarez, M., Molina, A., Quesada, C., Pinto, R., Krauskopf, M. and Vera, M.I., 2004. Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *Journal of Thermal Biology* 29, 663-667.
- Arias, E.B. and Cartee, G.D., 2005. Relationship between protein O-linked glycosylation and insulin-stimulated glucose transport in rat skeletal muscle following calorie restriction or exposure to O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *Acta Physiologica Scandinavica* 183, 281-289.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J., 1989. Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* 43, 772-777.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J., 1993. Letter: Correction to the description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Trend (DT) transformations in Practical Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis-2nd Edition. *J. Near Infrared Spectrosc.* 1, 185-186.
- Berilis, P., Mente, E., and Nengas, I., 2011. Collagen fibrils in cultured and wild wea bream (*Sparus aurata*) liver. An electron microscopy and image analysis study. *The Scientific World Journal* 11, 917-929.
- Besson M., Komen H., Aubin J., de Boer I.J.M., Poelman M., Quillet E., Vancoillie C., Vandeputte M., and van Arendonk J.A.M., 2014. Economic values of growth and feed efficiency in fish farming under density and nitrogen output limitations: an African catfish case study. *Journal of Animal Science* 92, 5394-5405.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Bouillon, R. and Suda, T., 2014. Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution. *BoneKEy Reports* 3, 480.
- Brett, J.R., Zala, C.A., 1975. Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. *Journal of the Fisheries Resource Board of Canada* 32, 2479-2486.
- Brodsky, J.L. and Fisher, E.A. 2008. The many intersecting pathways underlying apolipoprotein B secretion and degradation. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19: 254-259.
- Brown, K.E., Denenry, P.A., Ridnour, L.A., Fimmel, C.J., Kladney, R.D., Brunt, M.E., and Spitz, D.R., 2003. Effect of iron overload and dietary fat on indices of oxidative stress and hepatic fibrogenesis in rats. *Liver International* 23, 232-242.
- Burns, D. A., Ciurczak, E. W. E., 1992 Handbook of Near-Infrared Analysis, Marcel Dekker, Inc.: New York, p 680.
- Chabot, D., Koenker, R., Farrell, A.P., 2016a. The measurement of specific dynamic action in fishes. *Journal of Fish Biology* 88, 152-172.
- Chabot, D., McKenzie, D.J., Craig, J.F., 2016b. Metabolic rate in fishes: Definitions, methods and significance for conservation physiology. *Journal of Fish Biology* 88, 1-9.
- Churova, M.V., Meshcheryakova, O.V., Veselov, A.E., and Nemova, N.N., 2015. Activity of enzymes involved in the energy and carbohydrate metabolism and the level of some molecular-genetic characteristics in young salmon (*Salmo salar* L.) with different age and weight. *Russian Journal of Developmental Biology* 46, 254-262.
- Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A., Scaife, J.R., 2005. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy, *LWT. Food Science and Technology* 38(8), 821-828

- CRECHE²⁰¹³. Rapport de la convention MEDDE 2013 relative au concours apporté par l'Ifremer au Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie en matière de maîtrise d'ouvrage et d'expertise aquacole ; Référence Ifremer 2012/1/1210320/NYF.
- CRECHE²⁰¹⁴. Rapport de la convention MEDDE 2014 relative au concours apporté par l'Ifremer au Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie en matière de maîtrise d'ouvrage et d'expertise aquacole ; Référence Ifremer 13/1210868/NYF.
- CRECHE²⁰¹⁵. Rapport de la convention MEDDE 2015 relative au concours apporté par l'Ifremer au Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie en matière de maîtrise d'ouvrage et d'expertise aquacole ; Référence Ifremer 14/1211577/F.
- Daulé, S., Vandeputte, M., Vergnet, A., Guinand, B., Grima, L., and Chatain, B., 2014. Effect of selection for fasting tolerance on feed intake, growth and feed efficiency in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 420, S42-S49.
- DeLima, R.D., Chua A.C., Tirnitz-parker, J.E., Gan, E.K., Croft, K.D., Graham, R.M., Olynyk, J.K., and Trinder, D., 2012. Disruption of hemochromatosis protein and transferrin receptor 2 causes iron-induced liver injury in mice. *Hepatology* 56, 585-593.
- Drouilhet, L., Gilbert, H., Balmisse, E., Ruesche, J., Tircazes, A., Larzul, C., and Garreau, H., 2013. Genetic parameters for two selection criteria for feed efficiency in rabbits. *Journal of Animal Science* 91, 3121-3128.
- Dupont-Prinet, A., Chatain, B., Grima, L., Vandeputte, M., Claireaux, G., McKenzie, D.J., 2010. Physiological mechanisms underlying a trade-off between growth rate and tolerance of feed deprivation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology* 213, 1143-52.
- Ectopic expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic hepatocytes disrupts apolipoprotein B secretion and induces aberrant cellular morphology with lipid storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 2526-2530.
- Fortes Silva, R., Rosa, P.V., Zamora, S., and Sanchez-Vazquez, F.J., 2012. Dietary self-selection of protein-unbalanced diets supplemented with three essential amino acids in Nile tilapia. *Physiology and Behavior* 105, 639-644.
- Fry, F.E.J., 1971. The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish, in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology* Volume 6. Academic Press, New York, pp. 1-98.
- Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M.E., Nelson, D.R., and Stegeman, J.J., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in zebrafish. *BMC Genomics* 11, 643.
- Grima, L., Chatain, B., Ruelle, F., Vergnet, A., Launay, A., Mambrini, M., and Vandeputte, M., 2010. In search for indirect criteria to improve feed utilization efficiency in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Part II: Heritability of weight loss during feed deprivation and weight gain during re-feeding periods. *Aquaculture* 302, 169-174.
- Guerranti, R., Pagani, R., Neri, S., Errici, S.V., Leoncini, R., and Marinello, E., 2001. Inhibition and regulation of rat liver L-threonine dehydrogenase by different fatty acids and their derivatives. *Biochimica and Biophysica Acta - General Subjects* 1568, 45-52.
- Havel, P.J. 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine* 226, 263-277.
- Havel, R.J. 1975. Lipoproteins and lipid transport. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 63: 37-59.
- Hay, D.L., and Dickerson, I.M. (Eds), 2010. *The calcitonin gene-related peptide family. Form, function and future perspectives*. Springer, Amsterdam. 236p.

- Hegarty, R.S., Goopy, J.P., Herd, R.M., McCorkell, B., 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science* 85, 1479–1486.
- Hetenyi, G. Jr, Anderson, P.J., Kinson, G.A., 1984. Gluconeogenesis from threonine in normal and diabetic rats. *Biochemical Journal* 224, 355-360.
- Hu, F., Chen, L., Che, H., Fang, J, Lv, F, Zhang, S, Guo, C. et al., 2015. Fasting serum CGRP levels are related to calcium concentrations, but cannot be elevated by short-term calcium/vitamin D supplementation. *Neuropeptides* 49, 37-45.
- Ihara, Y., Yoshimura, M., Miyoshi, E., Nishikawa, A., Sultan, A.S., Toyosawa, S., Ohnishi, A. et al. 1998. Ectopic expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic hepatocytes disrupts apolipoprotein B secretion and induces aberrant cellular morphology with lipid storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3 ; 95(5):2526-30
- Ikeda, K., Lu, C., Weir, E.C., Mangin, M., and Broadus, A.E., 1989. Transcriptional regulation of the parathyroid hormone-related gene by glucocorticoids and vitamin D in a human-cell C line. *Journal of Biochemical Chemistry* 264, 14743-14746
- Jobling, M., 1980. Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology* 17, 325–334.
- Jones, G., Prosser, D.E., and Kaufmann, M., 2014. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *Journal of Lipid Research* 55, 13-31.
- Killen, S.S., Marras, S., McKenzie, D.J., 2011. Fuel, fasting, fear: routine metabolic rate and food deprivation exert synergistic effects on risk-taking in individual juvenile European sea bass. *Journal of Animal Ecology* 80, 1024–33.
- Kim, D., G. Perteau, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, S. L. Salzberg, 2015. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14:R36.
- Kovalenko, I., Rippke, G., Hurburgh, C., 2006 Measurement of soybean fatty acids by near-infrared spectroscopy: Linear and nonlinear calibration methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 421–427.
- Krahn, D.D., Gosnell, B.A., Levine, A.S., and Morley, J.E., 1984. Effects of calcitonin gene-related peptide on food intake. *Peptides* 5, 861-864.
- Krushitz, R., Luger, M., Kienbacher, C., Trauner, M., Klammer, C., Schindler, K., Langer, F.B. et al., 2016. The effect of Roux-en-Y vs. omega-loop gastric bypass on liver, metabolic parameters, and weight loss. *Obesity Surgery* 26, 2204-2212.
- Kühn, M.C., Willenberg, H.S., Schott, M., Papewalis, C., Stumpf, U., Flohé, S., Scherbaum, W.A. et al., 2012. Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349, 180-188.
- Li, J., Zhang, D., Xu, W., Jiang, G., Zhang, C., Li, X., Liu, W. 2014. Effects of dietary choline supplementation on growth performance and hepatic lipid transport in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diets. *Aquaculture* 434: 340-347.
- Li, J.N., Xu, Q.Y., Wang, C.A., Wang, L.S., Zhao, Z.G., and Luo, L., 2016. Effects of dietary glucose and starch levels on the growth, haematological indices and hepatic hexokinase and glucokinase mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* 22, 550-558.
- Luiting, P., Schrama, J.W., van der Hel, W., Urff, E.M., 1991. Metabolic differences between white leghorns selected for high and low residual food consumption. *British Poultry Science* 32, 763–782.
- Lutz, T.A., Rossi, R., Althaus, J., Del Prete, E., and Scharrer, E., 1997. Evidence for a physiological role of central calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in the control of food intake in rats. *Neurosciences Letters* 25, 159-162.

- Malandrakis, E.E., Dadali, O., Golomazou, E., Kavouras, M., Dailianis, S., Chadio, S., Exadactylos, A. et al., 2016. DNA damage and differential gene expression associated with physical stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* 236, 98-104.
- Martinez-Álvarez, R.M., Volkoff, R.H., Cueto, J.A., and Delgado, M.J., 2008. Molecular characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) related peptides (CGRP, amylin, adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin) in goldfish (*Carassius auratus*): Cloning and distribution. *Peptides* 29, 1534-1543.
- McCue, M.D., 2006. Specific dynamic action: a century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology A. Molecular and Integrative Physiology* 144, 381-94.
- McKenzie, D.J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B., Skov, P.V., Pedersen, P.B. and Jokumsen, A. 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture* 341, 216-222.
- McKenzie, D.J., Pedersen, P.B., and Jokumsen, A., 2007. Aspects of respiratory physiology and energetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) families with different size-at-age and condition factor. *Aquaculture* 263, 280-294.
- McKenzie, D.J., Vergnet, A., Chatain, B., Vandeputte, M., Desmarais, E., Steffensen, J.F., and Guinand, B., 2014. Physiological mechanisms underlying individual variation in tolerance of food deprivation in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Experimental Biology* 217, 3283-3292.
- Metón, I, Mediavilla, D, Caseras, A., Canto, E, Fernandez, F., and Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* 82, 223-232.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Shimizu, S., Urasaki, S., Matsubara, T., Nagahama, Y., and Ohta, K., 2015. Starvation beneficially influences the liver physiology and nutrient metabolism in *Edwardsella tarda* infected red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology* 189, 1-10.
- Morrison, W.D., Leeson, S., 1978. Relationship of feed efficiency to carcass composition and metabolic rate in laying birds. *Poultry Science* 57, 735-739.
- Nielsen, D., Hyldig, G., Nielsen, J., Nielsen, H.H., 2005 Lipid content in herring (*Clupea harengus* L.) - influence of biological factors and comparison of different methods of analyses: solvent extraction, Fatmeter, NIR and NMR, LWT - *Food Science and Technology*, 38(5), 537-548
- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of Animal Science* 84, 145-153.
- Pan, M., cederbaum, A.I., Zhang, Y.L., Ginsberg, H.N., Williams, K.J., Fisher, E.A. 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *Journal of Clinical Investigation* 113: 1277-1287.
- Panserat, S., Hortopan, G.A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skibba-Quassy, S., Esquerré, D. et al., 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.
- Panserat, S., Kamalam, B.S., Fournier, J., Plagnes-Juan, E., Woodward, K., and Devlin, R.H., 2014. Glucose metabolic gene expression in growth hormone transgenic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology* 170, 38-45.
- Perteau, M., Kim, D., Perteau, G.M., Leek, J.T., and Salzberg, S.L., 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature Protocols* 11, 1550-1667.

- Rao, D.S. and Raghuramulu, N., 1999. Is vitamin D redundant in an aquatic habitat? *Journal of Nutrition Science and Vitaminology* 45, 1-8.
- Rasco, B.A., Miller, C.E., King, T.L., 1991. Utilization of NIR spectroscopy to estimate the proximate composition of trout muscle with minimal sample pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39(1), 67-72
- Rohde, C.M. and DeLuca, H.F., 2005. All-trans retinoic acid antagonizes the action of calciferol and its active metabolite, 1,25-dihydroxycholecalciferol, in rats. *Journal of Nutrition* 135: 1647-1652.
- Rohde, C.M., Manatt, M., Clagett-Dame, M., and DeLuca, H.F., 1999. Vitamin A antagonizes the action of vitamin D in rats. *Journal of Nutrition* 129, 2246-2250.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad III, C.E., and Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8: 328.
- Sävendahl, L. and Underwood, L.E., 1999. Fasting increases serum total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B in healthy, nonobese humans. *Journal of Nutrition* 129: 2005-2008.
- Savitzky, A., Golay, M. J. E., 1964 Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- Schmidt-Neilsen, K., 1982. *Animal Physiology. Adaptation and Environment.* Cambridge University Press, New York.
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., 1991. Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Sci.*, 31, 469-474.
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., 1996. *Routine Operation, Calibration Development Manual, Infracore International: Silver Spring, MD.*
- Sinnaeve, G., D., P., Agneessens, R., Biston, R., 1994. The use of near infrared spectroscopy for the analysis of fresh grass silage. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2, 79-84.
- Srivastava, M. and Pollard, H.B., 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *The FASEB Journal* 13, 1911-1922.
- Svendsen, M.B.S., Bushnell, P.G., Steffensen, J.F., 2016. Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. *Journal of Fish Biology* 88, 26-50.
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P. A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S. T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, A.M., Bargelloni, L., Power, D. M., Bonhomme, F., Canario, A. V. M., Reinhardt, R., 2014. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications* 5: 5770.
- Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., and Pachter, L., 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology* 31, 46-53
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., Pachter, L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nature Protocols* 7: 562-578.
- Tsai, S.M., Liu, D.W., and Wang, W.P., 2013. Fibroblast growth factor (Fgf) signaling pathway regulates liver homeostasis in zebrafish. *Transgenic Research* 22, 301-314.
- Uddin, M., Okazaki, E., Uddin-Ahmad, M., Fukuda, Y., Tanaka, M., 2006. NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel, *Food Control*, 17(8), 660-664,
- Vecchi, C., Montossi, G., Garuti, C., Corradini, E., Sabelli, M., Canali, S., and Pietrangelo, A., 2014. Gluconeogenic signals regulate iron homeostasis via hepcidin in mice. *Gastroenterology* 146, 1060-1069.

- Visser, L.E.L.M., Bonetti, M., Paardekooper Overman, J., Nillesen, W.M., Frints, S.G., de Ligt, J., Zampino, G. et al., 2015. Heterozygous germline mutations in *A2ML1* are associated with a disorder clinically related to Noonan syndrome. *European Journal of Human Genetics* 23, 317-324.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M., 2009. RNA-seq, a revolutionary tools for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10, 57-63.
- Wold, H., 1973. Non-linear iterative partial least squares (NIPALS) modelling. Some current developments. In *Multivariate Analysis*, Krishnaiah, P. R., Ed., Academic Press: New York, Vol. III, pp 387-407.
- Wold, S., 1978 Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics* 20, 397-405.
- Yamaguchi K., Itoh, K., Ohnishi, N., Itoh, Y., Baum, C., Tsuji, T., Nagao, T. et al., 2003. Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Therapy* 8, 796-803.
- Zhao, Y., Hou, Y., Liu, F., Jing, L., Zhao, C., Luan, Y., Miao, Y. et al., 2016. Transcriptome analysis reveals that vitamin A metabolism in the liver affects feed efficiency in pigs. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6, 3615-3624.
- Zhu, J. and DeLuca, H.F., 2012. Vitamin D 25-hydroxylase – Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523, 30-36.
-