



**UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE**

**U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie**



**THESE**

présentée par

**M<sup>elle</sup> Estelle LE BIHAN**

et soutenue

le 20 novembre 2006

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN**

**Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies Alimentaires**  
(Arrêté du 25 Avril 2002)

***Valorisation des co-produits issus de la pêche des  
céphalopodes : applications à la seiche***

***Sepia officinalis***



**Membres du jury :**

M. BOLETZKY	Directeur de Recherche	CNRS, Observatoire océanologique de Banyuls	(Rapporteur)
M. GUERRA	Directeur de Recherche	Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo	(Rapporteur)
M <sup>me</sup> . GUERARD	Maitre de Conférences	Université de Bretagne Occidentale	
M. LEBEL	Professeur	Université de Caen	
M. MATHIEU	Professeur	Université de Caen	
M. KOUETA	Maître de Conférences HDR	Université de Caen	(Directeur de thèse)



## Avant propos

*Je souhaite remercier mon directeur de thèse, Monsieur Noussithé Koueta, Maître de conférence, HDR à l'université de Caen, d'abord pour m'avoir fait découvrir les céphalopodes et le domaine de la recherche. Ensuite, pour m'avoir encadrée depuis 6 ans, au travers de stage non obligatoire, puis en DEA et en thèse. Ses conseils, son soutien et sa confiance ont contribué à la réalisation de ce travail. Aussi, je souhaite qu'il trouve ici, l'expression de mes remerciements les plus sincères et le témoignage de ma gratitude.*

*Je suis reconnaissante à Monsieur Michel Mathieu, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins de l'université de Caen, pour son concours à mon comité de pilotage et pour sa participation à ce jury de thèse.*

*Que Monsieur Sigurd Von Boletzky, Directeur de recherche du CNRS à l'Observatoire Océanologique de Banyuls, Laboratoire Arago, reçoivent ici mes plus vifs remerciements pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en étant rapporteur de cette thèse.*

*Je remercie vivement Monsieur Angel Guerra, Directeur de recherche à l'Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.*

*Je voudrais remercier Madame Fabienne Guérard, Maître de conférences à l'université de Bretagne Occidentale, pour avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de ma thèse.*

*Je désire exprimer toute ma respectueuse reconnaissance à Monsieur Jean Marc Lebel, Professeur à l'université de Caen, pour m'avoir permis des collaborations avec le Master Professionnel Exploitation des Ressources Vivantes Côtières, pour avoir contribué à une partie de mes recherches au cours de notre collaboration concernant la recherche de molécules bio-actives dans les ensilages, pour sa grande disponibilité et pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.*

*Je souhaite remercier l'Equipe de Recherche en Physico-Chimie et Biotechnologies, IUT Génie Chimique - Génie des Procédés de l'université de Caen, pour leur collaboration et leur accueil au sein de leurs locaux. Un merci en particulier à Monsieur David Corroler, Maître de conférence à l'université de Caen, qui m'a fait profiter de ses compétences en microbiologie, pour ses conseils et sa gentillesse.*

*Je remercie également Monsieur Jean Pierre Gimazane, Maître de conférences à l'université de Caen, pour m'avoir prêté le matériel nécessaire à l'élevage des crevettes et des poissons; et les différentes promotions de Master Professionnel Exploitation des Ressources Vivantes Côtières pour leurs aides techniques.*

*Que Mademoiselle Armelle Perrin, trouve ici l'expression de mon amitié pour les 4 années partagées ensemble sur l'étude et la passion des céphalopodes et son aide dans la rédaction de ce manuscrit. Comme tu*

*l'as toi-même si bien écrit, nous avons passé un temps considérable à discuter et à s'émerveiller du « phénomène seiche ». Ces années passées ensemble seront inoubliables de part les aventures que nous avons vécues : les sorties plus ou moins nocturnes à la recherche, plus ou moins fructueuse, de cet animal la seiche Sepia officinalis, l'écumage des côtes normandes dans l'espoir de trouver « les grappes de raisins noirs », la fabrication et le transport particulièrement salissant et odorant de mes lysats, et tellement d'autres péripéties...*

*Avec Monsieur Stéphane Frouël, actuellement étudiant en thèse au laboratoire, que de chemin nous avons parcouru depuis 2 ans. Nos nombreuses collaborations sur les additifs alimentaires et discussions diverses m'ont été précieuses. Son soutien moral, technique et scientifique ainsi que son amitié m'ont été d'une aide importante. Qu'il trouve ici l'expression de mon amitié la plus sincère. Juste une chose Stéphane : « à bas PSA et PSI, vive A25 ».*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Béatrice Adeline, Adjointe technique au LBBM UMR 100 PE2M, pour son aide technique et ses compétences en histologie.*

*Je remercie Monsieur Didier Goux, Responsable technique du service de microscopie électronique appliqué à la biologie, pour son assistance technique et scientifique en microscopie électronique.*

*Merci à Monsieur Antoine Serpentine, Maître de conférences à l'université de Caen, pour ses conseils et les discussions que nous avons eues ensemble au cours de ma thèse.*

*Que Mademoiselle Céline Zatylny, Maître de conférences à l'université de Caen, soit remerciée pour ses conseils.*

*Je tiens à remercier Monsieur Thomas Lacoue-Labarthe, actuellement en thèse au laboratoire, pour sa gentillesse et sa bonne humeur ; travailler avec lui a été un réel plaisir.*

*Cette thèse a pu être réalisée grâce à un soutien financier des Affaires Maritimes de Basse-Normandie au travers d'un financement de l'Instrument Financier pour l'Orientement des Pêches (IFOP). Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à ces organismes, qui grâce à leur soutien financier ont permis la réalisation de ce travail.*

*Ce projet a bénéficié d'un financement « Etape de Pré-Incubation et Innovation » (EP2I) soutenue par le Fonds Européens de développement Régional (FEDER) et le Conseil Régional de Basse-Normandie. Je tiens à les remercier pour m'avoir donné leur confiance et m'avoir fourni les moyens de compléter ce travail par la mise en place de préséries industrielles, d'une étude de marché et d'une étude de protection industrielle et intellectuelle ayant donné lieu au dépôt d'un brevet.*

*Que Monsieur Alain Auvray, Chargé des relations industrielles en biologie et agro-bio-industries au Service d'Activités Industrielles et Commerciales (SAIC) de l'université de Caen, soit assuré de mon infinie gratitude pour son aide essentielle à l'obtention du financement de ce travail et du projet EP2I ; mais aussi*

*pour son accompagnement au cours de ces 3 dernières années aux nombreuses rencontres avec les industriels et aux comités de pilotage du projet EP2I. Ses conseils avisés, ses encouragements et sa grande disponibilité ont permis de porter ce travail bien au-delà du cadre du laboratoire. Aussi, je souhaite qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et le témoignage de mon amitié.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Laurent Protin, Directeur de l'incubateur de Basse-Normandie, et Madame Martine Gauduchon, Chargé d'affaires de l'Oséo ANVAR (Agence Nationale Valorisation de la Recherche), pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour leurs participations efficaces et constructives au cours des divers comités de pilotage du projet EP2I.*

*Un grand merci à Mademoiselle Anne Sophie Martinez, Maître de conférences à l'université de Caen, pour l'aide à la rédaction de ce travail et pour ses nombreux conseils éclairés. Aussi, je souhaite qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

*Que Monsieur Roger Villanueva, chercheur titulaire à l'Institut de Ciècies del Mar de Barcelone, reçoive mes remerciements pour m'avoir reçue dans son laboratoire.*

*J'adresse mes remerciements à Madame Marie-Paule Chichery et Monsieur Franck Levoy, respectivement ancienne Directrice et actuel Directeur du Centre de Recherche en Environnement Côtier (CREC) de Luc sur Mer, pour m'avoir permis d'utiliser les aménagements nécessaires à mes élevages.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel technique du Centre de Recherche en Environnement Côtier de Luc sur mer pour les multiples interventions que nécessitent les élevages et leur mise en place.*

*Que Madame Sandra Sritharan, Technicienne au laboratoire, pour son aide précieuse et sa bonne humeur, trouve ici l'expression de ma sympathie.*

*Que Monsieur Christophe Roger, Technicien au laboratoire, soit remercié pour son soutien technique.*

*Je voudrais remercier Céline Ballandonne et Samuel Thomas, Techniciens en radioprotection de la structure IMOGERE de l'université de Caen pour leur accueil convivial et leur conseil en terme de radioprotection.*

*Merci à Monsieur Francis Orvain et à Madame Clotilde Eudes, Maître de conférences à l'université de Caen, pour leur gentillesse et pour m'avoir permis de faire des vacances en histologie animale ainsi qu'en physiologie animale.*

*Merci à Mademoiselle Christelle Leclerc, Ingénieur nutrition - santé, qu'elle trouve ici l'expression de mon amitié pour sa bonne humeur, sa disponibilité, sa longue amitié et pour m'avoir activement aidé dans la rédaction de cette thèse.*

*Je tiens à remercier Mademoiselle Juliette Royer, ATER à l'université de Caen, pour ses conseils sur l'utilisation du logiciel National Instrument Vision Assistant 7.0.*

*La collaboration développée avec Monsieur Christophe Fleury, actuellement en thèse au laboratoire, a été très fructueuse et sympathique. Ses compétences et son acharnement nous ont permis d'obtenir des résultats bien au-delà de mes espérances. Qu'il soit assuré de mon amitié.*

*Je remercie Monsieur Jean Yves Bouis, Responsable du service biologique et Monsieur Frédéric Chevalier, Adjoint au responsable du service biologique de la Cité de la Mer de Cherbourg, pour notre collaboration sur les seiches, ayant conduit à l'échange de matériel biologique et de discussion particulièrement intéressante sur l'aquaculture.*

*Je tiens à remercier le personnel de Granvillmer et en particulier Monsieur Toulière, Directeur, Monsieur Gilles Richard, ancien Directeur adjoint, et Monsieur Samuel Levasseur, chef de production, pour l'intérêt et le soutien qu'ils ont apporté à ce travail, ainsi que pour la fourniture des co-produits de seiche Sepia officinalis.*

*Que Monsieur Bernard Noël, PDG de Dielen laboratoires à Cherbourg, soit remercié pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, pour avoir partagé son expérience dans le domaine de l'hydrolyse ainsi que pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués.*

*Je voudrais remercier la Coopérative de Traitements des Produits de la Pêche (CTPP) de Boulogne sur mer, et en particulier Monsieur Charles Delannoy, Directeur technique, pour avoir accepté de fabriquer des préséries d'ensilages de seiche dans son entreprise et pour l'intérêt porté à ce travail.*

*Je tiens à remercier les pêcheurs locaux et en particulier Messieurs Lapie (Granville), Guenon, Sgranville), Chayla (Granville), Lecornu (Port en Bessin), Desmare (Ouistreham), Cuyère (Trouville) qui m'ont permis d'obtenir pendant plusieurs saisons des seiches vivantes, indispensables, mais au combien difficile à obtenir, pour la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour ces agréables années passées ensemble.*

*Je remercie Mademoiselle Christelle Alves, Mademoiselle Isabelle Bardou,, Monsieur Nicolas Graindorge, Monsieur Julien Célestine, étudiants du Laboratoire de Physiologie du Comportement des Céphalopodes, pour les nombreux échanges concernant les céphalopodes.*

*Que les étudiants, Mesdemoiselles Aline Coulon, Lucie Mabire, Agnes Meslon, Aurélie Montcuit, Hélène Viala et Messieurs Thomas Broyer, Georges Safi, Benjamin Thomas, Mathieu Tirot, que j'ai reçus en stage, reçoivent tous mes remerciements pour l'immense aide qu'ils m'ont apporté au laboratoire comme sur le terrain.*

*Je remercie vivement tous les étudiants actuel et passé du laboratoire qui ont animé au quotidien ces nombreuses années. Je tiens en particulier à remercier Alban, Amandine, Amine, Anne-Caroline, Armelle, Aude, Benoît, Brice, Christophe, Déborah, Emeline, Emilie, Emilie, Géraldine, Hervé, Juliette, Julio, Karine, Laurence, Stéphane, Thomas pour les nombreuses pauses café et discussion partagées.*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille et en particulier Sébastien d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue au cours de ces longues années d'études.*





**Cette étude a été co- financée par**

**l'Instrument Financier pour l'Orientation de la Pêche (IFOP)**



**Cette étude a fait l'objet d'une Etape de Pré- Incubation et Innovation (EP2I) financée par le Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) et la Région Basse Normandie.**



**Cette étude a fait l'objet d'un dépôt de brevet.**

## **Publications :**

1. **Perrin A., Le Bihan E., Koueta N., (2004).** Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 311: 267-285.
2. **Le Bihan E., Perrin A., Koueta N., (2004).** Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of cuttlefish *Sepia officinalis* L.: effect of Zn, Cu and Ag on digestive enzyme activities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 309: 47-66.
3. **Le Bihan, E., Zatylny C., Perrin, A., Koueta N. (2006).** Studies of post-mortem evolution of cuttlefish viscera during their storage at two different temperatures. *Food chemistry*. 98: 39-51.
4. **Le Bihan E., Perrin A., Koueta N., (2006).** Influence of diet peptide contain on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu- Life and Environment*. 56 (2): 139-145.
5. **Le Bihan E., Perrin A., Koueta N., (2006).** Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food chemistry*. Acceptée.
6. **Frouël S., Le Bihan E., Koueta N., Drapaniotis O., Pham D., Nicolas J.L., (2006).** How commercial microbial preparations based on Lactobacilli can affect digestive metabolism of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles? *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Acceptée.
7. **Le Bihan, E., Gimazane, J. P., Lebel, J. M., Koueta N., (soumise).** Effects of food supplementation with different percentage of silage on survival and growth in experimental rearing of post-larvae shrimps *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*.
8. **Le Bihan, E., Frouël, S., Gimazane, J. P., Serpentine, A., Lebel, J. M., Nicolas, J. L., Koueta N., (en préparation).** Impact of lysate supplementation in diet when fed to juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*.
9. **Le Bihan E., Corroler, D., Barillier, D., Koueta N., (en préparation).** Used of silage as cell culture medium for bacteria.. *Current Microbiology*.
10. **Fleury, C., Le Bihan E. (co-authors), Frouël, S., Serpentine, A., Lebel, J. M., Koueta N., (en préparation).** Effect of silage supplementation on cell culture medium hemocytes. *Fish and shellfish immunology*.
11. **Le Bihan E., Frouël, S., Serpentine, A., Gimazane J. P., Lebel, J. M., Nicolas J. L., Koueta N., (en préparation).** Modulation of digestive and immunity systems ontogeny by diet supplementation in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Physiological and Biochemical Zoology*.

## Sommaire :

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
I DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE : <i>SEPIA OFFICINALIS</i> (LINNE, 1758)	3
Généralités .....	3
1. Classification	3
2. Habitat et mode de vie	3
3. Exploitation de la seiche en Manche	4
Anatomie et physiologie de la seiche <i>Sepia officinalis</i> .....	5
1. Le céphalopodium	5
2. Le viscéropallium	6
3. L'appareil reproducteur	6
4. L'appareil digestif	7
II CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE	8
III BUT DE L'ETUDE	9
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE DU MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	<b>11</b>
I INTRODUCTION	13
A. Contexte économique.....	13
1. Les produits de la pêche	13
2. La seiche	13
B. Voies de valorisation de la masse viscérale de la seiche .....	14
1. Les enzymes	14
2. Les huiles	15
3. Les lysats	15
II ETUDE DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE DES VISCERES	17
A. Etude de l'évolution post-mortem des viscères de seiche .....	17
1. Introduction	19
2. Materials and methods	20
a. <i>Biological material</i> .....	20
b. <i>Enzyme extraction</i> .....	21
c. <i>Enzymatic assays</i> .....	21
d. <i>pH:</i> .....	22
e. <i>TCA soluble protein and protein content</i> .....	22

	<i>f. Molecular weight of proteins and peptides</i> .....	22
	<i>g. Statistical analysis</i> .....	23
3.	Results and discussion	23
	<i>a. Intracellular enzyme specific activity change</i> .....	23
	<i>b. Extracellular enzymes specific activity change</i> .....	26
	<i>c. pH changes</i> .....	34
	<i>d. TCA soluble protein changes</i> .....	34
	<i>e. Molecular weight of proteins and peptides changes</i> .....	34
4.	Conclusion	35
B.	Etude de différents traitements sur la qualité des viscères de seiche.....	38
	1. Introduction	40
	2. Material and methods	41
	<i>a. Biological material</i> .....	41
	<i>b. Analysis</i> .....	42
	<i>c. Statistical analysis</i> .....	45
	3. Results and discussion	45
	<i>a. pH</i> .....	45
	<i>b. TCA soluble proteins</i> .....	46
	<i>c. Molecular weight of proteins and peptides</i> .....	47
	<i>d. Extracellular enzyme specific activity:</i> .....	48
	<i>e. Specific activity of intracellular enzymes</i> .....	49
	<i>f. Fatty acid composition</i> .....	50
	<i>g. Biochemical composition</i> .....	52
	4. Conclusion	52
III	PREPARATION D'ENSILAGES ET EFFET DU STOCKAGE	54
	A. Introduction.....	54
	B. Matériel et méthodes.....	54
	1. Matériel biologique	54
	2. Fabrication des ensilages	54
	3. Analyses	55
	<i>a. pH</i> .....	55
	<i>b. Quantité de protéines TCA (acide trichloroacétique) solubles et de protéines</i> .....	55
	<i>c. Poids moléculaire des protéines et peptides</i> .....	55
	<i>d. Contenu en acides aminés</i> .....	55

e.	<i>Digestibilité des protéines in vitro</i> .....	55
f.	<i>Extraction des enzymes et dosages</i> .....	56
	Résultats .....	57
	Discussion .....	63
IV	CONCLUSION .....	69

## **CHAPITRE 2 : VALORISATION DES ENSILAGES EN TANT QUE MILIEU DE CULTURE POUR MICRO-ORGANISMES : TESTS *IN VITRO*.**

I	INTRODUCTION .....	73
A.	Les micro-organismes .....	73
B.	La culture des micro-organismes .....	74
C.	Choix et présentation des micro-organismes .....	76
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	76
2.	<i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i> .....	76
3.	<i>Escherichia coli</i> .....	77
4.	<i>Proteus mirabilis</i> et <i>Proteus vulgaris</i> .....	77
5.	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> .....	77
6.	<i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i> .....	78
7.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	78
II	MATERIEL ET METHODES .....	79
A.	Micro-organismes .....	79
B.	Milieux de culture .....	80
C.	Conditions de culture .....	80
1.	Tests préliminaires .....	80
2.	Cinétique de croissance .....	80
D.	Analyses statistiques .....	83
III	RESULTATS .....	83
A.	Etudes préliminaires .....	83
B.	Comparaison de la cinétique de croissance des différentes bactéries .....	83
1.	Peptone LBBMA25 .....	83
2.	Peptone de caséine .....	84
3.	Peptone de soja .....	85
4.	Peptone de viande .....	86

C. Cinétique de croissance des micro-organismes sur différents milieux de culture.....	87
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
2. <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i>	88
3. <i>Escherichia coli</i>	89
4. <i>Proteus mirabilis</i> et <i>Proteus vulgaris</i>	89
5. <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	90
6. <i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i>	91
7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
IV DISCUSSION	93
V CONCLUSION	97

**CHAPITRE 3 : VALORISATION DES ENSILAGES EN NUTRITION ANIMALE : TESTS *IN VIVO*. 101**

I INTRODUCTION	103
II MOLLUSQUES	104
A. Introduction.....	106
B. Material and methods.....	107
1. Enrichment characteristic and prey enrichment	107
2. Rearing	108
3. Growth parameters	108
4. Assays	108
a. <i>Extraction</i> .....	108
b. <i>Enzymatic assays</i> .....	109
c. <i>Molecular weight of proteins and peptides</i> .....	109
d. <i>Protein contents</i> .....	110
e. <i>Prey composition</i> .....	110
5. Statistical analysis	111
C. Results.....	111
1. Molecular weight of proteins on silage	111
2. Growth parameter	111
3. Enzymatic activity	113
4. Preys composition	113
D. Discussion .....	114

	E. Conclusion.....	116
III	CRUSTACES	120
	A. Introduction.....	122
	B. Materials and methods.....	124
	1. Biological material	124
	2. Rearing method	124
	3. Diet	124
	4. Statistical analysis	125
	C. Results.....	125
	D. Discussion.....	128
IV	POISSONS	134
	A. Introduction.....	134
	B. Matériel et méthodes.....	137
	1. Matériel biologique	137
	2. Méthode d'élevage	138
	a. <i>Expérimentation 1</i> .....	138
	b. <i>Expérimentation 2</i> .....	138
	c. <i>Expérimentation 3</i> .....	139
	3. Suivi zootechniques	139
	4. Mesure des indices de condition	140
	a. <i>Facteur de condition FC</i> .....	140
	b. <i>Indice Hépat-Somatique IHS</i> .....	140
	c. <i>Indice Viscéro-Somatique IVS</i> .....	140
	d. <i>Observation des malformations</i> .....	140
	5. Analyse de la qualité biochimique de la chair	141
	6. Analyses statistiques	141
	C. Résultats.....	141
	1. Suivis zootechniques	141
	a. <i>Expérimentation 1</i> .....	142
	b. <i>Expérimentation 2</i> .....	144
	c. <i>Expérimentation 3</i> .....	146
	2. Mesure des indices de condition	149
	a. <i>Expérimentation 1</i> .....	149
	b. <i>Expérimentation 2</i> .....	149

	c. <i>Expérimentation 3</i> .....	149
	3. Analyse de la qualité biochimique de la chair	150
	D. Discussion .....	150
V	CONCLUSION	156
<b>CHAPITRE 4 : RECHERCHE DE MOLECULES BIO-ACTIVES</b>		
<b>DANS LES ENSILAGES</b>		<b>159</b>
I	INTRODUCTION	161
II	RECHERCHE DE MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA CROISSANCE	162
	A. Introduction.....	162
	B. Matériel et méthodes.....	163
	1. Matériel biologique	163
	2. Isolation des cellules de la glande digestive	164
	3. Mesure de la viabilité des cellules	165
	4. Dosage des activités enzymatiques	165
	5. Dosage de l'incorporation de la leucine <sup>3</sup> H, des acides aminés <sup>3</sup> H et de la thymidine <sup>3</sup> H	166
	6. Analyses statistiques	167
	C. Résultats.....	167
	1. Mesure de la viabilité des cellules	167
	2. Dosage des activités enzymatiques	168
	3. Dosage de l'incorporation de la leucine <sup>3</sup> H, des acides aminés <sup>3</sup> H et de la thymidine <sup>3</sup> H	170
	D. Discussion .....	171
III	RECHERCHE DE MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION	176
	A. Introduction.....	176
	B. Utilisation d'un bio-essai " <i>Artémie</i> " pour la caractérisation de molécules à activités sécrétagogue .....	177
	1. Introduction	177
	2. Matériel et méthodes	178
	a. <i>Matériel biologique</i> .....	178
	b. <i>Analyses enzymologiques</i> .....	180
	c. <i>Techniques séparatives et préparation des produits et fractions à tester</i> .....	181



d. Extraction.....	181
e. Digestion des protéines .....	181
f. Séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire..	181
g. Analyses statistiques .....	181
3. Résultats	181
a. Effet dose des ensilages ou molécules testées sur l'activité des enzymes digestives .....	181
b. Caractérisation des molécules impliquées dans la stimulation de l'activité des enzymes digestives .....	183
c. Caractérisation des fractions protéiques impliquées dans la stimulation de la sécrétion des enzymes digestives .....	184
4. Discussion	187
C. Etude expérimentale de la régulation de la digestion chez les juvéniles de bars <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	192
1. Introduction	192
2. Matériel et méthodes	192
a. Matériel biologique.....	192
b. Analyses enzymologiques.....	193
c. Histologie et microscopie électronique.....	193
d. Analyses statistiques .....	195
3. Résultats	195
a. Analyses enzymologiques.....	195
b. Histologie et microscopie électronique .....	197
4. Discussion	203
D. Conclusion .....	211
IV RECHERCHE DE MOLECULES BIO ACTIVES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	212
A. Introduction .....	212
B. Action de l'enrichissement LBBMA25 sur le système immunitaire de juvéniles de bars <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	214
1. Introduction	214
2. Matériel et méthodes	217
a. Matériel biologique.....	217
b. Histologie.....	217

c. <i>Dosages des activités immunitaires</i> .....	217
c. <i>Analyses statistiques</i> .....	219
3. Résultats	219
4. Discussion	224
C. Recherche d'effets biologiques des ensilages sur des hémocytes d'ormeaux <i>Haliotis tuberculata</i> .....	230
1. Introduction	230
2. Matériel et méthodes	232
a. <i>Matériel biologique</i> .....	232
b. <i>Les cultures primaires</i> .....	232
c. <i>Préparation des échantillons</i> .....	233
d. <i>Histologie</i> .....	233
e. <i>Mesure des surfaces cytoplasmiques et de la proportion des différents types d'hémocytes</i> .....	234
f. <i>Analyses des activités immunitaires</i> .....	234
g. <i>Analyses statistiques</i> .....	235
3. Résultats	235
4. Discussion	249
D. Conclusion .....	255
V. CONCLUSION	256
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>259</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>267</b>

## *Abréviations :*

ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
ADP: Adenosine Di Phosphate  
ANOVA: ANAlasis Of VAriance between groups  
ARN: Acide RiboNucléique  
ARNm: Acide RiboNucléique Messenger  
ATCase: Aspartate TransCarbamylase  
BAPNA: Benzoyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide  
BES: Bis(2 hydroxyethyl)-2 -aminoEthaneSulfonic  
BSA: Bovine Serum Albumin  
CCK: CholeCystoKinine  
CIP: Collection de l'Institut Pasteur  
CREC: Centre de Recherche en Environnement Côtier  
DMSO: DiMethyl SulfOxide  
DO: Densité Optique  
EDTA: EthyleneDiamine-Tetraacétique Acid  
EGF: Epidermal Growth Factor  
FAME: Fatty Acids Methylated Extract  
FC: Facteur de Condition  
GRAS: Generally Regarded As Safe  
IFOP: Instrument Financier pour l'Orientalion des Pêches  
IGF: Insuline Growth Factor  
IHS: Indice Hepato-Somatique  
IVS: Indice Viscero-Somatique  
LDH: Lactate DesHydrogenase  
L-DOPA: L-DihydrOxyPhenylAlanine  
MET: Microscopie ElecTronique  
MTT: 3- 4, 5- diMeThylthiazol- 2- yl- 2, 5- diphenyl Tetrazolium  
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form  
OD: Optic Density  
PCB: PolyChloroBiphényle  
PEP: PhosphoEnolPyruvate  
SD: Standard Deviation  
SDS PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
TCA: Trichloroacetic acid  
TSB: Tryptic Soy Broth  
UMIP: Collection des Champignons de l'Institut Pasteur

## **Index des figures :**

Figure 1: Cycle de migration de <i>Sepia officinalis</i> (Boucaud-Camou and Boismery, 1991).	4
Figure 2: Débarquements (en tonnes) de seiches en Manche par pays exploitant entre 1996 et 2003 (Anonyme, 2005).	5
Figure 3: Section transversale de <i>Sepia officinalis</i> montrant les structures et organes qui constituent le viscéropallium (modifiée d'après Mangold <i>et al.</i> , 1989).	6
Figure 4: Vue ventrale de l'appareil génital femelle de <i>Sepia officinalis</i> (modifiée d'après Mangold <i>et al.</i> , 1989).	7
Figure 5: Schéma du système digestif de <i>Sepia officinalis</i> (modifié d'après Mangold et Bidder, 1989).	8
Figure 6: Méthode de transformation de la seiche selon la méthode italienne. Ex. Coopérative Granvilmer (Basse Normandie, France).	14
Figure 7: Système fabrication de farines, autolysats, ensilages ou hydrolysats.	15
Figure 8: Cathepsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	24
Figure 9: Cathepsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	24
Figure 10: Total acid proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	26
Figure 11: Total acid proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	26
Figure 12: Total alkaline proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	27
Figure 13: Total alkaline proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	28
Figure 14: Trypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	29
Figure 15: Trypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	29
Figure 16: Chymotrypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	30
Figure 17: Chymotrypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	31
Figure 18: Lipase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	31
Figure 19: Lipase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	32

Figure 20: Amylase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).	33
Figure 21: Amylase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).	33
Figure 22: a) Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Effect of storage temperature on molecular weight of peptides and proteins between the cuttlefish death to 24 hours. – 0 minutes, ___ 24 hours at 4°C, - - 24 hours at 25°C.	35
Figure 23: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'évolution post-mortem de la qualité des viscères de seiches.	37
Figure 24: a) Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Elution profile of peptides and proteins in viscera from live cuttlefish. –, viscera from auction - - -, viscera from factories .....	47
Figure 25: Elution profile of peptides and proteins in viscera (absorbance at 280 nm).	48
Figure 26: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'impact du stockage et de la transformation sur la qualité des viscères de seiches.	53
Figure 27: a) Calibration de la colonne Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Poids moléculaire des protéines et peptides dans les ensilages fabriqués à 4°C à 0 jours: , 2 mois: ___ , 8 mois: __ ou 12 mois: après production.	58
Figure 28: Poids moléculaire des protéines et peptides dans les ensilages fabriqués à 25°C à 0 jours: , 2 mois: ___ , 8 mois: __ ou 12 mois: après production.	58
Figure 29: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant la fabrication des ensilages de viscères de seiches.	68
Figure 30: Structure typique d'une bactérie (Purves <i>et al.</i> , 2006).	73
Figure 31: Schéma d'une levure (Guery and Mcirdi, 2006).	74
Figure 32: Table d'agitation permettant la culture des micro-organismes.	81
Figure 33: Technique turbidimétrique de la mesure de la biomasse (Delignette-Muller, 1995).	82
Figure 34: Schéma d'une cinétique théorique simplifiée de croissance d'un micro-organisme.	82
Figure 35: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de LBBMA25.	84
Figure 36: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de caséine.	85
Figure 37: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de soja.	86
Figure 38: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de viande.	87
Figure 39 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	88
Figure 40 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	88
Figure 41 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Escherichia coli</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	89
Figure 42 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Proteus mirabilis</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	90
Figure 43 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Proteus vulgaris</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	90
Figure 44 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Lactococcus lactis</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	91
Figure 45 : Cinétique de croissance de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	92
Figure 46 : Cinétique de croissance de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur différents milieux de culture. LBBMA25 Caséine Soja Viande .	92
Figure 47: Synthèse des résultats obtenus concernant l'utilisation des ensilages en tant que peptones pour micro-organismes.	99
Figure 48- Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Shrimps proteins molecular weight repartition using gel filtration. –: Simple frozen shrimps, ___ :Frozen shrimps enriched with LBBMA4, - -: Frozen shrimps enriched with silage LBBMA25, “clear grey bar”: LBBMA4, “dark grey bar” :LBBMA25.	112
Figure 49- Weight (g) and conversion rate (%) of cuttlefish according to their diets. Weight of cuttlefish fed with simple fed: “white bar”, with fed enriched with LBBMA4: “clear grey	

bar”, with fed enriched with LBBMA25: “dark grey bar”. –: Ration of cuttlefish fed with simple fed, ___ ___ : with fed enriched with LBBMA4, - -: with fed enriched with LBBMA25. *: Significantly different from control (p < 0.05).	112
Figure 50 : Structures d’élevage des juvéniles de seiches du CREC de Luc sur Mer.	118
Figure 51 : Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l’utilisation des ensilages de viscères de seiches en enrichissement de l’alimentation de juvéniles de seiches <i>Sepia officinalis</i> .	119
Figure 52 : Weight of shrimp post-larvae according to their diet (mg) during rearing. A ) Diet A: , Diet 4-1: , Diet 4-2: , Diet 4-5: Diet 4-10: . B ) Diet A : , Diet 25-1: , Diet 25-2: , Diet 25-5: , Diet 25-10: *: Significantly different from control diet (p<0.05).	127
Figure 53: Weight of shrimp post-larvae according to their diet (mg) after 60 days of rearing. A ) Diet enriched with LBBMA4. B ) Diet enriched with LBBMA25. *: Significantly different from control diet (p < 0.05).	128
Figure 54 : Photo des crevettes <i>Penaeus japonicus</i> après 60 jours d’élevage en fonction de l’aliment reçu.	132
Figure 55 : Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l’utilisation des ensilages de viscères de seiches en enrichissement de l’alimentation de post larves de crevette <i>Penaeus japonicus</i> .	133
Figure 56 : Les différents stades biologiques de l’élevage du bar <i>Dicentrarchus labrax</i> .	136
Figure 57 : Photos de la structure d’élevage des juvéniles de bars.	138
Figure 58: a) Illustration des mesures de longueur (Lt) et de largeur (l) effectuées sur les juvéniles de bars. b) Mesure de la longueur totale (It) l’intestin après dissection Cp : Caeca pyloriques, E : estomac, Ia : Intestin antérieur, Ip : Intestin postérieur.	140
Figure 59: Types de malformations. A) ventrale (obésité). B) dorsale (spinose). C) operculaire (opercule absent).	141
Figure 60: Correspondance poids/âge entre les 3 élevages. Elevage 1 : , élevage 2 : , élevage 3 : .	142
Figure 61: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l’élevage 1 en fonction des différents aliments. Témoin ,LBBMA4 10 % ,LBBMA25 10% . *: significativement différent du témoin (p<0,05).	142
Figure 62: Photo des juvéniles de bars en fin de l’expérience 1.	144
Figure 63: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l’élevage 2 en fonction des différents aliments. Témoin ,Gabolysat , PC60 ,LBBMA25 5% . *: significativement différent du témoin (p<0,05).	145
Figure 64: Photo des juvéniles de bars en fin de l’expérience 2.	146
Figure 65: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l’élevage 3 en fonction des différents aliments. Témoin ,LBBMA25 2% . *: significativement différent du témoin (p<0,05).	147
Figure 66: Photo des juvéniles de bars en fin de l’expérience 3.	148
Figure 67: Synthèse des résultats obtenus concernant l’utilisation des ensilages en complément alimentaire des juvéniles de bars <i>Dicentrarchus labrax</i> .	155
Figure 68: Principe du bio-essai de cellules isolées de glande digestive de seiche (Le Bihan <i>et al.</i> , 2004).	165
Figure 69: Schéma de synthèse de l’étude de l’effet des ensilages ou facteurs de croissance sur les cellules isolées de la glande digestive de seiche.	175
Figure 70: Principe du bio-essai d’ <i>Artemia salina</i> (Frouël <i>et al.</i> , 2005).	179
Figure 71: Différents stades de nauplii d’ <i>Artemia salina</i> au cours de son développement (Sorgeloss, 2006).	180
Figure 72: a) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA4 testé. b) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA25 testé. c) Activité de l’amylase en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA4 testé. d) Activité de l’amylase en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA25 testé.	184
Figure 73: Répartition en poids moléculaire des protéines en fonction de la fraction.	185
Figure 74: a) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA4 testé en comparaison au témoin . b) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l’ensilage LBBMA25. testé en comparaison au témoin . c) Activité de	

l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 testé en comparaison au témoin . d) Activité de l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 testé en comparaison au témoin .	186
Figure 75: Schéma de synthèse de l'étude de l'effet des ensilages ou hormones sur la sécrétion d'enzymes digestives chez l'artémie.	191
Figure 76: Illustration des segments de découpe des juvéniles de bars. T : « Segment Tête », P : « Segment Pancréatique (Cœur, Estomac, Foie)», I : « Segment Intestin » et Q : « Segment Queue ». (D'après Cahu <i>et al.</i> , 1994).	193
Figure 77: Anatomie générale du tractus digestif de <i>Dicentrarchus labrax</i> . A : Anus, Cp : Caeca pyloriques, E : estomac, F : Foie, Ia : Intestin antérieur, Ip : Intestin postérieur, O : Œsophage, R : Repli intestinal, V : Vessie natatoire.	194
Figure 78: Calcul de la proportion relative de cellules à mucus (M) par rapport au nombre total d'entérocytes (E).	195
Figure 79: Structure histologique des villosités intestinales au niveau des caeca pyloriques après 42 jours d'élevage (x40). a) segments Y des bars témoins. b) segments Z des bars témoins. c) segments Y des bars LBBMA25. d) segments Y des bars LBBMA25. e) segments Y des bars Gabolysat. f) segments Y des bars Gabolysat. g) segments Y des bars PC60. h) segments Z des bars PC60. L : Lumière intestinale ; Lb : Lame basale ; ↓ : Cellule à mucus ou caliciforme ; * : Noyau entérocytaire ; Vi : Villosité intestinale.	199
Figure 80: Ultrastructure intestinale à 56 jours d'élevage. a) poissons témoins b) poissons LBBMA25 c) poissons Gabolysat d) poissons PC60. B : Bordure en brosse ; Ce : Canal excréteur de mucus ; Gm : Grains de mucine ; L : Lumière intestinale ; Ly : Lysosomes secondaires ; Mu : Cellule à mucus ou caliciforme ; Pt : Plateau terminal ; ∨ : Jonctions intercellulaires.	200
Figure 81: Ultrastructure intestinale à 103 jours d'élevage. a) poissons témoins b) poissons LBBMA25 c) poissons Gabolysat d) poissons PC60. B : Bordure en brosse ; Cd : Chromatine décondensée ; Ce : Canal excréteur de mucus ; Gm : Grains de mucine ; L : Lumière intestinale ; Ly : Lysosomes secondaires ; Mt : Mitochondries à crête tubulaire ; Mu : Cellule à mucus ou caliciforme ; N : Noyau cellulaire ; Ve : Vésicules d'endocytose ; Pt : Plateau terminal ; ∨ : Jonctions intercellulaires.	201
Figure 82: Ultrastructure intestinale des poissons à 56 jours d'élevage. Mesure de la longueur des microvillosités. a) Animaux recevant l'aliment témoin. b) Animaux recevant l'aliment PC60. c) Animaux recevant l'aliment Gabolysat. d) Animaux recevant l'aliment LBBMA25.	202
Figure 83: Tailles de microvillosités (µm) des juvéniles de bars après 56 jours d'élevage en fonction de l'alimentation reçue. * : significativement différents du témoin (p>0,05).	202
Figure 84: Schéma de synthèse de l'étude de l'effet des ensilages sur la capacité digestive et l'ontogenèse du système digestif de juvéniles de bars.	210
Figure 85 : Schéma des reins ainsi que les principales veines rénales, chez le bar <i>Dicentrarchus labrax</i> (Grassi Milano <i>et al.</i> , 1997).	215
Figure 86: Illustration de la méthode de diffusion sur agar pour la quantification des activités anti-microbiennes. Si = surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ). Les flèches indiquent la diffusion à travers la gélose (Frouël, 2006).	218
Figure 87 : Morphogenèse du rein céphalique chez les juvéniles de bars ayant reçus divers aliments (*40). a) Animaux témoins après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours). b) Animaux témoins après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours). c) Animaux témoins après 72 jours d'élevage (âge : 132 jours). d) Animaux LBBMA25 5% après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours). e) Animaux LBBMA25 5% après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours). f) Animaux LBBMA25 5% après 72 jours d'élevage (âge : 132 jours). h : tissu hématopoïétique ; mé : mélano-macrophages ; tu : tubules rénaux ; vc : veine cardinale.	220
Figure 88 : Morphogenèse du rein céphalique chez les juvéniles de bars ayant reçus divers aliments (*40). a) Animaux témoins après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours). b) Animaux témoins après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours). c) Animaux LBBMA25 5% après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours). d) Animaux LBBMA25 5% après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours). h : tissu hématopoïétique ; mé : mélano-macrophages ; tu : tubules rénaux ; vc : veine cardinale.	221

Figure 89 : Activité lysozymale détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours).....ou 56 _____ jours d'élevage (âge : 131 jours).	222
Figure 90: Activité phénoloxydase détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours) .....ou 56 _____ jours d'élevage (âge : 131 jours). * : significativement différent du témoin.	223
Figure 91: Activité anti-protéase détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours).....ou 56 _____ jours d'élevage (âge : 131 jours). * : significativement différent du témoin.	223
Figure 92 : Synthèse des résultats obtenus concernant l'action d'enrichissement sur le système immunitaire de juvéniles de bars <i>Dicentrarchus labrax</i> .	229
Figure 93: <i>Haliotis tuberculata</i> (source Haliotis-tuberculata..fr).	230
Figure 94: Morphologie des hémocytes en culture primaire. a) Cellules à aspect fibroblaste-like. b) Cellules à aspect épithéliale-like.	231
Figure 95: Principe du bio-essai d'hémocytes d'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> (Giard, 1996).	233
Figure 96 : Photos des hémocytes après 72 heures de culture selon différentes mises en culture (*40). a) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe. b) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. c) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml.. d) Mise en culture modifiée. e) Mise en culture modifiée en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. f) Mise en culture modifiée en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml.	236
Figure 97: Photos d'agrégats hémocytaires. a) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe. b) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. c) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml..	237
Figure 98: Activité lysozymale en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	238
Figure 99: Activité lysozymale en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	239
Figure 100: Activité phénoloxydase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	240
Figure 101: Activité phénoloxydase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	240
Figure 102: Activité anti-protéasique en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % d'inhibition). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	241
Figure 103: Activité anti-protéasique en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % d'inhibition). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	242
Figure 104: Surface des cellules en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin ). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	243
Figure 105: Surface des cellules en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin ). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	244
Figure 106: Proportion des cellules fibroblastes-like en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en %). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	245
Figure 107: Proportion des cellules fibroblastes-like en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en %). Témoin      Ensilage      . * : significativement différents du témoin (p>0,05).	245
Figure 108 : Gel SDS-PAGE. Les échantillons correspondant à chaque ligne sont : A) Poids moléculaires standards (de 250 to 10 kDa). B) Tapis cellulaire de cellules témoins mises en culture modifiée. C) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture modifiée. D) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture modifiée. E) Tapis cellulaire de cellules témoin mises en culture classique. F) Tapis	



cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture classique. G) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture classique. H) Poids moléculaires standards (range 250 to 10 kDa).

248

Figure 109 : Gel SDS-PAGE. Les échantillons correspondant à chaque ligne sont : A) Poids moléculaires standards (de 250 to 10 kDa). B) Milieu de culture de cellules témoins mises en culture modifiée. C) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture modifiée. D) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture modifiée. E) Milieu de culture de cellules témoin mises en culture classique. F) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture classique. G) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture classique. H) Poids moléculaires standards (range 250 to 10 kDa).

248

Figure 110 : Synthèse des résultats obtenus concernant la recherche dans les ensilages de molécules bio-actives sur le système immunitaire.

254

## **Index des tableaux :**

Tableau 1: Effect of storage temperature on pH, TCA soluble proteins and molecular weight of peptides and proteins. Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).	25
Tableau 2: Effect of different storage treatments on cuttlefish viscera. *: Significantly different from viscera from live cuttlefish ( $p < 0.05$ ).	45
Tableau 3: Impact of storage time and defrosting temperature on cuttlefish viscera.	46
Tableau 4: Cuttlefish viscera oil composition (% of total oil extracted). *: Significantly different from viscera from live cuttlefish ( $p < 0.05$ ).	51
Tableau 5: Evolution biochimique des ensilages au cours de leur fabrication. *: Différences significatives par rapport au jour 0 ( $p < 0,05$ ).	59
Tableau 6: Composition des ensilages après lyophilisation. *: Différences significatives ( $p < 0,05$ ).	60
Tableau 7: Stabilité des ensilages depuis 0 à 12 mois après la production. *: Différences significatives par rapport au jour 0 ( $p < 0,05$ ).	61
Tableau 8: Composition en acides gras des viscères issus de la transformation et des ensilages (%).	62
Tableau 9: Caractéristiques des différents micro-organismes choisis.	79
Tableau 10: Caractéristiques des peptones utilisées dans cette étude.	80
Tableau 11- Short presentation of the silages used in this study.	107
Tableau 12- Specific activity (Unity/mg of proteins) of digestive enzymes of cuttlefish according to their diets.	113
Tableau 13- Shrimps composition on HMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$ of dry weight), LMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$ of dry weight), total carbohydrates ( $\text{g}/100\text{g}$ of dry weight) proteins ( $\text{g}/100\text{g}$ of dry weight) and lipids ( $\text{mg/g}$ of dry weight)	114
Tableau 14: Presentation of the silages used in this study.	125
Tableau 15: Composition of the nine compound diets (%).	125
Tableau 16: Survival of shrimp post- larvae according to their diet (%).*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).	126
Tableau 17: Weight of shrimp post larvae according to diet (% of control group) after 30 days of rearing. (%).*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).	128
Tableau 18 : Composition des aliments (%).	137
Tableau 19: Correspondance poids/âge et temps d'élevage entre les différentes expérimentations.	141
Tableau 20: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 1. *: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	143
Tableau 21: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 2. *: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	146
Tableau 22: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 3. *: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	148
Tableau 23: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 1 en fonction de l'aliment reçu. * : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	149
Tableau 24: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 2 en fonction de l'aliment reçu. * : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	149
Tableau 25: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 3 en fonction de l'aliment reçu. * : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	150
Tableau 26: Qualité de la chair des juvéniles à la fin de l'expérimentation 1 en fonction de l'aliment reçu. * : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).	150
Tableau 27: Influence de l'EGF, l'IGF-I ou de l'insuline sur le MTT, l'activité pyruvate Kinase, l'incorporation de la leucine $^3\text{H}$ , l'incorporation des acides aminés $^3\text{H}$ , l'incorporation de la thymidine $^3\text{H}$ et de l'activité de l'ATCase (% d'augmentation par rapport aux cellules témoins). *: significativement différents des cellules témoins ( $p < 0.05$ ).	169
Tableau 28: Influence des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 sur le MTT, l'activité pyruvate Kinase, l'incorporation de la leucine $^3\text{H}$ , l'incorporation des acides aminés $^3\text{H}$ ,	

l'incorporation de la thymidine <sup>3</sup> H et de l'activité de l'ATCase (% d'augmentation par rapport aux cellules témoins). *: significativement différent des cellules témoins (p<0.05).	170
Tableau 29: Activité de l'amylase en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en lysats. *: significativement différent du témoin (p<0,05).	182
Tableau 30: Activité de la trypsine en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en lysats. *: significativement différent du témoin (p<0,05).	182
Tableau 31: Activité de l'amylase en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en hormones. *: significativement différent du témoin (p<0,05).	183
Tableau 32: Activité de la trypsine en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en hormones. *: significativement différent du témoin (p<0,05).	183
Tableau 33: Activité spécifique des phosphatases acides (U*10 <sup>-5</sup> ) au cours du temps et en fonction des traitements. Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA p>0,05).	196
Tableau 34: Activité spécifique de l'amylase (U*10 <sup>-5</sup> ) au cours du temps et en fonction des traitements Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA p>0,05).	196
Tableau 35: Activité spécifique de la trypsine (U*10 <sup>-5</sup> ) au cours du temps et en fonction des traitements Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA p>0,05).	197
Tableau 36: Résultats d'histologie semi-quantitative (% de cellules à mucus parmi les cellules épithéliales) au niveau des segments Y et Z des juvéniles de bars. *: significativement différents (p>0,05) du témoin.	198
Tableau 37 : Activité anti-microbienne contre les pathogènes <i>Vibrio carchariae</i> et <i>Vibrio amguillarum</i> , détectée au niveau du sérum de juvéniles de bars recevant différents aliments, à 28 ou 56 jours d'élevage. *: significativement différent du témoin.	224
Tableau 38 : Impact de la méthode de mise en culture des hémocytes sur différentes activités impliquées dans l'immunité. *: significativement différent du témoin.	242
Tableau 39 : Surface d'inhibition du pathogène <i>Vibrio carchariae</i> en présence des ensilages ou de l'acide lactique après 48 heures de mise en culture des bactéries.	246
Tableau 40 : surface d'inhibition du pathogène <i>Vibrio carchariae</i> en présence du milieu de culture ou du tapis cellulaire d'hémocytes, ayant reçu ou non des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 au cours de leur culture, après 48 heures de mise en culture des bactéries.	246
Tableau 41: surface d'inhibition du pathogène <i>Vibrio carchariae</i> en présence du milieu de culture ou du tapis cellulaire d'hémocytes, ayant reçu différentes fractions des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 au cours de leur culture, après 48 heures de mise en culture des bactéries.	247



# Introduction Générale

## **Plan de l'introduction générale :**

### I DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE : *SEPIA OFFICINALIS* (LINNE, 1758)

#### A. Généralités

1. Classification
2. Habitat et mode de vie
3. Exploitation de la seiche en Manche

#### B. Anatomie et physiologie de la seiche

1. Le céphalopodium
2. Le viscéropallium
3. L'appareil reproducteur
4. L'appareil digestif

### II CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

### III BUT DE L'ETUDE

# **I Description de l'espèce étudiée : *Sepia officinalis* (Linné, 1758)**

## **Généralités**

### **1. Classification**

Embranchement : mollusques

Classe: céphalopodes

Ordre: coléoïdés

Famille: sépiidés

Genre: *Sepia*

Espèce: *officinalis*



Les céphalopodes sont caractérisés par le rattachement des pieds à la tête (céphalopodium). De plus, ils possèdent une coquille, soit externe comme chez le nautilus soit interne comme chez la seiche, le calmar et le poulpe. Ces animaux sont particulièrement évolués et représentent le sommet de l'évolution chez les mollusques. De cette manière, ils sont dotés d'un système nerveux développé contenu dans un cartilage céphalique et sont capables d'apprentissage (Dickel *et al.*, 2001; Agin *et al.*, 2006). En conséquence, même si les céphalopodes ont gardé des caractéristiques appartenant aux mollusques, certains mécanismes sont comparables à ceux des poissons (Mangold *et al.*, 1989; Rocha *et al.*, 2001; Perrin, 2004). De ce fait, les céphalopodes sont étudiés pour de nombreuses raisons commerciales et scientifiques (Boletzky, 2003).

### **2. Habitat et mode de vie**

La répartition géographique de *Sepia officinalis* est étendue puisqu'elle occupe l'est de l'Atlantique, la mer Baltique jusqu'au nord de l'Afrique, ainsi que la Méditerranée et la zone des Açores (Boletzky, 1983; Boyle and Boletzky, 1996; Guerra, 2006). *Sepia officinalis* est une espèce necto-benthique pouvant vivre jusqu'à des profondeurs avoisinant 200 mètres, avec une plus forte abondance aux alentours de 100 mètres (Royer, 2002; Guerra, 2006).

La seiche effectue des migrations saisonnières très marquées (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). En Manche, les populations de seiches effectuent d'importantes migrations qui les éloignent des côtes en hiver (Figure 1). En revanche, les seiches sont présentes à la côte depuis avril jusqu'en octobre. Les animaux se reproduisent au printemps puis meurent. A

partir d'octobre, les animaux de l'année et ceux de l'année précédente effectuent une lente migration d'est en ouest le long de la fosse centrale de la Manche. Au printemps la migration de retour à la côte semble au contraire très rapide (Boucaud-Camou and Boismery, 1991).

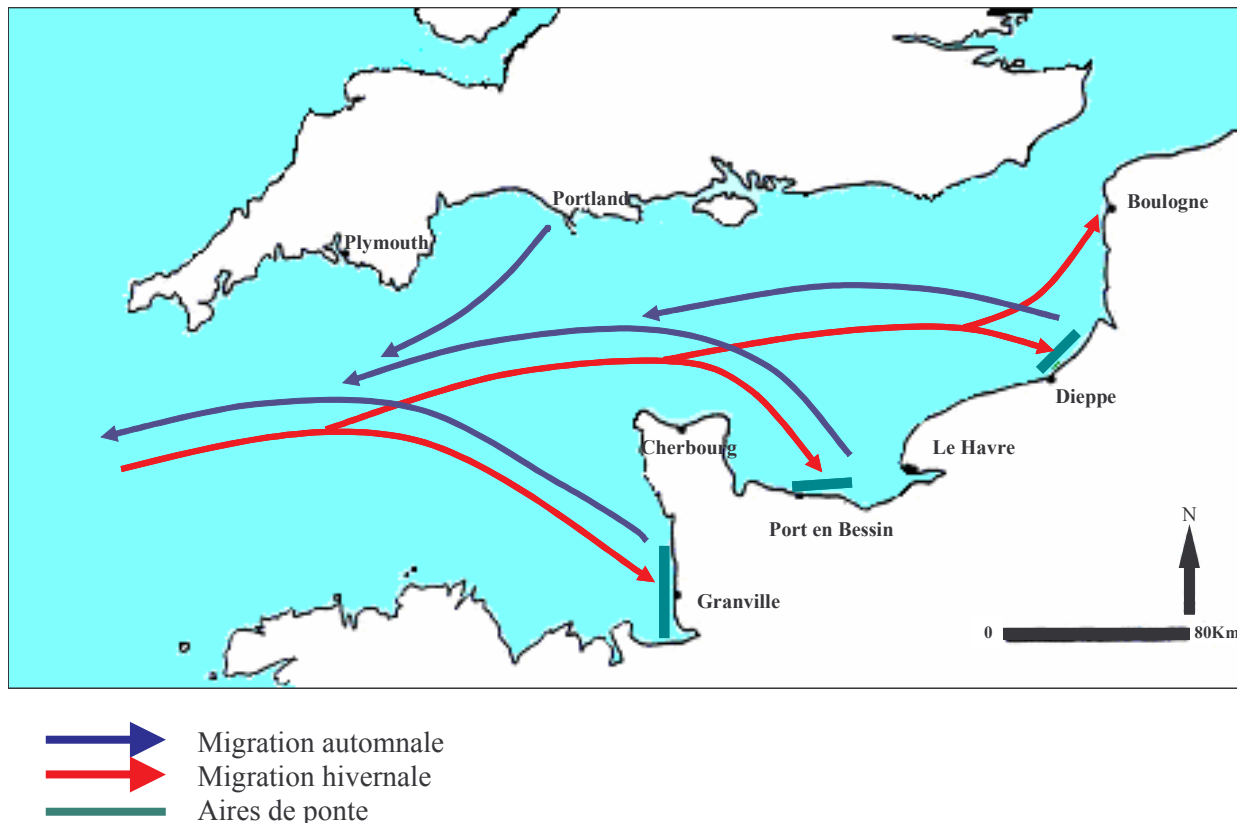


Figure 1: Cycle de migration de *Sepia officinalis* (Boucaud-Camou and Boismery, 1991).

### 3. Exploitation de la seiche en Manche

Depuis les années 1960, une progression nette de la production mondiale de céphalopodes a été constatée parallèlement au déclin des stocks de poissons démersaux (qui vivent à proximité du fond). Cette augmentation est liée à deux phénomènes : un intérêt accru pour cette ressource considérée comme une ressource alternative et un fort accroissement de son abondance souvent expliqué par la diminution de la plupart des espèces de poissons exploitées (Royer, 2002).

Les céphalopodes sont principalement pêchés par des chalutiers en Manche (Royer, 2002). Néanmoins, ils sont également pêchés par la plupart des engins : filets, casiers, dragues. La pêche de la seiche en Manche présente un schéma saisonnier très marqué lié aux phénomènes de migration de l'espèce et à la saisonnalité de l'abondance (Denis and Robin, 2001; Royer, 2002). En automne, la seiche est intensément exploitée par les chalutiers pendant leur migration vers les zones hauturières d'hivernage. En hiver, les captures sont peu nombreuses tandis qu'au printemps les seiches sont à nouveau pêchées par les chalutiers et les



caseyeurs. Ces derniers sont surtout présents sur les côtes françaises et principalement la côte bas-normande.

L'exploitation annuelle des seiches permet l'obtention de 2 500 à 15 000 tonnes en Manche. Cette forte variabilité à plusieurs origines : un cycle de vie très court, une reproduction saisonnière et une mortalité plus ou moins importante de la population adulte après la reproduction (Boyle and Boletzky, 1996). Le pays exploitant majoritairement les céphalopodes en Manche est la France. Elle réalise en moyenne 73,7% des débarquements de seiches (Figure 2).

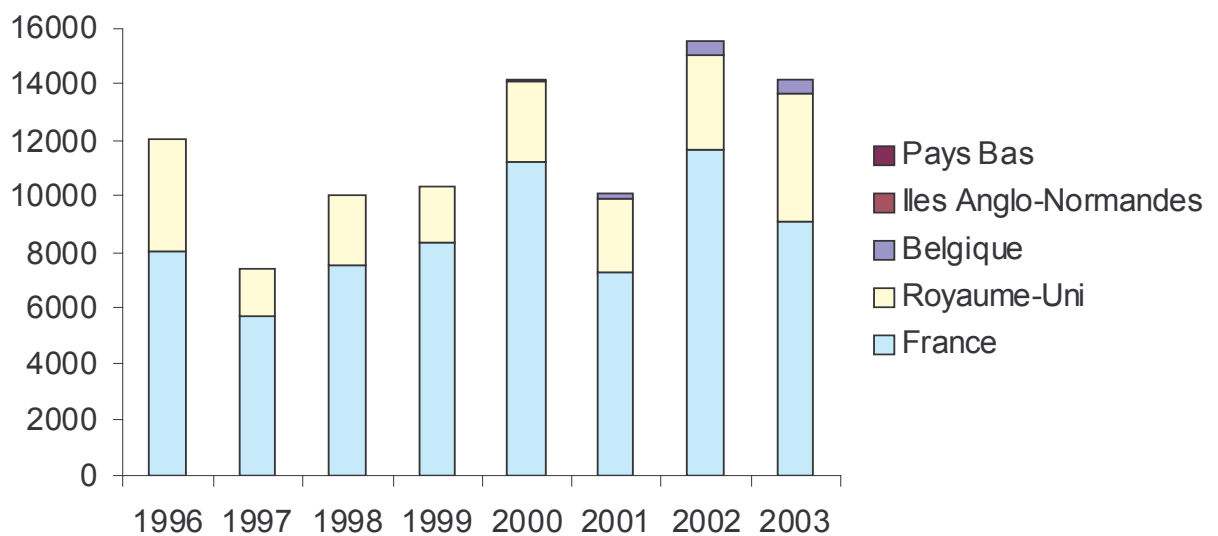


Figure 2: Débarquements (en tonnes) de seiches en Manche par pays exploitant entre 1996 et 2003 (Anonyme, 2005).

En terme de valeur économique, la production moyenne (1989-2002) de céphalopodes représentent 10 millions d'euros pour la France (Challier, 2005). En Basse-Normandie, première région française en ce qui concerne la production de seiches, cette espèce se situe à la deuxième place et contribue jusqu'à 35% du chiffre d'affaires des chalutiers côtiers au printemps (Royer, 2002).

## **Anatomie et physiologie de la seiche *Sepia officinalis***

### **1. Le céphalopodium**

Le céphalopodium comprend la tête, l'appareil brachial et l'entonnoir. Chez les céphalopodes, les ganglions cérébroïdes, palléo-viscéraux et pédieux sont fusionnés en un

système nerveux central céphalisé qui, sur un plan anatomique, est composé de 2 parties : le cerveau et les lobes optiques (Bernay, 2005). Le cartilage céphalique est une structure complexe qui protège le cerveau et certains organes des sens. La couronne brachiale entoure la masse buccale (Mangold *et al.*, 1989).

## 2. Le viscéropallium

Le viscéropallium comprend la coquille, le manteau, les nageoires, les organes de la cavité palléale et la masse des viscères (Figure 3).

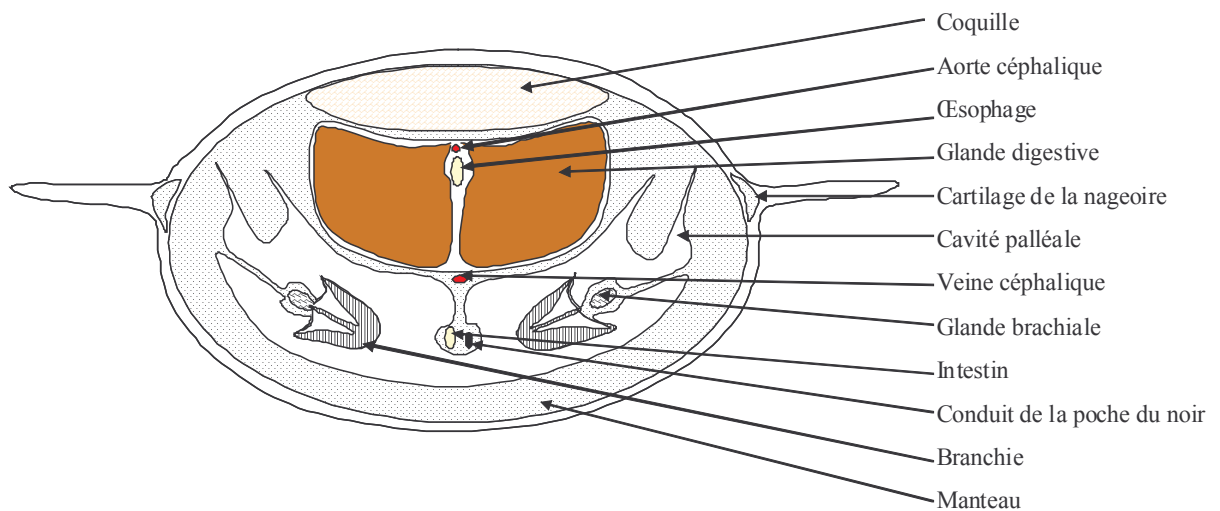


Figure 3: Section transversale de *Sepia officinalis* montrant les structures et organes qui constituent le viscéropallium (modifiée d'après Mangold *et al.*, 1989).

Chez tous les céphalopodes, la cavité palléale ventrale est spacieuse, contenant la partie interne de l'entonnoir, les branchies, l'anus, les orifices rénaux et génitaux (Mangold *et al.*, 1989).

## 3. L'appareil reproducteur

Chez les céphalopodes, les sexes sont bien séparés et stables (Richard, 1971). Chez le mâle, le testicule débouche sur un gonoducte, impliqué dans la formation des spermatophores (Bernay, 2005). Après leur élaboration, les spermatophores sont accumulés dans la poche de Needham avant d'être évacués par les contractions musculaires du pénis. Un bras modifié, le bras héctocotyle, assure le transfert des spermatophores à l'intérieur de la poche sous buccale de la femelle lors de l'accouplement.

Chez la femelle (Figure 4), les organes sexuels comprennent l'ovaire, l'oviducte, la glande de l'oviducte, les glandes nidamentaires principales et accessoires (Bernay, 2005). Ces

glandes peuvent atteindre des dimensions considérables chez les animaux mûrs (Mangold, 1989).

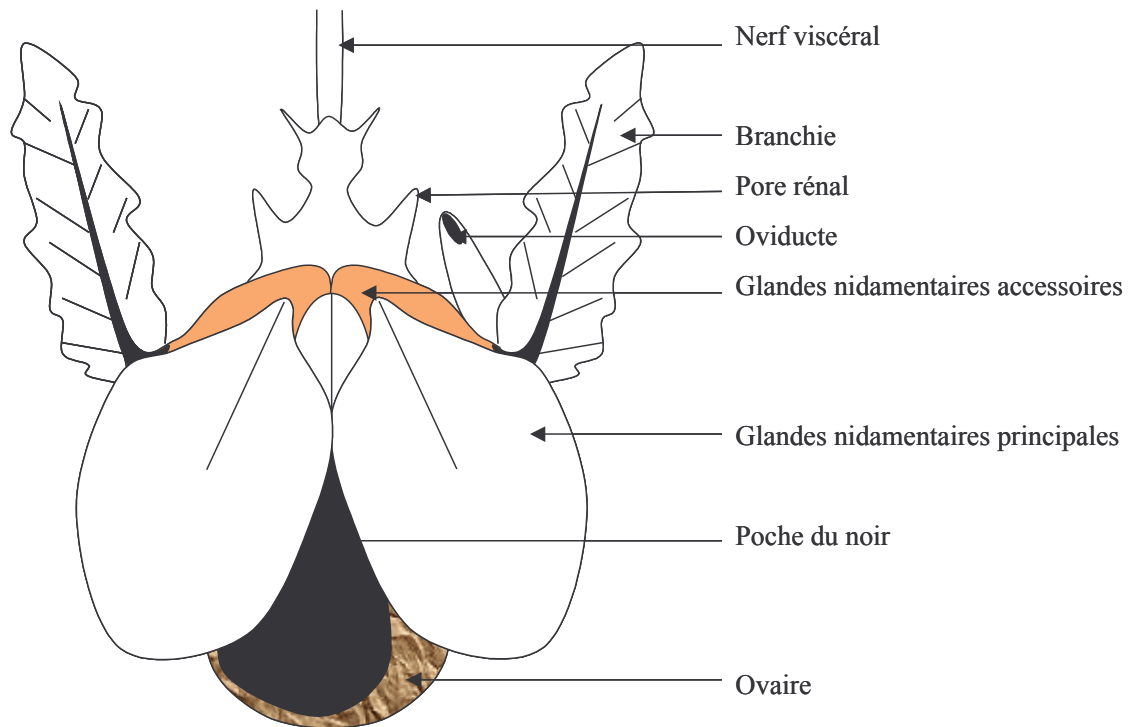


Figure 4: Vue ventrale de l'appareil génital femelle de *Sepia officinalis* (modifiée d'après Mangold *et al.*, 1989).

#### **4. L'appareil digestif**

Les céphalopodes sont des prédateurs actifs macrophages. L'appareil digestif est composé du bulbe buccal, des glandes associées au bulbe buccal, du tube digestif, de la glande digestive et des appendices des canaux digestifs (Figure 5). Chez ces animaux, les organes de digestion sont disposés en U.

La digestion débute au niveau du bulbe buccal qui sert à déchiqueter les proies mécaniquement mais aussi à l'aide d'enzymes sécrétées par les glandes salivaires postérieures (Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983; Koueta, 1983; Koueta and Boucaud-Camou, 1986; Perrin, 2004). Ensuite, la nourriture transite par l'oesophage vers l'estomac et les débris non digérables sont directement évacués vers l'intestin. L'estomac, très musculueux, broie les aliments qui vont aussi subir l'action des enzymes sécrétées par la glande digestive (digestion extracellulaire). Le bol alimentaire passe ensuite directement dans la glande digestive et dans le caecum où se poursuit la digestion intracellulaire. L'absorption se déroule dans la glande

digestive, les appendices de la glande digestive et le caecum. En effet, l'intestin des invertébrés, contrairement à celui des vertébrés ne possède pas de propriétés d'absorption. Les résidus issus de la digestion intracellulaire forment des corps bruns dans la glande digestive, qui sont évacués par l'intestin.

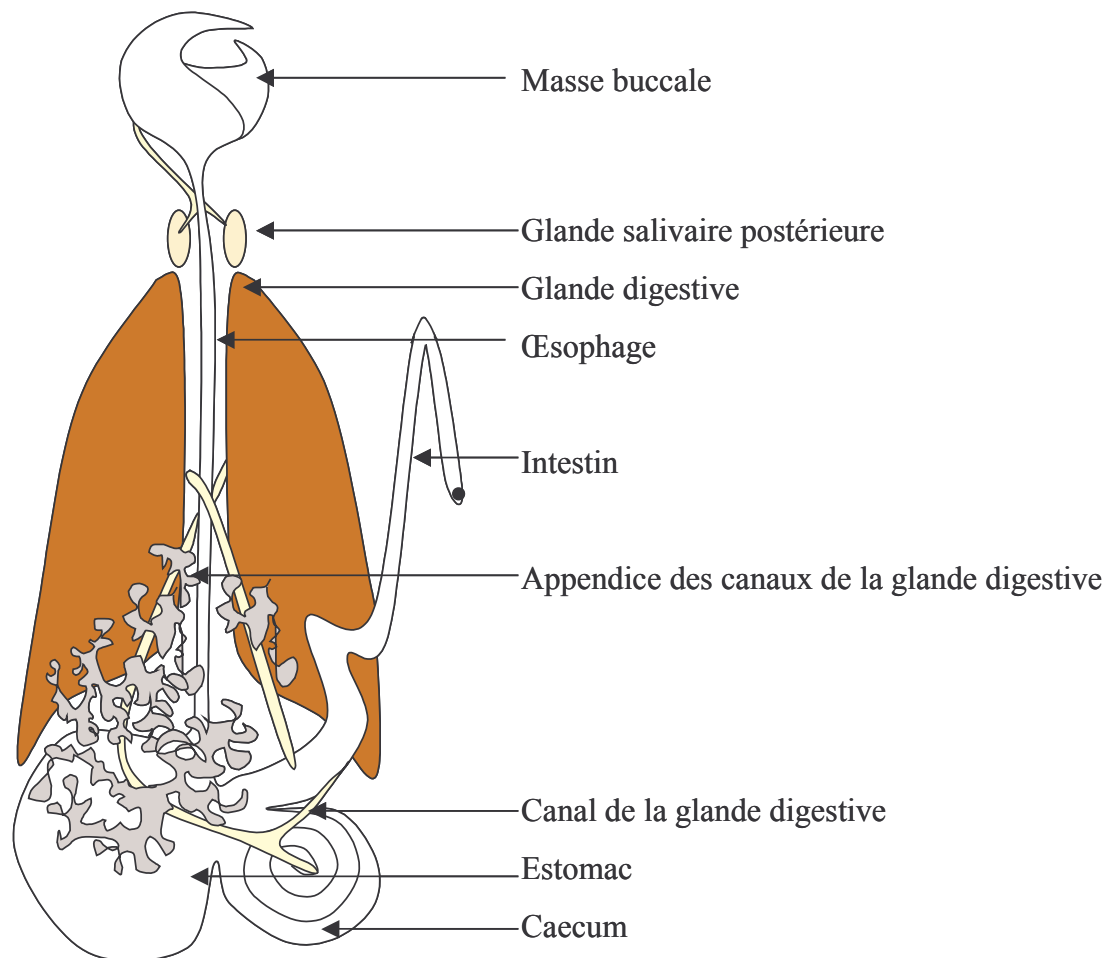


Figure 5: Schéma du système digestif de *Sepia officinalis* (modifié d'après Mangold et Bidder, 1989).

## **II Contexte général de l'étude**

La France est le premier producteur européen de seiches (5<sup>ème</sup> rang mondial) avec 12 300 tonnes en 2001. En Basse-Normandie, les débarques de céphalopodes constituent une part majeure de la pêche. La seiche représente la ressource qui produit le plus important chiffre d'affaires avec la coquille Saint-jacques et le bulot.

L'exploitation croissante des céphalopodes entraîne l'installation progressive des industries de transformation dans la région car l'exportation de la seiche se fait de plus en plus sous forme congelée, pelée et éviscérée. Ce mode d'exportation actuel génère une grande quantité de déchets avec des coûts d'enlèvement considérables. Les co-produits de la pêche des céphalopodes sont donc des matières premières obtenues en grande quantité et qui représentent une charge importante pour les entreprises transformatrices. Apporter des solutions de valorisation de ces co-produits permettrait alors de diminuer les coûts liés à la transformation des seiches et répondrait à une attente forte des industriels régionaux. Les co-produits de la pêche des céphalopodes sont donc des matières premières largement disponibles en Basse-Normandie et pour lesquels de nombreuses valorisations sont envisageables tant en alimentation animale ou humaine, en cosmétique qu'en médecine. Ainsi, les produits de la mer sont de plus en plus utilisés en médecine, cosmétologie et nutrition. Ils sont présents dans les aliments, les produits diététiques, les compléments alimentaires, certains médicaments ou encore des produits cosmétiques. Des procédés tels que l'hydrolyse ou l'autolyse sont utilisés pour valoriser les déchets de poissons. En effet, l'industrie alimentaire, pour élargir sa gamme de produits et fabriquer des produits de remplacement, a besoin de disposer de toutes sortes d'additifs ou d'ingrédients (Bourgeois and Leroux, 1982). Cette demande s'exprime en termes fonctionnels, c'est à dire que ces composés doivent répondre à une fonction précise (croissance, survie, qualité, métabolisme...).

### **III But de l'étude**

Ce travail a pour but d'étudier la qualité des co-produits issus de la transformation de la seiche, et sur cette base de développer et proposer des méthodes de valorisation de ces co-produits.

\* Dans un premier temps, nous allons explorer la qualité biochimique et enzymatique des co-produits issus de la transformation de la seiche *Sepia officinalis* afin de connaître les voies de valorisation envisageables.

\* Nous prospecterons les différentes voies d'utilisation des produits développés, *in vitro* puis *in vivo*. Nous chercherons d'abord à connaître l'efficacité des produits en tant

milieu de culture pour micro-organismes. Puis, nous étudierons l'impact de ces ingrédients en tant qu'enrichissements de l'alimentation de post-larves et de juvéniles de crustacés, de mollusques et de poissons.

\* Enfin, certaines molécules bioactives présentes dans les produits développés seront recherchées via l'utilisation de différents bio-essais.

L'organisation de ce manuscrit repose sur des articles intercalés dans le texte et dont les pages ont été re-numéroté pour faciliter au lecteur, l'accès aux illustrations. Afin d'éviter la confusion entre figures et tableaux du texte et de ceux des articles, ceux ci ont été re-numérotés.

# Chapitre 1 : Etude du matériel biologique

LE BIHAN E., ZATYLYNY C., PERRIN A., KOUETA N., (2006). Studies of post-mortem evolution of cuttlefish viscera during their storage at two different temperatures. *Food chemistry*. 98: 39-51

LE BIHAN E., PERRIN A., KOUETA N., (2006) Effect of different storage treatments, period of freezing and defrosting temperature on quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food chemistry*.(accepted).

## **Plan du chapitre 1 :**

### **I INTRODUCTION**

#### A. Contexte économique

1. Les produits de la pêche
2. La seiche

#### B. Voies de valorisation de la masse viscérale de la seiche

1. Les enzymes
2. Les huiles
3. Les lysats

### **II ETUDE DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE DES VISCERES**

#### A. Etude de l'évolution post-mortem des viscères de seiche

1. Introduction
2. Materials and methods
3. Results and discussion
4. Conclusion

#### B. Etude de différents traitements sur la qualité des viscères de seiche

1. Introduction
2. Material and methods
3. Results and discussion
4. Conclusion

### **III PREPARATION D'ENSILAGES ET EFFET DU STOCKAGE**

#### A. Introduction

#### B. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique
2. Fabrication des ensilages
3. Analyses

#### C. Résultats

#### D. Discussion

### **IV CONCLUSION**



# **I Introduction**

## **A. Contexte économique**

### **1. Les produits de la pêche**

L'industrie de transformation des produits de la mer élabore des produits destinés à l'alimentation humaine à partir de différentes variétés de poissons, coquillages, crustacés et mollusques. En 2004, 209 entreprises de transformation et une quarantaine de mareyeurs, ayant également une activité de transformation, ont été recensés en France.

La filière des co-produits est très peu développée en France. De plus, depuis quelques années, les difficultés apparues dans les filières animales concernant l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine et les dioxines, n'ont pas facilité ce processus de valorisation des co-produits issus des industries de transformation animales. En France, il est important de savoir que les producteurs (mareyeurs, saurisseurs, conserveurs...) produisent environ 150 000 tonnes de co-produits par an (viscères, têtes, arêtes et peaux) à partir de 320 000 tonnes de poissons.

La transformation des produits de la mer entraîne donc, pour les usines de transformation, la production d'une quantité importante de déchets. L'évacuation de ces déchets représente un coût annuel élevé.

### **2. La seiche**

Divers déchets sont obtenus au cours de la transformation de la seiche: les viscères, les yeux, le bec, l'os et la peau. En France, les seiches ne sont jamais transformées à bord des bateaux, ni même congelées, elles sont simplement glacées entières et stockées indépendamment du reste de la pêche, pour éviter les salissures dues à l'encre. Une fois à terre, elles sont achetées par les mareyeurs et les usines de transformation sous la criée, puis congelées entières en noir (non lavées) et en blocs. Les blocs de seiches congelées d'origine française sont destinés à être transformés en Italie, en Espagne et en France.

La méthode de transformation italienne (Figure 6) conduit à l'obtention de plusieurs types de déchets. D'abord la peau et le bec, ensuite l'os de seiche, enfin les viscères et les yeux. La peau et les becs constituent environ 8%, l'os environ 7% et la masse viscérale et les yeux plus de 20% du poids total de l'animal (Richard, 2001). Cette dernière est constituée par le système reproducteur, le système digestif, l'appareil cardio-respiratoire et l'appareil excréteur. La masse viscérale est particulièrement riche en enzymes, en protéines et en acides gras poly-insaturés. Nous avons choisi de travailler sur la valorisation des co-produits de la seiche et en particulier

sur sa masse viscérale. En effet, cette dernière possède un fort potentiel en ce qui concerne sa composition biochimique et n'a pour l'instant encore aucun débouché de valorisation.

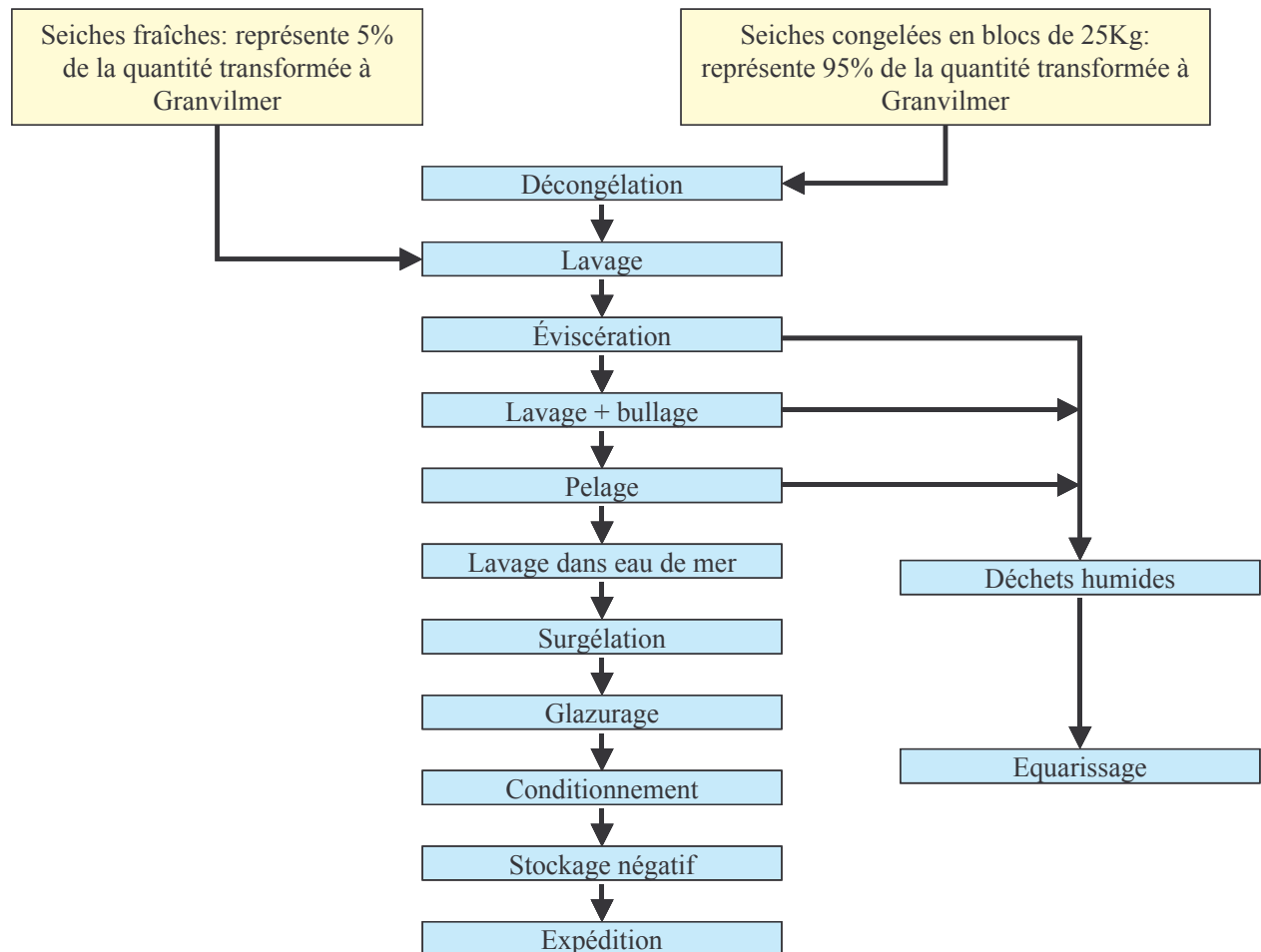


Figure 6: Méthode de transformation de la seiche selon la méthode italienne. Ex. Coopérative Granvilmer (Basse Normandie, France).

## **B. Voies de valorisation de la masse viscérale de la seiche**

Plusieurs voies de valorisation de la masse viscérale de la seiche peuvent être envisagées.

### **1. Les enzymes**

La glande digestive de la seiche est le siège d'une grande activité enzymatique. Dans cet organe il y a des enzymes de types amylasiques, lipasiques ou encore protéolytiques (Boucaud-Camou, 1974; Boucaud-Camou, 1982; Perrin, 2004). Parmi les protéases, il y a 2 principaux types, les sérines protéases (trypsine et chymotrypsine) et les cathepsines. Elle possède de plus des estérases ainsi que des phosphatases.

Les enzymes d'origine marine présentent de nombreux avantages par rapport à celles d'origine bactérienne, végétale ou animale, couramment utilisées dans l'industrie. En effet, elles

se distinguent par leurs conditions optimales d'activité : elles sont fonctionnelles dans des solutions fortement salines, sont généralement multifonctionnelles et surtout possèdent une forte activité catalytique à basse température.

## 2. Les huiles

La teneur en lipides des viscères est de plus de 10% (Boucaud-Camou, 1973). Ces huiles d'origines marines sont particulièrement riches en acides gras poly-insaturés. Leur utilisation en diététique et en pharmaceutique est bénéfique à la santé humaine (Richard, 2001).

Effectivement, des études ont montré que les acides gras poly-insaturés participent à la prévention de l'athérosclérose grâce à leurs actions anti-oxydantes. Ils jouent un rôle de prévention du vieillissement. Enfin, ils favorisent une bonne croissance et un bon développement du fœtus et du nourrisson.

## 3. Les lysats

Il existe un intérêt croissant concernant les bioprocédés de valorisation des déchets marins (Figure 7). En effet, les co-produits peuvent simplement être broyés puis séchés conduisant alors à l'obtention d'une farine ou bien subir une lyse permettant l'obtention de lysats (autolysat, ensilage ou hydrolysats).

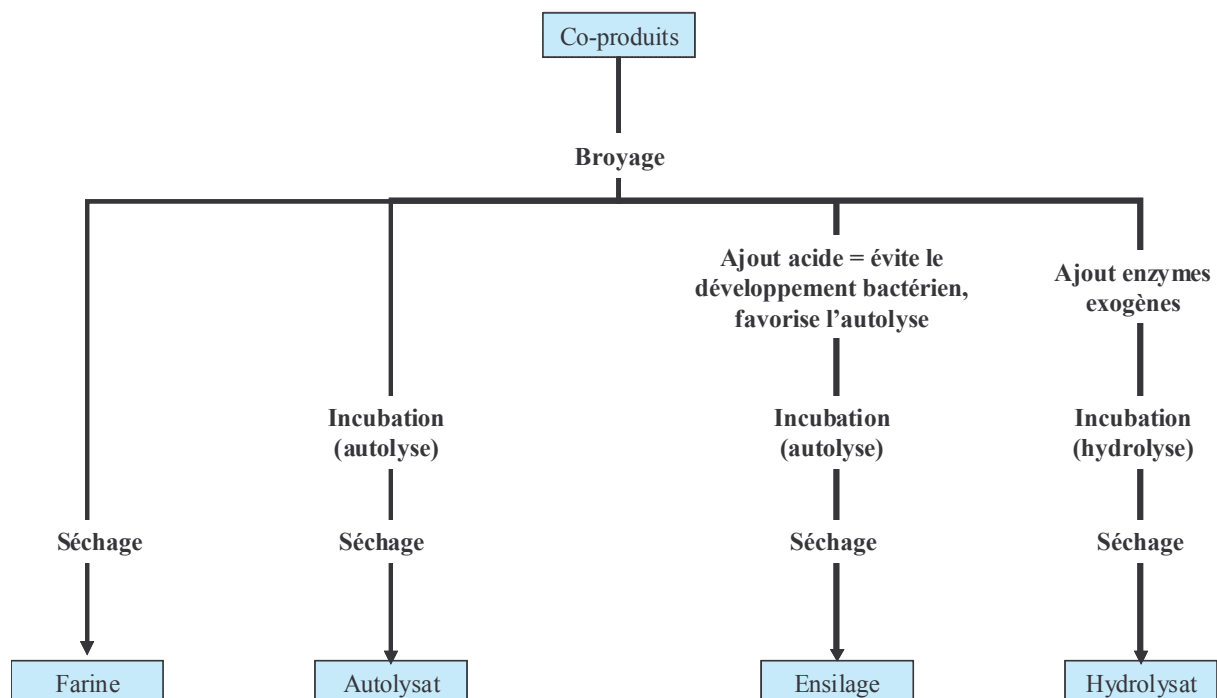


Figure 7: Système fabrication de farines, autolysats, ensilages ou hydrolysats.

Il existe diverses méthodes pour lyser les tissus. Classiquement, la méthode de production d'autolysat de poisson exploite les enzymes endogènes présentes dans les viscères.

Effectivement, les viscères sont connus pour leur contenu élevé en enzymes (Gildberg and Almas, 1986). Cette autolyse correspond à une évolution post-mortem dont on contrôle la température et le temps d'incubation (Pour revue : Mukundan, 1986). Au cours de cette digestion enzymatique, les bactéries vont jouer un rôle important (apport de matériel enzymatique) en contribuant à la digestion (Mukundan *et al.*, 1986). Les microorganismes vont croître et se multiplier avec l'autolyse du tissu qui contient tous les nutriments nécessaires à cela. Dans certains cas, on place même les tissus dans des conditions favorisant le développement bactérien afin de bénéficier des enzymes bactériennes (fermentation, ajout de sel, ajout de sucre....) (Amano, 1961; Gildberg and Almas, 1986).

Un ensilage est décrit comme étant un produit liquéfié fabriqué à partir d'un animal ou bien d'une partie d'un animal, et d'acide. La liquéfaction est provoquée par l'action des enzymes présentes dans les tissus et accélérée par l'ajout d'acide. Cet acide permet de créer les bonnes conditions de pH pour l'action des enzymes, favorise la digestion des tissus et limite la croissance bactérienne (Vizcarra-Magana *et al.*, 1999). Divers acides peuvent être utilisés, tels que des acides inorganiques (acide chlorhydrique, acide sulfurique...) ou des acides organiques (acides formique, acide propionique...). Les acides sont généralement apportés dans des proportions de 1 à 5 % (volume / poids) aux tissus broyés (Raa and Gildberg, 1976; Raa and Gildberg, 1982).

L'hydrolyse consiste en l'inactivation des enzymes endogènes et à l'utilisation d'enzymes commerciales (Clemente, 2000). L'hydrolyse est une technique obligatoire si le tissu concerné ne contient pas suffisamment d'enzymes endogènes ou bien si ces enzymes ne permettent pas l'obtention d'un produit convenable. Ces hydrolyses peuvent se faire en condition acide ou basique (Mackie, 1982)...

Pour l'ensemble de ces techniques, les temps d'incubation sont hautement variables, pouvant s'étendre de quelques heures à plusieurs mois. De la même façon, la température (de 4 à 50°C) et le pH (acide, neutre ou alcalin) de lyse peuvent varier. Ces paramètres sont fonction du tissu, de l'animal et du produit final que l'on désire obtenir (degrés de lyse). En conclusion, sous ces termes génériques d'autolysat, hydrolysats ou ensilage on englobe des nombreux produits hautement différents les uns des autres car chacun est fonction d'un nombre élevé de paramètres :

- Matière première : un groupe d'espèces, une espèce précise, un ensemble d'organe, un seul organe....
- Condition de lyse : à pH acide, neutre ou basique ; à températures très variables.

- Niveau de lyse : lyse complète ou partielle des tissus.
- Enzymes : endogènes, bactériennes, exogènes.
- Conditionnement : liquide, concentré, lyophilisé....

Les richesses enzymatiques et protéiques, exceptionnelles au niveau des viscères de la seiche, permettent l'accès à des substances possédant des propriétés extrêmement intéressante pour les secteurs de la diététique, de la cosmétologie, du médical et de l'élevage (agriculture et aquaculture). Néanmoins, un problème subsiste et concerne la dégradation et les altérations que peuvent subir les matières premières (co-produits) au cours de leur stockage et de leur transformation. Ainsi, les différents traitements subis peuvent altérer la qualité des co-produits et même empêcher leur utilisation via une dégradation trop importante des enzymes endogènes, des acides gras et de toutes les molécules présentes. Pour ces différentes raisons, l'objet de ce premier chapitre sera de caractériser le contenu enzymatique et biochimique des viscères de seiche, mais aussi de connaître l'impact de différents traitements sur la qualité des co-produits.

## **II Etude de la qualité biochimique des viscères**

### **A. Etude de l'évolution post-mortem des viscères de seiche**

#### **Résumé :**

Pour obtenir des données sur l'autolyse des viscères de la seiche *Sepia officinalis*, l'étude de l'évolution post-mortem de ces co-produits a été réalisée. Les viscères de seiches ont été stockés à 4 ou 25°C et des prélèvements réguliers ont été effectués pendant 4 mois. La rupture des lysosomes entraîne un relargage rapide des protéases totales acides et des cathepsines dans le milieu extracellulaire. La destruction des vésicules à zymogène intervient 2 heures après la mort de l'animal entraînant une augmentation de l'activité totale des protéases alcalines, de la trypsine, de la chymotrypsine et de l' $\alpha$ -amylase. Après 10 jours d'incubation, aucune activité enzymatique endogène n'est plus détectée. De plus, le pH des viscères stockés à 25°C devient alcalin tandis qu'il augmente plus lentement pour ceux stockés à 4°C. Le taux de protéines TCA solubles décroît rapidement à partir de 50 jours à cause de la dégradation et de l'agrégation des protéines. Enfin, l'autolyse entraîne une diminution significative du poids moléculaire des protéines.

La seiche, *Sepia officinalis*, est connue pour avoir un cycle de vie court, elle est caractérisée par un taux de croissance élevé (Mangold and Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Clarke *et al.*, 1989; Le Goff and Daguzan, 1991). Cette croissance rapide et leur métabolisme à prédominance protéique impliquent un fort renouvellement protéique et par conséquent des activités protéolytiques importantes. De plus, des études antérieures ont démontré la présence de nombreuses enzymes dans le tractus digestif de la seiche *Sepia officinalis* (Perrin *et al.*, 2004). Dans le but de connaître les mécanismes intervenant au cours de l'autolyse, nous avons étudié l'évolution post-mortem des co-produits en relation avec les activités enzymatiques des viscères de seiche.

L'étude des propriétés des enzymes présentes dans les viscères est particulièrement importante. Ainsi, elle permet la bonne compréhension des mécanismes de dégradation des protéines et des lipides et fournit des informations essentielles à la production d'ensilage à base viscères de seiches. Les lysats sont couramment utilisés dans l'alimentation des animaux élevés dans les fermes et les aquacultures (Haaland and Njaa, 1989). Néanmoins, la qualité nutritionnelle des ensilages dépend largement du degré d'autolyse des tissus et du produit formé. Haaland et Njaa (1989) ont démontré que la température de fabrication des ensilages influence à la fois le degré d'autolyse obtenu après stockage et le degré d'hydrolyse des liaisons des groupes amide. De plus, la fraction insoluble, qui est toujours présente dans un autolysat, est plus faible lorsque la température de stockage est supérieure à 2°C (Haaland and Njaa, 1989). La liquéfaction d'un ensilage est considérablement favorisée par un pH acide et une température proche de la température ambiante (Raa and Gildberg, 1976). Un haut degré d'hydrolyse est observé pendant les premiers jours. Les résultats obtenus démontrent qu'il existe deux phénomènes distincts au cours de l'évolution post-mortem des viscères de seiche. D'abord des phénomènes rapides qui interviennent quelques heures après la mort de l'animal. Ces événements sont rapides et incontrôlables. Ensuite, des phénomènes lents qui se déroulent plusieurs jours après la mort de l'animal. Ces derniers impliquent une autolyse qui peut être maîtrisée par le contrôle de la température, du pH. Au vu des résultats obtenus, pour la fabrication de lysats de viscères de seiche, l'autolyse ne doit pas dépasser 50 jours puisque au-delà de ce temps les protéines natives sont dénaturées et s'agrègent. Un acide doit être ajouté aux tissus de manière à obtenir le pH optimum aux activités enzymatiques, à accélérer l'autolyse et à stopper le développement bactérien (Gildberg and Almas, 1986). Enfin, concernant la température de fabrication des ensilages nos résultats sont insuffisants pour statuer entre 4 ou 25°C.

---

## Post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* L. during storage at two different temperatures:

*Estelle Le Bihan, Céline Zatylny, Armelle Perrin, Noussithé Koueta*

*Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France*

*Corresponding authors: Estelle Le Bihan: tel.: (33) 231565295; fax: (33) 231565346; estlebihan@yahoo.fr*

### **Abstract:**

We observed the post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* in order to apply the data to autolysate production. Cuttlefish viscera were stored at 4°C or 25°C and sampled regularly over 4 months. Our results showed that total acid proteases and cathepsins were rapidly released to the extracellular medium due to the breakdown of lysosomes. Total alkaline protease activity increased 2 hours after death due to the breakdown of zymogene vesicles. The same patterns were found with trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase activities. After 10 days of incubation, no endogenous enzymatic activity was found. After 50 days of storage, the TCA soluble protein levels decreased rapidly to approximately 30% due to protein degradation and aggregation. After 10 days, the pH of viscera stored at 25°C was alkaline, whereas in the viscera stored at 4°C the pH increased more slowly. As significant reduction in the protein molecular weight due to autolysis, was also observed.

Keywords: Digestive enzymes, Molecular weight, pH, Post-mortem, *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda), TCA soluble proteins, Viscera.

### **1. Introduction**

The cuttlefish, *Sepia officinalis*, is known to have a short life cycle and is characterized by a high growth rate (Mangold and Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Clarke *et al.*, 1989; Le Goff and Daguzan, 1991). Such rapid growth must involve a high rate of body protein turnover, and thus, intense activity of the proteolytic enzymes. Previous studies have examined the occurrence of digestive enzymes along the digestive tract of the cuttlefish *Sepia officinalis*. In recent studies, Perrin *et al.* (2004) measured digestive enzymes such as trypsin, acid phosphatases, total acid proteases and chymotrypsin in the juvenile cuttlefish. Moreover, Le Bihan *et al.* (2004b) have characterized cuttlefish cathepsins. The lysosomal system (Volkman *et al.*, 1989; Villalba *et al.*, 1993; Villalba *et al.*, 1993; Carajaville *et al.*, 1995; Likholat *et al.*, 2000; Sidermann, 2000; Pihan, 2001), which contains cathepsins has been implicated in numerous mechanisms of

intracellular digestion. Lysosomes are cytoplasmic granules that contain several acid hydrolases within the lysosomal membrane (De Duve *et al.*, 1955). These hydrolases, such as catheptic enzymes, are considered to be the main cause of post mortem tissue softening (Ono, 1971; Eino and Stanley, 1973; Penny, 1980).

The cephalopods are an important economic resource for global fisheries. Basse-Normandie is the foremost Cephalopod-producing region in France. Cuttlefish are mainly exported in frozen form to the Mediterranean countries and to Japan; France is the second most important exporter of frozen cuttlefish in the European Union. The valorisation can permit to increase the value of viscera. Traditionally, viscera have been considered as waste and utilized only to a minor extent (Gildberg and Almas, 1986). Nevertheless, the cuttlefish viscera represent an important part of the cuttlefish mass (15 to 25%). So, their waste represents an important commercial loss. Moreover, the digestive gland, which correspond to 10 to 15% of viscera, contains about 10% of lipids rich in polyunsaturated fatty acids (Boucaud-Camou, 1973). So, because of their biochemical composition, viscera could be the basis of marine autolysates for use as feed in aquaculture diets. In order to reveal mechanisms of autolysis, it is essential to study the post-mortem process in relation to the activities of hydrolytic enzymes in viscera. Different parameters influence the viscera autolysis such as endogenous enzymes, which determine the autolysate quality; pH, which is an essential parameter to enzymatic activity; temperature, which influences both the degree of autolysis reached after storage and the degree of hydrolysis of the amide groups (Haaland and Njaa, 1989). So, we assayed enzymatic activity, pH, the TCA (trichloroacetic acid) soluble protein level, because it reflects the degree of hydrolysis of peptide bonding and the molecular weight of proteins and peptides.

## **2. Materials and methods**

### **a. Biological material**

Cuttlefish *Sepia officinalis* were caught in the English Channel during Spring 2004. Individuals (mature animals; dorsal length 20-25 cm) were placed in tanks for 72 hours at 15°C, in the marine station in Luc-sur-Mer (France), to ensure that the cuttlefish used were not stressed. The animals were fed with live crab (*Carcinus maenas*) during one week. The viscera were removed from anaesthetized live cuttlefish and immediately disrupted using a liquidizer. The viscera (40 litters) were placed into two treatments in acid resistant plastic containers: one was stored at 4°C and the second group at 25°C, for 4 months. Tissue samples were taken at regular intervals (0, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h, 24h, 48h, ... 4 months), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed.



### b. Enzyme extraction

For acid protease and cathepsin assays, the frozen viscera were homogenized in 2.5 volume of the extraction buffer (1 % KCl containing 1mM of EDTA) (Le Bihan *et al.*, 2004). The homogenate was centrifuged for 60 minutes at 10000g at 4°C. The supernatant liquid was used for the assays. For the alkaline proteases, trypsin, chymotrypsin, lipases and amylase assays, the frozen viscera were extracted in buffer (1ml of buffer per 60mg of sample) containing: 0.09M TRIS-base, 0.08M boric acid, 3mM EDTA, 0,5mM mercapto-ethanol, glycerol 10%, pH 8,3 (Koueta, 1983). The crude extract was centrifuged for 30 minutes at 10000g at 4°C, and the supernatant used for assays.

### c. Enzymatic assays

Total acid and alkaline protease activities were measured according to Charney and Tomarelli (1947) and Van Wormhoudt and Sellos (1980). The substrate was casein Yellow 0,005% in a phosphate buffer (0,096M, KH<sub>2</sub>P<sub>04</sub>, 0,004M, NaH<sub>2</sub>P<sub>04</sub>), pH 2 for the acid proteases and pH 10 for alkaline proteases. 0.5ml was used for each 0.1ml of supernatant (Charney and Tomarelli, 1947; Van Wormhoudt and Sellos, 1980). The incubation was carried out for 1 hour at 37°C, and the intensity of the yellow coloration was estimated at 442nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein), where one unit is the variation of one unit of O.D. min<sup>-1</sup>.

Cathepsin activity was measured according to Bonete *et al.* (1984). The assay mixture was composed of 0.1ml of sample (containing catheptic activity), 0.05ml of 0.4M acetate buffer (pH 4.0), and 0.05ml of 2% (w/v) haemoglobin solution (Bonete *et al.*, 1984). The mixture was incubated at 37°C for 60 minutes. The reaction was stopped by the addition of 1ml of 3% (w/v) trichloroacetic acid. After ten minutes, the assay was centrifuged at 4000rpm for 10 minutes. An aliquot was used for the estimation of the released proteolytic end product. Appropriate blanks were used, and the products were evaluated by using the Folin-Lowry reaction, according to Barrett (1977), employing tyrosine as standard (Barrett and Kirschke, 1981). The activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic unit corresponds to one micromole of tyrosine.mg<sup>-1</sup> protein.

Trypsin activity was measured according to Tsunematsu *et al.* (1985) using 1 mM N $\alpha$ -benzoyl-Arg-p-nitroanilide as substrate in a 0.1M TRIS buffer, pH 9, and chymotrypsin according to Delmar *et al.* (1979) using 1.142mM Benzoyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (BAAPNA) as substrate in a buffer of 0.1M TRIS-base, 0.01M CaCl<sub>2</sub>, pH 11 (Tsunematsu *et al.*, 1985). Then, for both assays, 0.1ml of supernatant was added to 0.5ml of substrate. Time incubation was 30 minutes at 37°C for chymotrypsin and 1 hour at 25°C for trypsin. The final

absorbance was recorded at 410nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic unit corresponds to 10mmoles L<sup>-1</sup> of pNa.min<sup>-1</sup>.

Lipase activity was dosed according to a modified method of Versaw *et al.* (1989) using  $\beta$ -naphthyl caprilate as substrate. The assay mixture contained: 50 $\mu$ l of 200mM sodium taurocholate; 450 $\mu$ l of BES 50mM pH 7.2, 100 $\mu$ l of extract and 5 $\mu$ l of substrate at 200mM (dissolved in DMSO). The mixture was incubated for 30 minutes at 40°C, and 5 $\mu$ l of fast Blue BB 100mM (dissolved in DMSO) was added (Versaw *et al.*, 1989). The second incubation was 5 minutes at 40°C. The reaction was stopped by addition of 50 $\mu$ l of trichloroacetic acid 0.72N and 675 $\mu$ l of 95% ethanol/ ethylacetylale (V/V) solution. The colored product was read at 540nm. The lipase activity was expressed as specific activity (U. mg<sup>-1</sup> protein).

Amylase activity assayed was described by SIGMA-ALDRICH using starch as substrate. The substrate buffer contained starch at 1% in a monobasic phosphate buffer at 20mM and 6.7mM of sodium chloride, pH 6.9. We add 100 $\mu$ l of substrate buffer at 100 $\mu$ l of extract. The incubation was 3 minutes at 20°C, after, 100 $\mu$ l of revelator was added and incubated for 15 minutes in ebullition water. The revelator corresponds to tartrate sodium potassium 0.94M, NaOH 0.4 M and 3-5-dinitrosalicylic acid 48mM. The absorbance was recorded at 640nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein)

d. pH:

One gramme of fresh tissue was added to 8ml of twice distilled water. After vortexing, the pH was read using a pH-meter.

e. TCA soluble protein and protein content

The TCA soluble protein was assayed according to Benjakul *et al.* (2003). 27ml of TCA 5% (w/v) were added to 3g of fresh tissue. After homogenization, the mixture was stored for 1 hour at 4°C, and then centrifuged at 5000g during 5 minutes at 4°C (Benjakul *et al.*, 2003). Protein content was estimated using the Lowry method (1951).

The concentration of protein in each extract (in extraction buffer) was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as the standard.

f. Molecular weight of proteins and peptides

Fresh tissue was added to Tris buffer containing 10mM Tris-HCl and 150mM NaCl, pH 8 (0.1g to 10ml). The mixture was stored at 4°C for 1 hour, then centrifuged for 10 minutes at 4°C at 10 000g. The supernatant contained the Tris soluble proteins. The protein content was assayed according to the Lowry method (1951) using BSA as standard. The protein concentration in the supernatant was then adjusted at 10 mg/ml. The molecular weight of the extract obtained was

estimated using a Sephadex G25 column (Pharmacia G25M PD 10 Sephadex), which had been calibrated with the following molecular weight standards:  $\beta$ -amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), albumine (66,000), carbonic anhydrase (29,000), vitamin B12 (1,350). The amount of protein in the different fractions (500 $\mu$ l) was appreciated by the absorbance at 280 nm.

g. Statistical analysis

The results are given as mean  $\pm$  standard deviation (n=6 for each treatment). Data between treatments were compared with an ANOVA followed by a Tukey's test when significant differences ( $p < 0.05$ ) were found (Sokal and Rohlf, 1981).

### **3. Results and discussion**

a. Intracellular enzyme specific activity change

Figure 8 presents cathepsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage at two different temperatures. Significant increase ( $p < 0.05$ ) of cathepsin activity was observed 2 hours after the animal's death (90 to 100% of maximal activity), activity that remained stable for 24 hours when stored at 4°C, but which decreased over 24 hours when stored at 25°C. As described by Aoki and Ueno (1997), we also observed cathepsin liberation from the lysosomes during post-mortem storage. This suggests that the increase of activity two hours after death was due to disruption of lysosomes. Aoki and Ueno (1997) considered that most post-mortem change with regard to muscle degradation was due to the liberation of cathepsins from lysosomes. Whiting *et al.* (1975) prepared a lysosomal fraction from rainbow trout white muscle, and demonstrated that catheptic activity (possibly cathepsin D) was released from the lysosomes in aging muscle at 4°C. Moreover, activity of cathepsins B and L gradually decreased in the lysosomal fraction and increased in the supernatant fraction as rainbow trout muscle aged at 0°C (Whiting *et al.*, 1975). It appears that cathepsins are quickly liberated from the lysosomes during ageing (Aoki and Ueno, 1997).

Beyond 24 hours after death, the cathepsin specific activity significantly decreased ( $p < 0.05$ ) to 30% of maximal activity after 96 hours (Figure 9). After storage for 4 months, cathepsin activity viscera was 10% of maximal activity. The lysosome breaking leads to the liberation of the cathepsins in an environment that possesses a pH at 6.3 (Tableau 1). Le Bihan *et al.* (2004b), who have characterized the digestive gland cathepsins in the cuttlefish *Sepia officinalis*, indicated that cathepsin stability was weak above pH 5. The low cathepsin activity detected in viscera after several days may therefore be due to too high a pH.

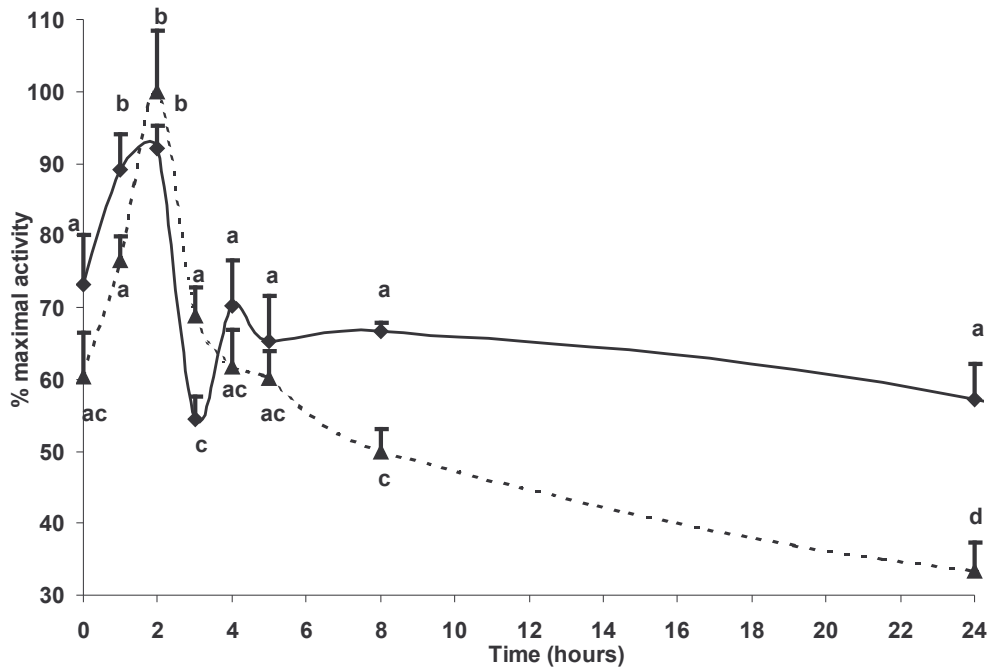


Figure 8: Cathepsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

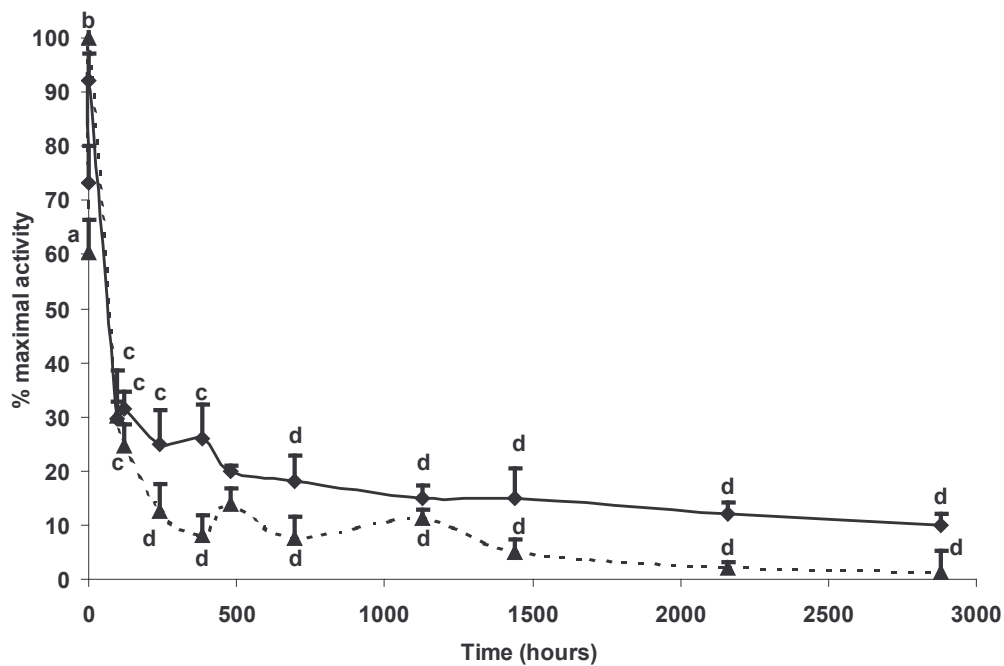


Figure 9: Cathepsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Tableau 1: Effect of storage temperature on pH, TCA soluble proteins and molecular weight of peptides and proteins. Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Storage time at 4°C:	pH:	TCA soluble proteins (mg/ml):	Molecular weight (%):	
			< 20 KDa	> 6.5 KDa
0 hours	6.42±0.011a	54.6±2.57a	80	20
2 hours	6.285±0.005b	25±0.1b	80	20
8 hours	6.315±0.015b	61.6±2.24c	70	30
24 hours	6.31±0.001b	59.8±0.52c	60	40
10 days	6.485±0.015c	68±0.1e	55	45
50 days	6.69±0.03d	70.8±5e	40	60
4 months	6.815±0.015d	28.7±3.9g	30	70
Storage time at 25°C:				
0 hours	6.42±0.011a	54.6±2.57a	80	20
2 hours	6.285±0.015b	25±0.9b	80	20
8 hours	6.47±0.02a	71.5±2.3d	65	35
24 hours	6.65±0.03e	71.5±2.17d	50	50
10 days	6.975±0.015f	76.2±0.5e	40	60
50 days	7.51±0.01g	84.8±2.9f	25	75
4 months	7.19±0.01g	29.9±2.2g	16	84

Figure 10 describes total acid protease specific activity in the crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage at the two different temperatures. We can observe a significant increase ( $p < 0.05$ ) of acid protease activity 2 hours after the animal death (60% of maximal activity), next, this activity stay stable to 24 hours when the storage was made at 4°C, or increase to 24 hours when the storage was made at 25°C. We observed that as with cathepsin activity, the total acid protease activity increased rapidly after the animal's death. In this way, it appears that in invertebrates, only lysosomes contain an acidic pH below 5. Then, acid proteases were always localized on lysosomes in invertebrates.

Beyond 1 day, total acid protease specific activity decreased significantly ( $p < 0.05$ ) to approximately 20% of maximal activity at four month after the cuttlefish death (Figure 11). As observed for the cathepsins activity, which contributes to total acid protease activity, have weak stability above pH 5. So, enzymes that mainly participate in the total acid protease activity were cathepsins, as observed by Le Bihan *et al.* (2004b).

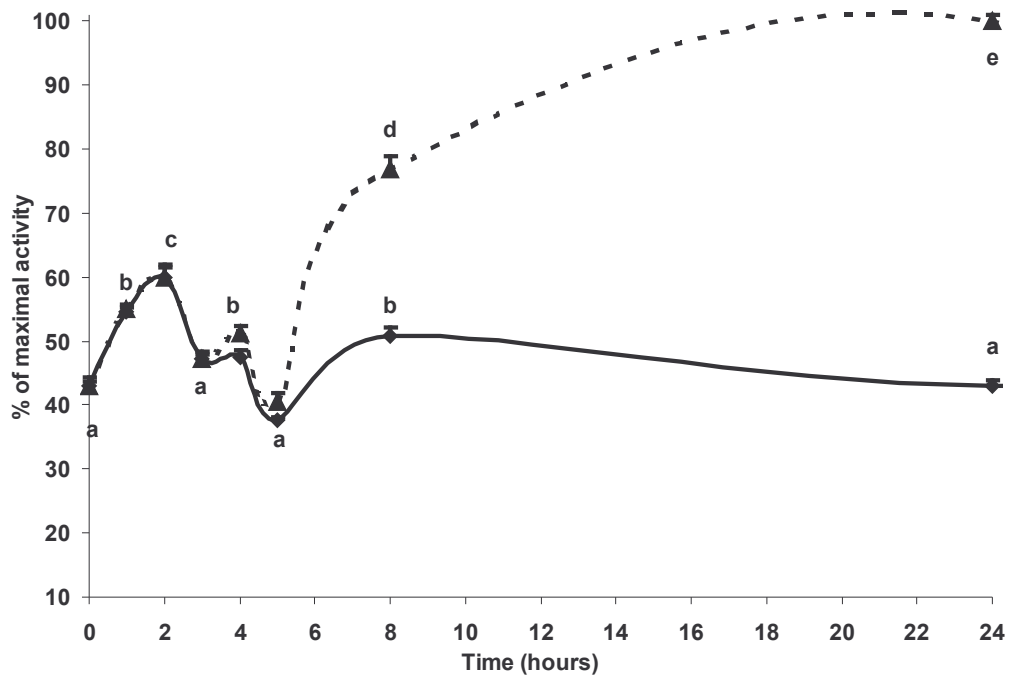


Figure 10: Total acid proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

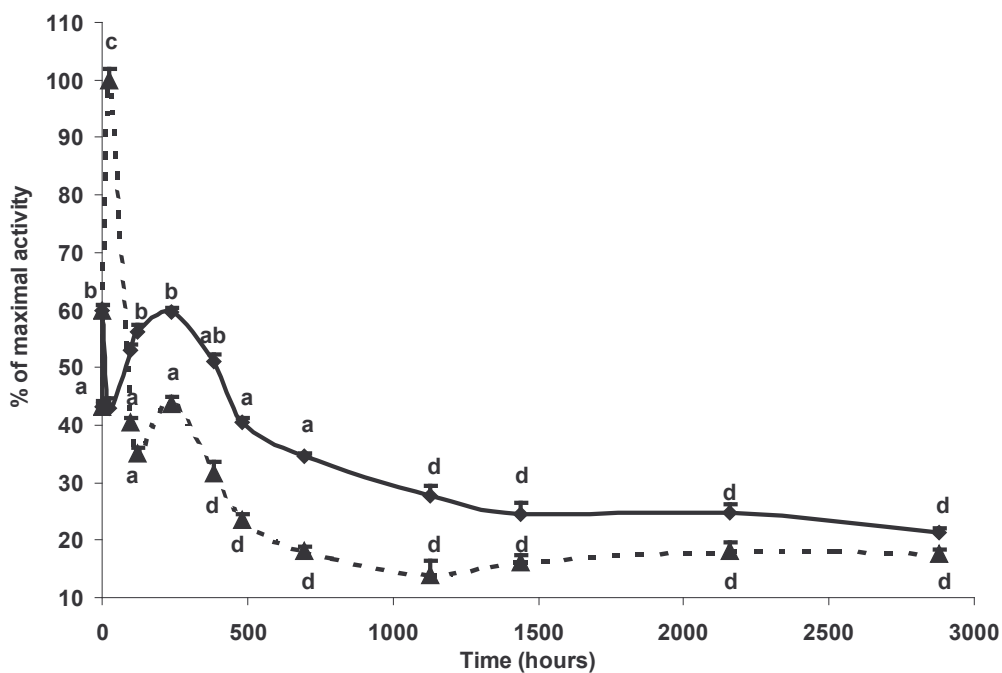


Figure 11: Total acid proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

b. Extracellular enzymes specific activity change

Figure 12 presents total alkaline protease specific activity in the crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage at two different temperatures. A significant

increase ( $p < 0.05$ ) of alkaline protease activity was observed 2 hours after the animal's death (90 to 100% of maximal activity), followed by a decrease (70 to 80%) after 24 hours. The animal's death results in major changes in the biochemical features of the tissue, leading to its disintegration (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004). This suggests that zymogene vesicles present in cells, containing secreted proteolytic alkaline enzymes, break down a few hours after the death of the cuttlefish inducing the increased alkaline protease activity observed 2 hours after death.

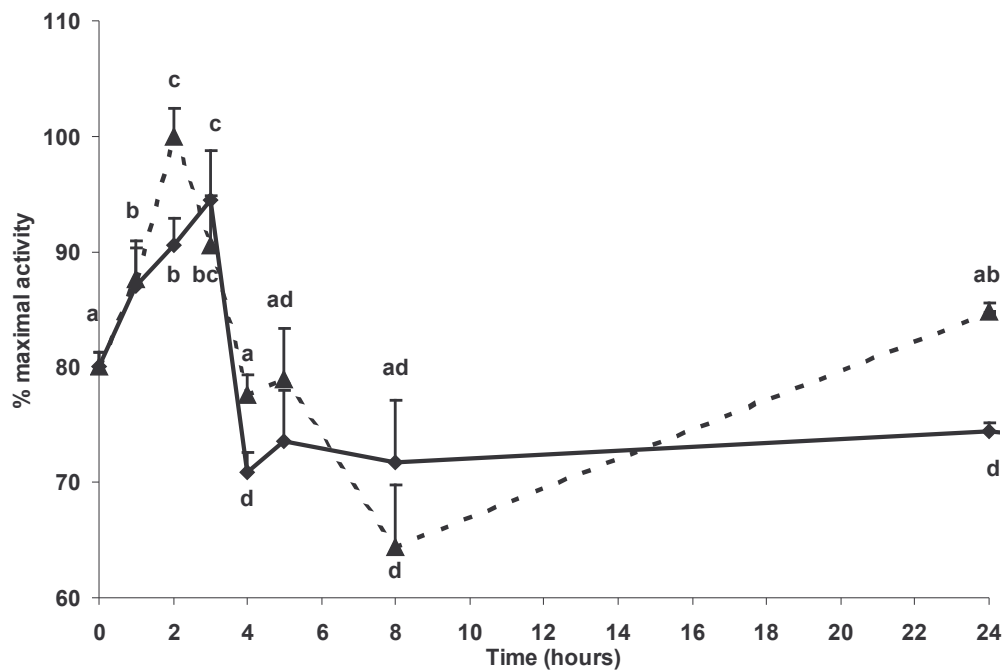


Figure 12: Total alkaline proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Beyond 96 hours after death, the total alkaline protease specific activity decreased significantly ( $p < 0.05$ ) to 25% of maximal activity after four months (Figure 13). So, total alkaline protease activity declines a few days after the animal's death under our storage conditions.

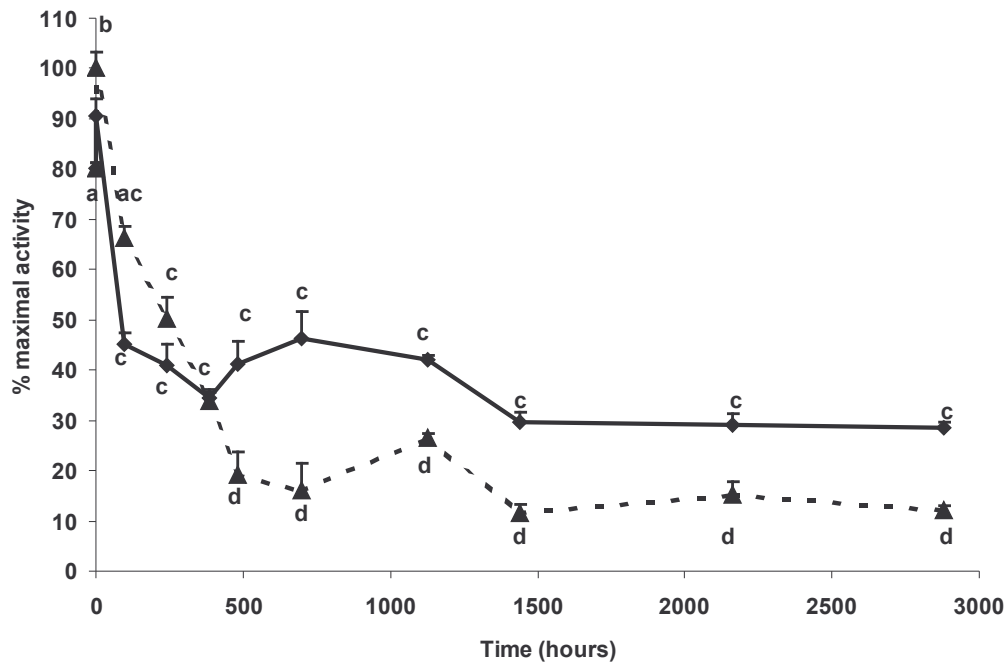


Figure 13: Total alkaline proteases specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Figure 14 presents the trypsin specific activity in the crude extracts of the digestive viscera cuttlefish during the first 24 hours of storage at the two different temperatures. A significant increase ( $p < 0.05$ ) of trypsin activity was observed 2 hours after the animal's death (30% of maximal activity), after, which activity decreased to 20% at 4 hours. Between 4 and 24 hours, the activity remained stable when stored at 4°C, but increased when stored at 25°C. So, as for the alkaline proteases, zymogene vesicles may be breaking down a few hours after death, inducing the trypsin activity increases observed 2 hours after death. In the case of storage at 25°C, trypsin activity increased to a maximum at 12 days, after which activity decreased over 4 months to 20% of maximal activity. In contrast, when tissues were stored at 4°C trypsin activity remained stable up to 20 days after death at 30% of maximal activity, followed by a significant increase ( $p < 0.05$ ) at 30 days (60% of maximal activity). After 30 days, trypsin activity decreased significantly to 20% of maximal activity four months after the death of the cuttlefish (Figure 15). Trypsin stability and activity therefore appears to be dependent on storage temperature. Nevertheless, trypsin activity remains high for at least 12 days.



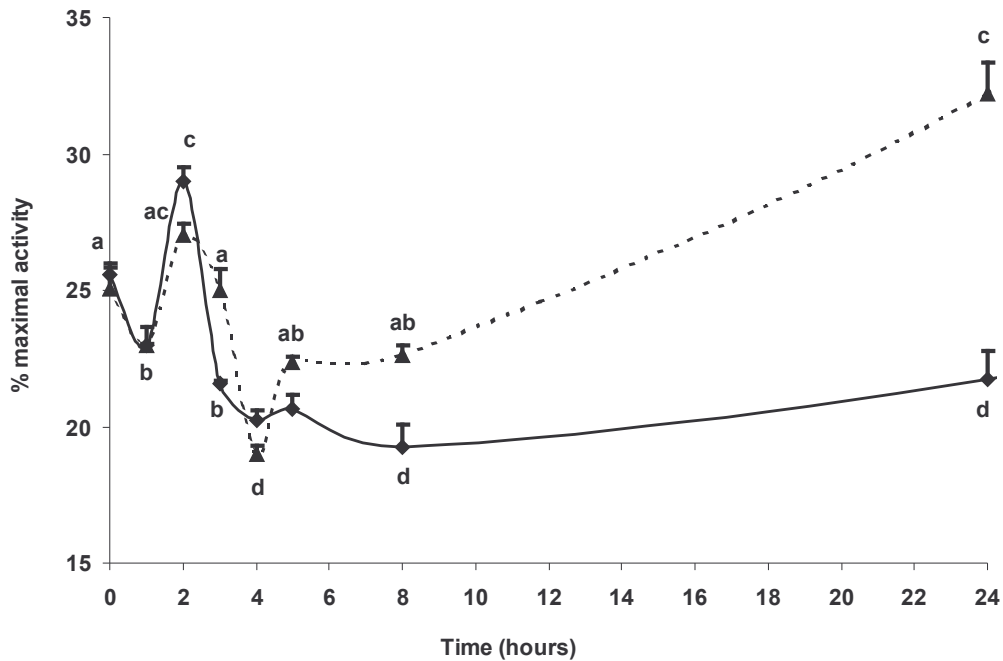


Figure 14: Trypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

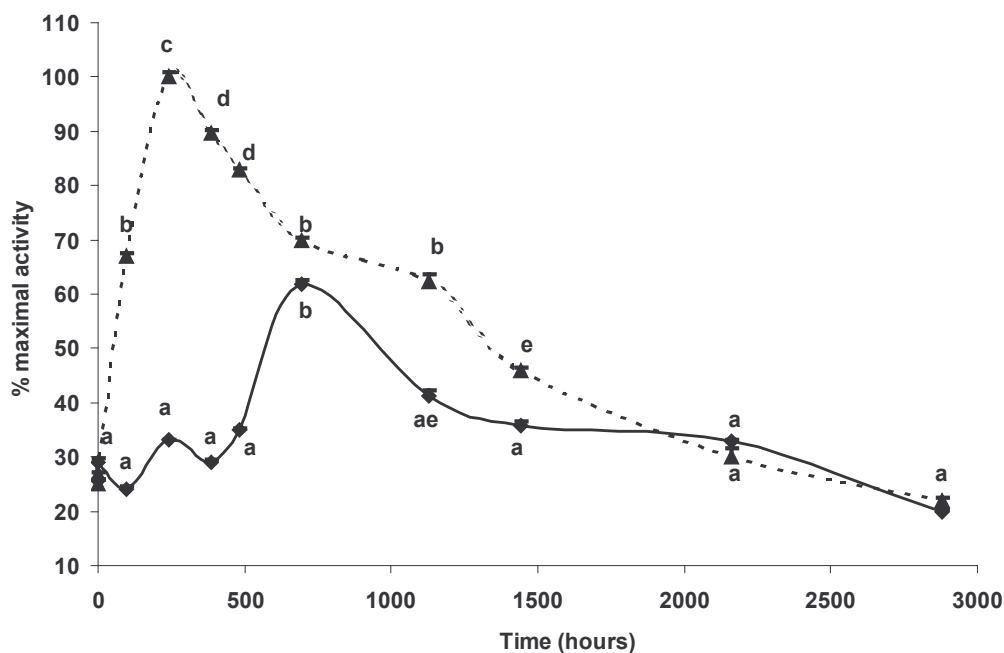


Figure 15: Trypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

There is a significant increase ( $p < 0.05$ ) of chymotrypsin activity in crude extracts of cuttlefish viscera 2 hours after the animal's death (90 to 100% of maximal activity). This activity decreases after 4 hours (77%) in viscera stored at 4°C, and 8 hours (60%) in viscera stored at

25°C (Figure 16). This activity decreases after 4 hours (77%) in viscera stored at 4°C, and 8 hours (60%) in viscera stored at 25°C. After decreasing, chymotrypsin activity stays stable up to 24 hours. It would seem, therefore, that zymogene vesicles were breaking few hours after the cuttlefish death releasing alkaline proteases and trypsin and inducing the chymotrypsin activity increases 2 hours after the death.

Chymotrypsin activity decreased significantly ( $p < 0.05$ ) after 50 days to be at 30% of maximal activity four months after the death of the cuttlefish (Figure 17). Chymotrypsin was very stable on storage. It is a serine protease, which acts at alkaline pH and is stable in poor acidic pH conditions. Chymotrypsin and trypsin are quantitatively important in the digestive system of carnivorous cuttlefish due to their high proteolytic activities (Heu *et al.*, 1995). They actively participate in the viscera autolysis.

Figure 18 shows that lipase specific activity in the crude extracts of cuttlefish digestive viscera does not change during the first 24 hours of storage at the two different temperatures. Lipases appear to be stable under the storage conditions at 4 or 25°C.

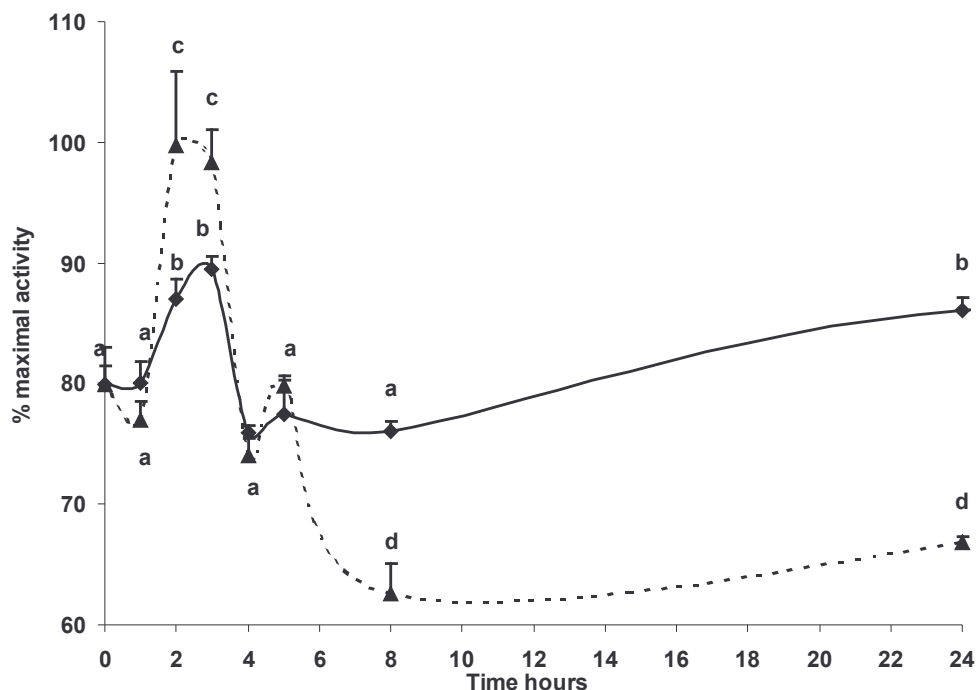


Figure 16: Chymotrypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

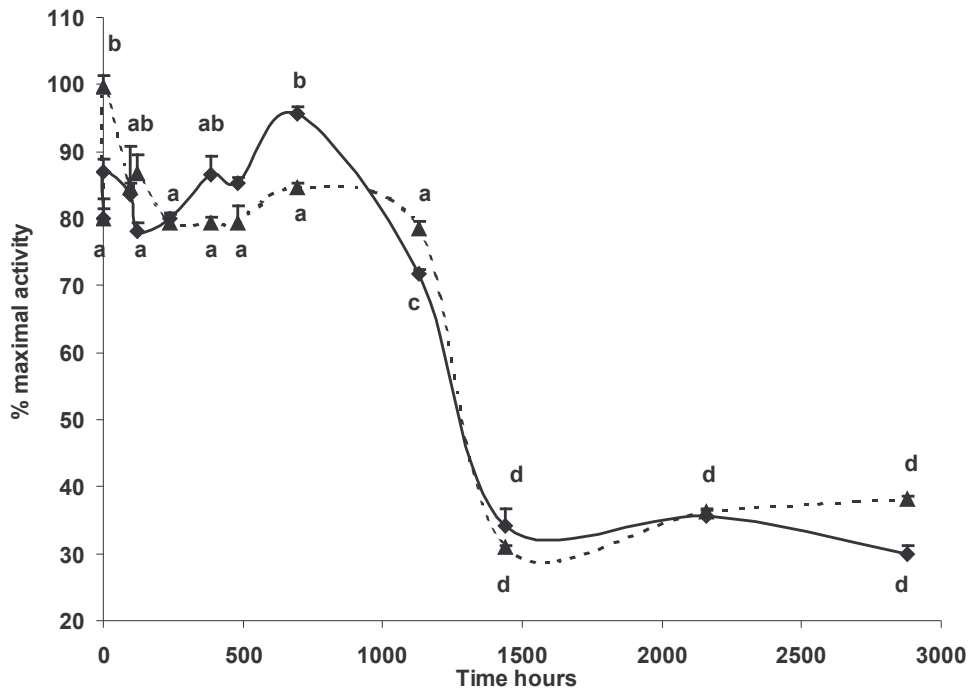


Figure 17: Chymotrypsin specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

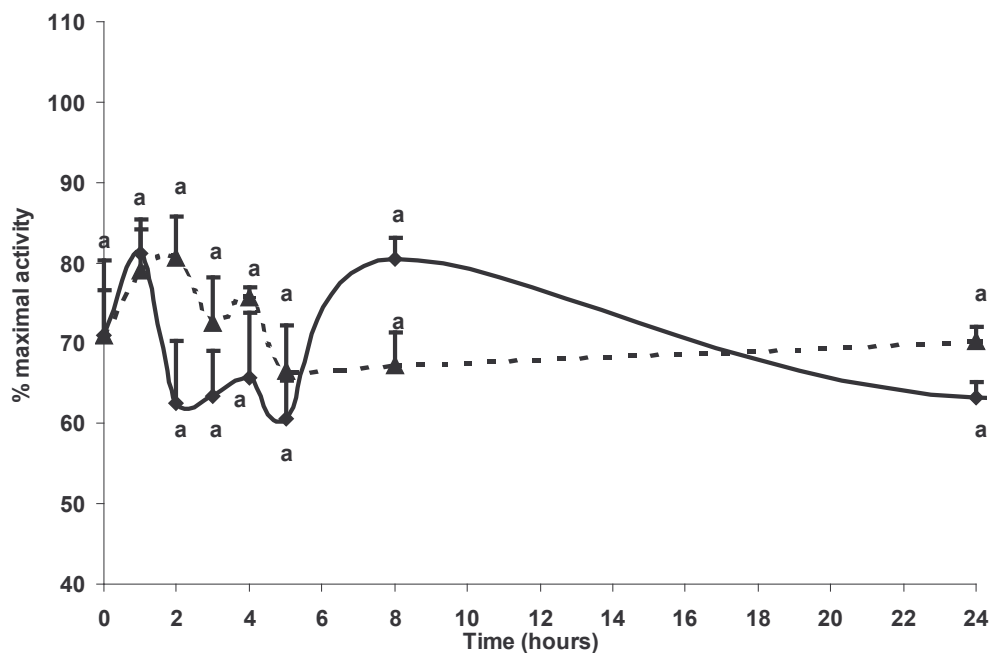


Figure 18: Lipase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Lipase activity stays significantly stable up to 50 days (90% of maximal activity). After 50 days, lipase activity decreased significantly ( $p < 0.05$ ) to be at 10% of maximal activity four months after the death of the cuttlefish (Figure 19) and after this to remain stable. In this way,

Abbas *et al.* (2002) showed that lipases have optimal stability at pH 5 to 7. Lipases are essential in autolysis because they determine the lipid quality in the final product. Their high stability in time can result in the accumulation of polyunsaturated fatty acids in high quantity in the viscera autolysate.

Figure 20 describes the amylase specific activity in the crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage at the two different temperatures. We observed a significant increase ( $p < 0.05$ ) of amylase activity 2 hours after the animal's death (90 to 100% of maximal activity), followed by a decrease after 4 hours (30%) in the viscera stored at 25°C, which was not seen in the viscera stored at 4°C. After these variations, amylase activity stays stable up to 24 hours.

Amylase activity decreased significantly ( $p < 0.05$ ) after 10 days in the viscera stored at 25°C and after 30 days in the viscera stored at 4°C to be at 10% of maximal activity four month after the death of the cuttlefish (Figure 21). Like carnivores (Hidalgo *et al.*, 1999), cuttlefish have low amylase activity. Nevertheless, amylase was relatively stable under our storage conditions, even if this stability varied according to the temperature of storage.

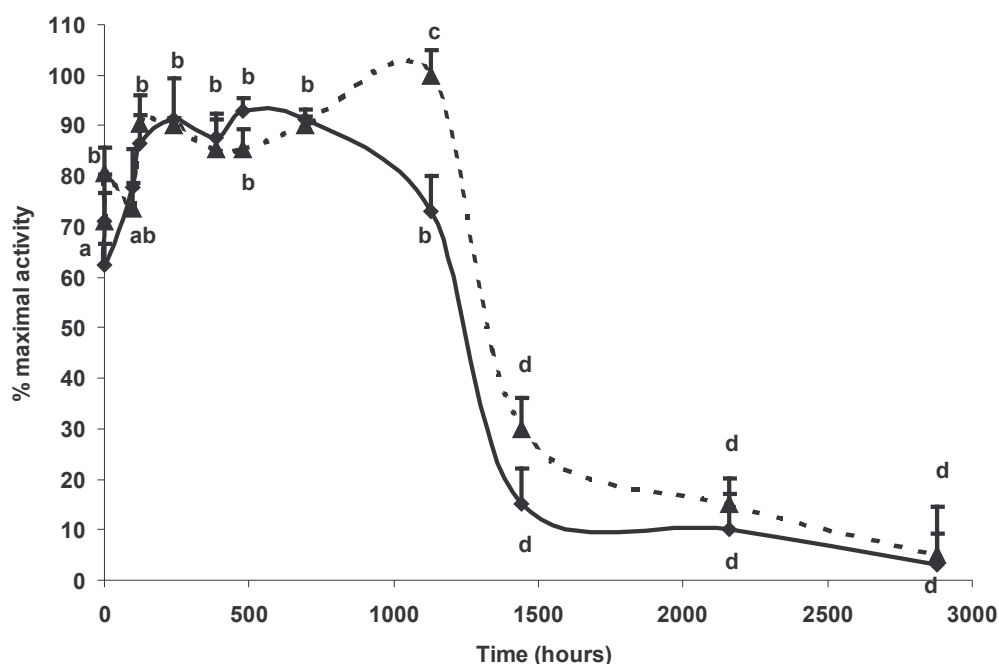


Figure 19: Lipase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

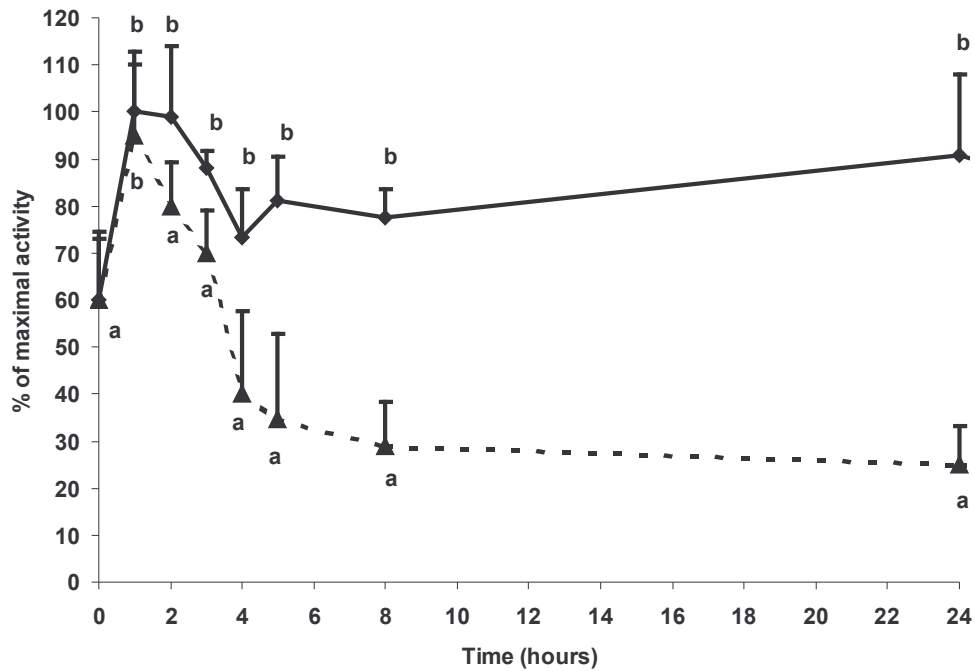


Figure 20: Amylase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during the first 24 hours of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

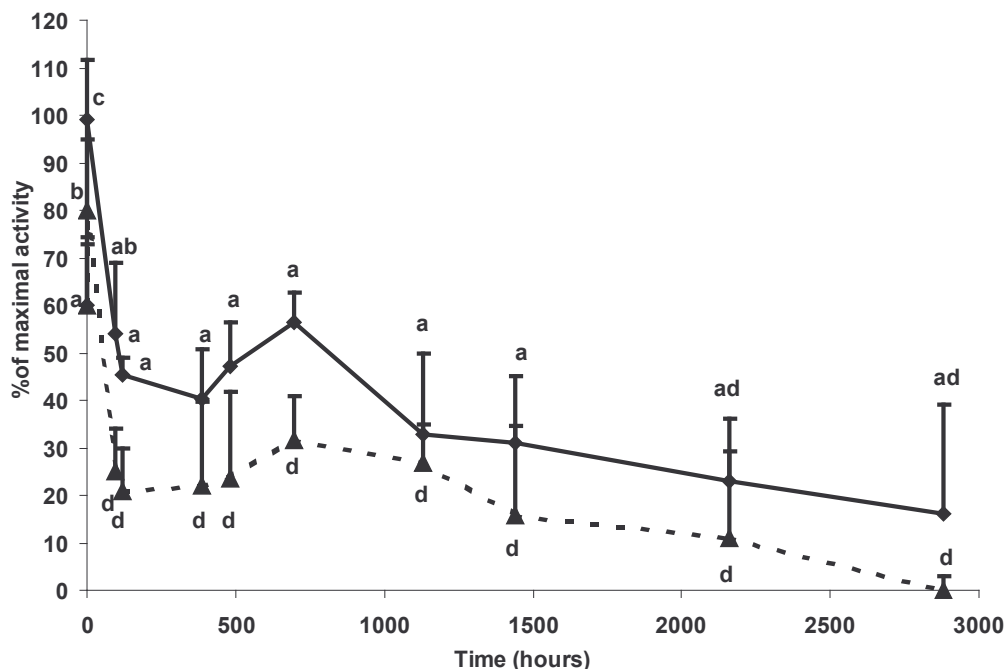


Figure 21: Amylase specific activity in crude extracts of cuttlefish digestive viscera during 4 months of storage (% of maximal activity) at two different temperatures (- 4°C or - - 25°C). Points not bearing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

c. pH changes

The pH at the animal's death was 6.42 (Tableau 1). We observed a significant pH decrease ( $p < 0.05$ ) 2 hours after the death of the cuttlefish. In the viscera stored at 4°C the pH stayed significantly stable up ( $p < 0.05$ ) to 24 hours. After 24 hours, in the viscera stored at 4°C the pH increased slowly to be at 6.81 after 4 months. On the other hand, in viscera stored at 25°C there was a significant increase in pH ( $p < 0.05$ ) after 4 months (7.19). The death of an animal initiates major changes in the biochemical features of tissue, leading to its disintegration (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004). After death, there is a decrease in pH and a reduction of cell membrane integrity (Cottin and Ducastaing, 1996; Church, 1998). These changes interact with other biochemical processes occurring after death, especially proteolysis (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004).

d. TCA soluble protein changes

The TCA soluble protein level at the animal's death was 54.6 mg/ml (Tableau 1). We observed a significant decrease in the TCA soluble protein level ( $p < 0.05$ ) 2 hours after the death of the cuttlefish due to a decrease in pH. In the viscera, the TCA soluble protein level significantly increased ( $p < 0.05$ ) over 50 days. After 50 days, the TCA soluble protein level significantly decreased ( $p < 0.05$ ) to be at 29 mg/ml after 4 months. Haaland and Njaa (1989) have observed a stabilization of the TCA soluble protein level after 1 to 3 months storage time at 4°C. Benjakul *et al.* (2003) have shown an increasing of TCA-soluble peptides and amino acids in the lizardfish throughout 15 days of iced storage, suggesting the autolytic degradation of protein. Moreover, they observed that, generally, whole fish had more TCA-soluble peptides and amino acids than heated/eviscerated fish, especially when the storage time increased. In this way, viscera contain a variety of digestive proteases, which play a role in the softening of abdominal tissues during post-mortem storage (Haard, 1992). The protein solubility increased during the initial months of storage, and then fell, as is characteristic of protein aggregation (Ruiz-Capillas *et al.*, 2002). After 50 days of storage of the viscera, there was denaturation and aggregation of proteins.

e. Molecular weight of proteins and peptides changes

The molecular weight of protein at the animal's death was greater than 20 kDa for 80% of protein (Tableau 1 et Figure 22). The molecular weight of protein decreases after the animal's death. After 4 months, the molecular weight of protein was lower than 6.5 kDa for 70% of proteins in the viscera stored at 4°C and for 84% of proteins in the viscera stored at 25°C. This implies that there is a significant autolysis ( $p < 0.05$ ) reflected by a high decrease of the molecular weight of proteins contained in stored viscera. In this way, after 4 months of storage the main

protein components have a molecular weight lower than 6500 (composed of about 65 amino acids).

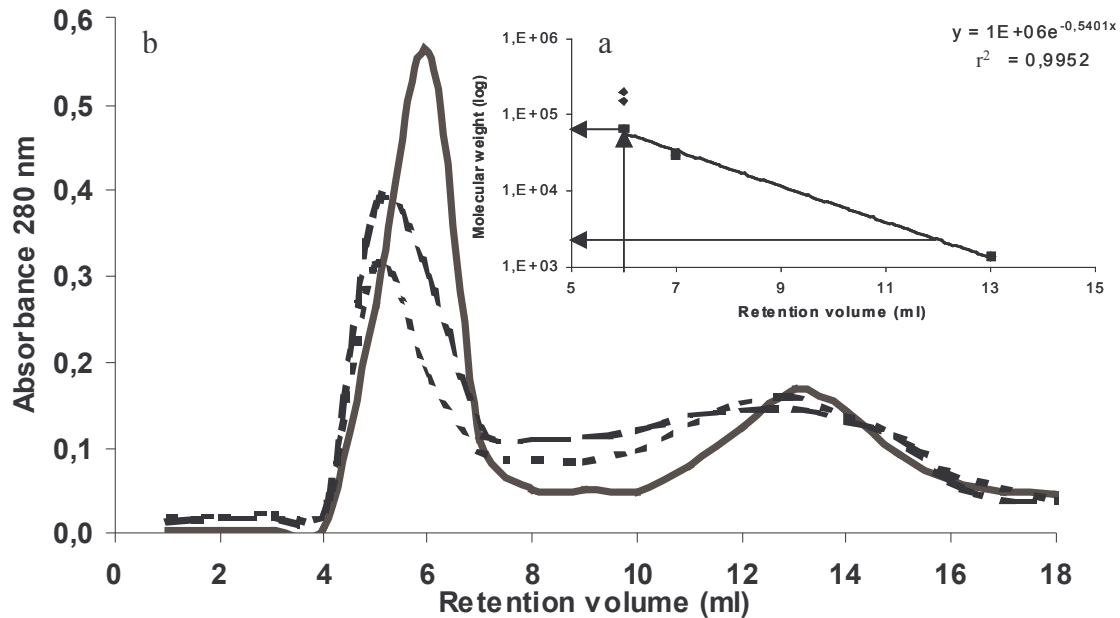


Figure 22: a) Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Effect of storage temperature on molecular weight of peptides and proteins between the cuttlefish death to 24 hours. – 0 minutes, \_\_\_ 24 hours at 4°C, - - 24 hours at 25°C.

#### 4. Conclusion

Properties of viscera enzymes are important in the understanding degradation of proteins and lipids, and may provide information useful in the production of cuttlefish viscera silage. Autolysate is used as a feed for farmed fish and other animals (Haaland and Njaa, 1989). The nutritional quality of the silage may depend on the degree of autolysis and the products formed. Haaland and Njaa (1989) showed that temperature influences both the degree of autolysis reached after storage and the degree of hydrolysis of the amide groups. Moreover, the undissolved fraction, which always remains in the autolysate, was smaller in the autolysate stored at high temperatures than in the autolysate at 2°C (Haaland and Njaa, 1989). The liquefaction of silages is markedly favoured at acid pH values and at temperatures above room temperature (Raa and Gildberg, 1976). Despite the weak stability of viscera enzymes in our experiments after 96 hours, we observed a high degree of autolysis in the first few days. Our results allow us to conclude that there are two different phenomena in the post-mortem evolution of cuttlefish viscera. There are fast phenomena, occurring a few hours after the animal's death, which induce irreversible and uncontrollable mechanisms. Slow phenomena occur several days after the animal's death and imply autolysis over which we may have control by controlling

temperature, pH... Autolysis may be restricted to less than 50 days because beyond that time, native proteins are denatured and aggregated. Acid needs to be added to obtain the optimum pH for enzyme activities, autolysis acceleration and to stop bacteria development (Gildberg and Almas, 1986). Finally, concerning the temperature, our results are insufficient to decide between storage at 4 or 25°C. In future experiments autolysate fabrication will be made at 4 and 25°C. Autolysate quality (protein and lipid concentrations as well as toxicity tests heavy metals, hydrocarbon and pesticides concentrations) will be examined. Finally, the study of the dietary value of viscera autolysate must be observed *in vivo*, via its use as protein complement in cuttlefish rearing and *in vitro* on the viability of the cell isolated from the cuttlefish digestive gland and digestive physiology.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Conseil Régional de Basse-Normandie and the IFOP. This study was conducted in CREC (Centre de Recherches en Environnement Côtier) at Luc sur Mer, Normandie, France. We are grateful to fisherman from Brehal (Manche in France) and Granville (Manche in France) for providing the biological materiel used in this study. We want to thank Dr. Paul Shaw and Dr. David Agnew for their help in English editing.



La Figure 23 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience concernant l'évolution post-mortem des viscères de seiche.

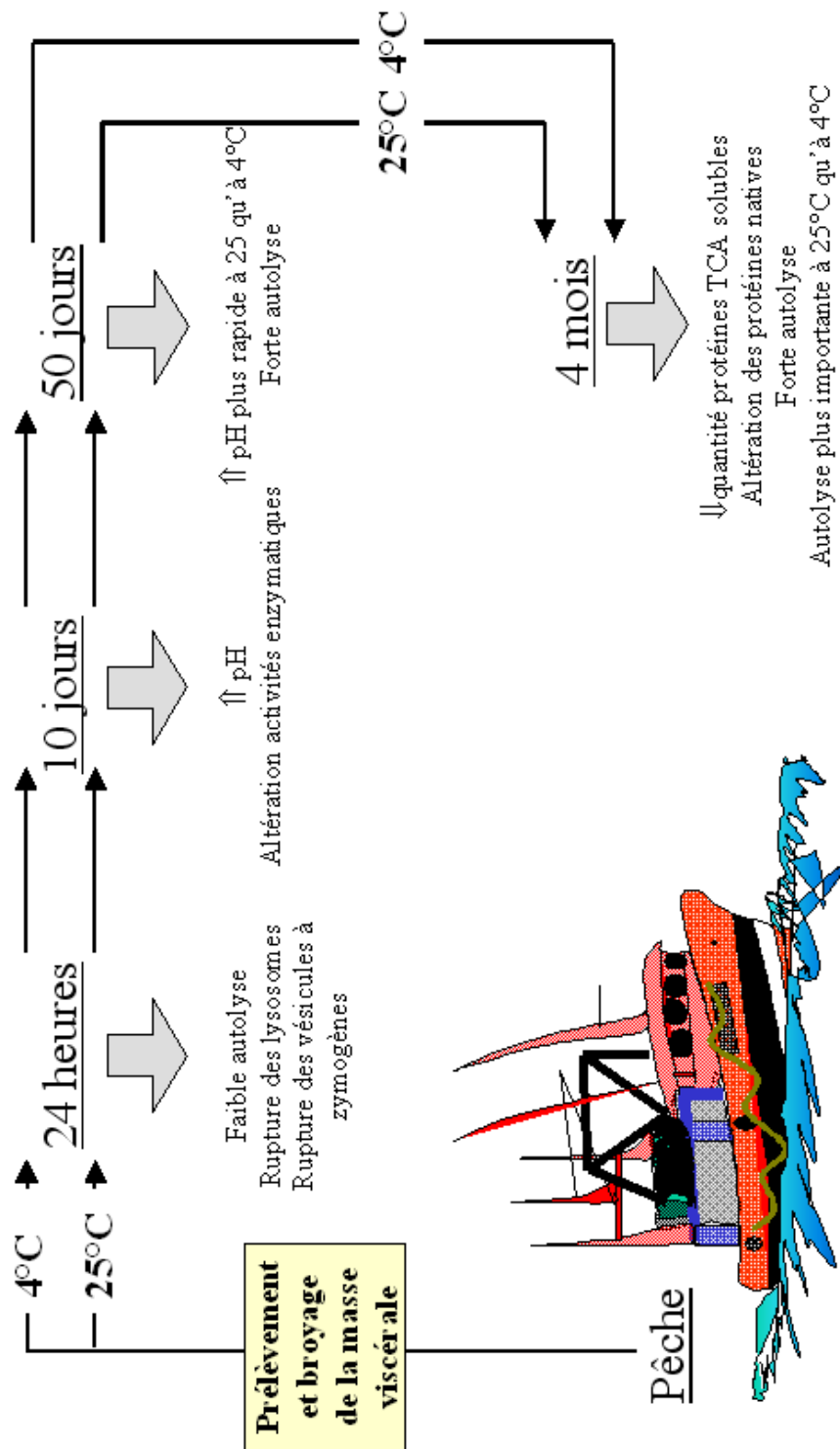


Figure 23: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'évolution post-mortem de la qualité des viscères de seiches.

## **B. Etude de différents traitements sur la qualité des viscères de seiche**

### **Résumé :**

Les effets du traitement (seiche fraîche, de criée ou de transformation), du stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant différent temps et de la température de congélation de la seiche ont été étudiés. Au cours du stockage, le pH et la quantité de protéines TCA solubles diminuent tandis que les activités enzymatiques intracellulaires (cathepsines, protéases totales acides et phosphatases acides) et extracellulaires (amylase, chymotrypsine, trypsine et protéases totales alcalines) augmentent.

La transformation de la seiche entraîne un accroissement du pH et de la quantité de protéines TCA solubles. De plus, dans les conditions de la transformation, les niveaux d'activité de l'amylase et de la lipase varient tandis que les activités des autres enzymes dosées (cathepsines, protéases totales acides et alcalines, phosphatases acides, chymotrypsine, trypsine, carboxypeptidase A et B) restent stables. La diminution du poids moléculaire des protéines/peptides et la variation de la composition en acides gras reflètent une hydrolyse des viscères de seiche au cours de la transformation. La composition en acide gras diffère entre les viscères issus de seiches fraîches et les co-produits obtenus après transformation. En dépit de ces changements, le pourcentage en acides gras poly-insaturés reste élevé dans les viscères obtenus après transformation.

Le stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  implique des changements majeurs dans la qualité des viscères de seiches. La congélation entraîne une augmentation du pH et une diminution de la quantité de protéines de haut poids moléculaire. Plus la température de décongélation des seiches est élevée, plus le pH est augmenté. Au cours du stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ , la quantité de protéines, de glucides et de lipides diminuent lentement.

Divers paramètres interviennent dans l'autolyse d'un tissu. Cependant, les conditions de stockage vont déterminer la qualité des viscères et la dégradation enzymatique. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact des différentes phases de stockage et de transformation sur les changements biochimiques des viscères de seiche. La congélation est une technique qui permet d'inhiber le développement microbien mais elle entraîne de nombreux changements au niveau des protéines du tissu. La congélation provoque des modifications de la structure et des propriétés fonctionnelles des protéines (Mackie, 1982). Ces changements incluent l'insolubilisation des protéines, la formation d'agrégats et des dommages mécaniques au cours du stockage au froid (Badii and Howell, 2001).

Différents phénomènes sont observés au niveau des viscères de la seiche *Sepia officinalis* entre le moment où l'animal est pêché et lorsque la seiche est transformée. D'abord, une rupture des lysosomes qui induit une augmentation des activités enzymatiques acides, une diminution du pH et de la quantité de protéines TCA solubles. Secondairement, la dégradation des vésicules à zymogène contenant les enzymes sécrétées entraîne une augmentation de l'activité de celle-ci. Enfin, une légère hydrolyse des viscères est observée. La quantité de protéines de haut poids moléculaire (supérieure à 20kDa) diminue lors du stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  alors que la quantité en protéines de faible poids moléculaire (inférieure à 6,5kDa) reste stable. La congélation implique des changements majeurs au niveau de la distribution en poids moléculaire des protéines et peptides. Ce phénomène est principalement lié à la dénaturation des protéines de haut poids moléculaire (Privalov, 1990). Le contenu en acides gras évolue au cours des différentes étapes (seiches fraîches, de criée ou transformées). Les acides gras majoritaires sont le C16:0, le C22:6-3 et le C20:5-3 pour les viscères de seiches fraîches ; le C16:0 et le C22:6-3 pour les viscères de seiches de criée et le C22:6-3 pour les viscères de seiches transformées. Au cours du stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ , le pourcentage en C22:6-3 augmente tandis que celui en C20:5-3 diminue. En dépit des changements observés, le pourcentage en acides gras poly-insaturés reste élevé au cours des différentes étapes. De plus, les activités enzymatiques dosées demeurent élevées et les proportions entre les protéines, les lipides et les glucides restent stables malgré une diminution de leur quantité. Donc, les co-produits (viscères) de seiches issus de la transformation conservent de bonnes propriétés biochimiques pour la production d'autolysat.

## Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera

*E. Le Bihan, A. Perrin, N. Koueta*

*Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France*

*Corresponding authors: Estelle Le Bihan: tel.: (33) 231565295; fax: (33) 231565346; estlebihan@yahoo.fr*

### **Abstract**

The effects of different preservation times (cuttlefish auction), transformation factory treatments, different times of frozen storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and various defrosting temperatures were investigated with respect to the chemical changes of the viscera of cuttlefish (*Sepia officinalis*). During auction storage, pH and TCA (trichloroacetic acid) soluble protein concentration decreased, whereas intracellular (cathepsins, total acid proteases and acid phosphatases) and extracellular (amylase, chymotrypsin, trypsin and total alkaline proteases) enzymatic activities increased. In cuttlefish transformation factories, pH value and TCA soluble protein concentration increased. In transformation factory conditions, lipase and amylase levels varied, while other assayed enzymes were stable. Moreover, during transformation factory treatment, the molecular weight of proteins / peptides decreased and the oil composition evolution reflected hydrolysis of cuttlefish viscera. Thus, cuttlefish viscera fatty acid composition differed between fresh viscera and factory viscera. Despite changes in the fatty acid chain composition during factory transformation, the percentage of polyunsaturated fatty acids remained high. Frozen storage implied major changes in viscera quality such as an increase in pH and a decrease in the quantity of high molecular weight protein. Moreover, the higher the defrosting temperature, the higher was the pH. During storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  the quantities of proteins, carbohydrates and lipids decreased slightly.

Keywords: Auction, Cuttlefish *Sepia officinalis*, Defrosting, Digestive enzymes, Factory transformation, Gel filtration, Molecular weight, Oil composition, Storage, TCA soluble proteins.

### **1. Introduction**

Cephalopods are an important economic resource for global fisheries. Traditionally, viscera have been considered as waste and have been utilized only to a minor extent (Gildberg and Almas, 1986). Nevertheless, cuttlefish viscera represent an important part of the cuttlefish mass (15 to 25%), and thus their waste represents an important commercial loss. Moreover, the digestive gland, which corresponds to 15% of viscera, contains about 10% of lipids rich in

polyunsaturated fatty acids (Boucaud-Camou, 1973). Because of their biochemical composition, viscera could be the basis of marine autolysates for use as feed in aquaculture diets. In order to make cuttlefish viscera autolysate it is essential to study the activities of hydrolytic enzymes in viscera during different treatments (auction, transformation factories, freezing and defrosting) to reveal mechanisms of autolysis and viscera quality.

Although frozen storage can inhibit microbial spoilage, tissue proteins undergo a number of changes, which modify their structural and functional properties (Mackie, 1982). These changes include protein insolubility, formation of aggregates and mechanical damage during frozen storage (Badii and Howell, 2001; Badii and Howell, 2002). Enzymes and other components are released (Nilsson and Ekstrand, 1993). Moreover, lipid oxidation is one of the major problems in frozen animals, since cuttlefish contain significant levels of polyunsaturated fatty acids, especially eicopentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3). Different parameters influence viscera autolysis such as endogenous enzymes, which determine the autolysate quality, pH, which is an essential parameter to enzymatic activity, and temperature, which influences the degree of autolysis reached after storage and the degree of hydrolysis of the amide groups (Haaland and Njaa, 1989). Nevertheless, storage conditions determine the viscera quality and enzymatic degradation. Then, the effects of different preservation times (cuttlefish auction), transformation factory treatments, different times of freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  and various defrosting temperatures were investigated on chemical changes of cuttlefish (*Sepia officinalis*) viscera. Therefore, we assayed enzymatic activity, pH, the TCA (trichloroacetic acid) soluble protein level (which reflects the degree of peptide hydrolysis bonding), the quantities of proteins, lipids, carbohydrates and the molecular weights of proteins and peptides.

## **2. Material and methods**

### **a. Biological material**

Viscera were obtained from cuttlefish *Sepia officinalis* caught in the English Channel during autumn 2003. Viscera were removed from anaesthetized live cuttlefish in order to determine the quality of fresh viscera.

Auction cuttlefish viscera came from cuttlefish caught in the English Channel during autumn 2003 by fisherman and bought in the Port en Bessin auction of cuttlefish room in order to determine quality of viscera from auction.

Factory viscera came from cuttlefish caught bought in the fishing port auction; and subsequently frozen for 4 months at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; then defrosted in seawater at  $10^{\circ}\text{C}$  for two days; and eviscerated in the aim to determine quality of factories viscera.

Cuttlefish auction were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for different times and defrosted at 4, 25 or  $40^{\circ}\text{C}$  with the aim to determining the quality of frozen viscera and the impact of defrosting temperature.

After harvesting, all viscera were immediately disrupted, frozen in liquid nitrogen and lyophilized until analyses.

#### b. Analysis

- pH

One gram of dry tissue was added to 8 ml of double distilled water. After vortexing, the pH was estimated with a pH-meter.

- TCA soluble protein and protein content

The TCA soluble protein concentration was assayed according to Benjakul *et al.* method (Benjakul *et al.*, 2003). 9ml of TCA 5% (w/v) were added to 1g of dry tissue. After homogenization, the mixture was stored for 1 hour at  $4^{\circ}\text{C}$ , and then centrifuged at 5000g for 5 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . Protein content was estimated using the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951).

The amount of protein in each extract (in extraction buffer) was determined by the method of Lowry (1951) with bovine serum albumin as the standard.

- Molecular weight of proteins and peptides:

Dry tissue was added to Tris buffer containing 10mM Tris-HCl and 150mM NaCl, pH 8 (0.1g of tissue to 10ml). The mixture was stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 hour, then centrifuged at 10 000g for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant contains the Tris soluble proteins. The protein content was assayed according to the Lowry method (1951) using BSA as standard. The protein concentration in the supernatant was then adjusted to 10mg/ml. The molecular weight of the extract obtained was estimated using a Sephadex G25 column (Pharmacia G25M PD 10 Sephadex), which had been calibrated with the following molecular weight standards:  $\beta$ -amylase (200,000), alcohol deshydrogenase (150,000), albumin (66,000), carbonic anhydrase (29,000), vitamin B12 (1,350). The amount of protein in the different fractions (500 $\mu$ l) was measured by absorbance at 280 nm.

- Enzyme extraction and measurements

Extraction

For total alkaline proteases, trypsin, chymotrypsin, lipases, carboxypeptidases A and B, and amylase assays, the extraction was carried out in buffer (1ml of buffer per 60mg of sample) containing: 0.09M TRIS-base, 0.08M boric acid, 3 mM EDTA, 0,5mM mercapto-ethanol, glycerol 10%, pH 8,3 (Koueta, 1983; Perrin *et al.*, 2004; Le Bihan *et al.*, 2006c). The crude extract was centrifuged for 30 minutes at 10 000 g at 4°C, and the supernatant used for assays.

For total acid proteases, total acid phosphatases and cathepsin assays, the extraction was carried out in 2.5 volume of the extraction buffer (1% KCl containing 1mM of EDTA) (Le Bihan *et al.*, 2004).

The homogenate was centrifuged for 60 minutes at 10 000g at 4°C. The supernatant was used for the assays.

Enzymatic assays

The amylase activity was assayed using starch as substrate. Substrate buffer contained starch at 1% in a monobasic phosphate buffer at 20mM and 6.7mM of sodium chloride, pH 6.9. 100µl of substrate buffer were added to 100µl of extract (Le Bihan *et al.*, 2006c). The incubation was for 3 minutes at 20°C, after which 100µl of revelator (tartrate sodium potassium 0.94M, NaOH 0.4M and 3-5-dinitrosalicilic acid 48mM) was added and incubated for 15 minutes in boiling water. The absorbance was recorded at 640nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein).

Carboxypeptidases A and B activities were assayed using Folk methods. Enzyme activities were expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) (Folk and Schirmer, 1963).

Chymotrypsin activity was assayed according with Delmar method (Delmar *et al.*, 1979). Enzyme activity was expressed as specific activity (mU.mg<sup>-1</sup>.prot) where one enzymatic unit corresponds to 10mmoles L<sup>-1</sup> of pNa.min<sup>-1</sup>.

Trypsin activity was measured using Tsunematsu method (Tsunematsu *et al.*, 1985; Villanueva *et al.*, 2002), and chymotrypsin using Delmar method (Delmar *et al.*, 1979). Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic unit corresponds to 10mmoles L<sup>-1</sup> of pNa.min<sup>-1</sup>.

Total acid and alkaline proteases were measured using Charney method (Charney and Tomarelli, 1947; Van Wormhoudt and Sellos, 1980). Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein), where one unit correspond to the variation of one unit of O.D. min<sup>-1</sup>.

Lipase activity was assayed according to a modified method (Versaw *et al.*, 1989) using  $\beta$ -naphthyl caprilate as substrate. The assay mixture contained: 50 $\mu$ l of 200mM sodium taurocholate; 450 $\mu$ l of BES 50mM pH 7.2, 100 $\mu$ l of extract and 5 $\mu$ l of substrate at 200mM (dissolved in DMSO). The mixture was incubated for 30 minutes at 40°C, then 5 $\mu$ l of fast Blue BB 100mM (dissolved in DMSO) was added. The second incubation was for 5 minutes at 40°C. The reaction was stopped by addition of 50 $\mu$ l of trichloroacetic acid 0.72N and 675 $\mu$ l of 95% ethanol/ ethylacetylacrylate solution (V/V). The colored product was read at 540nm. The lipase activity was expressed as specific activity (U. mg<sup>-1</sup> protein).

Cathepsin activity was measured using haemoglobin as substrate (Bonete *et al.*, 1984; Le Bihan *et al.*, 2004). Appropriate blanks were used, and the products were evaluated by using the Folin-Lowry reaction employing tyrosine as standard (Barrett and Kirschke, 1981). The activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic unit corresponds to one micromole of tyrosine.mg<sup>-1</sup> protein.

Total acid phosphatase activities were determined using p-nitrophenyl-phosphate 2% as substrate (Moyano *et al.*, 1996). Total acid protease activity was expressed as specific activity ( $\mu$ U.mg<sup>-1</sup>.prot) where one enzymatic unit corresponds to 1 mmole L<sup>-1</sup> of p-nitrophenol.

- Viscera oil composition

Fatty acids were extracted using the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). They were methylated in order to eliminate glycerolipids and phospholipids. Next, they were separated using liquid chromatography to obtain fatty acids methylated extract (FAME). FAME were run through a FAREWAX gas chromatography column (Restek), 30m\*0.32mm, graph with polyethylene glycol.

- Total protein concentration

Dry tissue (10mg) was digested in NaOH 1 M (10ml) during 12 hours at 20°C. Then, total protein concentration was determined by the method of Lowry (1951).

- Total carbohydrate concentration

Total carbohydrates were extracted by the methods of Staats *et al.* (Staats *et al.*, 1999) and assayed according to the method of Dubois *et al.* (Dubois *et al.*, 1956).

- Total lipid concentration

Total lipids were extracted by the methods of Bligh and Dyer (1959) and assayed according to the method of Marsh and Weinstein (Marsh and Weinstein, 1966).



### c. Statistical analysis

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation (n=6 for each treatment). Data between treatments were compared with an ANOVA followed by a Tukey's test when significant differences ( $p < 0.05$ ) were found (Sokal and Rohlf, 1981).

## 3. Results and discussion

### a. pH

During auction of cuttlefish, viscera pH was significantly lower ( $p < 0.05$ ) to that in viscera from live cuttlefish, whereas pH in viscera from live cuttlefish was significantly lower ( $p < 0.05$ ) to that in viscera from cuttlefish transformation factories (Tableau 2). Moreover, we can observe, Tableau 2, that the cuttlefish freezing implied a significant increase of pH. Then, pH increased slowly during the storage of cuttlefish at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Therefore, we observed a decrease in pH a few hours after the animal death. The death of cuttlefish implied lysosome breaking, which enhances the liberation of acidity. Authors assayed the pH in pre-rigor fillets of Atlantic salmon (Einen *et al.*, 2002). They observed that pH of fresh fillets decreased rapidly from pH 6.6 to 6.3 after 10 hours at refrigerated storage ( $3-4^{\circ}\text{C}$ ). The death of an animal initiates major changes in the biochemical features of tissue leading to its disintegration, which include a decrease in pH and a reduction in the integrity of the cell membranes (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004). These changes interact with other biochemical processes occurring after death, especially proteolysis.

Tableau 2: Effect of different storage treatments on cuttlefish viscera. \*: Significantly different from viscera from live cuttlefish ( $p < 0.05$ ).

	Live	Auction	Factories
pH:	6.42 $\pm$ 0.01	6.33 $\pm$ 0.01 *	6.55 $\pm$ 0.01 *
TCA soluble proteins:	48.66 $\pm$ 8	35.6 $\pm$ 11 *	58.85 $\pm$ 5 *
Total alkaline proteolytic activity (U * 10 <sup>-5</sup> /mg proteins):	4.8 $\pm$ 0.01	8.3 $\pm$ 0.005 *	6.1 $\pm$ 0.01 *
Amylase activity (U* 10 <sup>-4</sup> /mg proteins)	2 $\pm$ 0.008	2.7 $\pm$ 0.003 *	0.96 $\pm$ 0.004 *
Carboxypeptidases A activity (U* 10 <sup>-4</sup> /mg proteins)	2.4 $\pm$ 0.001	2.2 $\pm$ 0.005	2.6 $\pm$ 0.001*
Carboxypeptidases B activity (U* 10 <sup>-4</sup> /mg proteins)	2.3 $\pm$ 0.008	2.3 $\pm$ 0.001	2.9 $\pm$ 0.005*
Chymotrypsin activity (U* 10 <sup>-9</sup> /mg proteins)	9.8 $\pm$ 0.1	13 $\pm$ 0.05 *	9.9 $\pm$ 0.1
Trypsin activity (U* 10 <sup>-9</sup> /mg proteins)	7.9 $\pm$ 0.8	14 $\pm$ 0.3 *	15 $\pm$ 0.4 *
Lipases activity (U* 10 <sup>-4</sup> /mg proteins)	1.9 $\pm$ 0.01	1.9 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.01
Cathepsin activity (U* 10 <sup>-3</sup> /mg proteins)	7.2 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 0.11 *	15 $\pm$ 0.5 *
Total acid proteolytic activity (U* 10 <sup>-5</sup> /mg proteins)	9 $\pm$ 0.1	18 $\pm$ 0.5 *	40 $\pm$ 0.1 *
Acid phosphatases activity (U* 10 <sup>-3</sup> /mg proteins)	6 $\pm$ 0.8	7.7 $\pm$ 0.3 *	8.4 $\pm$ 0.4 *

Nevertheless, during frozen storage in cuttlefish transformation factories (Tableau 3), the pH increases as observed by others authors (Hultmann and Rustad, 2004) in their experiments on the Atlantic salmon, where the pH value increase during the storage period.

Tableau 3: Impact of storage time and defrosting temperature on cuttlefish viscera.

Time storage at – 20°C:	0 days (auction):	15 days:			30 days:			60 days:		
Temperature of defrosting:	–	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
pH:	6.35 ± 0.05	6.51 ± 0.01	6.55 ± 0.05	6.62 ± 0.02	6.53 ± 0.01	6.61 ± 0.01	6.7 ± 0.015	6.58 ± 0.02	6.64 ± 0.01	6.73 ± 0.01
Total proteins (g/100g):	85.79 ± 5	52.66 ± 8	42.6 ± 11	44.37 ± 9	24.85 ± 5	40.82 ± 6	36.37 ± 4	21.79 ± 4	15.66 ± 9	14.3 ± 6
Total carbohydrates (g/100g):	2.14 ± 0.2	1.26 ± 0.1	1.05 ± 0.05	1.2 ± 0.1	1.43 ± 0.1	1.17 ± 0.05	0.76 ± 0.02	1.16 ± 0.03	1.22 ± 0.04	0.69 ± 0.02
Total lipids (g/100g):	1.86 ± 0.5	4.4 ± 0.8	4 ± 0.3	5.15 ± 0.8	6.13 ± 0.4	6 ± 0.6	7 ± 0.4	3.54 ± 0.6	5.6 ± 0.9	4.7 ± 0.5

#### b. TCA soluble proteins

During auction of cuttlefish, viscera concentrations of TCA soluble proteins were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than TCA soluble proteins measured in viscera from live cuttlefish, whereas they were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in transformation factory viscera (Tableau 2). So, we observed a decrease of TCA soluble proteins a few hours after the animal's death. The death of animals implied the lysosomes breaking, which enhanced liberation of acidity and the decrease of TCA soluble protein concentration. During factory storage pH increases, which implied the increase of TCA soluble proteins quantity.

Benjakul and Bauer (2001) used the TCA soluble proteins measured as an index of autolytic degradation products. Using this method, they observed an increase of autolytic degradation products after a freeze-thaw cycle and storage at 2-4°C for 3 days. Therefore, freeze-thawing may affect the distribution of proteases in tissues, leading to the hydrolysis of proteins. As reported by Benjakul, Visessanguan, and Tueksuban (2003), TCA soluble proteins in cuttlefish viscera increased during iced storage, suggesting the autolytic degradation of cuttlefish proteins.

In factories, cuttlefish are maintained frozen during several months. Ruiz-Capillas *et al.* (2002) observed that 5% NaCl protein solubility in the muscle of volador (*Illex coindetii*) was higher than 60% throughout frozen storage and exhibited an increasing solubility in the initial months. Moreover, an initial increase of protein solubility was also observed during frozen

storage of sardine muscle (Montero *et al.*, 1996). This could be because in the early stages of storage, there is, as a result of the formation of ice crystals, a redistribution of hydrogen bridges and hydrophobic interactions, leading to denaturation (Matsumoto, 1980). This phenomenon could also result from the intense activity of cephalopod enzymes, which is several times greater than in fish (Ruiz-Capillas *et al.*, 2002).

### c. Molecular weight of proteins and peptides

Changes in the molecular weight of proteins and peptides in viscera according to their storage are presented in Figure 24 and Figure 25. The quantity of high molecular weight proteins (greater than 20 kDa) decreased during freezing, while, amounts of low molecular weight proteins (lower than 6.5 kDa) stay similar during storage. Thus, freezing implied major changing in the molecular weight distribution, because of the denaturation of high molecular weight proteins (Privalov, 1990).

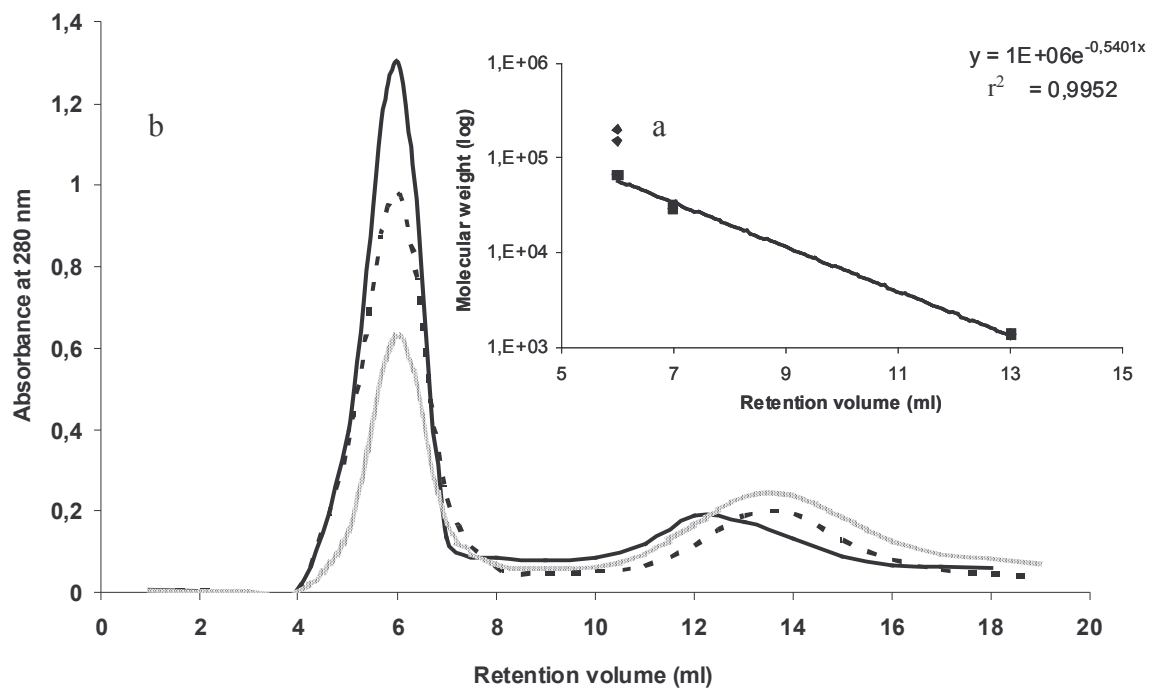


Figure 24: a) Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Elution profile of peptides and proteins in viscera from live cuttlefish. —, viscera from auction - - -, viscera from factories .....

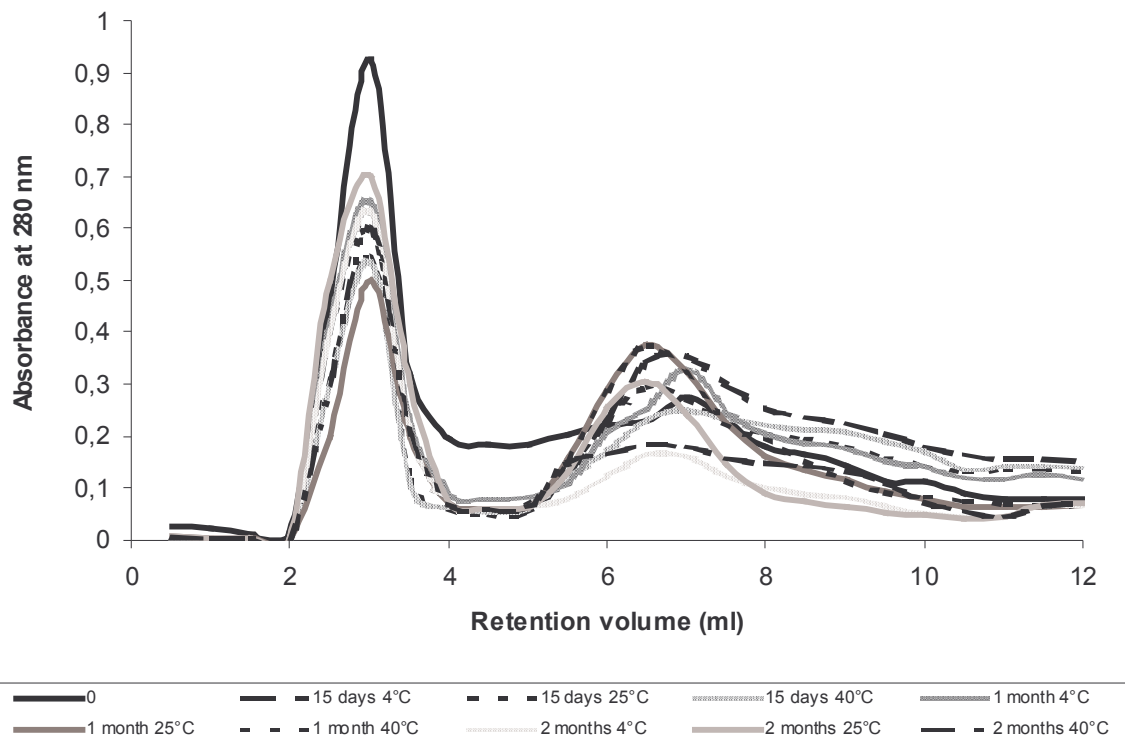


Figure 25: Elution profile of peptides and proteins in viscera (absorbance at 280 nm).

d. Extracellular enzyme specific activity:

In viscera from auction, specific activity of amylase was significantly higher ( $p < 0.05$ ) to activity measured in viscera from live cuttlefish, while it was significantly lower ( $p < 0.05$ ) to factory viscera (Tableau 2). Therefore, a few hours after the animal death, we observed an increase of amylase activity in cuttlefish viscera. Nevertheless, amylase activity was lower in factory viscera, in which we observed a degradation of this activity during factory transformation due to the instability of amylase in these storage conditions.

In factory viscera, specific activities of carboxypeptidases A and B were significantly higher ( $p < 0.05$ ) to activity measured in viscera from live cuttlefish (Tableau 2). Thus, carboxypeptidases are very stable under the tested storage conditions.

In viscera from auction, specific activity of chymotrypsin was significantly higher ( $p < 0.05$ ) to activity measured in viscera from live cuttlefish (Tableau 2). However, chymotrypsin activity was lower in factory viscera than in auction viscera, which demonstrated a slight degradation of this activity during factory transformation.

In auction and factory viscera, the specific activity of trypsin was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the activity measured in viscera from live cuttlefish (Tableau 2). Moreover, this activity stays high in factory viscera. Thus, trypsin was stable in the tested conditions. Chymotrypsin and trypsin are quantitatively important in the digestive system of carnivores due

to their high proteolytic activities (Heu *et al.*, 1995). They actively participate in viscera autolysis.

In auction and factory viscera, specific total proteolytic alkaline activity was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than activity measured in viscera from live cuttlefish (Tableau 2). The death of cuttlefish leads to the degradation of zymogene vesicles. Then, a few hours after the animal death, we observed an increase in total proteolytic alkaline activity in cuttlefish viscera. Nevertheless, total proteolytic alkaline activity was lower in factory viscera than in auction viscera, which demonstrated a little degradation of this activity during factory transformation.

Viscera contain a variety of digestive proteases, which play a role in the softening of abdominal tissue during post-mortem storage (Haard, 1992). Animal death results in major changes in the biochemical features of the tissue, leading to its disintegration (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004). This suggests that zymogene vesicles present in cells, containing secreted proteolytic alkaline enzymes, break down a few hours after the cuttlefish death inducing the increased alkaline protease activity (Le Bihan *et al.*, 2006c).

There were no significant differences between live cuttlefish viscera and other viscera with respect to specific lipase activity (Tableau 2). Thus, lipases were very stable in the tested storage conditions. Lipases are essential in autolysis because they determine the lipid quality in the final product. Their high stability over time could result in the accumulation of polyunsaturated fatty acids in high quantity in the viscera autolysate.

Benjakul and Bauer (2001) used activities of enzymes such as glucosidase to observe the effect of freeze-thaw cycles on cell integrity of catfish fillets. They detected an increase in enzymatic activities in correlation to the disintegration of membrane structure. They concluded that freeze-thaw processing potentially disrupts the cells, leading to the release of enzymes from intracellular organelles into the sarcoplasm. Thus, the freezing resulted in the loss of membrane integrity. Moreover, Benjakul and Bauer (2001) observed that after 3 days of storage at  $2-4^{\circ}\text{C}$  enzymatic activities decreased, probably due to the denaturation or instability of these enzymes during storage.

#### e. Specific activity of intracellular enzymes

In auction and factory viscera, the specific activity of cathepsins, total proteolytic acids and phosphatase acids were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the activity measured in viscera from live cuttlefish (Tableau 2). Thus, we observed an increase of total proteolytic acids and phosphatase acids activities a few hours after animal death. The death of cuttlefish implied the lysosomes breaking, which improved the liberation of intracellular enzymes. Moreover, these

activities were higher in factory viscera than in auction viscera. Thus, cuttlefish transformation in factories does not alter these activities.

Lysosomes are cytoplasmic granules that contain several acid hydrolases within the lysosomal membrane (Duve *et al.*, 1955; Aoki and Ueno, 1997). These hydrolases, such as catheptic enzymes, are considered to be the main cause of post-mortem tissue softening. The most important post-mortem change with regard to tissue degradation is considered to be the liberation of cathepsin from lysosomes (Haard, 1992; Aoki and Ueno, 1997). These authors observed the gradual decrease of cathepsins activities in the lysosomal fraction and the parallel increase in the supernatant fraction as the tissue aged at 0°C. Thus, it appears that the cathepsins were liberated from lysosomes during ageing.

f. Fatty acid composition

Cuttlefish viscera fatty acid composition (Tableau 4) significantly ( $p < 0.05$ ) differed between fresh viscera, auction viscera and factory viscera. The prominent fatty acids were C16:0, C22:6-3 and C20:5-3 in fresh viscera. In auction viscera, most important fatty acids were C16:0 and C22:6-3. Whereas in factory viscera the major fatty acid was C22:6-3. During auction and frozen storage the percentage of C22:6-3 increased, but that of C20:5-3 decreased. Despite changes in fatty acid composition during factory transformation, the percentage of poly-unsaturated fatty acids remained high. Our results are in accord with other experiments, such as those of Jeong Jeong, Ohshima and Koizumi (1999), who observed that the prominent fatty acids in muscle of giant scallop during frozen storage were poly-unsaturated fatty acids such as 20:5n-3, 22:6n-3 and 20:4n-6 (Jeong *et al.*, 1999).

As observed by Pirini *et al.* (2000) in the sea bass, we note that the high unsaturated fatty acid content is typical of oil of marine origin (20:5n-3; 22:6n-3). The n-3 poly-unsaturated fatty acid content was five times higher than that of n-6 fatty acids, which emphasizes the high quality of viscera fat from a cardiovascular point of view (Pirini *et al.*, 2000; Garcia-Arias *et al.*, 2003).

Tableau 4: Cuttlefish viscera oil composition (% of total oil extracted). \*: Significantly different from viscera from live cuttlefish (p&lt;0.05).

	Live	Auction	Factories
ISO14:0	0.21 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
C14:0*	3.53 ± 0.03	5.8 ± 0.02	3.51 ± 0.01
ISO15:0	0.25 ± 0.001	0.5 ± 0.003*	0.20 ± 0.004*
ANT15:0	0.09 ± 0.002	0.08 ± 0.005	0.07 ± 0.003
C15:0	0.46 ± 0.004	0.44 ± 0.009	0.41 ± 0.01*
ISO16:0	0.27 ± 0.004	0.25 ± 0.003	0.22 ± 0.0004*
ISO17:0	0.55 ± 0.01	0.6 ± 0.03	0.65 ± 0.01*
ANT17:0	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.26 ± 0.04
C16:0	15.12 ± 0.05	15.17 ± 0.03	15.33 ± 0.04
C17:0	0.56 ± 0.01	0.6 ± 0.006*	0.68 ± 0.01*
ISO18:0	0.14 ± 0.0014	0.14 ± 0.0003	0.14 ± 0.0009
C18:0	5.42 ± 0.12	6 ± 0.01*	6.23 ± 0.05*
C19:0	0.09 ± 0.005	0.09 ± 0.003	0.10 ± 0.0046
C20:0	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.02
C22:0	0.08 ± 0.03	0.079 ± 0.01	0.09 ± 0.01
C24:0	0.53 ± 0.02	0.6 ± 0.04*	0.65 ± 0.01*
Total:	32.97 ± 0.38	30.91 ± 0.5	34.02 ± 0.21

	Live	Auction	Factories
C16:2W6	0.06 ± 0.02	0	0
C16:2W4	0.25 ± 0.02	0.1 ± 0.001*	0.07 ± 0.003*
C18:2W7	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.002	0.05 ± 0.002
C18:2W6	0.49 ± 0.02	0.5 ± 0.04	0.57 ± 0.01
C18:2W4	0.37 ± 0.01	0.3 ± 0.03*	0.18 ± 0.003*
C20:2W6	0.32 ± 0.002	0.30 ± 0.008	0.40 ± 0.002*
C22:2W6	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.009	0.05 ± 0.0007
Total:	1.56 ± 0.07	1.3 ± 0.03	1.32 ± 0.01

	Live	Auction	Factories
C16:3W6	0.42 ± 0.01	0.5 ± 0.01*	0.63 ± 0.01*
C16:3W4	0.05 ± 0.002	0.025 ± 0.003*	0.02 ± 0.001*
C16:3W3	0.10 ± 0.003	0.1 ± 0.001	0.11 ± 0.001
C18:3W6	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.0008	0.05 ± 0.0007*
C18:3W3	0.28 ± 0.01	0.3 ± 0.003	0.35 ± 0.003*
C20:3W6	0.19 ± 0.002	0.15 ± 0.005	0.12 ± 0.003*
C20:3W3	0.09 ± 0.002	0.11 ± 0.003	0.11 ± 0.003
Total: *	1.22 ± 0.02	1.26 ± 0.01	1.39 ± 0.01

	Live	Auction	Factories
C14:1W9	0.21 ± 0.007	0.2 ± 0.005	0.17 ± 0.002*
C14:1W7	0.29 ± 0.002	0.25 ± 0.007	0.15 ± 0.003*
C15:1W8	0.06 ± 0.003	0.06 ± 0.001	0.05 ± 0.003
C16:1W7	7.05 ± 0.02	7.01 ± 0.08	5.73 ± 0.06*
C16:1W5	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.007	0.26 ± 0.004
C17:1W10	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.50 ± 0.004*
C17:1W8	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.004
C18:1W9	8.07 ± 0.05	8.5 ± 0.07	9.23 ± 0.1*
C18:1W7	5.09 ± 0.1	5.01 ± 0.09	3.64 ± 0.04*
C18:1W5	0.33 ± 0.01	0.3 ± 0.007	0.32 ± 0.0014
C19:1W10	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.009	0.16 ± 0.01
C19:1W8	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.008	0.15 ± 0.02
C20:1W11	0.76 ± 0.05	0.7 ± 0.007*	0.39 ± 0.01*
C20:1W9	1.54 ± 0.05	2.01 ± 0.08*	2.54 ± 0.06*
C20:1W7	0.49 ± 0.005	0.4 ± 0.002*	0.36 ± 0.005*
C20:1W5	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.007	0.03 ± 0.002
C22:1W13+11	0.29 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.42 ± 0.05
C22:1W9	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.03
C22:1W7	0.10 ± 0.01	0.1 ± 0.003	0.06 ± 0.01
C22:1W5	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.01
C24:1W9	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.009	0.22 ± 0.01
C24:1W7	0.04 ± 0.005	0.04 ± 0.007	0.03 ± 0.01
C24:1W	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.008
Total:	26.15 ± 0.07	26.8 ± 0.07	25.07 ± 0.09

	Live	Auction	Factories
C16:4W3	0.11 ± 0.001	0.12 ± 0.007	0.11 ± 0.0007
C18:4W3	0.58 ± 0.01	0.6 ± 0.05	0.36 ± 0.01*
C20:4W6	3.87 ± 0.08	4.53 ± 0.08*	4.83 ± 0.04*
C20:4W3	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.001	0.41 ± 0.005
C22:4W6	0.61 ± 0.01	0.5 ± 0.004*	0.71 ± 0.003*
Total:*	5.58 ± 0.07	6.18 ± 0.04	6.42 ± 0.05

	Live	Auction	Factories
C20:5W3	13.90 ± 0.16	12 ± 0.03*	10.95 ± 0.04*
C21:5W3	0.43 ± 0.03	0.33 ± 0.001*	0.21 ± 0.004*
C22:5W6	0.44 ± 0.05	0.39 ± 0.004*	0.64 ± 0.004*
C22:5W3	2.88 ± 0.04	2.9 ± 0.03	2.78 ± 0.02
C22:6W3	14.91 ± 0.19	16.11 ± 0.05*	18.23 ± 0.03*
Total:*	32.55 ± 0.24	31.73 ± 0.09	32.82 ± 0.07

#### g. Biochemical composition

Cuttlefish viscera from auction contain 86g/100g of proteins, 12g/100g of lipids and 2.1g/100g of carbohydrates (Tableau 3). These data are in accordance with others authors (Blanchier and Boucaud-Camou, 1982). The freezing of cuttlefish improved a significant decreased of proteins, lipids and carbohydrates quantity in their viscera (Tableau 3). Moreover, the storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  provokes a little decreased of protein quantity in cuttlefish viscera. Nevertheless, the proportions of proteins, lipids and carbohydrates stay similar during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The temperature of defrosting implied negligible modifications on viscera quality. Then, major changes were observed during the freezing of cuttlefish.

#### 4. Conclusion

Different phenomena take place during the auction and factory storage of cuttlefish. Primarily, our results show a breakdown of lysosome, which induces an increase in acid enzyme activities and a decrease of pH and TCA soluble protein concentration. Secondly, the degradation of zymogene vesicles, which contain secreted enzymes, implied an increase in the concentration of secreted enzymes. Finally, we observed a slight hydrolysis of viscera. Cuttlefish viscera fatty acid composition differs between fresh viscera, auction viscera and factory viscera. The prominent fatty acids were C16:0, C22:6-3 and C20:5-3 in fresh viscera. In auction, major fatty acids are C16:0 and C22:6-3. In factory viscera, the main fatty acid was C22:6-3. During frozen storage the percentage of C22:6-3 increased, but that of C20:5-3 decreased. Despite changes in fatty acid composition during factory transformation, the percentage of polyunsaturated fatty acids was maintained high and the proportion between proteins, lipids and carbohydrates varied little. Thus, factory viscera conserved good capacities to be used for the production of autolysates.

#### Acknowledgements

This work was supported by the IFOP. We are grateful to fisherman from Brehal (Manche in France), Granville (Manche in France) and the cooperative Granvilmer (Manche, France) for providing the biological materiel used in this study. We want to thank Mathieu Tirot for technical help and Dr. Graham Pierce for his help in English editing and scientific expertise.



La Figure 26 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience concernant l'impact du stockage et de différents traitements sur la qualité des viscères de seiche.

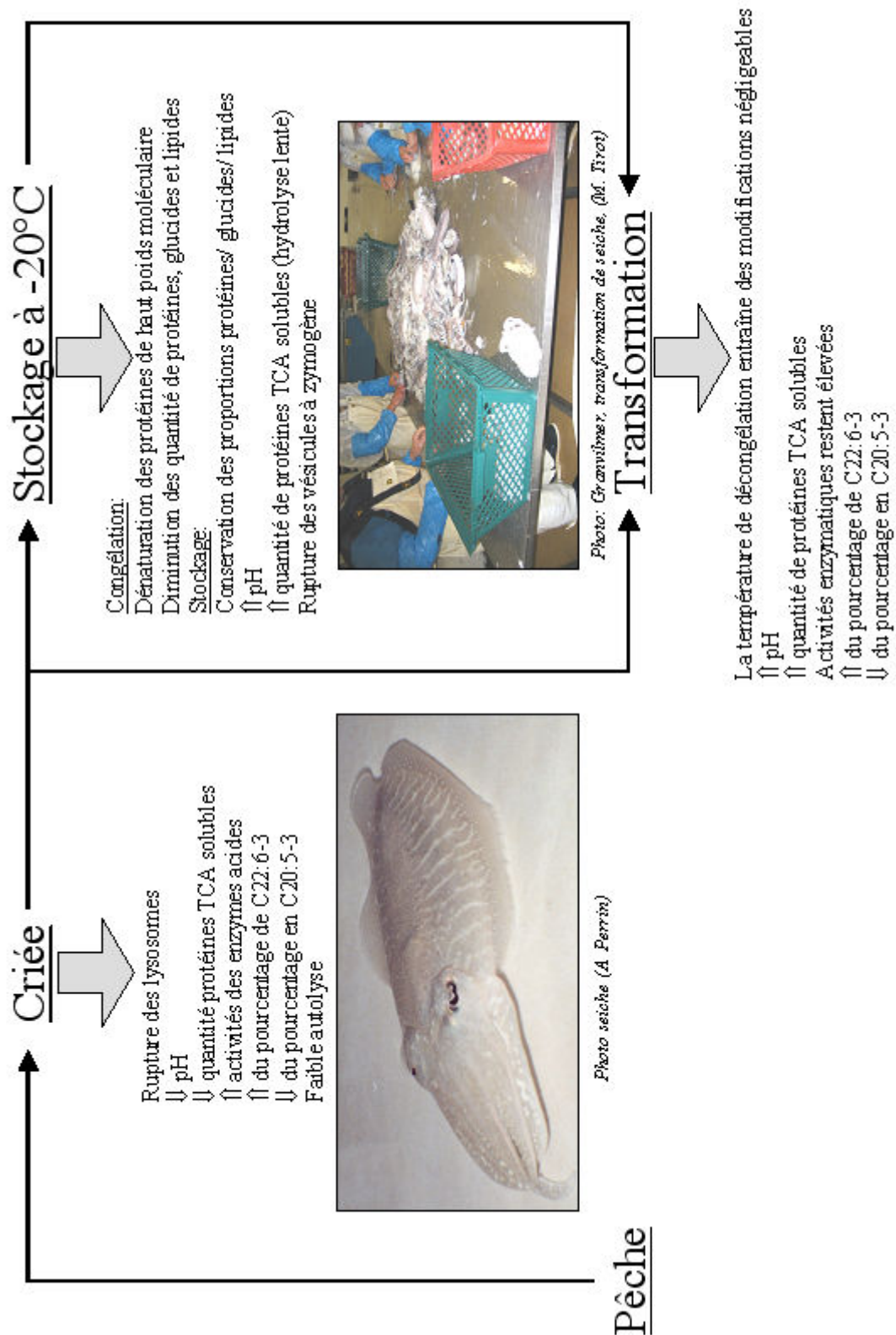


Figure 26: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'impact du stockage et de la transformation sur la qualité des viscères de seiches.

### **III Préparation d'ensilages et effet du stockage**

#### **A. Introduction**

Comme observé dans les parties précédentes, les céphalopodes sont une ressource économique importante pour les pêcheries mondiales. De plus, les viscères de seiches ont une composition biochimique particulièrement intéressante dans l'optique de leur valorisation en ensilage (Le Bihan *et al.*, 2006b; Le Bihan *et al.*, 2006c). A partir des résultats obtenus concernant l'évolution post-mortem des viscères de seiches et l'impact du stockage sur la qualité des co-produits, un protocole de fabrication d'ensilage a été mis en place.

Classiquement, la production des autolysats exploite les enzymes endogènes présentes dans les viscères pour produire les autolysats de composition désirée (Raa and Gildberg, 1982). Un ensilage correspond à un produit liquide fabriqué uniquement à partir d'un animal entier ou bien d'une partie de cet animal et d'un acide. La liquéfaction est provoquée par l'action des enzymes présentes dans les tissus et accélérée par l'ajout d'acide. Celui-ci ayant pour rôle de créer les conditions optimales d'action des enzymes, d'aider à la destruction des tissus et de limiter la croissance bactérienne.

Deux ensilages ont été préparés à deux températures différentes, sur la base de l'étude de la qualité du matériel biologique. Ces ensilages ont ensuite été analysés.

#### **B. Matériel et méthodes**

##### **1. Matériel biologique**

Les seiches sont pêchées en Manche au cours de l'automne 2003 et emportées à la criée de Port en Bessin. Elles sont alors stockées à -20°C pendant plusieurs mois, dans l'attente de leur transformation (coopérative de Granvilmer). Elles sont alors décongelées dans des bassins d'eau de mer (10°C) fortement bullés pendant 24 heures. Une fois décongelées, les seiches sont transformées. Les viscères et les yeux sont mis dans des conteneurs maintenus à 10°C.

##### **2. Fabrication des ensilages**

Les viscères et les yeux (40 litres) sont prélevés dans les conteneurs de la coopérative Granvilmer, mixés et mélangés avec de l'acide propionique à proportion de 1,5% (poids/volume). De l'éthoxiquine (250 ppm) est ajouté au mélange afin de réduire les risques d'oxydation des lipides. Le mélange est ensuite séparé dans deux bacs en plastique, résistant à

l'acide. Le premier bac est stocké à 4°C, et le second à 25°C pendant 50 jours (Le Bihan *et al.*, 2006b; Le Bihan *et al.*, 2006c).

Au cours de l'autolyse, des prélèvements sont effectués tous les 10 jours, puis lyophilisés dans l'attente des analyses biochimiques. Après l'incubation de 50 jours, les ensilages obtenus sont lyophilisés pour obtenir environ 2,9kg de chaque ensilage (rendement de 14,3%). Ces ensilages sont ensuite stockés à température ambiante dans l'obscurité.

### 3. Analyses

#### a. pH

Un gramme de lyophilisat est ajouté à 8ml d'eau bi-distillée. Après passage au vortex, le pH est estimé à l'aide d'un pH-mètre.

#### b. Quantité de protéines TCA (acide trichloroacétique) solubles et de protéines

Le contenu en protéines TCA solubles est effectué selon la méthode de Benjakul *et al.* (2003) développée antérieurement (chapitre 1, II).

#### c. Poids moléculaire des protéines et peptides

Méthode développée précédemment (chapitre 1, II).

#### d. Contenu en acides aminés

La concentration en acides aminés libres est déterminée en traitant 500 µl d'une solution d'ensilage (0,1g/10ml) avec 500µl de TCA 20%. Les échantillons sont centrifugés à 5000g pendant 15 minutes. Le surnageant est alors utilisé pour le dosage des acides aminés libres (Doi *et al.*, 1981; Gilmartin and Jervis, 2002). L'échantillon (100µl) est incubé à 85°C pendant 5 minutes avec 700µl de réactif ninhydrin (0,8g de ninhydrin dans 80ml d'éthanol et 10 ml de TCA contenant 1 gramme de CdCl<sub>2</sub> dissous dans 1 ml d'eau). L'échantillon est ensuite placé sur de la glace et 100µl d'eau distillée sont ajoutés. L'essai est ensuite centrifugé à 5000g pendant 5 minutes et l'absorbance est lue à 504nm sur un spectrophotomètre. Le blanc est préparé en substituant l'échantillon par de l'eau distillée. Une courbe étalon est préparée en utilisant une gamme d'arginine de 0 à 60nmol.

#### e. Digestibilité des protéines *in vitro*

La détermination de la digestibilité protéique est effectuée selon la méthode de Ali *et al.* (2003). L'échantillon (0,2g) est placé dans un tube à centrifuger de 50ml auquel on ajoute 15ml d'HCl 0,1N contenant 1,5mg de pepsine. Le mélange est alors incubé pendant 3 heures à 37°C. La suspension est ensuite neutralisée avec 3,3ml de NaOH 0,5M et traité avec 4mg de pancréatine dans 7,5ml de tampon phosphate 0,2M, pH 8, contenant de l'azide de sodium à 0,005M. L'ensemble est mélangé puis mis à incuber à 37°C pendant 24 heures. L'échantillon est

alors traité avec 10ml de TCA 10% et centrifugé à 5000g pendant 20 minutes à température ambiante (Ali *et al.*, 2003). Les protéines et peptides contenus sont dosés à l'aide de la méthode de Lowry (1951). La digestibilité est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Protéines contenues dans le surnageant} / \text{protéines contenues dans l'échantillon} * 100$$

f. Extraction des enzymes et dosages

• Extraction

En ce qui concerne le dosage de l'amylase et des protéases totales alcalines, l'extraction est faite dans un tampon (1ml de tampon pour 60mg d'échantillon) contenant : 0,09M de Tris-base, 0,08M d'acide borique, 3mM d'EDTA, 0,5mM de mercapto ethanol, du glycerol 10%, pH 8,3 (Koueta, 1983; Benjakul *et al.*, 2003; Perrin *et al.*, 2004).

Pour le dosage des protéases totales acides, l'extraction est faite dans un tampon (2,5ml de tampon pour 60mg d'échantillon) contenant : 1% de KCl et 1mM d'EDTA (Le Bihan *et al.*, 2004).

L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 60 minute à 10 000g à 4°C. Les dosages sont effectués sur le surnageant.

• Dosages enzymatiques

L'activité de l'amylase est dosée selon un protocole décrit par SIGMA-ALDRICH, utilisant l'amidon en tant que substrat tel que présentée préalablement (chapitre 1, II).

L'activité des protéases totales acides et alcalines est mesurée selon la méthode de Charney et Tomarelli (1947) et par Van Wormhoudt et Sellos (1980) dont la méthode a été développée précédemment (chapitre 1, II).

• Dosage de la quantité de protéines

Le lyophilisat de tissu (10mg) est digéré par du NaOH 1M (10ml) pendant 12 heures. Ensuite, le contenu en protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry (1951).

• Dosage de la quantité de glucides

Les glucides totaux sont extraits (Staats *et al.*, 1999) puis dosés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956).

• Dosage de la quantité de lipides

Les lipides totaux sont extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959) puis dosés selon la méthode de March et Weinstein (1966).

- Recherche de micro-organismes

La réglementation française en vigueur relative à la transformation des déchets animaux nécessite la recherche de certains micro-organismes. Concernant cette réglementation le texte référence correspond à l'arrêté du 30 décembre consolidé modifié par l'AM du 12 mars 1993, AM du 28 juin 1996, AM du 6 février 1998, AM du 9 avril 2001. D'après l'arrêté, la matière première utilisée dans le cadre de cette étude est considérée comme une matière à faible risque. En effet, les déchets frais d'animaux marins qui proviennent d'usines de fabricant des produits destinés à la consommation humaine, sont considérés comme une matière à faible risque. De ce fait, les produits finis doivent répondre à des normes microbiologiques : salmonelles : absence dans 25g : n=5, c=0, m=0, M=0 ; entérobactéries : n= 5, c=2, m=10, M = 3 x 10<sup>2</sup>/g. La détermination de la présence ou l'absence de bactéries est effectuée selon les normes ISO-AFNOR, respectivement V08-052PR pour les salmonelles et V08-015PR pour les entérobactéries.

- Dosage des dioxines, PCB, HAP :

L'ensemble de ces dosages a été effectué par le LABERCA de l'école vétérinaire de Nantes, habilité pour ces dosages.

- Analyses statistiques

Les résultats sont donnés avec un écart type (n=10 pour chaque traitement). Les données entre chaque point sont comparées à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey où les différences significatives (p<0,05) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

## Résultats

La répartition en poids moléculaire du contenu protéique des ensilages évolue très peu au cours du temps (Figure 27 et Figure 28). Les ensilages sont composés en majeure partie par des peptides de poids moléculaire inférieur à 6,5kDa. Trois pics sont observables sur le profil de poids moléculaire en ce qui concerne l'ensilage fabriqué à 25°C alors que seulement deux pics le sont pour l'ensilage fabriqué à 4°C.

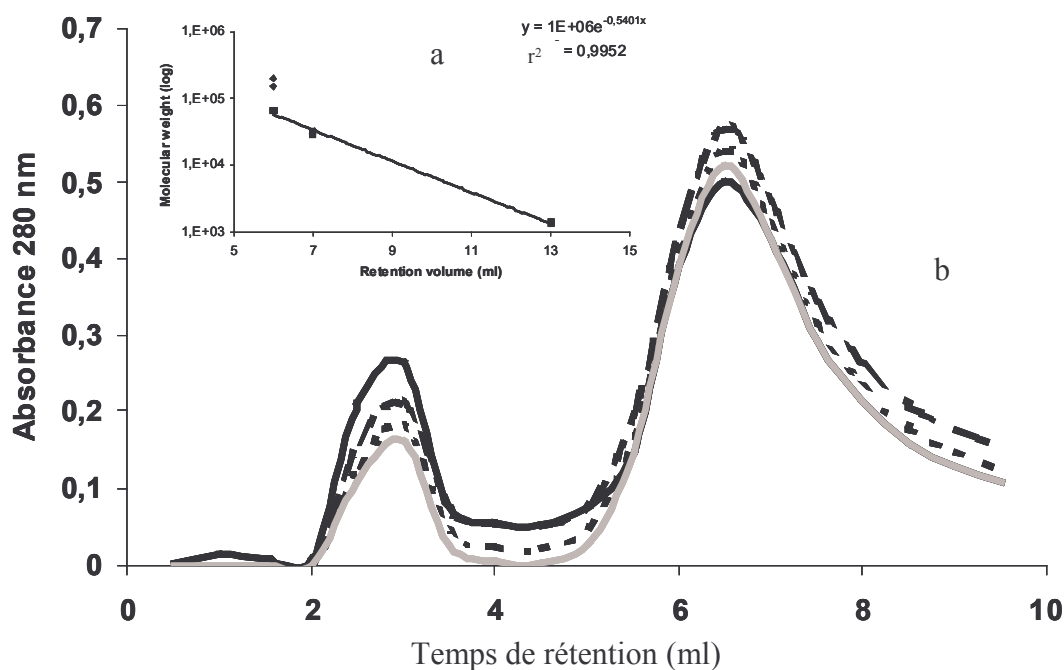


Figure 27: a) Calibration de la colonne Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Poids moléculaire des protéines et peptides dans les ensilages fabriqués à 4°C à 0 jours: —, 2 mois: \_\_\_\_, 8 mois: \_\_ ou 12 mois: — après production.

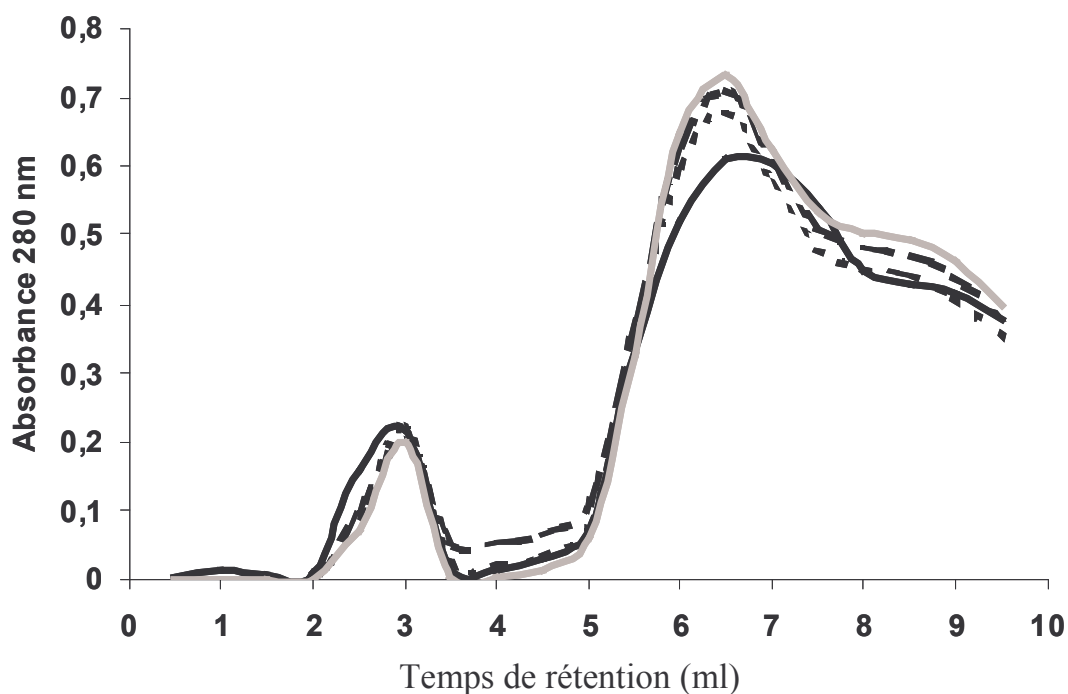


Figure 28: Poids moléculaire des protéines et peptides dans les ensilages fabriqués à 25°C à 0 jours: —, 2 mois: \_\_\_\_, 8 mois: \_\_ ou 12 mois: — après production.

Le pH augmente significativement ( $p < 0,05$ ) au cours du temps pendant la production (Tableau 5). Il passe de 4,51 à 4,83 en ce qui concerne l'ensilage fabriqué à 4°C et de 4,51 à 5,95 pour l'ensilage fabriqué à 25°C. Concernant les protéines TCA solubles, leur concentration augmente constamment pendant l'incubation à 4°C tandis qu'elle se stabilise après 20 jours pour l'ensilage fabriqué à 25°C. Dans tous les cas, la quantité de protéines TCA solubles est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) en fin de lyse par rapport au début de l'incubation. Au-delà de 30 jours, la quantité de protéines TCA solubles devient stable et il n'y a plus de différence significative entre les deux ensilages. Peu de différences sont observées pendant le stockage des ensilages après lyophilisation, ce qui reflète une faible autolyse et une bonne stabilisation des produits. L'activité spécifique de l'amylase est altérée par l'autolyse. En effet, après 10 jours d'ensilage, l'activité spécifique de l'amylase est significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) à celle observée au début de l'ensilage. En ce qui concerne l'ensilage fabriqué à 4°C, l'activité reste stable jusqu'à la fin de l'ensilage, tandis qu'elle diminue continuellement jusqu'à disparaître pour le second ensilage. Quant à l'activité protéolytique totale acide ou alcaline, elle est faiblement affectée par l'ensilage.

Tableau 5: Evolution biochimique des ensilages au cours de leur fabrication. \*: Différences significatives par rapport au jour 0 ( $p < 0,05$ ).

Temps (jours):	Ensilage fabriqué à 4°C:					Ensilage fabriqué à 25°C:				
	0	10	20	30	40	0	10	20	30	40
pH:	4,51 ± 0,1	4,6 ± 0,07	4,7 ± 0,05*	4,76 ± 0,1*	4,83 ± 0,1*	4,51 ± 0,1	5,1 ± 0,09*	5,6 ± 0,04*	5,8 ± 0,1*	5,95 ± 0,1*
Protéines TCA solubles (mg/ml):	205 ± 4,7	195 ± 6,4	331 ± 18*	299 ± 17*	303 ± 14*	205 ± 4,7	342 ± 4,7*	308 ± 16*	283 ± 18*	284 ± 8*
Activité spécifique de l'amylase (U/mg protéines):	9,46 ± 0,8	7,2 ± 0,15*	5,6 ± 0,9*	7,3 ± 0,7*	5,4 ± 0,26*	9,5 ± 0,86	8,63 ± 1,9*	3,9 ± 0,53*	2,3 ± 0,14*	0,4 ± 0,04*
Activité totale spécifique protéolytique acide (U/mg protéines):	5,5 ± 0,15	4,15 ± 0,1	4,9 ± 0,15	4,58 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,5 ± 0,15	4,05 ± 0,1*	5,2 ± 0,11	7,5 ± 0,3*	5,7 ± 0,2
Activité totale spécifique protéolytique alcaline (U/mg protéines):	1,6 ± 0,12	1,5 ± 0,08	1,7 ± 0,07	3,2 ± 0,15*	1,9 ± 0,09	1,6 ± 0,12	1,7 ± 0,14	1,2 ± 0,09*	1,2 ± 0,09*	1,3 ± 0,07*

L'ensilage fabriqué à 4°C contient 84,6g pour 100g de protéines tandis que l'ensilage fabriqué à 25°C en contient significativement moins ( $p<0,05$ ) (Tableau 6). De plus, la quantité de glucides est significativement plus faible ( $p<0,05$ ) pour l'ensilage fabriqué à la température de 25°C (1,86g pour 100g) que pour celui fabriqué à 4°C (2,63g pour 100g). Concernant la quantité de lipides contenus dans les ensilages, celui fabriqué à 25°C contient une quantité de lipides significativement ( $p<0,05$ ) plus importante (13,32g pour 100g) que celui fabriqué à 4°C (8,5g pour 100g). De plus, la digestibilité des ensilages est significativement ( $p<0,05$ ) plus élevée lorsque la température est plus élevée. Ainsi, elle est de 89,53% pour le lysat fabriqué à 4°C et de 95,59% pour le second.

Tableau 6: Composition des ensilages après lyophilisation. \*: Différences significatives ( $p<0,05$ ).

	Ensilage fabriqué à 4°C:	Ensilage fabriqué à 25°C:
pH:	5,29 ± 0,05	5,94 ± 0,05 *
Protéines TCA solubles (mg/ml):	399,5 ± 16	404 ± 13
Protéines totales (g/ 100 g de poids sec):	84,61 ± 3	63,90 ± 2 *
HMW glucides (g/ 100 g de poids sec):	1,45 ± 0,01	1,3 ± 0,02
LMW glucides (g/ 100 g de poids sec):	1,19 ± 0,005	0,56 ± 0,09 *
Glucides totaux (g/ 100 g de poids sec):	2,63 ± 0,016	1,86 ± 0,012 *
Lipides totaux (g/ 100 g de poids sec):	8,5 ± 0,4	13,32 ± 0,7 *
Peptides <6,5 kDa (%):	80,7 ± 0,4	89,3 ± 1 *
Digestibilité (%):	89,53 ± 2,15	95,59 ± 3,11 *
Composition en acides aminés (mg/g de poids sec):	240 ± 9	328,3 ± 14,3 *

La stabilité des ensilages dans le temps est bonne puisque seule une légère hydrolyse est observée (Tableau 7). De plus, les analyses microbiologiques effectuées 12 mois après la fabrication des ensilages montre l'absence de salmonelles et d'entérobactéries. Les analyses des dioxines, PCB et HAP, montrent des taux inférieurs aux normes en vigueur. Ainsi, les dioxines doivent être inférieures à 4pg/g de produit frais (\*70 pour matière sèche). Au niveau des HAP, seul le benzopyrène est pris en compte. Son taux doit être inférieur à 5µg/kg produit frais (\*70 pour matière sèche) et la somme des dioxines et PCB ne doit pas être au-delà de 8pg/g produit frais (\*70 pour matière sèche).

Tableau 7: Stabilité des ensilages depuis 0 à 12 mois après la production. \*: Différences significatives par rapport au jour 0 ( $p<0,05$ ).



Temps (mois):	Ensilage fabriqué à 4°C:				Ensilage fabriqué à 25°C:			
	0	2	8	12	0	2	8	12
Salmonelles:	–	–	–	Absence	–	–	–	Absence
Entéro-bacteries:	–	–	–	Absence	–	–	–	Absence
Dioxines (OMS-ToxiqueEquivalent) de matrice sèche	–	–	–	2,57 pg/g	–	–	–	2,27 pg/g
PCB (OMS-ToxiqueEquivalent) de matrice sèche	–	–	–	2,56 pg/g	–	–	–	2,32 pg/g
HAP (OMS-ToxiqueEquivalent) de matrice sèche	–	–	–	1,88 µg/kg	–	–	–	2,62 µg/kg
Dioxine + PCB (OMS-ToxiqueEquivalent) de matrice sèche	–	–	–	5,13 pg/g	–	–	–	4,59 pg/g
Benzo-pyrène (OMS-ToxiqueEquivalent) de matrice sèche	–	–	–	0,09 µg/kg	–	–	–	0,15 µg/kg
Peptides <6,5kDa (%):	80,7	84,8	85,6*	86,4*	89,3	91,4	90,91	91,5
pH:	5,29 ± 0,05	5,18 ± 0,2	5,14 ± 0,1	5,12 ± 0,2	5,94 ± 0,05	5,61 ± 0,1	5,56 ± 0,06	5,5 ± 0,1*
Protéines TCA solubles (mg/ ml):	399,5 ± 16	374 ± 18	383 ± 11	374 ± 8,7	404 ± 13	379 ± 9	367 ± 14*	367 ± 12*

Le Tableau 8 représente la composition en acides gras des viscères issus de la transformation et des deux ensilages. Les acides gras présents en plus grande quantité sont le C16:0, le C18:1 et le C22:6n-3 pour les viscères transformés. Par contre, en ce qui concerne les ensilages, les acides les plus présents sont le C16:0, le C20:5n-3 et le C22:6n-3. On observe une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la quantité des acides gras C16:0, C20:5n-3 et C22:6n-3 après ensilage. D'autres acides gras sont présents en quantité significativement ( $p < 0,05$ ) plus faible dans les ensilages tels que : C16:1 et C18:1. La quantité d'acides gras saturés et omega 6 ne varie pas significativement entre les trois lots. Néanmoins, il y a une diminution significative ( $p < 0,05$ ) des acides gras mono-insaturés ainsi qu'une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) des acides gras poly-insaturés et oméga 3.

Tableau 8: Composition en acides gras des viscères issus de la transformation et des ensilages (%).

Acides gras	Viscères de transformation	LBBMA4	LBBMA25
C4:0	0,1	0,1	0,3
C6:0	0,1	0,1	0,1
C8:0	0,1	0,1	0,1
C10:0	0,1	0,1	0,1
C10:1	0,1	0,1	0,1
C12:0	0,1	0,1	0,1
isoC14:0	0,1	0,1	0,1
C14:0	3,5	3,4	3,3
C14:1	0,2	0,2	0,2
isoC15:0	0,2	0,2	0,2
anteisoC15:0	0,1	0,1	0,1
C15:0	0,4	0,6	0,7
isoC16:0	0,2	0,2	0,2
C16:0	15,33	20,9	20,1
C16:1	10	4,3	4
isoC17:0	0,65	0,3	0,2
anteisoC17:0	0,26	0,2	0,3
C17:0	0,7	1	1
C17:1	0,7	0,2	0,2
C18:0	9,4	10,4	9,8
C18:1	14,2	7,7	5,9
C18:2n-6	0,6	0,3	0,2
C18:3n-6	0,1	0,1	0,2
C18:3n-3	0,3	0,2	0,1
C18:4n-3	0,4	0,5	0,4
C20:0	0,1	0,2	0,3
C20:1	3,3	3	3,3
C20:2n-6	0,4	0,3	0,3
C20:3n-3	0,1	0,1	0,1
C20:3n-6	0,1	0,1	0,1
C20:4n-6	4,83	4,7	4,7
C20:5n-3	10,9	14,3	15,6
C22:0	0,1	0,2	0,3
C22:1	0,9	0,5	0,6
C22:2	0,1	0,1	0,1
C22:4n-6	0,7	0,6	0,6
C22:5	3,4	1,1	1,1
C22:6n-3	18,2	21,1	22,4
C24:0	0,6	0,1	0,1
C24:1	0,3	0,7	0,9
Saturés	36,5	37,6	37,7
Mono- insaturés	20,2	16,6	15,1
Poly- insaturés	43,3	45,8	47,2
Total $\omega$ 3	29,9	36,1	38,5
Total $\omega$ 6	6,73	6,1	6

## **Discussion**

Dans les pays industrialisés et en voie de développement, il existe un intérêt croissant pour la fabrication d'ensilage. Outre le fait que les ensilages permettent d'utiliser les déchets issus de la pêche et de la transformation, cette technique est très compétitive comparée à d'autres techniques de lyse (Pour revue : Raa and Gildberg, 1982). Le taux d'autolyse est déterminé par l'activité des enzymes digestives présentes dans le tissu, les conditions physiologiques de l'animal lorsqu'il est pêché, le pH, la température et l'acide utilisé (Raa and Gildberg, 1982). Puisque les protéines sont les composantes majeures des viscères de seiche (Boucaud-Camou, 1972), ce sont principalement les protéases qui sont responsables de l'autolyse. Les enzymes digestives des poissons marins, des crustacés, et des mollusques diffèrent de leurs homologues de mammifères en ce qui concerne l'effet du pH et de la température sur leur activité. Généralement, leur activité protéolytique, à faible température, est plus élevée que pour les animaux terrestres (Kolodziejska and Sikorski, 1996). L'estomac des poissons, qui sécrète du HCl, contient de la pepsine, protéase aspartique, synthétisée par l'épithélium sous forme de pepsinogène. Cette enzyme est connue pour être fortement impliquée dans l'autolyse des viscères chez les poissons (Barrett, 1995). Beaucoup de poissons possèdent deux sortes de pepsine : la pepsine I et la pepsine II. Celles-ci digèrent l'hémoglobine à un taux maximale respectivement dans des zones de pH de 3 à 4 et 2 à 3. La pepsine de poisson et la cathepsine D ont des propriétés moléculaires très similaires. D'où l'hypothèse proposée selon laquelle la cathepsine D est l'enzyme ancestrale des aspartiques protéases présentes chez les vertébrés. En effet, la pepsine n'a jamais été détectée chez les invertébrés. Par contre la cathepsine D, aussi bien que les autres cathepsines, agit à la fois en tant qu'enzyme digestive et lysosomale chez beaucoup de ces animaux. Les propriétés moléculaires de la cathepsine D d'invertébrés correspondent à celles des poissons et des mammifères (Gildberg, 1988). Chez la seiche, les protéases acides correspondent principalement aux cathepsines qui ont un pH optimal compris entre 2 et 6, lorsqu'elles sont dosées avec l'hémoglobine en tant que substrat (Le Bihan, 2003). De plus, le taux d'autolyse augmente avec la température pour être optimal à 50°C. Cependant, la stabilité de ces enzymes est maximale pour une température comprise entre 2 et 35°C (Le Bihan, 2003).

La qualité nutritionnelle des ensilages dépend du degré d'hydrolyse ainsi que de la matière première utilisée. Haaland et Njaa (1989) ont montré que la température de lyse influence à la fois le degré d'hydrolyse obtenu après stockage et le degré d'hydrolyse des groupements amides. De plus, la fraction insoluble, qui est toujours présente dans un autolysat, est plus faible lorsque

l'autolysat est stocké à une température élevée (Haaland and Njaa, 1989). La liquéfaction des ensilages est favorisée par un pH acide et une température ambiante (Raa and Gildberg, 1976).

C'est pour ces raisons, que nous avons choisi de fabriquer des ensilages à deux températures différentes, 4 et 25°C, en présence d'un acide organique, l'acide propionique. Le choix de cet acide s'est fait pour sa capacité à limiter le développement bactérien à un pH élevé (pH inférieur à 6) permettant l'action d'un maximum d'enzymes ; ainsi que pour l'absence de nécessité de neutraliser cet acide contrairement à un acide inorganique (Pour revue : Tatterson and Windsor, 1974).

Après 50 jours d'ensilage, les produits obtenus sont lyophilisés pour obtenir 2,86kg de chaque autolysat correspondant à un rendement de 14,3%. C'est un excellent rendement puisque le matériel biologique frais contient environ 70% d'eau. En terme d'ensilage humide le rendement serait donc de 47,67%.

Au-delà de 10 jours d'autolyse pour l'ensilage fabriqué 25°C et de 20 jours pour celui fabriqué à 4°C, le pH est supérieur au pH observé en début d'incubation. Les deux ensilages ont un pH inférieur à 6 pendant toute la durée de la production et du stockage. Ceci est particulièrement important puisque l'acide propionique possède la capacité à limiter le développement des micro-organismes dans des conditions de pH inférieur à pH 6 (Gildberg and Almas, 1986). Pendant la fabrication des ensilages, le pH augmente régulièrement jusqu'au 40<sup>ème</sup> jours d'incubation. Cependant, à 25°C, le pH augmente significativement plus que celui de l'ensilage fabriqué à 4°C, reflétant des différences d'autolyse en fonction de la température d'incubation. Pendant le stockage des ensilages, le pH évolue peu entre 0 et 12 mois. Donc, les ensilages fabriqués au sein de notre laboratoire ont une bonne stabilité sous forme lyophilisée.

Les protéines TCA solubles augmentent après 10 jours d'incubation, pour l'ensilage fabriqué à 25°C, et à 20 jours, pour le second ensilage, en comparaison avec le début de l'incubation. Cependant, au-delà de 30 jours, la quantité de protéines TCA solubles devient stable et il n'y a plus de différence entre les deux ensilages. Les protéines TCA solubles reflètent le degré d'hydrolyse des liaisons peptidiques et la répartition en poids moléculaire des protéines et peptides (Haaland and Njaa, 1989). Comme observé dans cette expérience, Haaland et Njaa (1989), ont noté une stabilisation de la quantité de protéines TCA solubles de 1 à 3 mois de stockage à 4°C. Peu de différences apparaissent pendant le stockage des ensilages après lyophilisation, ce qui reflète une faible autolyse et une bonne stabilisation des produits.

En dépit du fait que la majeure partie de la fraction protéique est composée par des peptides (de poids moléculaire inférieur à 6,5 kDa) et des acides aminés libres, il reste tout de

même des protéines dans les ensilages, et ce quel que soit le temps de stockage après la fabrication. Ce phénomène a déjà été observé par Raa et Gildberg (1976). En effet, dans un ensilage il reste toujours des résidus insolubles. Jusqu'à présent, aucune explication n'a été avancée pour déterminer pourquoi une certaine proportion de tissu reste résistante à la digestion enzymatique. En pratique, il est important de diminuer la quantité de ces résidus. Trois pics sont observables sur le profil de poids moléculaires de l'ensilage fabriqué à 25°C alors que seulement deux pics sont identifiables pour l'ensilage fabriqué à 4°C. Il y a significativement plus de peptides et d'acides aminés libres dans l'ensilage fabriqué à 25°C (89,3%) que dans celui fabriqué à 4°C (80,7%). L'utilisation d'acide propionique permet d'obtenir un lysat de meilleure qualité que ce qui peut être obtenu par autolyse. Ainsi, Le Bihan *et al.* (2006) ont étudié l'évolution post-mortem des viscères de seiches à deux températures différentes (4 et 25°C) et ont démontré que seul 60 à 75% de la fraction protéique a un poids moléculaire inférieur à 6,5kDa après 50 jours d'autolyse. Ces auteurs observent après 4 mois d'autolyse que seul 70 à 84% de la fraction protéique a un poids moléculaire inférieur à 6,5kDa. Donc, l'utilisation d'acide pour accélérer et amplifier l'autolyse est nécessaire.

Pendant la production des ensilages, l'activité spécifique de l'amylase est très affectée. En effet, après 10 jours d'ensilage, l'activité spécifique de l'amylase est inférieure à celle observée au début de l'ensilage. En ce qui concerne l'ensilage fabriqué à 4°C l'activité reste stable jusqu'à la fin de l'ensilage, tandis qu'elle diminue continuellement jusqu'à disparaître pour le second ensilage. Les viscères de seiches contiennent une faible concentration en glucides (Boucaud-Camou, 1972). Par conséquent, la diminution de l'activité spécifique de l'amylase affecte peu la lyse des tissus. De plus, de la même façon que dans le cas de nombreux carnivores, la seiche possède une faible activité amylosique (Hidalgo *et al.*, 1999).

L'activité protéolytique totale acide ou alcaline est très faiblement modifiée par l'ensilage. En effet, quelle que soit la température de production des lysats, les activités protéolytiques totales restent élevées. De la même façon qu'observé dans cette expérimentation, Raa et Gildberg (1976) ont observé que l'activité des enzymes protéolytiques reste inchangée après 7 jours d'ensilage.

La température de fabrication de l'ensilage détermine sa composition. Ainsi, l'ensilage fabriqué à 4°C contient 84,6g pour 100g de protéines tandis que l'ensilage fabriqué à 25°C en contient moins. La quantité de glucides est plus faible pour l'ensilage fabriqué à la température de 25°C (1,86g pour 100g) que pour celui fabriqué à 4°C (2,63g pour 100g). Concernant la quantité de lipides contenus dans les ensilages, celui fabriqué à 25°C contient une quantité de lipides plus importante (13,31g pour 100g) que celui fabriqué à 4°C (8,5g pour 100g). De plus, la

digestibilité des ensilages est plus élevée lorsque la température est plus haute, puisqu'elle est de 89,53% pour le lysat fabriqué à 4°C et de 95,59% pour le second. La composition des ensilages fabriqués dans notre laboratoire est proche de celle d'ensilage de poissons (Goddard and Perret, 2005) et d'hydrolysats de poissons commercialisés (Bernet *et al.*, 2000) en terme de quantité de lipides, de contenu en acides aminés et peptides mais ils sont composés d'une plus grande quantité de protéines. Ces données sont encourageantes dans un but de commercialisation des ensilages de viscères de seiches.

La stabilité des ensilages dans le temps est bonne puisque seule une légère hydrolyse est observée. De plus, les analyses microbiologiques effectuées 12 mois après la fabrication des ensilages montre l'absence de salmonelles et d'entéro-bactéries. Donc, la préservation des lysats par l'acide et la lyophilisation permet de limiter durablement le développement de micro-organismes. Enfin, le dosage des toxiques montre que les ensilages sont largement en dessous des normes imposées en ce qui concerne les produits marins à destination alimentaire.

La technologie de fabrication des ensilages est particulièrement simple et l'équipement nécessaire est réduit. L'équipement de base consiste en un mixeur, un mélangeur pour l'ajout d'acide et d'éthoxyquine, un bac résistant à l'acide, un évaporateur et un conteneur de stockage du produit fini. L'acide propionique est relativement plus coûteux qu'un acide inorganique, qui pourrait être utilisé, mais il a été retenu pour ce travail en raison de sa capacité à préserver l'ensilage du développement bactérien à un pH relativement élevé (pH 6), nécessaire aux enzymes d'invertébrés. De plus, les produits obtenus ne nécessitent pas d'être neutralisés avant d'être utilisés pour nourrir des animaux, contrairement à des ensilages utilisant des acides inorganiques. Dans cette expérimentation, l'acide propionique à hauteur de 1,5 % permet d'obtenir un produit stable dans le temps (plus d'un an) et économique.

Les acides gras présents en plus grande quantité sont le C16:0, le C18:1 et le C22:6n-3 pour les viscères transformés. Par contre, en ce qui concerne les ensilages, les acides gras les plus présents sont le C16:0, le C20:5n-3 et le C22:6n-3. On observe une augmentation de la quantité des acides gras C16:0, C20:5n-3 et C22:6n-3 après ensilage. D'autres acides gras sont présents en quantité plus faible dans les ensilages tels que : C16:1 et C18:1. La quantité d'acides gras saturés et omega 6 ne varie pas entre les trois lots. Néanmoins, il y a une diminution des acides gras mono-insaturés ainsi qu'une augmentation des acides gras poly-insaturés et en particulier les oméga 3. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils démontrent la présence d'enzymes fabriquant des acides gras poly-insaturés. En dépit de changement dans la composition en acides gras au cours de l'ensilage, le pourcentage en acides gras poly-insaturés reste particulièrement élevé. Ces résultats sont en accord avec d'autres auteurs qui ont observé la

présence d'acides gras poly-insaturés en grande quantité dans le muscle de la coquille Saint Jacques (Jeong *et al.*, 1999). De plus, l'ensilage n'altère pas le contenu en acide gras typiquement marin (C20:5n-3 et C22:6n-3) des huiles contenues dans les viscères de seiche. Le contenu en acides gras poly-insaturés oméga 3 est environ 5 fois plus important que celui en oméga 6. Cela augmente la qualité des huiles puisque ce ratio en acides gras, oméga 3 et 6, va contribuer au bon fonctionnement du système cardiovasculaire (Pirini *et al.*, 2000; Garcia-Arias *et al.*, 2003).

La Figure 29 synthétise les résultats obtenus au cours de la fabrication des ensilages de viscères de seiches.

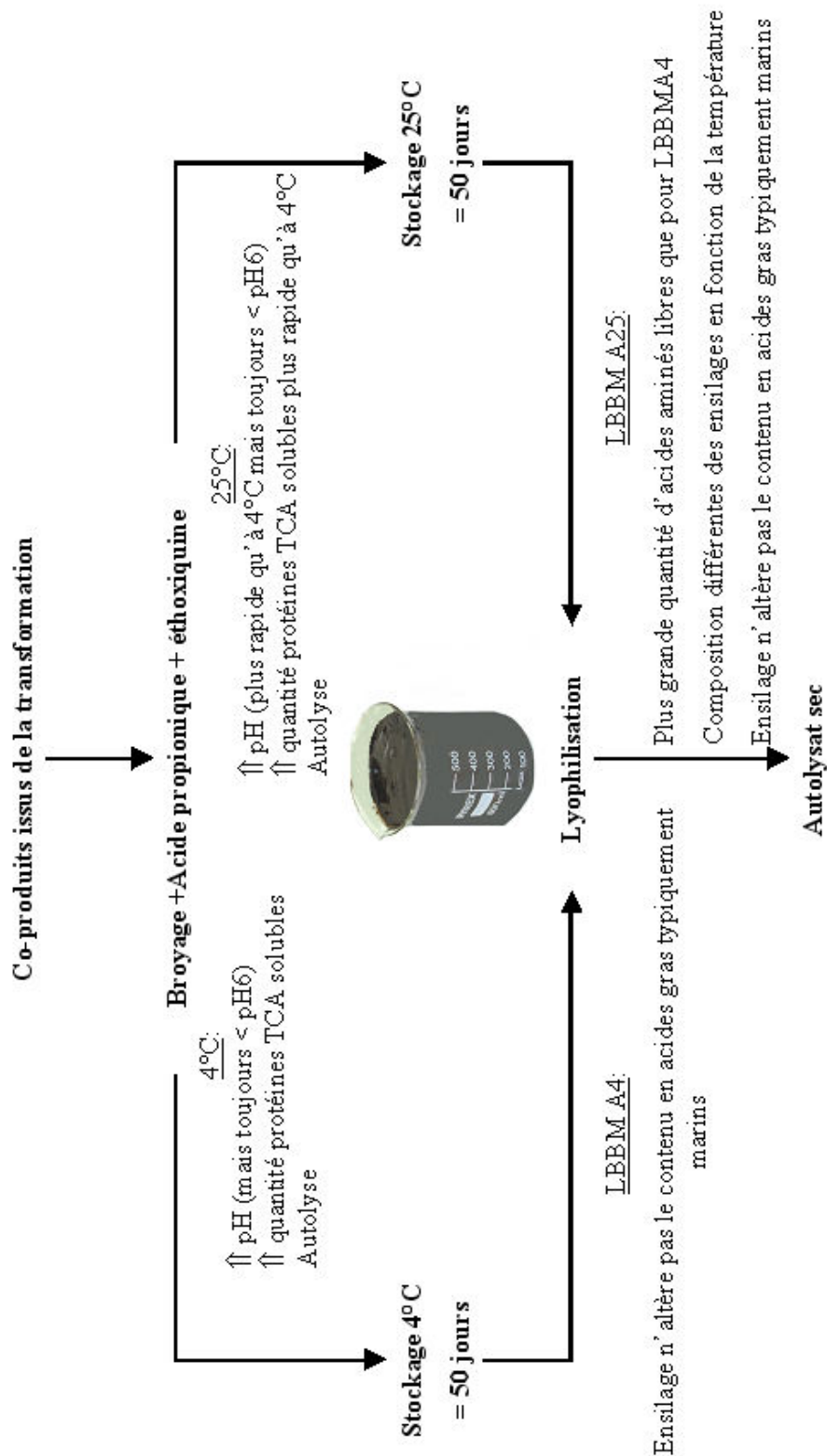


Figure 29: Schéma explicatif des résultats obtenus concernant la fabrication des ensilages de viscères de seiches.



## **IV Conclusion**

Ces études ont montré qu'au cours des étapes de stockage et de transformation des seiches, différents phénomènes ont lieu. D'abord, une destruction rapide (quelques heures après la mort de l'animal) des organites cellulaires (lysosomes et zymogènes) conduisant à la libération d'enzymes intra et extracellulaires dans le milieu. Ensuite, la congélation des seiches à -20°C entraîne des changements majeurs. Effectivement, la congélation des seiches provoque une forte diminution de la quantité de protéines, lipides et glucides dans les viscères. Cependant, la proportion relative entre les protéines, lipides et glucides reste la même. Enfin, le stockage à -20°C entraîne une autolyse lente des viscères.

Ainsi, les co-produits obtenus après transformation possèdent une bonne qualité biochimique, un contenu enzymatique satisfaisant puisque seule l'activité spécifique de l'amylase diminue de manière significative et un très bon profil en acide gras est obtenu puisque le pourcentage en acide gras poly-insaturé est maintenu (43,3% des acides gras). L'ensemble de cette étude montre que, malgré l'existence de nombreuses étapes de transformation (congélation, décongélation, éviscération, stockage des co-produits), la qualité enzymatique et biochimique des co-produits issus de la transformation de la seiche reste bonne. Donc, les co-produits issus de la transformation conservent de bonnes propriétés en tant que matière première pour produire des ensilages.

L'analyse de l'évolution post-mortem des viscères de seiche a apporté de précieuses informations. Ainsi, la capacité enzymatique des viscères est un paramètre essentiel pour la compréhension de la dégradation des protéines, glucides et lipides ainsi que pour la production d'ensilage de viscère de seiche. Cette étude a permis de mettre en évidence deux phénomènes différents au cours de l'évolution post-mortem des viscères de seiche. D'abord, des mécanismes rapides qui se déroulent quelques heures après la mort de l'animal. Ces mécanismes sont irréversibles et incontrôlables. Ensuite, des phénomènes lents qui adviennent plusieurs jours après la mort de l'animal. Ces derniers peuvent être contrôlés par la maîtrise de la température et du pH. De plus, cette étude a permis de constater que l'autolyse ne doit pas se faire au-delà de 50 jours puisque qu'ensuite il y a une dénaturation et une agrégation des protéines natives. De l'acide devra être ajouté au co-produit de manière à obtenir le pH optimum aux activités enzymatiques, mais aussi afin de limiter le développement bactérien.

La technologie nécessaire à la fabrication des ensilages est particulièrement simple et l'équipement nécessaire est réduit. De plus, dans ces travaux, l'acide propionique à hauteur de 1,5% permet d'obtenir un produit stable dans le temps (plus d'un an) et économique. La température de fabrication de l'ensilage détermine sa composition.

La stabilité des ensilages dans le temps est bonne puisque seule une légère hydrolyse est observée. De plus, les analyses microbiologiques effectuées 12 mois après la fabrication des ensilages montre l'absence de salmonelles et d'entéro-bactéries. Donc, la préservation des lysats par l'acide et la lyophilisation permet de limiter durablement le développement de micro-organismes. Enfin, le dosage des toxiques montre que les ensilages sont largement en dessous des normes imposées en ce qui concerne les produits marins destinés à l'alimentation.

L'ensemble de ces données montrent que les ensilages fabriqués au sein du LBBM UMR 100 PE2M peuvent trouver diverses applications de part leur qualité biochimique.

# Chapitre 2 :

## Valorisation des ensilages en tant que milieu de culture pour micro-organismes : tests *in vitro*.

LE BIHAN E., CORROLER, D., BARILLIER, D., KOUETA N., (en préparation). Used of silage as cell culture medium for bacteria. *Current Microbiology*.

Ce chapitre a fait l'objet d'une collaboration avec David CORROLER et Daniel BARILLIER de l'Equipe de Recherche en Physico-Chimie et Biotechnologies, IUT Génie Chimique – Génie des procédés de l'université de Caen.

## Plan du chapitre 2:

### I INTRODUCTION

- A. Les micro-organismes
- B. La culture des micro-organismes
- C. Choix et présentation des micro-organismes
  - 1. *Pseudomonas aeruginosa*
  - 2. *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*
  - 3. *Escherichia coli*
  - 4. *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*:
  - 5. *Lactococcus lactis subsp lactis*
  - 6. *Bacillus subtilis subsp subtilis*
  - 7. *Saccharomyces cerevisiae*

### II MATERIEL ET METHODES

- A. Micro-organismes
- B. Milieu de culture
- C. Condition de culture
  - 1. Tests préliminaires
  - 2. Cinétique de croissance
- D. Analyses statistiques

### III RESULTATS

- A. Etudes préliminaires
- B. Comparaison de la cinétique de croissance des différentes bactéries
  - 1. Peptone LBBMA25
  - 2. Peptone de caséine
  - 3. Peptone de soja
  - 4. Peptone de viande
- C. Cinétique de croissance des micro-organismes sur différents milieux de culture
  - 1. *Pseudomonas aeruginosa*
  - 2. *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*
  - 3. *Escherichia coli*
  - 4. *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*
  - 5. *Lactococcus lactis subsp lactis*
  - 6. *Bacillus subtilis subsp subtilis*
  - 7. *Saccharomyces cerevisiae*

### IV DISCUSSION

### V CONCLUSION

# I Introduction

## A. Les micro-organismes

Les micro-organismes sont les plus petites unités biologiques fonctionnelles. Leur taille est comprise entre 0,01 et 10  $\mu\text{m}$ . On utilise plusieurs mots pour parler des micro-organismes : microbe, animal pur, germe, ferment, protiste. Ce sont des organismes unicellulaires, pluricellulaires ou coloniaux à l'intérieur desquels n'a pas lieu de différenciation cellulaire. On observe toutefois des cas spéciaux comme chez les virus, les champignons et des algues. Cependant, de nombreuses bactéries ne peuvent se développer seules : elles forment donc des colonies (on parle alors de myxobactéries). Des signaux cellulaires puissants induisent un regroupement des bactéries en colonie. Chez les cyanobactéries, on observe des cellules spécialisées comme les hétérocystes. Les micro-organismes sont partout et très nombreux car très diversifiés sur un plan taxonomique (on parle de pléomorphisme). Ces organismes occupent tous les milieux en quantité importante. De plus, ils ont de grandes capacités métaboliques.

Les bactéries sont des procaryotes. Elles sont dépourvues de membrane nucléaire et de membrane entourant les organites (Figure 30). La plupart des bactéries peuvent être séparées en  $\text{Gram}^+$  et  $\text{Gram}^-$  sur la base de la structure de leur paroi cellulaire et de leur réponse à la coloration de Gram. Les processus biochimiques, se déroulant normalement dans les chloroplastes ou les mitochondries des eucaryotes, s'effectuent donc au niveau du cytoplasme chez les procaryotes. L'ADN bactérien est circulaire et situé dans une région de la cellule appelée nucléide.

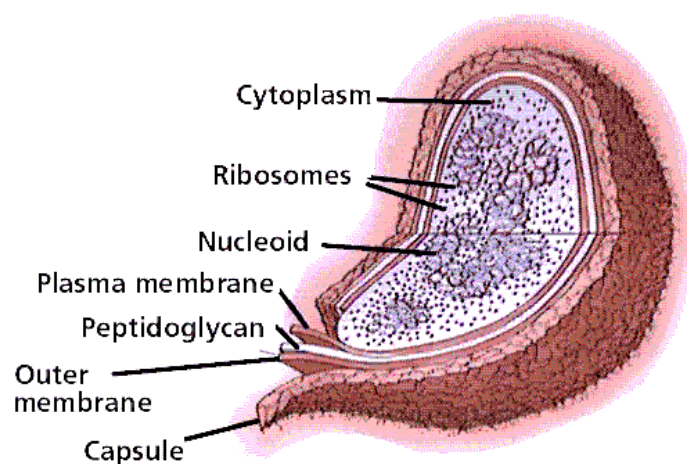


Figure 30: Structure typique d'une bactérie (Purves *et al.*, 2006).

Les cellules eucaryotes diffèrent principalement des procaryotes par la présence dans leur cytoplasme d'une variété d'organites et d'une enveloppe nucléaire délimitant le matériel génétique (Figure 31). Parmi les eucaryotes, on trouve les levures. Une levure est un champignon unicellulaire apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Les levures sont employées pour la fabrication du vin, de la bière, des spiritueux, des alcools industriels, du pain et d'antibiotiques. Ces microorganismes sont généralement de forme ovale, et se multiplient par bourgeonnement ou par fission (scissiparité). Elles sont souvent capables d'accomplir une sporulation soit dans un but de dormance en milieu défavorable, soit dans un but de dispersion.

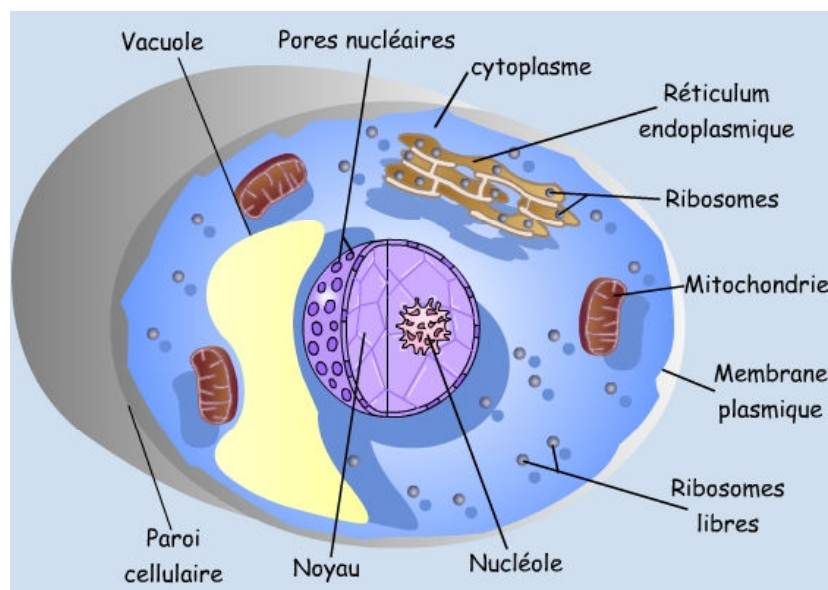


Figure 31: Schéma d'une levure (Guery and Mcirdi, 2006).

## **B. La culture des micro-organismes**

Les micro-organismes ont besoin d'environ 10 éléments en grande quantité. Ces éléments sont utilisés pour synthétiser des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. Plusieurs autres éléments sont nécessaires en très faible quantité, ils font partie des enzymes et des co-facteurs. Tous les micro-organismes peuvent être classés en quelques catégories nutritionnelles selon leurs besoins en carbone, en énergie, en hydrogène et en électrons. Les molécules nutritives ne peuvent généralement pas traverser la membrane plasmique par diffusion passive et doivent être transportées par un mécanisme impliquant des protéines membranaires de transport. Les eucaryotes utilisent aussi l'endocytose pour absorber les éléments nutritifs (Prescott *et al.*, 1996).

La microbiologie dépend en grande partie de la croissance et du maintien des micro-organismes en laboratoire. Ceci n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont

disponibles. Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisée pour faire croître, transporter ou conserver des micro-organismes. Un bon milieu doit contenir tous les nutriments dont le micro-organisme a besoin pour se développer. Les milieux complexes contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée. Ils sont très utiles et correspondent aux peptones, extrait de viande, de levures (Prescott *et al.*, 1996)...

Le milieu de culture constitue le principal coût de production en ce qui concerne les industries de production microbienne en masse (Coello *et al.*, 2000; Dufossé *et al.*, 2001). L'expansion des biotechnologies a entraîné une augmentation de la demande en milieux de croissance de micro-organismes de haute qualité et de faible coût (Coello *et al.*, 2000). De nombreux micro-organismes requièrent des sources d'azote organique. Ces dernières sont classiquement incorporées dans les milieux de culture commerciaux sous forme d'hydrolysats protéiques ou de peptones, avec divers degrés d'hydrolyse (Vasquez *et al.*, 2004). La source azotée est généralement le composant le plus coûteux des milieux bactériens.

Les déchets issus de l'industrie alimentaire représentent une source de contamination environnementale importante. Des recherches ont donc été faites afin de développer des méthodes de transformation de ces déchets en produits utilisables (Tatterson, 1982; Gildberg and Almas, 1986; Kristinsson and Rasco, 2000; Ravallec-Plé *et al.*, 2001; Martone *et al.*, 2005). Puisque ces co-produits incluent des têtes, des viscères, de la peau, du muscle, ils représentent une importante source de protéines (Martone *et al.*, 2005). Une alternative intéressante correspond à la lyse de ces co-produits pour obtenir des lysats, contenant des protéines et peptides possédant des propriétés fonctionnelles. Ainsi, les extraits de poissons se sont révélés être d'excellentes sources de nutriments pour la croissance microbienne. En particulier, les extraits de poissons digérés enzymatiquement et les autolysats de viscères de poissons qui ont été rapportés comme pouvant être un substrat de croissance microbien (Coello *et al.*, 2000). Les lysats peuvent être utilisés en tant que milieu de culture pour micro-organismes. Ainsi, les petits peptides et les acides aminés sont souvent nécessaires au substrat azoté pour la culture de micro-organismes (De La Broise *et al.*, 1998). Des études antérieures ont montré que des lysats de poissons peuvent constituer de très bonnes bases de milieu de culture pour micro-organismes. Effectivement, Clausen *et al.* (1985), ont montré que *Proteus sp.* a une croissance plus rapide et un meilleur rendement de masse cellulaire sur un milieu composé d'ensilage de viscères de poissons que sur un milieu standard à base de tryptone. De la même façon, d'autres auteurs ont démontré que l'utilisation de peptones marines permet dans la majeure partie des cas, d'obtenir de bons résultats de croissance pour *Roseobacter sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *vibrio sp.*

(Vasquez *et al.*, 2004), *Lactococcus casei*, *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus niger* (Dufossé *et al.*, 2001) en comparaison avec un milieu commercial classique.

### **C.Choix et présentation des micro-organismes**

Dans ce chapitre, les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ainsi que 3 peptones commerciales (caséine, soja et viande) sont utilisés et comparés en tant que milieu de culture de divers micro-organismes. Différents types de micro-organismes ont été étudiés : des bactéries et une levure.

Les micro-organismes choisis dans cette étude sont hétérotrophes (source de carbone : molécules organiques préformées, réduites provenant d'autres organismes) et chimiotrophes (source d'énergie : oxydation de composés organiques et inorganiques). Ces micro-organismes sont dépourvus d'une ou plusieurs enzymes essentielles et par conséquent ne peuvent fabriquer tous les constituants indispensables, ils doivent les obtenir de leur environnement.

#### **1. *Pseudomonas aeruginosa***

Bactéries de la famille des *pseudomonadaceae* sont des bactéries ubiquistes, vivant à l'état libre et opportunistes (normalement présentes chez un individu et qui deviennent pathogènes lors d'un affaiblissement des défenses de l'organisme). Le genre *Pseudomonas* de la famille des *pseudomonaceae* comprend une soixantaine d'espèces pouvant répondre à la définition suivante : bacilles à Gram<sup>-</sup>, aérobies stricts, capables de se multiplier sur milieux usuels, mobiles par ciliature polaire, possédant une oxydase, incapables de fermenter le glucose et pouvant produire des pigments. *Pseudomonas aeruginosa* est le plus commun du groupe *Pseudomonas*. Il s'agit d'un petit bacille, qu'on retrouve partout dans la nature : l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme. *Pseudomonas aeruginosa* produit un pigment (colorant) bleu gris : la pyocyanine, d'où il tire son nom de bacille pyocyanique, nom usuel de la bactérie en France. Bacille Gram<sup>-</sup>, très mobile grâce à des flagelles polaires (déplacement en ligne droite), aérobic strict, au métabolisme respiratoire, ne fermentant pas le glucose et producteur de pigments hydrosolubles (pigments fluorescents et pigments phénaziniques non fluorescents).

#### **2. *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae***

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram<sup>-</sup> (de 0,3 à 1,0µm de diamètre sur 0,6 à 6,0µm de longueur) se présentant de manière isolée, groupée par deux ou en courtes chaînes. Ce genre présente les caractères généraux de la famille des *enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz.



### 3. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille pathogène Gram<sup>-</sup> de la famille des *enterobacteriaceae*. Les *enterobacteriae* sont des bacilles à Gram<sup>-</sup>, aéro-anaérobies, mobiles ou immobiles, facilement cultivables, fermentant le glucose, réduisant les nitrates en nitrites et dépourvus d'oxydase. *Escherichia coli* est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. *Escherichia coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. *Escherichia coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour. En effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude aisé. La profusion de publications scientifiques qui la mentionnent en témoigne, et elle joue le rôle de « cheval de labour » dans tous les laboratoires de biologie moléculaire. *Escherichia coli* est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce, mais il existe plus de 1 000 types antigéniques, assez court (2 à 3µm x 0,7µm) et pouvant être isolé, groupé par 2 ou plus rarement en amas. *Escherichia coli* peut apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuse dans les vieilles cultures.

### 4. *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*

Actuellement, le genre *Proteus* rassemble cinq espèces : *Proteus hauseri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus penneri* et *Proteus vulgaris* ainsi que trois génomes non encore baptisés. Le genre *Proteus* est classiquement placé dans la famille des *enterobacteriaceae*. Les *Proteus sp.* sont des bacilles à Gram<sup>-</sup>, très généralement mobiles, mesurant de 0,4 à 0,8µm de diamètre. Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits. À l'exception de *Proteus myxofaciens* et de *Proteus hauseri*, les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans la nature. Elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de l'intestin de nombreuses espèces animales (souris, rats, chiens, chats, bovins, porcins, oiseaux, reptiles...). Dans le milieu extérieur, ces bactéries jouent un rôle important dans la dégradation des matières organiques d'origine animale. Les autres espèces du genre peuvent se comporter comme des pathogènes opportunistes notamment chez les individus hospitalisés, immunodéprimés, cathétérisés ou présentant des anomalies des voies urinaires. *Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques, suivie de *Proteus vulgaris* et de *Proteus penneri*.

### 5. *Lactococcus lactis subsp lactis*

*Lactococcus lactis subsp lactis* est un microorganisme d'intérêt industriel important, notamment dans l'industrie laitière. De plus, *Lactococcus lactis*, bactérie modèle, est un micro-

organisme GRAS (Generally Regarded As Safe). *Lactococcus lactis* est une bactérie lactique c'est à dire capable de provoquer la fermentation des sucres en acide lactique. Sa parfaite innocuité et le développement des connaissances sur ses capacités de production et de sécrétion de protéines hétérologues en font un bon candidat pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique. Elles sont ingérées vivantes en grandes quantités et peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, homme ou animal, où elles sont susceptibles d'exercer diverses activités bénéfiques.

#### **6. *Bacillus subtilis subsp subtilis***

Le genre *Bacillus*, de la famille des *bacillaceae* apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi...). Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes (ou pratiquement rectilignes), à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable, sporulées. A Gram<sup>+</sup> ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures), ils sont généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (pourtour de la bactérie), parfois capsulées, aérobies ou aéro-anaérobies. La culture de ces germes peut s'avérer difficile car certaines espèces exigent de nombreux facteurs de croissance. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable et les phénomènes de dissociation sont fréquents. Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore et du sporange. *Bacillus subtilis* appartient au groupe I, qui est constitué des bacilles à Gram<sup>+</sup>, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. *Bacillus subtilis* produit des colonies de formes irrégulières (contours ondulés ou pouvant présenter des filaments), de consistance crémeuse et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies prennent un aspect sec, rugueux et elles s'incrudent dans la gélose.

#### **7. *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* est une levure utilisée depuis l'aube de l'humanité dans l'élaboration du pain, du vin et de la bière de fermentation haute. Ainsi, dans ces domaines, elle est appelée «levure de boulanger» ou «levure de bière». Enfin, due à son mode de reproduction, elle est également nommée «levure à bourgeon» ou «levure bourgeonnante». *Saccharomyces cerevisiae* peut produire l'énergie nécessaire à sa survie et à sa reproduction de deux manières différentes, en fonction du milieu ambiant. Ces deux modes de production d'énergie sont : la respiration avec transformation de l'oxygène en gaz carbonique ou la fermentation alcoolique du glucose. Le premier est utilisé en cuisine, tandis que le second est privilégié pour la production de la bière.

Pour évaluer la possibilité d'utiliser les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 en tant que substrat pour la culture de micro-organismes, l'étude des cinétiques de croissance chez plusieurs bactéries et une levure, a été effectuée sur des milieux à base d'ensilages et de peptones commerciales de diverses origines.

## II Matériel et méthodes

### A. Micro-organismes

Pour cette expérimentation *in vitro*, où sont testés les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 sur la croissance de divers micro-organismes, ont été choisis : 7 bactéries, dont 5 bactéries Gram<sup>-</sup> et 2 bactéries Gram<sup>+</sup>, ainsi qu'une levure. L'ensemble des caractéristiques de ces micro-organismes est présenté succinctement dans le Tableau 9.

Tableau 9: Caractéristiques des différents micro-organismes choisis.

Micro-organisme	Origine	Micro-organismes	Caractéristiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP A22	Bactérie Gram <sup>-</sup>	Procaryote
<i>K pneumoniae subsp pneumoniae</i>	CIP 52145	Bactérie Gram <sup>-</sup>	Procaryote
<i>Escherichia coli</i>	CIP 548	Bactérie Gram <sup>-</sup>	Procaryote
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP A235	Bactérie Gram <sup>-</sup>	Procaryote
<i>Proteus vulgaris</i>	CIP A232	Bactérie Gram <sup>-</sup>	Procaryote
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	A4502	Bactérie Gram <sup>+</sup>	Procaryote
<i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i>	CIP 5265 T	Bactérie Gram <sup>+</sup>	Procaryote
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UMIP 143283	Levure	Eucaryote

## **B. Milieux de culture**

Cinq différentes peptones sont testées en tant que milieu de culture pour micro-organismes : peptone de soja, peptone de viande, peptone de caséine, peptone LBBMA4 et peptone LBBMA25 (Tableau 10).

Tableau 10: Caractéristiques des peptones utilisées dans cette étude.

<b>Peptone</b>	<b>Origine</b>	<b>Caractéristiques</b>
<b>Soja</b>	AES Laboratoires	Peptone papaïnique de soja
<b>Viande</b>	AES Laboratoires	Peptone pancréatique de viande
<b>Caséine</b>	AES Laboratoires	Pastone, digestion pancréatique de caséine
<b>LBBMA4</b>	LBBM UMR Ifremer PE2M	Ensilage de co-produit de la seiche 4°C
<b>LBBMA25</b>	LBBM UMR Ifremer PE2M	Ensilage de co-produit de la seiche 25°C

## **C. Conditions de culture**

### **1. Tests préliminaires**

L'ensemble des micro-organismes est cultivé dans un milieu de culture solide (15g/L). Ce milieu contient des peptones à 3 ou 15g/L, où le pH est ajusté à 7,2 et autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Les bactéries sont incubées à 30°C et la levure à 20°C. L'incubation des micro-organismes est effectuée pendant 24 à 48 heures.

### **2. Cinétique de croissance**

L'ensemble des micro-organismes est cultivé dans un milieu de culture liquide, contenant des peptones à 3g/L, le pH est ajusté à 7,2 et préalablement autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Les bactéries sont incubées à 30°C et la levure à 20°C. La culture des micro-organismes est effectuée pendant 24 heures dans une table d'agitation à 150 rpm, dans des flacons de culture de 250ml contenant 50ml de milieu (Figure 32).



Figure 32: Table d'agitation permettant la culture des micro-organismes.

Les différentes cultures sont effectuées à partir d'une pré-culture de 16 heures. Au début de la cinétique de croissance, les différents milieux de culture sontensemencés à 2% avec la pré-culture. Des échantillons sont prélevés à différents temps d'incubation afin de mesurer la croissance des micro-organismes par mesure de la turbidité à 600nm (Clausen *et al.*, 1985). Ainsi, l'augmentation de la biomasse microbienne accompagnant la croissance d'une population de micro-organismes entraîne l'opacification du milieu de culture. Les techniques turbidimétriques permettent de suivre l'évolution de la biomasse microbienne par la mesure de la densité optique (DO). Cette variable, définie comme le logarithme du rapport entre l'intensité  $I_0$  du faisceau incident et l'intensité  $I$  du faisceau transmis, caractérise l'opacité d'un milieu (Figure 33).

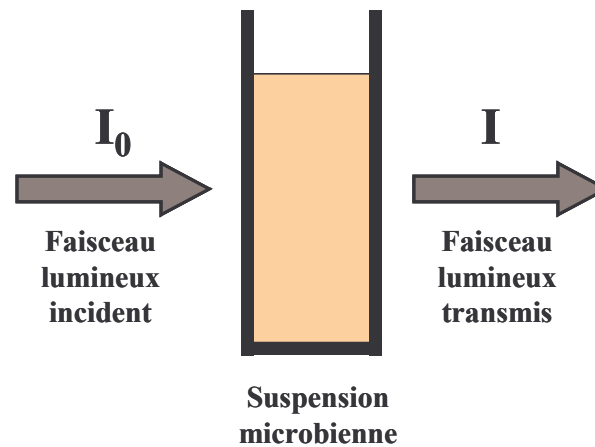


Figure 33: Technique turbidimétrique de la mesure de la biomasse (Delignette-Muller, 1995).

La Figure 34 résume la cinétique de croissance théorique simplifiée d'un micro-organisme. D'abord, il y a la phase de latence ou phase stationnaire, suivi d'une phase de croissance exponentielle, puis d'une phase stationnaire maximale. Les cinétiques de croissance d'une population microbienne sont souvent représentées en coordonnées semi-logarithmiques. La phase de croissance exponentielle apparaît alors linéaire, et la pente de cette droite correspond au taux de croissance (Delignette-Muller, 1995).

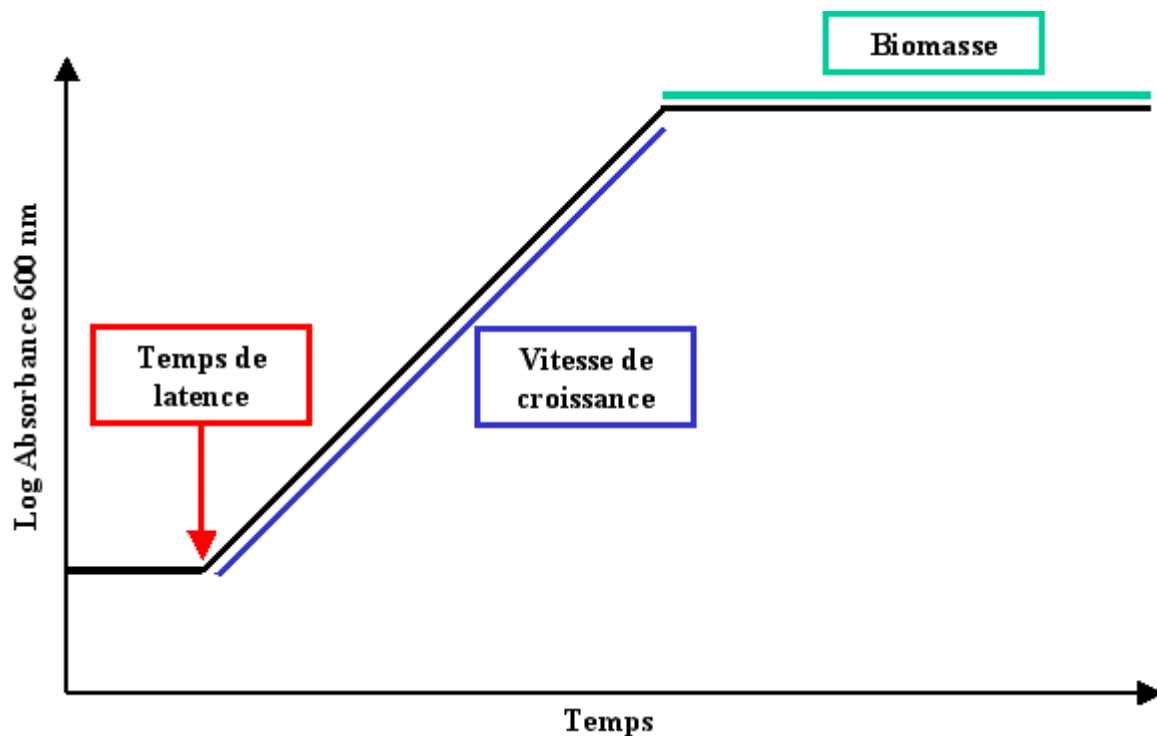


Figure 34: Schéma d'une cinétique théorique simplifiée de croissance d'un micro-organisme.

Chaque expérimentation est effectuée en triplicat et les résultats sont le résultat moyen des trois cultures issues de 3 pré-cultures différentes pour chaque micro-organisme.

#### **D. Analyses statistiques**

Les résultats sont donnés avec un écart-type ( $n= 3$  pour chaque point). Les données obtenues pour chaque point sont comparées à l'aide d'une ANOVA et complétées par un test de Tukey où les différences significatives ( $p<0,05$ ) sont observées (Staats *et al.*, 1999).

### **III Résultats**

#### **A. Etudes préliminaires**

L'impact de l'autoclavage sur la stabilité des ensilages est d'abord testé. Après un autoclavage de 15 minutes à 121°C, les peptones à base d'ensilage LBBMA25 (3 ou 15g/L) sont stables, les composés restent solubles. En revanche, l'ensilage LBBMA4 (3 ou 15g/L) résiste mal à l'autoclavage qui entraîne une insolubilisation de certains composés et une précipitation de ceux ci.

L'utilisation des ensilages, en milieu de culture solide, a permis d'apprécier la coloration de ces milieux de culture. L'ensilage LBBMA4, utilisé en tant que peptone, montre une forte coloration, quelle que soit la concentration testée. En ce qui concerne l'ensilage LBBMA25, sa coloration est plus faible que celle de l'ensilage LBBMA4 pour une même concentration.

L'ensemble des micro-organismes testés (Tableau 9) se sont développés sur le milieu solide LBBMA25.

#### **B. Comparaison de la cinétique de croissance des différentes bactéries**

##### **1. Peptone LBBMA25**

Sur un même milieu de culture la croissance des bactéries est très variable (Figure 35). Dans tous les cas, le temps de latence en très court sur le milieu de culture utilisant la peptone LBBMA25.

Les vitesses de croissance des bactéries sont très variables. Ainsi, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* ont une vitesse de croissance élevée, tandis que les autres bactéries ont une vitesse de croissance significativement plus faible ( $p < 0,05$ ).

En ce qui concerne la biomasse obtenue après 24 heures d'incubation, ce sont les bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui donnent les plus fortes biomasses ( $p < 0,05$ ). Puis, les bactéries *Bacillus subtilis*, *Proteus sp.* et *Pseudomonas aeruginosa* donnent une biomasse intermédiaire ( $p < 0,05$ ). Enfin, la plus faible biomasse est obtenue avec la bactérie *Lactococcus lactis* ( $p < 0,05$ ).

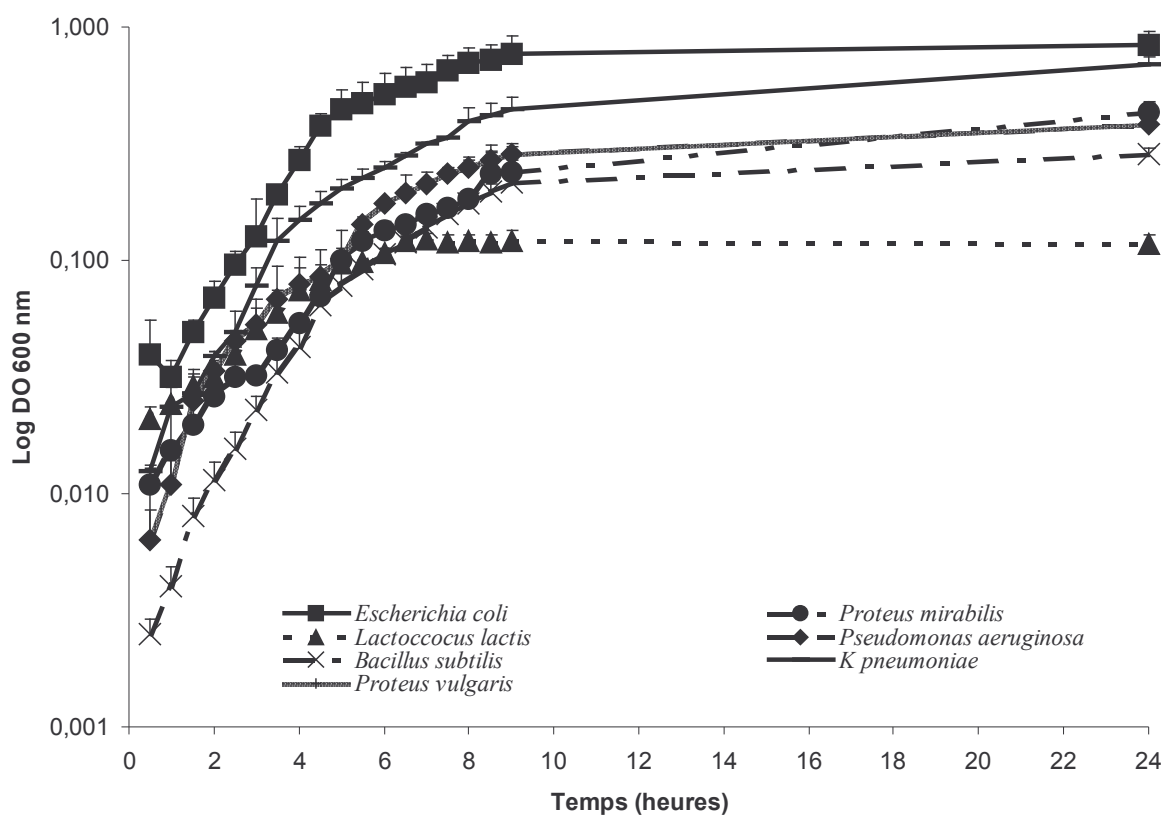


Figure 35: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de LBBMA25.

## 2. Peptone de caséine

Le temps de latence est très variable sur ce milieu de culture utilisant la peptone de caséine (Figure 36). Il est relativement court pour toutes les bactéries sauf en ce qui concerne *Bacillus subtilis* ( $p < 0,05$ ). De ce fait, le temps de latence est particulièrement long ( $p < 0,05$ ) en ce qui concerne la bactérie *Bacillus subtilis*.

Les vitesses de croissance des bactéries sont très variables. Ainsi, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* ont une vitesse de croissance élevée, tandis que les



autres bactéries ont une vitesse de croissance significativement plus faible ( $p < 0,05$ ), en particulier pour *Lactococcus lactis* qui a la plus faible vitesse de croissance ( $p < 0,05$ ).

La biomasse obtenue après 24 heures d'incubation, varie en fonction de la bactérie. Ce sont les bactéries *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* qui donnent la plus forte biomasse ( $p < 0,05$ ). Puis, la bactérie *Bacillus subtilis*, donne une biomasse intermédiaire ( $p < 0,05$ ). Enfin, la plus faible biomasse est obtenue avec la bactérie *Lactococcus lactis* ( $p < 0,05$ ).

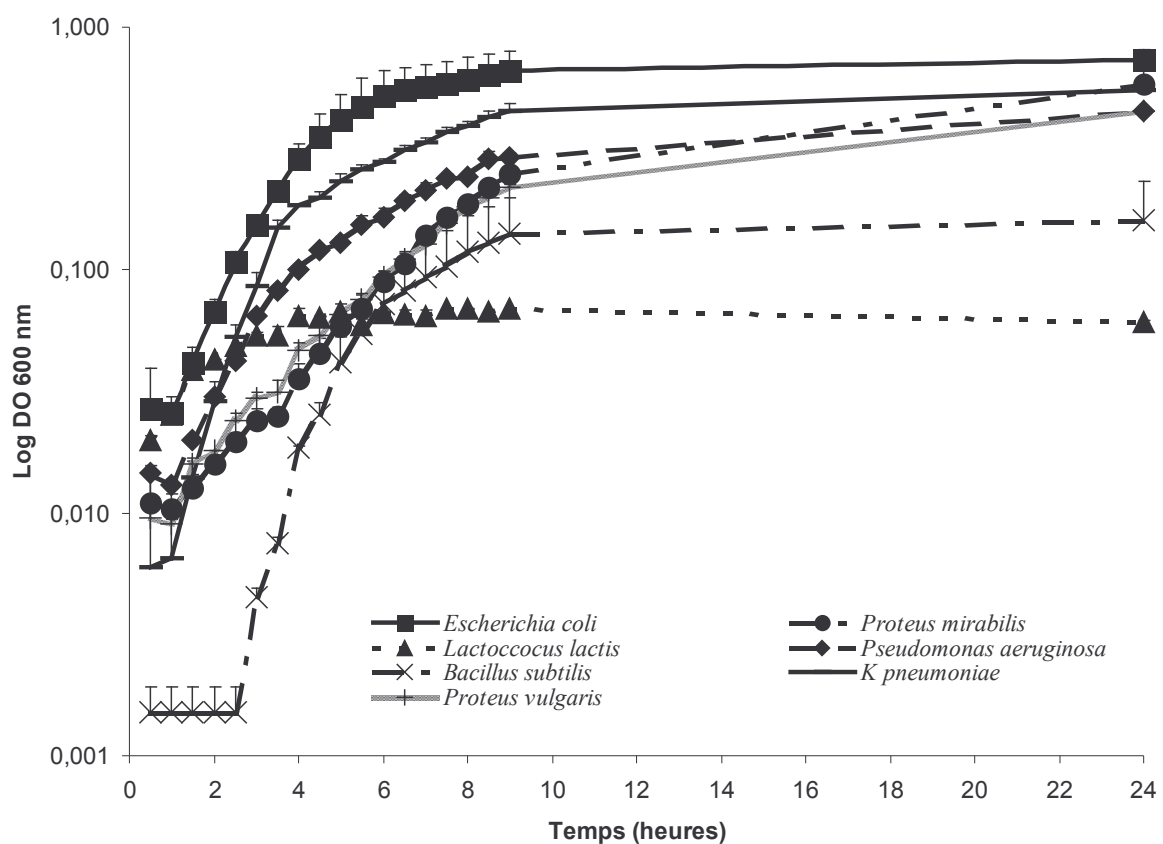


Figure 36: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de caséine.

### 3. Peptone de soja

Le temps de latence est variable sur ce milieu de culture utilisant la peptone de soja (Figure 37). Il est très court pour toutes les bactéries sauf pour *Bacillus subtilis*, où le temps de latence est particulièrement long ( $p < 0,05$ ).

Les vitesses de croissance des bactéries sont très variables sur ce milieu de culture. Ainsi, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* et *Klebsiella pneumoniae* ont une vitesse

de croissance élevée ( $p < 0,05$ ). En revanche, les autres bactéries ont une vitesse de croissance significativement plus faible ( $p < 0,05$ ).

La biomasse obtenue, après 24 heures d'incubation, varie légèrement en fonction de la bactérie. Ce sont les bactéries *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* qui donnent la plus forte biomasse ( $p < 0,05$ ). Les bactéries *Bacillus subtilis* et *Lactococcus lactis* donnent les biomasses les plus faibles ( $p < 0,05$ ).

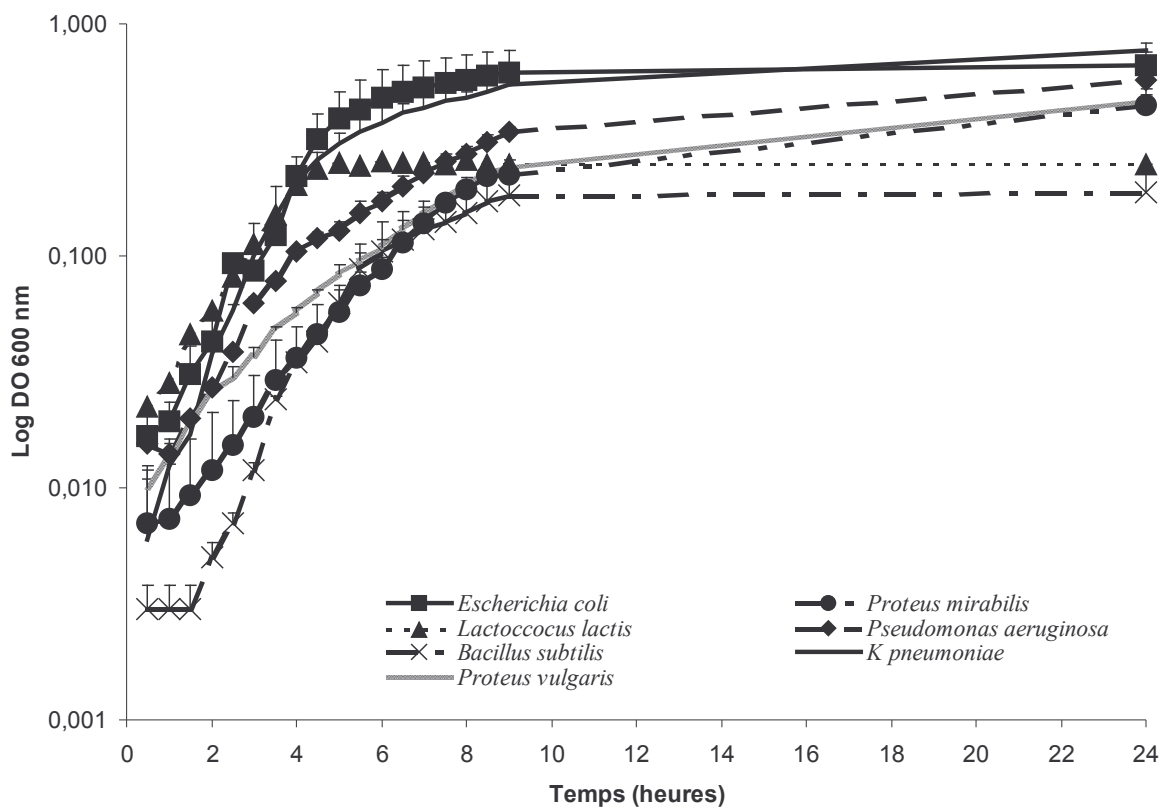


Figure 37: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de soja.

#### 4. Peptone de viande

Le temps de latence est variable sur ce milieu de culture utilisant la peptone de viande (Figure 38). Il est très court pour toutes les bactéries sauf pour *Bacillus subtilis*, où le temps de latence est particulièrement long ( $p < 0,05$ ).

Les vitesses de croissance des bactéries sont très variables sur ce milieu de culture. De ce fait, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* ont une vitesse de croissance élevée ( $p < 0,05$ ). Puis, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* présente une vitesse de croissance significativement moindre ( $p < 0,05$ ). Les bactéries *Proteus sp* et *Lactococcus lactis* montrent les plus faibles vitesses de croissance ( $p < 0,05$ ).

La biomasse obtenue, après 24 heures d'incubation, varie en fonction de la bactérie. Ce sont les bactéries *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* qui donnent la plus forte biomasse ( $p < 0,05$ ). La bactérie *Bacillus subtilis* permet l'obtention d'une biomasse intermédiaire, et *Lactococcus lactis* fournit la biomasse la plus faible ( $p < 0,05$ ).

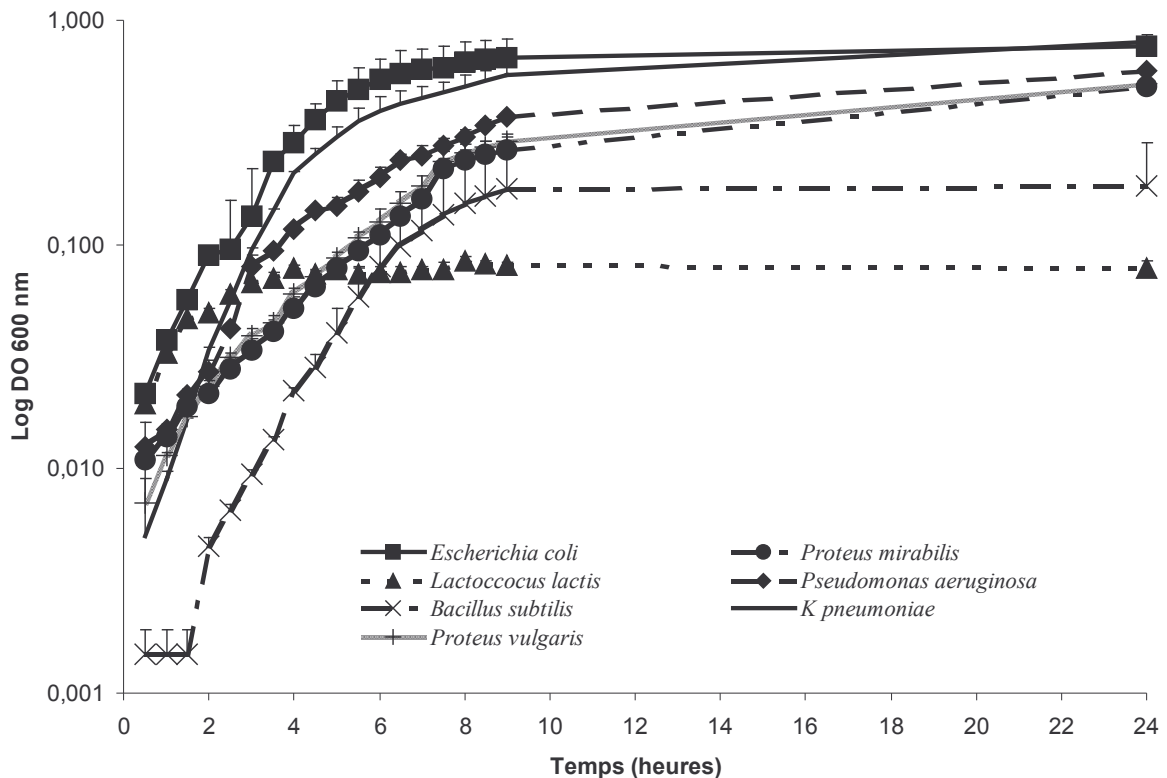


Figure 38: Cinétique de croissance des bactéries sur le milieu de culture peptone de viande.

## C. Cinétique de croissance des micro-organismes sur différents milieux de culture

### 1. *Pseudomonas aeruginosa*

Le suivi de la croissance de la bactérie Gram<sup>-</sup> *Pseudomonas aeruginosa* est effectué pendant 24 heures sur 4 milieux de culture différents. Il n'y a aucune différence significative en ce qui concerne la cinétique de croissance de cette bactérie (Figure 39).

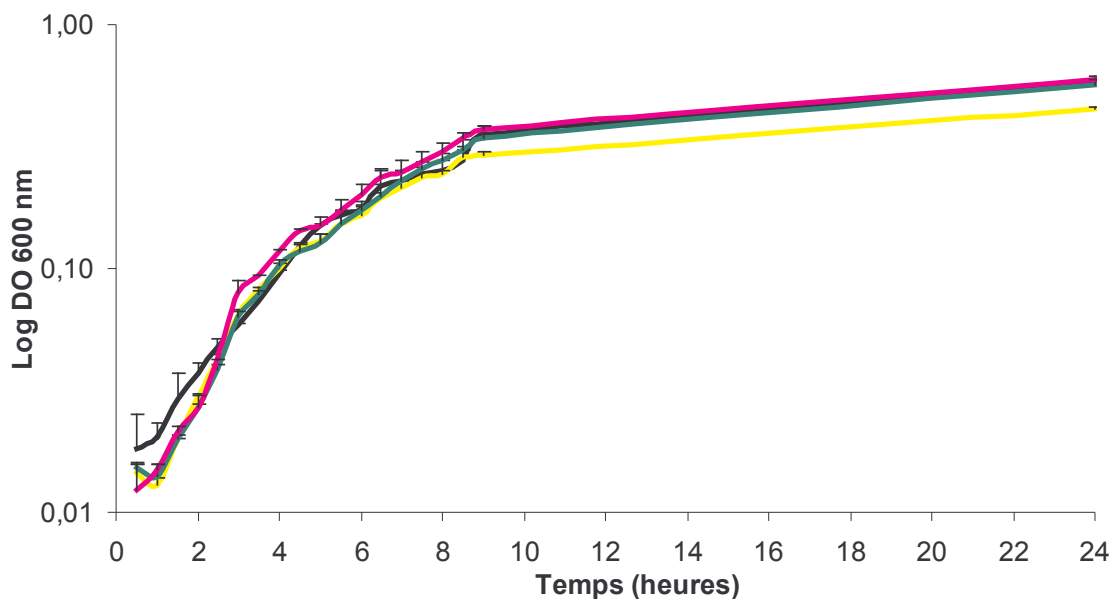


Figure 39 : Cinétique de croissance de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande — .

## 2. *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*

L'étude de la cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae*, bactérie Gram<sup>-</sup>, sur différents milieux de culture ne montre aucune différence significative (Figure 40).

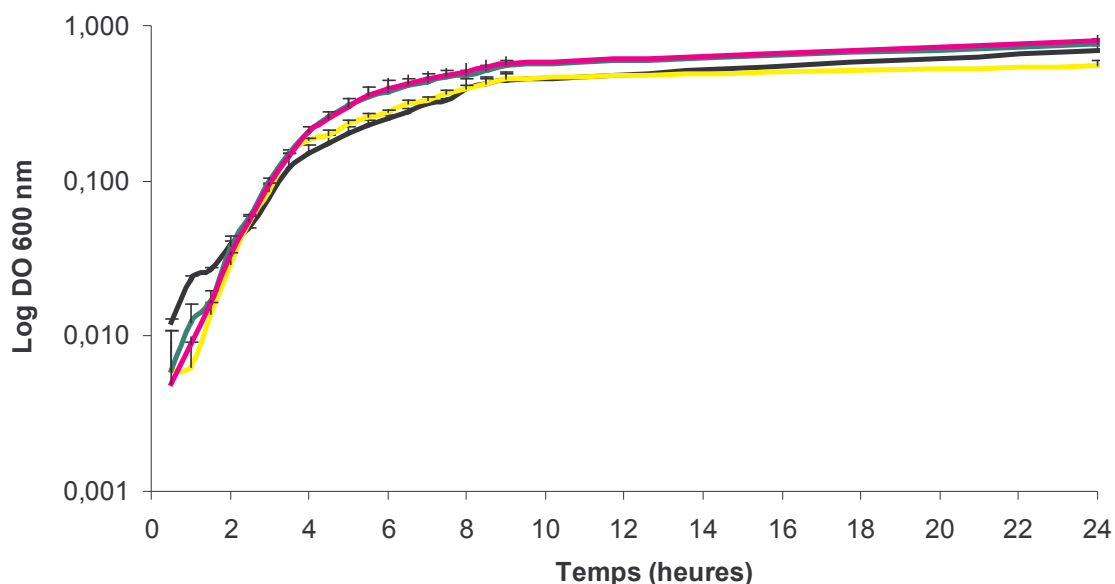


Figure 40 : Cinétique de croissance de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande — .

### 3. *Escherichia coli*

La cinétique de croissance de la bactérie Gram<sup>-</sup>, *Escherichia coli*, a été observée sur 4 milieux de culture différents. Aucune différence significative n'est observée (Figure 41).

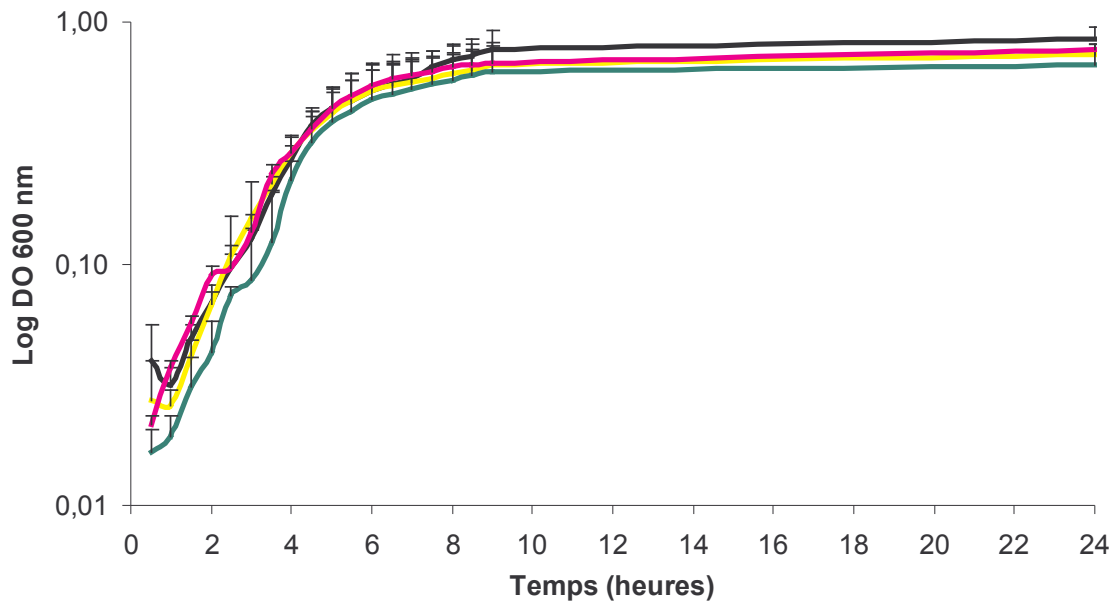


Figure 41 : Cinétique de croissance de la bactérie *Escherichia coli* sur différents milieux de culture. LBBMA25 ■ Caséine ■ Soja ■ Viande ■ .

### 4. *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*

L'observation des cinétiques de croissance de 2 espèces de *Proteus*, bactérie Gram<sup>-</sup> : *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* démontre que leur croissance est similaire. De plus, aucune différence significative n'est observée en fonction du milieu de culture utilisé (Figure 42 et Figure 43).

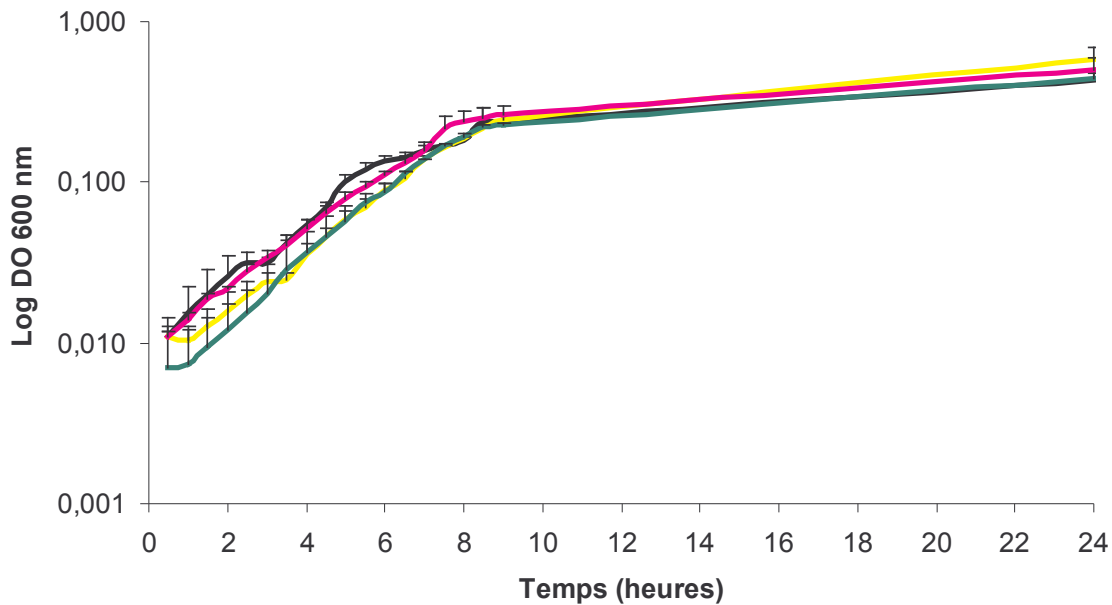


Figure 42 : Cinétique de croissance de la bactérie *Proteus mirabilis* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande — .

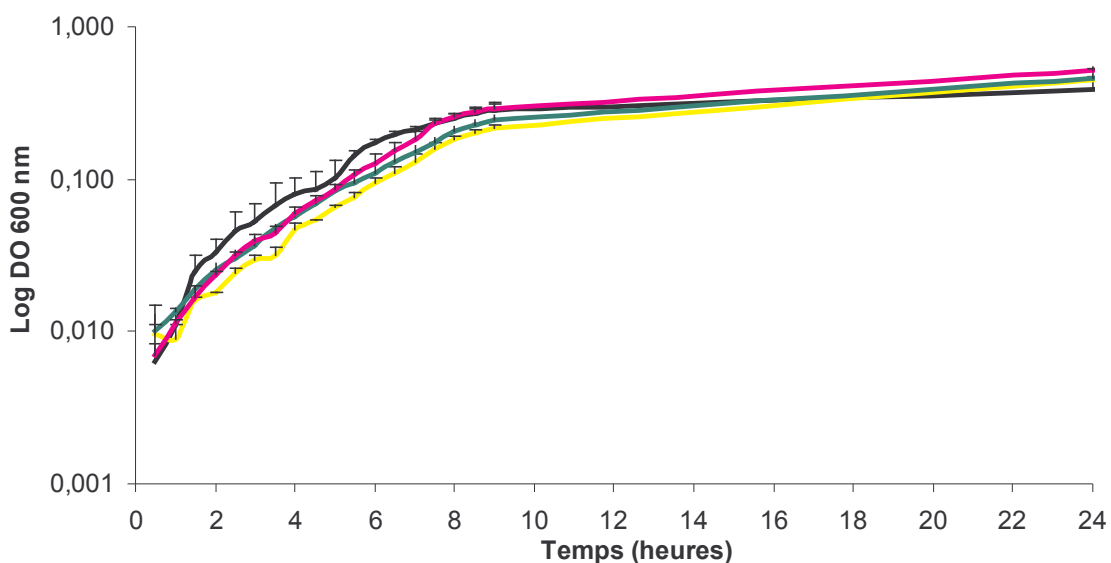


Figure 43 : Cinétique de croissance de la bactérie *Proteus vulgaris* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande — .

### 5. *Lactococcus lactis subsp lactis*

L'examen de la cinétique de croissance de *Lactococcus lactis*, bactérie Gram<sup>+</sup>, sur différents milieux de culture montre des différences significatives. Ainsi, après 24 heures d'incubation, le milieu à base de peptone de soja permet d'obtenir la plus forte biomasse ( $p < 0,05$ ). Puis, c'est le milieu à base de peptone LBBMA25 qui donne la plus forte biomasse, suivi par les milieux à base de viande et de caséine ( $p < 0,05$ ). De plus, les vitesses de croissance sont différentes en fonction de la peptone utilisée. De ce fait, la peptone soja permet d'obtenir

une vitesse de croissance significativement plus importante ( $p < 0,05$ ), suivi par la peptone LBBMA25. Viennent ensuite les peptones caséine et viande qui permettent toutes les 2 une même vitesse de croissance.

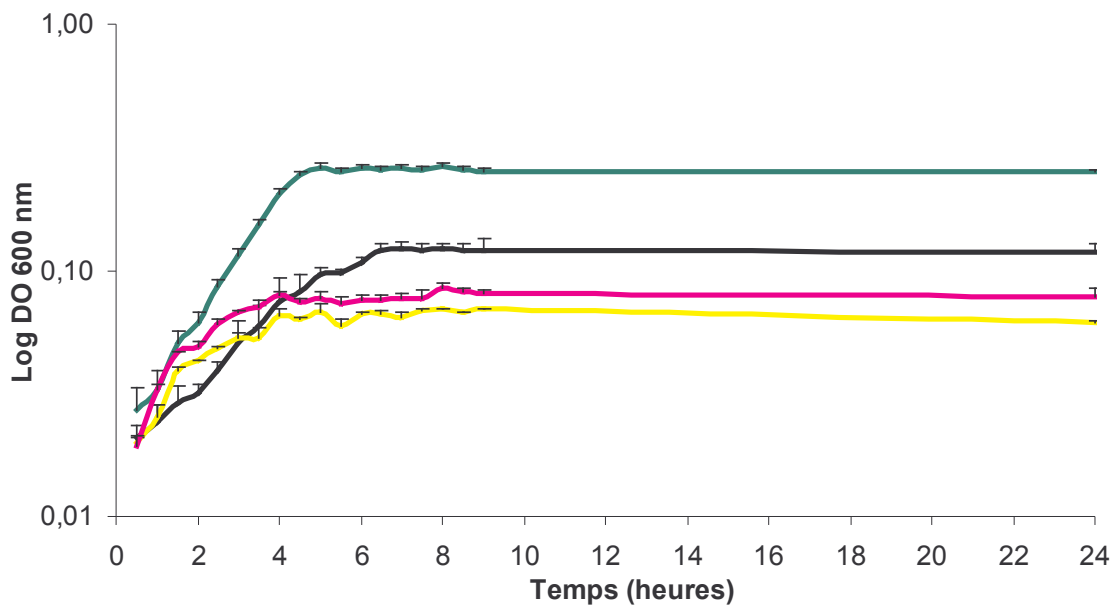


Figure 44 : Cinétique de croissance de la bactérie *Lactococcus lactis* sur différents milieux de culture. LBBMA25 ■ Caséine ■ Soja ■ Viande ■ .

### 6. *Bacillus subtilis subsp subtilis*

La cinétique de croissance de la bactérie Gram<sup>+</sup>, *Bacillus subtilis*, a été suivie sur 4 milieux de culture différents. Aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne la biomasse obtenue après 24 heures d'incubation. En revanche, le temps de latence de la croissance de ce micro-organisme est fonction du milieu de culture utilisé. Ainsi, il est significativement plus court ( $p < 0,05$ ) pour le milieu de culture utilisant la peptone LBBMA25, puis c'est avec le milieu de culture à la base de peptone de soja, suivi par le milieu à base de peptone de viande. Le temps de latence significativement le plus long ( $p < 0,05$ ) est obtenu avec le milieu de culture utilisant la peptone caséine.

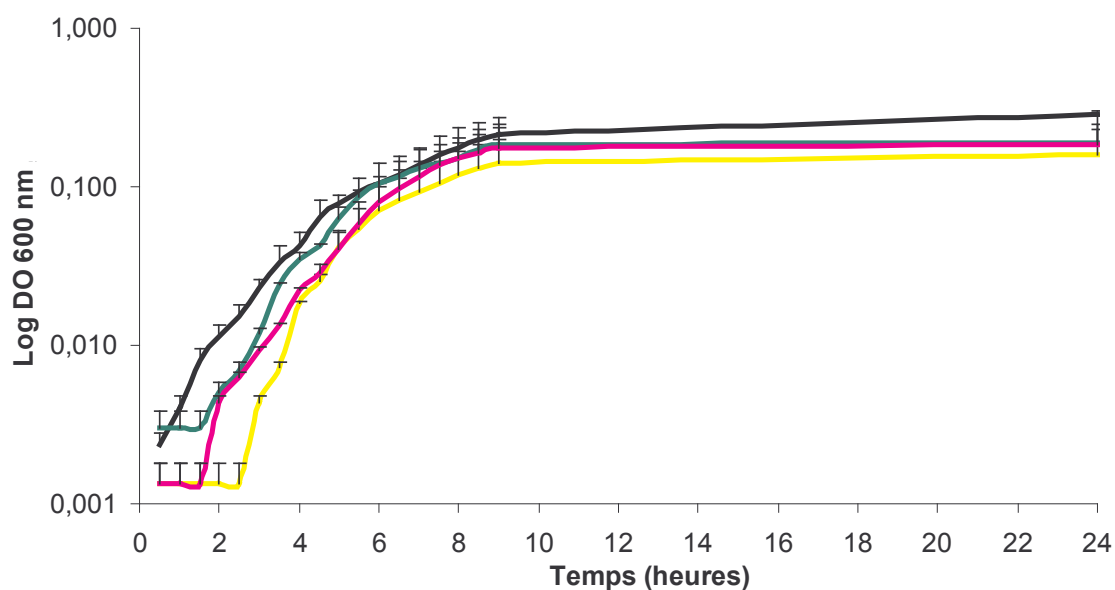


Figure 45 : Cinétique de croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande .

### 7. *Saccharomyces cerevisiae*

L'étude de la cinétique de croissance de la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, sur 4 milieux de culture différents montre qu'il n'y a aucune différence significative (Figure 46).

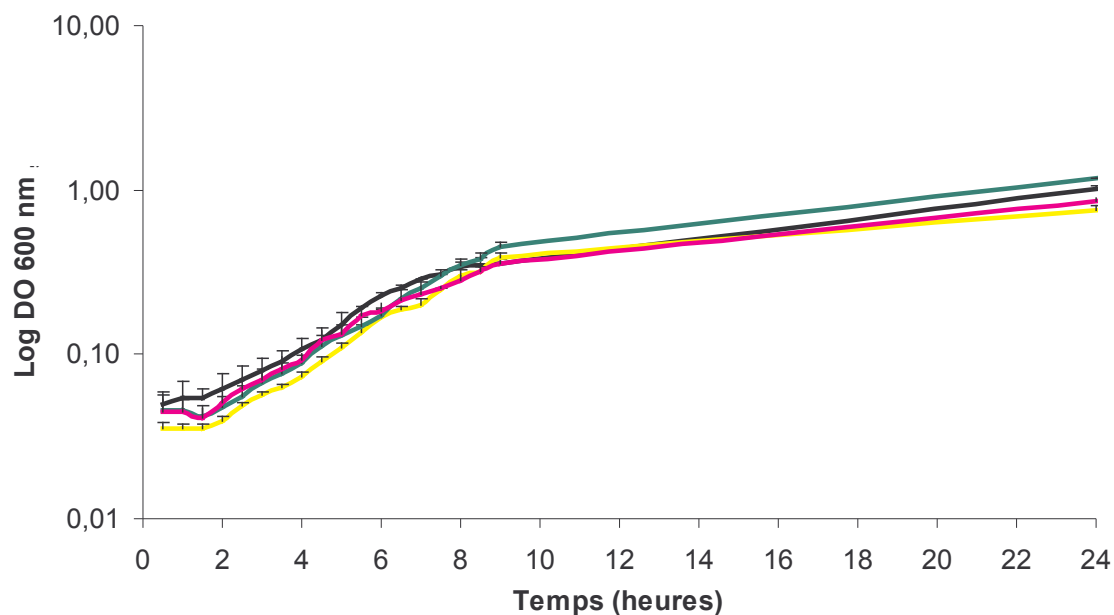


Figure 46 : Cinétique de croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur différents milieux de culture. LBBMA25 — Caséine — Soja — Viande .



## IV Discussion

Dans un premier temps, les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ont été utilisés pour la culture de micro-organismes. L'analyse biochimique de ces ensilages (chapitre 1, III) a montré que ces produits peuvent convenir en tant que peptone. Cependant, il a fallu vérifier leur stabilité à la chaleur (autoclave) et l'impact de la concentration en ensilage sur la coloration du milieu de culture (présence de l'encre de seiche).

L'impact de l'autoclavage sur la stabilité des ensilages a d'abord été testé. Après un autoclavage de 15 minutes à 121°C, les peptones à base d'ensilage LBBMA25 sont stables puisque les composés restent solubles. En revanche, l'ensilage LBBMA4 (3 ou 15g/L) résiste mal à l'autoclavage, qui entraîne une insolubilisation de certains composés et une précipitation de ceux-ci. De plus, l'utilisation des ensilages, en milieu de culture solide, a permis d'apprécier la coloration de ces milieux de culture. L'ensilage LBBMA4, utilisé en tant que peptone, montre une forte coloration due à la présence de mélanine, quelle que soit la concentration testée. La coloration est plus faible dans le cas de l'ensilage LBBMA25. De plus, à une concentration de 3g/L, elle est tout à fait convenable (proche de la coloration des peptones commerciales) pour effectuer les cinétiques de croissance des micro-organismes. Ces résultats sont cohérents avec la composition et le niveau d'hydrolyse de ces 2 ensilages (chapitre 1, III). En effet, l'ensilage LBBMA25 a subi une lyse plus forte que l'ensilage LBBMA4, sa composition en peptides et acides aminés est donc plus forte, avec en contre partie, une concentration en protéine plus faible. Ces paramètres entraînent donc une plus grande stabilité à la chaleur. De plus, une plus forte autolyse implique une dégradation plus importante de la mélanine présente et donc une coloration de l'ensilage moins importante dans le cas de l'ensilage LBBMA25.

Au vu de ces données, nous avons choisi d'effectuer des cinétiques de croissance en comparant la croissance de divers micro-organismes sur le milieu à base de peptone LBBMA25 avec 3 milieux à base de peptones commerciales : caséine, soja et viande.

Sur un même milieu de culture, la croissance des bactéries est très variable, que ce soit au niveau du temps de latence, de la vitesse de croissance ou encore de la biomasse obtenue après 24 heures d'incubation.

Le temps de latence est très court sur le milieu de culture utilisant la peptone LBBMA25 quelle que soit la bactérie utilisée. En revanche, il est variable sur les autres milieux de culture. Ainsi, avec les milieux à base de peptone de caséine, de soja ou de viande, le temps de latence

est relativement court pour toutes les bactéries sauf en ce qui concerne *Bacillus subtilis* qui montre un temps de latence particulièrement long.

Les vitesses de croissance des bactéries sont très variables. Ainsi, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* ont une vitesse de croissance élevée quel que soit le milieu de culture utilisé. *Lactococcus lactis* a généralement une vitesse de croissance très faible en comparaison avec les autres bactéries. Cependant, sur le milieu à base de peptone de soja, *Lactococcus lactis* atteint une bonne vitesse de croissance comparable à celle de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae*. Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus sp.* ont généralement une vitesse de croissance intermédiaire.

En ce qui concerne la biomasse obtenue après 24 heures d'incubation, certaines généralités apparaissent. D'abord, ce sont toujours *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* qui donnent les plus fortes biomasses. Sur les milieux à base de peptone de caséine, de soja et de viande, les bactéries *Proteus sp.* et *Pseudomonas aeruginosa* atteignent des biomasses similaires à celles obtenues avec les bactéries *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae*. Les bactéries *Bacillus subtilis*, *Proteus sp.* et *Pseudomonas aeruginosa* forment une biomasse intermédiaire sur le milieu de culture à base de LBBMA25. De plus, *Bacillus subtilis* permet l'obtention d'une biomasse intermédiaire ou faible et *Lactococcus lactis* donne toujours de faible biomasse sur les milieux testés.

L'ensemble de ces données démontre que les deux bactéries Gram<sup>+</sup> étudiées sont plus complexe à faire croître que les autres micro-organismes testés. En effet, leurs cinétiques de croissance sont en règle générale plus faible que celles des autres bactéries. C'est cependant avec ces deux micro-organismes que des différences sont observées au niveau de la cinétique de croissance en fonction de la peptone utilisée. Ce phénomène avait déjà été noté par Dufossé *et al.* (2001), qui soulèvent une question : lorsque l'on désire comparer des peptones, faut-il utiliser un milieu de culture bien adapté au micro-organisme étudié, ce qui implique une atténuation des différences au niveau des caractéristiques de croissance, ou bien utiliser un milieu de culture pauvre pour révéler des différences ?

Le suivi de la croissance de plusieurs bactérie Gram<sup>-</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* a été fait pendant 24 heures sur 4 milieux de culture différents. Aucune différence n'a été notée en ce qui concerne la cinétique de croissance de ces bactéries en fonction du milieu de culture utilisé. Il en est de même avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'ensemble de ces micro-organismes, bactéries

Gram<sup>-</sup> et levure, sont connus pour leur facilité de culture, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence observée. De cette façon, leurs besoins sont faibles et ces micro-organismes ne rencontrent pas de problème pour croître quel que soit le milieu de culture utilisé.

En outre, l'observation de la cinétique de croissance des bactéries Gram<sup>+</sup>, *Lactococcus lactis* et *Bacillus subtilis* sur différents milieux de culture, montre des différences significatives. Ainsi, après 24 heures d'incubation de *Lactococcus lactis*, le milieu à base de peptone de soja permet d'obtenir la plus forte biomasse. Puis, c'est le milieu à base de peptone LBBMA25 qui donne la plus forte biomasse, suivi par les milieux à base de viande et de caséine. Les vitesses de croissance de *Lactococcus lactis* sont différentes en fonction de la peptone utilisée. De ce fait, la peptone de soja permet d'obtenir une vitesse de croissance plus importante, suivi par la peptone LBBMA25. Viennent ensuite les peptones de caséine et de viande, qui permettent toutes les 2 une même vitesse de croissance. En revanche, la biomasse obtenue et la vitesse de croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* ne montre aucune différence en fonction du milieu de culture utilisé. D'autre part, le temps de latence de la croissance de ce micro-organisme est fonction du milieu de culture utilisé. Ainsi il est nettement plus court pour le milieu de culture utilisant la peptone LBBMA25, puis c'est avec le milieu de culture à la base de peptone de soja, suivi par le milieu à base de peptone de viande, enfin le temps de latence le plus long est obtenu avec le milieu de culture utilisant la peptone caséine. Ces deux micro-organismes, sont connus pour être beaucoup plus délicats à cultiver que la levure et les bactéries Gram<sup>-</sup> testées. Leurs besoins sont plus spécifiques et leur croissance sera plus ou moins forte en fonction des différents éléments qu'ils trouveront à leur disposition dans le milieu de culture. Les milieux de culture à base de peptone de soja et de LBBMA25 semblent mieux correspondre aux besoins des deux bactéries Gram<sup>+</sup> testées. Ainsi, les biomasses (*Lactococcus lactis*) et le temps de latence (*Bacillus subtilis*), observés avec les peptones de soja et LBBMA25, montrent que ces peptones apportent les éléments essentiels à une bonne croissance de ces 2 bactéries.

Divers travaux ont évalué la possibilité d'utiliser les lysats de poissons ou de co-produits marins en tant que peptones pour milieu de culture de micro-organismes. Ces peptones peuvent être utilisées comme seule source pour le milieu de culture ou bien entrant dans la composition de milieu complexe (ajout aux peptones de certains sels, de glucose...).

Plusieurs travaux portent sur l'utilisation des peptones marines dans des milieux de culture complexes. Par exemple, l'utilisation d'ensilage de poisson (*Sardinella anchovia*, *Lepophidium profundorum* et *Trachurus lathami*), à une concentration de 10g/L dans un milieu de culture

complexe, en tant que substrat de fermentation bactérien pour la production de bioproduits par la bactérie *Corynebacterium glutamicum* permet d'augmenter à la fois la biomasse produite et la production de L-lysine (Coello *et al.*, 2000). Ces auteurs démontrent que cet ensilage de poisson est capable d'augmenter la biomasse et la production de bio-produit. Il doit être utilisé en tant que source de facteurs de croissance, mais nécessite d'être enrichie par l'addition de glucose, de vitamines et de certains sels (Coello *et al.*, 2000).

Dufossé *et al.* (2001) ont comparé 4 différentes peptones de poissons (morue, saumon, thon et poisson indéterminé) commerciales ou fabriquées au sein de leur structure avec une peptone de caséine sur les cinétiques de croissance de plusieurs micro-organismes : des bactéries *Escherichia coli* et *Lactobacillus casei*, les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Sporobolomyces odorus*, et les moisissures *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus niger*. Ces auteurs précisent que la bactérie *Escherichia coli* est beaucoup plus facile à faire croître que *Lactobacillus casei*. Les courbes qu'ils ont obtenues avec *Escherichia coli* sont toutes similaires quelle que soit la peptone utilisée. En revanche, des différences sont observées avec *Lactobacillus casei*, puisque cette bactérie a une croissance plus importante avec 3 des peptones de poissons : morue, saumon et poisson indéterminé, que sur une peptone de poisson, le thon, et de caséine (Dufossé *et al.*, 2001). D'autres ont observé des cinétiques de croissances différentes concernant la bactérie *Escherichia coli* placée sur un substrat azoté à base d'hydrolysate de caséine ou d'hydrolysate de d'estomac de poisson (De La Broise *et al.*, 1998). De cette façon, De La Broise *et al.* (2001) ont montré que la phase de latence est plus courte, la vitesse de croissance et la biomasse obtenues sont plus importantes sur le substrat à base d'hydrolysate de caséine.

De plus, Dufossé *et al.* (2001) ont démontré que peu de différences sont observées en fonction du substrat azoté utilisé pour la levure *Sporobolomyces odorus*, mais que ce sont les peptones de caséine et de saumon qui donnent les biomasses les plus importantes en ce qui concerne la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Dufossé *et al.*, 2001). Dufossé *et al.* (2001), expliquent que les performances des peptones de poissons sont proches de celles de la peptone de caséine en terme de cinétique de croissance de micro-organismes. Ces données sont confirmées par d'autres études qui montrent que des peptones de poisson donnent de très bons résultats en comparaison avec une peptone de caséine (Guérard *et al.*, 2001).

Plusieurs peptones, obtenues à partir de co-produits marins de thon *Thunnus albacores*, de calmar *Loligo vulgaris*, d'espadon *Xiphia gladius* et de truite *Oncorhynchus mykiss* ont été testées pour fabriquer des milieux de culture en comparaison avec des milieux de culture commerciaux sur la croissance de bactéries marines *Roseobacter sp.*, *Pseudomonas fluorescens*

et *Vibrio sp.* (Vasquez *et al.*, 2004). Ces milieux commerciaux sont : le milieu MRS « Man, Rogosa, Sharpe » (contenant de la bactopectone ainsi que des extraits de levure et de viande) couramment utilisé pour les bactéries marines et le Marine Medium (contenant de la peptone et des extraits de levure) habituellement employé pour les bactéries lactiques. Vasquez *et al.* (2004) ont démontré que ces bactéries marines ont généralement une meilleure croissance sur les milieux de culture contenant des peptones de co-produits marins que sur ceux contenant des peptones commerciales.

Le plus souvent, les milieux de culture pour micro-organismes contiennent des protéines digérées en tant que source principale de carbone et d'azote. Mais ils sont aussi généralement supplémentés avec des extraits de farine, de levure et des sucres qui apportent différents éléments essentiels (des ions, des minéraux, des sucres et des vitamines) (Martone *et al.*, 2005). Certains travaux ont tout de même privilégié l'utilisation seule de peptones marines en tant que milieux de culture, en raison de leurs propriétés. Ainsi, Martone *et al.* (2005) ont choisi d'utiliser un hydrolysate de co-produit de poisson (*Merluccius hubbsi*) en tant que seule source d'azote et de carbone dans le milieu de culture de plusieurs micro-organismes représentatifs des différents groupes : une bactérie Gram<sup>-</sup> *Escherichia coli*, des bactéries Gram<sup>+</sup> *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis*, ainsi qu'une archae bactérie, *Halobacterium salinarum*. Ces auteurs ont montré que la peptone de co-produit de poisson possède une valeur nutritive suffisante pour supporter la croissance de bactérie et d'archaé bactérie (Martone *et al.*, 2005).

## **V Conclusion**

L'ensemble de ce chapitre concernant l'utilisation des ensilages LBBMA4 et LBBMA25 en tant que milieu de culture pour micro-organismes, a permis d'observer l'effet des ensilages *in vitro* sur des bactéries et une levure.

Toutes ces données soulignent bien les besoins importants en éléments essentiels des 2 bactéries Gram<sup>+</sup> testées, au contraire de l'ensemble de la levure et des bactéries Gram<sup>-</sup>.

Les résultats obtenus démontrent les potentialités d'utiliser l'ensilage LBBMA25 en tant que peptone puisqu'il permet d'obtenir des cinétiques de croissance équivalente à ce qui est obtenu avec des peptones commerciales de diverses origines (viande, soja et caséine). En

revanche, les caractéristiques de l'ensilage LBBMA4 ne permettent pas d'envisager son utilisation en tant que peptone pour la culture de micro-organismes.

L'ensemble de ces résultats montre que le choix des micro-organismes est crucial dans ce type d'étude. En effet, la comparaison de la cinétique de croissance de micro-organismes est plus facilement observable lorsque l'on utilise des micro-organismes sensibles, c'est à dire ayant des besoins forts en éléments essentiels.

Dans de futures expérimentations, de nouvelles cinétiques de croissance en élargissant le choix de micro-organismes (diverses origines, besoins particuliers...) devront être faites mais aussi en diversifiant les peptones de manière à optimiser l'étude.

La Figure 47 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience

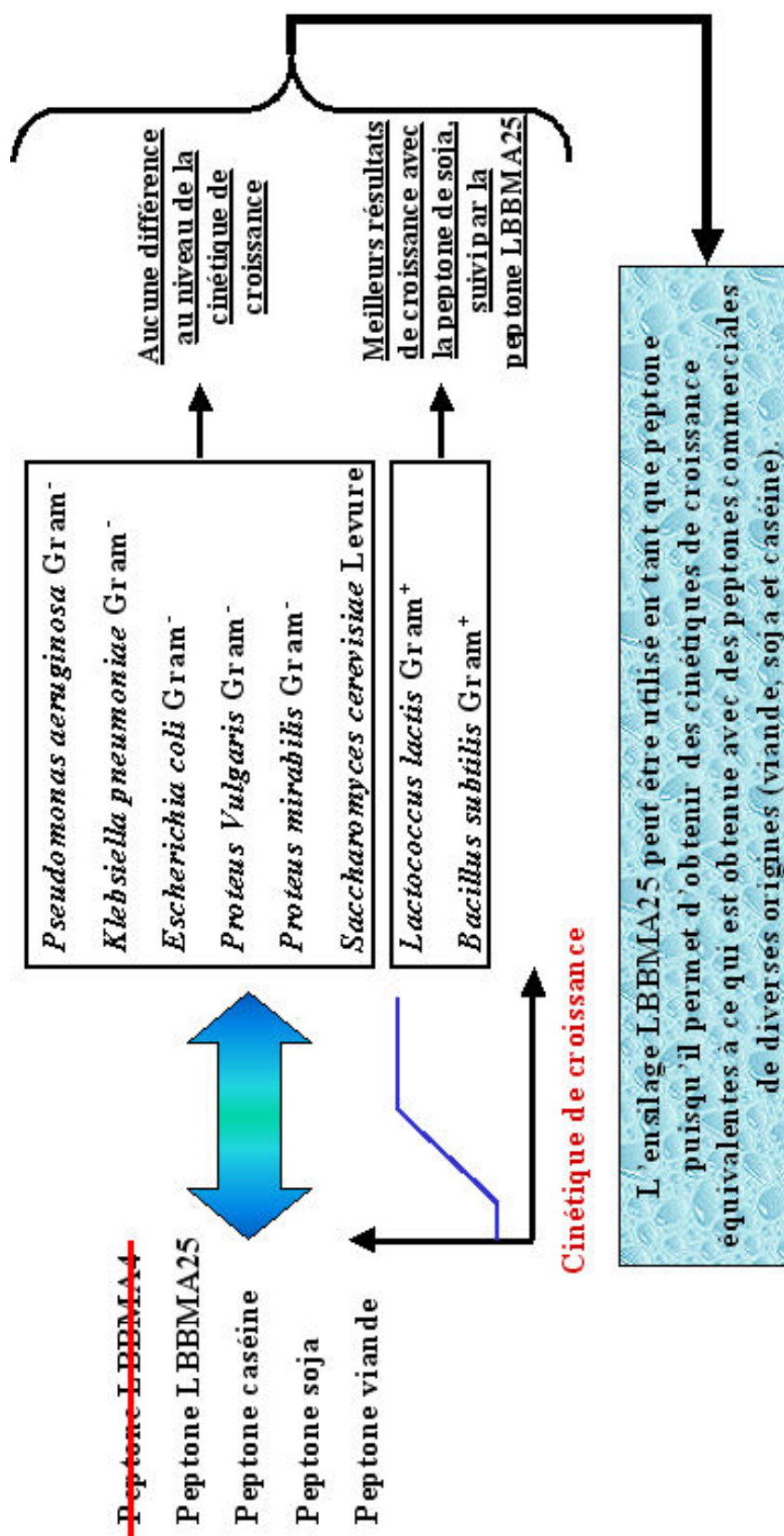


Figure 47: Synthèse des résultats obtenus concernant l'utilisation des ensilages en tant que peptones pour micro-organismes.





# Chapitre 3 :

## Valorisation des ensilages en nutrition animale : tests *in vivo*.

LE BIHAN E., PERRIN A., KOUETA N., (2006). Influence of diet peptide contain on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu- Life and Environment*. 56 (2): 139-145.

LE BIHAN, E., GIMAZANE, J. P., LEBEL, J. M., KOUETA N., (submitted). Effects of food supplementation with different percentage of silage on survival and growth in experimental rearing of post-larvae shrimps *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*.

LE BIHAN, E., FROUËL, S., GIMAZANE, J. P., SERPENTINI, A., LEBEL, J. M., NICOLAS, J. L., KOUETA N., (in preparation). Impact of lysate supplementation in diet when fed to juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*.

Ce chapitre à fait l'objet d'une collaboration avec le Master Professionnel Exploitation des Ressources Vivantes Côtières de l'université de Caen.

---

## Plan du chapitre 3 :

### I INTRODUCTION

### II MOLLUSQUES

- A. Introduction
- B. Material and methods
  - 1. Enrichment characteristic and prey enrichment
  - 2. Rearing
  - 3. Growth parameters
  - 4. Assays
  - 5. Statistical analysis
- C. Results
  - 1. Molecular weight of proteins on silage
  - 2. Growth parameter
  - 3. Enzymatic activity
  - 4. Preys composition
- D. Discussion
- E. Conclusion

### III CRUSTACÉS

- A. Introduction
- B. Material and methods
  - 1. Biological material
  - 2. Rearing method
  - 3. Diet
  - 4. Statistical analysis
- C. Results
- D. Discussion

### IV POISSONS

- A. Introduction
- B. Matériel et méthodes
  - 1. Matériel biologique
  - 2. Méthode d'élevage
  - 3. Suivis zootechniques
  - 4. Mesure des indices de condition
  - 5. Analyse de la qualité biochimique de la chair
  - 6. Analyses statistiques
- C. Résultats
  - 1. Suivis zootechniques
  - 2. Mesure des indices de condition
  - 3. Analyse de la qualité biochimique de la chair
- D. Discussion

### V CONCLUSION

## **I Introduction**

L'aquaculture correspond à une activité de pratiques culturelles de végétaux et d'animaux dans l'eau. Elle s'est considérablement développée dans certaines régions du monde et fournit, aujourd'hui, plus du tiers des ressources mondiales aquatiques (Boeuf, 2002). Le début des années 1960 correspond à un changement dans les pratiques aquacoles, avec la mise au point d'aliments composés artificiels qui a permis la délocalisation des sites piscicoles, des zones côtières adjacentes aux ports de pêche vers des zones plus propices, thermiquement et qualitativement, à l'intérieur des terres (Boeuf, 2002). L'aquaculture représentait plus de 26% (31 millions de tonnes) de la production mondiale de poissons, crustacés et mollusques en 1998 (117 millions de tonnes issues du produit de la pêche et de l'aquaculture). L'augmentation annuelle de cette production est de 10%. Si cette croissance se maintient, le produit de la pisciculture devrait dépasser la contribution de la pêche dans le total des poissons destinés à la consommation humaine vers l'an 2030 (Tovar-Ramirez, 2002). La disponibilité en poissons pour la consommation humaine a augmenté de 27,6 millions de tonnes en 1961, à plus de 93 millions de tonnes à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle (Tovar-Ramirez, 2002). Les deux tiers de ces poissons provenaient de la pêche tandis qu'un tiers provenait de l'aquaculture.

L'aliment aquacole contient classiquement beaucoup de produits marins, principalement de la farine de poissons, qui représente la plus importante source de protéines dans les aliments d'aquaculture. En effet, l'aliment aquacole contient une proportion importante de farines de poissons (40 à 60%) et d'huile de poissons (15 à 30%). Avec l'augmentation de la population et de la pression de pêche, la production mondiale de farine de poisson est en phase de déclin depuis les dernières années. De plus, il y a une forte demande en protéines d'origine marine pour la population humaine et pour les animaux d'élevages (Millamena, 2002). Face à la forte consommation et à la diminution de sa production, le prix des farines de poissons a fortement augmenté. Il devient donc urgent de trouver des alternatives appropriées aux farines de poissons. Au cours de ces dernières années, l'accroissement de l'intérêt porté à l'aquaculture a suscité la curiosité des scientifiques, orientant leurs voies de recherche vers la nutrition des poissons.

En aquaculture, il existe une forte volonté pour développer des substituts aux farines de poissons en utilisant des farines d'animaux terrestres et des protéines de sources végétales (Millamena, 2002). Un effort particulièrement important a cependant été consacré à la digestion des nutriments soit les plus coûteux, soit nécessaires en grande proportion dans le régime pour subvenir aux besoins de l'animal. Ainsi, les différents objectifs sont d'abord de maîtriser l'alimentation artificielle des différents stades de développement des espèces aquacoles, ensuite,

de diminuer l'utilisation des ressources halieutiques en aquaculture. Pour atteindre ces objectifs, le développement de composés nouveaux, tels que des ensilages de co-produits, utilisables en tant que complément alimentaire permettrait à la fois de pallier aux carences (liées à l'utilisation des produits végétaux ou d'aliments congelés) et de limiter l'utilisation des ressources aquatiques.

La production de lysat et leur utilisation pour l'alimentation animale ou en tant qu'additif est une pratique courante permettant d'augmenter la valeur des co-produits de l'industrie de la transformation des produits marins (Cancre *et al.*, 1999). Diverses techniques sont utilisées pour obtenir des lysats, mais dans tous les cas, les produits montrent une excellente valeur nutritive principalement liée à leur composition élevée en acides aminés libres et peptides (Cancre *et al.*, 1999).

Le but de cette étude est donc de tester des sources protéiques d'invertébrés marins, les ensilages de co-produits de la seiche, en tant qu'enrichissement de l'alimentation d'animaux d'intérêt aquacole (mollusque, crustacé, poisson).

## II Mollusques

### Résumé :

Des seiches nées dans le laboratoire sont élevées pendant 40 jours avec différents aliments (LBBMA4 ou LBBMA25 qui sont des ensilages de viscères). La survie est de 100% dans chacun des groupes. Les seiches qui reçoivent une alimentation enrichie ont une croissance et un taux de conversion plus élevés. Ces résultats montrent que les protéines autolysées des enrichissements peuvent être utilisées pour la nutrition de juvéniles de céphalopodes. Les différences observées entre les juvéniles recevant une alimentation enrichie ou non-enrichie sont dues en grande partie aux protéines et aux peptides contenus dans les enrichissements. Ainsi, LBBMA4 contient moins de peptides que LBBMA25 alors que leur contenu en protéines (>20kDa) est identique. Les peptides de faibles poids moléculaires contenus dans les crevettes enrichies sont responsables du maintien de l'activité spécifique des enzymes protéolytiques des seiches alimentées avec des crevettes enrichies. De plus, la forte concentration en glucides et en peptides des crevettes enrichies implique une diminution de l'activité spécifique de l'amylase. L'activité spécifique des lipases n'est pas modifiée par l'alimentation testée.

La croissance et le taux de conversion est améliorée par l'utilisation d'hydrolysats de protéines de poissons chez les larves du salmonidé *Salmo salar* (Berge and Storebakken, 1996) et de la carpe *Cyprinus carpio* (Carvalho *et al.*, 1997). Cet effet positif peut être attribué à l'augmentation de la digestibilité de l'aliment lié au traitement enzymatique. Les acides aminés libérés au cours du procédé jouent le rôle d'attractants, ils entraînent une stimulation de la prise alimentaire et de la croissance. (Berge and Storebakken, 1996; Oliva-Telez *et al.*, 1999). De plus, les lysats incorporés dans l'alimentation permettent de stimuler le développement larvaire des poissons tel que chez poisson rouge *Carassius auratus* ou le bar *Dicentrarchus labrax* (Szlaminska *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997).

Le système digestif des juvéniles de seiches n'est mature qu'au-delà du 30<sup>ème</sup> jour après l'éclosion (Boucaud-Camou, 1973; Perrin *et al.*, 2004). Pendant cette période de maturation de nombreux changements interviennent. La supplémentation de l'alimentation des juvéniles de seiche peut contribuer à une bonne survie et à une croissance rapide. D'un point de vue métabolique, la principale différence entre les céphalopodes et les autres organismes marins correspond à leur contenu élevé en protéines (75-85% du poids sec) due à la prédominance d'un métabolisme protéique (Villanueva *et al.*, 2002). Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 possèdent un contenu élevé en protéines (81% pour LBBMA4 et 89% pour le LBBMA25) et en particulier en protéines de faible poids moléculaire (inférieur 6,5kDa). Ces produits peuvent donc être digérés rapidement et facilement. Ainsi, ils correspondent aux besoins de jeunes seiches.

L'utilisation des ensilages, LBBMA4 et LBBMA25, en tant qu'enrichissement indirect (utilisation de crevettes *Crangon crangon* enrichie en tant que proies) dans l'alimentation de juvénile de seiche donne des résultats satisfaisants. De cette manière, ils permettent de réduire la ration alimentaire, d'augmenter le gain de poids et d'améliorer le taux de conversion de l'aliment. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ce phénomène. Les enrichissements entraînent une augmentation de la quantité de peptides et de glucides dans les crevettes utilisées comme proie (Perrin, 2004). Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 peuvent être employés comme enrichissement de l'alimentation de juvéniles de seiche en élevage. Cependant, l'utilisation d'un enrichissement indirect est limitant puisque les proies métabolisent en partie l'enrichissement. Nous n'avons donc réussi à enrichir les proies qu'en peptides et acides aminés. Nous pouvons imaginer que l'utilisation d'un vecteur (crevette) de l'enrichissement limite l'effet des ensilages. Dans de futures expérimentations nous devons donc utiliser des enrichissements directs.

---

## **Influence of diet peptide content on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis***

*E. LE BIHAN\**, *A. PERRIN*, *N. KOUETA*

*Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France*

*Corresponding authors: estlebihan@yahoo.fr*

### **Abstract**

Juvenile cuttlefish hatched in the laboratory were reared for 40 days with different enriched diets (LBBMA4 or LBBMA25, which are viscera silages). Survival was 100% in every group. Cuttlefish fed with enriched diet had better growth and conversion rate. These results indicate that autolysed proteins from enrichment can be used in juvenile cephalopod nutrition. Differences observed in juvenile cuttlefish fed with non-enriched food and cuttlefish receiving enriched food are due for a large part to the protein and peptides contained in the enrichments. In this way, LBBMA4 contains lower peptides than the LBBMA25, whereas the containing in proteins (> 20kDa) was similar. Low molecular weight peptides contained in enriched shrimps are also responsible of the remaining specific activity of proteolytic enzymes in the juvenile cuttlefish fed with enriched shrimp. Moreover, carbohydrates high concentration of enriched shrimps improved a decrease of amylase specific activity. Lipases specific activity was not modified by diet.

Keywords: Cuttlefish, Diet, Enrichment, Enzymes, Growth, Rearing

### **A. Introduction**

Marine animals are mainly exported in eviscerated frozen form, which improves the development of transformation factories. In consequence, many scrap are produced, principally viscera. Traditionally, viscera have been considered as waste and utilized only to a minor extend (Gildberg and Almas, 1986). Therefore, because of their biochemical composition, viscera could be the basis of marine autolysates to be used in aquaculture diets supplementation. Silage is described as a liquid product made only from animal. Liquefaction is caused by the action of enzymes already present in the animal, and is accelerated by the acid, which in addition to creating the right conditions for the enzymes to work, helps to break down bone and limits the growth of spoilage bacteria (Tatterson and Windsor, 1974). Temperature at which silage is

processed may affected the nutritional value of the resultant meal, mainly due to differences in protein digestibility (Pike *et al.*, 1990). In this way, higher was the temperature of fabrication of silage higher was the quantity of peptides compared with protein composition of silage.

Because there is no formulated diet suitable for marine larvae and juvenile, they are fed live preys. Then, rearing marine larvae and juvenile represents high cost that limits the development of marine aquaculture. In this way, cuttlefish eat mainly live preys as crustaceans and fish but only sub-adults and adults can be reared easily with inert food (Castro *et al.*, 1993). During post-hatch development, they exclusively hunt small crustaceans as young shrimp (Koueta *et al.*, 2002). This is the main problem to succeed in rearing juvenile cuttlefish for aquaculture. Many attempts have been made to rear juvenile cuttlefish with alternative diets, but young animals in these trials were fragile and their growth rate was low (Castro, 1991). Nevertheless, Perrin *et al.* (2004) have shown encouraging results in rearing juvenile cuttlefish with enriched frozen shrimps from 10-days-old. Over the last two decades, several studies have been conducted to determine the nutritional requirements of marine larvae and juveniles (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Perrin *et al.*, 2004). As demonstrated by Zambonino-Infante *et al.* (1997) in sea bass larvae, the molecular size of the dietary protein fraction could play a major role in larval and juvenile development. Protein hydrolysates are potential ingredients that are used in aquaculture mainly as protein supplements, attractants and palatability enhancers (Hardy, 1991). The high concentration of free amino acid in silage permitted to us it as a food additive in aquaculture (Viana *et al.*, 1996).

## **B. Material and methods**

### **1. Enrichment characteristic and prey enrichment**

In this paper, our viscera silages made at two different temperatures were investigated in enrichment of juvenile cuttlefish diet. Tableau 11 describes our two silages.

Tableau 11- Short presentation of the silages used in this study.

Commercial name	Raw material	Manufacturer	Presentation (aspect)	Temperature of fabrication	Peptides content (<6.5 kDa)
LBBMA4	Marine viscera	LBBM	Powder	4°C	81%
LBBMA25	Marine viscera	LBBM	Powder	25°C	89%

The *Crangon crangon* shrimp were captured at Luc sur Mer (France) and placed in tank (90 litres). Shrimp were feed with mashed shrimp. In this way, fresh shrimp surimi was soaked for 24 h at 4°C for control diet and for 24 h at 4°C in silage (500 mg powder / 2 g surimi) for test diet. Surimi was then distributed to young *C. crangon* at rate of 5 g of surimi for 10 g of the live prey (Koueta 2002). After their feeding, shrimp were weighted and frozen.

## **2. Rearing**

The rearing took place in the marine station in Luc sur Mer (France) in the structure described by Koueta & Boucaud-Camou (1999). At the hatching, juvenile cuttlefish were placed individually in small tanks, which were separated in 4 compartments by a transparent surface. A total of 60 juvenile cuttlefish, hatching the same day, were divided in 3 groups of 20 animals housed and fed separately and reared in the same conditions. Each tank contained four animals separated by a thick partition, animals housed and fed separately with the same quantity of food for each treatment and reared in the same conditions.

The 60 cuttlefish were fed *ad libitum* with simple live shrimps (*Crangon crangon*) during the first 5 days. After 5 days, the first group received simple frozen shrimps, the second group received frozen shrimps enriched with LBBMA4 and the third group received frozen shrimps enriched with LBBMA25 (*ad libitum*). At 40-days-old, 8 hours after giving the diet, cuttlefish were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until enzymatic analysis.

## **3. Growth parameters**

The amount of food ingested by the animals in each container was measured by weighting the food remaining in the individual tanks each day. Weight (mg) was estimated each 5 days. Food conversion efficiency (%) was calculated as (growth weight/ weight of food ingested)\*100.

## **4. Assays**

### **a. Extraction**

The tissue were disrupted in a potter in 2.5 vol. of the extraction buffer which corresponded to 1 % KCl containing 1 mM of EDTA for acid proteases assays (e.g. Le Bihan *et al.* 2004). The homogenate was centrifuged for 60 minutes at 10000 g at 4°C. The supernatant liquid was used for the assays. The tissue were disrupted in a potter in extraction buffer (1 ml of buffer per 60 mg of sample) containing: 0.09 M TRIS-base, 0.08 M boric acid, 3 mM EDTA, 0,5 mM mercapto-ethanol, glycerol 10 %, pH 8,3 (e.g. Koueta 1983) for the alkaline proteases and amylase assays. Then, the crude extract was centrifuged 30 minutes at 10000 g at 4°C. The supernatant liquid was used for assays.



**b. Enzymatic assays**

Total acid and alkaline proteases were measured according to Charney & Tomarelli (1947). Substrate was casein Yellow 0,005 % in a phosphate buffer (0,096 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,004 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 2 for the acid proteases and pH 10 for alkaline proteases. 0.5 ml was used for each 0,1 ml of supernatant. The incubation was carried out for 1 hour at 37°C and the intensity of the yellow coloration was estimated at 442 nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one unit is the variation of one unit of O.D.

The technical used for the amylase assay was described by SIGMA-ALDRICH using the starch as substrate. The substrate buffer contain starch at 1% in a monobasic phosphate buffer at 20 mM and 6.7 mM of sodium chloride, pH 6.9. We add 100 µl of substrate buffer at 100 µl of extract. The incubation was 3 minutes at 20°C. After that, 100 µl of revelator was add and incubating 15minutes in boiling water. The revelator corresponds to tartrate sodium potassium 0.94 M, NaOH 0.4 M and 3-5-dinitrosalicilic acid 48 mM. The absorbance was recorded at 640 nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein).

Lipases activity was assayed according with Mckellar & Cholette (1986). Substrate was β-naphtyl caprylate 200 mM in DMSO. Sodium taurocholate 200mM (50µl), BES 50mM pH7.2 (450µl), substrate (5µl) and supernatant (100µl) were mixed and incubated 30 minutes at 40°C. After the incubation, 5µl of Fast BB salt 100mM in DMSO was added. The incubation was carried out during 5 minutes at 40°C. Finally, 50µl of TCA 0.72N and 675µl of a solution ethanol 95%/ ethylacetate (v/v) was added. The intensity of coloration was estimated at 540 nm. Enzyme activity was expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one unit is the variation of one unit of O.D.

**c. Molecular weight of proteins and peptides**

Molecular weight of proteins and peptides contained by shrimps or silages was determined using gel filtration. Dry tissue was added to Tris buffer containing 10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl, pH 8 (0.1 g to 10 ml). The mixture was stored at 4°C for 1 hour, then centrifuged for 10 minutes at 4°C at 10 000g. The supernatant contains the Tris soluble proteins. The protein content was assayed according to the Lowry method (1951) using BSA as standard. The protein concentration in the supernatant was then adjusted at 10 mg/ml. The molecular weight of the extract obtained was estimated using a Sephadex column (Pharmacia PD 10 Sephadex), which had been calibrating with the following molecular weight standards: β-amylase (200,000), alcohol deshydrogenase (150,000), albumine (66,000), carbonic anhydrase (29,000), vitamin B12 (1,350). The amount of protein in the different fractions (500 µl) was appreciated by the

absorbance at 280 nm. Results were used to calculate proportion of peptides contained in each assay. Proportion of peptides (%) was calculated as  $(\text{area of peak 2} / (\text{area of peak 1} + \text{area of peak 2})) * 100$ .

d. Protein contents

The proteins content in each extract was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as the standard.

e. Prey composition

Frozen shrimps from the 3 groups (100 g) were freeze-dried and transform in powder using ball grinder. Total proteins contained on freeze-dried shrimps was determined using Lowry method (1951). Ten ml of NaOH 1M was added at powder of freeze-dried shrimps (10 mg). After vortexing, the solution was stocked for 12 hours at room temperature. A solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% in NaOH 0.1M (100 ml) was added to solutions of CuSO<sub>4</sub> 0.5% (1ml) and tartrate sodium potassium 1% (1 ml). Later than, 0.5 ml of sample was added at 0.5 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M and 5 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. The incubation takes place at room temperature during 10 minutes. Past, 0.5 ml of Folin-Cioacalteu solution 0.5M was additional at the solution. After vortexing, the incubation takes place at room temperature during 1h30. The intensity of coloration was estimated at 750 nm.

Total carbohydrates contained on freeze-dried shrimps was extracting using Staats *et al.* method (1999) and assayed according to Dubois *et al.* (1956). Dry tissue (500 mg) was added to distilled water (5 ml). Assays were placed at 35°C during one hour, after that, assays were centrifuged 10 minutes at 3000 g. Two ml of supernatant was take and added at 8 ml of absolute ethanol. Assays were placed during 16 hours at -20°C and centrifuged 30 minutes at 4000 g at 10°C. The supernatant contains low molecular weight carbohydrates and pellets contain high molecular weight carbohydrates. Ethanol contains on pellets and supernatant was evaporated at 60°C. Added 1 ml of distilled water on dry pellets obtained. Assayed of carbohydrates was made adding 1 ml of phenol solution at 5% and 5 ml of sulfuric acid 96 %. The incubation takes place at room temperature during 30 minutes using glucose as standard. Intensity of coloration was estimated at 485 nm.

Total lipids contained on freeze-dried shrimps was extracting using Bligh & Dyer method (1959) and assayed according to Marsh & Weinstein (1959). Dry tissue (10 mg) was added to 1 ml of chloroform and 2 ml of methanol. Assays were centrifuged 10 minutes at 4000 g. Supernatant was take and 1 ml of chloroform and 2 ml of methanol were added to pellets. Assays were centrifuged 10 minutes at 4000 g. All supernatant were take and 4 ml of distilled water

were added. Assays were centrifuged 10 minutes at 4000 g. Lipids were contained in the lower phase. Chloroform contains was evaporated at 60°C. Added 10 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on dry pellets obtained. The incubation takes place at 200°C during 20 minutes using tripalmitate as standard. Intensity of coloration was estimated at 360 nm.

### **5. Statistical analysis**

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation (n=10). Data were compared with an ANOVA followed by a Tukey's test when significant differences (p<0.05) were found (Sokal and Rohlf, 1981).

## **C. Results**

### **1. Molecular weight of proteins on silage**

The peak, which contains proteins of molecular weight higher at 20 kDa, represents 19 or 11%, respectively in the LBBMA4 and LBBMA25, whereas the second peak (proteins >6.5 KDa) represents 81 or 89% respectively (Figure 48).

### **2. Growth parameter**

The survival was 100% in all three groups during the experimental rearing. The cuttlefish weight significantly increased (p<0.05) in comparison 0 to 40 days in the all groups (Figure 49). The cuttlefish, which received enriched food have significant higher weight (p<0.05) at 10, 35, 40-days-old. The conversion rate was significantly higher (p<0.05) in the groups fed with enriched diet at 10 and 35-days-old than in the control (Figure 49).

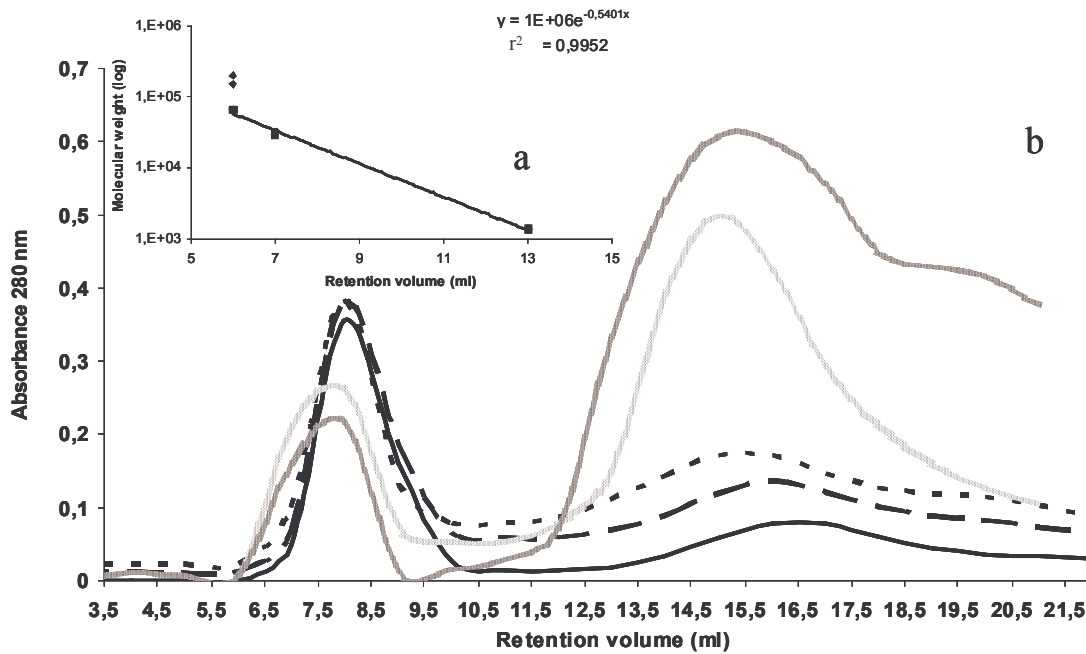


Figure 48- Calibration graph of molecular weight for Pharmacia G25M PD 10 Sephadex. b) Shrimps proteins molecular weight repartition using gel filtration. - - : Simple frozen shrimps, — — :Frozen shrimps enriched with LBBMA4, . . . : Frozen shrimps enriched with silage LBBMA25, “clear grey bar”: LBBMA4, “dark grey bar” :LBBMA25.

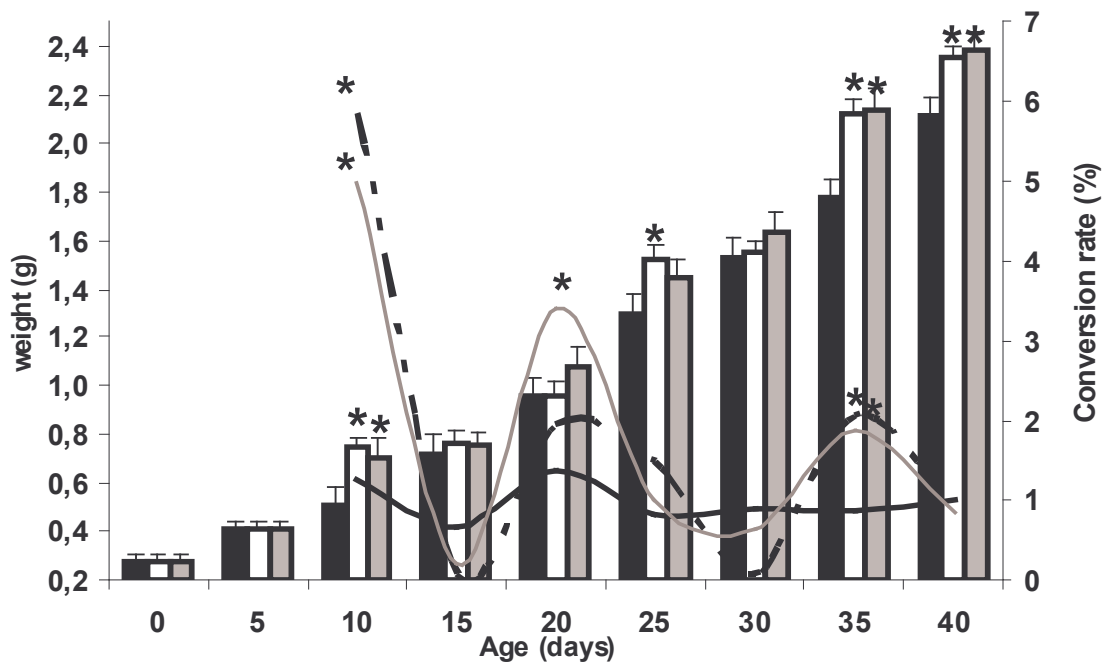


Figure 49- Weight (g) and conversion rate (%) of cuttlefish according to their diets. Weight of cuttlefish fed with simple fed: “white bar”, with fed enriched with LBBMA4: “clear grey bar”, with fed enriched with LBBMA25: “dark grey bar”. — — : Ration of cuttlefish fed with simple fed, . . . : with fed enriched with LBBMA4, - - - : with fed enriched with LBBMA25. \*: Significantly different from control (p < 0.05).

### 3. Enzymatic activity

Specific total proteolytic acid activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) in cuttlefish fed with shrimp enriched with LBBMA25 (Tableau 12). Specific total proteolytic alkaline activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) in cuttlefish fed with shrimp enriched with LBBMA25 (Tableau 12). Specific lipases activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) in cuttlefish fed with shrimp enriched with LBBMA4 (Tableau 12). Specific amylase activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) in cuttlefish fed with enriched shrimp (Tableau 12).

Tableau 12- Specific activity (Unity/mg of proteins) of digestive enzymes of cuttlefish according to their diets.

	Cuttlefish fed with simple shrimp:	Cuttlefish fed shrimps enriched with LBBMA4:	Cuttlefish fed shrimps enriched with LBBMA25:
Specific activity of total acid proteolytic enzymes:	$4.58.10^{-5} \pm 2.63.10^{-6}$	$3.97.10^{-5} \pm 2.1.10^{-6}$	$5.5.10^{-5} \pm 2.67.10^{-6}+$
Specific activity of total alkaline proteolytic enzymes:	$3.42.10^{-5} \pm 2.24.10^{-6}$	$3.8.10^{-5} \pm 2.27.10^{-6}$	$4.17.10^{-5} \pm 2.2.10^{-6}+$
Specific activity of lipases:	$2.10^{-4} \pm 8.81.10^{-6}$	$2.17.10^{-4} \pm 7.10^{-6}$	$1.9.10^{-4} \pm 8.01.10^{-6}$
Specific activity of amylase:	$7.99.10^{-6} \pm 2.9.10^{-6}$	$7.14.10^{-5} \pm 2.8.10^{-6} -$	$5.53.10^{-5} \pm 2.49.10^{-6} -$

+: Significant increase from cuttlefish fed with simple shrimp ( $p < 0.05$ ).

-: Significant decrease cuttlefish fed with simple shrimp ( $p < 0.05$ ).

### 4. Preys composition

The amount of total proteins in g/ 100g of dry weight was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in enriched shrimp in comparison non-enriched shrimp (Tableau 13). The amount of total carbohydrates in g/ 100g of dry weight was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in enriched shrimp in comparison non-enriched shrimp (Tableau 13). HMW (high molecular weight) carbohydrates in  $\mu\text{g/g}$  of dry weight was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in shrimp enriched with LBBMA4 in comparison non-enriched shrimp. Moreover, LMW (low molecular weight) carbohydrates in  $\mu\text{g/g}$  of dry weight was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in shrimp enriched with LBBMA4 and higher in shrimp enriched with LBBMA25 in comparison non enriched shrimp. The amount of total lipids in g/ 100g of dry weight was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in enriched shrimp in comparison non-enriched shrimp (Tableau 13). The quantity of proteins, which have a molecular weight higher at 20 kDa contained by shrimps was not significantly influenced by enrichment (Figure 48). On the contrary, shrimps contains of peptides ( $> 6.5$  kDa) was directly influenced by the amounts of peptides of enrichment. In this way, shrimps received the LBBMA25 contains

significantly ( $p < 0.05$ ) more peptides than shrimps received the LBBMA4, which contains significantly ( $p < 0.05$ ) more peptides than control shrimps.

Tableau 13- Shrimps composition on HMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$  of dry weight), LMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$  of dry weight), total carbohydrates (g/100g of dry weight) proteins (g/100g of dry weight) and lipids (mg/g of dry weight)

	Total proteins (g/100g of dry weight):	HMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$ of dry weight):	LMW carbohydrates ( $\mu\text{g/g}$ of dry weight):	Total carbohydrates (g/100g of dry weight):	Total lipids (g/100g of dry weight):	Peptides ( $>6.5$ kDa):
Frozen simple shrimps:	$28.80 \pm 0.123$	$61328.6 \pm 311.72$	$79624.7 \pm 108$	$14.095 \pm 0.325$	$9.588 \pm 1.2$	27,8 %
Frozen shrimps enriched with LBBMA4:	$18.31 \pm 0.13$ -	$82552.1 \pm 121.29$ +	$69671.6 \pm 6.9$ -	$15.222 \pm 0.127$ +	$6.8498 \pm 0.8$ -	35,2 % <sup>+</sup>
Frozen shrimps enriched with LBBMA25:	$25.54 \pm 0.0986$ -	$64548.7 \pm 356.33$	$84601.3 \pm 131$ +	$14.915 \pm 0.23$ +	$8.3184 \pm 0.5$ -	41,5 % <sup>+</sup>

+ : Significant increase from control shrimps ( $p < 0.05$ ).

- : Significant decrease control shrimps ( $p < 0.05$ ).

## **D. Discussion**

From a metabolic point of view, one of the most apparent differences in comparison cephalopods and other marine organisms is a high-protein content (75-85% of dry weight) due to the predominance of their amino acid metabolism (Villanueva *et al.*, 2002). Artificial diets based on less expensive protein sources are becoming increasingly important as an alternative to live feeds in the aquaculture industry (Coutteau *et al.*, 1997). In this way, silage has proved to be a good protein source for sea-farmed fish (Raa and Gildberg, 1982). In our silages, there are more of 81% of proteins in LBBMA4, which have molecular weight lower at 6.5 KDa, whereas there are 89% in LBBMA25. Silages obtained contain principally peptides, which can possess actives properties and amino acids, which can be ingested rapidly by juvenile animal in rearing.

Nobody have rearing juvenile cuttlefish with alternative diet before this experiment, from 5-days-old with so good survival (100%). The weight highly increased to 40-days old. In this way, cuttlefish, which received simple frozen preys, have a weight of 2.11g, cuttlefish receiving frozen enriched shrimp with LBBMA have a weight of 2.35g (+11.37% to control cuttlefish) and cuttlefish, which received frozen enriched shrimp with LBBMA25 have a weight of 2.38g (+

12.8% to control cuttlefish) after 40 days of rearing. Next, enrichments permit juvenile cuttlefish to have better growth weight. The conversion rate was better for the cuttlefish fed with enriched frozen preys at 10, 20, 25 and 35-days-old. This higher food conversion rate shows that the methodology of enrichment of the prey with silages was effective. The animal fed with enriched diet refused excess food as previously observed by Richard (1975) and Koueta *et al.* 2002 in experimental rearing. Other studies showed the same phenomena in *Haliotis fulgens* where the addition of viscera silage on diet permitted to induce higher growth rates compared with natural food (Viana *et al.*, 1996). Moreover, Oliva-Telez *et al.* (1999) showed that the effect of silage processing temperature on fish performance is more or less pronounced, depending on the species considered. In Atlantic salmon *Salmo salar* (Pike *et al.*, 1990) diets including silage processed at low temperatures supported higher growth rates, while in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pike *et al.*, 1990) and in cuttlefish differences were not as pronounced as in salmon. Nevertheless, according to the high difficulty to feed juvenile cuttlefish with artificial diet, we used enriched frozen shrimps alternative diet. Therefore, the impact of silages supplementation on juvenile cuttlefish was made using indirect enrichment. Preys composition shows that enrichment implied an increased of total carbohydrates and peptides. On the contrary, total proteins and lipids decreased with the enrichment of shrimps. Ours results show despite of the decrease of total proteins content on enriched shrimps, the quantity of peptides increased according with the peptides content of silages. Even an indirect enrichment, we have success to obtain alternative diet enriched on peptides and free amino acids. Nevertheless, shrimp composition was not adjustable indefinitely. Thus, since shrimp metabolism is based on carbohydrates, protein enrichment induces after metabolization an increase of carbohydrate content. We only success to obtain alternative diet enriched on peptides and free amino acids. This limitation can explain the fact that is not differences observed in comparison cuttlefish fed with shrimp enriched with LBBMA4 or LBBMA25. We can imagine that the utilization of indirect enrichment limit the effect of silage. In future experiment, we have to test the impact of silages using direct enrichment.

At 40-days-old, digestive system of cuttlefish was similar at adult system (Boucaud-Camou, 1973; Perrin *et al.*, 2004). Then, all differences observed in specific digestive enzymes activities are correlated to cuttlefish diet. Our results show that total acid proteolytic activity was stimulated by the containing of shrimps fed with LBBMA25. Moreover, total alkaline proteolytic activity stimulation by the containing of shrimps fed with enrichment was correlated with shrimp quantity of peptides. So, higher peptides composition of enriched shrimps improved higher

proteolytic enzymes stimulation. Furthermore, the containing of shrimps carbohydrates quantity inhibited amylase activity.

The utilization of silage as enrichment of juvenile cuttlefish shows very interesting results. Thus, it permits to reduce ration, to increase weight and to ameliorate the food conversion rate. Several factors can be at the origin of this phenomenon. Enrichment improves higher quantity of peptides and carbohydrates in shrimps as observed by Perrin (2004). Then, autolysate from viscera can be use as enrichment in cuttlefish rearing.

## **E. Conclusion**

The use of dried fish protein hydrolysate in diets has been shown to improve growth and feed utilization of salmonids as *Salmo salar* (Berge and Storebakken, 1996) and carp larvae *Cyprinus carpio* (Carvalho *et al.*, 1997). This positive effect can be attributed to increased digestibility of the diet due to the enzymatic treatment; free amino acids released in the process might also act as attractants, increasing feed intake and growth (Berge and Storebakken, 1996; Oliva-Telez *et al.*, 1999). In this way, incorporation of a protein hydrolysate in diet has a beneficial effect on larvae development as in *Carassius auratus* or *Dicentrarchus labrax* (Szlaminska *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997). The digestive system of juvenile cuttlefish only becomes mature 30 days after hatching (Boucaud-Camou, 1973; Perrin *et al.*, 2004). During this maturation period, important changes occur. Therefore supplementing the diet contributed to healthy and rapid growth and higher survival rate.

Autolysate is used as a food for farmed fish (Haaland and Njaa, 1989). The nutritional quality of the silage may depend on the degree of autolysis and the products formed. Haaland & Njaa (1989) showed that the temperature influence both on the degree of autolysis reached after storage and on the degree of hydrolysis of the amide groups. Moreover, the undissolved fraction, which always remains in autolysate, was smaller in the autolysate stored at high temperatures than in the autolysate at 2°C (Haaland and Njaa, 1989). The liquefaction of silages is markedly favoured at acid pH values and at temperatures above room temperature (Raa and Gildberg, 1976). The process of ensilage is very simple and the capital cost of equipment can be low. The basic equipment could consist of a grinder, a means of adding the acid, an acid-resistant storage tank, a means of stirring the silage and containers to distribute the (Tatterson and Windsor, 1974). Then, our experimentally silage fabrication can be easily applied industrially to produce protein concentrate from viscera.



**Acknowledgments:**

This work was supported the IFOP. This study was conducted in CREC (Centre de Recherches en Environnement Côtier) at Luc sur Mer, Normandie, France. We are grateful to the cooperative Granvilmer for providing the biological materiel used in this study and to Aline Coulon, Aurélie Moncuit, Agnes Meslon, Helene Viala, Georges Safi and Line-Alexandra Gabault for their help on cuttlefish rearing. We want to thank Dr. Beatriz Roel for his help in English editing.

La Figure 50 montre les structures et bacs d'élevage des juvéniles de seiches en conditions contrôlées et standardisées.



Figure 50 : Structures d'élevage des juvéniles de seiches du CREC de Luc sur Mer.

La Figure 51 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.



Figure 51 : Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'utilisation des ensilages de viscères de seiches en enrichissement de l'alimentation de juvéniles de seiches *Sepia officinalis*.

### III Crustacés

#### Résumé :

L'effet de la substitution d'une partie de la base alimentaire chez la crevette *Penaeus japonicus* par une quantité équivalente en ensilage (LBBMA4 ou LBBMA25) a été étudié. L'élevage s'est déroulée pendant 60 jours. Au cours des 30 premiers jours, plusieurs lots reçoivent un aliment enrichi en ensilage. Entre le 30<sup>ème</sup> et le 60<sup>ème</sup> jour d'élevage, toutes les crevettes reçoivent un aliment classique non enrichi. Les aliments qui contiennent un enrichissement en ensilage de viscères de seiche entraînent une augmentation significative de la croissance et de la survie en comparaison avec l'aliment témoin.

De plus, une croissance optimale est observée pour une supplémentation en ensilage de 2%. De cette manière, un effet/dose est observé pour les 2 ensilages testés. Cet effet a une corrélation positive entre 0 et 2% d'enrichissement et négative entre 2 et 10%.

Après 25 jours d'élevage, le pourcentage de poids entre les animaux qui reçoivent un aliment enrichi en ensilage de seiche et les animaux témoins se stabilise. De plus, l'arrêt de l'enrichissement n'entraîne pas de chute de l'avantage pris par les post-larves recevant un aliment enrichi. Ce phénomène démontre qu'un enrichissement de l'alimentation des post-larves de crevettes pendant 25 jours est suffisant pour optimiser et maintenir la croissance des crevettes.

Le principal problème rencontré dans la crevetticulture est de trouver un aliment artificiel peu coûteux. Celui-ci doit permettre d'assurer une croissance rapide et une bonne survie aux crevettes depuis les post-larves jusqu'à la taille commerciale (Pillay and Dill, 1979). Le taux de croissance des crevettes pénéides est étroitement lié à la qualité de leur aliment, en particulier à la source protéique (Cruz-Suarez *et al.*, 1992). En dépit des nombreuses avancées concernant les besoins en macronutriments et micronutriments des crevettes pénéides, il est fortement recommandé d'inclure des protéines d'invertébrés marins (mollusques, crustacés) dans l'alimentation des crevettes (Cruz and Guillaume, 1983; Cruz-Ricque *et al.*, 1987; Cruz-Ricque *et al.*, 1989; Cruz-Suarez *et al.*, 1992; Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002; Williams *et al.*, 2005).

L'élevage des post-larves de crevettes est difficile en raison de la forte mortalité observée à ce stade. De plus, il correspond à une phase critique du développement du système digestif. Les taux de survie obtenus dans cette expérimentation excèdent toujours 82%. Les conditions d'élevage utilisées répondent bien aux besoins des post-larves de crevettes. En outre, l'utilisation d'aliment enrichi en ensilage de mollusque a permis d'augmenter la survie des post-larves.

Dans cet élevage, des ensilages de viscères de seiche, particulièrement riche en peptides, acides aminés et acides gras poly-insaturés sont ajoutés dans l'alimentation de post-larves de crevettes. La réponse des post-larves en terme de poids est plus ou moins rapide ou importante en fonction de l'ensilage (LBBMA4 ou LBBMA25) et du pourcentage d'enrichissement utilisé. Pour les ensilages LBBMA4 et LBBMA25, un enrichissement à hauteur de 2% permet d'obtenir les meilleures performances de croissance.

L'utilisation des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 en tant que complément alimentaire dans l'élevage de post-larves de crevettes permet de diminuer la période critique et d'obtenir ainsi des juvéniles plus rapidement. Le gain de poids obtenu par les crevettes recevant un aliment enrichi est particulièrement important (178% pour l'ensilage LBMA25 ajouté à 2%) et pourra permettre d'obtenir des animaux de taille commerciale plus rapidement comme démontré dans notre expérimentation.

## Effects of artificial diet containing silage on survival and growth in experimental rearing of post-larvae shrimp *Penaeus japonicus*

*E. Le Bihan, J. P. Gimazane, J. M. Lebel and N. Koueta*

*Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France*

*Corresponding authors: Estelle Le Bihan: tel.: (33) 231565295; fax: (33) 231565346; estlebihan@yahoo.fr*

### **Abstract:**

The effect of incorporation of two molluscan viscera silages made at 4°C (LBBMA4) or made at 25°C (LBBMA25) by substitution of an equivalent amount of the basal mixture was studied during 30 days in terms of growth performance and survival in post-larvae shrimp (*Penaeus japonicus*). After 30 days of rearing, all post-larvae were fed with control diet (diet A) until 60 days. Diet containing molluscan viscera silage significantly increased growth and survival compared to control diet, which corresponded to the composition of commercial pellets for post-larvae or juvenile. Moreover, optimal growth was obtained for a 2% silage supplementation in diet. In this way, we can observe a dose/effect for silage tested. This effect had positive correlation between 0 to 2% and negative correlation between 2 to 10%. After 25 days of diet enrichment with silage, we observed a stabilization in term of percentage of weight between enriched shrimp and control group. This phenomenon shows that 25 days of shrimp diet enrichment was sufficient to optimised and maintained growth advantage take by enriched shrimp.

Keywords: Diet, Growth, *Penaeus japonicus*, Rearing, Silage, Waste factories

### **A. Introduction**

The shrimp production was 1 087 111 tonnes in 2000, which represents 26.1% of aquaculture world production (Basuyaux, 2006). This shrimp aquaculture was dominated by three main species *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis* and *Penaeus vannamei*, which represents 86% of the total production (FAO, 2003). Moreover, the penaeid shrimp, *Penaeus japonicus*, was the subject of various studies in the world, especially in Asia, because of the development of numerous shrimp farms (Basuyaux, 2006). The current trend in shrimp farming is towards increased intensification of culture systems. Success of this type of culture is highly dependent on the availability of well balanced, nutritionally complete and cost-effective

formulated feeds (Bautista-Teruel *et al.*, 2003). One of main problem in intensive shrimp culture is to find an inexpensive artificial diet, which ensures rapid growth of shrimps from post-larvae to commercial size with good survival (Pillay and Dill, 1979). Improving productivity without adding to the cost is the goal of any business and none more so than shrimp farming. With feed and feeding being the principal cost components of intensive shrimp production, it is not surprising that research is still to focus on how feeds can be better formulated and closely match the animal nutritional requirements, to deliver maximal growth by stimulating high feed intake and to improve efficiency (Williams *et al.*, 2005).

Moreover, growth rate of penaeid shrimps is closely related to the quality of the diet, mainly the protein source (Cruz-Suarez *et al.*, 1992). Despite numerous advances concerning the nutritional requirements in macronutrients (protein, carbohydrate and lipid) and micronutrients (vitamins, essential fatty acids and carotenoids) of penaeid shrimps, there are still a certain amount of questions about certain types of ingredients needed to produce high performance shrimp feed (Williams *et al.*, 2005). For example, a strong advocacy exists for including some marine invertebrate constituent such as cephalopod, molluscan or crustacean meal in shrimp feed formulations (Cruz and Guillaume, 1983; Cruz-Ricque *et al.*, 1987; Cruz-Ricque *et al.*, 1989; Cruz-Suarez *et al.*, 1992; Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002; Williams *et al.*, 2005).

Nutritional value of this feedstuff is variable, depending on factors such as kind of animal species, whole or offal tissue, freshness of the raw material used and conditions of processing (Pike *et al.*, 1990). Protein hydrolysates and autolysates are potential feed ingredients used in aquaculture feeds mainly as protein supplements, attractants and palatability enhancers (Hardy, 1991). The use of dried fish protein autolysates or hydrolysates in diet has been shown to improve growth and feed utilization of salmonids (Jackson *et al.*, 1984; Stone *et al.*, 1989; Berge and Storebakken, 1996), abalone (Viana *et al.*, 1996) and carp larvae (Carvalho *et al.*, 1997). This positive effect may be due to an increased digestibility of the lysate due to lysis (Oliva-Telez *et al.*, 1999). The processing of meal temperature may affect the nutritional value of resultant meal, mainly due to differences in protein digestibility (Pike *et al.*, 1990; Akness and Mundheim, 1997; Oliva-Telez *et al.*, 1999).

The aim of this trial was to compare growth and feed utilization of post-larvae shrimps fed with basal mixture enriched with different molluscan viscera silages (made at 4°C or 25°C).

## **B. Materials and methods**

### **1. Biological material**

Post-larvae shrimps *Penaeus japonicus* (10 mg weight per animal) were obtained from a commercial hatchery and held under quarantine conditions for 1 week. During this holding period, shrimps were maintained on a commercial feed corresponding to the basal diet. Shrimps were then hand sorted and separated in 9 groups of 200 animals in each tank. This experiment was carried out at the CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) at Luc sur Mer (France).

### **2. Rearing method**

During 8-weeks, feeding trial was conducted to determine the nutritional value of two alimentary ingredients on growth and survival of *Penaeus japonicus* post-larvae. The alimentary ingredients tested were viscera silages developed in our laboratory. Each dietary treatment consisted of two replicate groups of shrimps (200 shrimps per tank; mean weight  $\pm$  S. D., 10 mg  $\pm$  0.05 mg) maintained in a common open system. Each tank contained 90 liters of filtered seawater, supplemental aeration, heating resistance, natural photoperiod. During the trial the temperature was maintained at 25°C and salinity at an average value of 35‰. Dietary treatments were randomly assigned and shrimps were weighed every five days. Water quality was maintained by filtration of seawater, removal of settled solids, and open system seawater. Total ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen concentrations and pH were measured twice weekly.

### **3. Diet**

Composition of the two molluscan silages is presented in Tableau 14. A practical basal diet containing all necessary ingredients for shrimp diet was used. The test diets were then developed based on the replacement of basal diet by an equal silage basis. After processing, the dry ingredients were mixed in a food mixer for 5 minutes. Shrimps were fed according to a fixed feeding rate (50% of shrimp weight), which was adjusted for expected growth and observed mortalities. During 30 days, the nine groups received respectively the diet A (corresponding to the control diet), 4-1, 4-2, 4-5, 4-10, 25-1, 25-2, 25-5 and 25-10 (Tableau 15). During the trial, the shrimp were weighted and counted every five days. Between 30 and 60 days, all animals were fed with diet A.



Tableau 14: Presentation of the silages used in this study.

Commercial name	Raw material	Manufacturer	Presentation (aspect)	Temperature of fabrication	Peptides content <6.5 kDa (% of total proteins)	Amino acids (mg/ g dry weight)	ω3 (% of total fatty acids)	ω6 (% of total fatty acids)
LBBMA4	Molluscan marine viscera	LBBM	Powder	4°C	81	240	36.1	6.1
LBBMA25	Molluscan marine viscera	LBBM	Powder	25°C	89	328	38.5	6

Tableau 15: Composition of the nine compound diets (%).

Ingredients (%):	Diet A:	Diet 4-1:	Diet 4-2:	Diet 4-5:	Diet 4-10:	Diet 25-1:	Diet 25-2:	Diet 25-5:	Diet 25-10:
LBBMA4	-	1	2	5	10	-	-	-	-
LBBMA25	-	-	-	-	-	1	2	5	10
Crude proteins (%):	52	51.48	50.96	49.4	46.8	51.48	50.96	49.4	46.8
Crude oil (%):	15	14.85	14.7	14.25	13.5	14.85	14.7	14.25	13.5
Crude ash (%):	10.1	9.999	9.89	9.59	9.09	9.999	9.89	9.59	9.09
Crude cellulose (%):	0.4	0.396	0.392	0.38	0.36	0.396	0.392	0.38	0.36
Total phosphore (%):	1.62	1.6	1.58	1.539	1.458	1.6	1.58	1.539	1.458
Methionine and cystein (%):	2.3	2.28	2.25	2.185	2.07	2.28	2.25	2.185	2.07
Copper (mg/ kg):	3	2.97	2.94	2.85	2,7	2.97	2.94	2.85	2,7
Vitamin A (I.U./ kg):	20500	20500	20500	20500	20500	20500	20500	20500	20500
Vitamin D3 (I.U./ kg):	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Vitamin E (mg/ kg):	240	240	240	240	240	240	240	240	240

#### 4. Statistical analysis

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation (n=30). Data were compared with an ANOVA followed by a Tukey's test when significant differences ( $p < 0.05$ ) were found (Sokal and Rohlf, 1981).

### C.Results

A higher content in peptides, amino acids and poly-unsaturated fatty acids was observed in the two silages used in our rearing experiment (Tableau 14). These two products came from the

same species viscera, but autolysis occurred at different temperatures: 4 or 25°C. Temperature of autolysis implied different degrees of lysis, then silage made at 25°C contained more peptides and amino acids than silage made at 4°C. Moreover, the autolysis at 25°C permitted to obtain a silage containing more poly-unsaturated fatty acids, in particular in  $\omega$  3 fatty acids, than at lower temperature of autolysis.

After 10 days of rearing, the survival was significantly higher ( $p < 0.05$ ) for the shrimps fed with diet 4-1, 25-1, 25-2 and 25-10 compared to the control shrimps feed with diet A (Tableau 16). Later than 15 days, animals fed with the diet 4-10 and 25-5 had a significantly higher survival ( $p < 0.05$ ) than post-larvae receiving the diet A. Since the 20<sup>th</sup> days of rearing, the survival was significantly better ( $p < 0.05$ ) for the shrimps receiving diet 4-5 compared to the shrimps fed with diet A. Past 25 days, animals fed with the diet 4-5 have significant higher survival ( $p < 0.05$ ) than post-larvae receiving the diet A. Then, after 60 days of rearing, the diet A implied significant lower ( $p < 0.05$ ) survival than enriched diet. The better survival was observed for diet 25-2.

Tableau 16: Survival of shrimp post- larvae according to their diet (%).\*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).

	0	5	10	15	20	25	30	60
Diet A	100	96±0.39	92±0.28	89±0.23	87±0.17	84±0.10	82±0.05	82±0.05
Diet 4-1	100	99±0.48	98±0.97*	96±0.92*	96±0.92*	95±0.35*	94±0.84*	94±0.84*
Diet 4-2	100	94±0.87	91±0.79	91±0.28	91±0.28	91±0.28*	91±0.28*	91±0.28*
Diet 4-5	100	96±0.41	94±0.35	93±0.84	92±0.82*	92±0.30*	91±0.28*	91±0.28*
Diet 4-10	100	99±0.48	96±0.38	96±0.38*	96±0.38*	96±0.38*	95±0.87*	95±0.87*
Diet 25-1	100	98±0.97	98±0.46*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*
Diet 25-2	100	100±0.58	99±0.97*	98±0.43*	97±0.92*	97±0.92*	97±0.92*	97±0.92*
Diet 25-5	100	98±0.97	96±0.41	94±0.84*	93±0.82*	93±0.30*	92±0.79*	92±0.79*
Diet 25-10	100	97±0.94	97±0.43*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*	96±0.41*

Figure 52 shows weight of post larvae during 60 days of rearing. At 10 days of rearing, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between control group and post-larvae receiving diet 4-5 or 25-2. After 15 days of rearing, the growth was significantly higher ( $p < 0.05$ ) for the shrimp of all groups receiving diet enriched with silage LBBMA4 compared to the shrimps of

control group. Enrichment 25-2, significantly improve the gain of weight ( $p < 0.05$ ) compared to diet A between 10 days of rearing to the end of experiment. Diet 25-5 and 25-1 significantly increased weight ( $p < 0.05$ ) compared to the control diet, after 30 days of rearing. Nevertheless, diet 25-10 didn't implied significant higher growth after 30 days of rearing.

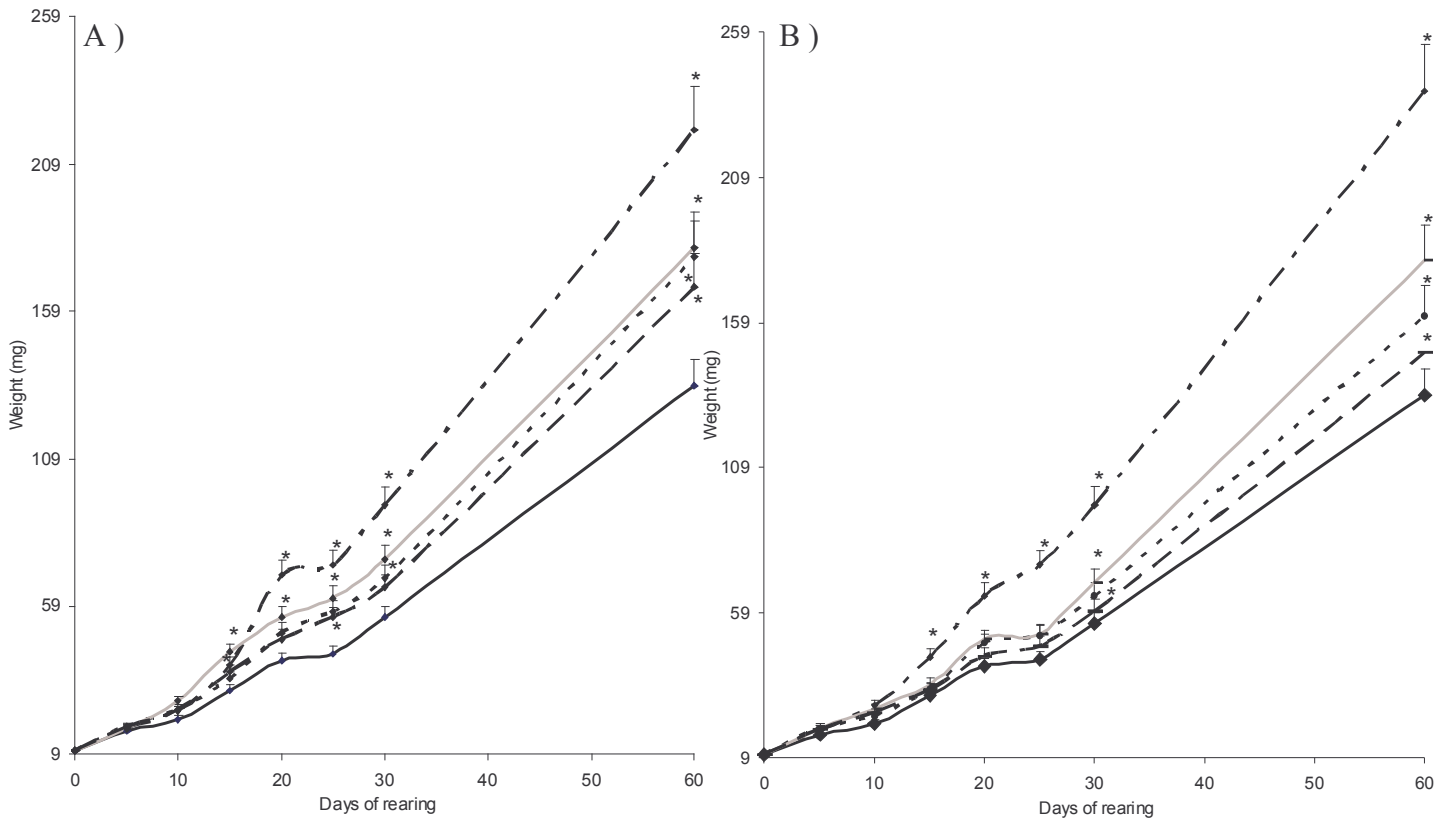


Figure 52 : Weight of shrimp post-larvae according to their diet (mg) during rearing. A ) Diet A: — , Diet 4-1: ····, Diet 4-2: — · — , Diet 4-5: — — — , Diet 4-10: — — — . B ) Diet A: — , Diet 25-1:····, Diet 25-2:— · — , Diet 25-5: — — — , Diet 25-10: — — — \*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).

After 30 days, the end of the enrichment in all group didn't improve loss of weight gain in the post-larvae (Figure 52). At 30 days of rearing the weight gain in comparison with control shrimp was 123%, 168%, 135%, 118%, 116%, 179%, 125%, and 107%, respectively for LBBMA4 1%, 2%, 5% 10% and LBBMA25 1%, 2%, 5%, 10% (Tableau 17). After the end of the enrichment, we observed a maintain of the weight advantages take by the shrimps receiving enriched diet.

At 60 days of rearing all groups receiving enriched diet have significantly higher weight ( $p < 0.05$ ) than control group (Figure 53). We can observe a positive effect – dose between 0 to 2% of enrichment and a negative effect – dose between 2 to 10% of enrichment. Significantly

maximum weight ( $p < 0.05$ ) was obtained with 2% of enrichment. Moreover, diet 25-2 permitted optimal growth of post-larvae.

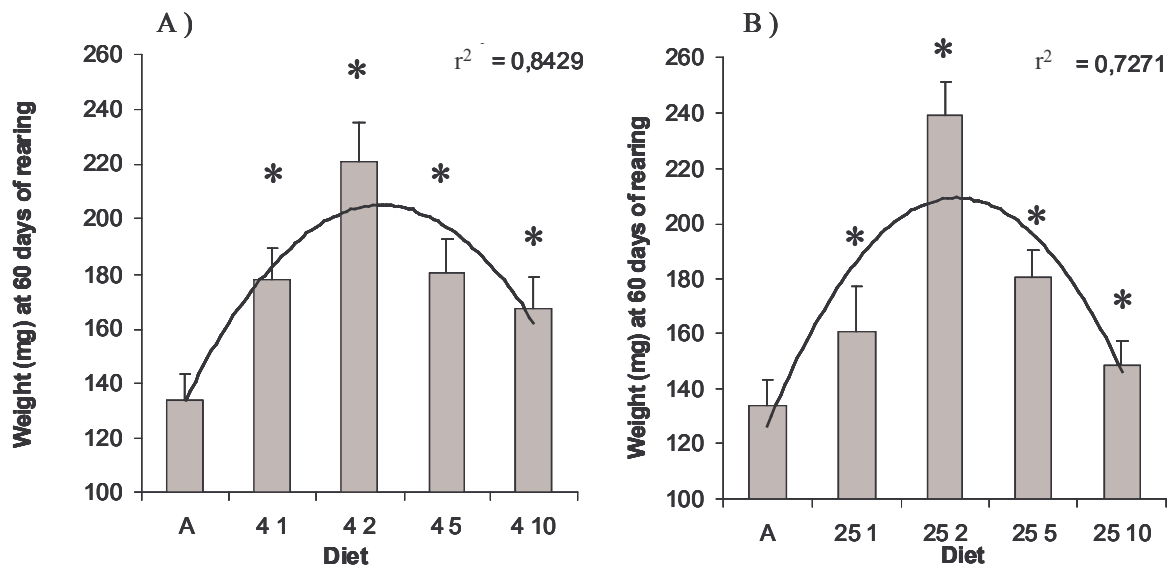


Figure 53: Weight of shrimp post-larvae according to their diet (mg) after 60 days of rearing. A ) Diet enriched with LBBMA4. B ) Diet enriched with LBBMA25. \*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).

Tableau 17: Weight of shrimp post larvae according to diet (% of control group) after 30 days of rearing. (%). \*: Significantly different from control diet ( $p < 0.05$ ).

Diet	%
4-1	123*
4-2	168*
4-5	135*
4-10	118*
25-1	116*
25-2	179*
25-5	125*
25-10	107

## D. Discussion

Providing animals with the optimal quantities of a nutritionally complete feed is one of the most critical aspects of shrimp farming since feeds remain the highest expense for farmers. Feeds still need to be formulated to meet the nutritional requirements of shrimps farmed in intensive raceway production systems (Main and Van Wyk, 2004). Because of the most expensive ingredients in feed production are proteins, different protein sources are tested for commercial feed production to reduce costs. Manufactures ignore if some protein sources are appropriate in

quantity and quality for adequate digestion and assimilation by the intended organism. For example, soybean protein is currently used as protein base for cultured shrimp to reduce costs (Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002). However, it cannot be used as the unique source of proteins because of the low occurrence of certain essential amino acids and of anti-nutritional molecules (Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002). Moreover, the quantity and quality of dietary proteins are primary factors influencing shrimp growth, nitrogen loading of the culture system and feed costs (Davis and Arnold, 2000). Consequently, considerable research has been conducted to evaluate protein requirements and the acceptability of various feedstuffs as protein sources (Davis and Arnold, 2000). Nevertheless, rearing post-larvae shrimps remains difficult because of the high mortality of this stage, which is a critical phase according to the development of digestive system. The percentage of survival observed in this experiment is very good whatever the diet use. In all groups, survival rate was higher than 82%. Then, our experimental conditions rightly corresponded to the needs of the shrimp post-larvae. Moreover, all enriched diet permitted to increase the survival of shrimp post-larvae. These results are encouraging because of the increase of survival rate of more than 10 % in comparison with control group.

In our experiment, we investigated the possibility to use some molluscan viscera silages, with high content of peptides, amino acids and poly-unsaturated fatty acids on post-larvae shrimp rearing. After 15 days of rearing, the shrimps of all groups receiving a diet enriched with molluscan silage LBBMA4 had superior weight compared to the shrimps of the control group. Enrichment 25-2, improved the higher gain of weight between 10 days of rearing to the end of experiment. Diet 25-5 and 25-1 increased the growth, compared to the control diet, after 30 days of rearing. Thus, two molluscan silages (LBBMA4 and LBBMA25) tested as feed ingredient in post-larvae shrimp diet improved the growth in comparison with the control diet. Nevertheless, diet 25-10 didn't implied a higher growth after 30 days of rearing compared to the control group. Then, responses to the two silages tested were more or less rapid and important, according to the percentage of silage, in term of percentage of weight gain in comparison with the control shrimps. Thus, properties of the protein lysates also depend on their chemical characteristics, which are a function of the hydrolysis degree (Kristinsson and Rasco, 2000). The most important feature of a protein lysate for good nutritional quality is the degree of hydrolysis of the product. In fish, high levels of dietary free amino acids can change the rate of absorption in the gastrointestinal tract, inducing premature absorption of certain free, essential amino acids in relation to the absorption of the amino acids in the polypeptide chains. Moreover, generally speaking, growth rate of cultured shrimp is higher when the amino acid composition of their feed is the same as the composition of the own protein. The amino acid composition of the shrimp *Penaeus*

*japonicus* protein is highly similar to that of molluscs such as clam, cephalopod or shrimp to a lesser extent (Boonyaratpalin *et al.*, 1980). So, mollusc meals are of prime importance as mussel meal, and especially squid meal, which seems to act as a growth promotant on several shrimp species (AQUACOP and Cuzon, 1989). It is worth it talking of a squid effect, which could be a more general mollusc effect related to shrimp growth (AQUACOP and Cuzon, 1989). For this reason, in the artificial shrimp feeds, squid meal and short-necked clams were important ingredients. High growth rates of larvae and juveniles generally require an abundant supply of amino acids for anabolic as well as energetic purposes (Tonheim *et al.*, 2005). However, a moderate supplementation of peptides and amino acids has to be added in artificial diet. In this way, a decrease of growth is usually experienced when peptides and amino acids are included at levels above 25-30 % (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Tonheim *et al.*, 2005). Enrichments used in our experiment contained both n-6 and n-3 highly unsaturated fatty acids, which may satisfied the essential fatty acids requirements of post-larvae shrimps. Weight gain and survival of Japanese prawn, *Penaeus japonicus*, improved when level of essential fatty acids was sufficient (Muzinic *et al.*, 2004). Our two silages have received a moderate lysis according to their content in peptides and amino acids. Furthermore, they came from molluscan tissue, so they greatly matched the shrimp post-larvae requirements (protein, amino acids and fatty acids content) as observed with zoo-technical parameters (weight and survival).

A 2% of enrichment permitted to ameliorate the shrimp growth. In this way, after 30 days of rearing, shrimps receiving the diet 4-2 or 25-2 had a growth weight corresponding to 168.3 and 172.7 % of the control group, respectively. The presented percentage of silage in the diet implied different response level in term of growth. So, we could observed a positive effect–dose between 0 to 2% and a negative effect–dose between 2 to 10% of enrichment. Then, maximum weight was obtained with a 2% of enrichment. Moreover, diet 25-2 allowed an optimal growth of post-larvae. Therefore, it is necessary to test percentage range of enrichment before using nutritional complement in shrimp diet. In this manner, we can optimize effect of different diet ingredients use in the rearing of post-larvae shrimp. Growth rate of penaeid shrimps is closely related to the quality of their diet, mainly to the protein source, as shown by growth tests carried out on *Penaeus japonicus* (Cruz-Ricque *et al.*, 1989). Thus, the weight gain of shrimp was improved by 45% with the addition of squid meal at 5% in the diet in pond pens (Cruz-Suarez *et al.*, 1992). Moreover, a study of the dietary effect of squid protein fractions was then conducted on juvenile *Penaeus japonicus* with results showing that growth rate and food conversion ratio were enhanced, even with a level of incorporation as low as 1.5% (Cruz-Ricque *et al.*, 1989).

Some authors demonstrated that the best growth could be obtained using a 5-15% of muscle squid meal, but, larger amounts of this squid meal implied a high mortality and a growth decreased (Fenucci *et al.*, 1980). Our results are in concordance with others researches: food properties are enhance by protein lysates as ingredients of diet (Anggawati *et al.*, 1990; Cahu *et al.*, 1999; Oliva-Telez *et al.*, 1999; Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002; Le Bihan *et al.*, 2006a). Anggawati *et al.* (1990) found that replacing 3% of fish meal by fish hydrolysate was enough to enhance shrimp growth of the shrimp *Penaeus monodon*. Investigations on fish larvae growth confirm that feeds with fish hydrolysate supplement improve growth and digestive system development in better way at low concentration (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999).

In addition, after 30 days, the end of enrichment in all groups didn't improves the loss of weight gain of post-larvae. In this way, at the end of enrichment, we observed a maintain of the advantages taken by shrimps receiving enriched diet. At 60 days of rearing, all groups receiving enriched diet had a higher weight than control group. Then, shrimp receiving diet 4-2 and 25-2 had a weight corresponding to 164.6 and 178.2 % of the control group respectively, after 60 days of rearing. Using LBBMA4 or LBBMA25 as nutritional complementary in rearing of post-larvae shrimps is a good way to minimize the critical period of rearing and to obtain juveniles more rapidly. The weight gain obtained by supplementation of shrimp diet is really important (for instance 178% for LBBMA25 added at 2%) and can permit to obtain commercial shrimp size more rapidly compared to classical diet as demonstrated in our experimental rearing.

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the IFOP (Instrument Financier pour l'Orientation des Pêches). This study was conducted in CREC (Centre de Recherches en Environnement Côtier) at Luc sur Mer, Normandie, France. We are grateful to Aline Coulon, Aurélie Moncuit, Agnès Meslon, Hélène Viala and Georges Safi for their help on shrimp rearing. We want to thank Dr Anne-Sophie Martinez for her help in English editing.

La Figure 54 montre les crevettes *Penaeus japonicus* après 60 jours d'élevage en conditions expérimentales, en fonction de différents aliments.



Figure 54 : Photo des crevettes *Penaeus japonicus* après 60 jours d'élevage en fonction de l'aliment reçu.



La Figure 55 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.

**Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 constituent un très bon enrichissement pour l'élevage de post-larves de crevettes *Penaeus japonicus***

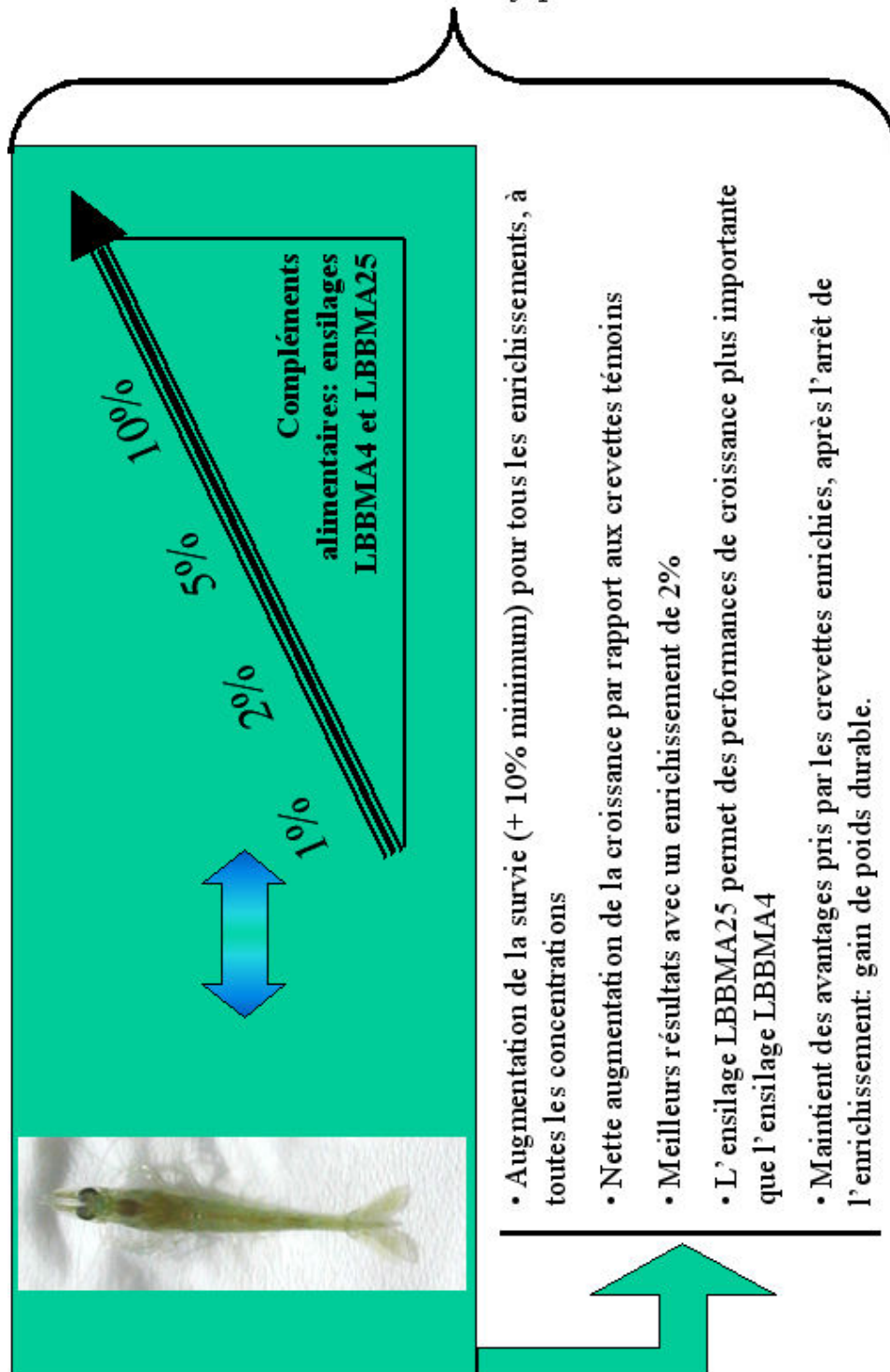


Figure 55 : Schéma explicatif des résultats obtenus concernant l'utilisation des ensilages de viscères de seiches en enrichissement de l'alimentation de post larves de crevette *Penaeus japonicus*.

## IV Poissons

### A. Introduction

Le bar ou loup de mer *Dicentrarchus labrax*, fait partie des quelques espèces « pionnières » de l'aquaculture marine. Les premières expériences sur le bar datent de 1969. C'est dans les années 1986-1988 qu'a été mise au point une technique de production, à l'échelle industrielle, de larves de bonne qualité, d'où le développement de l'élevage de poissons de mer en Europe. Bien que la technologie ait été mise au point par des chercheurs français et anglais, c'est en Grèce que l'élevage du loup s'est principalement développé. La production grecque a ainsi augmenté entre 1988 et 1996 de 400 tonnes à 18 000 tonnes. Cependant, d'après IFREMER, la production française de bar est en constante évolution. Cette augmentation de la production engendre une demande croissante en aliments et compléments alimentaires. Le bar, dont l'élevage est en pleine expansion, est relativement peu connu d'un point de vue nutritionnel par rapport aux salmonidés. Ainsi, ces derniers constituent les espèces modèles des travaux de recherche en aquaculture.

Outre l'aspect sanitaire et l'utilisation prophylactique d'antibiotiques, actuellement le principal problème rencontré en pisciculture de bars reste l'alimentation. En effet, pour nourrir un kilo de poissons d'élevage, il faut pêcher trois à quatre kilos de poissons sauvages. Ce ratio élevé résume l'enjeu de l'aquaculture : transformer son système d'alimentation. L'alimentation « durable » des poissons carnivores d'élevage reste une interrogation puisque celle-ci repose sur des poissons. En effet, les espèces élevées sont principalement carnivores : elles ont des besoins importants en protéines et en acides gras poly-insaturés fournis par des huiles. Ainsi, le développement de la pisciculture s'accompagne malheureusement d'une pêche minière de masse pour fournir farines et huiles de poissons.

La recherche aquacole concentre donc ses efforts sur l'élaboration d'aliments et d'enrichissements. Nombre de produits végétaux sont déjà utilisés avec plus ou moins de succès : tourteaux de soja, blé, colza... Or, il s'est avéré difficile de remplacer complètement la farine et l'huile de poisson par des composés végétaux. Ainsi, ces produits entraînent des carences, une qualité de chair moindre et de nombreux troubles métaboliques, en particulier chez les animaux marins carnivores. En effet, les poissons sont incapables de synthétiser eux-mêmes des acides gras poly-insaturés. Sans eux, les poissons présentent des taux de mortalité importants.

Récemment, l'effort de recherche en aquaculture s'est aussi porté sur la manière d'économiser des protéines. Cependant, elle augmente la teneur en graisses des poissons, néfaste

également pour le goût et la texture de la chair des poissons. Les chercheurs en nutrition ont mis au point des formules alimentaires enrichies en lipides, afin de fournir une bonne partie de l'énergie et d'épargner des protéines. Suivant ce principe et en facilitant l'assimilation et la digestion de l'aliment, les lysats utilisés en élevage de bars pourraient permettre aux poissons d'économiser de l'énergie lors du processus de nutrition.

L'élevage du bar se décompose en plusieurs parties (Figure 56). D'abord, le développement larvaire qui constitue l'étape la plus critique de l'élevage du bar (Villeneuve, 2005). Au cours de cette phase, les larves sont alimentées avec des proies vivantes. L'aliment vivant va être progressivement remplacé par des aliments inertes, c'est le sevrage. Le sevrage est effectué lorsque les larves atteignent un poids d'environ 250 mg. Cette étape, particulièrement délicate étant donné que l'ontogenèse est en cours et que le système digestif des larves n'est pas encore mature, a fait l'objet de beaucoup de travaux. Ainsi, diverses études, ont permis de développer et d'optimiser les aliments larvaires afin de diminuer la mortalité des larves de bar (Metailler *et al.*, 1977; Walford and Lam, 1993; Zambonino-Infante and Cahu, 1994; Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu and Zambonino-Infante, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 1998; Cahu *et al.*, 1999; Nolting *et al.*, 1999; Zambonino-Infante and Cahu, 1999; Fontagné *et al.*, 2000; Tovar-Ramirez, 2002; Tovar *et al.*, 2002; Cahu *et al.*, 2003; Cahu *et al.*, 2003; Cahu *et al.*, 2004; Tovar-Ramirez *et al.*, 2004). En revanche, le stade juvénile a fait l'objet de très peu d'études. Ce stade est pourtant particulièrement intéressant puisque l'ontogenèse est en cours et que la mortalité reste importante durant les premières semaines de sevrage (jusqu'à un poids de 500 mg). Lorsque les animaux ont atteint un poids de 1 gramme, on parle de période de pré-grossissement au cours de laquelle les animaux reçoivent une ration élevée. Puis, la phase de grossissement débute, et les animaux devenus particulièrement résistants vont croître rapidement. Les étapes de développements larvaires et juvéniles sont des phases clés pour l'obtention rapide d'animaux de taille commerciale et bénéficiant d'une bonne survie.

Au cours de ces investigations, nous avons donc choisi d'étudier l'impact sur les paramètres zootechniques, du remplacement d'une partie de l'aliment par des compléments alimentaires, chez des juvéniles de bar *Dicentrarchus labrax*. Trois expérimentations d'élevage de juvéniles (à différents âges) permettront d'appréhender l'effet de complément alimentaire (ensilages marins) sur la croissance et la survie des juvéniles au cours de l'ontogenèse.

## Elevage Larvaire



Œuf de 1180 µm de diamètre

Larve éclore de 3,5 mm de long



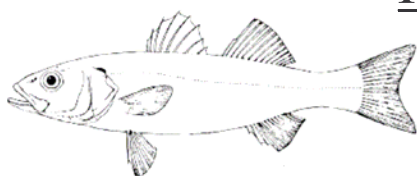
Larve de 10 jours

## Sevrage



Juvénile de 60 jours de 250 mg

## Pré-grossissement



Juvénile de 90 jours de 1 g  
Le juvénile est semblable à l'adulte

## Grossissement

Bar portion de 350 g

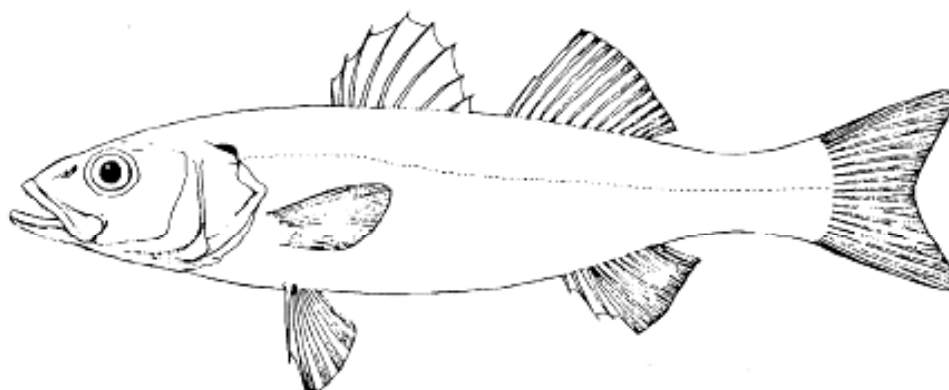


Figure 56 : Les différents stades biologiques de l'élevage du bar *Dicentrarchus labrax*.

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Matériel biologique**

Les juvéniles de bars sont obtenus par l'intermédiaire de la ferme aquacole Aquanord (Gravelines, France). Ils sont ensuite transférés pendant 7 jours dans un bac d'acclimatation de 90 litres d'eau de mer en circuit ouvert (température : 20°C, bullage constant, photopériode naturelle). Au cours de cette période, les juvéniles reçoivent un aliment (aliment témoin) pour juvéniles de bars (Tableau 18).

Trois élevages différents ont été menés. Les animaux ont un poids de 3g pour la première expérimentation (réception en octobre 2004), 250mg pour le second élevage (réception en octobre 2005) et pèsent 500mg pour la troisième expérimentation (réception en avril 2006).

Tableau 18 : Composition des aliments (%).

Ingrédients (%):	Aliment témoin:	Aliment LBBMA4 10%	Aliment LBBMA25 10%	Aliment LBBMA25 5%	Aliment LBBMA25 2%	Aliment Gabolysat	Aliment PC60
LBBMA4	-	10	-	-	-	-	-
LBBMA25	-	-	10	5	2	-	-
Gabolysat	-	-	-	-	-	5	-
PC60	-	-	-	-	-	-	5
Protéines (%)	52	46,8	46,8	49,4	50,96	49,4	49,4
Lipides (%)	15	13,5	13,5	14,25	14,7	14,25	14,25
Cendre (%)	10,1	9,09	9,09	9,6	9,9	9,6	9,6
Cellulose (%)	0,4	0,36	0,36	0,38	0,39	0,38	0,38
Total phosphore (%)	1,62	1,458	1,458	1,54	1,59	1,54	1,54
Méthionine et cystéine (%)	2,3	2,07	2,07	1,18	2,25	1,18	1,18
Cuivre (mg/ kg)	3	2,7	2,7	2,85	2,94	2,7	2,7
Vitamine A (I.U./ kg)	20500	20500	20500	20500	20500	20500	20500
Vitamine D3 (I.U./ kg)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Vitamine E (mg/ kg)	240	240	240	240	240	240	240

## 2. Méthode d'élevage

Après acclimatation, 80 bars sont transférés dans chacun des bacs d'expérimentation. Chaque bac est relié à un bac de filtration biologique thermorégulé (Figure 57). La variation de débit entre les 2 bacs permet de réguler la température du bac d'élevage.



Figure 57 : Photos de la structure d'élevage des juvéniles de bars.

### a. Expérimentation 1

L'élevage des juvéniles de poisson est suivi sur 126 jours. Pendant les 84 premiers jours, 3 alimentations différentes sont testées (Tableau 18) : un aliment témoin (100% de granulés pour juvéniles de bars), un aliment LBBMA4 10% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 10% de LBBMA4), un aliment LBBMA25 10% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 10% de LBBMA25). Puis, après 84 jours, l'ensemble des animaux reçoit une alimentation composée de 100% de granulés pour juvéniles de bars.

### b. Expérimentation2

L'élevage des juvéniles de poisson est suivi sur 103 jours. Pendant les 84 premiers jours, 4 alimentations différentes sont testées (Tableau 18) : un aliment témoin (100% de granulés pour juvéniles de bars), un aliment LBBMA25 5% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 5% de LBBMA25), un aliment PC60 5% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 5% de PC60), un aliment Gabolysat 5% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 5% de Gabolysat). Puis, après 84 jours, l'ensemble des animaux reçoit une alimentation composée de 100% de granulés pour juvéniles de bars.

### c. Expérimentation 3

L'élevage des juvéniles de poisson est suivi sur 56 jours. Deux alimentations différentes sont testées (Tableau 18): un aliment témoin (100% de granulés pour juvéniles de bars) et un aliment LBBMA25 2% (granulés pour juvéniles de bars enrichis avec de 2% de LBBMA25).

Les enrichissements utilisés sont tous des lysats marins (LBBMA4, LBBMA25, PC60 et Gabolysat). Les compléments alimentaires LBBMA4 et LBBMA25 ont été fabriqués au sein du laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines. Le PC60 et le Gabolysat sont deux hydrolysats de poissons commerciaux à destination d'alimentation animale et humaine, fabriqués par DIELEN Laboratoires (Manche, France). Ainsi, la société DIELEN Laboratoires, produits des lysats de poissons des mers froides (familles des Gadidés et des Scombridés). Ces lysats de poissons ont une composition complexe, ils contiennent majoritairement des petits peptides et des acides aminés résultant de la lyse ménagée des protéines, mais aussi différents acides gras essentiels, vitamines et minéraux.

L'ensemble des aliments enrichis est préparé au préalable par mélange puis par homogénéisation au mixeur. La ration alimentaire quotidienne est de 10 % du poids moyen des animaux. Les poissons sont nourris tous les jours à heure fixe (18h00). La veille de chaque pesée et prélèvement un jeun est établi. La survie est observée quotidiennement dans des bacs. Les individus morts sont retirés immédiatement du bac afin de prévenir toute contamination bactérienne.

Les paramètres physico chimiques sont contrôlés. La température est maintenue à  $17\pm 2^{\circ}\text{C}$  tout au long de l'élevage. Le pH, les concentrations en nitrites/nitrates sont suivis régulièrement via l'utilisation de bandelettes test (Tetratest<sup>TM</sup> 5-in-1).

### **3. Suivi zootechniques**

Des pesées régulières sont effectuées pour les 3 expérimentations.

Les individus (\*2 échantillonnages aléatoires de 10 individus) sont prélevés par bac à chaque prélèvement (n=20). A la fin de l'expérimentation, la pesée est effectuée sur 15 individus (n=15) par bac. Plusieurs paramètres biométriques et paramètres de croissance sont mesurés (Figure 58) : la longueur totale depuis l'extrémité buccale jusqu'à l'extrémité caudale (Lt), la largeur entre le devant de la 1<sup>ère</sup> nageoire dorsale et l'arrière des nageoires pectorales (l), la longueur de l'intestin, poids total, poids des viscères et poids du foie.

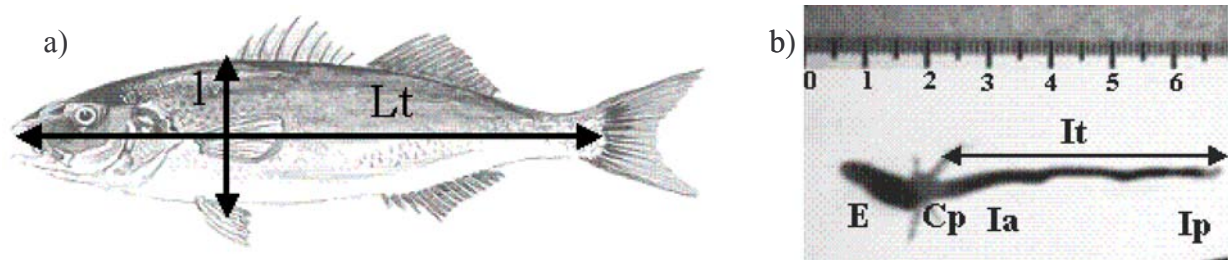


Figure 58: a) Illustration des mesures de longueur (Lt) et de largeur (l) effectuées sur les juvéniles de bars. b) Mesure de la longueur totale (It) l'intestin après dissection Cp : Caeca pyloriques, E : estomac, Ia : Intestin antérieur, Ip : Intestin postérieur.

#### 4. Mesure des indices de condition

##### a. Facteur de condition FC

Le facteur de condition ( $\text{g}/\text{mm}^3$ ) est calculé ( $n = 15$ ) selon la formule suivante (Peterson and Small, 2004) :

$$FC = \left( \frac{\text{Poids total}}{Lt \times l^2} \right) \times 100$$

##### b. Indice Hépatosomatique IHS

L'indice hépatosomatique est calculé ( $n = 15$ ) selon la formule suivante (Peterson and Small, 2004) :

$$IHS = \frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids total}} \times 100$$

##### c. Indice Viscéro-Somatique IVS

L'indice viscéro-somatique est calculé ( $n = 15$ ) selon la formule suivante (Peterson and Small, 2004) :

$$IVS = \frac{\text{Poids des viscères}}{\text{Poids total}} \times 100$$

##### d. Observation des malformations

Trois types principaux de malformations sont observés : ventrale, dorsale ou operculaire (Figure 59).



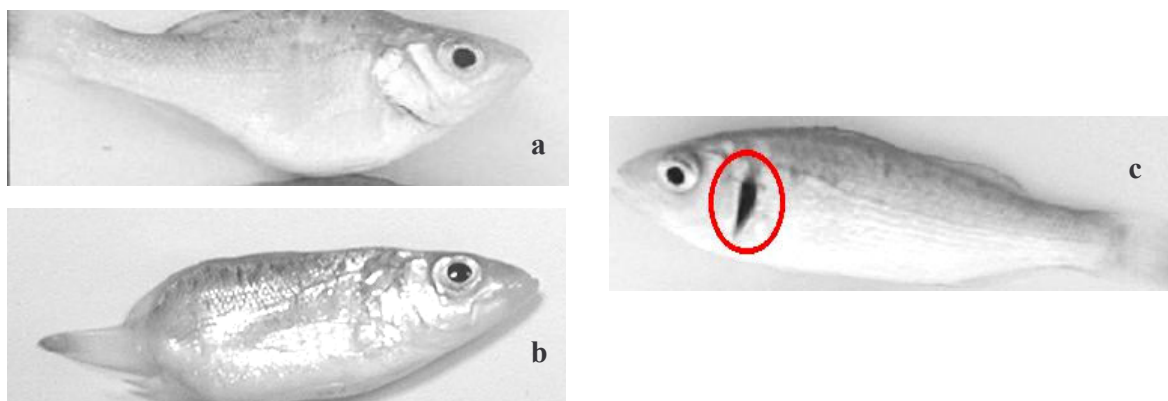


Figure 59: Types de malformations. A) ventrale (obésité). B) dorsale (spinose). C) operculaire (opercule absent).

### **5. Analyse de la qualité biochimique de la chair**

L'analyse biochimique de la qualité de la chair (protéines, glucides, lipides) est effectuée comme décrit précédemment (chapitre 3, II).

### **6. Analyses statistiques**

Les résultats sont donnés avec un écart type ( $n=15$  pour chaque traitement). Les données sont comparées à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey lorsque des différences significatives ( $p<0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

## **C. Résultats**

### **1. Suivis zootechniques**

Le Tableau 19 et la Figure 60 établissent la correspondance poids/âge entre les différents élevages.

Tableau 19: Correspondance poids/âge et temps d'élevage entre les différentes expérimentations.

Jour élevage	Expérimentation 1		Expérimentation 2		Expérimentation 3	
	Poids en g (témoin)	Age des poissons (jours)	Poids en g (témoin)	Age des poissons (jours)	Poids en g (témoin)	Age des poissons (jours)
0	3	150	0,25	60	0,5	75
15	4	165	0,5	75	0,9	90
30	5,5	180	1	90	1,25	105
45	5,8	195	1,3	105	1,9	120
60	7	210	1,7	120	2,2	135
75	9	225	2,1	135	-	-
90	10	240	3,2	150	-	-
105	12	255	3,7	165	-	-
120	13	270	-	-	-	-

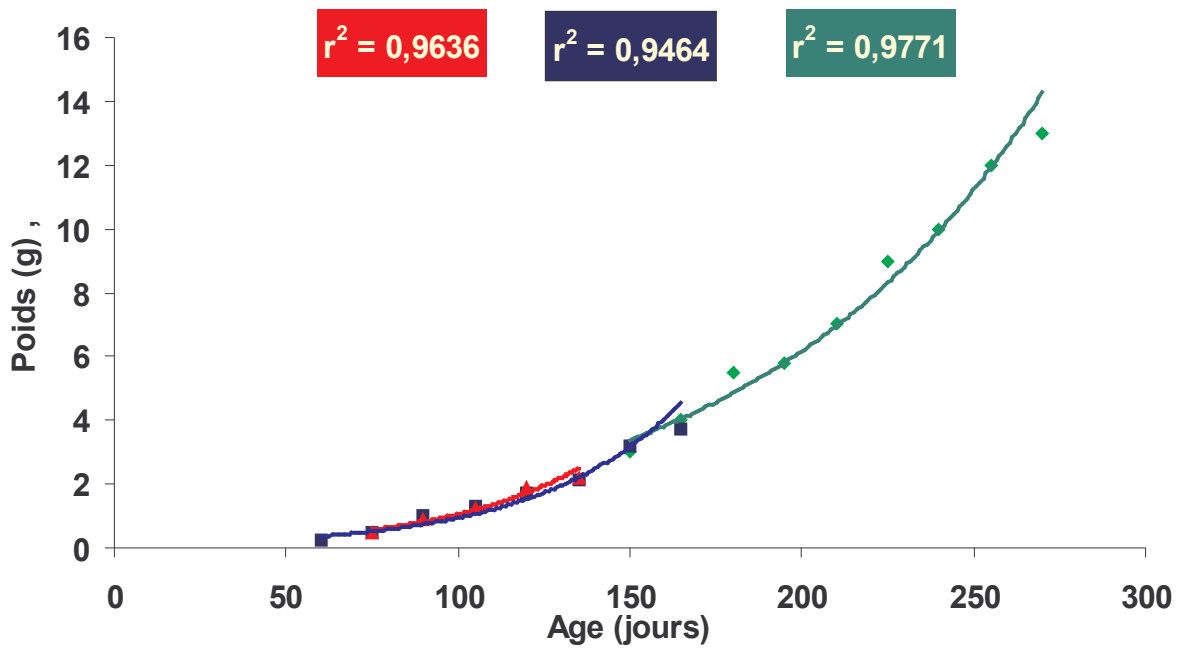


Figure 60: Correspondance poids/âge entre les 3 élevages. Elevage 1 : ■, élevage 2 : ■, élevage 3 : ■.

a. Expérimentation 1

Tout les juvéniles de bar ont une croissance exponentielle ( $r^2 > 0,096$ ) au cours de l'élevage (Figure 61).

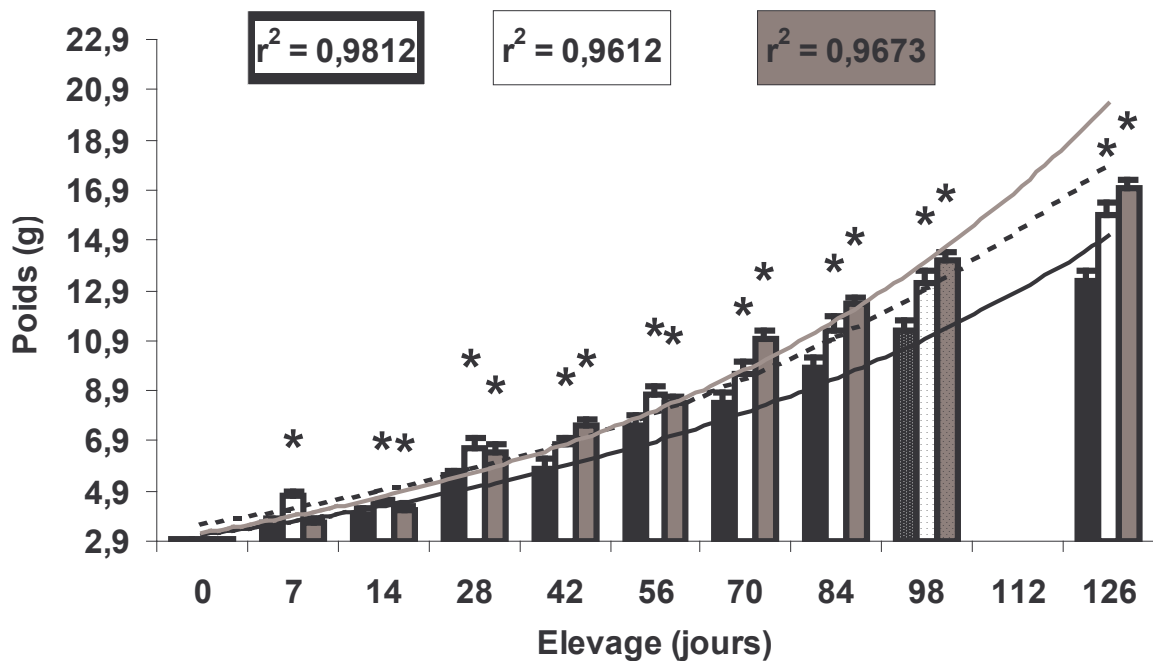


Figure 61: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l'élevage 1 en fonction des différents aliments. Témoin ■, LBBMA4 10% ■, LBBMA25 10% ■. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Après 7 jours d'élevage (âge : 157 jours), les juvéniles recevant l'aliment LBBMA4 10% ont un poids significativement plus important ( $p < 0.05$ ) que celui des poissons du lot témoin. De plus, entre le jour 14 (âge : 164 jours) et le jour 126 (âge : 276 jours), les juvéniles recevant une alimentation enrichie conservent un poids significativement plus important ( $p < 0.05$ ) que les juvéniles témoins en dépit de l'arrêt de l'enrichissement au-delà du jour 84 (âge : 234 jours). A partir du 7<sup>ème</sup> jour (âge : 157 jours) jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour (âge : 178 jours), le pourcentage de gain de poids des animaux enrichis en LBBMA4 10% augmente régulièrement par rapport au lot témoin (Tableau 20). En ce qui concerne les animaux recevant l'aliment LBBMA25 10%, le pourcentage de poids par rapport au témoin, est en constante augmentation entre le 14<sup>ème</sup> jour (âge : 164 jours) et le 42<sup>ème</sup> jour (âge : 192 jours). Après le 28<sup>ème</sup> (âge : 178 jours) ou 42 jours (âge : 192 jours), respectivement pour l'enrichissement LBBMA4 et LBBMA25, malgré un arrêt de l'enrichissement au-delà du 84<sup>ème</sup> jour (âge : 234 jours), le pourcentage de gain de poids des animaux enrichis par rapport aux témoins est stable. L'utilisation des ensilages en tant que compléments alimentaires à hauteur de 10% de l'alimentation, permet un gain de poids de 119 et 127%, respectivement pour LBBMA4 et LBBMA25 par rapport aux animaux recevant un aliment témoin (Figure 62).

Au cours de l'élevage le taux de survie est très bon (Tableau 20) dans tous les groupes. Ainsi, les animaux témoins et ceux du lot recevant l'aliment LBBMA4 10% ont un taux de survie de 98,38 % et les juvéniles alimentés avec le LBBMA25 10% ont un taux de survie de 96,92%.

Tableau 20: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 1. \*: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

	Jours:	Aliment témoin:	Aliment LBBMA4 10%	Aliment LBBMA25 10%
Pourcentage de poids par rapport au témoin (%)  (Poids des animaux tests/ poids des animaux témoins *100)	14 (âge: 124 jours)	—	111 ± 0.9 *	110 ± 0.3*
	28 (âge: 178 jours)	—	120 ± 0.8 *	116 ± 0.2*
	42 (âge: 192 jours)	—	116 ± 0.5 *	130 ± 0.5 *
	84 (âge: 234 jours)	—	116 ± 0.44 *	126 ± 0.8 *
	98 (âge: 248 jours)	—	116 ± 0.6 *	125 ± 0.7 *
	126 (âge: 276 jours)	—	119 ± 0.9 *	127 ± 0.8 *
Survie (%):	28 (âge: 178 jours)	100	100	100
	42 (âge: 192 jours)	98,38	100	98,38
	98 (âge: 248 jours)	98,38	98,38	96,92
	126 (âge: 276 jours)	98,38	98,38	96,92

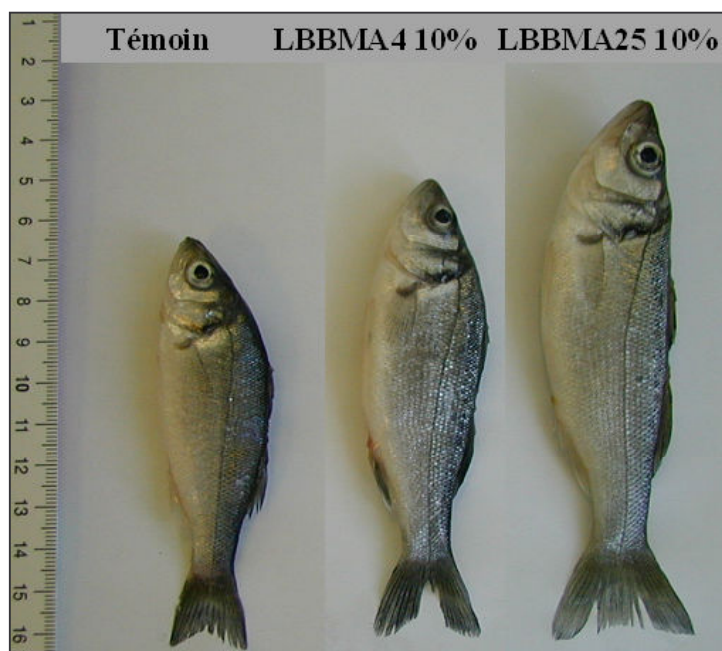


Figure 62: Photo des juvéniles de bars en fin de l'expérience 1.

#### b. Expérimentation 2

Tout les juvéniles de bar ont une croissance exponentielle ( $r^2 > 0,097$ ) au cours de l'élevage (Figure 63).

Au-delà du 35<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 95 jours), les animaux recevant une alimentation LBBMA25 5% ont un poids significativement plus important ( $p < 0,05$ ) que celui des poissons du lot témoin (Tableau 21). Ce phénomène se maintient après l'arrêt de l'enrichissement au 84<sup>ème</sup> jour (âge : 144 jours). L'aliment Gabolysat permet d'augmenter significativement ( $p < 0,05$ ) le poids des juvéniles à partir du 56<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 116 jours). De la même manière que l'aliment LBBMA25 5%, l'aliment Gabolysat permet un maintien des performances de croissance après l'arrêt de l'enrichissement. En revanche, l'aliment contenant l'enrichissement PC60 entraîne dès le 84<sup>ème</sup> jour (âge : 144 jours) une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du poids des juvéniles en comparaison avec l'aliment témoin. Entre le 25<sup>ème</sup> jour (âge : 85 jours) et le 72<sup>ème</sup> jour (âge : 132 jours), les animaux recevant une alimentation enrichie en LBBMA25 à hauteur de 5% ont un pourcentage de poids, qui augmente régulièrement par rapport aux animaux témoins (Tableau 21). Au-delà du 56<sup>ème</sup> jour (âge : 116 jours), malgré un arrêt de l'enrichissement au 84<sup>ème</sup> jour (âge : 144 jours), on note une stabilisation du pourcentage de gain de poids des animaux recevant l'aliment LBBMA25 par rapport aux animaux témoins. L'utilisation des enrichissements en tant que complément alimentaire à hauteur de 5% de l'alimentation, entraîne diverses réponses en terme de poids. Le pourcentage de poids par rapport

aux animaux témoins en fin d'élevage est de 162, 138 et 75%, respectivement pour les enrichissements LBBMA25, Gabolysat et PC60 (Figure 64).

Au cours de l'élevage le taux de survie est relativement similaire entre les différents lots (Tableau 20). Ainsi, les animaux du lot témoin, du lot recevant l'aliment LBBMA25 5% et du lot recevant l'aliment Gabolysat 5% ont un taux de survie de 56 à 57%. En revanche, les juvéniles qui ont reçu l'aliment PC60 5%, montrent une survie plus faible que les autres animaux. En effet, la survie n'est que de 45% pour les animaux recevant l'enrichissement PC60 à hauteur de 5%.

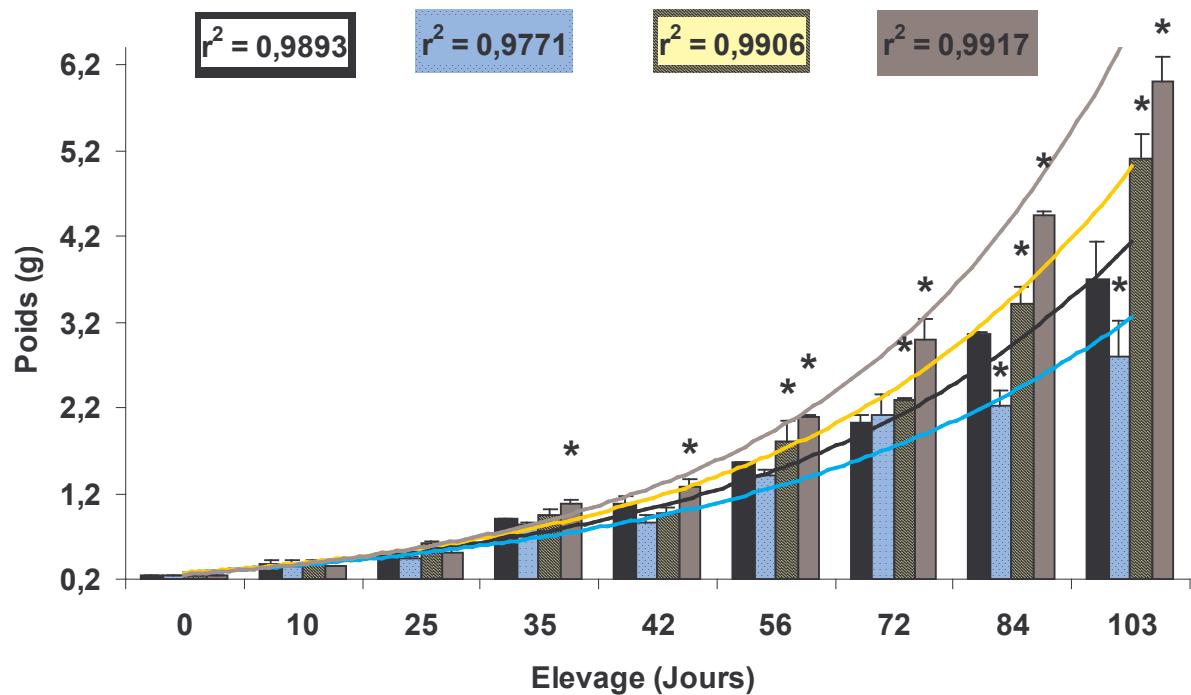


Figure 63: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l'élevage 2 en fonction des différents aliments. Témoin ■, Gabolysat ▨, PC60 ▩, LBBMA25 5% ■. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Tableau 21: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 2. \*: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

	Jours:	Aliment témoin:	Aliment LBBMA25 5%	Aliment Gabolysat 5%	Aliment PC60 5%
Pourcentage de poids par rapport au témoin (%)  (Poids des animaux tests/ poids des animaux témoins *100)	35 (âge: 95 jours)	–	118*	104	93
	42 (âge: 102 jours)	–	118*	95	91
	56 (âge: 116 jours)	–	143*	115*	91
	72 (âge: 132 jours)	–	148*	116*	103
	84 (âge: 144 jours)	–	145*	117*	72*
	103 (âge: 163 jours)	–	162*	138*	75*
Survie (%):	25 (âge: 85 jours)	86	70*	70*	86
	42 (âge: 102 jours)	66	57	57	61
	84 (âge: 144 jours)	56	57	56	50
	103 (âge: 163 jours)	56	57	56	45*



Figure 64: Photo des juvéniles de bars en fin de l'expérience 2.

### c. Expérimentation 3

Tout les juvéniles de bar ont une croissance exponentielle ( $r^2 > 0,098$ ) au cours de l'élevage (Figure 65).

Au-delà du 7<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 82 jours), les animaux recevant une alimentation LBBMA25 2% ont un poids significativement plus important ( $p < 0.05$ ) que celui des poissons du lot témoin (Tableau 22). Entre le 7<sup>ème</sup> jour (âge : 82 jours) et le 28<sup>ème</sup> jour (âge : 103 jours), les animaux recevant une alimentation enrichie en LBBMA25 à hauteur de 2% ont un pourcentage de poids, qui augmente régulièrement par rapport aux animaux témoins (Tableau 22). Au-delà du 28<sup>ème</sup> jour (âge : 103 jours), on note une stabilisation du pourcentage de gain de poids des animaux recevant l'aliment LBBMA25 par rapport aux animaux témoins. L'utilisation de l'enrichissement LBBMA25 en tant que complément alimentaire à hauteur de 2% de l'alimentation, entraîne une nette augmentation du poids des juvéniles. Le pourcentage de poids par rapport aux animaux témoins en fin d'élevage est de 143% (Figure 66).

Au cours de l'élevage le taux de survie est relativement élevé pour les différents lots (Tableau 22). La survie est néanmoins significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) pour les animaux nourris avec l'aliment enrichi en LBBMA25 à hauteur de 2%, puisque ces derniers ont un taux de survie de 90% contre 80% pour les juvéniles témoins.

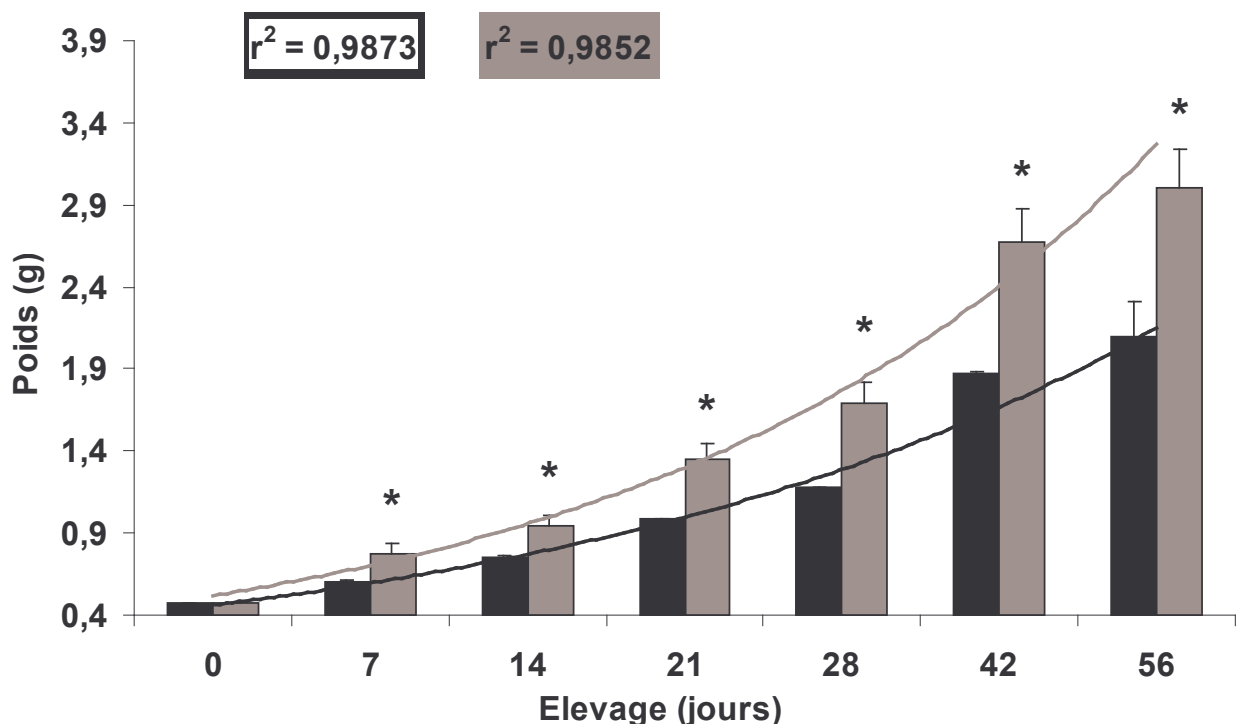


Figure 65: Evolution du poids des juvéniles (g) au cours de l'élevage 3 en fonction des différents aliments. Témoin ■, LBBMA25 2% ■. \*: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Tableau 22: Paramètres zootechniques des poissons au cours de l'élevage 3. \*: significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

	Jours:	Aliment témoin:	Aliment LBBMA25 5%
Pourcentage de poids par rapport au témoin (%) (Poids des animaux tests/ poids des animaux témoins *100)	7 (âge: 82 jours)	–	119*
	14 (âge: 89 jours)	–	125*
	21 (âge: 96 jours)	–	133*
	28 (âge: 103 jours)	–	143*
	42 (âge: 117 jours)	–	143*
	56 (âge: 131 jours)	–	143*
Survie (%)	14 (âge: 89 jours)	92	97
	28 (âge: 103 jours)	85	95*
	42 (âge: 117 jours)	83	95*
	56 (âge: 131 jours)	80	90*

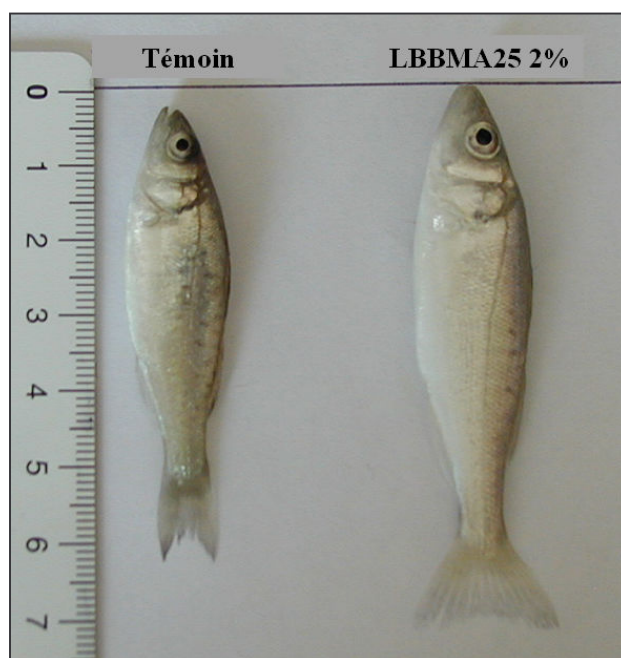


Figure 66: Photo des juvéniles de bars en fin de l'expérience 3.



## 2. Mesure des indices de condition

### a. Expérimentation 1

L'analyse des indices de condition (facteur de condition IHS, IVS et malformations) ne montre pas de différences significatives entre les différents juvéniles recevant une alimentation classique ou enrichie en ensilage à hauteur de 10% (Tableau 23).

Tableau 23: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 1 en fonction de l'aliment reçu. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

126 <sup>ème</sup> jour (âge : 276 jours)	Témoin	LBBMA4 10%	LBBMA25 10%
Facteur de condition	1,92 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,01 ± 0,2
Indice hépato-somatique (%)	2,6 ± 0,5	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,3
Indice viscéro-somatique (%)	10,5 ± 1,6	9,4 ± 0,8	9,3 ± 1,8
Malformations ventrales (%)	0	0	0
Malformations dorsales (%)	0	0	0
Malformations operculaires (%)	0	0	0

### b. Expérimentation 2

L'étude des paramètres de condition des juvéniles, montre qu'il n'y a pas de différences significatives au niveau du facteur de condition, de l'IHS et de l'IVS en fonction de l'alimentation reçue par les juvéniles de bar (Tableau 24). On note tout de même une tendance à la présence d'un plus grand nombre de malformations chez les animaux recevant une alimentation non enrichie.

Tableau 24: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 2 en fonction de l'aliment reçu. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

103 <sup>ème</sup> jour (âge : 163 jours)	Témoin	LBBMA25 5%	Gabolysat 5%	PC60 5%
Facteur de condition	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,2
Indice hépato-somatique (%)	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,3
Indice viscéro-somatique (%)	11,1 ± 0,7	12,2 ± 1,4	10,1 ± 0,8	9,8 ± 1,6
Malformations ventrales (%)	3,75	1,25	1,25	2,5
Malformations dorsales (%)	1,25	1,25	0	1,25
Malformations operculaires (%)	1,25	0	0	0

### c. Expérimentation 3

L'observation des indices de condition des poissons, montre qu'il n'y a pas de différences significatives au niveau du facteur de condition, de l'IHS et de l'IVS en fonction de l'alimentation reçue par les juvéniles de bar (Tableau 25). En revanche, on observe une tendance à la présence d'un plus grand nombre de malformation chez les animaux recevant une alimentation non enrichie.

Tableau 25: Indices de condition des juvéniles à la fin de l'expérimentation 3 en fonction de l'aliment reçu. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

56 <sup>ème</sup> jour (âge : 131 jours)	Témoin	LBBMA25 2%
Facteur de condition	2,1 ± 0,1	2,09 ± 0,1
Indice hépato-somatique (%)	1,8 ± 0,2	2 ± 0,4
Indice viscéro-somatique (%)	10,9 ± 0,9	11,3 ± 1,1
Malformations ventrales (%)	8,1	0
Malformations dorsales (%)	3,6	0
Malformations operculaires (%)	0	0

### **3. Analyse de la qualité biochimique de la chair**

L'analyse biochimique de la qualité de chair des juvéniles recevant un aliment témoin ou enrichie, montre qu'il n'y a pas d'impact significatif de l'enrichissement sur la composition biochimique en protéines, glucides et lipides des juvéniles de bars (Tableau 26).

Tableau 26: Qualité de la chair des juvéniles à la fin de l'expérimentation 1 en fonction de l'aliment reçu. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

126 <sup>ème</sup> jour (âge : 276 jours)	Témoin	LBBMA4 10%	LBBMA25 10%
protéines totales g/100g pds sec	57 ± 5	55 ± 6	56 ± 4
lipides solubles totaux g/100g pds sec	3,8 ± 0,008	3,9 ± 0,01	4,2 ± 0,012
Lipides g/100g pds sec	10,1 ± 1,1	12,1 ± 1,9	11,5 ± 1,9

## **D. Discussion**

Au cours de l'expérimentation 1, le taux de survie est toujours supérieur à 96,92%. L'élevage 2, entraîne les taux de survie les plus faibles puisque les animaux du lot témoin et du lot recevant l'aliment LBBMA25 5% ont un taux de survie de 56 à 57%. Au cours de l'élevage 3, le taux de survie est relativement élevé pour les différents lots. La survie est néanmoins plus élevée pour les animaux nourris avec l'aliment enrichi en LBBMA25 à hauteur de 2%, puisque ces derniers ont un taux de survie de 90% contre 80% pour les juvéniles témoins. Ainsi, plus les animaux sont âgés au cours de l'expérimentation, plus le taux de survie est élevé.

Tout les juvéniles de bar ont une croissance exponentielle ( $r^2 > 0,096$ ) au cours de l'élevage ce qui dénote une bonne croissance. De plus, les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 entraînent un accroissement rapide du poids des juvéniles en comparaison avec un aliment témoin. Cependant, la réponse en terme de poids par rapport au témoin est plus ou moins rapide. Ainsi, lorsque les animaux sont très jeunes au début de l'expérimentation, leur réponse n'intervient qu'au 35<sup>ème</sup> jour, c'est à dire lorsque leur poids est supérieur à 500 mg. En revanche, lorsque les animaux sont suffisamment âgés, leur réponse en terme de poids est particulièrement rapide. Ce

phénomène peut s'expliquer par le stade développement auquel se trouvent les poissons. En effet, dans un premier temps (entre 250 et 500 mg), les juvéniles de bars subissent une ontogenèse importante. L'énergie est alors principalement allouée au développement des différents organes et non pas à la croissance. L'étude stricte de la croissance ne permet pas d'observer des différences entre les différentes alimentations.

L'utilisation des ensilages en tant que compléments alimentaires à hauteur de 10% de l'alimentation, entraîne un gain de poids de 119 et 127%, respectivement pour LBBMA4 et LBBMA25, par rapport aux animaux nourris avec un aliment témoin. Donc, l'ensilage LBBMA25 permet de meilleures performances de croissance. L'utilisation de LBBMA25 à hauteur de 5% et 2% de l'alimentation, entraîne une augmentation du poids respective de 162% et 143% par rapport aux animaux témoins. Il y a un effet dose positif entre 0 et 5% d'incorporation d'ensilage dans l'aliment et un effet dose négatif au-delà de 5%. Les meilleurs résultats de croissance sont donc observés pour l'ensilage LBBMA25 utilisé à 5%. Ce phénomène est bien connu en alimentation de larves et de juvéniles. Ainsi, les protéines hydrolysées sont utilisées dans l'alimentation artificielle afin d'augmenter la disponibilité des protéines et de cette façon d'augmenter la croissance des animaux (Tonheim *et al.*, 2005). Cependant, si une supplémentation modérée en protéines hydrolysées dans l'alimentation permet une stimulation de la croissance des larves, une diminution de la croissance est généralement observée lorsque les protéines pré-hydrolysées sont incluses à un niveau trop important de 25-30% (Cahu and Zambonino-Infante, 1997; Carvalho *et al.*, 1997; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Tonheim *et al.*, 2005). Ainsi, les acides aminés libres et les petits peptides sont absorbés par les entérocytes et entrent dans l'organisme à un taux élevé tandis que les protéines doivent être coupées par les enzymes protéolytiques avant d'être absorbées (Tonheim *et al.*, 2005). Une supplémentation trop importante entraîne une saturation des mécanismes de transport de l'intestin ayant comme résultat d'augmenter la quantité d'acides aminés libres et de peptides dans la lumière de l'intestin impliquant une croissance plus faible que les animaux témoins qui reçoivent un aliment non hydrolysé (Cahu *et al.*, 1999). L'arrêt de l'enrichissement, après une stabilisation du pourcentage de gain de poids par rapport au témoin, permet dans tous les cas un maintien de l'avantage pris par les animaux recevant une alimentation enrichie. L'utilisation des ensilages en tant que complément alimentaire permet donc une augmentation durable du poids des juvéniles en comparaison avec les animaux témoins. Donc, dans cette étude, les ensilages de seiches *Sepia officinalis*, se sont avérés être d'excellents ingrédients alimentaires pour juvéniles de bar *Dicentrarchus labrax* en raison des très bons résultats de croissances observés.

L'analyse des indices de condition (facteur de condition IHS, IVS) ne montre pas de différences entre les juvéniles nourris avec une alimentation classique ou enrichie en ensilage à hauteur de 10, 5 ou 2%. De plus, l'analyse biochimique de la qualité de chair des juvéniles percevant un aliment témoin ou enrichie, démontre qu'il n'y a pas d'impact de l'enrichissement sur la composition biochimique en protéines, glucides et lipides des juvéniles de bars. La composition biochimique les indices de condition observés au cours de ces élevages sont en accord avec la bibliographie (Dias *et al.*, 1998; Perez and Oliva-Telez, 1999). Ainsi, ces données suggèrent que l'augmentation de poids observée, en présence des enrichissements LBBMA4 et LBBMA25, n'est pas liée à une augmentation du taux de graisse mais à une croissance homogène du poisson et à une augmentation de la taille du squelette. Ce même phénomène est observé chez le poisson, le barbu de rivière *Ictalurus punctatus* en présence de l'hormone de croissance bovine (Peterson *et al.*, 2004).

Une tendance, à un plus grand nombre de malformations, est observée chez les animaux nourris avec une alimentation non enrichie. Diverses anomalies physiques ont été décrites chez les larves et juvéniles de poissons (Cahu *et al.*, 2003). Naturellement, on trouve environ 4% de malformations corporelles chez des larves sauvages, au contraire des taux relativement élevés observés en éclosion (Boglione *et al.*, 2001). Cahu *et al.* (2003) ont démontré que les nutriments affectent le développement et en particulier la formation du squelette. De cette manière, un ajout d'hydrolysats de protéines en quantité modérée (12%) dans l'alimentation des larves, stimule le développement du squelette sans altérer la croissance (Cahu *et al.*, 2003).

L'ensemble des résultats porte à conclure que l'utilisation des ensilages en tant que complément alimentaire pour juvénile de bar est parfaitement adapté. En effet, l'utilisation d'un faible pourcentage d'ensilage (2 à 10%) dans l'alimentation de juvéniles (>500 mg) pendant quelques semaines (2 à 3 semaines) permet l'obtention d'animaux ayant un poids nettement supérieur (de 119 à 162%) aux animaux témoins. De plus, ils n'altèrent pas la survie, les indices de conditions et la qualité de chair.

La comparaison de l'ensilage de viscères de seiche LBBMA25 avec 2 hydrolysats de poissons commerciaux (DIELEN Laboratoires) permet de situer l'ensilage par rapport aux autres produits existants sur le marché. L'utilisation des enrichissements en tant que complément alimentaire à hauteur de 5% de l'alimentation, entraîne diverses réponses en terme de poids. Le pourcentage de poids par rapport aux animaux témoins en fin d'élevage est de 162, 138 et 75%, respectivement pour les enrichissements LBBMA25, Gabolysat et PC60. De plus, au cours de l'élevage le taux de survie est relativement similaire entre les différents lots. Ainsi, les animaux

du lot témoin, du lot recevant l'aliment LBBMA25 5% et du lot recevant l'aliment Gabolysat 5% ont un taux de survie de 56 à 57%. En revanche, ceux qui ont reçu l'aliment PC60 5%, ont une survie plus faible que les autres animaux. En effet, la survie n'est que de 45% pour les animaux recevant l'enrichissement PC60 à hauteur de 5%. L'utilisation des hydrolysats fabriqué par DIELEN Laboratoires, en complément alimentaire pour l'élevage de nombreuses espèces et en complément en alimentation humaine, a permis d'observer de bons résultats. En effet, que ce soit chez le porc, le poney, les bovins, le chien, la pintade ou le poisson, le Gabolysat, administré en complément dans l'alimentation, permet une augmentation significative de la croissance (Cottu, 1990; Dielen Laboratoires, 2005). Celle ci est comparable, notamment chez le veau, à celle obtenue avec l'utilisation d'anabolisant (Le Rouilly, 1980; Giard, 1996). De plus, le PC60, possède des propriétés anxiolytiques, démontrées chez le rat (Bernet *et al.*, 2000). Giard (1996) a démontré que le Gabolysat et le PC60 n'ont pas les mêmes effets *in vitro* sur des bio-essais de mollusques. En effet, le Gabolysat, au contraire du PC60, est capable d'augmenter l'incorporation de leucine tritiée dans les cellules du bord de manteau de la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* et les hémocytes de l'ormeau *Haliotis rufescens*. De plus, le Gabolysat et le PC60 sont tous deux capables d'augmenter la tension musculaire du rectum de la coquille Saint Jacques. Ainsi, les propriétés des lysats sont particulièrement variables en fonction de l'origine des tissus et de leurs lyses. Néanmoins, l'ensemble de ces données, permet de dire que l'ensilage LBBMA25 est tout à fait compétitif avec des hydrolysats commerciaux destinés à l'alimentation animale.

Les résultats obtenus sur les paramètres de croissance des juvéniles de bar *Dicentrarchus labrax* sont en accord avec la littérature. De cette façon, l'utilisation des co-produits des poissons peut permettre de produire des ingrédients capables de stimuler la croissance d'espèces élevées en aquaculture. Diverses recherches ont été effectuées concernant le rôle nutritif d'hydrolysats de poissons. Ces études ont montré que ces produits possèdent un ratio d'efficacité protéique élevé et une forte valeur nutritive. Chez les larves de bar, la substitution des protéines de farine de poisson par des produits hydrolysés permet une stimulation de leur développement et une augmentation du taux de survie (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Cahu and Zambonino-Infante, 2001). De plus, les ensilages de poissons utilisés en tant que base protéique alternative pour aliment en aquaculture montrent une haute digestibilité et permettent un remplacement efficace de la farine de poisson (Raa and Gildberg, 1982; Jackson *et al.*, 1984; Espe *et al.*, 1989). L'addition d'autolysat de poissons dans l'alimentation à hauteur de 10% s'avère efficace sur la survie et la croissance de juvénile de bar (de 400mg à 5g) (Metailler *et al.*, 1977). Les protéines hydrolysées sont d'abord utilisées pour leur valeur nutritive en tant que

complément alimentaire pour des individus ou organismes qui ne peuvent pas digérer des protéines natives (Silvestre, 1997; Tonheim *et al.*, 2005). Mais, les protéines alimentaires hydrolysées présentent ainsi des propriétés fonctionnelles particulièrement intéressantes et diversifiées. Pour une application alimentaire, les études ont montré que les hydrolysats protéiques doivent être très riches en peptides de faible poids moléculaire, spécialement en di et tri peptides (Silvestre, 1997). Par contre, une hydrolyse limitée permettra l'obtention d'hydrolysats contenant des peptides de plus grand poids moléculaire qui sont présumés être associés à des hydrolysats fonctionnels (Silvestre, 1997).

La Figure 67 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.

### Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 constituent un très bon enrichissement pour l'élevage de juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax*

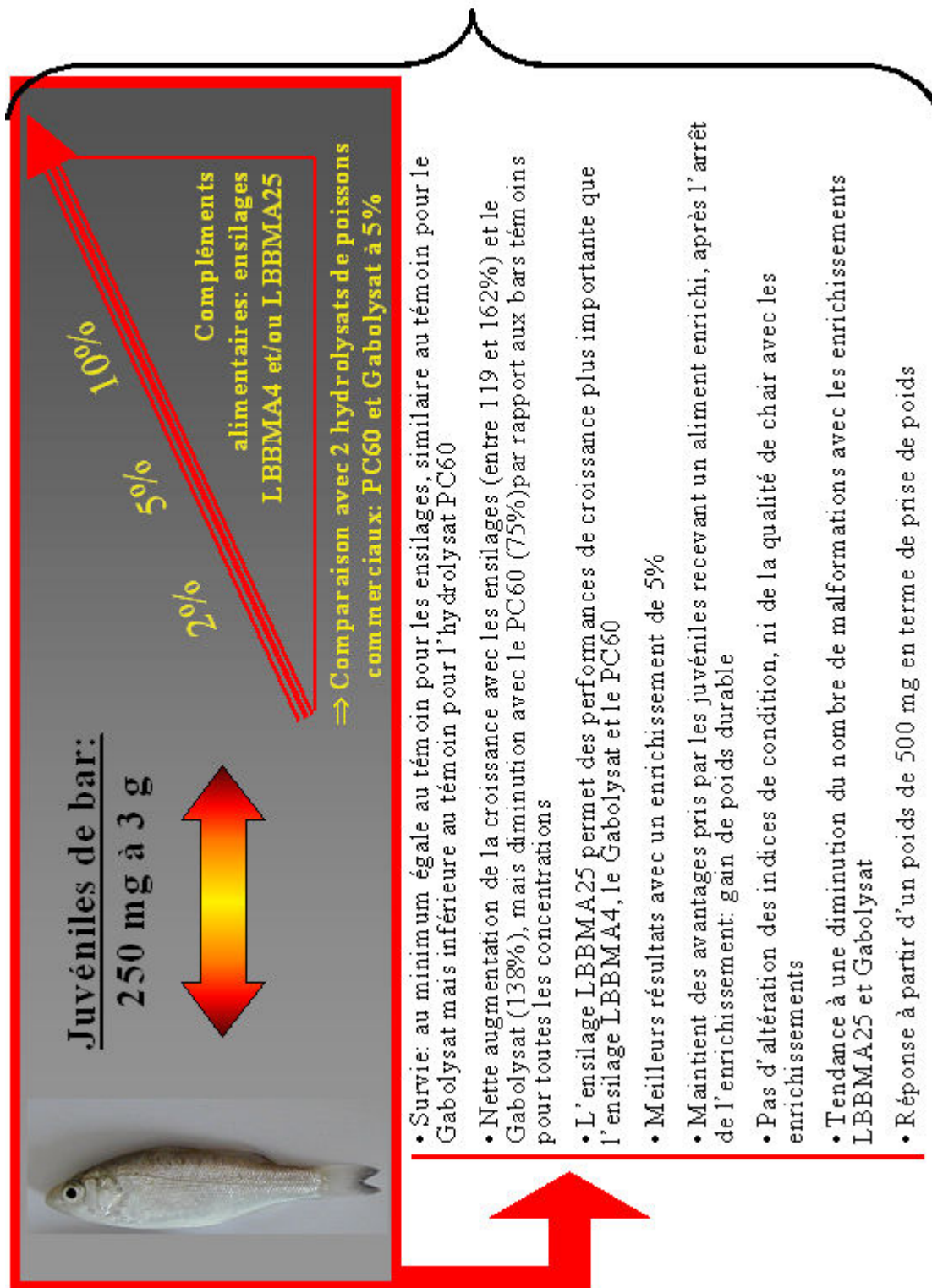


Figure 67: Synthèse des résultats obtenus concernant l'utilisation des ensilages en complément alimentaire des juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax*.

## V Conclusion

L'augmentation de la population humaine conduit à une forte demande en produits issus de la pêche, et par conséquent entraîne une intensification de la pêche (Sykes *et al.*, 2006). Depuis les années 1970, la consommation de poissons a doublé et la production aquacole tient une part de plus en plus importante (Sykes *et al.*, 2006). Au cours des dernières décennies, la participation de l'aquaculture à la production totale de poissons est passée de 6 à 30%. Cet accroissement rapide est dû à une combinaison d'effets : une augmentation de la population mondiale, une diminution des captures par la pêche traditionnelle et un changement de la consommation dans les pays développés (Sykes *et al.*, 2006). Face à une élévation de la consommation de poisson et à l'appauvrissement des ressources aquacoles, la production de poissons d'élevage à fort impact économique s'est accrue de manière importante. En effet, en 2001 l'aquaculture représentait 34% de la production de la pêche totale alors qu'en 1970 elle n'en représentait que 5,3% (Villeneuve, 2005). L'aquaculture européenne couvre actuellement en volume 4,4 % de la production mondiale (142,1 millions de tonnes), ce qui correspond à 8,2% de la valeur totale (61,5 milliards de dollars). De plus, sur les 210 espèces produites par l'aquaculture, 60 le sont en Europe. Les espèces marines les plus représentées sont les salmonidés, la daurade, le bar, le mullet et le turbot (Villeneuve, 2005). L'élevage du saumon est le plus important et il représente 57% de la production européenne totale qui est de 1,4 millions de tonnes. Il est important de noter qu'entre 2000 et 2004 la production de juvéniles de bar et de daurade a augmenté d'environ 30% pour atteindre 650 millions de juvéniles et que la France produit la majeure partie de ces alevins en Europe (Villeneuve, 2005).

Cependant, l'élevage des périodes larvaires et juvéniles, reste critique et associé à des mortalités importantes, en raison des nombreux changements morphologiques et fonctionnels en cours à ces stades. Le développement d'aliments adaptés aux différents stades des animaux est un élément important pour l'aquaculture. En effet, la stimulation de la croissance au cours de ces phases pourra réduire la durée de ces périodes critiques. De plus, l'aliment est un élément essentiel en aquaculture, puisqu'il est associé à la fois à la croissance, la santé et au coût de production des animaux (Turker *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces travaux, concernant l'utilisation des ensilages LBBMA4 et LBBMA25 en tant que complément alimentaire en alimentation aquacole, a permis d'observer l'effet des ensilages *in vivo* sur des mollusques, crustacés et poissons. Cette étude s'est donc portée sur l'impact de l'utilisation d'ensilages marins en tant qu'enrichissement de l'alimentation de post-larves ou de juvéniles en élevages expérimentaux. L'inclusion des ensilages dans l'alimentation



---

de post-larves de crustacés et de juvéniles de mollusques ou de poissons s'est avérée particulièrement intéressante. Ainsi, les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 introduit à un faible pourcentage dans l'aliment, pendant un temps court (quelques semaines) permettent : une forte stimulation de la croissance, un maintien ou une amélioration du taux de survie, une qualité de chair identique et une tendance à la diminution du taux de malformations des animaux de manière durable même après l'arrêt de l'enrichissement. En conclusion, les ensilages de co-produits issus de la transformation de la seiche *Sepia officinalis*, peuvent être inclus dans la formulation d'aliments pour jeunes animaux en aquaculture et permettre ainsi de très bonnes performances de production. Ces résultats sont très prometteurs pour la valorisation des co-produits issus de la transformation de la seiche. De cette manière, la valeur ajoutée à la transformation de la seiche serait importante. D'abord, en raison de la forte demande dans le domaine de l'aquaculture, c'est à dire par les aquaculteurs et en particulier par les fabricants d'aliments, de nouvelles sources de protéines animales pouvant remplacer les farines de poissons. Ensuite pour l'importante sollicitation en ingrédients à propriétés fonctionnelles (stimulation de la croissance, une augmentation de la survie, une diminution des malformations...) de la part du secteur aquacôle.



# Chapitre 4 : Recherche de molécules bio- actives dans les ensilages

FLEURY, C., LE BIHAN E. (co-authors), FROUEL, S., SERPENTINI, A., LEBEL, J. M., KOUETA N., (en préparation). Effect of silage supplementation on cell culture medium hemocytes. *Fish and shellfish immunology*.

LE BIHAN E., FROUEL, S., SERPENTINI, A., GIMAZANE J. P., LEBEL, J. M., NICOLAS J. L., KOUETA N., (en préparation). Modulation of digestive and immunity systems ontogeny by diet supplementation on the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Physiological and Biochemical Zoology*

Ce chapitre à fait l'objet d'une collaboration avec Christophe FLEURY, Stéphane FROUEL, Antoine SERPENTINI et Jean Marc LEBEL du LBBM UMR 100 Ifremer PE2M.

**Plan du chapitre 4:****I INTRODUCTION****II RECHERCHE DE MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA CROISSANCE**

## A. Introduction

## B. Matériel et méthodes

## 1. Matériel biologique

## 2. Isolation des cellules de la glande digestive

## 3. Mesure de la viabilité des cellules

## 4. Dosage des activités enzymatiques

5. Dosage de l'incorporation de la leucine  $^3\text{H}$ , des acides aminés  $^3\text{H}$  et de la thymidine  $^3\text{H}$ 

## 6. Analyses statistiques

## C. Résultats

## 1. Mesure de la viabilité des cellules

## 2. Dosage des activités enzymatiques

3. Dosage de l'incorporation de la leucine  $^3\text{H}$ , des acides aminés  $^3\text{H}$  et de la thymidine  $^3\text{H}$ 

## D. Discussion

**III RECHERCHE DE MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION**

## A. Introduction

## B. Utilisation d'un bio-essai "Artémie" pour la caractérisation de molécules à activités sécrétagogue

## 1. Introduction

## 2. Matériel et méthodes

## 3. Résultats

## 4. Discussion

C. Etude expérimentale de la régulation de la digestion chez les juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax*

## 1. Introduction

## 2. Matériel et méthodes

## 3. Résultats

## 4. Discussion

## D. Conclusion

**IV RECHERCHE DE MOLECULES BIO-ACTIVES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE**

## A. Introduction

B. Action de l'enrichissement LBBMA25 sur le système immunitaire de juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax*

## 1. Introduction

## 2. Matériel et méthodes

## 3. Résultats

## 4. Discussion

C. Recherche d'effets biologiques des ensilages sur des hemocytes d'ormeaux *Haliotis tuberculata*

## 1. Introduction

## 2. Matériel et méthodes

## 3. Résultats

## 4. Discussion

## D. Conclusion

**V. CONCLUSION**

## **I Introduction**

Les lysats sont utilisés dans de nombreuses applications, telles qu'en supplément dans l'alimentation humaine (Clemente, 2000), en aquaculture, en supplémentation de milieu de culture pour cellules isolées ou bactéries, mais aussi en industrie alimentaire comme agent liant, émulsifiant (Gildberg and Almas, 1986). De nombreux lysats contiennent des peptides actifs (Sato *et al.*, 1982) intervenants dans : l'effet de type facteurs de croissance, la stimulation de la synthèse protéique, le contrôle de la motilité intestinale, le déclenchement de sécrétion d'enzymes digestives, le contrôle de la vasodilatation, l'effet anxiolytique, l'effet antiprolifératif, l'effet antioxydant (Bernet *et al.*, 2000; Ravallec-Plé *et al.*, 2001; Ravallec-Plé and Van Wormhoudt, 2003; Guérard, 2004; Williams *et al.*, 2005; Picot *et al.*, 2006). Divers peptides et autres molécules bio-actives telles que des sécrétagogues, des molécules immuno-stimulantes et des facteurs de croissance montrent un intérêt spécifique pour l'aquaculture, les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Gildberg *et al.*, 1996; Ravallec-Plé *et al.*, 2001). Les molécules sécrétagogues telles que la gastrine ou la cholécystokinine possèdent un large spectre d'activités tel que : la stimulation de la synthèse protéique, le contrôle de la motilité intestinale et la sécrétion d'enzymes digestives (Gildberg *et al.*, 1996). Les immuno-modulateurs constituent un groupe de substances hétérogènes telles que des peptides, des  $\beta$ -glucanes, des liposaccharides (Gildberg *et al.*, 1996). Les facteurs de croissances sont définis comme un groupe d'agents régulateurs polypeptidiques. Ils contrôlent un ensemble de réponses cellulaires, telles que la multiplication des cellules ou la synthèse de l'ADN, par une série de mécanismes analogues à ceux d'hormones endocrines classiques (Ravallec-Plé *et al.*, 2001).

Dans la composition d'un lysat donné, on retrouve généralement toujours les mêmes peptides actifs. Le point déterminant est la répétitivité des conditions de lyse qui doivent toujours fournir des peptides de même taille (Ravallec-Plé *et al.*, 2001). Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ont une composition complexe : ils contiennent majoritairement des peptides de petite taille et des acides aminés résultant de l'autolyse ménagée des protéines. Ils possèdent, en outre, des acides gras essentiels, vitamines et minéraux. L'utilisation de ces cocktails en complément alimentaire pour l'élevage de mollusques, de crustacés ou de poissons, a permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, ces ensilages administrés en tant que complément dans le régime alimentaire, complet et équilibré, permettent une amélioration significative de la croissance. Celle-ci est comparable à celle obtenue avec l'utilisation d'anabolisant tel que le  $17\alpha$ -methyltestosterone sur le juvénile de saumon *Oncorhynchus masou* puisqu'un apport de cet anabolisant à 7 mg/Kg pendant 84 jours dans l'alimentation permet une croissance supérieure au

témoin de 32,6% (Santandreu and Diaz, 1994). Le mode d'action de ces produits sur la physiologie des animaux reste inconnu. Au vu de ces données, il a paru intéressant de rechercher si ces ensilages contiennent des molécules capables de moduler la croissance, la digestion (maturation du système digestif) ou encore les défenses immunitaires. Dans ce chapitre nous étudions l'implication des ensilages LBBMA4 et LBBMA25 dans la régulation des divers mécanismes cités ci-dessus. En effet, depuis plusieurs années, la présence de peptides biologiquement actifs dans la nourriture a été établie : ce sont les « formones » (Giard, 1996). Les exorphines qui proviennent de la digestion du gluten ou de la caséine par la pepsine, en sont les exemples les plus connus. Ces peptides exogènes présentent une activité biologique apparentée à celle des opioïdes (immuno-modératrices, hypertensives). D'autre part, des peptides produits pendant la digestion ou administrés oralement peuvent traverser la barrière intestinale et induire la même activité biologique qu'administrés par perfusion (Gardner, 1987).

## **II Recherche de molécules impliquées dans la croissance**

### **A. Introduction**

Parmi les facteurs de croissance connus chez les vertébrés, on distingue la superfamille des insulines et celle de l'EGF (Epidermal Growth Factor). La première est impliquée dans la croissance somatique et le métabolisme énergétique. La seconde présente une activité trophique et mitogène dépendante du type cellulaire considéré (Giard, 1996). Chez les vertébrés, l'insuline est essentiellement synthétisée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas puis libérée dans la circulation générale. Elle exerce une régulation de type endocrine sur le métabolisme des cellules et des tissus cibles : synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et du métabolisme glucidique. Les IGFs (Insulin-like Growth Factors) s'expriment eux de façon ubiquitaire, puisque si le foie est la principale source de l'IGF I circulant, les IGFs peuvent être sécrétés dans la plupart des tissus (Gricourt, 2002). Dans de nombreux types cellulaires, l'EGF active à la fois la phospholipase  $A_2$  afin de stimuler la sécrétion d'acide arachidonique et la production d'acide éicosanoïde (Canesi *et al.*, 1997). L'acide arachidonique et ses métabolites sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires, incluant la prolifération et la différenciation des cellules (Canesi *et al.*, 1997).

Chez les invertébrés, la présence de molécules apparentées à ces différents facteurs de croissance a été établie (Giard, 1996). Récemment, des homologues entre des peptides d'invertébrés et les insulines, IGFs et l'EGF (Epidermal Growth Factor), ont été identifiées, indiquant un haut degré de conservation au cours de l'évolution animale. Ainsi, Giard (1996) a mis en évidence que les facteurs de vertébrés, l'insuline, l'IGF I et l'EGF présentent une activité sur le métabolisme des cellules isolées de mollusques. En effet, toutes ces substances sont actives sur les cellules digestives de la coquille Saint-Jacques. En revanche, seules l'insuline et l'IGF I induisent une augmentation significative de la synthèse protéique des cellules du bord de manteau (Giard, 1996).

Le développement de la culture cellulaire a fourni un outil essentiel pour l'étude du métabolisme cellulaire *in vitro* (Cancre *et al.*, 1995). Chez les mollusques marins, aucune lignée cellulaire n'a pu être établie, et ceci malgré de nombreux essais *in vitro*. Cependant, des cultures primaires, issues de différents tissus, ont été développées avec succès afin d'étudier des processus spécifiques, notamment en vue d'analyser les problèmes liés à la physiologie des mollusques (Serpentini, 2001). Le choix de différents types cellulaires s'est ouvert aux chercheurs permettant ainsi la mise en place de plusieurs modèles. De nombreuses études ont porté sur l'étude du métabolisme des mollusques particulièrement en ce qui concerne le développement de cultures de cellules de la glande digestive de mollusques marins (Giard, 1996; Robledo and Carajaville, 1996; Le Bihan *et al.*, 2004).

Un bio-essai *in vitro* basé sur une suspension cellulaire de glande digestive de seiche *Sepia officinalis* peut être utilisé afin d'étudier l'effet de facteur de croissance sur différents paramètres. Dans cette étude, un bio-essai de cellules isolées de glande digestive de seiche servira à comparer l'effet sur ce type cellulaire de facteurs de croissance et des ensilages LBBMA4 et LBBMA25. Ce bio-essai est basé sur la viabilité cellulaire, le métabolisme glucidique et l'utilisation de marqueur radioactif tels que la leucine, les acides aminés, la thymidine ou l'aspartate marqués.

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Matériel biologique**

Les seiches utilisées sont des animaux adultes, pêchés en Manche au printemps 2005. Les individus (animaux matures ; longueur de manteau : 20-25 cm) sont placés pendant 72 heures à 15°C dans les structures d'élevage du CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) de

Luc sur Mer, de manière à obtenir des animaux qui ne soient pas stressés. Les seiches sont nourries avec des crabes vert *Carcinus maenas*.

## **2. Isolation des cellules de la glande digestive**

La méthode repose sur la capacité de réponse fonctionnelle de cellules dissociées (maintenues dans un milieu assurant leur survie) à une substance biologiquement active.

L'ensemble des manipulations est réalisé en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé est préalablement stérilisé par autoclave. La dissociation des cellules de la glande digestive est effectuée selon la méthode développée par Le Bihan *et al.* (2004). La glande digestive est prélevée sur 2 seiches et immédiatement placée dans le milieu de culture (Figure 68). Le milieu utilisé consiste en du L15 Leibovitz (10,88g/L) filtré sur un filtre de 0,22 $\mu$ m. Le pH est ajusté à 7,4 (Lenoir, 1989), la pression osmotique ajustée à celle des mollusques marins (1,1 Osmoles) avec du NaCl 0,34M et du KCl 50mM (Lenoir, 1989). Le milieu est stérilisé par filtration sur cartouche Millipore (0,22 $\mu$ m) et additionné d'antibiotiques (Gentamycine 2,5mg/100ml, Pénicilline 100 unités/100ml et Streptomycine 10mg/100ml) puis conservé à 4°C.

La glande digestive est reprise dans du milieu et découpée en petits morceaux. L'enzyme de dissociation (pronase à 0,1% *Streptomyces griseus* Boehringer) est ensuite ajoutée. La dissociation est réalisée dans la glace pendant 20 minutes sous agitation magnétique modérée. Après cette agitation, la suspension cellulaire est filtrée sur la toile à blutter de 100  $\mu$ m de maille, afin de retenir les agrégats ou les fragments non dissociés. L'ensemble des cellules est récupéré dans du milieu, remis en suspension et centrifugé pendant 4 minutes à 300 g. Le culot contenant les cellules dissociées est repris dans du milieu à 15°C et les cellules sont remises en suspension (le surnageant est éliminé). Le lavage des cellules est renouvelé deux fois afin d'éliminer l'enzyme de dissociation. Le culot est enfin repris dans un volume de milieu nécessaire pour obtenir une concentration cellulaire de  $30 \cdot 10^6$  cellules par ml. Ce volume est estimé à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules isolées sont alors placées dans des plaques multi-puits (24 puits). Après 4 heures, 10 $\mu$ l de solution à tester (facteur de croissance, ensilage ou milieu de culture pour le contrôle négatif) sont ajoutés. L'incubation s'effectue à 15°C pendant un temps variable (0 à 24 heures).



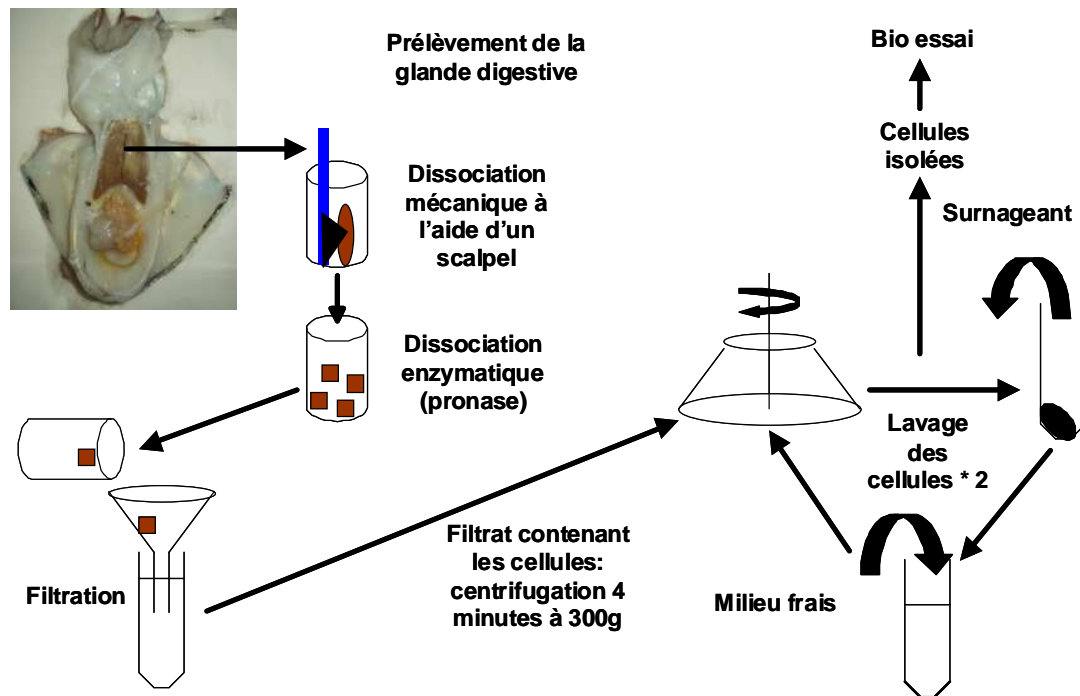


Figure 68: Principe du bio-essai de cellules isolées de glande digestive de seiche (Le Bihan *et al.*, 2004).

### **3. Mesure de la viabilité des cellules**

La viabilité des cellules est estimée par le test MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium), qui est un test enzymatique basé sur la détermination de l'activité des enzymes déshydrogénases mitochondriales (Mosmann, 1983). Ce test a été adapté pour évaluer la viabilité des cellules d'invertébrés marins (Naganuma *et al.*, 1994). Le test MTT consiste à incuber, pendant 30 minutes à température ambiante, 250µl de la suspension cellulaire en présence de 25µl d'une solution de MTT (75mg MTT/15ml de milieu) et de 275µl d'isopropanol à 0,04N d'HCl. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. L'absorbance est lue à 570nm avec une référence à 630nm.

### **4. Dosage des activités enzymatiques**

La suspension cellulaire est prélevée au niveau des plaques de culture après 30 minutes pour le dosage de l'activité pyruvate kinase (Canesi *et al.*, 1999) ou 180 minutes en ce qui concerne le dosage de l'activité de l'ATCase (Aspartate TransCarbamylase) (Koueta, 1990), puis centrifugée à 750g pendant 5 minutes à 15°C. Le surnageant est ensuite séparé du culot cellulaire, puis ils sont congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C dans l'attente des analyses enzymatiques.

L'activité pyruvate kinase est dosée en utilisant le produit de la réaction enzymatique (pyruvate) en tant que substrat pour une seconde enzyme : la lactate déshydrogénase (Bergeron and Herbland, 2001). L'activité de cette enzyme nécessite la présence du NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form) en tant que co facteur. Le NADH est oxydé au cours de la réaction enzymatique, sa disparition progressive peut être mesurée en suivant la diminution de son absorbance spécifique à 340nm. Les conditions standard de dosage sont les suivantes : tampon Tris-HCl à 80mM, pH 7,35, PEP (PhosphoEnolPyruvate) 4mM, KCl 67mM, MgCl<sub>2</sub> 6,7mM, ADP (Adénosine Di Phosphate) 2mM, NADH 0,15mM et 140 unités de pyruvate kinase-free LDH. La température d'incubation est de 25°C. L'activité enzymatique est proportionnelle au taux de changement de l'absorbance mesurée à 340nm, elle est exprimée en pourcentage d'augmentation de l'activité spécifique par rapport aux cellules du témoin ( $((\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ protéines du test}) / (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ protéines des cellules contrôles})*100)-100$ ).

L'aspartate transcarbamylase catalyse la seconde étape de la biosynthèse des bases pyrimidiques. L'activité de l'ATCase est mesurée en utilisant l'acide aspartique marqué au carbone 14 (acide L aspartique <sup>14</sup>C). Le substrat de l'enzyme est un mélange d'acide aspartique marqué, d'acide aspartique froid dans du tampon glycine-NaCl, pH 12,5 et de carbamyl phosphate dans du tampon Tris 0,4M, pH 9,5 (Koueta, 1990). La solution d'aspartate est composée de 3,15ml d'acide aspartique froid (6mg/ml) et de 1,5ml d'acide aspartique marqué (2 $\mu$ Ci/ml). La solution de carbamyl phosphate est préparée à 10mg/ml. L'extrait (100 $\mu$ l) est ajouté à la solution d'acide aspartique (100 $\mu$ l) et de carbamyl phosphate (50 $\mu$ l). L'ensemble est incubé pendant une heure à 35°C. La réaction est stoppée par l'ajout d'acide 3M et placée à 4°C. Après centrifugation (5000g pendant 20 minutes à 4°C), le produit de la réaction (carbamyl aspartate <sup>14</sup>C) est séparé de son précurseur par élution sur une colonne échangeuse d'ions, qui retient l'acide aspartique. La radioactivité présente dans l'éluant est estimée par comptage en présence de liquide à scintillation (500 $\mu$ l d'extrait élué + 2,5ml de liquide à scintillation). Pour chaque dosage, un contrôle est fait pour mesurer la quantité de carbamyl aspartate synthétisé de manière non enzymatique. L'activité de l'ATCase est exprimée en pourcentage de l'activité spécifique du témoin ( $((\text{nmol carbamyl aspartate synthétisée}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{protéines du test}) / (\text{nmol carbamyl aspartate synthétisée}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{protéines des cellules contrôles})*100)-100$ ).

La quantité de protéines est estimée selon la méthode de Lowry (1951).

### **5. Dosage de l'incorporation de la leucine <sup>3</sup>H, des acides aminés <sup>3</sup>H et de la thymidine <sup>3</sup>H**

Des marqueurs radioactifs sont utilisés pour observer les variations d'incorporation dues à l'activation ou l'inhibition de voies métaboliques, en présence ou en absence de diverses

molécules bio-actives. La nature de ces bio-marqueurs détermine les voies métaboliques impliquées (Giard, 1996).

La synthèse protéique est estimée via l'utilisation de la leucine tritiée ou d'acides aminés tritiés (121 Ci/mmol). Ainsi, l'incorporation de ces molécules marquées permet d'évaluer le métabolisme protéique à une période donnée, reflétant ainsi l'activité de synthèse des cellules. L'incubation se déroule à 15°C pendant 20 heures en tube stérile de 5ml. Chaque tube contient 500µl de suspension cellulaire à  $5.10^6$  cellules/ml, 50µl (1µCi) de marqueur radioactif et 100µl de facteurs de croissance ou d'ensilage (Giard, 1996).

La synthèse d'ADN est estimée via l'utilisation de la thymidine tritiée (35Ci/mmol). Ainsi, cette méthode permet une estimation de la synthèse d'ADN traduisant alors l'activité de prolifération des cellules. L'incubation se déroule à 15°C pendant 24 heures en tube stérile de 5ml. Chaque tube contient 500µl de suspension cellulaire à  $5.10^6$  cellules/ml, 50µl (1µCi) de marqueur radioactif et 100µl de facteurs de croissance ou d'ensilage (Giard, 1996).

Après incubation, 1ml d'acide trichloroacétique 10% est ajouté à la suspension cellulaire. Cette solution permet la rupture des parois cellulaires et la précipitation des macro molécules. L'ensemble est alors stocké à 4°C pendant une nuit. Puis, l'essai est centrifugé pendant 10 minutes à 1000g puis lavé avec 1ml de TCA 10%. Cette opération est renouvelée 3 fois. Le culot obtenu est ensuite solubilisé à l'aide de 500µl de KOH 0,3N et placé à 40°C pendant 1 heure. La radioactivité est alors estimée par comptage en présence de liquide à scintillation.

## **6. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés avec un écart type (n=6 pour chaque traitement). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey où les différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

## **C. Résultats**

### **1. Mesure de la viabilité des cellules**

Toutes les concentrations de facteurs de croissance ou d'ensilages testées entraînent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la viabilité cellulaire à l'exception de l'IGF I à 400nM qui n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire en comparaison aux cellules témoins (Tableau 27). De plus, il existe un effet/dose pour toutes les substances testées. En ce qui concerne les facteurs de croissance, ils impliquent un effet dose positif significatif ( $p < 0,05$ ) de la viabilité cellulaire

pour des concentrations de 50nM à 100nM. Cependant, ils provoquent un effet dose négatif significatif ( $p < 0,05$ ) pour des concentrations comprises entre 150nM et 400nM.

Une augmentation de la concentration en ensilage (de 31,25 à 500 $\mu$ g/ml) induit une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de l'effet positif obtenu sur la viabilité cellulaire. L'effet maximum est observé pour l'insuline utilisée à une concentration de 100mM et pour l'ensilage LBBMA25 à 31,25 $\mu$ g/ml, qui permettent une stimulation de la viabilité cellulaire de 139 et 124,4%, respectivement (Tableau 28).

## **2. Dosage des activités enzymatiques**

Les différents facteurs de croissance et ensilages testés induisent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité pyruvate kinase par rapport aux cellules du témoin et cela pour l'ensemble des concentrations testées (Tableau 27). Il y a un effet/dose pour l'ensemble des substances testées. En effet, une concentration plus élevée en facteurs de croissance ou en ensilages implique une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'effet positif observé sur l'activité de la pyruvate kinase. L'effet maximum observé se situe à 400mM pour l'EGF et correspond à une stimulation d'activité de 1230% par rapport aux cellules témoins.

Tous les facteurs de croissance testés provoquent une stimulation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité de l'ATCase en comparaison avec les cellules témoins (Tableau 28). Cependant, une concentration minimale est nécessaire pour stimuler l'activité de l'ATCase, mis à part pour l'EGF. En effet, la concentration minimale est de 200nM, 100nM, 125 $\mu$ g/ml ou 250 $\mu$ g/ml pour, respectivement, l'IGF I, l'insuline, le LBBMA4 et le LBBMA25. Un effet/dose est noté pour l'ensemble des substances testées. En effet, une augmentation de la concentration en facteurs de croissance ou en ensilages implique un accroissement significatif ( $p < 0,05$ ) de l'effet positif observé sur l'activité de l'ATCase. L'effet maximum est obtenu pour l'EGF à 400mM et permet une augmentation d'activité de 209,3% par rapport aux cellules témoins.

Tableau 27: Influence de l'EGF, l'IGF-I ou de l'insuline sur le MTT, l'activité pyruvate Kinase, l'incorporation de la leucine  $^3\text{H}$ , l'incorporation des acides aminés  $^3\text{H}$ , l'incorporation de la thymidine  $^3\text{H}$  et de l'activité de l'ATCase (% d'augmentation par rapport aux cellules témoins). \*: significativement différents des cellules témoins ( $p < 0.05$ ).

% d'augmentation par rapport aux cellules témoins	Concentration:	EGF	IGF-I	Insuline
MTT:	50 nM	69,17 ± 5.11 *	66,42 ± 5.19 *	82,71 ± 4.73 *
	75 nM	75,19 ± 4.93 *	76,69 ± 4.89 *	134,59 ± 3.68 *
	100 nM	87,97 ± 4.6 *	108,27 ± 4.15 *	139,10 ± 3.61 *
	150 nM	86,47 ± 4.63 *	99,25 ± 4.34 *	82,71 ± 4.73 *
	200 nM	68,42 ± 5.13 *	49,37 ± 5.78 *	40,60 ± 2.3 *
	400 nM	63,91 ± 5.27 *	14,29 ± 2.56	37,59 ± 3 *
Activité Pyruvate Kinase:	50 nM	209 ± 5.5 *	13 ± 1.1	299 ± 8.5 *
	75 nM	496 ± 7.4 *	139 ± 4.5 *	411 ± 6.7 *
	100 nM	826 ± 6.5 *	134 ± 5.1 *	368 ± 4.2 *
	150 nM	826 ± 11 *	257 ± 3.5 *	427 ± 7.5 *
	200 nM	762 ± 12.3 *	262 ± 6.6 *	538 ± 8.8 *
	400 nM	1230 ± 14.3*	671 ± 9.5 *	586 ± 6.5 *
Incorporation de leucine $^3\text{H}$ :	50 nM	14,93 ± 0.75 *	25,73 ± 0.25 *	28,75 ± 0.83 *
	75 nM	6,08 ± 0.23	20,84 ± 0.94 *	20,30 ± 0.83 *
	100 nM	18,66 ± 0.56 *	29,29 ± 0.21 *	29,10 ± 0.72 *
	150 nM	7,45 ± 0.83	21,11 ± 0.94 *	28,55 ± 0.7 *
	200 nM	8,90 ± 0.5	32,81 ± 0.4 *	18,30 ± 0.73 *
	400 nM	27,70 ± 0.75 *	32,90 ± 0.98 *	47,07 ± 0.7 *
Incorporation des acides aminés $^3\text{H}$ :	50 nM	33,86 ± 1.7	91,98 ± 1.02 *	59,68 ± 3.64 *
	75 nM	33,52 ± 2.54	71,11 ± 0.29 *	79,67 ± 0.93 *
	100 nM	87,63 ± 1.66 *	107,08 ± 2.17 *	124,55 ± 1.12 *
	150 nM	96,23 ± 0.6 *	118,72 ± 0.66 *	173,58 ± 2.05 *
	200 nM	88,72 ± 2.55 *	111,97 ± 2.93 *	161,94 ± 1.44 *
	400 nM	98,28 ± 1.41 *	139,76 ± 2.55 *	194,30 ± 1.34 *
Incorporation de la thymidine $^3\text{H}$ :	50 nM	34,86 ± 2.46 *	29,10 ± 1.11	86,34 ± 1.97 *
	75 nM	32,42 ± 0.22 *	45,36 ± 2.16 *	92,93 ± 1.35 *
	100 nM	78,72 ± 1.79 *	79,20 ± 1.1 *	109,77 ± 1.8 *
	150 nM	60,35 ± 0.52 *	91,03 ± 1.84 *	146,83 ± 3.11 *
	200 nM	75,42 ± 0.23 *	90,05 ± 0.64 *	148,32 ± 0.95 *
	400 nM	96,27 ± 1.74 *	102,04 ± 2.69 *	217,60 ± 2.68 *
Activité de l'ATCase	50 nM	35,48 ± 3.51 *	9,22 ± 1.4	8,41 ± 0.87
	75 nM	33,24 ± 0.92 *	5,35 ± 0.51	3,97 ± 0.33
	100 nM	55,22 ± 1.19 *	7,12 ± 1.3	25,75 ± 1.7 *
	150 nM	70,51 ± 2.25 *	6,34 ± 0.4	36,31 ± 1.12 *
	200 nM	141,7 ± 0.47 *	14,63 ± 0.25 *	43,6 ± 0.15 *
	400 nM	209,3 ± 1.35 *	41,01 ± 1.15 *	81,40 ± 2.71 *

Tableau 28: Influence des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 sur le MTT, l'activité pyruvate Kinase, l'incorporation de la leucine  $^3\text{H}$ , l'incorporation des acides aminés  $^3\text{H}$ , l'incorporation de la thymidine  $^3\text{H}$  et de l'activité de l'ATCase (% d'augmentation par rapport aux cellules témoins). \*: significativement différent des cellules témoins ( $p < 0.05$ ).

% d'augmentation par rapport aux cellules témoins	Concentration:	LBBMA4	LBBMA25
MTT:	31,25 $\mu\text{g/ml}$	84,06 $\pm$ 4.24 *	124,36 $\pm$ 6.5 *
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	78,65 $\pm$ 6.2 *	116,54 $\pm$ 3.85 *
	125 $\mu\text{g/ml}$	70,98 $\pm$ 6.1 *	90,83 $\pm$ 4.93 *
	250 $\mu\text{g/ml}$	63,31 $\pm$ 4.58 *	86,77 $\pm$ 4.6 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	61,35 $\pm$ 3.99 *	79,70 $\pm$ 4.63 *
Activité de la pyruvate Kinase:	31,25 $\mu\text{g/ml}$	103 $\pm$ 5.1 *	163 $\pm$ 5.5 *
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	154 $\pm$ 9 *	201 $\pm$ 3.1 *
	125 $\mu\text{g/ml}$	231 $\pm$ 7.1 *	233 $\pm$ 8 *
	250 $\mu\text{g/ml}$	240 $\pm$ 5*	310 $\pm$ 7.3 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	451 $\pm$ 10.4 *	495 $\pm$ 6.5 *
Incorporation de la leucine $^3\text{H}$ :	31,25 $\mu\text{g/ml}$	30,21 $\pm$ 0.9 *	24,80 $\pm$ 0.88 *
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	12,58 $\pm$ 0.59 *	29,11 $\pm$ 0.5 *
	125 $\mu\text{g/ml}$	15,98 $\pm$ 0.4 *	31,71 $\pm$ 0.97 *
	250 $\mu\text{g/ml}$	18,88 $\pm$ 0.15 *	29,11 $\pm$ 0.35 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	14,86 $\pm$ 0.37 *	31,71 $\pm$ 0.97 *
Incorporation des acides aminés $^3\text{H}$ :	31,25 $\mu\text{g/ml}$	80,55 $\pm$ 3.1 *	10,66 $\pm$ 0.63
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	117,22 $\pm$ 1.78 *	21,43 $\pm$ 0.66
	125 $\mu\text{g/ml}$	95,81 $\pm$ 1.62 *	61,00 $\pm$ 1.02 *
	250 $\mu\text{g/ml}$	141,38 $\pm$ 2.94 *	86,24 $\pm$ 1.7 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	174,76 $\pm$ 3.97 *	109,52 $\pm$ 2.94 *
Incorporation de la thymidine $^3\text{H}$ :	31,25 $\mu\text{g/ml}$	61,22 $\pm$ 1.75 *	42,69 $\pm$ 0.54 *
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	22,89 $\pm$ 2.46	56,44 $\pm$ 0.45 *
	125 $\mu\text{g/ml}$	84,73 $\pm$ 0.45 *	126,85 $\pm$ 0.95 *
	250 $\mu\text{g/ml}$	160,92 $\pm$ 2.99 *	123,09 $\pm$ 1.97 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	180,64 $\pm$ 1.13 *	149,73 $\pm$ 1.74 *
Activité de l'ATCase :	31,25 $\mu\text{g/ml}$	6,24 $\pm$ 0.54	4,78 $\pm$ 0.47
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	2,98 $\pm$ 0.61	5,08 $\pm$ 0.58
	125 $\mu\text{g/ml}$	14,39 $\pm$ 0.55 *	6,35 $\pm$ 0.45
	250 $\mu\text{g/ml}$	19,8 $\pm$ 0.63 *	16.85 $\pm$ 0.86 *
	500 $\mu\text{g/ml}$	41,41 $\pm$ 2.17 *	35,79 $\pm$ 2.21 *

### 3. Dosage de l'incorporation de la leucine $^3\text{H}$ , des acides aminés $^3\text{H}$ et de la thymidine $^3\text{H}$

Les différents facteurs de croissance et les ensilages testés induisent un accroissement significatif ( $p < 0,05$ ) de l'incorporation de la leucine tritiée par rapport aux cellules du témoin à l'exception de l'EGF à 75, 150 et 200mM qui n'a pas d'effet sur l'incorporation de la leucine tritiée en comparaison avec les cellules du contrôle (Tableau 27). Il n'y a aucun effet/dose pour l'ensemble des substances testées. L'effet maximum est observé pour l'insuline à 400nM, qui implique une augmentation d'incorporation de 47% par rapport aux cellules témoins.

Les différents facteurs de croissance et ensilages testés entraînent une élévation significative ( $p < 0,05$ ) de l'incorporation d'acides aminés à l'exception de l'EGF à 50nM, 75nM et le LBBMA25 à 31,25 et 61,5 $\mu$ g/ml par rapport aux cellules du témoin (Tableau 27 et Tableau 28). De plus, un effet/dose est obtenu pour l'ensemble des substances testées. Ainsi, une augmentation de la concentration en facteurs de croissance ou en ensilages provoque un accroissement significatif ( $p < 0,05$ ) de l'effet positif noté sur l'incorporation des acides aminés tritiés. L'effet maximum observé se situe à 400mM pour l'insuline et 500 $\mu$ g/ml pour le LBBMA4. Ils correspondent à une augmentation d'incorporation de 194,3% et 174,8%, respectivement, par rapport aux cellules témoins.

Les différents facteurs de croissance et les ensilages testés entraînent une élévation significative ( $p < 0,05$ ) de l'incorporation de la thymidine tritiée par rapport aux cellules du témoin à l'exception de l'IGF I à 50nM et du LBBMA4 à 62,5 $\mu$ g/ml (Tableau 27 et Tableau 28). Un effet/dose est observé pour l'ensemble des substances testées. De ce fait, une augmentation de la concentration en facteurs de croissance ou en ensilages implique une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'effet positif observé sur l'incorporation de la thymidine tritiée. L'effet maximum est constaté pour l'insuline à 400nM qui permet une stimulation de l'incorporation de la thymidine tritiée de 217,69% par rapport aux cellules témoins.

## **D. Discussion**

De nombreuses études ont été effectuées sur la haute valeur nutritionnelle de la farine de calmar en tant que source de protéines (Cruz and Guillaume, 1983; Cruz-Ricque *et al.*, 1989). Cruz et Guillaume (1983) ont conclu que l'effet promoteur de la croissance est dû à la fraction protéique contenue dans les tissus de calmar, suggérant ainsi la présence d'un facteur de croissance inconnu. De plus, les études menées sur l'effet des ensilages de viscères utilisées en tant qu'enrichissement de l'alimentation de juvéniles de seiches *Sepia officinalis* (Le Bihan *et al.*, 2006a), de post-larves de crevettes *Penaeus japonicus* ou de juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax* ont montré que les taux de conversion et de croissance sont fortement augmentés. De la même façon que pour la farine de calmar, l'hypothèse de la présence de facteurs de croissance dans les ensilages peut donc être émise. Ainsi, des études de biologie moléculaire menées sur des cellules d'invertébrés ont montré la présence de gènes homologues produisant à la fois des récepteurs aux facteurs de croissances et différentes protéines impliquées dans la transduction du signal médié par des tyrosines kinases (Canesi *et al.*, 1999). Les études biochimiques et

immunologiques effectuées sur des invertébrés marins suggèrent la présence de peptides, de type facteurs de croissance-like, jouant un rôle dans la mobilisation du glycogène, la stimulation de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (Danton *et al.*, 1996).

Cette étude montre que des facteurs de croissance de vertébrés, (l'insuline, l'IGF I, l'EGF) ainsi que les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 présentent une activité sur le métabolisme des cellules de mollusques.

Toutes les concentrations de facteurs de croissance et ensilages expérimentées induisent un accroissement de la viabilité cellulaire (à l'exception de l'IGF I à 400nM) en comparaison avec les cellules témoins. Il y a une dose dépendance des facteurs de croissance sur la viabilité cellulaire avec un effet/dose positif pour des concentrations comprises entre 50 et 100nM. De plus, ils entraînent un effet/dose négatif pour des concentrations de 150 à 400nM malgré une stimulation de la viabilité cellulaire par rapport aux cellules témoins. Concernant les ensilages un effet/dose négatif est toujours obtenu malgré une stimulation de la viabilité cellulaire en comparaison avec les cellules témoins. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence dans les ensilages de molécules hautement bio-actives ou présentes en forte concentration, correspondant à un équivalent de concentration en facteur de croissance de 150nM. L'insuline à 100nM et l'ensilage LBBMA25 à 31,25µg/ml permettent d'obtenir la plus forte viabilité soit 139 et 124,4%, respectivement. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont en corrélation avec ceux obtenus par Cancre *et al.* (1995). Ces derniers ont obtenu, sur des cellules isolées de l'hépatopancréas de crustacé, un taux de survie cellulaire plus élevé en supplémentant le milieu de culture avec des facteurs de croissance.

Le métabolisme des glucides est lui aussi stimulé par l'ajout de facteurs de croissance ou d'ensilages. De ce fait, l'activité pyruvate kinase, qui est une enzyme glycolytique clé, est stimulée en leur présence. De plus, la stimulation de cette activité est dépendante de la concentration en facteurs de croissance ou en ensilages. En dépit d'un effet maximal observé en présence d'EGF à 400nM, les ensilages, l'IGF I et l'insuline provoquent aussi une stimulation du métabolisme glucidique. Divers travaux rapportent l'effet hypoglycémiant d'insulines de vertébrés chez de nombreuses espèces de mollusques. De cette façon, l'insuline mammalienne provoque la diminution de la teneur en glucose circulant et augmente le contenu en glycogène dans la glande digestive et le muscle du gastéropode *Strophocheilus oblongus* (Marques and Falkmer, 1976) ainsi que dans le manteau du bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Madar *et al.*, 1979). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules isolées de glande digestive de



moule *Mytilus galloprovincialis*, où plusieurs facteurs de croissance (EGF, IGF I et insuline) entraînent une stimulation des enzymes glycolytiques (Canesi *et al.*, 1999).

Les facteurs de croissance et les ensilages testés provoquent une hypertrophie des cellules de la glande digestive de seiche, démontrée par l'accroissement de l'incorporation de la leucine et des acides aminés tritiés par les cellules de la glande digestive de seiche. Les composés testés induisent donc une synthèse protéique. Il existe une relation effet/dose sur l'incorporation des acides aminés tritiés pour toutes substances testées. En revanche, aucun effet/dose n'est observé en ce qui concerne l'incorporation de la leucine tritiée. Cette différence notable entre l'incorporation de la leucine et des acides aminés peut s'expliquer par l'existence dans les cellules de pool naturel de leucine, induisant un biais. L'effet maximal d'incorporation de la leucine tritiée est obtenu pour l'insuline à 400nM (47%). L'IGF I et les ensilages permettent également une bonne stimulation de cette incorporation (environ 20%). L'incorporation des acides aminés est maximale en présence d'insuline à 400nM ou d'ensilage LBBMA4 à 500µg/ml. De même que dans nos travaux, Cancre *et al.* (1995) ont montré que l'EGF est capable de stimuler *in vitro* la synthèse de protéines au niveau de cellules isolées à partir de l'hépatopancréas de *Palaemon serratus*. De plus, un peptide de la famille des insulines/IGF, est impliqué dans la régulation de la croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Gricourt *et al.*, 2003), dans la croissance et le développement de juvéniles d'escargot *Helix aspersa* (Gomot and Gomot, 1995). Les insulines/IGF semblent exercer cette fonction en stimulant la synthèse de protéines comme cela a déjà été démontré sur les cellules de manteau chez *Helisoma duryi* (Saleuddin *et al.*, 1992), *Mytilus edulis* (Kellner-Cousin *et al.*, 1994), et *Pecten maximus* (Giard *et al.*, 1998), ainsi que sur les cellules de la glande digestive chez *Pecten maximus* (Giard *et al.*, 1998). D'autre part, Giard (1996) a démontré que certains hydrolysats (de type Gabolysat, DIELEN Laboratoires) de poisson sont capables d'induire une stimulation *in vitro* de l'incorporation de leucine tritiée dans les cellules de bord de manteau et les hémocytes d'ormeau *Haliotis tuberculata* en culture.

Les facteurs de croissance et ensilages expérimentés induisent une hyperplasie illustrée par l'augmentation de l'incorporation de la thymidine tritiée et de l'activité de l'ATCase au niveau des cellules isolées de la glande digestive de seiche. Une augmentation de la concentration en facteurs de croissance ou en ensilages provoque une augmentation de la stimulation de l'activité de l'ATCase et de l'incorporation de thymidine. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont montré que l'ajout d'EGF dans le milieu de culture de cellules isolées de la glande digestive de moule permet une stimulation de la synthèse d'ADN (Canesi *et al.*, 1997).

De plus, le traitement d'hémocytes en culture avec de l'insuline porcine stimule l'incorporation de la leucine et de la thymidine tritiée. Cela reflète, dans une certaine mesure, une augmentation de la synthèse en protéines et en ADN (Lebel *et al.*, 1996).

Cette étude démontre que des facteurs de croissance de vertébrés (EGF, IGF et insuline) et les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 peuvent modifier l'activité métabolique des cellules digestives de mollusques. Des résultats similaires ont été obtenus par Giard (1996) sur la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*. Comme démontré par Giard (1996), ces résultats ne sont pas surprenants si l'on suppose que l'insuline et l'IGF I ont une activité biologique analogue aux peptides de mollusques tels que les insulines MIPs (Mollusc Insulin-like Peptides). Ainsi, chez le mollusque gastéropode *Lymnea stagnalis*, les MIPs ont été identifiées comme étant des neurohormones impliquées dans le contrôle de la croissance somatique et la formation de la coquille (Geraerts, 1976).

Dans cette étude, les ensilages ont un comportement proche de celui de facteurs de croissance. Giard (1996) a démontré que certains autolysats d'origine marine sont capables de stimuler l'incorporation de leucine tritiée *in vitro* sur des cellules primaires d'hémocytes d'ormeau *Haliotis tuberculata*. Les ensilages de co-produits de seiches peuvent à la fois stimuler l'hypertrophie et l'hyperplasie de cellules isolées.

La Figure 69 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.

Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ont un comportement proche de celui de facteurs de croissance sur les cellules isolées de la glande digestive de seiche *Sepia officinalis*

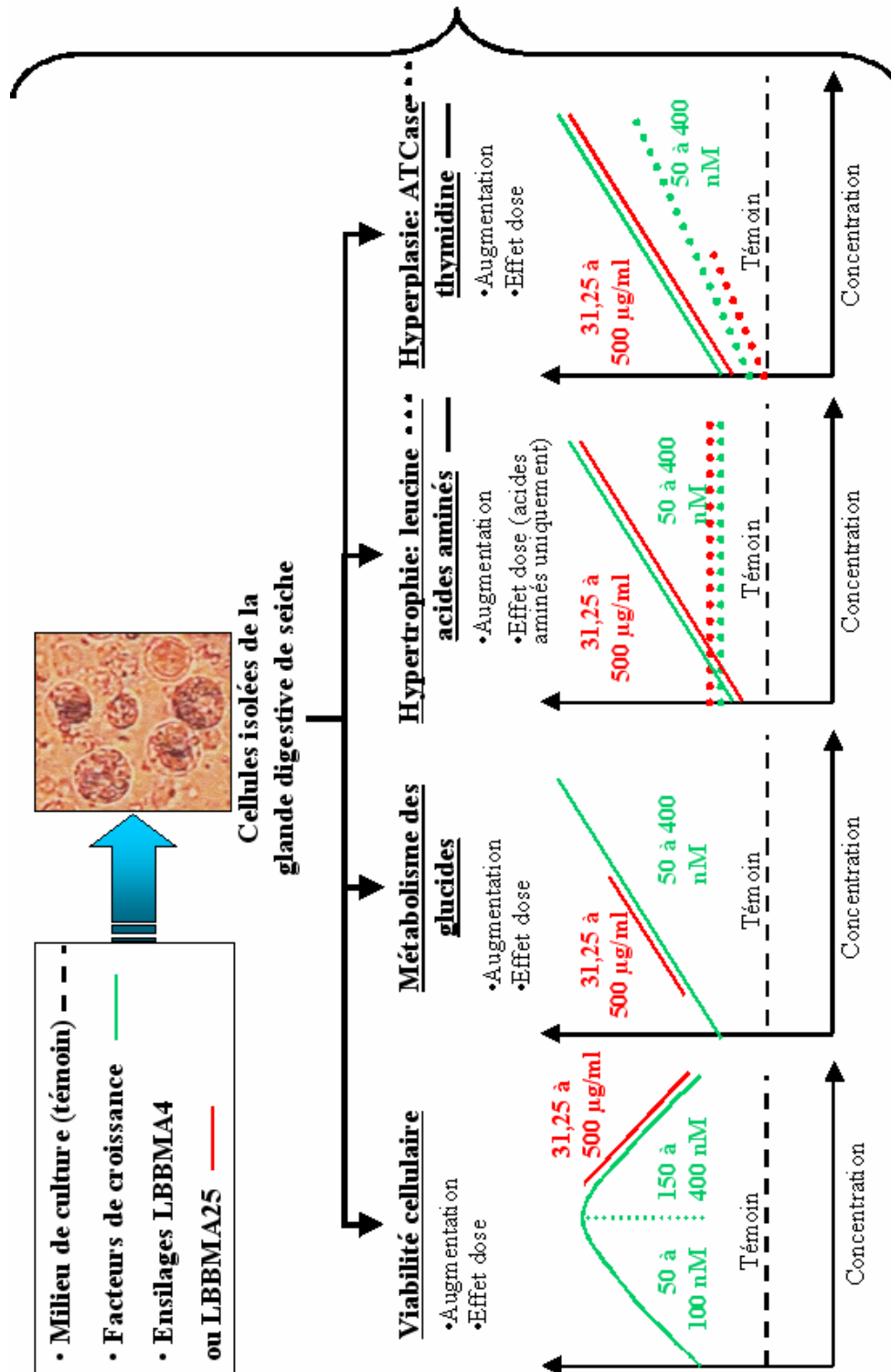


Figure 69: Schéma de synthèse de l'étude de l'effet des ensilages ou facteurs de croissance sur les cellules isolées de la glande digestive de seiche.

### **III Recherche de molécules impliquées dans la digestion**

#### **A. Introduction**

La digestion chez les larves et les juvéniles fait intervenir des mécanismes complexes impliquant à la fois une bonne maturation du système digestif, une bonne régulation de la synthèse et de la sécrétion des enzymes digestives.

Des études ont été menées concernant le processus de différenciation des fonctions digestives au cours du développement chez les larves et juvéniles de vertébrés tel que le bar *Dicentrarchus labrax* (Diaz *et al.*, 1989; Zambonino-Infante and Cahu, 1994; Dias *et al.*, 1998; Zambonino-Infante and Cahu, 2001; Cahu *et al.*, 2004), l'anguille *Anguilla japonica* (Chiu and Pan, 2002) ou d'invertébrés tels que la seiche *Sepia officinalis* (Boucher-Rodoni, 1982; Boucaud-Camou *et al.*, 1985; Perrin, 2004), la crevette *Penaeus monodon* (Kumlu *et al.*, 1992). Ces phénomènes sont bien connus chez les vertébrés. Différents facteurs nutritionnels sont impliqués dans la différenciation et la maturation du tractus digestif. De nombreux composés tels que : les hormones, les neurohormones, les neurotransmetteurs et ARNm, codant pour des facteurs de croissance et d'autres composés, sont déposés dans le vitellus par la femelle chez les poissons marins (Kim and Brown, 1999). Ces composés régulateurs sont particulièrement importants au cours du développement ontogénique. Bien que l'ontogenèse du système digestif soit déterminée génétiquement, le processus de maturation du système digestif peut être stoppé ou au contraire stimulé lorsque les larves ou juvéniles reçoivent une alimentation adéquate (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). Ainsi, les nombreuses adaptations structurales de l'intestin des larves et juvéniles de poissons au cours de leur développement sont caractéristiques de leurs adaptations fonctionnelles aux aliments et à la ration (Govoni *et al.*, 1986).

De plus, il est admis que l'obtention d'un taux de croissance optimal est fonction des capacités digestives. Celles-ci doivent pouvoir fournir le matériel requis pour supporter la synthèse des protéines des tissus (Blier *et al.*, 2002). En effet, différents travaux ont démontré que l'activité de la trypsine a une influence sur le taux de croissance et sur l'efficacité de la conversion des aliments (Lemieux *et al.*, 1999; Blier *et al.*, 2002). De nombreuses études antérieures ont montré la capacité des larves et juvéniles à réguler l'activité des enzymes digestives en fonction de leur régime alimentaire. Ainsi, Perrin (2004), a démontré que chez les juvéniles de seiche *Sepia officinalis*, l'utilisation d'une alimentation congelée entraîne le maintien d'une importante activité spécifique des phosphatases acides et freine donc la

maturation du système digestif. Ainsi la régulation des synthèses et sécrétions d'enzymes afin de permettre la métabolisation et l'utilisation des composés de l'aliment selon les besoins de l'animal, est une fonction normale (Zambonino-Infante and Cahu, 1994; Caruso *et al.*, 1996).

L'objet de cette étude est d'observer l'effet des ensilages LBBMA4 et LBBMA25 sur la digestion, la sécrétion des enzymes digestives et la maturation du système digestif, de larves et de juvéniles d'invertébrés ainsi que de vertébrés.

## **B. Utilisation d'un bio-essai "Artémie" pour la caractérisation de molécules à activités sécrétagogue**

### **1. Introduction**

*Artemia salina* est un crustacé branchiopode, possédant un corps allongé, formé d'un grand nombre de segments et dépourvu de carapace. Il est caractérisé par ses appendices natatoires aplatis en lamelles minces lobées servant à la locomotion, la respiration et la nutrition. Son abdomen est dépourvu d'appendices, il possède une paire d'yeux pédonculés et les sexes sont séparés. Le développement des nauplii en adulte comporte 15 stades successifs au cours desquels on observe : un allongement de l'abdomen, l'apparition progressive des thoracopodes et le début du fonctionnement du tube digestif car le nauplius ne s'alimente pas dès la naissance. Chez l'artémie, la filtration est continue et non sélective puisque toutes les particules de tailles adaptées sont ingérées. L'artémie est capable de vivre dans des conditions environnementales très variables : eau à diverses salinités, fluctuation de la température, réserves alimentaires changeantes, oxygénation variable (MacRae, 2003). De plus, la production des nauplii d'artémies par incubation des cystes en eau de mer est particulièrement simple (Lavens *et al.*, 1986). De nombreuses études ont été menées sur cet organisme hautement adaptable. En effet, son adaptabilité, son cycle court, sa petite taille et sa facilité d'obtention (pas de contrainte de reproduction) en font un très bon animal de laboratoire permettant d'effectuer des études « *in vivo* et *in vitro* » simples.

Alors que les mécanismes du contrôle de la digestion sont bien établis chez les vertébrés, les informations concernant les molécules impliquées dans la régulation de la digestion chez les invertébrés restent fragmentaires. Ainsi, il existe peu de données relatant la caractérisation biologique de neuropeptides impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'enzymes digestives (Favrel *et al.*, 1991; Giard, 1996). Cette situation est la conséquence de la diversité et de la complexité des organes digestifs des invertébrés. Chez les insectes, la digestion est

principalement régulée au niveau de l'intestin moyen. Cependant, l'épithélium de l'intestin moyen, qui est impliqué dans la synthèse et la sécrétion d'enzymes digestives, n'est pas innervée par des neurones ce qui suggère l'existence de mécanismes non neuraux, impliqués dans la digestion (Sakai *et al.*, 2006). Les investigations menées chez les insectes ont montré l'existence de plusieurs molécules impliquées dans la régulation de la sécrétion des enzymes digestives telles que : les leucosulfakinines ou encore les calisulfakinines qui sont des membres de la famille des CCK/gastrine (Sakai *et al.*, 2006). Chez les mollusques, la digestion implique principalement la glande digestive qui est l'organe clé de la synthèse et de la sécrétion des enzymes digestives. Chez les mollusques, la sérotonine et la dopamine sont les principales amines biogènes présentes dans le système nerveux (Giard, 1996). De plus, des peptides apparentés au FMRFamide sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'enzymes digestives chez la coquille Saint Jacques (Giard, 1996). Cette réponse présente de nombreuses similitudes avec la réponse obtenue chez les vertébrés avec la cholécystokinine (Giard, 1996). Enfin, Giard (1996) a mis en évidence que des facteurs de croissance de vertébrés, l'insuline et l'IGF I présentent une activité sur le métabolisme des cellules digestives de mollusques. Chez les crustacés, la digestion des nutriments est régulée par l'hépatopancréas, qui produit diverses enzymes telles que l'amylase, des protéases et des lipases. L'hépatopancréas est responsable de la régulation de la digestion et de l'absorption des nutriments. Différentes hormones gastro-intestinales de vertébrés telles que la CCK, la gastrine ou la sécrétine sont capables de stimuler la libération d'enzymes digestives au niveau de l'hépatopancréas de crustacés (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999). De plus, divers auteurs ont caractérisé des molécules gastrines/cholécystokinines-like chez des crustacés (Favrel *et al.*, 1987; Favrel *et al.*, 1991). Ces données laissent à penser que les crustacés possèdent des facteurs endogènes proches des hormones de vertébrés puisqu'ils ont des récepteurs capables d'accepter ces hormones (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999).

## **2. Matériel et méthodes**

### **a. Matériel biologique**

Le bio-essai utilisé a été développé par Frouël *et al.* (2005). Il a été mis en place afin de déterminer l'effet de molécules sur le métabolisme de nauplii d'artémie en les distinguant des simples effets liés à la prise alimentaire. Les différents tests sont effectués sur des animaux âgés de 4 jours, recevant une alimentation *ad libitum* qui peut être adjuvée par des hormones, des ensilages ou des fractions à hauteur de 5% dans l'eau de mer. Cet ajout se fait au moment  $T_0$  et les analyses des activités enzymatiques après 5h30 de filtration des métonauplii.

Les cystes d'*Artemia salina* (0,5g/L) sont mis en volume de 1 litre d'eau de mer stérile artificielle (30g/L), pH 8,3 à 27°C, en présence d'un bullage et d'un éclairage constant (Frouël *et al.*, 2005). Après 24 heures d'incubation, les nauplii sont séparés des cystes éclos par décantation et aspiration des cystes. En effet, les cystes vides se placent à la surface tandis que les nauplii sont attirées par une source lumineuse placée en bas de la bouteille d'incubation. A partir du 3<sup>ème</sup> jour (apparition de la bouche), les métanauplii sont alimentés deux fois par jour à l'aide de 500µl de microalgues commercialisées (Liquizell à 1µg/ml) (Figure 70). Au 4<sup>ème</sup> jour, les métanauplii sont alimentées, comptées (55 à 65 artémies/ml) et placées immédiatement en microplaques de 24 puits (volume de nauplii de 1,9ml). Puis, sont ajoutés dans les puits, 100 µl des produits à tester (ensilages, fractions, hormones ou eau de mer stérile pour le contrôle négatif). Les microplaques sont alors placées en incubation pendant 5h30 à 27°C, en présence d'un bullage et d'un éclairage constant (Frouël *et al.*, 2005). A la fin de l'incubation, les nauplii sont prélevés, broyés et congelés à -80°C dans l'attente des dosages.

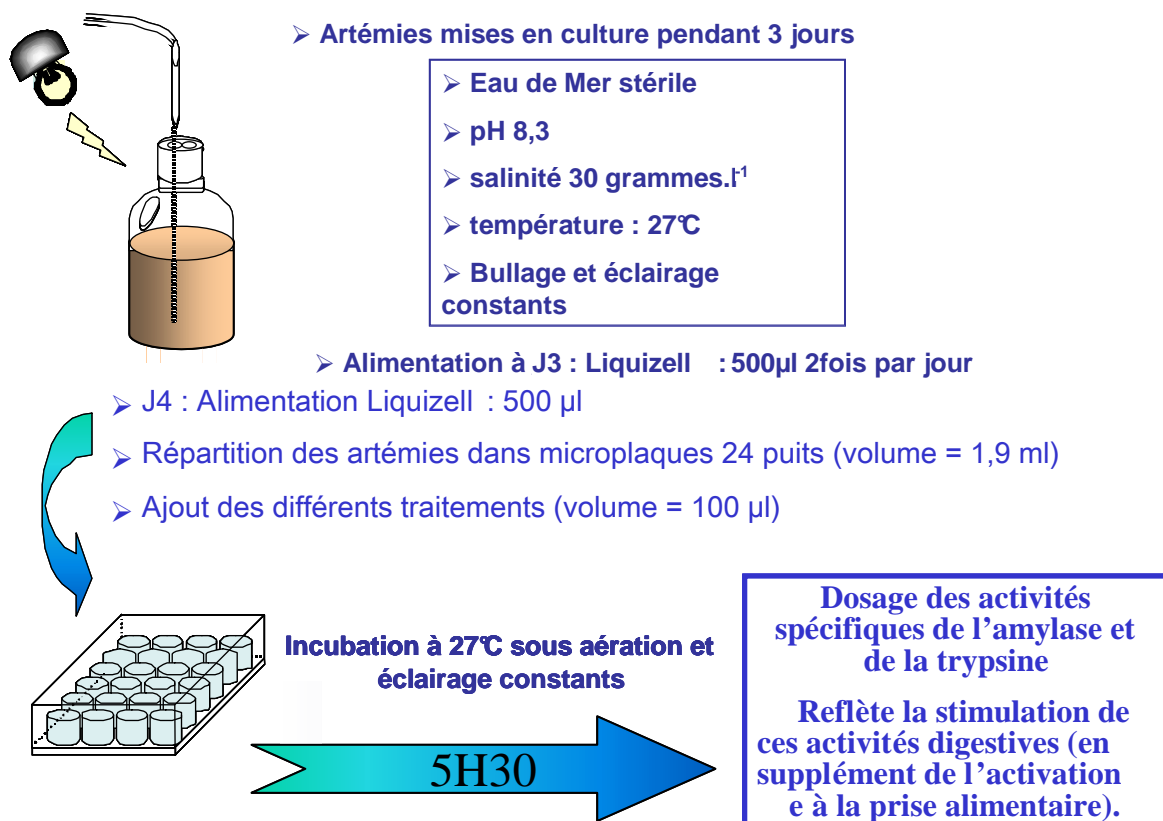


Figure 70: Principe du bio-essai d'*Artemia salina* (Frouël *et al.*, 2005).

Les différents stades des nauplii sont bien définis par Sorgeloos (2006) qui décrit 4 stades différents (Figure 71). Au stade E-1 on observe un embryon éclos, soit 24 heures après

l'hydratation des cystes. Ce premier stade correspond à des embryons entourés par une membrane d'éclosion, chez lesquels seul l'œil nauplien peut être observé. Puis différents appendices vont se développer et le nauplius perd sa membrane d'éclosion. Ce premier stade correspond à des animaux qui ne se nourrissent pas, ils consomment leurs réserves internes de vitellus, leur tube digestif est clos. Les stades nauplii correspondent à des stades possédant la fonction de locomotion et d'alimentation, les larves sont colorées en brun orange due à la présence du vitellus. Au cours de ces stades, apparaissent des appendices : les antennes qui permettent la locomotion, les antennules secondaires et les mandibules rudimentaires, ainsi que les ocelles rouges. A la fin de ces stades naupliens, les larves possèdent un système digestif fonctionnel. Puis, apparaissent les stades métanauplii au cours desquels l'abdomen s'allonge. Les particules alimentaires sont collectées à partir du milieu à l'aide des antennes, il y a une différenciation des thoracopodes, apparition des métamères thoraciques. Alors des changements importants interviennent, avec l'apparition du stade zoé et de la maturation sexuelle. A ce stade, les artémies possèdent 11 paires de thoracopodes et une paire d'yeux.

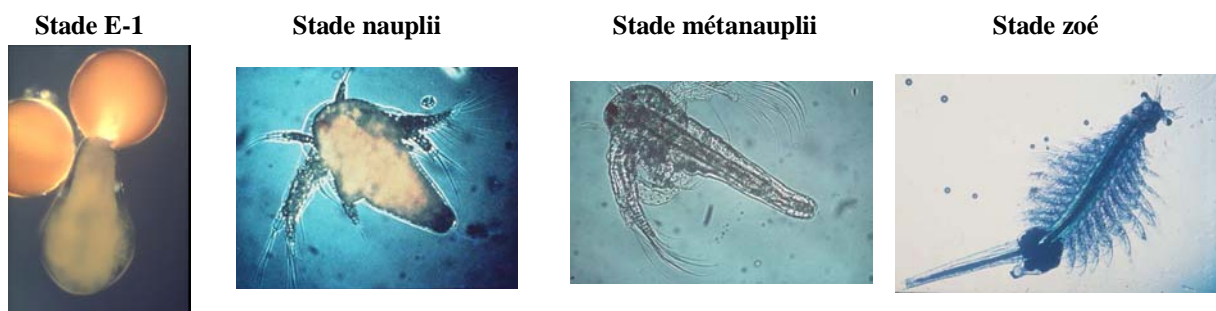


Figure 71: Différents stades de nauplii d'*Artemia salina* au cours de son développement (Sorgeloos, 2006).

Pour le bio-essai, le stade métanauplius a été retenu car c'est un stade obtenu de façon homogène à J4, facilement caractérisable, où les artémies possèdent un système digestif fonctionnel (Frouël *et al.*, 2005).

#### b. Analyses enzymologiques

L'activité de l'amylase et de la trypsine est mesurée selon les méthodes développées antérieurement (chapitre 1, II).

La quantité de protéines est évaluée selon la méthode de Lowry (1951) développée préalablement (chapitre 1, II).



c. Techniques séparatives et préparation des produits et fractions à tester

La séparation des différentes molécules présentes dans les ensilages permettra de caractériser la fraction impliquée dans la stimulation de la sécrétion d'enzymes digestives.

d. Extraction

L'extraction des glucides a été accomplie selon la méthode développée précédemment (chapitre 1, II) (Staats *et al.*, 1999).

L'extraction des lipides a été effectuée selon la méthode développée antérieurement (chapitre 1, II) (Bligh and Dyer, 1959).

e. Digestion des protéines

La digestion *in vitro* des protéines a été exécutée selon la méthode développée préalablement (chapitre 1, III) (Ali *et al.*, 2003).

f. Séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire

La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire a été effectuée selon la méthode développée précédemment (chapitre 1, II), en utilisant une colonne sephadex G50. chaque fraction recueillie contient 500µl de volume pour un volume total de 10ml.

g. Analyses statistiques

Les résultats sont donnés avec une déviation standard (n=10 pour chaque test). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey lorsque des différences ( $p < 0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

### **3. Résultats**

a. Effet dose des ensilages ou molécules testées sur l'activité des enzymes digestives

L'activité de l'amylase est stimulée en présence des 4 lysats testés (LBBMA4, LBBMA25, Gabolysat, PC60) (Tableau 29). Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 accroissent de manière significative ( $p < 0,05$ ) l'activité de l'amylase pour toutes les concentrations testées. En revanche, l'activité de l'amylase n'est stimulée significativement ( $p < 0,05$ ) que pour une dose minimale de 0,00001g/L de Gabolysat ou de PC60. Dans tous les cas, la réponse en terme d'activité amylosique est fonction de la concentration en lysat. En effet, une augmentation de la concentration en lysat entraîne un accroissement plus importante de l'activité de l'amylase. On note un maximum de stimulation de 187% pour le PC60 à 1g/L.

Tableau 29: Activité de l'amylase en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en lysats. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Concentration (g/L)	LBBMA4	LBBMA25	Gabolysat	PC60
1	163 ± 5,63*	168 ± 4,15*	164 ± 5,8*	187 ± 8,6*
0,05	142 ± 7,45*	161 ± 4,9*	166 ± 4,7*	177 ± 5,4*
0,02	142 ± 2,17*	144 ± 3,14*	156 ± 6,8*	163 ± 4,5*
0,01	126 ± 1,3*	131 ± 1,05*	118 ± 3,7*	122 ± 3,6*
0,001	124 ± 2,09*	130 ± 4*	109 ± 5,4	120 ± 5,6*
0,0001	117 ± 4,13*	111 ± 2,4*	111 ± 3,3*	114 ± 3,5*
0,00001	115 ± 1,35*	115 ± 1,69*	105 ± 3,6	107 ± 2,5

L'activité de la trypsine est stimulée en présence des 4 lysats testés (LBBMA4, LBBMA25, Gabolysat, PC60) (Tableau 30). Les ensilages LBBMA4, LBBMA25 et le lysat PC60 stimulent de manière significative ( $p < 0,05$ ) l'activité de la trypsine pour toutes les concentrations testées. Par contre, l'activité de la trypsine n'est stimulée significativement ( $p < 0,05$ ) que pour une dose inférieure à 0,01 g/L de Gabolysat. Dans tous les cas, la réponse en terme d'activité trypsique est fonction de la concentration en lysat. Ainsi, une augmentation de la concentration en lysat entraîne une stimulation moins importante de l'activité de la trypsine. On observe donc un effet dose négatif. De plus, on remarque un maximum de stimulation de 161, 156 et 158% respectivement pour les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ainsi que le PC60 à 0,00001g/L.

Tableau 30: Activité de la trypsine en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en lysats. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Concentration (g/L)	LBBMA4	LBBMA25	Gabolysat	PC60
1	133 ± 4,8*	129 ± 4,7*	108 ± 1,6	118 ± 3,5*
0,05	130 ± 2,6*	129 ± 1,3*	109 ± 3,6	122 ± 5,6*
0,02	135 ± 6*	133 ± 1,4*	107 ± 2,7	132 ± 4,4*
0,01	143 ± 3,6*	141 ± 2*	132 ± 4,8*	144 ± 2,2*
0,001	164 ± 6,2*	151 ± 1*	138 ± 3,7*	154 ± 1,4*
0,0001	164 ± 4,7*	151 ± 3,2*	138 ± 6,5*	159 ± 3,2*
0,00001	161 ± 7,44*	156 ± 1,69*	139 ± 3,4*	158 ± 1,8*

L'activité de l'amylase est significativement stimulée ( $p < 0,05$ ) en présence de l'insuline et de la gastrine (Tableau 31). La gastrine et l'insuline entraînent une augmentation significative de l'activité de l'amylase ( $p < 0,05$ ) pour toutes les concentrations testées. De plus, il y a une augmentation de la stimulation observée avec une augmentation de la concentration en hormones. On note un maximum de stimulation de 146% pour l'insuline à  $10^{-2}$ M.

Tableau 31: Activité de l'amylase en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en hormones. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Concentration (M)	Insuline	Gastrine
$10^{-10}$	-	$111 \pm 1,22^*$
$10^{-9}$	-	$120 \pm 0,41^*$
$10^{-8}$	$118 \pm 1,26^*$	$116 \pm 0,86^*$
$10^{-7}$	$118 \pm 6,47^*$	$116 \pm 1,3^*$
$10^{-6}$	$115 \pm 2,88^*$	$118 \pm 1,68^*$
$10^{-5}$	$114 \pm 0,92^*$	$131 \pm 0,84^*$
$10^{-4}$	$122 \pm 1,55^*$	$133 \pm 0,86^*$
$10^{-3}$	$120 \pm 0,65^*$	-
$10^{-2}$	$146 \pm 1,29^*$	-

L'activité de la trypsine en pourcentage par rapport à l'activité de la trypsine dosée dans les artémies témoins (avec eau de mer) est représentée dans le Tableau 32. L'activité de la trypsine est significativement stimulée ( $p < 0,05$ ) en présence de l'insuline et de la gastrine. L'insuline induit une augmentation significative de l'activité de la trypsine ( $p < 0,05$ ) pour toutes les concentrations testées. En revanche, une concentration inférieure à  $10^{-5}$ M est nécessaire pour augmenter significativement ( $p < 0,05$ ) l'activité de la trypsine. De plus, il y a une diminution de la stimulation observée avec une augmentation de la concentration en hormones. On observe donc un effet dose négatif. Enfin, on note un maximum de stimulation de 128% pour la gastrine à  $10^{-9}$ M.

Tableau 32: Activité de la trypsine en pourcentage de l'activité des témoins en fonction de différentes concentrations en hormones. \* : significativement différent du témoin ( $p < 0,05$ ).

Concentration (M)	Insuline	Gastrine
$10^{-10}$	-	$121 \pm 1,6^*$
$10^{-9}$	-	$128 \pm 3,7^*$
$10^{-8}$	$159 \pm 2,4^*$	$117 \pm 2,8^*$
$10^{-7}$	$121 \pm 2,5^*$	$117 \pm 2,2^*$
$10^{-6}$	$112 \pm 1,9^*$	$115 \pm 1,9^*$
$10^{-5}$	$116 \pm 2,1^*$	$108 \pm 1,1$
$10^{-4}$	$111 \pm 1,1^*$	$107 \pm 1,4$
$10^{-3}$	$120 \pm 0,9^*$	-
$10^{-2}$	$116 \pm 0,8^*$	-

#### b. Caractérisation des molécules impliquées dans la stimulation de l'activité des enzymes digestives

L'activité de la trypsine est significativement stimulée ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin en présence des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25, mais aussi en présence de la fraction contenant les protéines digérées *in vitro* (Figure 72). En revanche, les fractions contenant les glucides et les

lipides issus des ensilages n'entraînent aucune stimulation de l'activité de la trypsine en comparaison avec les artémies témoins.

L'activité de l'amylase est significativement stimulée ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin en présence des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25, mais aussi en présence de la fraction contenant les protéines digérées *in vitro* (Figure 72). En outre, les fractions contenant les glucides et les lipides issus des ensilages n'entraînent aucune stimulation de l'activité de l'amylase en comparaison avec les artémies témoins.

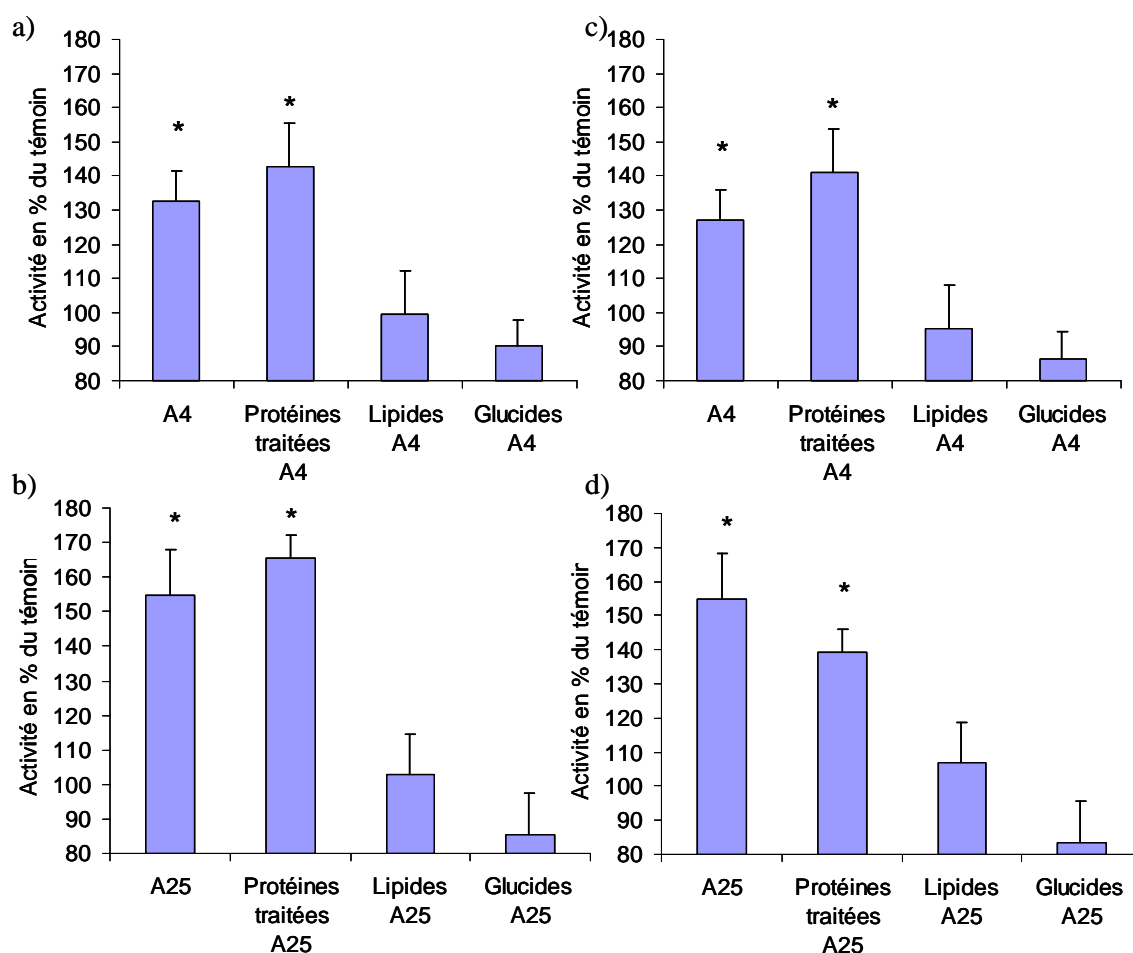


Figure 72: a) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 testé. b) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 testé. c) Activité de l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 testé. d) Activité de l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 testé.

### c. Caractérisation des fractions protéiques impliquées dans la stimulation de la sécrétion des enzymes digestives

La séparation des protéines contenues dans les ensilages permet de caractériser les fractions protéiques impliquées dans la sécrétion des enzymes digestives. La Figure 73

correspond à la répartition en poids moléculaire des protéines et peptides contenus dans les fractions.

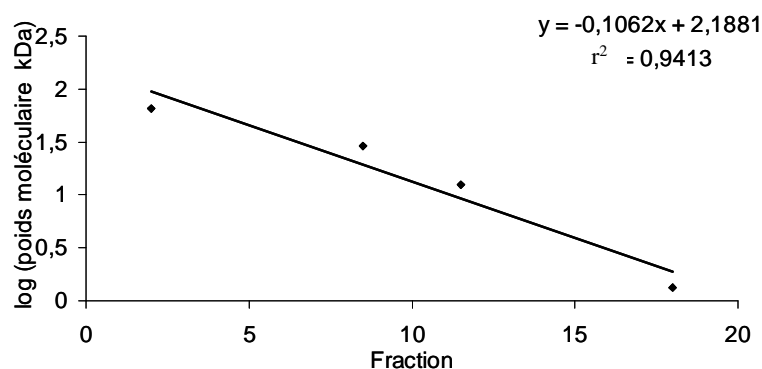


Figure 73: Répartition en poids moléculaire des protéines en fonction de la fraction.

Parmi les différentes fractions issues de la séparation de l'ensilage LBBMA4, seules les fractions de 14 à 18, soit des molécules de poids moléculaire compris entre 1,89 et 5,02 kDa, sont capables de stimuler l'activité de la trypsine des artémies en comparaison avec les animaux témoins (Figure 74). Ce sont les fractions 14 à 20, de poids moléculaire inférieur à 5,02 kDa qui entraînent une stimulation de l'activité de l'amylase en comparaison avec les artémies témoins. En ce qui concerne l'ensilage LBBMA25, ce sont les fractions 14 à 18, soit 1,89 et 5,02 kDa qui stimulent l'activité de la trypsine en comparaison avec les artémies témoins. L'activité de l'amylase est accrue en présence des fractions 14 à 18, soit 1,89 et 5,02 kDa.

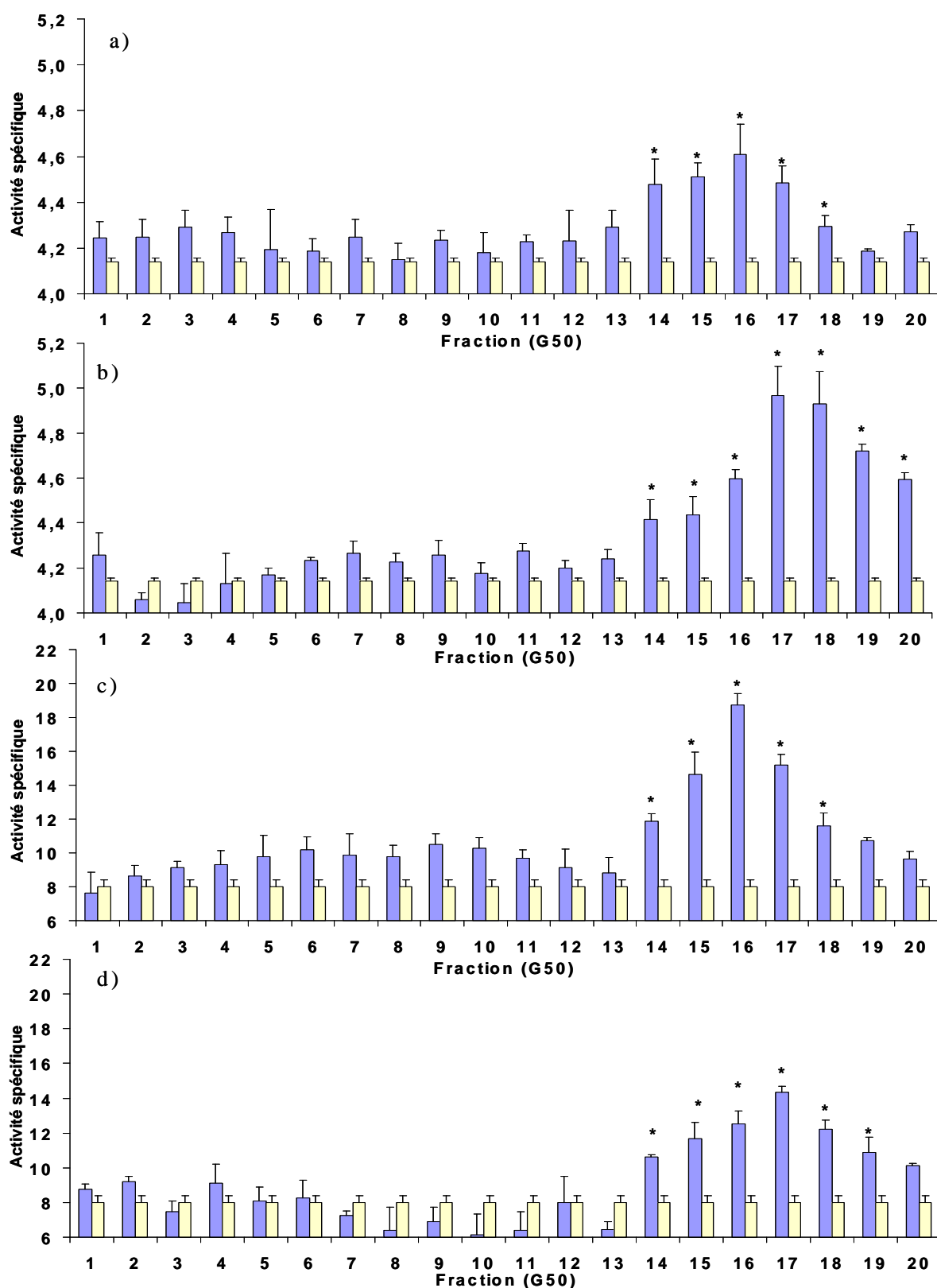


Figure 74: a) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 ■ testé en comparaison au témoin ■. b) Activité de la trypsine en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25. ■ testé en comparaison au témoin ■. c) Activité de l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 ■ testé en comparaison au témoin ■. d) Activité de l'amylase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 ■ testé en comparaison au témoin ■.

#### **4. Discussion**

Pour le bio-essai, le stade métanauplius a été retenu car c'est un stade avec une population homogène, aisément caractérisable avec un système digestif fonctionnel (Frouël *et al.*, submitted). Au cours de son développement, l'artémie voit ses activités trypsique et amylasique augmentées au cours des 18 premiers jours de vie (Samain, 1985). Après 4 jours, ces activités sont faibles mais stables. Au-delà de la troisième semaine, l'amylase augmente fortement (Samain, 1985). Ainsi, chez les crustacés, les enzymes digestives sont synthétisées et sécrétées par des types cellulaires particuliers de l'hépatopancréas (Biesiot and McDowell Capuzzo, 1990). Ainsi, les cellules F sont impliquées dans la synthèse des enzymes digestives et les cellules B dans leur sécrétion. Ces deux types cellulaires sont présents dans les larves du homard *Homarus americanus*, et le nombre de cellules B augmente au cours du développement larvaire (Biesiot and McDowell Capuzzo, 1990). L'hépatopancréas des crustacés sécrète de nombreuses enzymes digestives telles que des amylases et des protéases. Chez les vertébrés, les hormones gastro-intestinales, telles que la gastrine ou la CCK, sont impliquées dans la sécrétion des enzymes présentes au niveau du pancréas (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999). Les hormones de vertébrés semblent être reconnues chez les crustacés (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999).

En présence de l'insuline et de la gastrine, les activités de l'amylase et de la trypsine de l'artémie sont stimulées. La réponse en terme d'activité est fonction de la concentration en hormones. D'autres auteurs ont décrit la capacité d'hormones de vertébrés à stimuler la sécrétion d'enzymes digestives, à partir de l'hépatopancréas, chez les crustacés (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999). Ces auteurs ont montré que l'insuline utilisée à  $10^{-7}$ M et  $10^{-6}$ M n'entraîne pas de stimulation de la sécrétion des enzymes digestives à partir de l'hépatopancréas de l'écrevisse américaine *Orconectes limosus* contrairement à son action chez les vertébrés. Cependant, Resh-Sedlmeier et Sedlmeier (1999) ont effectué ces tests *in vitro*, se limitant donc à l'action d'un seul organe : l'hépatopancréas. L'utilisation d'animaux vivants implique l'intervention de mécanismes plus complexes permettant d'observer l'action de molécules *in vivo*, non détectable *in vitro*.

En présence des 4 lysats testés (LBBMA4, LBBMA25, Gabolysat, PC60), les activités de l'amylase et de la trypsine sont stimulées. L'action des ensilages et lysats sur les activités digestives des artémies miment l'action des différentes hormones testées et cela avec des réponses du même ordre en terme de pourcentage. Cependant, Giard (1996) n'a trouvé aucun effet de lysats commerciaux (Gabolysat et PC60), sur la sécrétion des enzymes digestives au niveau de cellules isolées de la glande digestive de la coquille Saint Jacques. Dans notre étude,

l'expérimentation est effectuée sur des animaux *in vivo*, possédant donc probablement un système hormonal répondant à la prise alimentaire. Les données obtenues seraient donc la résultante de la présence, dans les ensilages, de molécules actives sur la sécrétion des enzymes digestives soit par voie directe, soit par voie indirecte. Ainsi, l'ajout de farine de calmar dans l'alimentation de larves et post-larves de crustacé est connu pour stimuler la sécrétion des enzymes protéolytiques (Brito *et al.*, 2000). Toutefois, rien n'indique que les voies d'actions des 4 différents ensilages sont les mêmes. De futures recherches permettront de connaître les voies d'actions de ces lysats.

La réponse en terme d'activité est fonction de la concentration administrée. En effet, une élévation de la concentration en produits tests (lysats ou hormones) implique une stimulation plus importante de l'activité de l'amylase et une stimulation moins forte de l'activité de la trypsine. Resh-Sedlmeier et Sedlmeier (1999) ont démontré l'existence d'un effet dose positif de la concentration en gastrine (0 à 50nM) sur la sécrétion de l'amylase au niveau de l'hépatopancréas du crustacé *Orconectes limosus*. De plus, ils ont observé un effet dose négatif, malgré une stimulation par rapport au témoin, de l'activité au-delà d'une concentration de  $5 \cdot 10^{-9}$  M. Il est intéressant de comparer les résultats obtenus au cours de cette expérimentation avec les résultats d'autres auteurs, concernant les concentrations et les effets doses observés. En effet, la gastrine produit chez les vertébrés et les invertébrés des courbes biphasiques, c'est à dire, des courbes avec un maximum, mais où la réponse est submaximale si la concentration est supramaximale (Gardner and Jensen, 1983; Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999). Chez les vertébrés la réponse maximale pour la gastrine est obtenue pour une concentration de  $10^{-10}$  M alors qu'elle est de  $5 \cdot 10^{-9}$  M chez le crustacé *Orconectes limosus* (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999). Les valeurs obtenues au cours de cette étude sont donc en accord avec la littérature puisqu'une concentration de  $10^{-9}$  M de gastrine entraîne une valeur maximum d'activité de la trypsine chez l'artémie. Cependant, de la même façon que ce qui a été observée par Resh-Sedlmeier et Sedlmeier (1999), les différences observées au niveau de l'amylase et de la trypsine en réponse aux molécules testées reste peu clair. En effet, ces différentes enzymes sont supposées être sécrétées à partir d'un même type cellulaire, les cellules B, chez les crustacés (Resch-Sedlmeier and Sedlmeier, 1999).

De manière à déterminer la fraction contenant les molécules engagées dans la stimulation des activités enzymatiques digestives, les lipides, les glucides et une préparation de protéines digérées expérimentalement ont été fractionnés. En présence des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25, mais aussi en présence des protéines digérées *in vitro*, les activités de la trypsine et



de l'amylase sont stimulées par rapport au témoin. En revanche, les glucides et les lipides issus des ensilages ne provoquent aucune modification des activités de la trypsine ou de l'amylase en comparaison avec les artémies témoins. Ces données suggèrent que la fraction protéique soit à l'origine de la stimulation de la sécrétion des enzymes digestives. Cependant, la digestion *in vitro* des protéines n'annule pas l'effet stimulant observé. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour répondre à cette problématique : soit l'action stimulante observée est liée à de petits peptides et acides aminés, soit cette action est due à des protéines non digestibles présentes dans les ensilages. La farine de calmar utilisée en tant que complément alimentaire (quelques pourcents dans l'alimentation <10%) est connue pour avoir un effet promoteur de la croissance chez les crevettes en élevage (Cruz and Guillaume, 1983; Cruz-Ricque *et al.*, 1989; Cruz-Suarez *et al.*, 1992). Ainsi, Cruz-*et al.* (1983) indique la présence possible d'un facteur de croissance dans la fraction protéique de la farine de calmar. Cet extrait protéique agit positivement sur l'hyperplasie et l'hypertrophie de cellules musculaires de crevettes (Cruz-Ricque *et al.*, 1987). Ces données ainsi que les expériences précédentes, portent à croire qu'il pourrait se trouver dans la fraction protéique des ensilages de seiches une molécule de type facteur de croissance tout comme dans la farine de calmar.

La séparation des protéines contenues dans les ensilages, en fonction de leur poids moléculaire, permet de caractériser les fractions protéiques engagées dans la sécrétion des enzymes digestives. Seules les fractions de 14 à 18 issues de la séparation des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25, soit des molécules de poids moléculaire compris entre 1,89 et 5,02 kDa, sont capables de stimuler l'activité de la trypsine des artémies, en comparaison avec les animaux témoins. Cette étude montre que les ensilages sont capables d'induire une réponse, en terme d'activité enzymatique, semblable à l'action d'hormones telles que la gastrine ou l'insuline. Des molécules, présentes dans la fraction protéique, sont donc susceptible de stimuler le mécanisme digestif soit par voie directe via la présence de peptides actifs sur la digestion, c'est à dire des hormones-likes ; ou bien par voie indirecte via la présence de molécules dans les ensilages capables d'activer la voie hormonale impliquée dans la régulation de la sécrétion des enzymes digestives. Divers auteurs ont caractérisé des molécules de type gastrine/cholécystokinine like chez des crustacés (Favrel *et al.*, 1987; Favrel *et al.*, 1991). Ainsi, Favrel *et al.* (1987), ont démontré l'existence de peptides proches de gastrines/cholécystokinines de poids moléculaire d'environ 2,5kDa au niveau de l'estomac de la crevette *Palaemon serratus* par des méthodes immuno-cytochimiques. De plus, Favrel *et al.* (1991) ont isolé 4 peptides de type gastrines/cholécystokinines, au niveau de l'estomac du crustacé marin la langoustine *Nephrops norvegicus*, dont les poids moléculaires sont compris entre 1 et 2kDa. Les fractions

positives correspondent à un poids moléculaire proche de ceux trouvés pour des peptides de type gastrines/cholécystokinines chez les crustacés. D'autres analyses seront nécessaires pour caractériser et identifier les molécules présentes dans les ensilages, capables de stimuler la sécrétion des enzymes digestives.

La Figure 75 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.

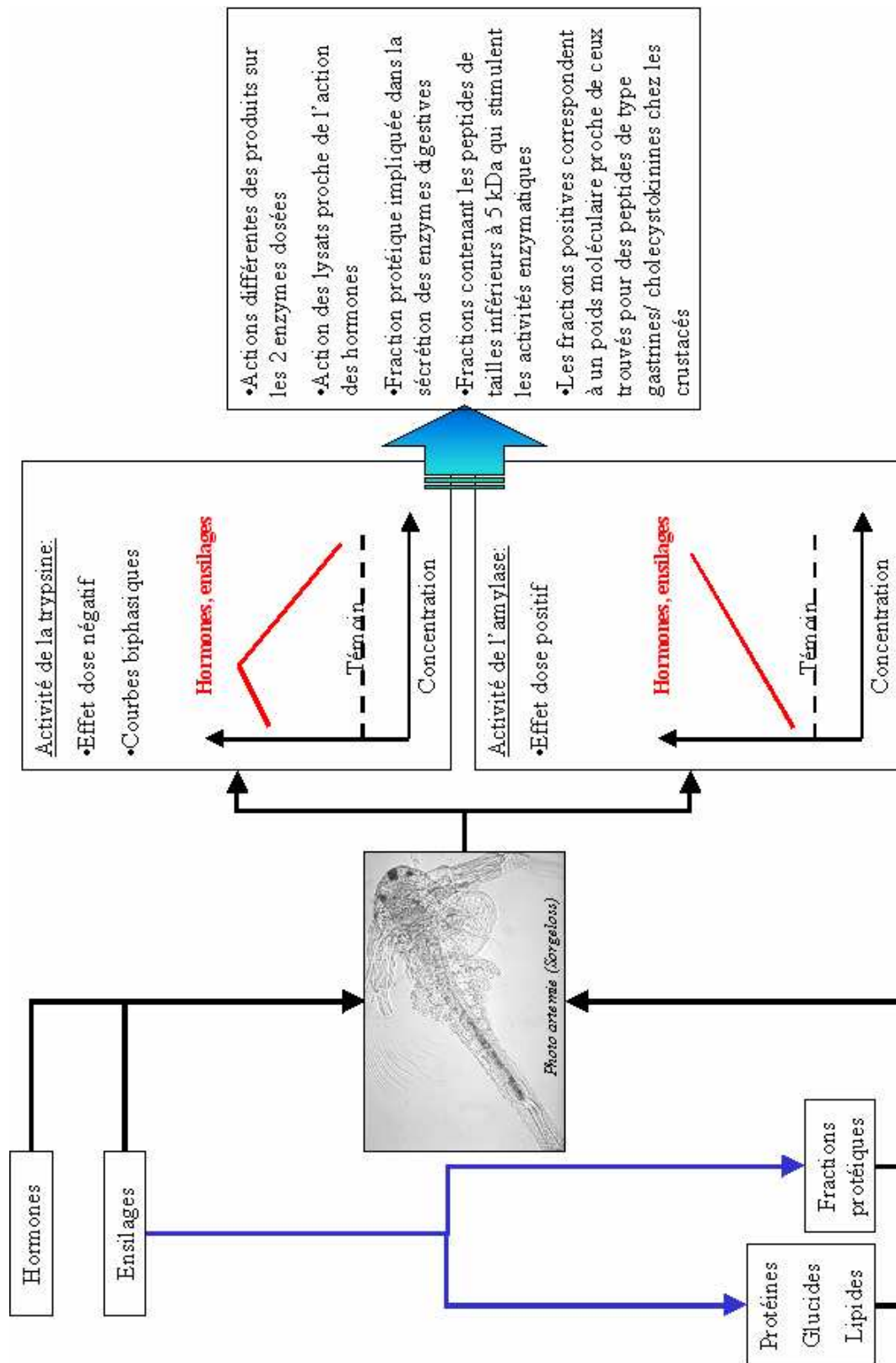


Figure 75: Schéma de synthèse de l'étude de l'effet des ensilages ou hormones sur la sécrétion d'enzymes digestives chez l'artémie.

## **C. Etude expérimentale de la régulation de la digestion chez les juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax***

### **1. Introduction**

L'ontogenèse est définie comme l'ensemble des changements morphologiques, physiologiques et comportementaux d'un individu d'une espèce au cours du temps. Différentes phases ontogénétiques sont recensées chez le poisson. D'abord la phase pré-larvaire, correspondant à un état endotrophe. Puis, la phase larvaire, caractérisée par la transition vers l'exotrophie, une période de différenciation tissulaire et de croissance, se terminant par la métamorphose. Ensuite, la phase juvénile (250mg environ en éclosion) qui suit immédiatement la métamorphose et se caractérise par une forte croissance. Enfin, la phase adulte, atteinte lorsque l'animal est capable de se reproduire. La métamorphose ainsi que les transitions entre différentes phases peuvent se traduire, selon les espèces, par des périodes très instables de changements morphologiques, anatomiques et physiologiques.

La formation du tube digestif au cours du développement a été abondamment étudiée en relation avec la fonction digestive chez les larves. La différenciation du tube en compartiments successifs est généralement progressive durant les premiers jours de la phase larvaire (Zambonino-Infante and Cahu, 2001; Nebel, 2005). Les stades larvaire et juvénile correspondent essentiellement à des périodes d'ontogenèse et de croissance. Au début du stade larvaire, le foie devient massif et remplace progressivement la vésicule vitelline qui se résorbe. Dès le stade juvénile, sa forme et sa localisation sont très voisines de celles de l'adulte. Le pancréas se développe le long des vaisseaux sanguins qui parcourent le tube digestif et prend peu à peu la forme diffuse caractéristique de l'adulte (Diaz *et al.*, 1998). Cependant, ces données se limitent aux premiers stades de développement du bar. En effet, peu de travaux concernent la maturation du système digestif chez les juvéniles et en particulier pour des poissons de 250 mg (sevrage alimentaire). Cette étape est cependant critique puisque lors du passage de l'état de larves à celui de juvéniles, les bars sont sevrés en éclosion. L'alimentation jusque là vivante est remplacée par une alimentation artificielle.

### **2. Matériel et méthodes**

#### **a. Matériel biologique**

Les poissons utilisés dans cette étude sont issus de l'expérimentation 2 (chapitre 3).

Sur un même poisson, plusieurs paramètres peuvent être mesurés. Ainsi les juvéniles peuvent être divisés en quatre segments (Figure 76) (Cahu and Zambonino-Infante, 1994).

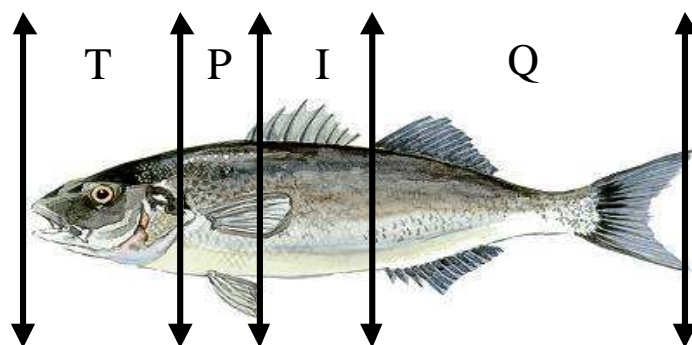


Figure 76: Illustration des segments de découpe des juvéniles de bars. T : « Segment Tête », P : « Segment Pancréatique (Cœur, Estomac, Foie) », I : « Segment Intestin » et Q : « Segment Queue ». (D'après Cahu *et al.*, 1994).

#### b. Analyses enzymologiques

Les analyses d'enzymologie sont établies *a posteriori* sur des animaux congelés dans l'azote liquide (n=6) au moment du prélèvement puis à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant les dosages.

Après décongélation des poissons, le segment pancréatique est disséqué puis broyé en présence de 50mg de billes de zirconium ( $\text{Ø} = 0,5\text{mm}$ ) à l'aide d'un broyeur automatique à la fréquence de 30 oscillations/s, pendant 2 minutes. Le broyat de poissons est ensuite centrifugé à 10 000g pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les dosages enzymatiques et protéique s'effectuent sur le surnageant.

L'activité des phosphatases acides est basée sur l'utilisation de p-nitrophenyl-phosphate à 2% en tant que substrat dans du tampon TRIS 1M à pH 3 (Moyano *et al.*, 1996). Ainsi, 0,1ml d'échantillon est ajouté à 0,1ml de substrat. Après 30 minutes d'incubation à  $25^{\circ}\text{C}$ , la réaction est stoppée par ajout de 1ml de NaOH 1M. L'absorbance est mesurée à 405nm. L'activité spécifique des phosphatases acides totales est exprimée en unité par mg de protéines où 1 unité enzymatique correspond à  $1\mu\text{mole L}^{-1}$  de p-nitrophénol formée par minute.

Les activités de l'amylase et de la trypsine sont dosées selon les méthodes développées précédemment (chapitre 1, II).

La quantité de protéines est mesurée selon la méthode développée antérieurement (chapitre 1, II).

#### c. Histologie et microscopie électronique

Le suivi en histologie et en microscopie électronique à transmission (MET) est exercé sur des animaux qui sont fixés (n=3) au moment du prélèvement. Pour l'histologie, les animaux entiers sont fixés dans du Davidson à 10% d'acide acétique et les lames subissent une coloration au trichrome de Masson, qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant

cytoplasmique (éosine) et un colorant fibrillaire (vert lumière). En ce qui concerne la MET, l'étude est effectuée sur l'intestin disséqué au préalable. La fixation de l'organe est faite dans un tampon phosphate à 2% de glutaraldéhyde et les lames sont contrastées avec de l'acétate d'uranyle (contrastant les nucléoprotéines : noyau, nucléole, ribosomes) et des sels de plomb (contrastant les membranes).

L'observation en microscopie optique des effets des différents enrichissements est faite par un suivi histologique de coupes transversales du tractus digestif. Les coupes sont réalisées suivant 3 segments (X, Y et Z) (Figure 77). L'analyse a essentiellement été établie sur l'intestin (antérieur et postérieur) et sur les caeca pyloriques (CP).

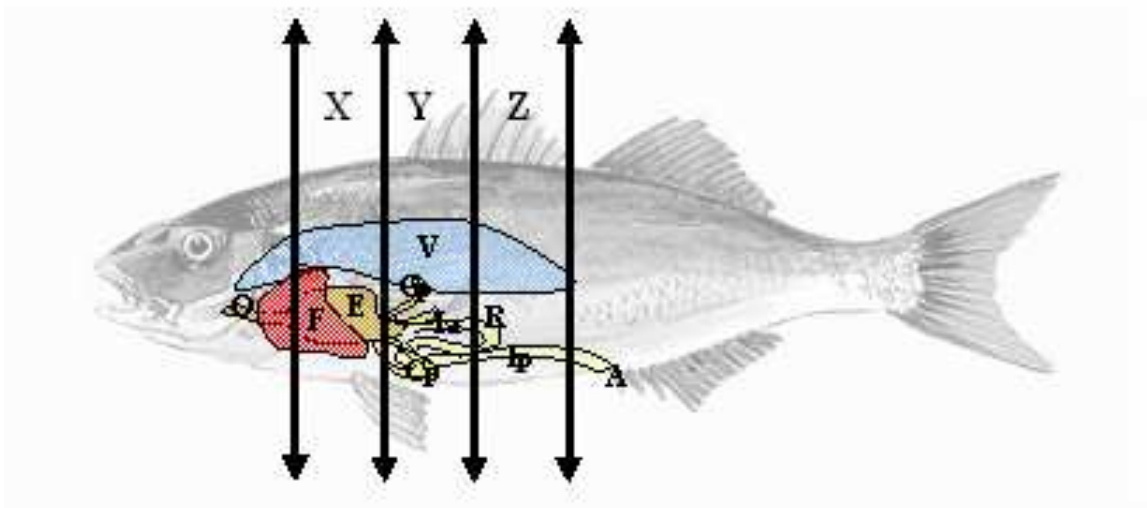


Figure 77: Anatomie générale du tractus digestif de *Dicentrarchus labrax*. A : Anus, Cp : Caeca pyloriques, E : estomac, F : Foie, Ia : Intestin antérieur, Ip : Intestin postérieur, O : Œsophage, R : Repli intestinal, V : Vessie natatoire.

L'utilisation d'une grille de comptage de 100 carrés (10x10) permet de réaliser une analyse semi-quantitative des structures histologiques d'intérêt par mesure des proportions de chaque type cellulaire (nombre de cellules à mucus par rapport au nombre d'entérocytes par exemple) (Figure 78).

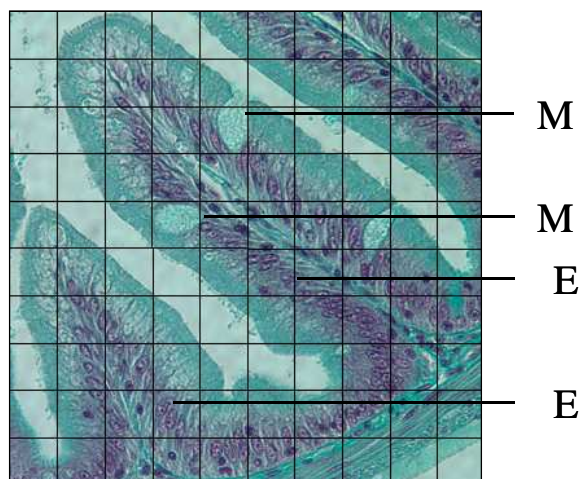


Figure 78: Calcul de la proportion relative de cellules à mucus (M) par rapport au nombre total d'entérocytes (E).

Concernant la microscopie électronique, le logiciel National Instruments Vision Assistant 7.0 et le logiciel Analysis, permettent une analyse semi-quantitative des surfaces relatives et longueurs des structures d'intérêt par rapport à l'ensemble de l'entérocyte.

#### d. Analyses statistiques

Les résultats sont donnés avec un écart type ( $n=10$  pour chaque test). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey où les différences significatives ( $p<0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

### 3. Résultats

#### a. Analyses enzymologiques

L'activité des phosphatases acides est stimulée en début de développement, notamment à J8 (âge : 68 jours) pour l'ensemble des compléments alimentaires testés (Tableau 33). Ainsi, l'activité est significativement augmentée ( $p<0,05$ ) par rapport au témoin avec l'ensemble des traitements. Puis l'activité spécifique des phosphatases acides diminue pour l'ensemble des lots. La tendance est d'ailleurs maintenue après l'arrêt des enrichissements. Cependant, après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours), les animaux recevant une alimentation enrichie en LBBMA25 ou en Gabolysat ont une activité spécifique des phosphatases acides significativement plus faible ( $p<0,05$ ) que les poissons du lot témoin. En revanche, les juvéniles recevant une alimentation complétée en PC60 ont une activité spécifique des phosphatases acides significativement plus élevée ( $p<0,05$ ) que les poissons du lot témoin à J23 (âge : 83 jours). Après 56 jours d'élevage (âge : 116 jours), seuls les animaux recevant une alimentation enrichie en PC60 ont une activité spécifique des phosphatases acides significativement plus élevée ( $p<0,05$ ) que les

poissons du lot témoin. Au-delà de 56 jours d'élevage (âge : 116 jours), il n'y a plus de différences significatives entre les différents lots.

Tableau 33: Activité spécifique des phosphatases acides ( $U \cdot 10^{-5}$ ) au cours du temps et en fonction des traitements. Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA  $p > 0,05$ ).

Jour de prélèvement	Témoin	LBBMA25	Gabolysat	PC60
J0 (âge : 60 jours)	5,9±0,4a	5,9±0,4a	5,9±0,4a	5,9±0,4a
J8 (âge : 68 jours)	8,5±0,6a	15,3±1,0b	16,0±1,1b	16,6±1,1b
J23 (âge : 83 jours)	9,2±0,6a	7,5±0,5b	7,4±0,5b	11,1±0,7c
J56 (âge : 116 jours)	3,3±0,2a	3,8±0,3a	3,9±0,3a	5,4±0,4b
J72 (âge : 132 jours)	1,2±0,8a	1,0±0,1a	1,1±0,7a	1,1±0,7a
J92 (âge : 152 jours)	0,8±0,6a	1,0±0,4a	1,1±0,8a	0,9±0,5a
J103 (âge : 163 jours)	0,9±0,6a	1,0±0,5a	0,9±0,8a	1,1±0,7a

L'activité spécifique de l'amylase est relativement stable en ce qui concerne les animaux recevant une alimentation enrichie, tandis qu'elle subit de fortes variations dans le lot témoin au cours de l'élevage (Tableau 34). L'activité spécifique amyliasique est significativement inhibée ( $p < 0,05$ ) par les trois enrichissements testés après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours). Au 23<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 83 jours), seuls les animaux recevant une alimentation enrichie au PC60 voient leur activité amyliasique significativement diminuée ( $p < 0,05$ ) en comparaison avec ceux du lot témoin. Après 56 jours d'élevage (âge : 116 jours), les enrichissements PC60 et LBBMA25 permettent une stimulation significative de l'activité spécifique de l'amylase ( $p < 0,05$ ). Au 72<sup>ème</sup> jour (âge : 132 jours), l'activité spécifique de l'amylase est significativement stimulée ( $p < 0,05$ ) par l'alimentation enrichie au Gabolysat. Après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours), tous les animaux recevant une alimentation enrichie ont une activité amyliasique significativement stimulée ( $p < 0,05$ ). Au 103<sup>ème</sup> jour (âge : 163 jours), tous les animaux recevant une alimentation enrichie ont une activité amyliasique significativement inhibée ( $p < 0,05$ ).

Tableau 34: Activité spécifique de l'amylase ( $U \cdot 10^{-5}$ ) au cours du temps et en fonction des traitements. Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA  $p > 0,05$ ).

Jour de prélèvement	Témoin	LBBMA25	Gabolysat	PC60
J0 (âge : 60 jours)	0,4±0,05a	0,4±0,05a	0,4±0,05a	0,4±0,05a
J8 (âge : 68 jours)	1,6±0,2a	0,5±0,06b	0,3±0,03c	0,3±0,04c
J23 (âge : 83 jours)	0,9±0,1a	0,8±0,1ab	0,7±0,09ab	0,5±0,07b
J56 (âge : 116 jours)	0,3±0,04a	0,6±0,08b	0,4±0,05a	0,7±0,09b
J72 (âge : 132 jours)	0,2±0,02a	0,1±0,01a	0,2±0,03b	0,1±0,01a
J92 (âge : 152 jours)	0,3±0,04a	0,5±0,06b	0,5±0,06b	0,5±0,07b
J103 (âge : 163 jours)	0,8±0,04a	0,5±0,07b	0,4±0,05b	0,3±0,04b



L'activité spécifique de la trypsine est significativement inhibée ( $p < 0,05$ ) à J8 (âge : 68 jours) pour l'ensemble des lysats (LBBMA25, Gabolysat et PC60) (Tableau 35). Au 23<sup>ème</sup> jour (âge : 83 jours) aucune différence significative n'est observée. Après 56 jours d'élevage (âge : 116 jours), les juvéniles recevant une alimentation enrichie au Gabolysat ont une activité spécifique de la trypsine significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) à celle des animaux témoins. Au 72<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 132 jours), les juvéniles recevant une alimentation enrichie au LBBMA25 ont une activité spécifique de la trypsine significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle des animaux témoins. Après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours), les juvéniles recevant une alimentation enrichie au Gabolysat ou au LBBMA25 ont une activité spécifique de la trypsine significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle des animaux témoins. Après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours), les juvéniles recevant une alimentation enrichie ont une activité spécifique de la trypsine significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle des animaux témoins. Entre les jours 23 et 72, on observe une diminution de l'activité spécifique de la trypsine pour tous les lots. Les enrichissements stimulent significativement l'activité trypsique à partir de J93 ( $p < 0,05$ ), notamment avec le LBBMA25 et le Gabolysat. En effet, l'activité spécifique de la trypsine est stable au-delà de 72 jours d'élevage (âge : 132 jours) pour le lot témoin. Au contraire, elle augmente pour les juvéniles recevant un enrichissement.

Tableau 35: Activité spécifique de la trypsine ( $U \cdot 10^{-5}$ ) au cours du temps et en fonction des traitements Dans une même ligne, les lots n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents (ANOVA  $p > 0,05$ ).

Jour de prélèvement	Témoin	LBBMA25	Gabolysat	PC60
J0 (âge : 60 jours)	5,2±0,3a	5,2±0,3a	5,2±0,3a	5,2±0,3a
J8 (âge : 68 jours)	9,2±0,2a	3,9±0,3b	2,5±0,2c	6,4±0,4d
J23 (âge : 83 jours)	6,1±0,1a	6,2±0,4a	6,8±0,5a	7,3±0,5a
J56 (âge : 116 jours)	3,1±0,1a	4,0±0,3a	2,2±0,1b	4,1±0,3a
J72 (âge : 132 jours)	0,9±0,1a	1,8±0,1b	1,0±0,1a	1,1±0,1a
J92 (âge : 152 jours)	0,7±0,1a	2,4±0,1b	3,1±0,6b	1,5±0,1a
J103 (âge : 163 jours)	1,6±0,1a	6,9±0,5bc	7,2±0,5c	4,3±0,3b

#### b. Histologie et microscopie électronique

Les structures intestinales sont essentiellement observées au niveau des caeca pyloriques et non de l'intestin à proprement parlé (microscopie optique, objectif x40). L'ensemble des photos (Figure 79) montre une structure classique de l'intestin : des entérocytes de forme prismatique avec un noyau au pôle basal et une différenciation en microvillosités du pôle apical, caractéristique d'un épithélium simple prismatique et absorbant, ainsi que la présence de cellules à mucus entre les entérocytes.

L'enrichissement PC60 induit la présence de villosités peu nombreuses et de taille réduite dès le 8<sup>ème</sup> jour (âge : 68 jours) (Tableau 36). En revanche, les enrichissements LBBMA25 et Gabolysat entraînent une forte augmentation du nombre relatif de cellules à mucus par rapport au nombre d'entérocytes dès le 8<sup>ème</sup> jour (Figure 79 et Tableau 36). L'ensemble de ces phénomènes est observé à la fois au niveau du segment Y et du segment Z. L'arrêt de l'enrichissement n'entraîne pas de changement au niveau des structures intestinales. De cette façon, les différences observées entre les différents lots se maintiennent. Le pourcentage de cellules à mucus présentes au niveau de l'épithélium intestinal du segment Y évolue uniformément entre le lot témoin et le lot LBBMA25. Cependant, ce nombre est toujours significativement plus élevé ( $p < 0,05$ ) pour les animaux nourris avec un aliment enrichi en LBBMA25 au niveau du segment Y. En revanche, l'enrichissement Gabolysat, qui entraîne une augmentation du nombre de cellules à mucus en début de développement au niveau du segment Y, reste stable au cours du temps et ne montre plus de différence significative avec le lot témoin au-delà du jour 56 d'élevage (âge : 116 jours). Le nombre de cellules à mucus présentes au niveau du segment Y pour les animaux recevant un enrichissement PC60 est inférieur à celui des animaux témoins. Au niveau du segment Z, l'ensemble des traitements entraîne une évolution du nombre de cellules à mucus à une même vitesse. Cependant, l'enrichissement LBBMA25 entraîne toujours un nombre significativement plus élevé ( $p < 0,05$ ) de cellules à mucus, suivi par l'enrichissement Gabolysat. Puis vient le témoin et enfin l'enrichissement PC60 qui provoque la présence d'un nombre réduit de cellules à mucus.

Tableau 36: Résultats d'histologie semi-quantitative (% de cellules à mucus parmi les cellules épithéliales) au niveau des segments Y et Z des juvéniles de bars. \* : significativement différents ( $p > 0,05$ ) du témoin.

Segment Y	Témoin	LBBMA25	Gabolysat	PC60
J8 (âge : 68 jours)	0,011±0,001	0,085±0,009 *	0,073±0,005*	0,027±0,006
J23 (âge : 83 jours)	0,032±0,001	0,108±0,001*	0,079±0,002*	0,041±0,009
J56 (âge : 116 jours)	0,069±0,009	0,126±0,02*	0,097±0,001*	0,038±0,001 *
J72 (âge : 132 jours)	0,096±0,01	0,172±0,01 *	0,079±0,02	0,074±0,02
J92 (âge : 152 jours)	0,120±0,01	0,203±0,01 *	0,1±0,01	0,08±0,001
J103 (âge : 163 jours)	0,140±0,01	0,229±0,02 *	0,13±0,02	0,093±0,01
Segment Z				
J8 (âge : 68 jours)	0,045±0,001	0,193±0,005*	0,062±0,008*	0,041±0,009*
J23 (âge : 83 jours)	0,048±0,003	0,099±0,002*	0,079±0,001*	0,029±0,001 *
J56 (âge : 116 jours)	0,058±0,005	0,122±0,01*	0,089±0,015*	0,035±0,003 *
J72 (âge : 132 jours)	0,08±0,015	0,167±0,02*	0,103±0,01 *	0,061±0,001 *
J92 (âge : 152 jours)	0,092±0,02	0,161±0,009*	0,116±0,01 *	0,069±0,001 *
J103 (âge : 163 jours)	0,096±0,01	0,165±0,009 *	0,129±0,021*	0,078±0,002 *

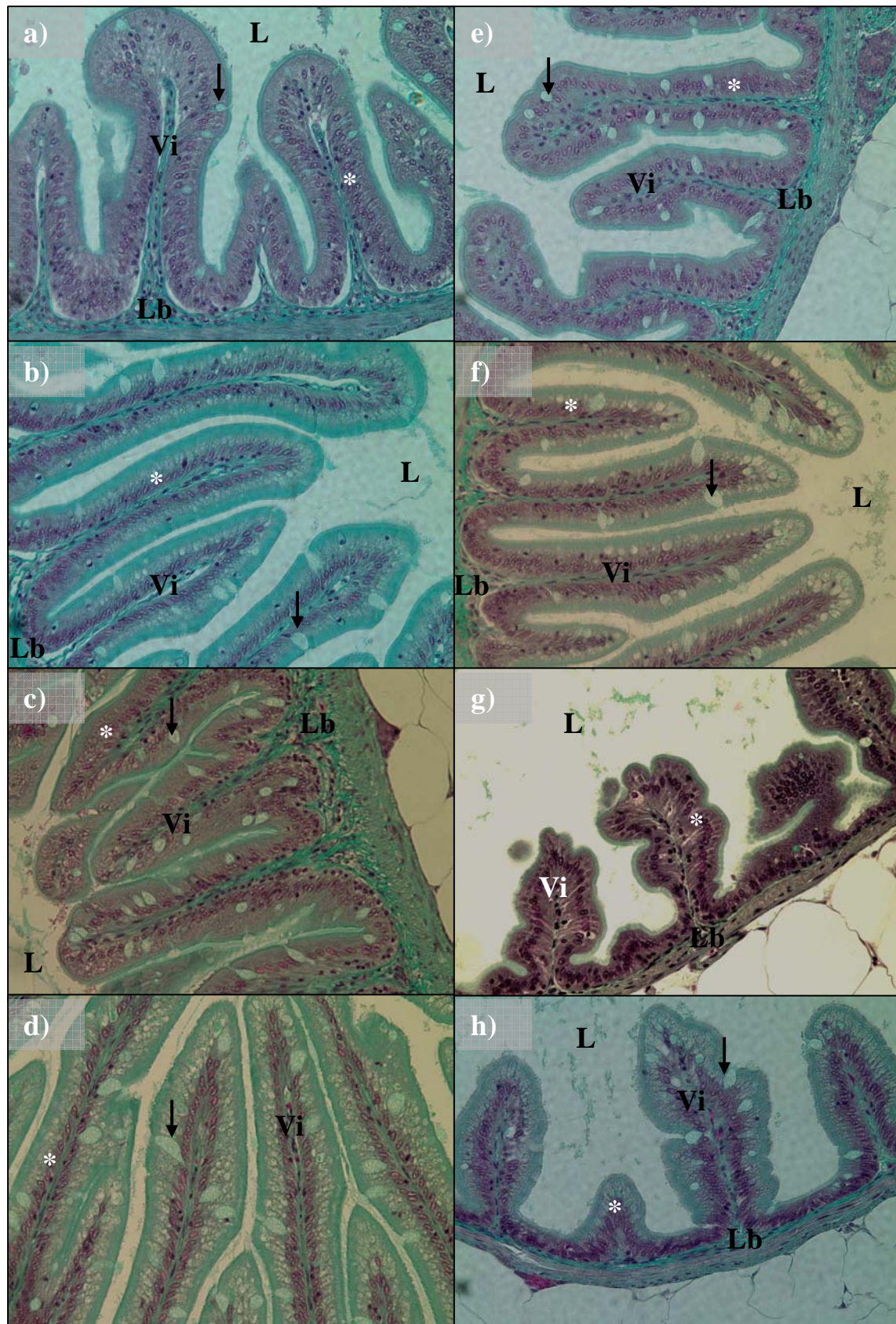


Figure 79: Structure histologique des villosités intestinales au niveau des caeca pyloriques après 42 jours d'élevage (x40). a) segments Y des bars témoins. b) segments Z des bars témoins. c) segments Y des bars LBBMA25. d) segments Y des bars LBBMA25. e) segments Y des bars Gabolysat. f) segments Y des bars Gabolysat. g) segments Y des bars PC60. h) segments Z des bars PC60. L : Lumière intestinale ; Lb : Lame basale ; ↓ : Cellule à mucus ou caliciforme ; \* : Noyau entérocytaire ; Vi : Villosité intestinale.

L'utilisation de la microscopie électronique permet d'observer l'ultrastructure de l'intestin et plus particulièrement de l'épithélium intestinal. De ce fait, les entérocytes et leurs jonctions intercellulaires peuvent être observés (Figure 80). De plus, cette technique permet l'observation d'organites tels que les lysosomes, les mitochondries et les noyaux.

Après 56 jours d'élevage (âge : 116 jours), de nombreuses modifications ultrastructurales apparaissent au niveau du tractus digestif des juvéniles de bars. Les différences les plus nettes s'observent au pôle apical des entérocytes sous la bordure brosse (B). En ce qui concerne les traitements LBBMA25 et Gabolysat (Figure 80), on observe la formation de cellules à mucus (Mu) appelées également cellules caliciformes. De plus, on observe la présence importante de mitochondries à crêtes tubulaires autour des structures particulières (cellules à mucus, lysosomes secondaires, vésicules d'endocytose) ainsi que la décondensation de la chromatine des noyaux cellulaires. Les résultats obtenus avec le PC 60 montrent que les microvillosités sont très peu développées et la présence de lysosomes secondaires (Ly) en grande quantité (Figure 80).

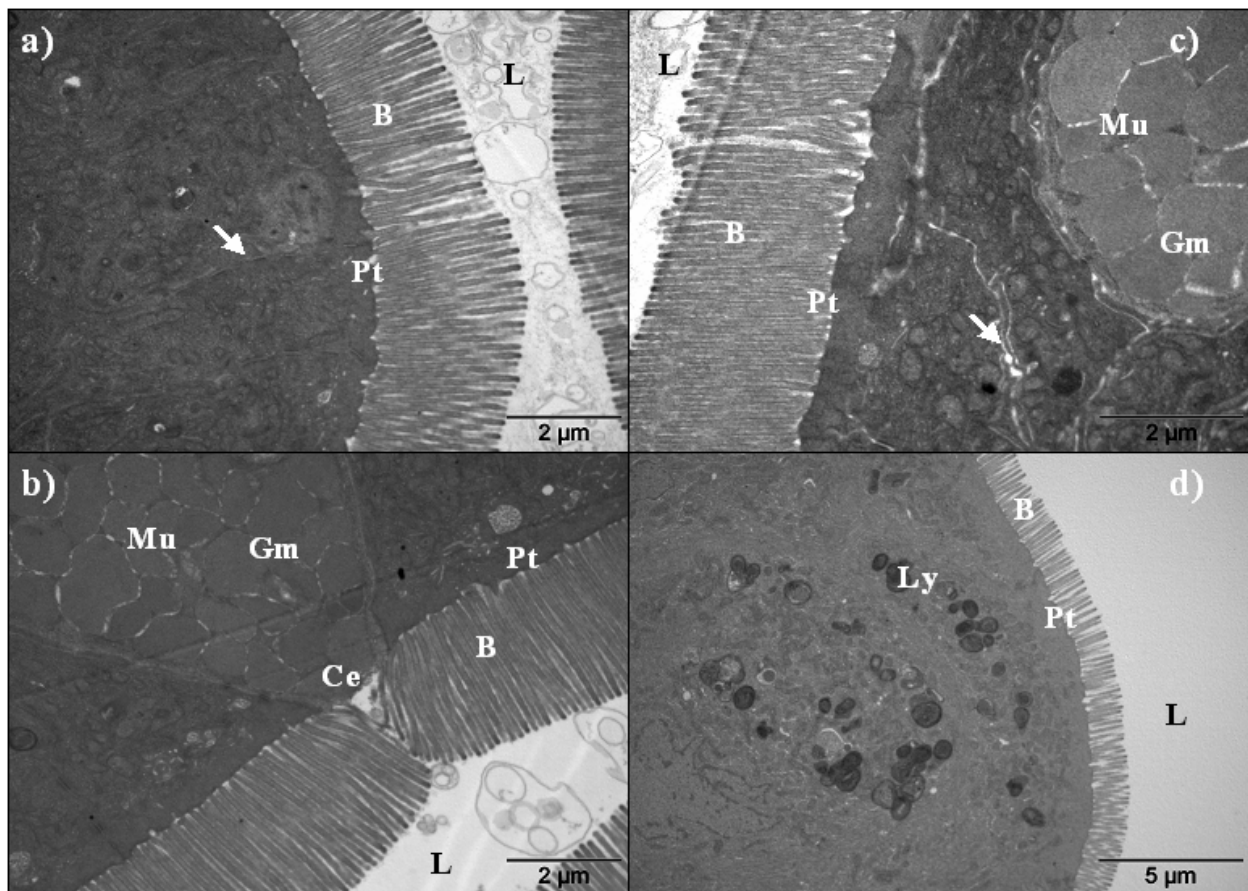


Figure 80: Ultrastructure intestinale à 56 jours d'élevage. a) poissons témoins b) poissons LBBMA25 c) poissons Gabolysat d) poissons PC60. B : Bordure en brosse ; Ce : Canal excréteur de mucus ; Gm : Grains de mucine ; L : Lumière intestinale ; Ly : Lysosomes secondaires ; Mu : Cellule à mucus ou caliciforme ; Pt : Plateau terminal ; ∨ : Jonctions intercellulaires.

Après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours), les observations faites au 56<sup>ème</sup> jour se trouvent confirmées. Les images concernant les lysats montrent la présence de cellules à mucus avec le traitement LBBMA25 et le Gabolysat mais dans une proportion moindre qu'en début de développement (Figure 81). Le PC 60 quant à lui montre la présence de lysosomes secondaires en très grande quantité et une bordure en brosse peu développée, mais ne présente aucune autre structure particulière.

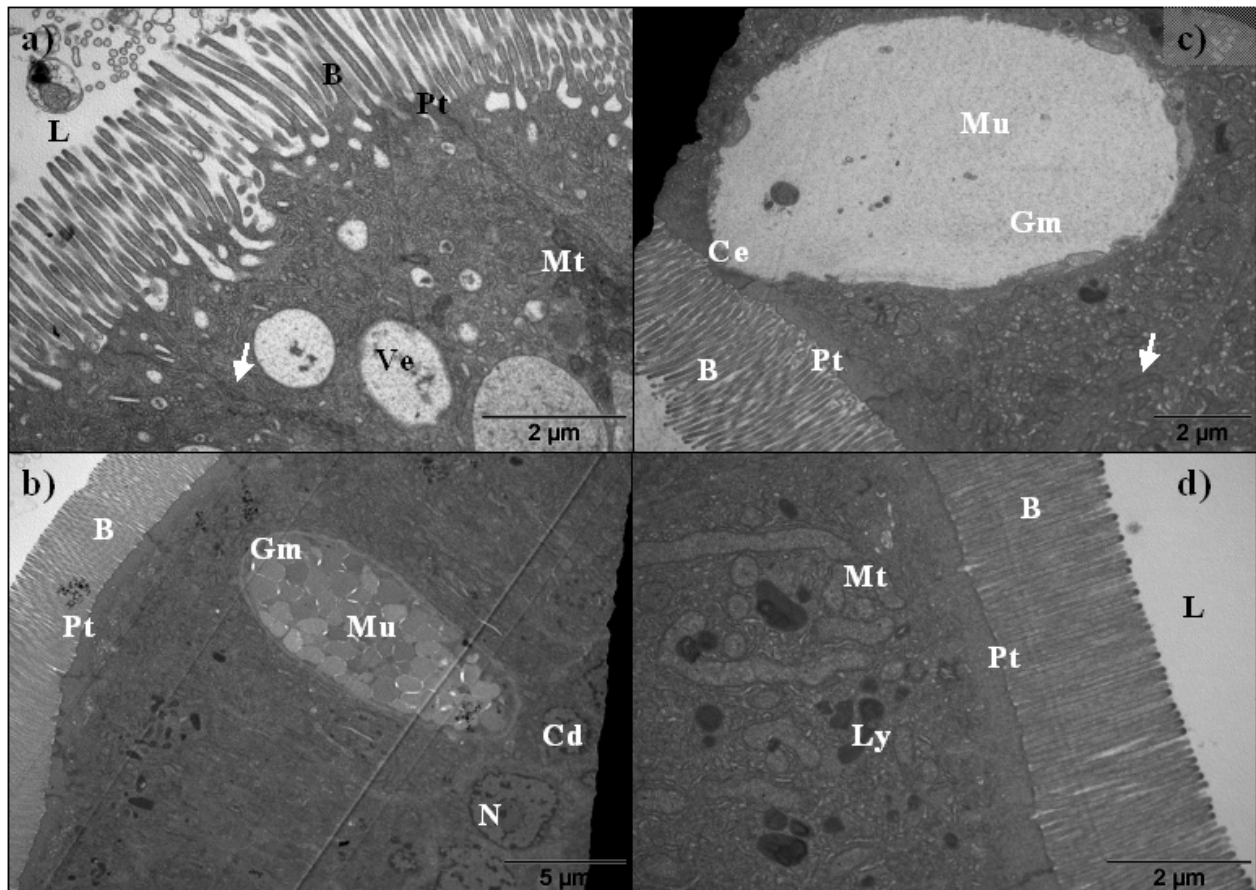


Figure 81: Ultrastructure intestinale à 103 jours d'élevage. a) poissons témoins b) poissons LBBMA25 c) poissons Gabolysat d) poissons PC60. B : Bordure en brosse ; Cd : Chromatine décondensée ; Ce : Canal excréteur de mucus ; Gm : Grains de mucine ; L : Lumière intestinale ; Ly : Lysosomes secondaires ; Mt : Mitochondries à crête tubulaire ; Mu : Cellule à mucus ou caliciforme ; N : Noyau cellulaire ; Ve : Vésicules d'endocytose ; Pt : Plateau terminal ;  $\blacktriangledown$  : Jonctions intercellulaires.

La mesure de la taille des microvillosités montre qu'il existe des différences significatives en fonction de l'alimentation reçue après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours) (Figure 82 et Figure 83). En effet, la taille moyenne des microvillosités est de 2,46µm pour les animaux témoins, de 1,97µm pour les animaux enrichis en Gabolysat, de 1,34 µm pour les animaux enrichis en PC60 et de 2,87µm pour les animaux enrichis en LBBMA25. Ces résultats montrent donc que la taille des microvillosités est significativement plus faible ( $p < 0,05$ ) pour les animaux

enrichis en PC60 par rapport aux autres lots. En revanche, l'enrichissement LBBMA25 entraîne une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la taille des microvillosités en comparaison avec les animaux témoins.

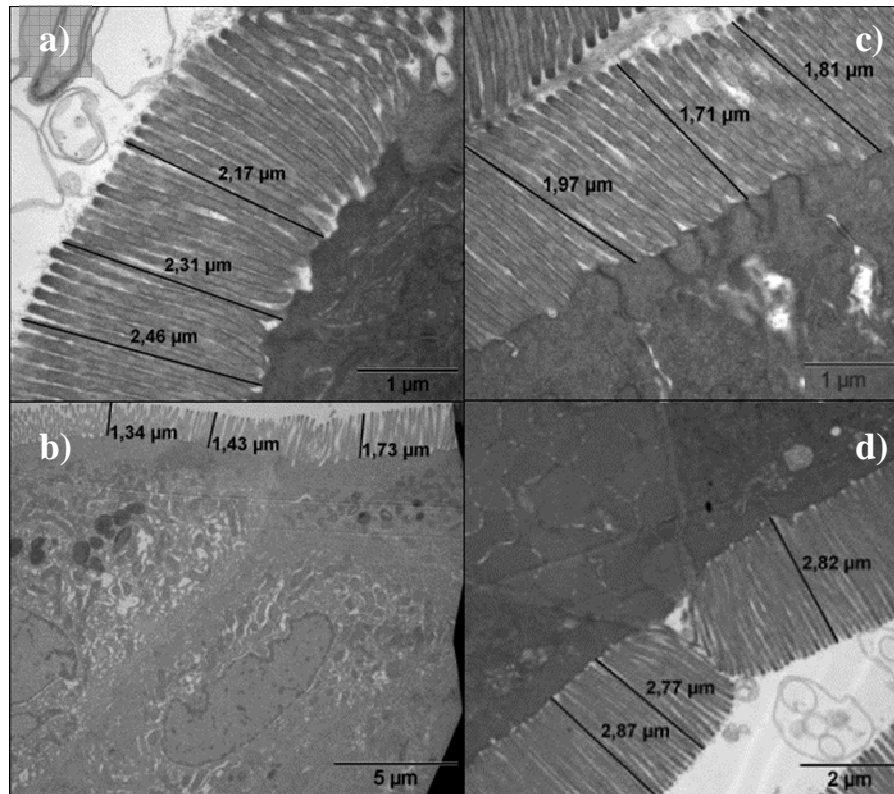


Figure 82: Ultrastructure intestinale des poissons à 56 jours d'élevage. Mesure de la longueur des microvillosités. a) Animaux recevant l'aliment témoin. b) Animaux recevant l'aliment PC60. c) Animaux recevant l'aliment Gabolysat. d) Animaux recevant l'aliment LBBMA25.

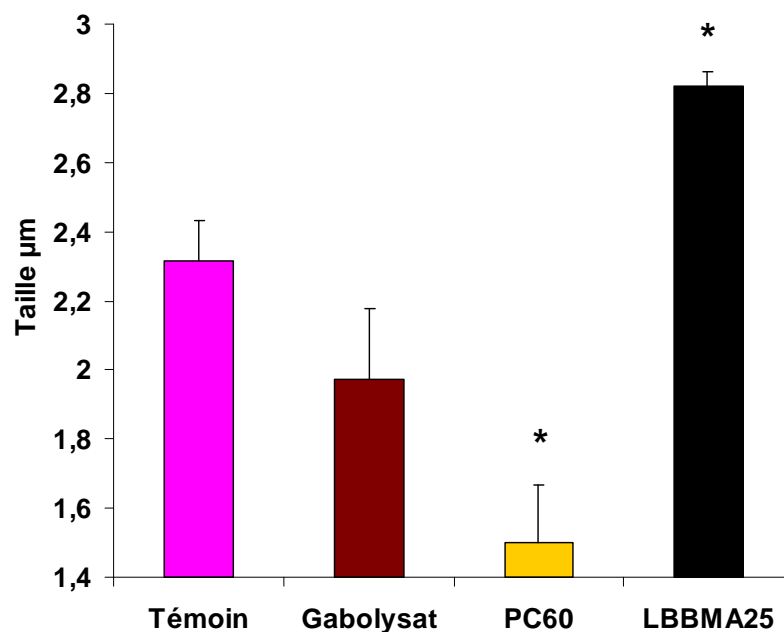


Figure 83: Tailles de microvillosités (μm) des juvéniles de bars après 56 jours d'élevage en fonction de l'alimentation reçue. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

#### **4. Discussion**

L'application de compléments alimentaires aux productions aquacoles suscite un intérêt qui s'accroît rapidement. Dans cette étude, les compléments alimentaires (LBBMA25, Gabolysat et PC60) sont testés sur un élevage de juvéniles de bars. Le métabolisme intègre de nombreux systèmes et processus. En effet, le métabolisme des animaux implique une multitude d'étapes qui s'étend de la capture de l'aliment, à son ingestion, à sa digestion, à son absorption et au transport des nutriments, à l'assimilation, à la partition et à l'utilisation de l'énergie, jusqu'au processus d'élimination des déchets (Nelson and Sheridan, 2006). Les mécanismes régulateurs sont donc essentiels pour obtenir une coordination appropriée de ces différentes étapes entre elles. Mais ces mécanismes dépendent aussi du statut physiologique et du stade de développement de l'animal. L'adaptation des enzymes digestives en fonction du stade de l'animal et de son alimentation est donc un élément clé. Nous avons choisi d'étudier plusieurs enzymes connues pour être impliquées dans la digestion. D'abord, les phosphatases acides, qui sont des enzymes hydrolytiques acides intracellulaires, largement impliquées dans les phénomènes de digestion chez les juvéniles. Puis, l'amylase qui est une enzyme alcaline extracellulaire impliquée dans la digestion des glucides. Enfin, la trypsine qui est une exoprotéase alcaline extracellulaire, connue pour intervenir dans la digestion des protéines chez les carnivores.

Chez les vertébrés supérieurs, les enzymes digestives sont distribuées le long du tractus digestif. Ces enzymes sont restreintes à certaines sections du système digestif, démontrant par-là une zonation fonctionnelle (Lundstedt *et al.*, 2004). Cet arrangement n'a pas été observé chez beaucoup de poissons, chez lesquels les enzymes sont distribuées tout le long du tractus digestif. En dépit du fait que les processus digestifs des poissons soient plus primitifs, le contenu enzymatique est très similaire à ce qui est observé chez des vertébrés supérieur (Lundstedt *et al.*, 2004). De plus, de nombreux peptides et hormones contrôlant les fonctions du système digestif chez les hauts vertébrés ont été trouvés chez les poissons (Smith, 1999). L'étude des enzymes digestives de poissons permet de mieux comprendre les mécanismes et l'utilisation des nutriments. Le changement d'alimentation peut modifier le profil enzymatique ou la concentration en enzymes. Chez les juvéniles, il y a une maturation du système digestif (Langar, 1992). Ainsi, la digestion, initialement à prédominance intracellulaire, devient à prédominance extracellulaire au fur et à mesure de la maturation du système digestif (Zambonino-Infante and Cahu, 1994; Cahu and Zambonino-Infante, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Zambonino-Infante and Cahu, 2001; Cahu *et al.*, 2004). La digestion intracellulaire est assurée par des enzymes agissant en milieu acide et la digestion extracellulaire

par des enzymes alcalines. Il existe donc une transition d'une digestion faisant intervenir principalement des enzymes acides telles que les phosphatases acides vers une digestion utilisant principalement des enzymes alcalines telles que l'amylase ou la trypsine.

En début de développement, notamment à J8 (âge : 68 jours), l'activité des phosphatases acides est stimulée pour l'ensemble des compléments alimentaires expérimentés. Les divers enrichissements testés sont particulièrement riches en molécules de faibles poids moléculaires (Tableau 6, chapitre 1 ; chapitre 3). Zambonino-Infante *et al.* (1997) ont montré que l'utilisation de di- et tri-peptides dans l'alimentation de larves de bars *Dicentrarchus labrax* permet d'obtenir de meilleurs taux de croissance et de survie. De plus, de nombreuses études montrent que l'alimentation des juvéniles, du fait de leur digestion à prédominance intracellulaire, requiert la présence de molécules de faibles poids moléculaires (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Zambonino-Infante and Cahu, 2001). L'utilisation des divers lysats permettrait donc de stimuler l'activité des phosphatases acides en début du stade juvénile (environ 250mg à 500mg) et par conséquent de permettre une meilleure digestibilité de l'aliment. Cette phase est particulièrement délicate puisque les bars sont sevrés (passage d'une alimentation vivante à une alimentation artificielle) à la fin au début du stade juvénile (250mg). Une adaptation optimale des enzymes digestives à ce stade est particulièrement importante. Puis, au-delà de 23 jours d'élevage (âge : 83 jours, 500mg), l'activité spécifique des phosphatases acides diminue pour l'ensemble des lots. Cette tendance est d'ailleurs maintenue après l'arrêt des enrichissements. Cette évolution des capacités digestives des juvéniles est liée à l'ontogénèse. Après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours), les animaux recevant une alimentation enrichie en LBBMA25 ou en Gabolysat ont une activité spécifique des phosphatases acides plus faible que les poissons du lot témoin. En revanche, les juvéniles recevant une alimentation complémentée en PC60 ont une activité spécifique des phosphatases acides plus élevée que les poissons du lot témoin à J23 (âge : 83 jours). L'ensemble de ces données montre que l'utilisation des lysats (LBBMA25 ou Gabolysat) stimule d'abord puis inhibe les activités des phosphatases acides permettant ainsi une optimisation de la digestion des juvéniles. Ainsi, les mécanismes d'ontogénèse et maturation du système digestif restent prédominants et dirigent l'évolution globale des capacités digestives. Dans la littérature, il est montré que l'aliment permet de déterminer le maximum ou plateau d'activité de diverses enzymes pancréatiques ou intestinales (Pour revue : Zambonino-Infante *et al.*, 2001). Cependant, l'aliment n'agit pas ou peu, au cours de l'ontogénèse, sur le déclin ou l'augmentation de ces activités enzymatiques qui sont programmées génétiquement (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). Pourtant, Zambonino-Infante *et al.* (2001) expliquent que le processus



de maturation du système digestif peut être stoppé ou au contraire accéléré lorsque les larves ou juvéniles reçoivent une alimentation adéquate.

L'activité spécifique de l'amylase est relativement stable chez les animaux recevant une alimentation enrichie. En revanche, elle subit de fortes variations dans le lot témoin au cours de l'élevage. L'activité spécifique amylasique est inhibée par les trois enrichissements testés après 8 jours d'élevage. Les divers enrichissements utilisés sont très pauvres en glucides et particulièrement riches en molécules d'origines protéiques facilement assimilables (Tableau 6, chapitre 1 ; chapitre 3). L'alimentation des poissons d'élevage et particulièrement des poissons carnivores tel que le bar, se caractérise par des taux élevés en protéines d'origine animale dans l'aliment (Panserat and Kaushik, 2002). La grande exigence du poisson en protéines alimentaires dérive du faible besoin énergétique (donc faible besoin en nutriments énergétiques non azotés tels que les glucides) et de l'importance du catabolisme direct par voie oxydative des acides aminés absorbés. Cela pourrait expliquer la faible variation d'activité amylasique observée au cours de l'élevage pour les animaux recevant une alimentation enrichie (Panserat and Kaushik, 2002). Il est ainsi démontré que les glucides sont une source énergétique mineure chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Panserat and Kaushik, 2002). En effet, en l'absence de glucides alimentaires, ce sont les protéines et les lipides qui sont rapidement et efficacement métabolisés afin de fournir l'énergie nécessaire à la couverture des besoins chez la truite (Panserat and Kaushik, 2002). L'amylase ne serait donc pas une enzyme clé impliquée dans la digestion des juvéniles de bars. Sa non-régulation prédéterminée au cours de l'ontogenèse conforte cette hypothèse.

A J8, pour l'ensemble des lysats (LBBMA25, Gabolysat et PC60), l'activité spécifique de la trypsine est inhibée. Les lysats sont particulièrement riches en peptides et en acides aminés (Tableau 6, chapitre 1 ; chapitre 3), or la trypsine est une enzyme hydrolysant plutôt des protéines. Dans un premier temps les juvéniles, qui ont une digestion à prédominance intracellulaire vont privilégier l'utilisation des molécules de faible poids moléculaire donc inhiber ou ne pas stimuler l'activité d'enzymes extracellulaires telle que la trypsine. L'augmentation de l'activité spécifique de la trypsine intervient plus ou moins rapidement en fonction de l'enrichissement utilisé. En effet, ce phénomène se déroule dès le 72<sup>ème</sup> jour pour les juvéniles recevant une alimentation enrichie au LBBMA25, au 92<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 152 jours), en ce qui concerne les animaux recevant une alimentation enrichie au Gabolysat, et après le 103<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 163 jours) pour les poissons recevant une alimentation enrichie au PC60. Cette augmentation de l'activité de la trypsine fait partie de la maturation du système

digestif. En effet, au cours de l'ontogenèse, la digestion des juvéniles de bars va devenir à prédominance extracellulaire et donc nécessiter l'implication d'enzymes extracellulaires alcalines telles que la trypsine.

L'ensemble de ces données montre que l'utilisation de lysats au début du stade juvénile (250mg à 500mg) chez le bar *Dicentrarchus labrax*, permet une meilleure répartition des activités enzymatiques. Ainsi, les lysats vont entraîner une diminution de l'activité des enzymes extracellulaires et favoriser l'activité des enzymes intracellulaires. Ce mécanisme va permettre une optimisation de la digestion des juvéniles. Puis, lorsque la phase juvénile est suffisamment avancé (> 500mg) les lysats favorisent l'activité de la trypsine devenue une enzyme majeure dans la digestion puisqu'au cours de l'ontogenèse l'activité des enzymes intracellulaires acides diminue quelle que soit l'alimentation utilisée (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). Au vu de ces résultats, l'hypothèse suivante peut être émise : les lysats utilisés au cours de cette étude entraînent une optimisation du système digestif et des capacités digestives de bar, en stimulant d'abord les enzymes intracellulaires acides, puis en accélérant la transition vers la digestion à prédominance extracellulaire.

Cependant, la croissance et la survie sont très variables en fonction de l'enrichissement utilisé. De ce fait, l'utilisation du PC60 provoque de fortes mortalités et une faible croissance (diminution de 25% de poids par rapport au témoin). En revanche, une bonne survie et une croissance élevée sont obtenues avec les lysats LBBMA25 (+62% de poids par rapport au témoin) et Gabolysat (+37% de poids par rapport au témoin). Des paramètres autres que les enzymes digestives et leur bonne régulation sont donc à prendre en compte pour expliquer ces résultats zootechniques. Ainsi, une meilleure utilisation de la nourriture est largement dépendante de la digestion et de l'absorption de l'aliment. Ce processus est la résultante de plusieurs paramètres. D'abord, il est le produit de l'activité totale des enzymes digestives, incluant le stade final de la digestion et l'absorption, qui se déroule au niveau de la bordure en brosse de l'intestin (Klein *et al.*, 1998). Ensuite, ce phénomène dépend de la capacité digestive des animaux qui est fonction de leur stade et de leur capacité à transférer l'aliment digéré à travers la membrane de l'épithélium de l'intestin (Klein *et al.*, 1998). L'intestin est un organe impliqué dans d'importantes fonctions physiologiques. Ainsi, il est le site de la digestion des aliments et de l'absorption des nutriments (Caballero *et al.*, 2003). L'utilisation optimale des nutriments alimentaires dépend donc fortement de l'efficacité de ces fonctions.

Pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la digestion et la croissance des juvéniles de bars, nous avons choisi d'effectuer des études morphologiques et

morphométriques via l'utilisation de la microscopie optique et de la microscopie électronique. L'étude histologique permet d'observer la structure de l'intestin : des entérocytes de forme prismatique avec un noyau au pôle basal et une différenciation en microvillosités au niveau du pôle apical caractéristique d'un épithélium simple prismatique et absorbant. De plus, des cellules à mucus sont présentes entre les entérocytes. Ces cellules permettent de lubrifier l'épithélium pour favoriser les échanges. Ainsi, la sécrétion permet de maintenir une quantité d'eau (hydratant le mucus) qui favorise la diffusion des substances et les mécanismes d'absorption et une lame basale reposant sur le tissu conjonctif. Les cellules à mucus sont aussi présumées contribuer aux défenses des poissons contre les organismes pathogènes (Dezfuli *et al.*, 2006). Des différences de structure intestinale sont essentiellement observées au niveau des caeca pyloriques et non de l'intestin. L'enrichissement PC60 entraîne la présence de villosités peu nombreuses et de taille réduite, ainsi qu'un nombre réduit de cellules à mucus dès le 8<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 68 jours). En revanche, les enrichissements LBBMA25 et Gabolysat permettent une forte augmentation du nombre relatif de cellules à mucus par rapport au nombre d'entérocytes dès le 8<sup>ème</sup> jour d'élevage. L'arrêt de l'enrichissement ne provoque pas de changement au niveau des structures intestinales. De cette façon, les différences apparaissant entre les différents lots se maintiennent. L'enrichissement LBBMA25 entraîne toujours un nombre plus élevé de cellules à mucus, suivi par l'enrichissement Gabolysat, puis, vient le témoin et enfin l'enrichissement PC60 qui provoque la présence de peu de cellules à mucus. L'ensemble de ces données montre que l'augmentation du nombre de cellules à mucus au niveau de l'épithélium intestinal des juvéniles de bar est un phénomène intervenant dans l'ontogenèse. En effet, quelle que soit l'alimentation reçue, le nombre de cellules à mucus évolue positivement au cours de l'ontogenèse. Le nombre de cellules à mucus dénombrées au niveau du segment Z des juvéniles de bars est corrélé avec les poids obtenus au cours de l'élevage (Chapitre 3). Ainsi, les meilleurs résultats de croissance sont obtenus avec l'enrichissement LBBMA25, puis le Gabolysat, ensuite le témoin et enfin avec le PC60. La présence de cellules à mucus pourrait donc être un élément clé dans la mise en place du système digestif des bars, pour obtenir une digestion et une absorption suffisante à une bonne croissance.

La microscopie électronique permet d'observer l'ultrastructure de l'intestin, et plus particulièrement de l'épithélium intestinal. De ce fait, les entérocytes, les cellules à mucus et les jonctions intercellulaires peuvent être observés. En ce qui concerne les traitements LBBMA25 et Gabolysat les cellules à mucus appelées également cellules caliciformes sont présentes en grand nombre. Ces dernières secrètent des grains de mucine dans la lumière intestinale par l'intermédiaire d'un canal excréteur. La présence importante de mitochondries à crêtes tubulaires

autour des structures particulières (cellules à mucus, lysosomes secondaires, vésicules d'endocytose) ainsi que la décondensation de la chromatine des noyaux cellulaires, montrent que l'activité cellulaire des entérocytes est importante (Philip and Balas, 2002). Les résultats obtenus avec le PC60 confirment ceux observés en histologie, puisque les microvillosités sont très peu développées. De plus, les lysosomes secondaires sont présents en grande quantité. L'observation de ces nombreux organites, impliqués dans la digestion intracellulaire, est en accord avec nos diverses observations. Ainsi, la maturation du système digestif de ces juvéniles recevant l'aliment PC60 est particulièrement troublée. Les lysats LBBMA25 et Gabolysat entraînent la présence de cellules à mucus mais dans une proportion légèrement moindre qu'en début de développement. La mesure de la taille des microvillosités montre qu'il existe des différences importantes en fonction de l'alimentation reçue après 103 jours d'élevage. En effet, la taille moyenne des microvillosités est de 2,46 $\mu$ m pour les animaux témoins, de 1,97 $\mu$ m pour les animaux enrichis en Gabolysat, de 1,34 $\mu$ m pour les animaux enrichis en PC60 et de 2,87 $\mu$ m pour les animaux enrichis en LBBMA25. La taille des microvillosités est nettement plus faible pour les animaux enrichis en PC60 par rapport aux autres lots. En revanche, l'enrichissement LBBMA25 entraîne une forte augmentation de la taille des microvillosités en comparaison avec les animaux témoins. Certains auteurs ont démontré que des saumons transgéniques, mutés au niveau du gène de l'hormone de croissance, ont une surface intestinale augmentée par rapport à des saumons témoins, suggérant que les saumons transgéniques sont capables d'augmenter leur croissance en augmentant la taille totale de l'intestin et en stimulant la sécrétion des enzymes digestives par les cellules intestinales (Stevens *et al.*, 1999; Stevens and Devlin, 2000; Blier *et al.*, 2002).

L'enrichissement PC60 entraîne donc un faible développement de l'intestin caractérisé par des villosités et des microvillosités de tailles très réduites, peu de cellules à mucus ainsi qu'un nombre important de lysosomes secondaires. Cette structure faiblement développée de l'intestin est en accord avec les données zootechniques obtenues avec l'utilisation du PC60. Cet enrichissement entraîne donc un blocage de l'ontogenèse du système digestif, et en particulier de l'intestin, provoquant alors une forte mortalité et une croissance faible des juvéniles de bars. Le Gabolysat entraîne une forte augmentation du nombre de cellules à mucus permettant un meilleur échange à la surface de l'épithélium intestinal, ainsi que la présence de villosités développées. L'association de ces deux facteurs permet une amélioration de l'absorption des nutriments. Enfin, le LBBMA25 permet à la fois d'augmenter le nombre de cellules à mucus, la taille des microvillosités et favorise la présence de villosités développées. Ces trois paramètres optimisent l'absorption puisque la surface d'échange est particulièrement augmentée (grandes

villosités et microvillosités) et que l'échange est favorisé en milieu aqueux (beaucoup de cellules à mucus) (Philip and Balas, 2002).

Il existe donc plusieurs niveaux de régulation de la digestion et de la maturation du système digestif chez le juvénile de bar *Dicentrarchus labrax*. En effet, l'ensemble de cette étude montre que la composition biochimique globale (protéines, glucides, lipides et poids moléculaire) des enrichissements intervient grandement dans la régulation des enzymes digestives. De ce fait, l'utilisation d'un enrichissement riche en molécules de faible poids moléculaire optimise les capacités digestives des juvéniles de bars. Toutefois, le développement du système digestif et en particulier de l'intestin fait intervenir une régulation beaucoup plus fine impliquant des molécules particulières propres à un lysat donné. Les lysats Gabolysat et LBBMA25 permettent une forte stimulation de la croissance associée à une optimisation de la digestion des juvéniles de bars à la fois via la régulation des capacités digestives (composition biochimique globale), mais aussi en favorisant l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin (molécules particulières). De plus, seul l'ensilage LBBMA25, permet une augmentation de la taille des microvillosités au niveau de l'intestin. Cet ensilage entraîne donc des changements importants au niveau de la physiologie digestive des juvéniles de bars. Une caractérisation des molécules impliquées dans ce mécanisme devra être envisagée.

La Figure 84 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience.

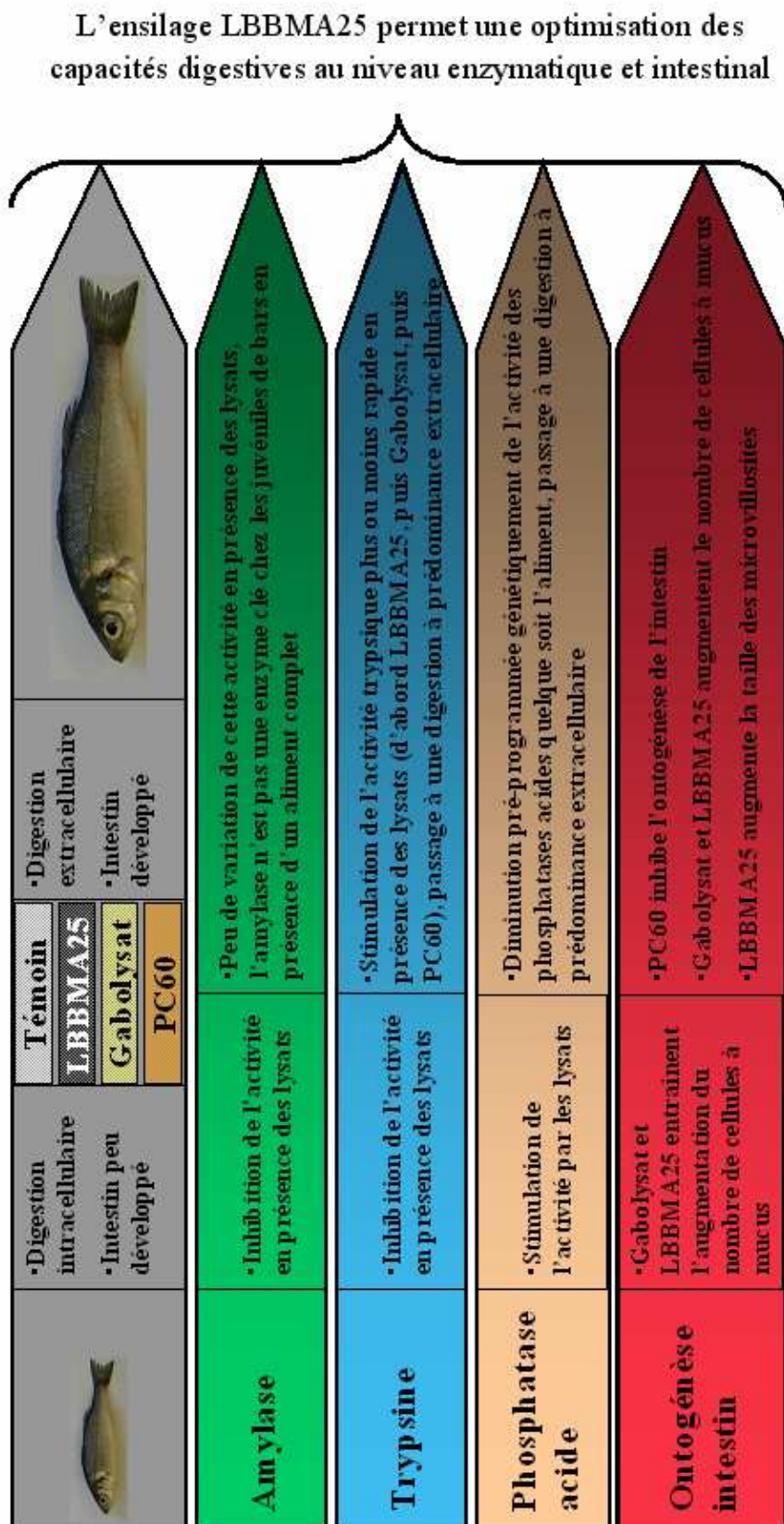


Figure 84: Schéma de synthèse de l'étude de l'effet des ensilages sur la capacité digestive et l'ontogénèse du système digestif de juvéniles de bars.

## **D. Conclusion**

L'ensemble de cette étude concernant l'action des ensilages sur la digestion a permis d'obtenir plusieurs réponses.

D'abord, l'étude de l'effet des ensilages sur l'activité des enzymes digestives de métranauplii d'artémies *in vivo* a permis de caractériser la fraction impliquée dans cette stimulation. En effet, ces données suggèrent que la fraction protéique est à l'origine de la stimulation de la sécrétion des enzymes digestives. De plus, la séparation des protéines contenues dans les ensilages, en fonction de leur poids moléculaire, montre que seuls les peptides de poids moléculaires <5,02kDa sont capables de stimuler l'activité des enzymes digestives de l'artémie *in vivo*.

Ensuite, nous avons comparé cette activité avec celles d'hormones (insuline et gastrine) de vertébrés, connues pour être impliquées dans régulation de la sécrétion d'enzymes digestives. Cette étude montre que les ensilages sont capables d'induire une réponse, en terme d'activité enzymatique et de concentration, semblable à l'action d'hormones telles que la gastrine ou l'insuline. De plus, les fractions positives correspondent à un poids moléculaire proche de ceux trouvés pour des peptides de type gastrine/cholécystokinine chez les crustacés.

Cependant, l'expérimentation sur les artémies est effectuée sur des animaux *in vivo*, possédant donc probablement un système hormonal de réponse à la prise alimentaire. Les données obtenues peuvent donc être la résultante de la présence dans les ensilages de molécules actives sur la sécrétion des enzymes digestives soit par voie directe, soit par voie indirecte (stimulation des voies de type hormonale). De plus, rien n'indique que les voies d'action des 4 différents ensilages seraient les mêmes.

L'étude menée sur des juvéniles de bars montre que la composition biochimique globale (protéines, glucides, lipides et poids moléculaire) des enrichissements intervient de manière importante dans la régulation des enzymes digestives. De ce fait, l'utilisation d'un enrichissement contenant une part importante de molécules de faible poids moléculaire optimise les capacités digestives des juvéniles de bars.

Cependant, l'ontogenèse du système digestif et en particulier de l'intestin fait intervenir une régulation fine impliquant des molécules particulières. Seul les lysats Gabolysat et LBBMA25 permettent une forte stimulation de la croissance associée à une optimisation de la digestion des juvéniles de bars à la fois via la régulation des capacités digestives (composition

biochimique globale), mais aussi en favorisant l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin (molécules particulières).

De plus, seul l'ensilage LBBMA25, permet une augmentation de la taille des microvillosités au niveau de l'intestin. Cet ensilage entraîne donc probablement des changements majeurs au niveau de la physiologie digestive des juvéniles de bars.

Il existe donc plusieurs niveaux de régulation de la digestion et de la maturation du système digestif chez les larves et les juvéniles par les ensilages. D'abord, la régulation des capacités digestives, essentielles à une bonne digestion des larves et des juvéniles, mais aussi la régulation du développement du système digestif qui détermine la bonne survie et croissance des animaux. L'activité sécrétogène n'est donc pas suffisante pour estimer la qualité de la digestion. En effet, tous les lysats testés permettent une optimisation des capacités digestives mais l'ontogénèse du système digestif peut être inhibée (PC60), inchangée ou stimulée (Gabolysat, LBBMA25) en présence de ces lysats. Le mode d'action de ces différents lysats implique donc l'intervention de molécules différentes.

## **IV Recherche de molécules bio actives sur le système immunitaire**

### **A. Introduction**

Les problèmes sanitaires dans les aquacultures sont une grande préoccupation. En effet, les maladies infectieuses constituent un problème majeur et représentent une des principales barrières au développement de l'aquaculture. Les larves d'animaux aquatiques sont fortement exposées aux troubles gastro-intestinaux associés aux microbes car elles débutent leur alimentation alors même que le tractus digestif n'est pas encore complètement développé. De même, leur système immunitaire est incomplet (Timmermans, 1987).

Il existe plusieurs paramètres entrant dans le système de défense inné. D'abord, les paramètres physiques, comme avec la présence de mucus au niveau des épidermes, agissant comme une première barrière contre les infections. Mis à part le piégeage des pathogènes, le mucus contient des molécules impliquées dans l'immunité telles que des lectines, du pentraxin, du lysozyme, des protéines du complément, des peptides antimicrobiens et des immunoglobulines (Pour revue : Magnadottir, 2006).



Ensuite, l'existence de cellules du système inné avec des macrophages, l'activité de cellules inflammatoires et de cellules cytotoxiques.

Finalement, il existe les paramètres humoraux, tels que les inhibiteurs de protéases, présents dans le sérum, qui sont impliqués dans la phase de réactions aiguës et la défense contre les pathogènes. En effet, de nombreux pathogènes sécrètent des enzymes protéolytiques (Magnadottir, 2006). Mais, le système humoral comprend aussi les enzymes lytiques telles que : le système phénoloxydase, la voie lytique du complément avec le lysozyme, la chitinase, les cathepsines, qui sont des éléments importants de défense, principalement contre les bactéries. Le système phénoloxydase inclut une série d'enzymes activant la cascade de la phénoloxydase. Cette succession enzymatique a le pouvoir d'encapsuler les bactéries, ce qui peut tuer un certain nombre de pathogènes et induit la coagulation (Petranyi, 2002). Le lysozyme est un paramètre important de la défense immunitaire chez les vertébrés et les invertébrés. Il est connu pour activer le système du complément et les phagocytes (Magnadottir, 2006). Le système du complément est un système de défense particulièrement ancien puisqu'il a été récemment identifié chez les invertébrés deutérostomiens tels que des échinodermes et des tuniciers (Pour revue : Boshra, 2006). La participation du complément aux voies alternatives et des lectines a aussi été démontrée chez les invertébrés (Boshra *et al.*, 2006). Le système du complément est composé de nombreuses molécules plasmatiques jouant un rôle dans l'immunité innée et adaptative (Boshra *et al.*, 2006). Le système du complément peut être activé par trois voies : alternative, lectine ou classique. La voie classique est initiée par le complexe antigène anticorps ; la voie alternative correspond à une activation spontanée du complément ; la voie des lectines requiert l'interaction de lectines avec les sucres de la paroi des microbes (Boshra *et al.*, 2006). Les fonctions médiées par l'activation du complément dans l'immunité innée incluent la phagocytose et la cytolysse des pathogènes, la solubilisation des complexes immuns et l'inflammation (Boshra *et al.*, 2006). Cependant, chez les poissons, les molécules impliquées dans la voie des lectines sont très mal connues.

De nombreux immuno-stimulants (glucanes, vitamines, acides gras essentiels) ont été utilisés avec succès en aquaculture et leur effet stimulant sur la résistance aux maladies et aux stress est bien documenté (Boshra *et al.*, 2006). En effet, l'activité du complément, présente dans le sérum de poisson, est stimulée par une administration orale de vitamine E ou C en supplémentation de l'aliment (Boshra *et al.*, 2006). De plus, une déficience en ces vitamines implique une déplétion de la voie alternative du complément chez la truite (Boshra *et al.*, 2006). Des effets similaires ont été observés chez de nombreuses espèces de poissons avec la vitamine

C. Enfin, l'activité hémolytique médiée par le complément est stimulée chez le poisson alimenté avec des immuno-stimulants tels des glucanes chez *Dicentrarchus labrax* ou des acides gras poly-insaturés  $\omega_3$  ou des caroténoïdes chez *Oncorhynchus mykiss* (Boshra *et al.*, 2006).

Tous ces composants de l'immunité innée constituent la première défense immunitaire des invertébrés et des vertébrés contre les pathogènes. Les paramètres immuns innés, et en particulier les activités lysozymale et lytique, sont utilisés en tant qu'indicateurs de l'effet de facteurs externes tels que des compléments alimentaires, des probiotiques ou des immuno-stimulants, sur le système immunitaire et la résistance aux maladies des poissons (Magnadottir, 2006).

## **B. Action de l'enrichissement LBBMA25 sur le système immunitaire de juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax***

### **1. Introduction**

Les poissons téléostéens représentent un groupe important chez les vertébrés (environ 20 000 espèces). Ils sont apparus depuis environ 300 millions d'années et présentent des similarités dans l'organisation de leur système immunitaire avec les autres vertébrés (Scapigliatti *et al.*, 2002). De plus, les téléostéens sont importants en aquaculture puisque beaucoup d'espèces ont été introduites dans des fermes aquacoles, et que d'autres sont étudiées afin de développer leur production aquacole. Différentes maladies peuvent affecter les poissons à tous les stades de leur vie et la connaissance de la régulation de leur système immunitaire est particulièrement important pour le contrôle sanitaire (Scapigliatti *et al.*, 2002).

Les poissons téléostéens possèdent un système immunitaire organisé pour la défense de l'organisme contre les pathogènes via l'existence de mécanismes immunitaires spécifiques et non-spécifiques (Scapigliatti *et al.*, 1999). La réponse innée précède généralement la réponse adaptative ; elle l'active et détermine la nature de celle-ci (Magnadottir, 2006). Le système immunitaire inné est de première importance pour combattre les infections chez les poissons. Ainsi, le système de réponse acquise est relativement inefficace chez les poissons en raison de leur statut, d'un point de vue évolutif, et de leur nature poïkilotherme (Magnadottir, 2006). Il en résulte un répertoire limité en anticorps, une mémoire et une prolifération des lymphocytes réduites.

L'apparition du système de défense immunitaire spécifique est très variable en fonction de l'espèce de poisson. En général, le système immunitaire acquis se développe tard chez les

espèces marines qui dépendent du système de défense inné pendant les premiers mois après la naissance (Magnadottir, 2006). Ainsi, le système immunitaire inné est d'une importance vitale pour la résistance aux maladies des poissons, et en particulier pendant le développement du système immunitaire acquis.

Les travaux récents montrent que les différences génétiques du système immunitaire et de leurs molécules associées sont faibles entre les mammifères et les poissons téléostéens (Press and Evensen, 1999). En dépit de ces légères différences, la morphologie, c'est à dire la structure et la forme du système immunitaire, est très différente entre les mammifères et les poissons (Press and Evensen, 1999). Les principales différences sont : l'absence de moëlle osseuse et de ganglions lymphatiques. Par conséquent, chez les poissons téléostéens, le rein constitue le principal organe lymphoïde en complément du thymus, de la rate et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (Press and Evensen, 1999). Le rein (Figure 85) est un organe en Y qui est décrit comme possédant de nombreux compartiments fonctionnels et anatomiques (Press and Evensen, 1999; Villeneuve, 2005).

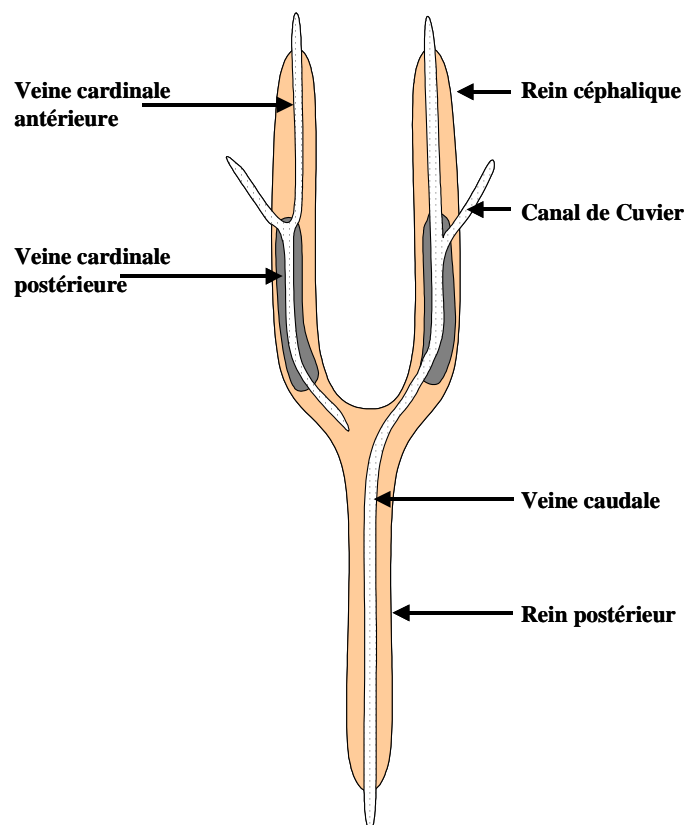


Figure 85 : Schéma des reins ainsi que les principales veines rénales, chez le bar *Dicentrarchus labrax* (Grassi Milano *et al.*, 1997).

La plus grande partie du rein des téléostéens possède peu de tissus excréteurs et correspond au rein céphalique. Ce dernier est principalement un compartiment lympho-myéloïde (Press and Evensen, 1999). Le rein céphalique est un organe clé dans l'immunité des poissons car c'est le principal site de développement et de prolifération des lymphocytes B, des macrophages et probablement des granulocytes (Romano *et al.*, 2002). Le tronc du rein est constitué de tissus rénaux avec les glomérules, tubules et canaux collecteurs. En revanche, la partie la plus haute du rein (rein céphalique) est pratiquement dépourvue de tissu rénal et est dit agglomérulaire (Grove *et al.*, 2006). Ainsi, le rein céphalique est un important organe hématopoïétique et possède de nombreuses similitudes avec la moëlle épinière des mammifères (Press and Evensen, 1999). Le rein céphalique sert en tant qu'un second organe lymphoïde, un analogue de ganglion lymphatique, important dans l'induction et l'élaboration de la réponse immunitaire (Press and Evensen, 1999). Le rein céphalique est impliqué à la fois dans la réponse immunitaire non spécifique et dans la réponse spécifique (Press and Evensen, 1999). Chez le bar, le système rénal consiste en un organe en « Y », où les branches antérieures et la région antérieure de l'unique branche postérieure constituent les tissus hématopoïétiques pauvres en tubules et en glomérules (Grassi Milano *et al.*, 1997). Puis, le tissu change en partie caudale, où se trouve une région de transition entre la partie hématopoïétique et excrétrice du rein postérieur. Ce dernier est graduellement réduit et substitué par des tubules et des glomérules (Grassi Milano *et al.*, 1997). Les canaux de Cuvier et les veines cardinales antérieures et postérieures se situent dans la partie antérieure du rein.

Au début du développement des bars *Dicentrarchus labrax*, la partie antérieure du rein est excrétrice, puis elle est progressivement remplacée par le tissu lymphoïde hématopoïétique (Grassi Milano *et al.*, 1997). Au cours de cette transformation, le rein postérieur se développe et devient le rein excréteur. Chez *Dicentrarchus labrax*, les premières cellules hématopoïétiques apparaissent une semaine après la naissance et leur nombre augmente graduellement (Grassi Milano *et al.*, 1997). Des bourgeons de tubes mésonéphriques se forment à partir du pronephros vers 20 jours (Nebel, 2005). Reliés à un petit glomérule, chaque tubule grandit en diamètre et en longueur, se replie tandis que leur nombre s'accroît (Nebel, 2005). La régression du pronephros commence entre 90 et 100 jours après la naissance. De cette manière, la morphogenèse du rein postérieur est complète 4 mois après la naissance des poissons (Grassi Milano *et al.*, 1997). L'acquisition rapide de ce système de défense immunitaire est donc

essentielle pour les juvéniles de bars qui n'ont pour se défendre dans un premier temps que le système de défense inné.

## **2. Matériel et méthodes**

### **a. Matériel biologique**

Les poissons utilisés dans cette étude sont issus de l'expérimentation 3 pour les analyses d'activités impliquées dans l'immunité et de l'expérimentation 2 pour les observations histologiques (chapitre 3). Les sérums n'ont pu être prélevés qu'à partir du 28<sup>ème</sup> jour (age : 103 jours) en raison de la taille des poissons et d'une quantité insuffisante de sang avant cette date.

### **b. Histologie**

La préparation des lames est effectuée comme décrit précédemment (chapitre 4, III) et la structure du rein céphalique est observée sur le segment X (Figure 76).

### **c. Dosages des activités immunitaires**

Les poissons sont anesthésiés sur de la glace. Après prélèvement du sang au niveau du cœur à l'aide d'une seringue stérile, le sang est centrifugé 5 minutes à 10 000g. Les différentes analyses sont effectuées sur le sérum (surnageant).

- **Dosage de l'activité lysozyme-like**

L'activité du lysozyme, contenue dans le sérum, est mesurée indirectement via la lyse d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, microorganisme particulièrement sensible au lysozyme (Thompson *et al.*, 1995). La présence d'une activité de type lysozyme est mise en évidence par diminution de l'absorbance à 450nm après 5 minutes. L'activité est comparée à l'aide d'une gamme étalon qui est effectuée avec du lysozyme de blanc d'oeuf de poule. L'activité lysozymale est exprimée en équivalent du lysozyme de blanc d'œuf utilisé pour effectuer la gamme étalon.

- **Dosage de l'activité phénoloxydase**

L'activité phénoloxydase contenue dans le sérum est mesurée par spectrométrie en déterminant la formation du dopachrome à partir de la L-DihydroxyPhénylAlanine (L-DOPA) (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). L'échantillon (50µl) est ajouté à 150µl de Tris 0,05M, pH 8, puis incubé avec 50µl de tampon cacodylate 10mM, pH 7 et 50µl de L-DOPA (3g.L<sup>-1</sup>) pendant 10 minutes à 25°C. L'absorbance est lue à 492nm. L'activité phénoloxydase est exprimée en unité (où une unité correspond une unité d'absorbance).

- Dosage de l'activité anti-protéasique

L'activité anti-protéasique est mesurée en ajoutant 5 $\mu$ l de sérum à 15 $\mu$ l de trypsine (1mg/10ml) contenue dans du tampon Tris 0,05M, pH 8. L'ensemble est incubé pendant 5 minutes à température ambiante (Thompson *et al.*, 1995). Puis, 200 $\mu$ l de BAPNA (10,4mg/20 ml de Tris 0,01M, pH 7,4) sont ajoutés. L'incubation est effectuée pendant 15 minutes à température ambiante. Puis, la réaction est arrêtée par l'ajout de TCA à 30% (500 $\mu$ l). Un témoin positif est réalisé sans sérum. L'absorbance est lue à 410nm. L'activité anti-protéasique est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin positif.

- Dosage de l'activité anti-vibrio

Dans une étape préliminaire, les pathogènes (*Vibrio carchariae*, pathogène d'ormeau *Haliotis sp.* et *Vibrio anguillarum*, pathogène de poissons) sont soumis à une pré-culture par un ensemencement à 1% de 2 tubes de 10ml de bouillon TSB à 20% de NaCl puis incubé pendant 24 heures à 22°C en aérobiose. Après 48 heures de préculture, les vibrios sont dilués suite à la mesure de la DO à 540nm puis étalés sur 20ml de gélose Zobell de manière à ce que la concentration soit de 5.10<sup>6</sup>UFC.ml<sup>-1</sup> et le tapis bactérien non confluent (540nm : DO =1.10<sup>9</sup>UFC.ml<sup>-1</sup> soit en général une dilution à 10<sup>3</sup> de la préculture de 24 heures de *Vibrio sp.*). Des puits ( $\varnothing = 6$ mm) sont ensuite creusés dans la gélose à l'aide de cônes stériles. Le fond de ces puits est obturé par 20 $\mu$ l de gélose blanche molle stérile à 7% d'agar. Puis, 30 $\mu$ l de surnageant sont déposés au fond du puits. Les boîtes sont alors mises à incuber en aérobiose 2 heures à 4°C afin de permettre la diffusion d'éventuels métabolites puis 48 heures à 22°C en aérobiose pour permettre la croissance des vibrios. L'activité anti-microbienne est quantifiée par mesure des surfaces d'inhibition (Si) autour des puits (mm<sup>2</sup>) (Figure 86).

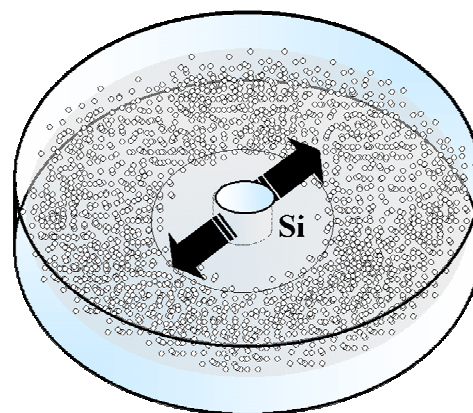


Figure 86: Illustration de la méthode de diffusion sur agar pour la quantification des activités anti-microbiennes. Si = surface d'inhibition (mm<sup>2</sup>). Les flèches indiquent la diffusion à travers la gélose (Frouël, 2006).

#### d. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés avec un écart type ( $n=10$  pour chaque test). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey où les différences significatives ( $p<0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

### **3. Résultats**

Les Figure 87 et Figure 88 montrent l'ontogenèse du rein céphalique chez des juvéniles de bars recevant différentes alimentations. Plusieurs caractéristiques sont observées au niveau du rein céphalique : d'abord la présence de la veine cardinale, ensuite l'existence de tubules rénaux en nombres variables en fonction de l'aliment et de l'âge des animaux, enfin des mélanomacrophages caractérisés par la présence de granules noirs, chargés en mélanine. Au cours du développement, la taille du rein céphalique augmente régulièrement quelle que soit l'alimentation. Cependant, la taille du rein céphalique est rapidement (dès 23 jours d'élevage soit un âge de 83 jours) plus importante pour les animaux alimentés avec l'aliment LBBMA25 5%.

Après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours), les animaux recevant une alimentation témoin montrent la présence de peu de tubules rénaux dans le rein céphalique. En revanche, après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours), les animaux qui sont nourris avec de l'aliment LBBMA25 5% possèdent un nombre important de tubules rénaux puisque ces tubules sont présents dans l'ensemble de la surface du rein céphalique. Au 23<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 83 jours), les animaux recevant une alimentation témoin montrent la présence de nombreux tubules dans le rein céphalique. Ainsi, ils représentent une grande partie de la surface du rein à ce niveau. Au contraire de ce qui est observé pour les juvéniles témoins, les animaux alimentés avec du LBBMA25 5% possèdent très peu de tubules rénaux. Après 72 jours d'élevage (âge : 132 jours), le nombre de tubules rénaux diminue quelle que soit l'alimentation, néanmoins, le nombre de tubules reste plus faible pour les animaux nourris avec l'aliment LBBMA25 5%. Après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours), le nombre de tubules rénaux diminue quelle que soit l'alimentation. Ainsi, il n'y a plus du tout de tubules pour les animaux recevant l'aliment LBBMA25 5% et il ne reste que quelques tubules pour les juvéniles témoins. Ce même phénomène est observé après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours).

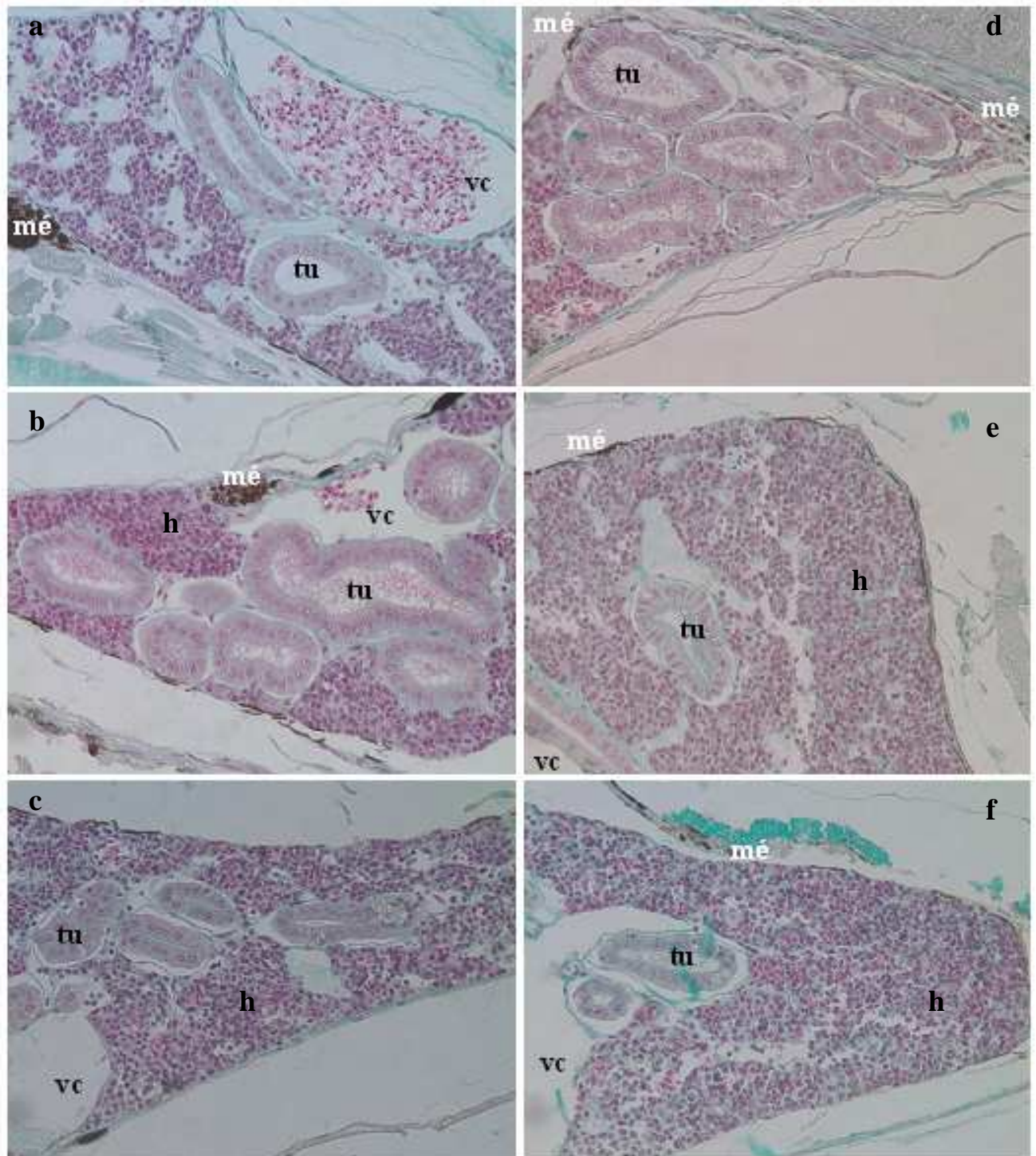


Figure 87 : Morphogenèse du rein céphalique chez les juvéniles de bars ayant reçus divers aliments (\*40). a) Animaux témoins après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours). b) Animaux témoins après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours). c) Animaux témoins après 72 jours d'élevage (âge : 132 jours). d) Animaux LBBMA25 5% après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours). e) Animaux LBBMA25 5% après 23 jours d'élevage (âge : 83 jours). f) Animaux LBBMA25 5% après 72 jours d'élevage (âge : 132 jours). h : tissu hématopoïétique ; mé : mélano-macrophages ; tu : tubules rénaux ; vc : veine cardinale.



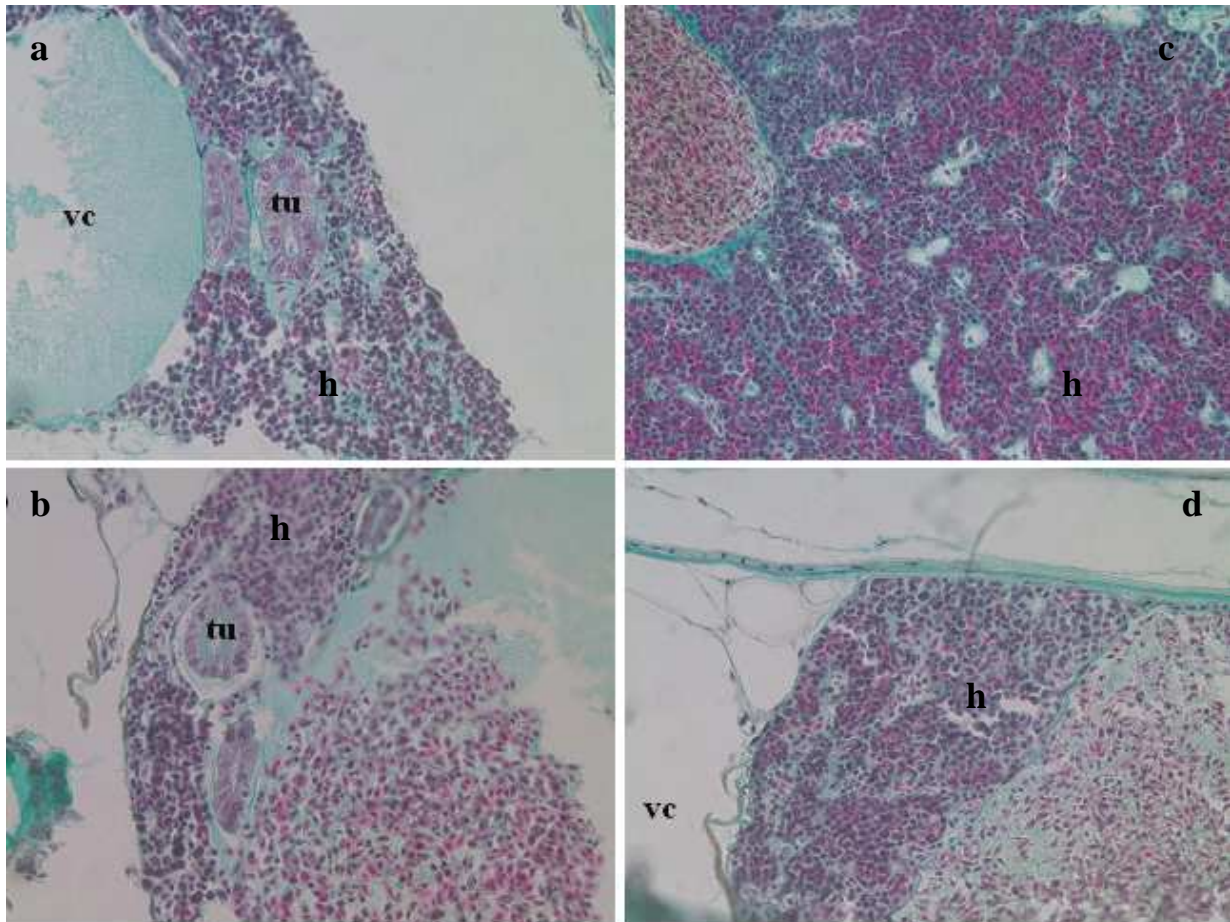


Figure 88 : Morphogenèse du rein céphalique chez les juvéniles de bars ayant reçus divers aliments (\*40). a) Animaux témoins après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours). b) Animaux témoins après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours). c) Animaux LBBMA25 5% après 92 jours d'élevage (âge : 152 jours). d) Animaux LBBMA25 5% après 103 jours d'élevage (âge : 163 jours). h : tissu hématopoïétique ; mé : mélano-macrophages ; tu : tubules rénaux ; vc : veine cardinale.

Au 28<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 103 jours), les poissons recevant l'aliment LBBMA25 2%, ont une activité lysozymale significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) que les bars témoins (Figure 89). Le même phénomène est observé après 56 jours d'élevage (âge : 131 jours). De plus, une même tendance est observée pour l'activité lysozymale entre le jour 28 et 56 quel que soit l'aliment reçu. En effet, cette activité augmente significativement ( $p < 0,05$ ) pour l'ensemble des poissons et cela dans les mêmes proportions soit +0,13 équivalent lysozyme de blanc œuf pour tous les poissons.

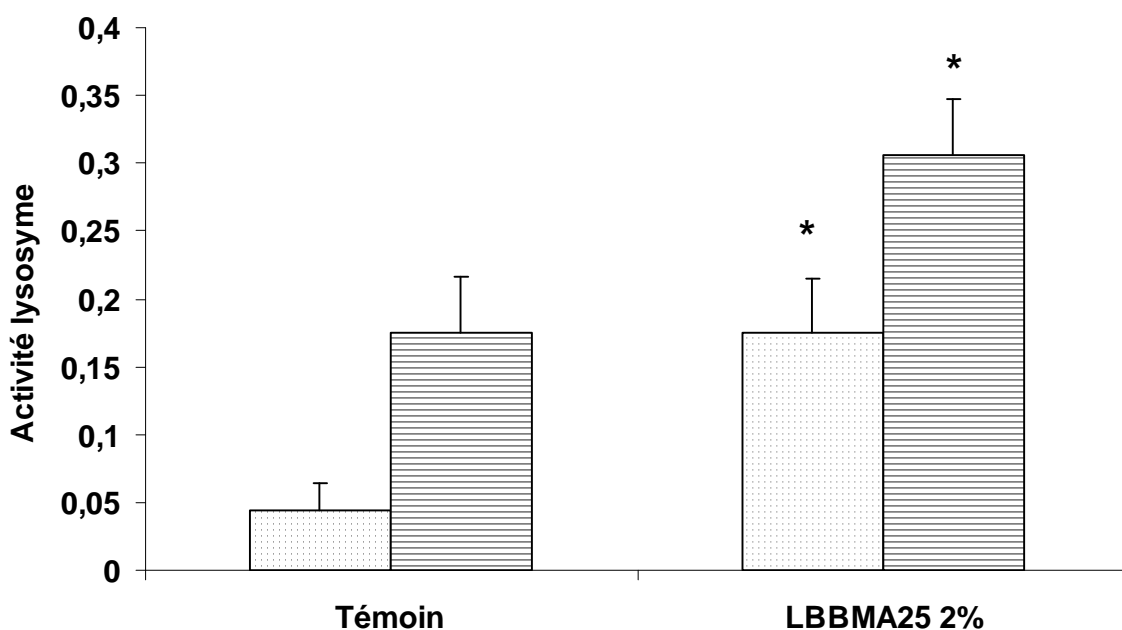


Figure 89 : Activité lysozymale détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours).....ou 56 \_\_\_\_\_ jours d'élevage (âge : 131 jours).

Aucune différence significative n'est observée au jour 28 (âge : 103 jours) concernant l'activité phénoloxydase (Figure 90). En revanche, l'activité phénoloxydase est significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) pour les poissons recevant l'aliment LBBMA25 2% que pour les juvéniles témoins. De plus, l'activité phénoloxydase augmente de manière significative ( $p < 0,05$ ) entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> pour tous les poissons. Cette activité est plus importante d'un facteur 6,7 et 10, respectivement, pour les juvéniles recevant l'aliment témoin et LBBMA25 2%.

L'activité anti-protéasique dosée dans le sérum de juvéniles de poissons après 28 et 56 jours d'élevage est représentée sur la Figure 91. Après 28 jours d'élevage (âge : 103 jours), aucune différence significative n'est observée entre les deux lots. Cependant, à 28 jours d'élevage (âge : 103 jours), l'activité anti-protéasique est particulièrement élevée pour l'ensemble des poissons puisqu'elle permet plus de 80% d'inhibition de l'activité protéasique. Au 56<sup>ème</sup> jour, les animaux recevant l'aliment LBBMA25 2% ont une activité anti-protéasique significativement plus forte ( $p < 0,05$ ) que les juvéniles témoins. Une même tendance, de l'activité anti-protéasique à diminuer entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> jour d'élevage, est observée. Cependant, cette diminution n'est que de 1,6 fois pour les animaux recevant l'aliment LBBMA25 2%, contre 7 fois pour les animaux témoins.

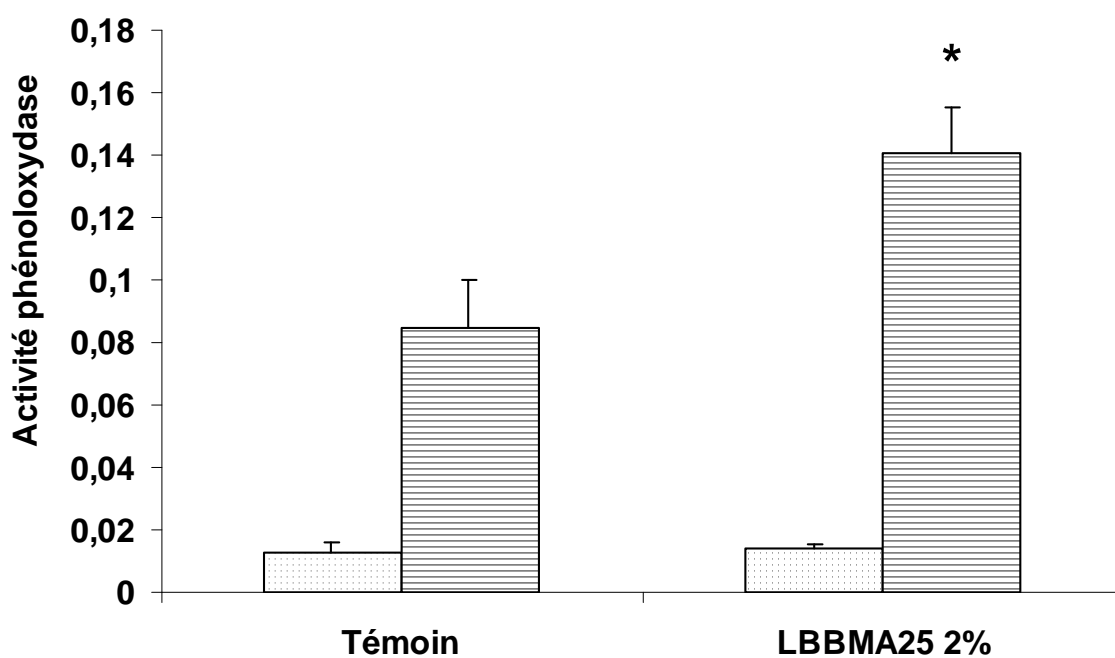


Figure 90: Activité phénoxydase détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours) .....ou 56 \_\_\_\_\_ jours d'élevage (âge : 131 jours). \* : significativement différent du témoin.

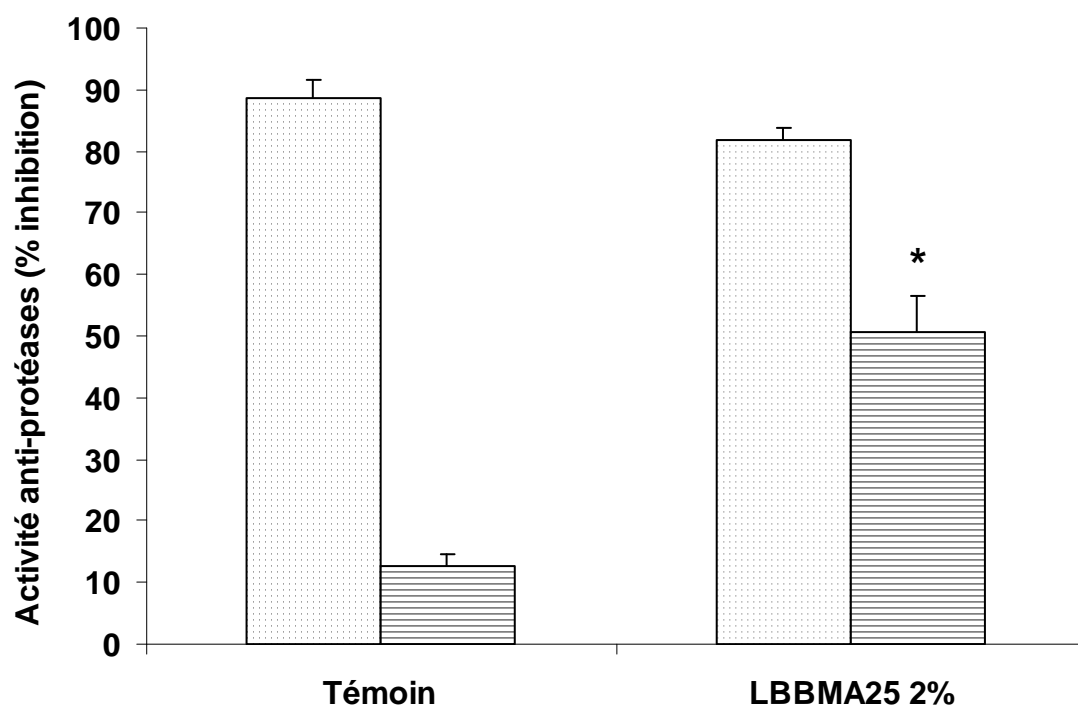


Figure 91: Activité anti-protéase détectée dans le sérum de juvéniles de bars ayant reçus différents aliments après 28 jours (âge : 103 jours).....ou 56 \_\_\_\_\_ jours d'élevage (âge : 131 jours). \* : significativement différent du témoin.

Le dosage des activités anti-microbiennes, dirigées contre deux pathogènes marins *Vibrio carchariae* (pathogène d'ormeaux) et *Vibrio anguillarum* (pathogène de poissons), dans le sérum des juvéniles de bars alimentés avec divers aliments est représenté Tableau 37. Les résultats montrent que le sérum de poisson n'a pas d'activité anti-microbienne quelles que soient les conditions d'alimentation et l'âge des poissons.

Tableau 37 : Activité anti-microbienne contre les pathogènes *Vibrio carchariae* et *Vibrio amguillarum*, détectée au niveau du sérum de juvéniles de bars recevant différents aliments, à 28 ou 56 jours d'élevage. \* : significativement différent du témoin.

	Témoin J28	LBBMA25 2% J28	Témoin J56	LBBMA25 2% J56
Activité anti-bactérienne contre le pathogène <i>Vibrio carchariae</i> (surface d'inhibition mm <sup>2</sup> )	0	0	0	0
Activité anti-bactérienne contre le pathogène <i>Vibrio anguillarum</i> (surface d'inhibition mm <sup>2</sup> )	0	0	0	0

#### **4. Discussion**

Une nutrition adéquate est reconnue comme étant cruciale pour une bonne santé et capacité à détruire les pathogènes (Amar *et al.*, 2004). De nombreuses déficiences immunitaires ont été rapportées comme étant corrélées à un apport insuffisant en éléments essentiels (Amar *et al.*, 2004). De plus, dans des conditions d'élevage intensif, de nombreuses espèces de poisson génèrent un stress lié à l'environnement. Cela conduit à une altération ou même une suppression du système immunitaire rendant les poissons sensibles à diverses maladies (Villamil *et al.*, 2003). Pendant l'élevage, l'utilisation routinière d'antibiotiques n'est pas conseillée. Ils peuvent ainsi induire des effets négatifs sur la flore naturelle des poissons et augmenter le risque de présence de bactéries résistantes aux antibiotiques (Villamil *et al.*, 2003). Une alternative intéressante pour le contrôle des maladies est d'utiliser des immuno-stimulants, qui augmentent la résistance des poissons, par la stimulation des mécanismes de défense immunitaire.

Il existe un intérêt considérable à surréguler le système immunitaire inné à l'aide d'immuno-stimulants (Magnadottir, 2006). Les immuno-stimulants sont des extraits biologiques ou synthétisés chimiquement, capables de stimuler la réponse immunitaire par l'activation des activités bactéricides (Bagni *et al.*, 2005). Les immuno-stimulants peuvent être subdivisés en plusieurs groupes selon leur source : bactérienne, dérivé algal, dérivé animal, facteur nutritionnel ou les cytokines/hormones (Bricknell and Dalmo, 2005). Ces sous-groupes sont indépendants du mode d'action des immuno-stimulants. Différentes catégories de substances sont connues pour

agir comme immuno-stimulants mais peu d'entre elles peuvent être utilisées en aquaculture (Bagni *et al.*, 2005). Les  $\beta$ -glucanes de levures, connus pour stimuler la réponse immunitaire chez de nombreuses espèces de poissons, augmentent la production de protéines lytiques anti-microbiennes telles que le lysozyme et le complément (Bagni *et al.*, 2005). Les effets biologiques des immuno-stimulants sont hautement dépendants du récepteur de la cellule qui le reconnaît en tant que molécule potentiellement à risque et stimule les voies de défenses immunitaires (Bricknell and Dalmo, 2005). Une augmentation des activités et composants de la réponse innée est bénéfique pour les poissons, et en particulier dans les conditions d'aquaculture. Cela est surtout vrai en ce qui concerne l'aquaculture des larves et des juvéniles où il existe de nombreuses pertes en raison d'un système immunitaire incomplet (Magnadottir, 2006). En effet, ces pertes sont attribuées aux infections provenant d'opportunistes environnementaux et de bactéries pathogènes (Magnadottir, 2006). Les immuno-modulateurs peuvent constituer des suppléments aux vaccins pour la protection des poissons d'aquaculture contre les maladies (Bogwald *et al.*, 1996).

Les observations histologiques du rein céphalique permettent d'obtenir des informations sur le développement rénal en fonction des aliments utilisés. Au niveau du rein céphalique, on note la présence de la veine cardinale, de tubules rénaux en nombres variables et des mélanomacrophages caractérisés par la présence de granules noirs, chargés en mélanine (Press and Evensen, 1999). Au cours du développement, la taille du rein céphalique augmente régulièrement quelle que soit l'alimentation. Cependant, la taille du rein céphalique est rapidement (dès 23 jours d'élevage soit un âge de 83 jours) plus importante pour les animaux nourris avec l'aliment LBBMA25 5%. Ce phénomène est certainement lié à une croissance plus importante des juvéniles lorsqu'ils sont alimentés avec ce dernier aliment (chapitre 3, III). De plus, après 8 jours d'élevage (âge : 68 jours), les animaux qui reçoivent une alimentation témoin montrent la présence de peu de tubules rénaux au niveau du rein céphalique. En revanche, les animaux recevant l'aliment LBBMA25 5% possèdent un nombre important de tubules rénaux puisque ces tubules sont présents dans l'ensemble de la surface du rein céphalique. Ces données sont particulièrement intéressantes étant donné que chez le bar, *Dicentrarchus labrax*, des bourgeons de tubes mésonéphriques se forment à partir du pronephros vers 20 jours (Nebel, 2005). Ainsi, dans un premier temps, la partie antérieure du rein est excrétrice. Cette dernière se développe et le nombre de tubules augmente. Lorsque le système excréteur du rein est fonctionnel, la partie antérieure est progressivement remplacée par le tissu lymphoïde hématopoïétique (Grassi Milano *et al.*, 1997). Nos résultats montrent donc que chez les animaux alimentés avec l'aliment LBBMA25 5% le nombre de tubules augmente rapidement,

contrairement au juvéniles témoins. L'ontogenèse de la partie excrétrice du rein est plus rapide en présence de l'aliment LBBMA25 5%. Au cours du développement, le rein postérieur se développe et devient le rein excréteur. La régression du pronephros commence après 90 à 100 jours après la naissance. De cette manière, la morphogenèse du rein postérieur est complète 4 mois après la naissance des poissons (Grassi Milano *et al.*, 1997). Nos résultats montrent un retard dans l'ontogenèse du système excréteur et hématopoïétique situé au niveau du rein céphalique chez les juvéniles témoins par rapport au juvéniles alimentés avec l'aliment LBBMA25 5%. Ainsi, la morphogenèse du rein céphalique est achevée plusieurs semaines plus tôt pour les animaux alimentés avec l'aliment LBBMA25 5%.

Plusieurs analyses d'activités impliquées dans l'immunité ont été effectuées dans le sérum des juvéniles de bar alimenté soit en aliment témoin soit en aliment LBBMA25 2%. Au 28<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 103 jours), les poissons recevant l'aliment LBBMA25 2%, ont une activité lysozymale plus élevée que les bars témoins. Le lysozyme est une activité importante du système de défense inné (Magnadottir *et al.*, 2005) ; c'est une enzyme qui détruit les cellules bactériennes en coupant les liaisons glycosidiques au niveau des peptidoglycanes de la paroi (Reynaud and Deschaux, 2006). Il agit directement sur la paroi des bactéries Gram<sup>+</sup> et sur les peptidoglycanes de la couche interne chez les bactéries Gram<sup>-</sup> lorsque le complément et les autres enzymes ont détruit la paroi externe (Reynaud and Deschaux, 2006). Le lysozyme présent dans le sérum de poisson est connu pour être généralement d'origine leucocytaire (Magnadottir *et al.*, 2005). Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation montrent la capacité de l'alimentation à réguler, tôt dans le développement des juvéniles de bar, l'activité lysozymale. En revanche, les activités de la phénoloxydase et anti-protéase ne montrent aucune différence après 28 jours d'élevage (âge : 103 jours). Ces activités ne sont pas régulées par l'aliment LBBMA25 2% à ce stade de maturation. Il est à noter que l'activité anti-protéases est particulièrement élevée au 28<sup>ème</sup> jour d'élevage (âge : 103 jours). De la sorte, le plasma de poisson contient de nombreux inhibiteurs de protéases qui permettent d'inhiber les nombreuses toxines produites par les bactéries (digérant les protéines des tissus de l'hôte en tant que source d'acides aminés) (Ellis, 1999). Les différents dosages effectués au 56<sup>ème</sup> jour (âge : 131 jours) montrent que les animaux recevant une alimentation LBBMA25 2% possèdent des activités lysozymale, phénoloxydase et anti-protéases plus élevées que les juvéniles recevant une alimentation témoin. Donc, l'aliment LBBMA25 2% peut être considéré comme un immuno-stimulant puisqu'il est capable d'augmenter les activités immunitaires impliquées dans les mécanismes de défenses innés. Ce phénomène est corrélé à une forte stimulation de la croissance des juvéniles et une bonne survie (chapitre 3, III). Plusieurs auteurs ont montré une corrélation entre immuno-stimulation et

activité promotrice de croissance (Sakai, 1999; Villamil *et al.*, 2003). De plus, ces mêmes auteurs ont démontré que l'hormone de croissance fonctionne à la fois en tant qu'immunostimulant et stimule la croissance. Ainsi, des truites injectées avec de l'hormone de croissance montrent une résistance accrue contre *Vibrio anguillarum* (Sakai, 1999). Chez le saumon *Oncorhynchus keta*, l'hormone de croissance entraîne *in vitro* une augmentation de l'activité des phagocytes (Munoz *et al.*, 1998). Chez les mammifères et les poissons, la présence de récepteurs spécifiques à l'hormone de croissance a été trouvée sur des cellules myéloïdes et lymphoïdes (Munoz *et al.*, 1998). En outre, de nombreuses déficiences immunitaires ont été rapportées comme étant corrélées à un apport insuffisant en éléments essentiels (Amar *et al.*, 2004). Cela inclut par exemple les protéines, les acides gras, les poly-saccharides, les vitamines et les métaux lourds essentiels (Amar *et al.*, 2004). Certaines molécules peuvent ainsi stimuler à la fois la croissance, la survie et la résistance des poissons aux maladies (Amar *et al.*, 2004). Au vu de ces données, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses concernant la stimulation de la croissance et des activités impliquées dans la réponse immunitaire innée chez les poissons. Ainsi, ce phénomène peut être lié soit au comblement d'une carence présente dans l'aliment témoin ou bien à la présence de molécules bio-actives dans l'ensilage LBBMA25. Néanmoins, l'aliment témoin utilisé est un aliment complet destiné à l'alimentation des juvéniles de bars. Il est donc supposé contenir tous les éléments nécessaires à la bonne croissance des juvéniles.

Le dosage des activités anti-microbiennes, dirigées contre deux pathogènes marins *Vibrio carchariae* (pathogène d'ormeaux) et *Vibrio anguillarum* (pathogène de poisson), dans le sérum des juvéniles de bars ne montre pas d'activité anti-microbienne contre ces pathogènes quelles que soient les conditions d'alimentation et d'âge.

Plusieurs phénomènes sont observés au cours de l'élevage. Ainsi, quelle que soit l'alimentation, les différentes activités dosées évoluent de la même façon. En effet, l'activité lysozymale augmente pour l'ensemble des poissons et cela dans les mêmes proportions soit +0,13 équivalent lysozyme de blanc œuf. L'activité phénoloxydase augmente entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> pour tous les poissons. Cette activité est stimulée au cours de l'élevage d'un facteur 6,7 et 10, respectivement, pour les juvéniles recevant l'aliment témoin et l'aliment LBBMA25 2%. Enfin, une même tendance entre les animaux nourris avec l'aliment témoin et LBBMA25 est observée pour l'activité anti-protéase qui tend à diminuer entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> jour d'élevage. Cependant, cette diminution n'est que de 1,6 fois pour les animaux recevant l'aliment LBBMA25 2%, contre 7 fois pour les animaux témoins. L'ensemble de ces résultats montre que l'ontogénèse joue un rôle majeur dans l'évolution des activités impliquées dans la réponse

immunitaire. L'utilisation de compléments alimentaires permet de jouer le rôle d'immuno-stimulant et de stimuler l'ontogenèse, mais ne peut en aucun cas s'opposer à l'évolution physiologique et morphologique programmée génétiquement.

En conclusion, l'utilisation de l'enrichissement LBBMA25 permet de stimuler l'ontogenèse d'organes impliqués dans l'hématopoïèse tel que le rein, mais aussi de stimuler la réponse immunitaire innée. Cependant, ce test *in vivo* ne permet pas de discriminer l'origine de ces stimulations. Des tests effectués *in vitro* devraient permettre d'appréhender ce problème et de comprendre comment cet ensilage est capable d'intervenir sur les capacités immunitaires d'animaux marins.



La Figure 92 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience

**LBBMA25 est un immunostimulant chez les juvéniles de bar  
*Dicentrarchus labrax*.**

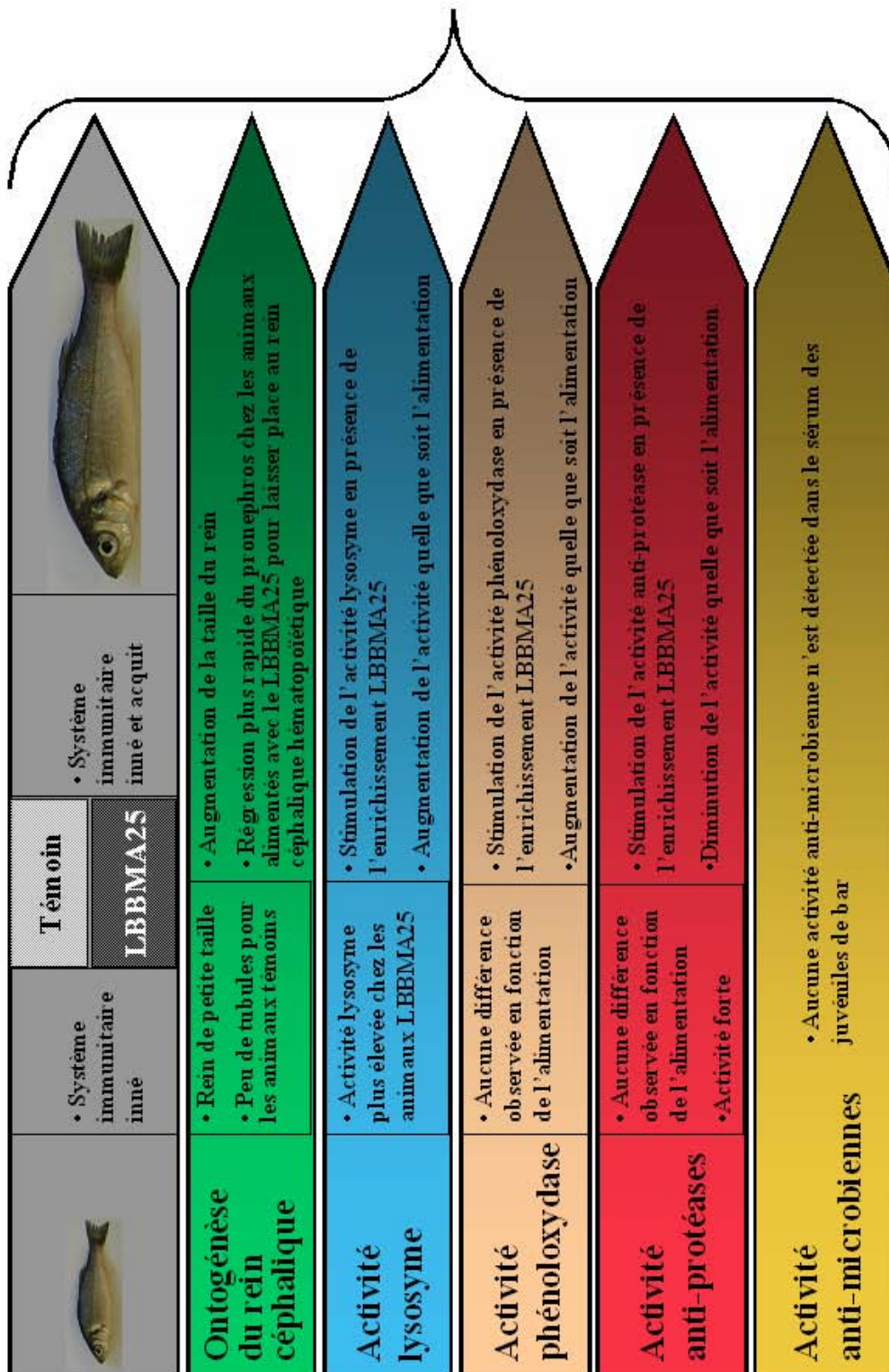


Figure 92 : Synthèse des résultats obtenus concernant l'action d'enrichissement sur le système immunitaire de juvéniles de bars *Dicentrarchus labrax*.

## **C. Recherche d'effets biologiques des ensilages sur des hémocytes d'ormeaux**

### ***Haliotis tuberculata***

#### **1. Introduction**

L'ormeau, *Haliotis tuberculata*, se localise dans les infractuosités des rochers au niveau infralittoral et se répartit dans une zone allant du nord de la Manche jusqu'au pourtour de la méditerranée (Figure 93).



Figure 93: *Haliotis tuberculata* (source Haliotis-tuberculata..fr).

Du fait de sa qualité culinaire, l'ormeau est très recherché, et constitue une ressource marine particulièrement lucrative. Ce succès se traduit par une forte pression de braconnage. De plus, les populations, dont la présence est relativement ponctuelle, présentent une densité faible et sont fragiles. Depuis 1997, des mortalités exceptionnelles d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) ont été déplorées : en 1998 la Bretagne-Nord était touchée, l'été suivant, le sud du département de la Manche (Archipel des îles Chausey) ainsi que certaines îles Anglo-Normandes dont les gisements naturels étaient décimés. Ces fortes mortalités sont dues à un agent infectieux : la bactérie *Vibrio carchariae*. De plus, un procaryote de l'ordre de rickettsiales, à l'origine du syndrome de dépérissement, a provoqué le déclin des populations d'*Haliotis rufescens* et d'*Haliotis cracherodii* de la côte Ouest américaine, tandis qu'une parasitose a décimé l'espèce *Haliotis tuberculata* en Bretagne et en Normandie durant l'été 1999 (Serpentini, 2001). C'est pourquoi des élevages se sont récemment développés, notamment en France. Cependant, nombre de ces élevages se trouvent confrontés eux aussi aux problèmes sanitaires.

Les études fondamentales portant sur les défenses immunitaires de ce mollusque constituent par conséquent une partie essentielle de la recherche appliquée sur l'aquaculture des

mollusques et peuvent trouver une application directe dans le domaine de l'aquaculture. Parmi leurs diverses fonctions, les hémocytes d'invertébrés jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense immunitaire (Johansson and Soderhall, 1988; Serpentine, 2001; Delaporte, 2005). Les hémocytes sont des cellules circulantes impliquées principalement dans les processus de défense immunitaire. Chez les mollusques marins, aucune lignée cellulaire n'a pu être établie et ceci malgré de nombreux essais *in vitro*. Cependant, des cultures primaires issues de différents tissus ont été développées avec succès afin d'étudier des processus spécifiques et notamment en vue d'analyser les problèmes liés à la physiologie et la pathologie des mollusques (Serpentine, 2001). Les hémocytes ont pu être cultivés seuls, dans le but d'étudier des interactions entre les cellules et les pathogènes, ou en co-culture avec des cellules de manteau afin d'analyser les processus de réparation. Les hémocytes d'invertébrés constituent une population hétérogène d'un point de vue morphologique et fonctionnelle, décrits à travers leur degré de différenciation (Serpentine, 2001). Chez les bivalves, deux groupes d'hémocytes sont distingués : les hyalinocytes et les granulocytes (Pipe *et al.*, 1997). Cependant, certains auteurs travaillant chez les gastéropodes, ont émis l'hypothèse que les granulocytes et les hyalinocytes pouvaient représenter un état de différenciation d'un seul et même type cellulaire (Serpentine, 2001). Chez les hémocytes, deux types cellulaires sont observés en culture primaire : les fibroblastes-like et les épithéliales-like (Lebel *et al.*, 1996). Cependant, à ce jour, aucune relation précise entre l'aspect morphologique des cellules et leur aspect fonctionnel, n'a pu être déterminée (Serpentine, 2001). Les cellules dites fibroblastes-like, sont étalées et présentent des prolongements cytoplasmiques qui s'apparentent, de part leur morphologie, à des fibroblastes (Figure 94). Les autres cellules gardent leur aspect arrondi originel et sont dites épithéliales-like.

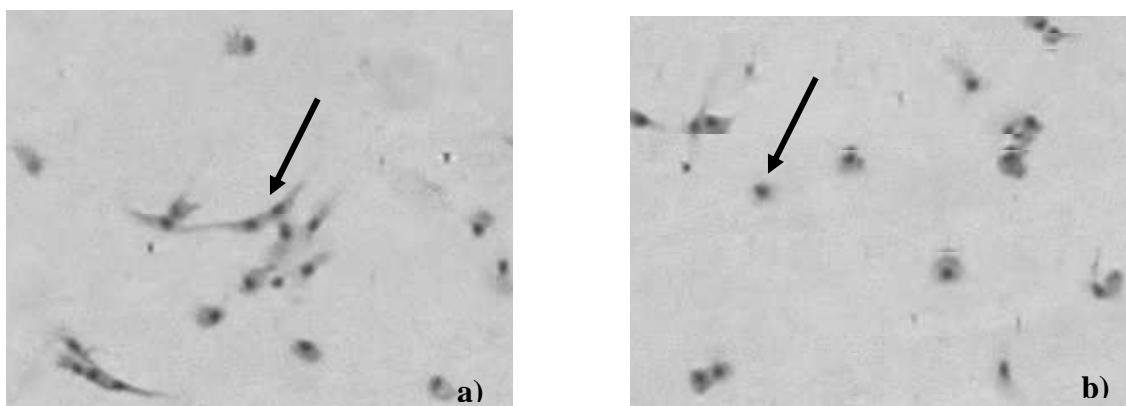


Figure 94: Morphologie des hémocytes en culture primaire. a) Cellules à aspect fibroblaste-like. b) Cellules à aspect épithéliale-like.

En dépit de machinerie limitée de reconnaissance des pathogènes, le système de défense immunitaire innée est impressionnant. Ceci est démontré par le système de défense immun des invertébrés, particulièrement efficace, qui est exclusivement basé sur des phénomènes innés pour combattre une variété de pathogènes dans diverses conditions environnementales (Magnadottir, 2006).

## **2. Matériel et méthodes**

### **a. Matériel biologique**

Cette étude est réalisée sur des ormeaux adultes, *Haliotis tuberculata*, de longueur de coquille de 10 à 12 centimètres. Ces animaux sont pêchés au large de Cherbourg sur la côte Nord de la péninsule du Cotentin (Manche). Ils sont ensuite maintenus au CREC (Centre de Recherche en environnement Côtier) de Luc sur Mer (Calvados) et sont nourris quotidiennement avec un mélange d'algues prélevées sur le littoral (*Laminaria sp.* et *Palmaria palmata.*).

### **b. Les cultures primaires**

Les hémocytes d'ormeau sont prélevés selon la méthode utilisée par Lebel *et al.* (1996) (Figure 95). Après incision médio-latérale du pied de l'ormeau, l'hémolymphe est collectée (15 à 20ml/animal) avec une seringue de 20ml munie d'une aiguille 40\*12. L'hémolymphe est transférée dans un tube stérile et dilué selon un rapport 1 :3 dans une solution d'Alsever qui permet d'éviter l'agglutination des hémocytes.

Les hémocytes sont alors soit mis en culture après comptage des cellules, soit séparés du sérum et lavés à l'aide de 2 centrifugations successives de 10 minutes à 800g, à 15°C en présence d'eau de mer stérile. Suite à ces 2 lavages, les hémocytes sont remis en suspension dans de l'eau de mer stérile. Après comptage sur cellule de Mallassez, les cellules sont déposées à 650 000 hémocytes par ml pour chaque expérience dans des plaques de culture. Trois volumes d'eau de mer synthétique sont ajoutés. Ainsi, après 1h30 d'incubation à 15°C, la totalité des cellules a adhéré au support et le surnageant est éliminé puis remplacé par 1,2ml de milieu de Hank's 199 dont l'osmolarité est ajustée à 1000mOsm avec 250mM de NaCl, 10mM de KCl, 25mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5mM de CaCl<sub>2</sub>, 10mM d'Hépes, pH 7,4 et additionné de 2mM de L-glutamine et 2mM de concanavale A. Le milieu est supplémenté en antibiotiques par 60mg/L de pénicilline et de 100mg/L de streptomycine. Les solutions à tester sont alors ajoutées (10µl). Le milieu est renouvelé toutes les 24 heures. Les hémocytes sont prélevés après 72 heures de culture.

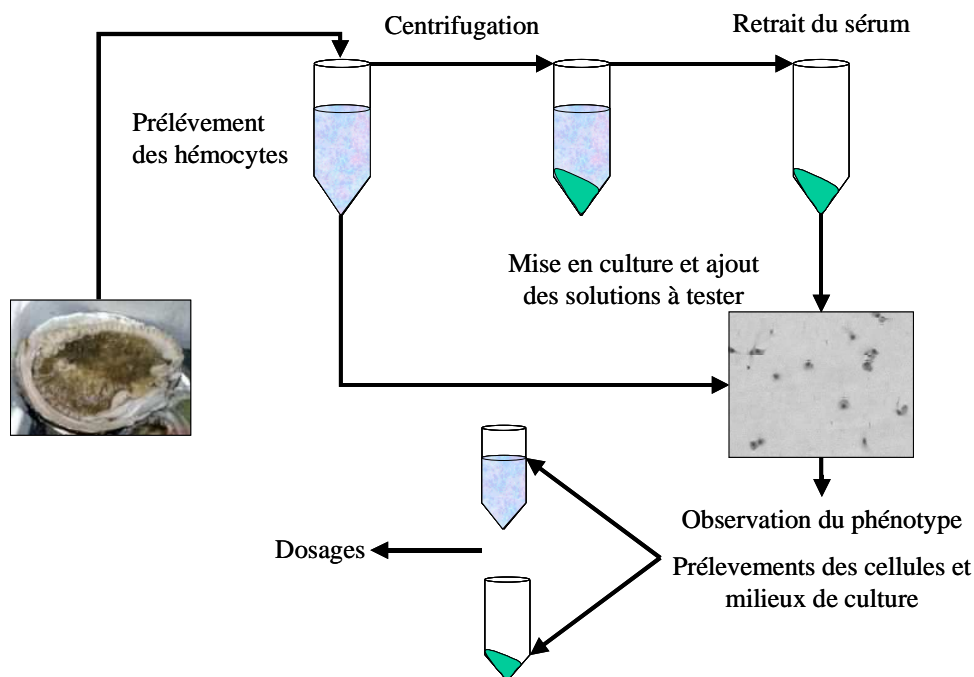


Figure 95: Principe du bio-essai d'hémocytes d'orveau *Haliotis tuberculata* (Giard, 1996).

### c. Préparation des échantillons

Dans un premier temps une gamme de concentration en ensilage est testée de manière à déterminer la concentration optimale à utiliser. Des solutions d'ensilage à plusieurs concentrations sont fabriquées dans du Tris HCl 0,1M, pH 8,3 : 0,01mg/ml, 1mg/ml, 2,5mg/ml, puis pasteurisées. Ces solutions sont testées sur le phénotype des hémocytes après 72 heures d'incubation. La dose de 1mg/ml s'avère être optimale pour l'obtention d'une réponse de la part des hémocytes, puisqu'en dessous l'effet est faible ou absent, et au-delà de cette concentration l'effet est faible.

Des solutions d'ensilage à 1mg/ml, dans du Tris HCl 0,1M, pH 8,3, puis pasteurisées sont ensuite utilisées. De plus, un fractionnement des ensilages est effectué à l'aide d'une colonne de gel filtration G50 Sephadex permettant la séparation des protéines et peptides contenus dans l'ensilage en fonction de leur poids moléculaire. Ces fractions sont ensuite reconcentrées sur speed vack afin d'obtenir des échantillons de concentrations voulues (1mg de protéines/ml).

### d. Histologie

Lorsque les hémocytes sont destinés à être fixés puis colorés, ils sont mis en culture de la même manière que décrit précédemment, mais une lamelle en verre est placée au fond des puits de culture de façon à ce que les hémocytes adhèrent à celle-ci. Après 72 heures de culture, le milieu de culture est retiré, puis 1ml de méthanol est ajouté afin de fixer les cellules pendant 10 minutes. Ensuite, le méthanol est retiré et remplacé par de l'hématoxyline pendant 1 minute, puis

par du vert lumière pendant 1 minute. Suite à la coloration, les lamelles sont décolorées pendant 2 minutes en présence d'eau bi-distillée. Enfin, de l'acétone est ajoutée pendant 10 minutes. Les lamelles sont alors prélevées et montées sur lames.

e. Mesure des surfaces cytoplasmiques et de la proportion des différents types d'hémocytes

La mesure de la surface cytoplasmique des cellules, ainsi que la proportion des différents types d'hémocytes en fonction du traitement reçu sont effectuées sur les lames colorées. Ces mesures sont effectuées à l'aide du logiciel National Instruments Vision Assistant 7.0 et via l'utilisation d'une grille de comptage de 100 carrés (10x10) qui permettent de réaliser une analyse semi-quantitative. En effet, le logiciel permet de mesurer différentes aires cellulaires permettant la comparaison de la surface des hémocytes en fonction du traitement reçu. De plus, le comptage des cellules fibroblastes-like et épithéliales-like permet d'obtenir la proportion d'hémocytes étalés en fonction du traitement reçu.

f. Analyses des activités immunitaires

La suspension cellulaire est prélevée dans les plaques de culture, puis centrifugée à 750g pendant 5 minutes à 15°C. Le surnageant est ensuite séparé du culot cellulaire, puis ils sont congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C dans l'attente des analyses.

- Dosage de l'activité lysozymale

L'activité lysozymale est mesurée dans le surnageant selon la méthode développée précédemment (chapitre 4, IV, B). L'activité lysozymale est exprimée en % de l'activité lysozymale du témoin.

- Dosage de l'activité phénoloxydase

L'activité phénoloxydase est mesurée dans le surnageant selon la méthode développée antérieurement (chapitre 4, IV, B). L'activité phénoloxydase est exprimée en % de l'activité phénoloxydase du témoin.

- Dosage de l'activité anti-protéasique

L'activité anti-protéasique est mesurée dans le surnageant selon la méthode développée préalablement (chapitre 4, IV, B). Cette activité est exprimée en % d'inhibition.

- Dosage de l'activité anti-vibrio

L'activité anti-bactérienne est mesurée selon la méthode développée précédemment (chapitre 4, IV, B). Les différents prélèvements sont effectués après 72 heures de culture des hémocytes. De plus, plusieurs témoins sont utilisés, de l'acide lactique (dilué au 100<sup>ème</sup>) qui constitue le témoin positif et les ensilages bruts en solution de manière à discriminer l'origine

des activités dosées. Ces analyses sont effectuées sur des mises en culture classique ou modifiée. Cette activité est exprimée en surface d'inhibition ( $\text{mm}^2$ ).

- Profil protéique

Le profil protéique des milieux de culture ou des cellules récupérées est analysé par migration sur gel de SDS PAGE. Les milieux de cultures sont récoltés ainsi que les tapis cellulaires (grattés dans tampon Tris-base 50mM). Les extraits sont concentrés sur centricon (MWCO 10kDa), puis dessalés avec du Tris-base 50mM, et concentré 30 fois. Les échantillons sont mélangés à du tampon de charge (1vol/2vol de tampon : 2,9ml d'eau déionisée, 1ml de Tris HCl à 0,5M, pH 6,8, 2ml de Glycérol, 1,6ml de SDS à 10% (w/v), 0,4ml de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1% de Bleu de Bromophénol) et chauffés 30 minutes à 60°C. La migration est effectuée sur un gel de polyacrilamide à 12%. Le gel est placé dans une cuve (*mini protean system*, Biorad, France) contenant du tampon d'électrophorèse (3g de Tampon Trisma base, 15g de Glycine, 0,1% de SDS, ajusté à 1litre avec de l'eau, pH doit être directement de 7,5). Les échantillons sont déposés (45 $\mu$ l) dans les puits du gel. La migration se fait durant 4h avec une intensité constante de 100V. Le gel est ensuite coloré avec un tampon de coloration (1g de Bleu de Commassie R250, 300ml de méthanol, 100ml d'acide acétique, 600ml d'eau distillée) puis décoloré en présence d'un tampon de décoloration à 100°C (600ml d'eau distillée).

g. Analyses statistiques

Les résultats sont donnés avec un écart type (n=6 pour chaque test). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey où les différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont observées (Sokal and Rohlf, 1981).

### 3. Résultats

Différentes méthodes de mises en culture ont été utilisées. D'abord la mise en culture classique, en présence de l'hémolymphe, qui permet un étalement des hémocytes (Figure 96). Ensuite, une méthode modifiée, où l'hémolymphe est retirée, permettant d'obtenir des hémocytes adhérents mais non étalés. L'ajout des ensilages brut provoque dans tous les cas (mise en culture classique ou modifiée) une augmentation du nombre d'hémocytes étalés. De plus, l'ajout des ensilages entraîne une augmentation importante de la taille des prolongements cytoplasmiques et de leur nombre.

Pour effectuer l'étude de l'effet des ensilages sur le phénotype des hémocytes la méthode modifiée qui permet de mieux discriminer les hémocytes épithéliales-like des hémocytes fibroblaste-like est privilégiée. Plusieurs témoins ont été effectués afin de déterminer l'origine des activités dosées. Ainsi, chaque activité testée a été recherchée dans les ensilages, dans le

milieu de culture des hémocytes et dans les hémocytes mis en culture selon les 2 méthodes présentées précédemment. Ces analyses ont montré que les ensilages ne présentent pas d'activité lysozymale, phénoloxydase, anti-protéasique ni anti-microbienne.

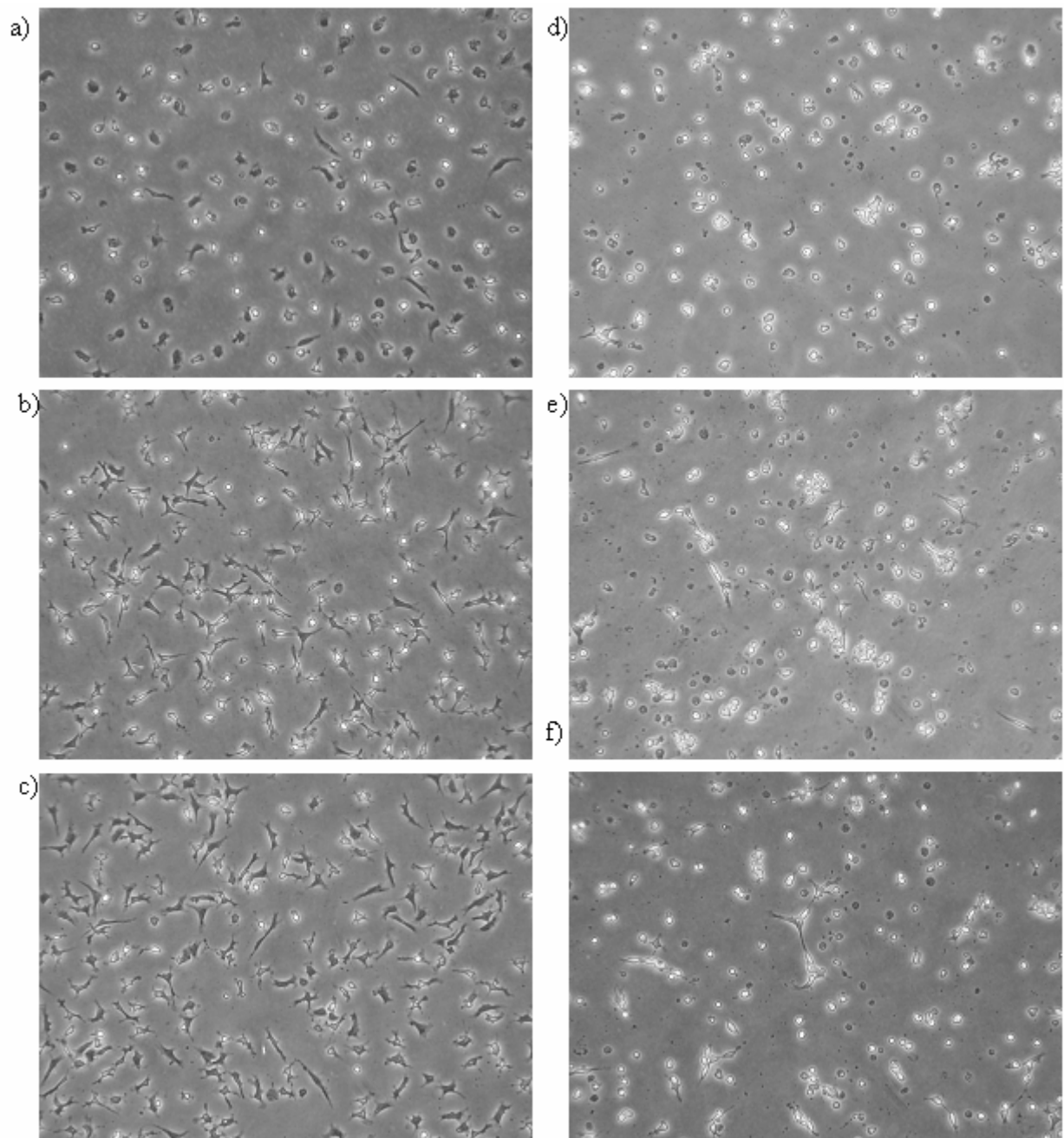


Figure 96 : Photos des hémocytes après 72 heures de culture selon différentes mises en culture (\*40). a) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe. b) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. c) Mise en culture classique en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml.. d) Mise en culture modifiée. e) Mise en culture modifiée en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. f) Mise en culture modifiée en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml.



Au cours de ces investigations, les hémocytes recevant des ensilages dans leur milieu de culture montrent une tendance à l'agrégation contrairement aux hémocytes témoins. Ce phénomène est observé pour tous les ensilages testés et quelle que soit la méthode de mise en culture (Figure 97).

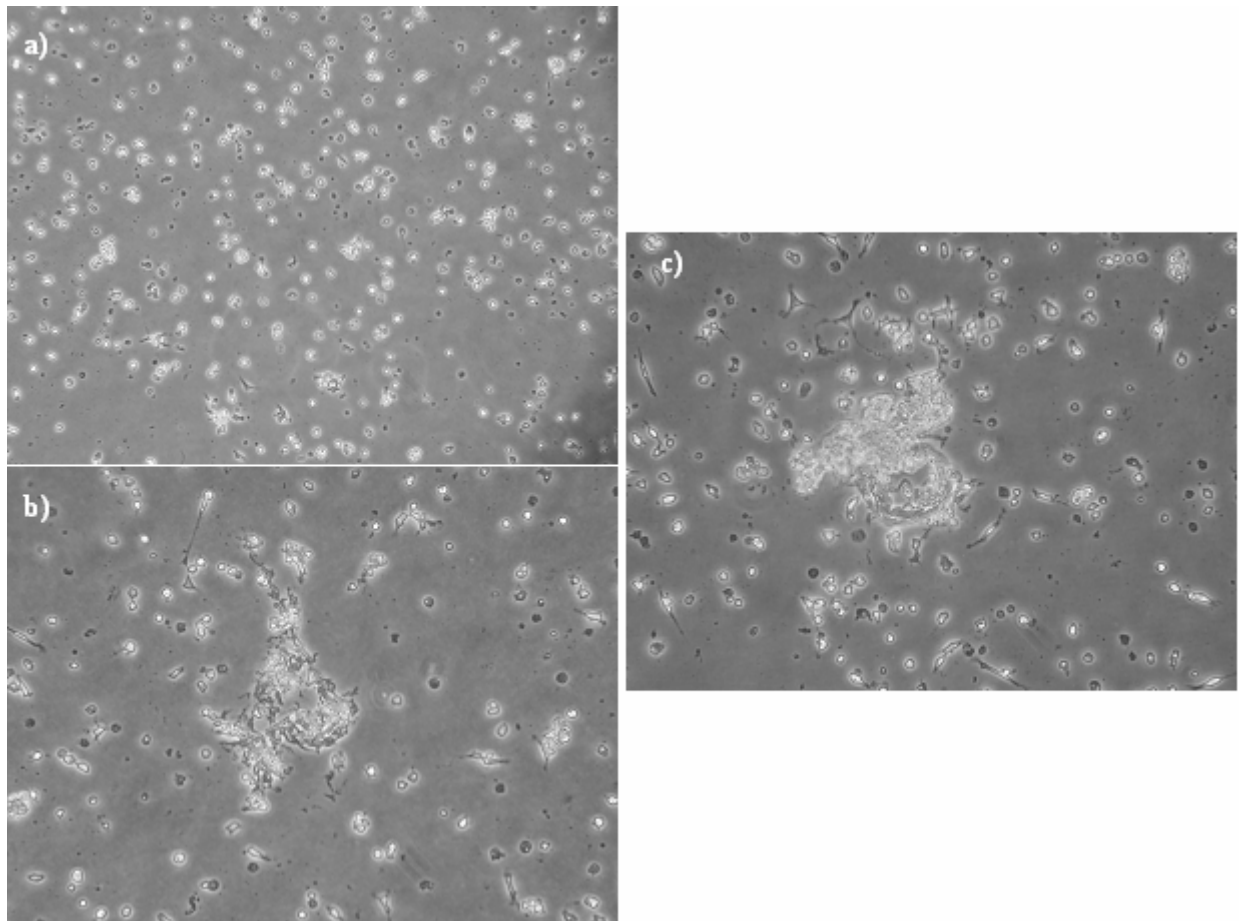


Figure 97: Photos d'agrégats hémocytaires. a) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe. b) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA4 à 1mg/ml. c) Mise en culture modifiée en présence d'hémolymphe et en présence de l'ensilage LBBMA25 à 1mg/ml..

Le milieu de culture recevant l'ensilage LBBMA4 non fractionné (AA) possède une activité lysozymale significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoin recevant une solution de Tris HCl (176%) (Figure 98). De plus, le fractionnement de l'ensilage LBBMA4 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité lysozymale des hémocytes. Les fractions A2, A3-4, A5-6, A9-10, A11-12, A15-16, A17-18 et A19 permettent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité lysozymale des hémocytes par rapport au témoin. Les fractions A3-4, A5-6, A11-12 et A19 permettent la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 300\%$ ).

L'activité lysozymale dosée dans le milieu de culture d'hémocytes mis en culture sans hémolymph en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA25 est montrée Figure 99. Le milieu de culture recevant l'ensilage LBBMA25 non fractionné (AA) possède une activité lysozymale significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (329%). En outre, le fractionnement de l'ensilage LBBMA25 démontre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité lysozymale des hémocytes. Les fractions A2, A3-4, A5-6, A7-8, A9-10, A13-14, A19 et A20 entraînent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité lysozymale des hémocytes par rapport au témoin. Les fractions A7-8 et A13-14 permettent la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 430\%$ ).

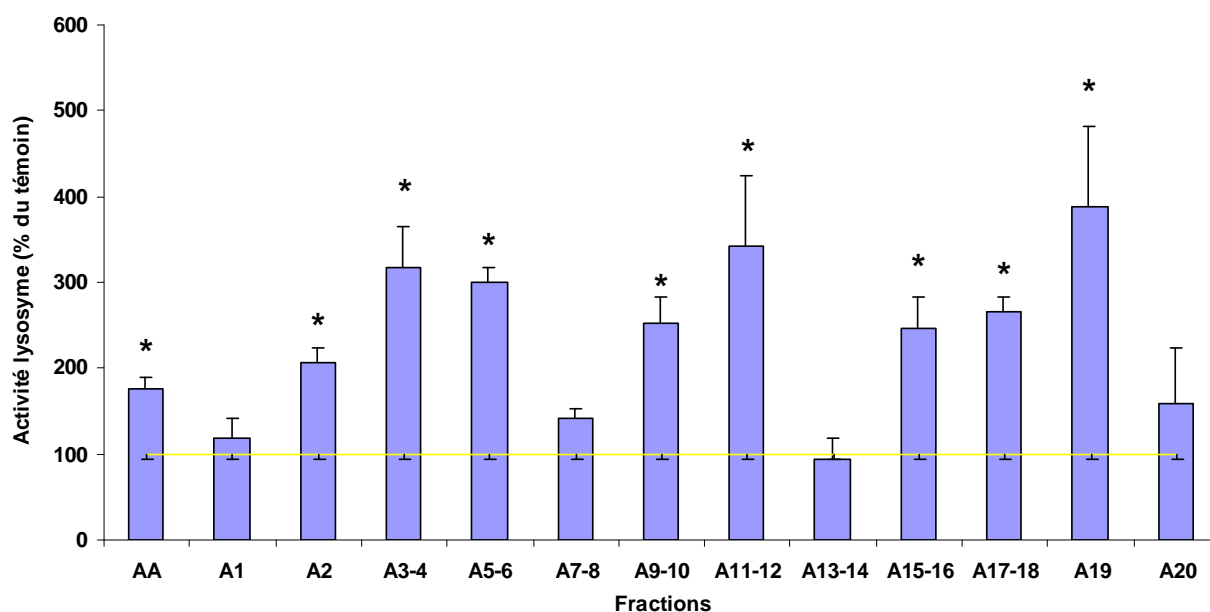


Figure 98: Activité lysozymale en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p < 0,05$ ).

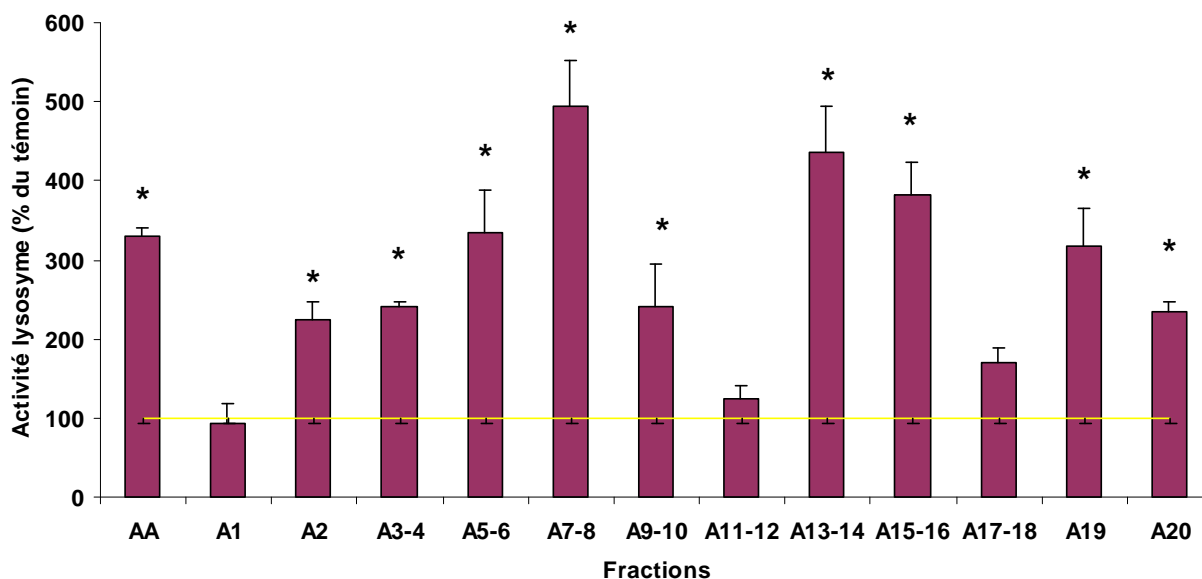


Figure 99: Activité lysozymale en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p < 0,05$ ).

Le milieu de culture recevant l'ensilage LBBMA4 non fractionné (AA) renferme une activité phénoloxydase significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (110%) (Figure 100). De plus, le fractionnement de l'ensilage LBBMA4 permet de voir que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité phénoloxydase des hémocytes. Les fractions A2, A7-8, A9-10, A11-12, A13-14, A15-16 et A19 entraînent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité phénoloxydase des hémocytes par rapport au témoin. La fraction A9-10 permet la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 133\%$ ).

Le milieu de culture qui a reçu l'ensilage LBBMA25 non fractionné (AA) possède une activité phénoloxydase significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (120%) (Figure 101). En outre, le fractionnement de l'ensilage LBBMA25 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité phénoloxydase des hémocytes. Les fractions A3-4, A5-6, A7-8, A9-10, A13-14 et A20 permettent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité phénoloxydase des hémocytes par rapport au témoin. Les fractions A5-6 et A7-8 entraînent la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 137\%$ ).

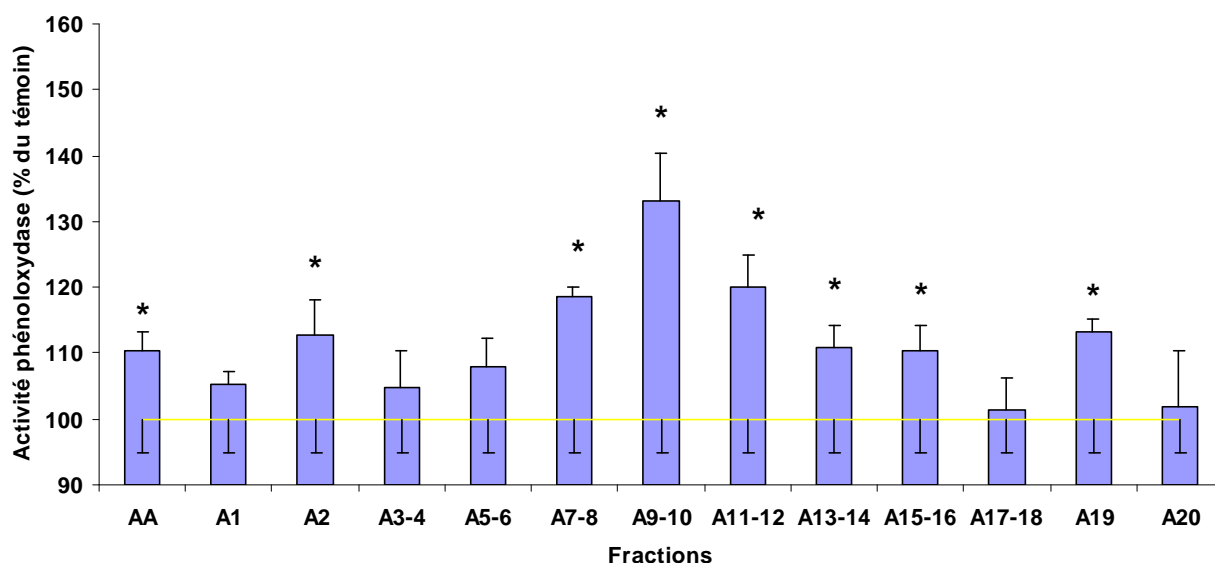


Figure 100: Activité phénoloxydase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

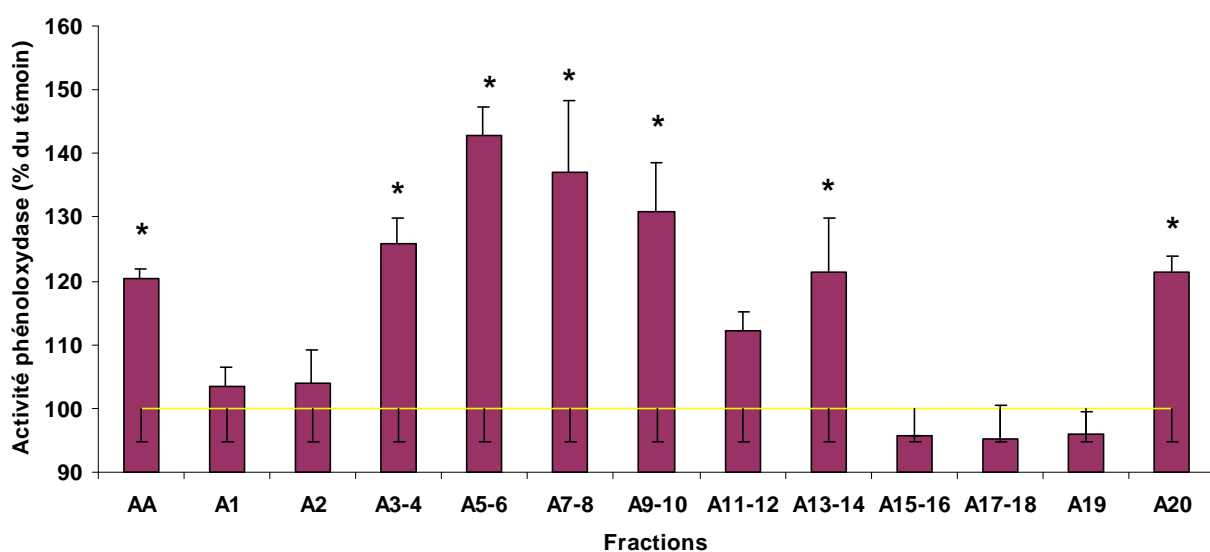


Figure 101: Activité phénoloxydase en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

L'activité anti-protéasique présente dans le milieu de culture d'hémocytes mis en culture sans hémolymph en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA4 est observable sur la Figure 102. Cette activité anti-protéasique est de 19% pour le milieu de culture issus des hémocytes témoins. L'ensilage LBBMA4 non fractionné (AA) montre une activité anti-protéasique significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (35%). De plus, le fractionnement de

l'ensilage LBBMA4 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité anti-protéasique des hémocytes. Les fractions A2, A3-4, A11-12, A13-14, A17-18 et A19 entraîne une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité anti-protéasique des hémocytes par rapport au témoin. Les fractions A2, A17-18 et A19 permettent la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 40\%$ ).

La Figure 103 montre l'activité anti-protéasique dosée dans le milieu de culture d'hémocytes mis en culture sans hémolymphe en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA25. Cette activité anti-protéasique est de 19% pour le milieu de culture issus des hémocytes témoin. L'ensilage LBBMA25 non fractionné (AA) montre une activité anti-protéasique significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (35%). En outre, le fractionnement de l'ensilage LBBMA25 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de l'activité anti-protéasique des hémocytes. Les fractions A3-4, A5-6, A7-8, A11-12, A13-14, A15-16, A19 et A20 entraînent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité anti-protéasique des hémocytes par rapport au témoin. Les fractions A5-6, A7-8 et A15-16 permettent la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de cette activité ( $> 46\%$ ).

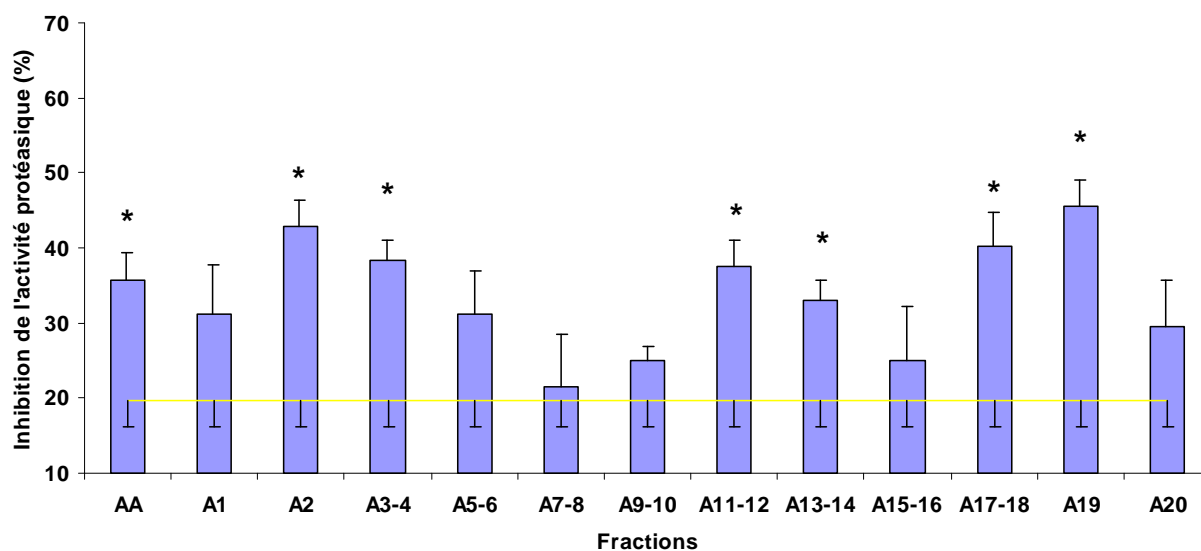


Figure 102: Activité anti-protéasique en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % d'inhibition). Témoin ■ Ensilage ■. \*: significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

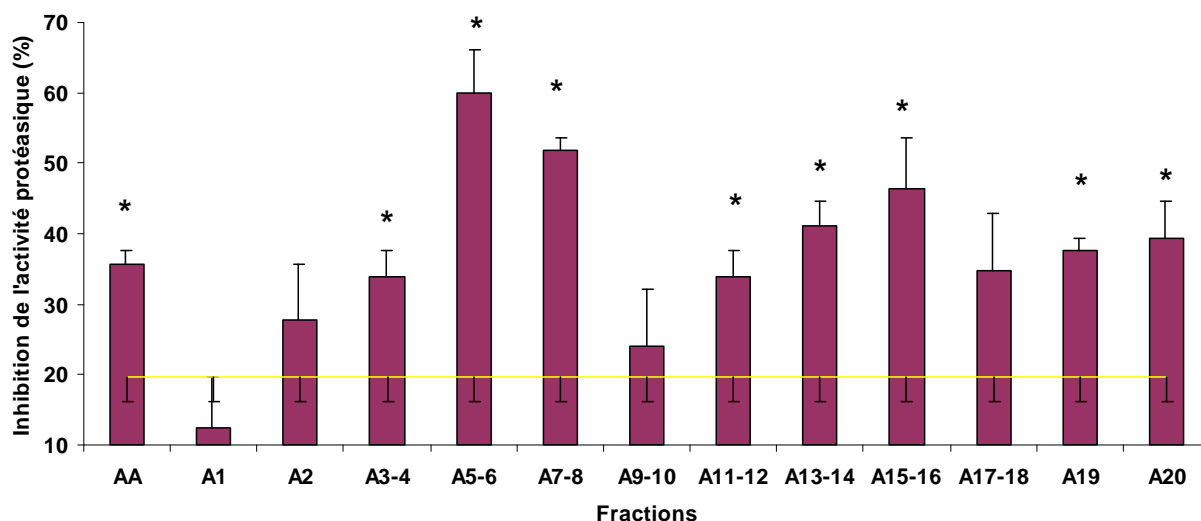


Figure 103: Activité anti-protéasique en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % d'inhibition). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

Nous avons cherché à savoir si les différences observées au niveau des différents paramètres immunitaires dosés sont liées au phénotype des cellules (fibroblastes-like) ou bien à d'autres facteurs. Ces mêmes analyses ont donc été effectuées sur des cellules mise en culture selon une méthode classique (Tableau 38). Le phénotype fibroblaste-like n'est pas à l'origine des différences observées en terme d'activités immunitaires. Ainsi, l'ajout des ensilages entraîne une stimulation des activités lysozymale, phénoloxydase ainsi que anti-protéase, quelle que soit la méthode de mise en culture.

Tableau 38 : Impact de la méthode de mise en culture des hémocytes sur différentes activités impliquées dans l'immunité. \* : significativement différent du témoin.

Solutions testées :	Lysozyme (% témoin)	Phénoloxydase (% témoin)	Anti-protéase (% inhibition)
Témoin mise en culture classique :	100 ± 1,1	100 ± 1,49	14 ± 0,6
Ensilage LBBMA4 mise en culture classique :	150 ± 2*	111 ± 2,48	43 ± 1*
Ensilage LBBMA25 mise en culture classique :	183 ± 4*	113 ± 1,49*	56 ± 1*
Témoin mise en culture modifiée :	100 ± 1	100 ± 0,48	20 ± 0,6
Ensilage LBBMA4 mise en culture modifiée :	176 ± 3*	112 ± 0,48*	41 ± 2*
LBBMA25 mise en culture modifiée :	329 ± 4,4*	122 ± 3,9*	45 ± 5*

La surface des cellules mise en culture sans hémolymphe en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA4 est représentée Figure 104. L'ensilage LBBMA4 non fractionné (AA) montre une surface cellulaire significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (122%). De plus, le fractionnement de l'ensilage LBBMA4 permet de voir que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de la surface cellulaire des hémocytes. Les fractions A2, A11-12, A13-14 et A19 montrent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la surface cellulaire des hémocytes par rapport au témoin. La fraction A13-14 entraîne la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de la surface cellulaire ( $> 150\%$ ).

La Figure 105 représente la surface des cellules mise en culture sans hémolymphe en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA25. L'ensilage LBBMA25 non fractionné (AA) montre une surface cellulaire significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (129%). En outre, le fractionnement de l'ensilage LBBMA25 démontre que seules certaines fractions sont impliquées dans la stimulation de la surface cellulaire des hémocytes. Les fractions A2, A3-4, A5-6, A13-14 et A20 permettent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la surface cellulaire des hémocytes par rapport au témoin. La fraction A20 permet la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de la surface cellulaire ( $> 139\%$ ).

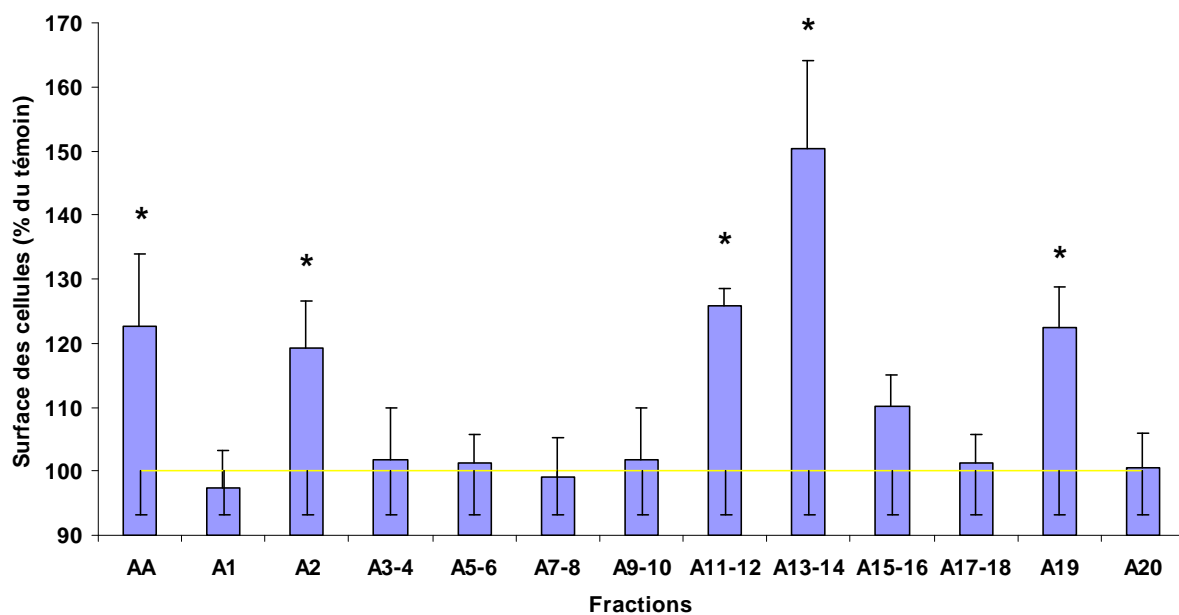


Figure 104: Surface des cellules en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

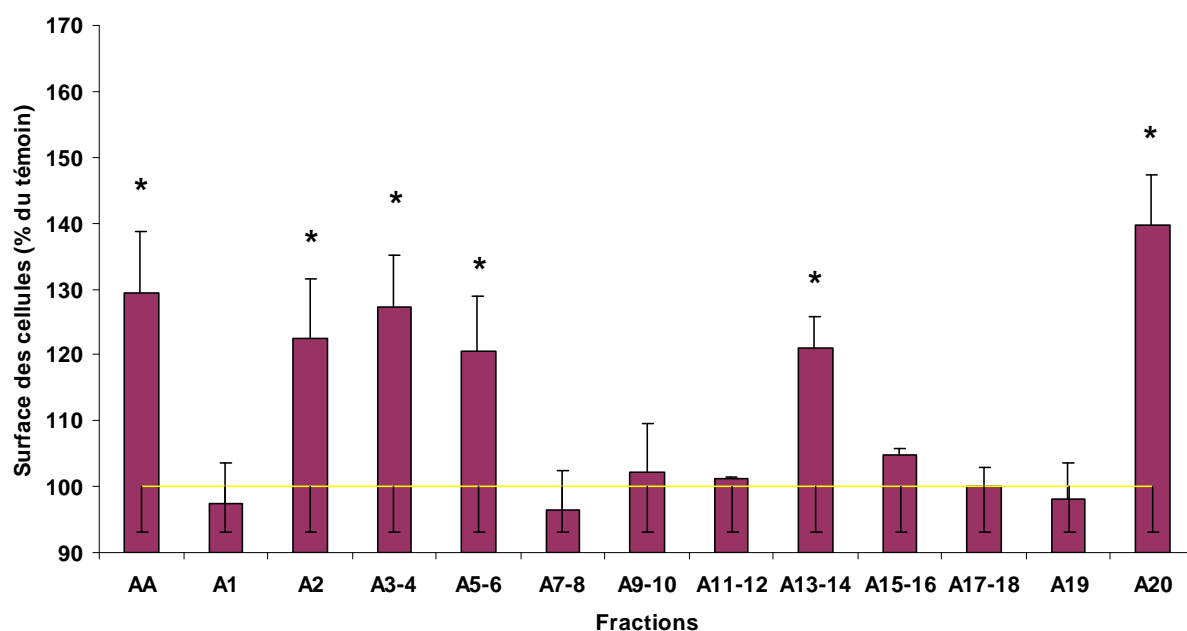


Figure 105: Surface des cellules en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en % du témoin). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p < 0,05$ ).

Les hémocytes témoins comptent 3,69% de cellules fibroblastes-like. L'ensilage LBBMA4 non fractionné (AA) montre une proportion de cellules fibroblastes-like significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (45%) (Figure 106). De plus, le fractionnement de l'ensilage LBBMA4 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans l'augmentation de la proportion de cellules fibroblastes-like des hémocytes. Les fractions A2, A11-12, A13-14 et A19 permettent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la proportion de cellules fibroblastes-like parmi hémocytes par rapport au témoin. La fraction A13-14 permet la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de la proportion de cellules fibroblastes-like ( $> 150\%$ ).

La Figure 107 représente la proportion de cellules fibroblastes-like mise en culture sans hémolymphe en présence de différentes fractions de l'ensilage LBBMA25. Les hémocytes témoins compte 3,69% de cellules fibroblastes-like. L'ensilage LBBMA25 non fractionné (AA) montre une proportion de cellules fibroblastes-like significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à celle dosée dans le milieu de culture des hémocytes témoins recevant une solution de Tris HCl (52%). En outre, le fractionnement de l'ensilage LBBMA25 montre que seules certaines fractions sont impliquées dans l'augmentation de la proportion de cellules fibroblastes-like parmi les hémocytes. Les fractions A2, A3-4, A5-6, A13-14 et A20 permettent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la proportion de cellules fibroblastes-like des hémocytes par rapport au



témoin. La fraction A20 permet la plus forte stimulation ( $p < 0,05$ ) de la proportion de cellules fibroblastes-like ( $> 54\%$ ).

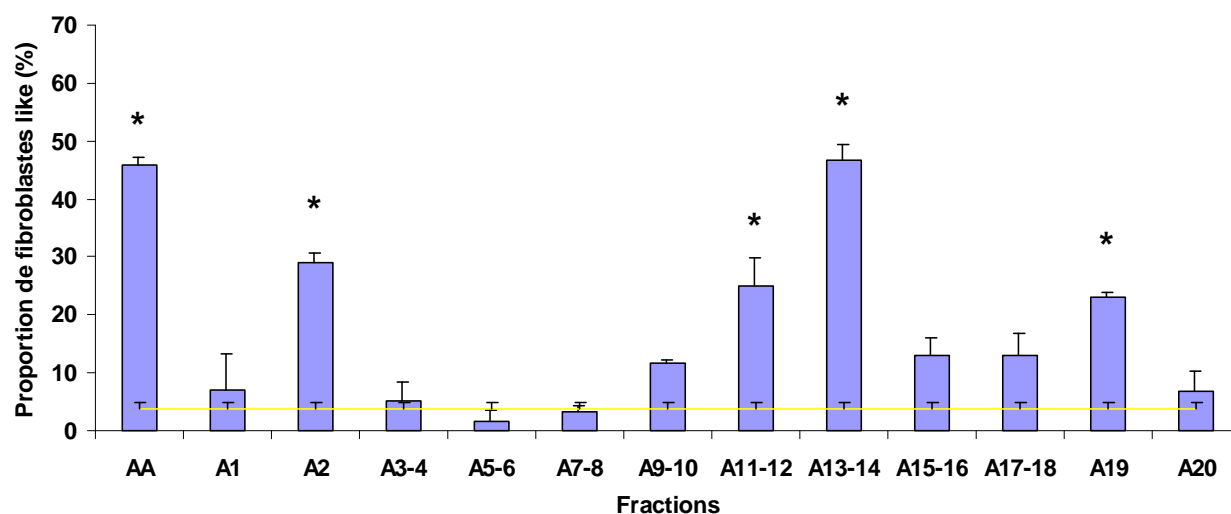


Figure 106: Proportion des cellules fibroblastes-like en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA4 (en %). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

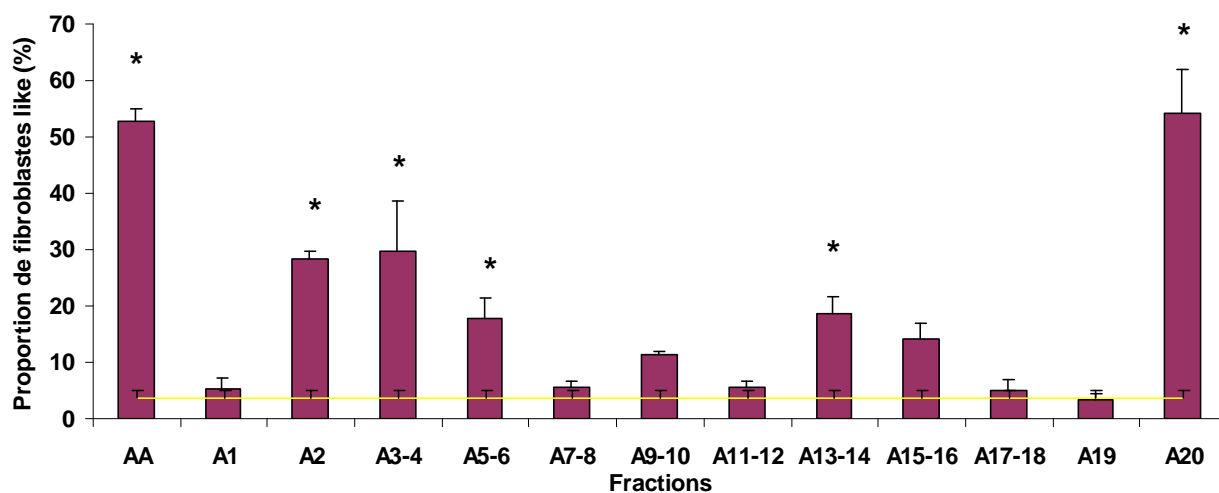


Figure 107: Proportion des cellules fibroblastes-like en fonction de la fraction de l'ensilage LBBMA25 (en %). Témoin ■ Ensilage ■. \* : significativement différents du témoin ( $p > 0,05$ ).

Les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 ne possèdent pas d'activité anti-bactérienne lorsqu'ils sont utilisés directement sur une bactérie pathogène *Vibrio carchariae* (Tableau 39). En revanche, l'acide lactique entraîne l'inhibition de la croissance de ce pathogène.

Tableau 39 : Surface d'inhibition du pathogène *Vibrio carchariae* en présence des ensilages ou de l'acide lactique après 48 heures de mise en culture des bactéries.

Solutions testées	Ensilage LBBMA4	Ensilage LBBMA25	Témoin positif : acide lactique
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> )	0	0	156 ± 11,4

Les résultats montrent que quelle que soit la méthode de mise en culture, le tapis cellulaire d'hémocytes n'a aucun effet sur la croissance du pathogène *Vibrio carchariae* (Tableau 40). En revanche, le milieu de culture de ces hémocytes montre une forte activité anti-bactérienne, pour toutes les méthodes de mise en culture, en présence des ensilages.

Tableau 40 : surface d'inhibition du pathogène *Vibrio carchariae* en présence du milieu de culture ou du tapis cellulaire d'hémocytes, ayant reçu ou non des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 au cours de leur culture, après 48 heures de mise en culture des bactéries.

Solutions testées	Milieu de culture LBBMA4	Milieu de culture LBBMA25	Tapis cellulaire LBBMA4	Tapis cellulaire LBBMA25	Témoin négatif sans ensilage
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) selon une mise en culture classique	136 ± 6	172 ± 3	0	0	0
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) selon une mise en culture modifiée	160 ± 10	185 ± 4	0	0	0

Le fractionnement des ensilages et leur ajout dans le milieu de culture des hémocytes entraîne la présence d'activité anti-microbienne pour certaines fractions, au niveau du milieu de culture (Tableau 41). Ainsi, en ce qui concerne l'ensilage LBBMA4, les fractions F2, F9-10, F11-12, F13-14, F15-16, F17-18, F19 et F20 entraînent une inhibition de croissance ou une destruction du pathogène marin *Vibrio carchariae*. Pour l'ensilage LBBMA25, ce sont les fractions F2, F3-4, F5-6, F9-10, F13-14, F15-16 et F20 qui montrent un effet anti-microbien. Le maximum d'activité est observé pour la fraction F15-16 pour l'ensilage LBBMA4 et pour la fraction F3-4 en ce qui concerne l'ensilage LBBMA25.

Tableau 41: surface d'inhibition du pathogène *Vibrio carchariae* en présence du milieu de culture ou du tapis cellulaire d'hémocytes, ayant reçu différentes fractions des ensilages LBBMA4 ou LBBMA25 au cours de leur culture, après 48 heures de mise en culture des bactéries.

Solutions testées	F1	F2	F3-4	F5-6	F7-8	F9-10	F11-12	F13-14	F15-16	F17-18	F19	F20
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) Milieu de culture LBBMA4	0	58 ± 8	0	0	0	115 ± 10	58 ± 8	28 ± 6	136 ± 11	75 ± 9	75 ± 9	115 ± 10
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) Milieu de culture LBBMA25	0	58 ± 8	160 ± 12	75 ± 9	0	115 ± 10	0	58 ± 8	115 ± 10	0	0	160 ± 12
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) Tapis cellulaire LBBMA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Surface d'inhibition (mm <sup>2</sup> ) Tamis cellulaire LBBMA25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire sur gel de polyacrilamide en SDS-PAGE permet de voir si les différents traitements utilisés entraînent une différence de répartition en poids moléculaire et donc des synthèses de protéines différentes. La Figure 108 montre que le tapis cellulaire contient toujours le même profil protéique, quels que soient le mode de mise en culture ou encore les substances ajoutées au milieu de culture. Il n'y a donc pas de différences notables observées à l'aide de la technique de SDS-PAGE au niveau du tapis cellulaire dans les conditions testées.

Le milieu de culture contient toujours le même profil protéique quel que soit le mode de mise en culture (Figure 108). Cependant, la bande située entre 25 et 30kDa est plus intense lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture. De plus, le profil est différent en bas du gel, pour des molécules de poids moléculaire d'environ 15kDa. En effet, la plupart des bandes disparaissent et il n'y a plus qu'une à deux bandes lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture. Ce phénomène est observé pour les deux types de mises en culture.

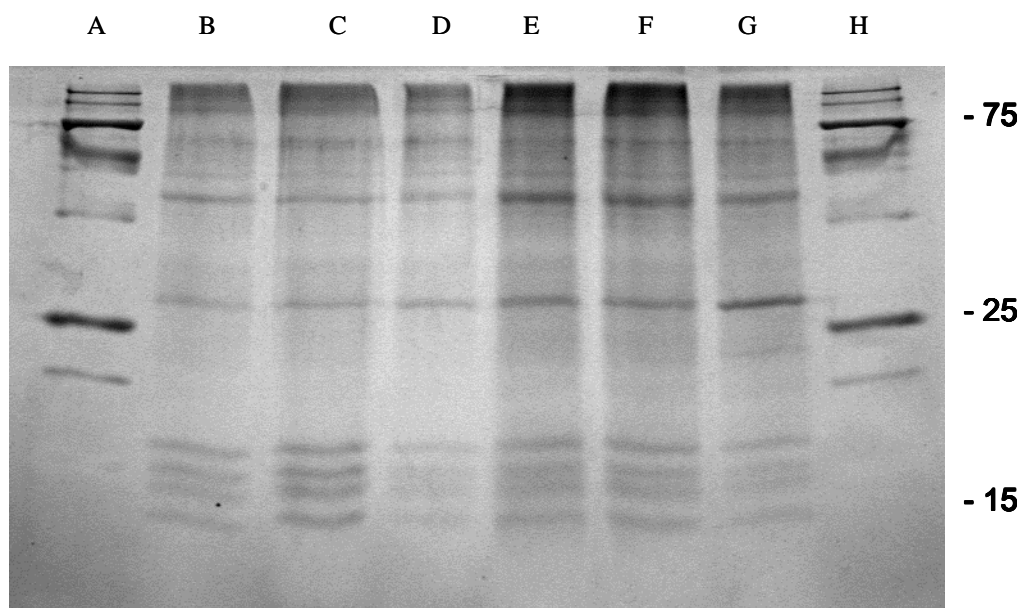


Figure 108 : Gel SDS-PAGE. Les échantillons correspondant à chaque ligne sont : A) Poids moléculaires standards (de 250 to 10 kDa). B) Tapis cellulaire de cellules témoins mises en culture modifiée. C) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture modifiée. D) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture modifiée. E) Tapis cellulaire de cellules témoin mises en culture classique. F) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture classique. G) Tapis cellulaire de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture classique. H) Poids moléculaires standards (range 250 to 10 kDa).

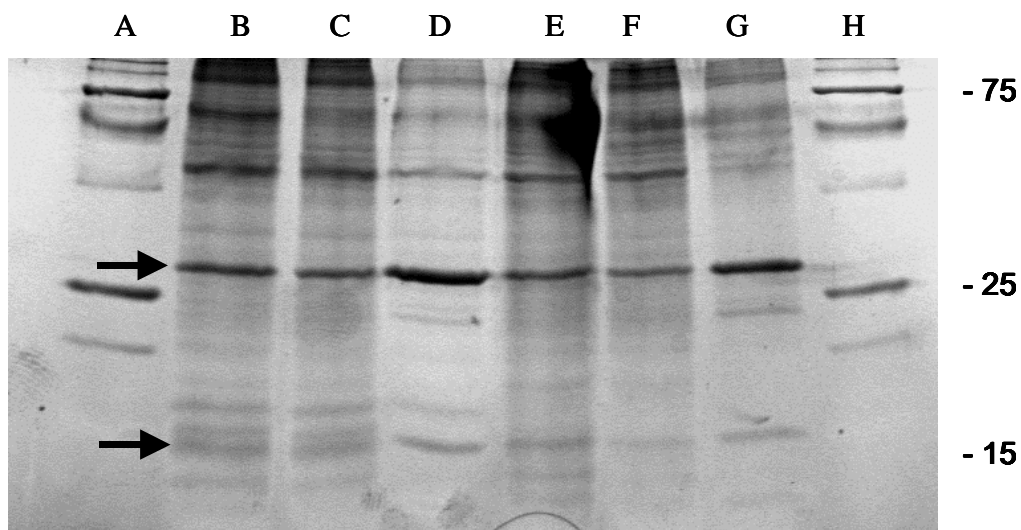


Figure 109 : Gel SDS-PAGE. Les échantillons correspondant à chaque ligne sont : A) Poids moléculaires standards (de 250 to 10 kDa). B) Milieu de culture de cellules témoins mises en culture modifiée. C) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture modifiée. D) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture modifiée. E) Milieu de culture de cellules témoin mises en culture classique. F) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA4, mises en culture classique. G) Milieu de culture de cellules recevant de l'ensilage LBBMA25, mises en culture classique. H) Poids moléculaires standards (range 250 to 10 kDa).

#### **4. Discussion**

Chez les mollusques, les hémocytes constituent la principale première ligne de défense contre les invasions (Bachère *et al.*, 1995). Tandis que le rôle des anticorps, opsonines, lymphocytes et macrophages est bien établi dans la réponse immunitaire chez les vertébrés, chez les invertébrés, seules quelques protéines et cellules sont proposées en tant que composantes du système de défense immunitaire (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Cependant, les invertébrés possèdent des mécanismes pour une réponse rapide et efficace capable de reconnaître et de détruire le matériel du non-soi. Cette réponse est réalisée selon des mécanismes caractéristiques tels que la coagulation, la phagocytose, l'encapsulation, la formation de nodules et la mélanisation (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003).

Au cours de cette investigation, plusieurs paramètres impliqués dans la réponse immunitaire ont été étudiés. Les activités lysozymale, phénoloxydase, anti-protéasique et anti-microbienne ont été recherchées au niveau des hémocytes d'ormeaux, mais aussi au niveau du milieu de culture.

La mise en culture classique, en présence de l'hémolymphe permet un étalement des hémocytes. En revanche, la méthode modifiée, où l'hémolymphe est retirée, permet l'obtention d'hémocytes adhérents mais non étalés. Dans tous les cas (mise en culture classique ou modifiée), l'ajout des ensilages bruts dans le milieu de culture entraîne une augmentation du nombre d'hémocytes étalés. De plus, l'ajout des ensilages entraîne une augmentation importante de la taille et du nombre de prolongements cytoplasmiques. Pour effectuer l'étude de l'effet des ensilages sur le phénotype des hémocytes, nous avons choisi la méthode modifiée qui permet de mieux discriminer les hémocytes épithéliales-like des fibroblastes-like. Plusieurs témoins ont été réalisés afin de déterminer l'origine des activités dosées. Ainsi, chaque activité testée a été recherchée dans les ensilages, dans le milieu de culture des hémocytes et dans les hémocytes mis en culture selon les 2 méthodes présentées précédemment. Ces analyses ont montré que les ensilages ne présentent pas d'activités lysozymale, phénoloxydase, anti-protéasique ni anti-microbienne. Les variations d'activités observées au niveau des cultures primaires d'hémocytes sont dues à des synthèses par les hémocytes de molécules impliquées dans les défenses immunitaires. Les ensilages stimulent donc les défenses immunitaires. En outre, les ensilages stimulent la synthèse et/ou la sécrétion des molécules anti-microbiennes dans le milieu de culture des hémocytes. Les effecteurs humoraux sont des facteurs solubles dont certains sont produits par les hémocytes. Parmi eux, les enzymes lysozymales, originaires des hémocytes, interviennent dans la défense anti-microbienne des invertébrés et agissent de manière non-spécifique contre les

envahisseurs (Bachère *et al.*, 1995; Malham *et al.*, 1998). Les études chez les mollusques, ont montré que de nombreuses enzymes lysozymales sont présentes dans les hémocytes et l'hémolymphe (Malham *et al.*, 1998). De telles fonctions de défense ont déjà été démontrées expérimentalement avec le lysozyme inductible qui possède une activité bactériolytique (Cheng *et al.*, 1975). Le lysozyme, l'une des plus communes de ces enzymes, a été identifiée et caractérisée chez de nombreux invertébrés. Le système d'activation de la prophénoloxydase est considéré, chez les invertébrés, comme un composant impliqué à la fois dans la reconnaissance du non-soi et sa destruction. La prophénoloxydase est une enzyme clé dans la réponse immunitaire des cellules incluant l'encapsulation mélanique et la phagocytose (Ling and Yu, 2005). L'encapsulation mélanique cellulaire est un mécanisme complexe qui requiert la participation et la coordination des hémocytes et de protéines plasmatiques incluant le système d'activation de la phénoloxydase. Chez le homard *Panulirus interruptus*, un lysat d'hémocyte est capable d'activer la prophénoloxydase plasmatique indiquant la localisation de l'enzyme activatrice du prophénoloxydase dans les hémocytes (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Cette enzyme est une sérine protéase qui transforme la forme prophénoloxydase inactive en la forme active : la phénoloxydase. L'activation de la prophénoloxydase se fait par une libération de la prophénoloxydase et de l'enzyme d'activation à partir de granules. Chez la crevette et l'écrevisse, la prophénoloxydase et l'enzyme d'activation sont localisées dans des vésicules à zymogènes situées dans les hémocytes. Un stimulus microbien permet la sécrétion du contenu des granules (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). En dehors de la cellule, l'enzyme d'activation est activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  plasmatique et va alors transformer le prophénoloxydase en phénoloxydase. Les pathogènes possèdent des activités protéasiques extracellulaires importantes. Il existe une corrélation entre la production de protéases par les pathogènes et leur pathogénicité (Stewart-Tull *et al.*, 2004). En effet, ces enzymes lytiques vont dégrader les cellules et les liaisons intercellulaires. L'activité anti-protéasique est importante dans les défenses immunitaires. Ainsi, elle aide les défenses de nombreux organismes en régulant et inhibant les activités potentiellement destructrices des protéases provenant des pathogènes (Malham *et al.*, 1998). En général, ces inhibiteurs de protéases agissent par leur liaison au site actif des protéases et préviennent l'hydrolyse des protéines (Malham *et al.*, 1998). L'importance de la réponse des hémocytes en terme d'activité anti-protéasique est donc particulièrement importante dans la réponse immunitaire. Enfin, il existe des molécules, synthétisées par l'hôte, capables d'inhiber la croissance ou encore de tuer les pathogènes. Ces molécules sont dites anti-microbiennes et ont été détectées chez de nombreux invertébrés marins. Cependant, leur nature est peu connue et variable (glycosides stéroïdes, stérols polyhydroxylés, lysozymes, substances complément-

like...), de plus, peu de composés ont été caractérisés (Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2002). Une lectine anti-microbienne a tout de même pu être isolée chez le crabe *Scylla serrata*, et des peptides anti-microbiens ont été isolés et caractérisés chez le crabe *Carcinus maenas* et la crevette *Penaeus vannamei* (Haug *et al.*, 2002). Ces activités anti-microbiennes peuvent être détectées dans de nombreux tissus mais sont souvent observées de façon majoritaire au niveau des hémocytes et de l'hémolymphe chez les invertébrés (Haug *et al.*, 2002). Les résultats obtenus montrent que le phénotype fibroblaste-like n'est pas à l'origine des différences observées en terme d'activités immunitaires. Ainsi, l'ajout des ensilages entraîne une stimulation des activités lysozymale, phénoloxydase ainsi que anti-protéase, et l'existence des propriétés anti-microbiennes quelle que soit la méthode de mise en culture.

Au cours de ces investigations les hémocytes recevant des ensilages dans leur milieu de culture montrent une tendance à l'agrégation contrairement aux hémocytes témoins. Ce phénomène est observé pour tous les ensilages testés et pour l'ensemble des méthodes de mise en culture. La phénoloxydase active a tendance à adhérer à la surface des hémocytes et entraîne la formation d'agrégat (Ling and Yu, 2005). Cette liaison de la phénoloxydase à la surface des cellules requiert des interactions. Celles ci sont soit directes entre la phénoloxydase et la surface des hémocytes, soit indirecte en faisant intervenir des protéines de l'hémolymphe comme protéines accessoires pour former un complexe protéique (Ling and Yu, 2005). Ce sont des protéines de la superfamille des lectines qui correspondent à ces protéines accessoires (Ling and Yu, 2005). Chez les insectes, la reconnaissance du non-soi, est accompagnée par une rapide transformation des hémocytes circulant non adhérents en hémocytes adhérents (Nardi *et al.*, 2006). Les hémocytes vont alors former des agrégats regroupant plusieurs hémocytes.

Cette étude montre que certaines fractions des ensilages sont capables de stimuler à la fois l'activité lysozymale, phénoloxydase, anti-protéase, le nombre de cellules fibroblastes-like, la surface cellulaire et l'activité anti-microbienne en comparaison avec les hémocytes témoins. Donc, l'ajout des ensilages entraîne à la fois une augmentation du nombre de cellules fibroblastes-like, mais aussi d'activités impliquées dans l'immunité. Dans tous les cas (mise en culture classique ou modifiée), l'ajout des ensilages dans le milieu de culture entraîne une augmentation du nombre d'hémocytes étalés ainsi que de la taille et du nombre de prolongements cytoplasmiques. En règle générale, les fractions actives dans l'ensilage LBBMA25 sont de poids moléculaires inférieures aux fractions actives de l'ensilage LBBMA4.

Enfin, les activités sont généralement plus fortes en présence des fractions LBBMA25 qu'en présence des fractions de l'ensilage LBBMA4.

L'étude du profil protéique du tapis cellulaire et du milieu de culture en SDS-PAGE montre que pour tous les modes de mise en culture et toutes les substances ajoutées, le profil protéique est le même en ce qui concerne le tapis cellulaire. Il n'y a donc pas de différences notables observées à l'aide de la technique de SDS-PAGE au niveau du tapis cellulaire dans les conditions testées. De plus, le milieu de culture contient toujours le même profil protéique quel que soit le mode de mise en culture. Cependant, la bande située entre 25 et 30kDa est plus intense lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture. De plus, le profil est différent pour des molécules de poids moléculaire d'environ 15kDa. En effet, la plupart des bandes disparaissent et il n'y a plus qu'une bande lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture. Ce phénomène est observé pour les deux types de mises en culture. Ce résultat concorde avec les observations faites concernant l'effet de la mise en culture sur différentes activités immunitaires. L'ajout de l'ensilage LBBMA25 entraîne donc la présence de protéines différentes ou en quantité différente dans le milieu de culture mais rien de notable n'est observé au niveau du tapis cellulaire. Les molécules présentes de façon différentielle sont donc des protéines extracellulaires sécrétées.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant ces protéines synthétisées et sécrétées de façon différentielle au niveau des hémocytes en présence des ensilages.

D'abord, nous pouvons émettre l'hypothèse de la stimulation de la synthèse de lectines-like par les hémocytes en présence des ensilages. Ainsi, les lectines de type C jouent un rôle crucial dans la première ligne de défense contre le non-soi (Endo *et al.*, 2006). Les lectines, qui sont des protéines de liaisons aux glucides, sont impliquées dans une multitude de processus, incluant la réponse immunitaire innée, critique pour la détection des micro-organismes infectieux (Kang *et al.*, 2006). Ces lectines sont appelées immulectines et sont des récepteurs possédant des domaines glucidiques impliqués dans la reconnaissance et la liaison au non soi (Green *et al.*, 2006; Ling and Yu, 2006). Les lectines jouent un rôle central dans la reconnaissance du non-soi et la destruction des envahisseurs chez les invertébrés (Luo *et al.*, 2006). Certaines lectines d'invertébrés, sont impliquées dans la stimulation de la phagocytose, des activités antibactériennes, l'activation du système prophénoloxydase, l'agglutination, l'immobilisation, la lyse et la formation de nodules (Vasta *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006). De nombreuses lectines ont été caractérisées comme étant engagées dans la reconnaissance du non-soi chez les invertébrés marins (Kang *et al.*, 2006). Chez les arthropodes, un groupe de lectines reconnaissant les



molécules associées aux pathogènes, a été trouvé au niveau des hémocytes (Kang *et al.*, 2006). De la même façon, chez un tunicier, *Styela plicata*, il est démontré que l'hémolymphé sécrète une lectine lors d'une inflammation (Kang *et al.*, 2006). La plupart des lectines sont des protéines multimériques, composées d'une seule sous-unité de poids moléculaire de 25 à 40kDa (Luo *et al.*, 2006). Néanmoins, Luo *et al.* (2006) ont purifié une lectine à partir du sérum de la crevette *Penaeus monodon* et ils ont démontré que c'est un monomère de 18kDa. Ces auteurs expliquent que la capacité d'héماغlutination observée avec cette lectine démontre qu'elle peut être un oligomère. De plus, d'autres auteurs ont isolé et caractérisé une lectine à partir de l'hémolymphé du gastropode *Belamyia bengalensis*, c'est une protéine monomère de poids moléculaire de 33kDa (Banerjee *et al.*, 2004). Récemment, une lectine-like de poids moléculaire de 36kDa a été purifiée chez un urochordé, l'ascidie *H. roretzi*, (Endo *et al.*, 2006). De plus, chez la lamproie *Lampetra japonica*, une lectine a été caractérisée dans le sérum, son poids moléculaire est de 24kDa (Endo *et al.*, 2006).

Ensuite, la stimulation de protéines anti-microbiennes par les hémocytes est observée. Haug *et al.* (2002) ont montré l'existence de protéines anti-microbiennes chez de nombreux crustacés et suggèrent que ces activités soient liées à des composés de poids moléculaire compris entre 2 et 12kDa. Ces auteurs proposent que les activités anti-microbiennes testées soient liées à l'activité lysozyme-like présente au niveau de l'hémolymphé et des hémocytes des crustacés étudiés. En effet, le lysozyme est un agent anti-bactérien qui cause la lyse de bactéries par hydrolyse enzymatique des peptidoglycanes détectés au niveau de la paroi bactérienne (Facon and Skura, 1996). De plus, des lysozymes, possédant des propriétés anti-microbiennes, ont été isolés et caractérisés chez l'étoile de mer *Asteria rubens* pour un poids moléculaire de 15,5kDa (Haug *et al.*, 2002). Chez un mollusque bivalve *Chlamys islandica* avec un poids moléculaire de 11kDa (Nilsen *et al.*, 1999). Chez la moule *Mytilus edulis* avec un poids moléculaire de 13kDa (Oldsen *et al.*, 2003) et chez l'huître *Crassostrea virginica* avec un poids moléculaire de 18,4kDa (Xue *et al.*, 2004).

La Figure 110 synthétise les résultats obtenus au cours de cette expérience :

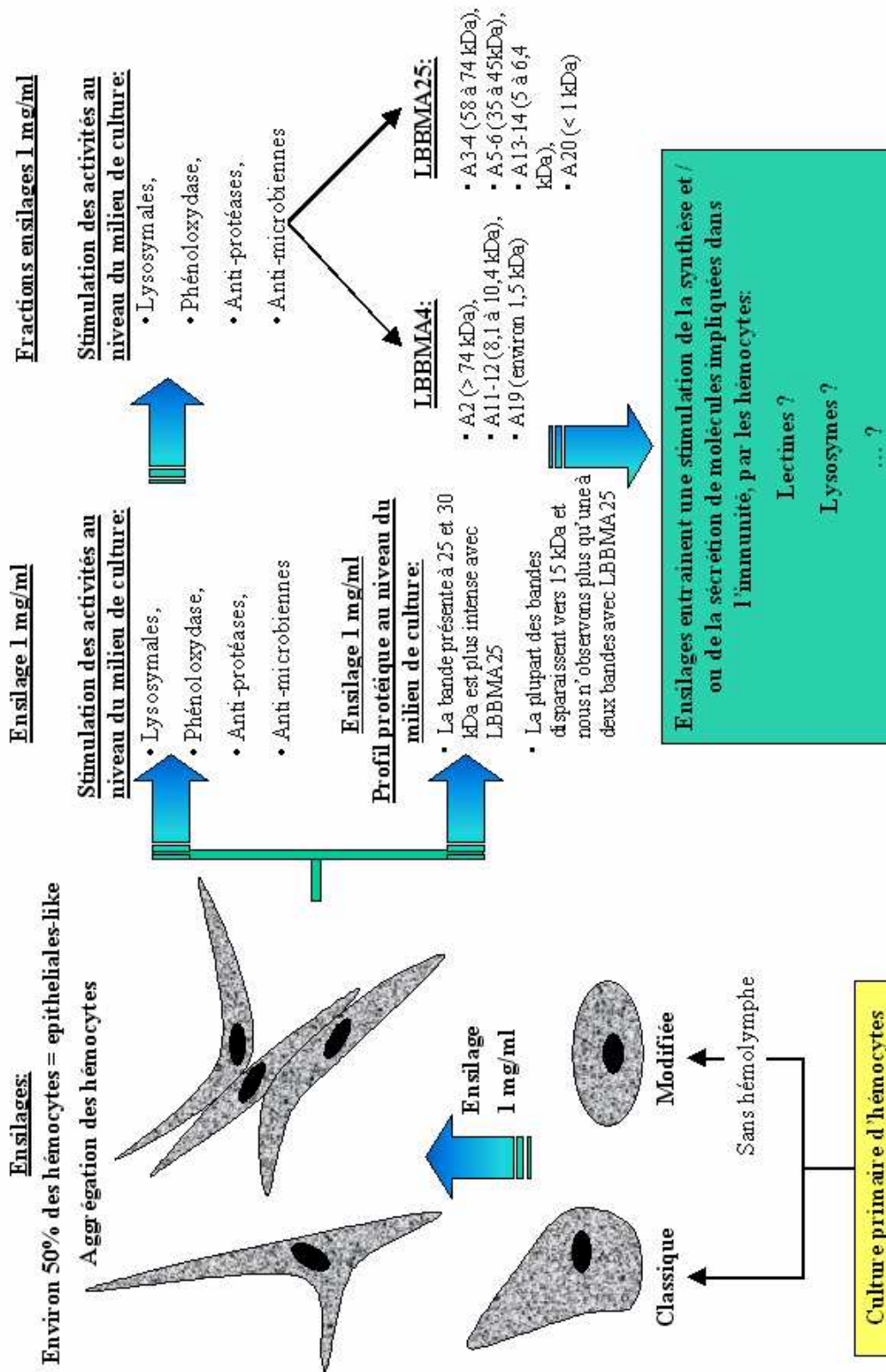


Figure 110 : Synthèse des résultats obtenus concernant la recherche dans les ensilages de molécules bio-actives sur le système immunitaire.

## **D. Conclusion**

L'ensemble de cette étude concernant la recherche dans les ensilages de molécules bio-actives sur le système immunitaire a permis plusieurs observations :

D'abord, l'impact de cet ensilage sur le développement du rein céphalique de juvénile de bar *in vivo* est observée. Ainsi, au cours du développement, la taille du rein céphalique augmente régulièrement quelle que soit l'alimentation. Cependant, la taille du rein céphalique est rapidement plus importante pour les animaux alimentés avec l'aliment LBBMA25 5%. De plus, l'ensemble de ces résultats montre un retard dans le développement du système excréteur et hématopoïétique situé au niveau du rein céphalique, chez les juvéniles témoins par rapport aux juvéniles alimentés avec l'aliment LBBMA25 5%. Pourtant, l'ensemble des résultats obtenus, montre que l'ontogénèse prend importance dans l'évolution des activités impliquées dans la réponse immunitaires dosées. L'utilisation de compléments alimentaires permet de stimuler à la fois l'immunité et l'ontogénèse, mais ne peut en aucun cas aller contre l'évolution physiologique et morphologique programmée génétiquement.

Par ailleurs, le dosage d'activités impliquées dans l'immunité innée a permis de voir *in vivo*, sur des juvéniles de bars et *in vitro*, sur des hémocytes d'ormeaux, que les ensilages possèdent des propriétés immuno-stimulantes. Ainsi, ils sont capables d'induire l'augmentation des activités lysozymale, phénoloxydase et anti-protéasiques chez un poisson et un mollusque marin. La présence d'activité anti-microbienne contre le pathogène marin *Vibrio carchariae*, induite par l'ajout d'ensilage, a même été détectée au niveau du milieu de culture d'hémocytes d'ormeaux.

Ensuite, l'ajout des ensilages dans le milieu de culture d'hémocytes d'ormeaux induit à la fois une stimulation des activités immunitaires, mais aussi une modification phénotypique de ces cellules. Ainsi, on observe une augmentation du nombre d'hémocytes fibroblaste-like, du nombre de prolongements cytoplasmiques et une tendance à l'agrégation des hémocytes. En outre, des différences concernant le profil protéique du milieu de culture des hémocytes en présence de l'ensilage LBBMA25 a été noté. La bande située entre 25 et 30kDa est plus intense lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture. De plus, le profil est différent pour des molécules de poids moléculaire d'environ 15kDa. En effet, la plupart des bandes disparaissent et il n'y a plus qu'une bande lorsque l'ensilage LBBMA25 est ajouté au milieu de culture.

Le fractionnement des ensilages, a permis d'observer que certaines fractions sont impliquées dans la stimulation des activités immunitaires innées et le phénotype des hémocytes. En effet, les fractions A2 (>74 kDa), A11-12 (8,1 à 10,4kDa) et A19 (environ 1,5kDa) de

l'ensilage LBBMA4 ainsi que les fractions A3-4 (58 à 74kDa), A5-6 (35 à 45kDa), A13-14 (5 à 6,4kDa) et A20 (<1kDa) de l'ensilage LBBMA25 stimulent ces divers paramètres.

En conclusion, les ensilages ont des propriétés immuno-stimulantes *in vivo* et *in vitro*. Cette stimulation de la réponse immunitaire innée est corrélée avec une forte stimulation de la croissance et de l'ontogenèse *in vivo* ainsi qu'un changement phénotypique des hémocytes *in vitro*. Seules certaines fractions des ensilages sont à l'origine de ces changements. De plus, les ensilages entraînent une synthèse et/ou une sécrétion de protéines différentes au niveau des hémocytes, pouvant être à l'origine des variations d'activités dosées. Des recherches menées *in vivo* et *in vitro*, permettront de caractériser les facteurs immuno-stimulants des ensilages.

## **V. Conclusion**

L'ensemble de ce chapitre, concernant la recherche de composés bio-actifs dans les ensilages LBBMA4 et LBBMA25, a permis d'observer l'action de ces ensilages sur la digestion, la croissance et l'immunité d'animaux marins *in vitro* et/ou *in vivo*.

Tout d'abord, concernant la recherche de molécules bio-actives sur la croissance, les ensilages possèdent un comportement proche de celui de facteurs de croissance, lorsqu'ils sont utilisés en tant que complément de milieu de culture de cellules isolées de mollusques. En effet, ils peuvent stimuler à la fois l'hyperplasie et l'hypertrophie de cellules isolées de mollusques. Ces données sont en accord avec les observations zootechniques faites sur des poissons, des mollusques ou encore des crustacés. Ainsi, les ensilages entraînent des stimulations de croissance particulièrement fortes.

Ensuite, l'étude concernant la recherche de molécules bio-actives sur la digestion, montre que les ensilages sont capables de réguler les capacités digestives de manière proche de celle d'hormones telle que la gastrine ou l'insuline. Le fractionnement de l'ensilage démontre que c'est la fraction protéique de poids moléculaire inférieur à 5,02kDa qui est impliquée dans ce mécanisme. De plus, les ensilages entraînent une optimisation du système digestif des juvéniles de poissons via une augmentation du nombre de cellules à mucus et de la taille de la bordure en brosse. Plusieurs niveaux de régulation de la digestion et de la maturation du système digestif sont observés chez les larves et les juvéniles par les ensilages. La régulation des capacités digestives est essentielle à une bonne digestion chez les larves et des juvéniles, mais c'est la

régulation de l'ontogénèse du système digestif qui détermine la survie et la croissance des animaux.

Enfin, l'étude concernant la recherche de molécules bio-actives sur le système immunitaire, démontre que les ensilages peuvent moduler la réponse immunitaire *in vivo* et *in vitro*. L'ensilage utilisé *in vivo* sur des juvéniles de poisson permet à la fois de stimuler l'ontogénèse du rein céphalique impliqué dans l'hématopoïèse et d'augmenter la réponse immunitaire innée, jouant ainsi un rôle immuno-stimulant. De plus, l'utilisation *in vitro* de ces ensilages permet une immuno-stimulation et un changement phénotypique des hémocytes d'ormeaux. Ces modifications sont corrélées avec des synthèses et/ou sécrétion, par les hémocytes, de molécules correspondant à des poids moléculaires de 25 à 30kDa et 15kDa environ. Le fractionnement des ensilages a permis de montrer que ce sont les fractions A2 (> 74kDa), A11-12 (8,1 à 10,4kDa) et A19 (environ 1,5kDa) de l'ensilage LBBMA4 ainsi que les fractions A3-4 (58 à 74kDa), A5-6 (35 à 45kDa), A13-14 (5 à 6,4kDa) et A20 (<1kDa) de l'ensilage LBBMA25 qui sont impliquées dans la stimulation de ces divers paramètres.

L'ensemble de ces données montre la multiplicité d'action des ensilages. En effet, ils sont capables de stimuler à la fois la digestion, la croissance et les capacités immunitaires d'animaux marins. Des recherches, permettront de savoir quelles sont les molécules impliquées dans ces différents phénomènes et les voies de stimulation utilisées. Les résultats obtenus laissent déjà présager de multiples applications à ces molécules issus de l'ensilage de co-produits de la seiche *Sepia officinalis*.



# Conclusion générale et Perspectives





Les débarques de céphalopodes constituent une part majeure de la pêche dans la région Basse-Normandie. De plus, la demande croissante en produits transformés, entraîne l'installation progressive des industries de transformations dans la région. Cela conduit à l'existence de co-produits de la pêche en quantité importante, entraînant un coût élevé pour leur enlèvement. Ces co-produits représentent pourtant une matière première en quantité suffisante et à faible coût en vue de leur valorisation. L'objectif de ce travail consistait donc à développer une technique de valorisation des co-produits issus de la transformation des céphalopodes.

Dans ce but, la qualité biochimique et enzymatique a d'abord été abordée. Les études combinées de l'évolution post-mortem et de l'impact de différents traitements sur la qualité biochimique et enzymatique des co-produits, ont permis de connaître les voies de valorisation envisageables. Il apparaît que les co-produits obtenus après transformation possèdent une bonne qualité biochimique, un contenu enzymatique satisfaisant et un très bon profil en acide gras puisque le pourcentage élevé en acide gras poly-insaturé est maintenu. De plus, l'analyse de l'évolution post-mortem des viscères de seiche a fourni de précieuses informations. La capacité enzymatique des viscères est un paramètre essentiel pour la compréhension de la dégradation des protéines, glucides et lipides ainsi que pour la production d'ensilage de viscère de seiche. Sur la base de ces résultats et par volonté de développer une technique simple, peu coûteuse et facilement applicable aux usines de transformation, un protocole de fabrication d'ensilages à partir des co-produits issus de la transformation de la seiche *Sepia officinalis* a été élucidé. Ainsi, la technologie nécessaire à la fabrication de ces ensilages est particulièrement simple et l'équipement nécessaire est réduit.

Après analyse de la composition des lysats obtenus, nous avons investigué sur leurs utilisations potentielles. Les peptones sont couramment utilisées pour la culture des micro-organismes. La possibilité d'utiliser les lysats *in vitro* en tant qu'alternative aux peptones existantes a d'abord, été explorée. Pour cela, les cinétiques de croissance et les biomasses, de divers micro-organismes (bactéries et levures), ont été abordées. Les résultats obtenus démontrent la possibilité d'utiliser l'ensilage LBBMA25 en tant que peptone puisqu'il permet d'obtenir des cinétiques de croissance équivalentes à celles obtenues avec des peptones commerciales de diverses origines (viande, soja et caséine). En revanche, les caractéristiques de l'ensilage LBBMA4 ne permettent pas d'envisager son utilisation en tant que peptone pour la culture de micro-organismes. Dans de futures expérimentations, de nouvelles cinétiques de croissance devront être faites en élargissant le choix de micro-organismes (diverses origines, besoins particuliers) mais aussi en diversifiant les peptones de manière à améliorer cette étude.

Dans un second temps, nous avons abordé l'éventualité d'utiliser les ensilages en aquaculture. Nous avons étudié les différentes voies d'utilisation de ces lysats *in vivo*. L'impact d'ingrédients en tant qu'enrichissements de l'alimentation de post-larves et de juvéniles a été effectué sur des mollusques, des crustacés et des poissons. Les paramètres zootechniques et les différentes analyses biochimiques ont permis de conclure à la possibilité d'utiliser les lysats en aquaculture. Ainsi, les ensilages LBBMA4 et LBBMA25 inclus à un faible pourcentage dans l'aliment, pendant un temps court (quelques semaines) permettent une forte stimulation de la croissance, un maintien ou une amélioration du taux de survie, une qualité de chair identique et une tendance à la diminution du taux de malformations des animaux de manière durable même après l'arrêt de l'enrichissement. En conclusion, les ensilages de co-produits issus de la transformation de la seiche *Sepia officinalis* peuvent être inclus dans la formulation d'aliments pour jeunes animaux élevés en aquaculture et permettre ainsi de très bonnes performances de production. Ces résultats sont très prometteurs pour la valorisation des co-produits issus de la transformation de la seiche. Ainsi, la valeur ajoutée à la transformation de la seiche serait importante en raison de la forte demande dans le domaine de l'aquaculture c'est à dire par les aquaculteurs et par les fabricants d'aliments qui sont très demandeurs de nouveaux ingrédients à propriétés fonctionnelles (stimulation de la croissance, une augmentation de la survie, une diminution des malformations...).

Enfin, nous avons caractérisé des facteurs actifs présents dans les lysats, via l'utilisation de différents bio-essais développés au sein du laboratoire. Des primo-cultures de cellules de mollusques ont permis d'aborder la présence potentielle de molécules facteur de croissance-like via leurs impacts sur des cellules isolées de glande digestive de seiche ou impliqué dans l'immunité via leurs effets sur des hémocytes d'ormeaux. D'abord, concernant la recherche de molécules bio-actives sur la croissance, les ensilages possèdent un comportement proche de celui de facteurs de croissance, lorsqu'ils sont utilisés en complément de milieu de culture de cellules isolées de mollusques. En effet, ils peuvent stimuler à la fois l'hyperplasie et l'hypertrophie de cellules isolées de mollusques. Ces données sont en accord avec les observations zootechniques faites sur des poissons, des mollusques ou encore des crustacés puisque les ensilages entraînent des stimulations particulièrement importantes. De plus, l'utilisation *in vitro* des ensilages permet une immuno-stimulation et un changement phénotypique des hémocytes d'ormeaux. Ces modifications sont corrélées avec des synthèses et/ou sécrétion, par les hémocytes, de molécules correspondant à des poids moléculaires de 25 à 30kDa et 15kDa environ. Le fractionnement des ensilages a permis de montrer que ce sont les fractions A2 (>74kDa), A11-12 (8,1 à 10,4kDa) et A19 (environ 1,5kDa) de l'ensilage LBBMA4 ainsi que les fractions A3-4 (58 à 74kDa), A5-6

(35 à 45kDa), A13-14 (5 à 6,4kDa) et A20 (<1kDa) de l'ensilage LBBMA25 qui sont impliquées dans la stimulation de ces divers paramètres. La recherche de molécules immuno-stimulantes a aussi pu être abordée *in vivo* sur des juvéniles de bars. L'ensilage utilisé *in vivo* sur des juvéniles de poissons permet à la fois de stimuler la morphogénèse du rein céphalique impliqué dans l'hématopoïèse et d'augmenter la réponse immunitaire innée, jouant ainsi un rôle immuno-stimulant. L'étude concernant la recherche de molécules bio-actives sur le système immunitaire, démontre que les ensilages peuvent moduler la réponse immunitaire *in vivo* et *in vitro*.

La recherche des molécules à potentiel sécrétagogue a été menée via l'utilisation d'un bio-essai impliquant une culture standardisée de nauplii d'artémie et des analyses enzymatiques sur des juvéniles de bars. La recherche de molécules bio-actives sur la digestion a montré que les ensilages sont capables de réguler les capacités digestives de manière proche de celle d'hormones telle que la gastrine ou l'insuline. Le fractionnement de l'ensilage démontre que c'est la fraction protéique de poids moléculaire inférieur à 5,02kDa qui est impliquée dans ce mécanisme. De plus, les ensilages entraînent une optimisation du système digestif des juvéniles de poissons via une augmentation du nombre de cellules à mucus et de la taille de la bordure en brosse. Il y a donc plusieurs niveaux de régulation de la digestion et de la maturation du système digestif chez les larves et les juvéniles, par les ensilages. La régulation des capacités digestives, est essentielle à une bonne digestion des larves et des juvéniles, mais c'est la régulation de l'ontogénèse du système digestif qui détermine la bonne survie et croissance des animaux.

Nos travaux ont permis, sur la base de la caractérisation partielle des ensilages, d'observer la capacité de ces produits à stimuler à la fois la digestion, la croissance et les capacités immunitaires d'animaux marins. Les résultats obtenus laissent présager de multiples applications à ces composés issus de l'ensilage de co-produits de la seiche *Sepia officinalis*. Les travaux futurs de purification et de caractérisation, permettront de savoir quelles sont les molécules à l'origine de ces différents phénomènes et quelles sont les voies de stimulation utilisées.

Ces travaux débouchent sur de nombreuses perspectives pour les usines de transformation. En effet, la valorisation des co-produits issus de la transformation de la seiche, au travers de la fabrication d'ensilages, s'est avérée simple, peu coûteuse et les résultats obtenus à l'aide de nombreuses expérimentations menées *in vivo* et *in vitro* laissent envisager un avenir prometteur à ces produits. De plus, les différentes études parallèles menées dans le cadre d'une étape de pré-innovation et incubation ont conduit à un dépôt de brevet. L'étude de marché laisse entrevoir des

demandes au niveau des fabricants d'aliments aquacoles. L'objectif final de ce projet est de pouvoir créer une structure industrielle, associée aux usines de transformation des céphalopodes, qui valorisera les co-produits de la seiche. Des contacts favorables au développement d'une telle structure ont déjà été pris avec des industriels régionaux.

Néanmoins, cette voie de valorisation n'est certainement pas la seule perspective envisageable. En effet, il y a une grande richesse lipidique des co-produits de la seiche tant au niveau quantitatif que qualitatif. Ainsi, les viscères sont composés d'environ 10 % de lipides. Ils se caractérisent par la présence d'une grande variété d'acides gras. De plus, ils ont un contenu important en acides gras dits « essentiels », tels que les acides gras à longues chaînes de la famille des n-3, caractéristiques des huiles marines : acide eicosapentaénoïque (précurseur des prostaglandines) et acide docosahexaénoïque (précurseurs des phospholipides des cellules nerveuses). A l'avenir, le développement d'une méthode d'extraction de l'huile des co-produits de la transformation de la seiche pourra être envisagé. Ces huiles marines sont extrêmement prisées au niveau des marchés de la cosmétique, de la pharmaceutique et de l'alimentation.

De plus, ces travaux ont démontré la richesse enzymatique présente dans les viscères de seiches. La fabrication d'autolysat de poissons s'avère de plus en plus problématique en raison de la faible qualité des co-produits obtenus à l'heure actuelle (M. Noël, PDG DIELEN Laboratoires, communication personnelle). En effet, nos discussions avec les industriels fabricants des lysats de poissons ont montré que les co-produits de poissons obtenus ne possèdent plus suffisamment d'activités enzymatiques endogènes pour permettre la fabrication d'autolysat. Cela est dû à un ensemble de phénomènes : d'abord, une concurrence de plus en plus importante vis-à-vis de ces co-produits qui ont vu leur statut passer de déchets à matières premières. Cela entraîne de nombreux problèmes pour les industriels en ce qui concerne l'approvisionnement en matières premières de qualité. De plus, les matières premières obtenues sont de plus en plus souvent éviscérées, leur contenu enzymatique est donc pratiquement nul. Enfin, les industriels doivent s'approvisionner de plus en plus loin. Les co-produits obtenus sont donc généralement congelés et subissent un transport long. Tout ces facteurs entraînent une dégradation des enzymes endogènes, déjà présentes en faible quantité. En conséquence, les industriels sont contraints d'avoir recours à l'hydrolyse via l'utilisation d'enzymes commerciales. L'utilisation de ces enzymes représente alors un coût supplémentaire pour la fabrication des lysats. De plus, en règle générale, les hydrolysats sont le résultat de l'hydrolyse des matières premières par une enzyme unique protéolytique commerciale. Cependant, les matières premières hydrolysées sont composées par de multiples molécules dont la lyse nécessiterait l'action simultanée de diverses enzymes : protéases, lipases et amylases. Ainsi,

l'hydrolyse par l'utilisation d'enzymes commerciales purifiées ne peut pas rivaliser avec une autolyse ou une hydrolyse utilisant l'ensemble du matériel enzymatique des viscères. Les enzymes d'origine marine présentent de nombreux avantages par rapport à celles d'origine bactérienne, végétale ou animale, couramment utilisées dans l'industrie. Elles se distinguent par leurs conditions optimales d'activité : elles sont fonctionnelles dans des solutions fortement salines, sont généralement multifonctionnelles et surtout possèdent une forte activité catalytique à basse température (Pour revue : Haard, 1992). Il apparaît donc assez innovant d'élaborer des techniques d'obtention d'un cocktail d'enzymes stabilisées de viscères de seiche. Une étude complémentaire permettra de déterminer la quantité et la qualité des enzymes contenue dans le cocktail. Ce mélange enzymatique pourra alors être utilisé pour la fabrication d'hydrolysats de poissons.



# Bibliographie





**A**

- Agin, V., Chichery, R., Chichery, M. P., Dickel, L., Darmaillacq, A. S. and Bellanger, C. (2006) Behavioural plasticity and neural correlates in adult cuttlefish. *Vie et Milieu- Life and Environment* 56, 81-87.
- Akness, A. and Mundheim, H. (1997) The impact of raw material freshness and processing temperature for fish meal on growth, feed efficiency and chemical composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 149, 87-106.
- Ali, M. A. M., El Tinay, A. H. and Abdalla, A. H. (2003) Effect of fermentation on the *in vitro* protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry* 80, 51-54.
- Amano, K. (1961) The influence of fermentation of the nutritive value of fish with special reference to fermented fish products of southeast Asia. In 'FAO International conference on fish in nutrition'. Washington. pp. 1-19.
- Amar, E., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2004) Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 527-537.
- Anggawati, A., Murtini, J. and Heruwati, E. (1990) The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. In 'Research Report. Research Institute for Fish Technology.' Palmerah Jakarta. pp. 1-12.
- Anonyme (2005) Report of the Working Group on Cephalopod Fisheries and Life History. In 'I.C.E.S.' Aberdeen, UK, 20-24 september. pp. 63.
- Aoki, T. and Ueno, R. (1997) Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International* 30, 585-591.
- AQUACOP and Cuzon, G. (1989) Selected ingredients for shrimp feed. In 'Advance in Tropical Aquaculture'. Tahiti. pp. 405-412.

**B**

- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A. and Rodriguez, J. (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.
- Badii, F. and Howell, N. K. (2001) A comparison of biochemical changes in cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) during frozen storage. *Journal of Science Food Agriculture* 81, 1-11.
- Badii, F. and Howell, N. K. (2002) Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. *Food Hydrocolloids* 16, 313-319.
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P., Sarti, M. and Marino, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast Beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* 18, 311-325.
- Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J. and Chatterjee, B. (2004) Mucin binding mitogenic lectin from the freshwater Indian gastropode *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421, 125-134.
- Barrett, A. and Kirschke, A. (1981) Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Methods in enzymology* 80, 535-561.
- Barrett, A. J. (1995) Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases. pp 110

- Basuyaux, O. (2006) Evaluation de la faisabilité d'un élevage de crevettes japonaises dans le département de la Manche. In 'Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral'. Blainville sur mer. pp. 20.
- Bautista-Teruel, M., Eusebio, P. and Welsh, T. (2003) Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225, 121-131.
- Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tueksuban, J. (2003) Changes in physico-chemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. *Food Chemistry* 80, 535-544.
- Berge, G. M. and Storebakken, T. (1996) Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 145, 205-212.
- Bergeron, J. P. and Herbland, A. (2001) Pyruvate kinase activity as index of carbohydrate assimilation by mesoplankton: an early field implementation in the bay of Biscay, NE Atlantic. *Journal of Plankton Research* 23, 157-163.
- Bernay, B. (2005) Contrôle de la ponte ovulaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: utilisation du modèle *Sepia officinalis* pour la caractérisation de peptides régulateurs. Thèse, Université de Caen. pp 183.
- Bernet, F., Montel, V., Noël, B. and Dupouy, J. P. (2000) Diazepam-like effects of a fish protein hydrolysate (Gabolysat PC60) on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity. *Psychopharmacology* 149, 34-40.
- Biesiot, P. and McDowell Capuzzo, J. (1990) Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobsters *Homarus americanus* Milnes Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 136, 107-122.
- Blanchier, B. and Boucaud-Camou, E. (1982) Contenu lipidique de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. à maturité sexuelle. *Malacologia* 22, 691-696.
- Blier, P. U., Lemieux, H. and Devlin, R. H. (2002) Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissue? Insight from transgenic Coho salmon. *Aquaculture* 209, 379-384.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
- Boeuf, G. (2002) L'aquaculture dans le monde- Quel avenir? In 'Cycle de conférence 2001-2002 - Perspectives - Quel avenir pour l'homme?' Université de Perpignan. pp. 1-10.
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. and Cautaudella, S. (2001) Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192, 1-22.
- Bogwald, J., Dalmo, R., McQueen Leifson, R., Stenberg, E. and Gildberg, A. (1996) The stimulatory effect of a muscle cod protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L., on Atlantic salmon *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 3-16.
- Boletzky, S. (2003) Biology of early life stages in cephalopod molluscs. In 'Advances in Marine Biology.' 44 pp 143-203.
- Boletzky, S. V. (1983) *Sepia officinalis*. In 'Cephalopod Life Cycles 1'. Boyle ed. Acad. Press. pp. 31-32.
- Bonete, M. J., Manjon, A., Llorca, F. and Iborra, J. L. (1984) Acid proteinase activity in fish - I. Comparative study of extraction of cathepsins B and D from *Mujil auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78, 203-206.
- Boonyaratpalin, M., Vorasayan, P. and Suksuchep, V. (1980) Shrimp nutrition in Japan. A study tour report. In 'Programme for the Expansion of Freshwater Prawn Farming.' Thailand. pp. 11.
- Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 239-262.
- Boucaud-Camou, E. (1972) Premières données sur l'infrastructure du foie de *Sepia officinalis* L. *Bulletin de la Société Linnéenne de Normandie* 97, 149-155.

- Boucaud-Camou, E. (1973) Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse, Université de Caen. pp 208
- Boucaud-Camou, E. (1974) Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 115, 5-27.
- Boucaud-Camou, E. (1982) Localisation of some hydrolytic enzymes in digestive organs of juvenile *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Malacologia* 22, 685-690.
- Boucaud-Camou, E. and Boismery, J. (1991) The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L) in the English channel. In 'The cuttlefish'. (Université de Caen: Caen) pp 179-189.
- Boucaud-Camou, E. and Boucher-Rodoni (1983) Feeding and digestion in cephalopods. In 'The Mollusca' vol 5, Physiology part 2 (New York: Academic Press) pp 149-187.
- Boucaud-Camou, E., Yim, M. and Tresgot, A. (1985) Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during post-hatching development. *Vie et Milieu- Life and Environment* 35, 263-266.
- Boucher-Rodoni, R. (1982) La glande digestive des céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. *Cahiers de Biologie Marine* 23, 299-318.
- Bourgeois, C. M. and Leroux, P. (1982) Protéines animales. In 'Extraits, concentrés et isolats en alimentation humaine.' (Lavoisier), pp 305.
- Boyle, P. and Boletzky, S. (1996) Cephalopod populations: definition and dynamics. In 'Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences'. 351, 985-1002.
- Breuil, G. (1997). Le système immunitaire du bar *Dicentrarchus labrax*. Immunoglobulines, cellules productrices d'immunoglobulines, ontogenèse. Applications à une pathologie virale néonatale. Thèse, Université de Montpellier II. pp 218.
- Bricknell, I. and Dalmo, R. (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 457-472.
- Brito, R., Chimal, M. E., Gaxiola, G. and Rosas, C. (2000) Growth, Metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 255, 21-36.

## C

- Caballero, M., Izquierdo, M., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernandez, A. and Rosenlund, G. (2003) Morphological aspects of intestinal cells from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325-340.
- Cahu, C., Ronnestad, I., Grangier, V. and Zambonino-Infante, J. L. (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolysed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238, 295-308.
- Cahu, C., Zambonino-Infante, J. and Takeuchi, T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
- Cahu, C. and Zambonino-Infante, J. L. (1994) Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109, 213-222.
- Cahu, C. and Zambonino-Infante, J. L. (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding. *Aquaculture International* 5, 151-160.
- Cahu, C. and Zambonino-Infante, J. L. (2001) Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.

- Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., Escaffre, A. M., Bergot, P. and Kaushik, S. J. (1998) Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with compound diet from first feeding, comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169, 1-7.
- Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, P. and Le Gall, M. M. (1999) Protein hydrolysate vs, fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109-119.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J. L. and Barbosa, V. (2003) Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal of Nutrition* 90, 21-28.
- Cancre, I., Ravallec-Plé, R., Van Wormhoudt, A., Stenberg, E., Gildberg, A. and Le Gal, Y. (1999) Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnology* 1, 489-494.
- Cancre, I., Van Wormhoudt, A. and LeGal, Y. (1995) Effects of cellular growth factors on crustacean hepatopancreas cell suspensions. *Journal of Marine Biotechnology* 2, 83-87.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Malasesta, M., Gazzanelli, G. and Gallo, G. (1999) Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lam) through tyrosine kinase mediated signal transduction. *General and Comparative Endocrinology* 116, 241-248.
- Canesi, L., Ciacci, C., Orunesu, M. and Gallo, G. (1997) Effects of epidermal growth factor on isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). *General and Comparative Endocrinology* 107, 221-228.
- Carajaville, M. P., Robledo, Y., Etxeberria, M. and Marigomez, I. (1995) Cellular markers as useful tol in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. (M. Carajaville Edit, Univ. Pais Vasco: Bilbao), pp 19-55.
- Caruso, G., Genovese, L. and Greco, S. (1996) Preliminary investigation on the digestive enzymes of reared *Pagellus acarne* (risso, 1826) juveniles in relation to two different diets. *Oebalia* 22, 3-13.
- Carvalho, A. P., Escaffre, A. M., Oliva-Teles, A. and Bergot, P. (1997) First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International* 5, 361-367.
- Castro, B. G. (1991) Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behaviour and Physiology* 19, 35-38.
- Castro, B. G., DiMarco, F. P., DeRusha, R. H. and Lee, P. G. (1993) The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 170, 241-252.
- Challier, L. (2005) Variabilité de la croissance des Céphalopodes juvéniles (*Sepia officinalis*, *Loligo forbesi*) et relation avec les fluctuations du recrutement, en Manche. Thèse, Université de Caen. pp 190.
- Charney, J. and Tomarelli, R. (1947) A colorimetric method for the determination proteolytic activity of duodenal juice. *Biological Chemistry* 171, 501-505.
- Cheng, T., Rodrick, G., Foley, D. and Koehler, S. (1975) Release of lysozyme from hemolymph cells of *Merceneria merceneria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 25, 261-265.
- Chiu, S. T. and Pan, B. S. (2002) Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. *Aquaculture* 205, 141-156.
- Church, N. (1998) MAP fish and crustaceans sensory enhancement. *Food Science and Technology Today* 12, 73-83.
- Clarke, A., Rodhouse, P. G., Holmes, L. J. and Pascoe, P. L. (1989) Growth rate and nucleic acid ration in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 133, 229-240.

- Clausen, E., Gildberg, A. and Raa, J. (1985) Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. *Applied Environment Microbiology* 50, 1556-1557.
- Clemente, A. (2000) Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 11, 254-262.
- Coello, N., Brito, L. and M., N. (2000) Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage. *Bioresource Technology* 73, 221-225.
- Cordova-Murueta, J. H. and Garcia-Carreno, F. L. (2002) Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210, 371-384.
- Cottin, P. and Ducastaing, A. (1996) *Rigor mortis* mécanismes et conséquences. *Froids et Aquaculture*, 103-107.
- Cottu, O. (1990) Etude d'une supplémentation en Gabolysat chez les pintades de chair. Covinter. pp 19.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M. R., Bergot, P. and Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149-164.
- Cruz-Ricque, E., Guillaume, J. and Van Wormhoudt, A. (1989) Effect of squid extracts on time course appearance of glucose and free amino acids in haemolymph in *Penaeus japonicus* after feeding: preliminary results. *Aquaculture* 76, 57-65.
- Cruz-Ricque, L., Guillaume, J., Cuzon, G. and Aquacop (1987) Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *Journal of World Aquaculture Society* 18, 209-217.
- Cruz-Suarez, E., Ricque, D. and AQUACOP (1992) Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture* 106, 293-299.
- Cruz, E. and Guillaume, J. (1983) Facteur de croissance inconnu de la farine de calmar pour la crevette japonaise: localisation de ce facteur. In 'Conseil International pour l'Exploitation de la Mer'. pp. 1-7.

## D

- Danton, E., Kiyomoyo, M., Komaru, A., Wada, T., Awaj, M. and Mathieu, M. (1996) Comparative analysis of storage tissue and insulin-like neurosecretion in diploid and triploid mussels *Mytilus galloprovincialis* LMK in relation to their gametogenesis cycle. *Invertebrate Reproduction and Development* 29, 37-46.
- Davis, A. and Arnold, C. (2000) Replacement of fish meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 185, 291-298.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Applemans, F. (1955) Tissue fractionations studies: -. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochemical Journal* 60, 604-617.
- De La Broise, D., Dauer, G., Gildberg, A. and Guérard, F. (1998) Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on *Escherichia coli* culture kinetics. *Journal of Marine Biotechnology* 6, 111-115.
- Delaporte, M. (2005) Modulation des paramètres immunitaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse, Université de Rennes. pp 365.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J. and Fleurence, J. (2004) Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chemistry* 84, 441-446.
- Delignette-Muller, M. L. (1995) Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse, Université de Lyon. pp 143.
- Delmar, E. G., Largman, C., Brodick, J. W. and Geokas, M. C. (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry* 99, 316-320.

- Denis, V. and Robin, J. P. (2001) Present status of the French Atlantic fishery for cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Fisheries resource* 11, 375-395.
- Dezfuli, B., Simoni, E., Giari, L. and Manera, M. (2006) Effects of experimental terbuthylamine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere*, in press.
- Dias, J., Alvarez, M. J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J. M. and Kaushik, S. J. (1998) Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein / energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169-186.
- Diaz, J., Huelvan, C., Dinis, M. and Métailler, R. (1998) Influence of dietary bulk agents (silica, cellulose and a natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources* 11, 219-226.
- Diaz, J. P., Connes, R., Divanach, P. and Barnabe, G. (1989) Développement du foie et du pancréas du Loup, *Dicentrarchus labrax*: I. Etude de la mise en place des organes au microscope électronique à balayage. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 13eSerie 10, 87-98.
- Dickel, L., Chichery, M. P. and Chichery, R. (2001) Increase of learning abilities and maturation of the vertical lobe complex during post-embryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. *Developmental Psychology* 39, 92-98.
- Dielen Laboratoires (2005) Fabriquant de compléments alimentaires. Humain & Animal. Tourlaville, France. pp 21
- Doi, E., Shibata, D. and Matoba, T. (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry* 118, 173-184.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28, 350-356.
- Dufossé, L., De La Broise, D. and Guérard, F. (2001) Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on gompertz modeling of microbial growth. *Current Microbiology* 42, 32-38.
- Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies: intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochemical Journal* 60, 604-617.

## E

- Einen, O., Guerin, T., Fjaera, S. O. and Skjervold, P. O. (2002) Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture International* 212, 129-140.
- Eino, M. F. and Stanley, D. W. (1973) Catheptic activity, textural properties and surface ultrastructure of post-mortem beef muscle. *Journal of Food Science* 38, 45-50.
- Ellis, A. (1999) Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 291-308.
- Endo, Y., Takahashi, M. and Fujita, T. (2006) Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* 211, 283-293.
- Espe, M., Raa, J. and Njaa, L. R. (1989) Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 49, 259-270.

## F

- Facon, M. and Skura, B. (1996) Antibacterial activity of lactoferricin, lysosyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *International Dairy Journal* 6, 303-313.

- FAO (2003). Etat de l'aquaculture dans le monde. Service des ressources des eaux intérieures et de l'aquaculture. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture., Rome, 886, 35.
- Favrel, P., Kegel, G., Sedlmeier, D., Leller, R. and Van Wormhoudt, A. (1991) Structure and biological activity of crustacean gastrointestinal peptides identified with antibodies to gastrin/cholecystochinin. *Biochimie* 73, 1233-1239.
- Favrel, P., Van Wormhoudt, A., Studler, J. and Bellon, C. (1987) Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinine-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) intermolt variation. *General and Comparative Endocrinology* 65, 363-372.
- Fenucci, J., Zein-Eldin, Z. and Lawrence, A. (1980) The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed. *Process in World Mariculture Society* 11, 403-409.
- Folk, A. and Schirmer, C. (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase a system, I: three forms of the active enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 238, 3884-3898.
- Fontagné, S., Robin, J., Corraze, G. and Bergot, P. (2000) Growth and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed from first feeding on compound diets containing medium-chain triacylglycerols. *Aquaculture* 190, 261-271.
- Frouël, S. (2006). Approche *in vitro* de l'activité antimicrobienne des préparations microbiennes. Communication personnelle.
- Frouël, S., Pham, D. and Nicolas, J. L. (2005) Study of the probiotic effects in shrimp by mean of biotest perfected with *Artemia salina*. In '8th International Conference on Shellfish Restoration'. Brest, France. pp. 1-10.
- Frouël, S., Pham, D. and Nicolas, J. L. (submitted) Development of a bioassay with *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) to study probiotic effects of a commercial microbial preparation on crustacean. *Marine Biology*.

## G

- Garcia-Arias, M. T., Alvarez Pontes, E., Garcia-Linares, M. C., Garcia-Fernandez, M. C. and Sanchez-Muniz, F. J. (2003) Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chemistry* 83, 349-356.
- Gardner, J. (1987) Passage of intact peptides across the intestine. *Advance in Biosciences* 65, 99-106.
- Gardner, J. and Jensen, R. (1983) Gastrointestinal peptides: the basis of action at the cellular level. In 'Recent progress in hormone research.' (Academic Press: New York) pp 211-243.
- Geraerts, W. (1976) Control of growth by neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnea stagnalis*. *General and Comparative Endocrinology* 29, 61-71.
- Giard, W. (1996) Utilisation de bioessais *in vitro* pour la caractérisation et la purification de facteurs actifs sur la digestion et la croissance de mollusques. Thèse, Université de Caen. pp 146.
- Giard, W., Lebel, J. M., Boucaud-Camou, E. and Favrel, P. (1998) Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L.: an *in vitro* study. *Journal of Comparative Physiology* 168, 81-86.
- Gildberg, A. (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91, 425-435.
- Gildberg, A. and Almas, K. A. (1986) Utilization of fish viscera. In 'Food Engineering and Process Applications, Unit Operations'. (Elsevier sc. Publ.: London, UK) pp 383-392.
- Gildberg, A., Bogwald, J., Johansen, A. and Stenberg, E. (1996) Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114, 97-101.

- Gilmartin, L. and Jervis, L. (2002) Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50, 5417-5423.
- Goddard, J. S. and Perret, J. S. (2005) Co-drying fish silage for use in aquafeeds. *Animal Feed Science and Technology* 118, 337-342.
- Gomot, A. and Gomot, L. (1995) Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bulletin de l'institut Oceanographique* 14, 141-149.
- Govoni, J. J., Boehlert, G. W. and Watanabe, Y. (1986) The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16(1-3), 59-77.
- Grassi Milano, E., Basari, F. and Chimenti, C. (1997) Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology and immunohistochemistry. *General and Applied Endocrinology* 108, 483-496.
- Green, P., Luty, A., Nair, S., Radford, J. and Raftos, D. (2006) A second form of collagenous lectin from the tunicate, *Styela plicata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144, 343-350.
- Gricourt, L. (2002) Implication des molécules du système insuline / IGF dans la croissance et la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: effets biologiques *in vitro* d'un ligand hétérologue (IGF-I recombinant humain), caractérisation et expression d'un récepteur homologue de type insuline. Thèse, Université de Caen. pp 145.
- Gricourt, L., Bonnec, G., Boujard, D., Mathieu, M. and Kellner, K. (2003) Insulin-like system and growth regulation in the pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *General and Comparative Endocrinology* 134, 44-56.
- Grove, S., Johansen, R., Reitan, L. and Press, C. (2006) Immune- and enzyme histochemical characterization of leucocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 693-708.
- Guérard, F. (2004) New and exciting use of peptides from by-products and under-utilised resources. In 'SEAFOODplus'. Copenhagen, Danemark. pp. 1-20.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D. and Binet, A. (2001) Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic* 11, 1051-1059.
- Guerra, A. (2006) Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu- Life and Environment* 56, 97-107.
- Guery, B. and Mcirdi, K. (2006). Croissance. <http://croissbact.free.fr/levure.php>.

## H

- Haaland, H. and Njaa, L. R. (1989) Effect of temperature on the autolysis of capelin silages stored for one year. *Fiskeridirektoratets Skrifter Serie ErnÆring*. II, 219-226.
- Haard (1992) A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquaculture and Food Production Technology* 1, 17-35.
- Hardy, R. W. (1991) Fish hydrolysates: production and use in aquaculture feeds. In: Akiyama, D. M., Tan, R. K. H. (Eds.), *Process in Aquaculture Feeds Processing and Nutrition Workshop*. American Soybean Association, Singapour, pp. 109-115.
- Haug, T., Kjuul, A., Stensvag, K., Sandsdalen, E. and Styrvold, O. (2002) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 371-385.
- Haug, T., Kjuul, A., Styrvold, O., Sandsdalen, E., Olsen, O. and Stensvag, K. (2002) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (holothuroidea), and *Asteria rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 94-102.



- Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G. and Vargas-Albores, F. (2003) In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxylase is located in plasma not in haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 14, 105-114.
- Heu, M. S., Kim, H. R. and Pyeun, J. H. (1995) Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B, 557-567.
- Hidalgo, M. C., Urea, E. and Sanz, A. (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
- Hultmann, L. and Rustad, T. (2004) Iced storage of atlantic salmon (*Salmo salar*) - effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food chemistry* 85, 377-387.

## J

- Jackson, A. J., Kerr, A. K. and Cowey, C. B. (1984) Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutritional and storage characteristics. *Aquaculture* 38, 211-220.
- Jeong, B. Y., Ohshima, T. and Koizumi, C. (1999) Changes in fatty chain compositions of lipid classes during frozen storage of the adductor muscle of giant ezo scallop (*Patinoptecten yessoensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 415-422.
- Johansson, M. and Soderhall, K. (1988) Isolation and Purification of a Cell Adhesion Factor from Crayfish Blood Cells. *Journal of Cell Biology* 106, 1795-1803.

## K

- Kang, Y., Kim, Y., Cho, S., Choi, K. and Cho, M. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental & Comparative Immunology* in press.
- Kellner-Cousin, K., Mialhe, E. and Mathieu, M. (1994) Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglion neurosecretory cells of the mussel *Mytilus edulis*. *Tissue & Cell* 26, 891-899.
- Kim, B. G. and Brown, C. L. (1999) Hormonal manipulation of digestive enzyme ontogeny in marine larval fishes - effects on digestive enzymes. In 'UJNR Aquaculture'. pp. 47-55.
- Klein, S., Cohn, S. and Alpers, D. (1998) The alimentary tract in nutrition. (William and Wilkins: Baltimore), pp 605-630.
- Kolodziejska, I. and Sikorski, Z. E. (1996) The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bulletin of the Sea Fish Institute* 1, 51-56.
- Koueta, N. (1983) Contribution à l'étude de la glande salivaire postérieure de céphalopodes décapodes. Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Caen. pp 168.
- Koueta, N. (1990) Etude expérimentale du contrôle endocrine de la maturation génitale chez la seiche *Sepia officinalis* L. (Mollusque Cephalopode). Thèse, Université de Caen. pp 280.
- Koueta, N. and Boucaud-Camou, E. (1986) Comparative study of the secretion of the posterior salivary glands of decapod cephalopods - *Sepia officinalis* L. *Cellular and Molecular Biology* 32, 333-341.
- Koueta, N., Boucaud-Camou, E. and Noel, B. (2002) Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Aquaculture* 203, 293-310.
- Kristinsson, H. and Rasco, B. (2000) Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Processing in Biochemistry* (Barking, UK) 36, 131-139.

Kumlu, Sarihan and Tekelioglu (1992) Trypsin activity in larvae of *Penaeus monodon* Fabricius, 1789 (Crustacea; Decapoda, Penaeidae) in relation to their diet. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh* 44, 103-110.

## L

Langar, H. (1992) Effets physiologiques et métaboliques de la qualité nutritionnelle des protéines chez le jeune alevin de bar (*Dicentrarchus labrax*). Thèse, Université de Bretagne Occidentale. pp 136.

Lavens, P., Léger, P. and Sorgeloss, P. (1986) Production, utilisation and manipulation of *Artemia* as food source for shrimp and fish larvae. *Océanis* 12, 229-247.

Le Bihan, E. (2003). Mise au point de techniques de dissociation. Application à l'étude de l'effet de polluants sur les activités enzymatiques de la glande digestive de la seiche *Sepia officinalis* Linné (Mollusque Céphalopode). DEA: Biologie et Productions Animales: Biologie Aquacole, Université de Rennes. pp 21.

Le Bihan, E., Perrin, A. and Koueta, N. (2004) Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309, 47-66.

Le Bihan, E., Perrin, A. and Koueta, N. (2006a) Influence of diet peptide content on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu- Life and Environment* 56, 139-145.

Le Bihan, E., Perrin, A. and Koueta, N. (2006b) Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food Chemistry* accepted.

Le Bihan, E., Zatylny, C., Perrin, A. and Koueta, N. (2006c) Post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* L. during storage at two different temperatures. *Food chemistry* 98, 39-51.

Le Goff, R. and Daguzan, J. (1991) Growth and life cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in south Brittany (France). *Bulletin of Marine Sciences* 49, 341-348.

Le Rouilly, M. (1980) Essai du Gabolysat sur la croissance de veaux de boucherie. Rapport de recherche ITEB-CERCV de Villers-Bocage. pp 20.

Lebel, J. M., Giard, W., Favrel, P. and Boucaud-Camou, E. (1996) Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *haliotis tuberculata*. *Biology & Cell* 86, 67-72.

Lemieux, H., Blier, P. and Dutil, J. D. (1999) Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 293-303.

Lenoir, F. (1989) Mise au point de techniques de dissociation, de purification et de cultures cellulaires chez la moule *Mytilus edulis* L. Application à l'étude des régulations du métabolisme du glucose et du glycogène. Thèse, Université de Caen. pp 168.

Likholat, E. A., Ananeva, T. V., Antoniuk, S. V. and Lutova, N. B. (2000) Proteolytic system in lungs upon inhalation exposure to low doses of lead salts. *Ukraine Biokhimisty* 72, 84-87.

Ling, E. and Yu, X. (2005) Prophenoloxydase binds to the surface of hemocytes and involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1356-1366.

Ling, E. and Yu, X. (2006) Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunoelectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 289-299.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry* 193, 265-275.
- Lundstedt, L., Melo, J. and Morales, G. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 137, 331-339.
- Lundstedt, L. M., Bibiano Melo, J. F. and Moraes, G. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* 137, 331-339.
- Luo, T., Yang, H., Zhang, X. and Xu, X. (2006) Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 607-617.

## M

- Mackie, I. M. (1982) Fish protein hydrolysates. *Processing in Biochemistry* 1, 26-31.
- MacRae, T. (2003) Molecular chaperones, stress resistance and development in *Artemia franciscana*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14, 251-258.
- Madar, I., Sildan, N., Pora, E. and Hernandez, L. (1979) *In vitro* effect of insulin on the glucose uptake by isolated mantle pieces of *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Review Roumanian Biology - Biology Animal* 24, 41-43.
- Magnadottir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J. and Dalmo, R. (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 429-439.
- Main, K. and Van Wyk, P. (2004) Shrimp manual. pp 208.
- Malham, S., Runham, N. and Secombest, C. (1998) Lysosyme and anti-protease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). *Developmental & Comparative Immunology* 22, 27-37.
- Mangold, K. (1983) Food feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of Museum of Victoria* 44, 81-93.
- Mangold, K. (1989) Organes génitaux. In 'Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes'. (Paris) pp 459-492.
- Mangold, K., Bidder, A. M. and Portmann, A. (1989) Organisation générale des céphalopodes. In 'Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes'. Paris pp 7-69.
- Mangold, K. M. and Boletzky, S. V. (1973) New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology* 19, 7-12.
- Marques, M. and Falkmer, S. (1976) Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance, and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod mollusk, *Strophocheilus oblongus*. *General and Applied Entomology* 29, 522-530.
- Marsh, J. and Weinstein, D. (1966) Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research* 7, 574-576.
- Martone, C., Perez Borla, O. and Sanchez, J. (2005) Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology* 96, 383-387.
- Matsumoto, J. J. (1980) Chemical deterioration of muscles proteins during frozen storage. In J. R. Whitaker, & M. Fujimaki (Eds.), Chemical deterioration of muscle proteins. In 'ACS Symposium Series 123, American Chemical Society'. Washington. pp. 95-124.

- Metailler, R., Mery, C., Depois, M. and Nedelec, J. (1977) Influence de divers aliment composés sur la croissance et la survie d'alevins de bar (*Dicentrarchus labrax*). 3rd Meeting of the I.C.E.S. group of mariculture, Brest, France 4, 93-109.
- Millamena, O. (2002) Replacement of fish meal by animal by-product meals in a practical diet for grow-out culture of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 204, 75-84.
- Montero, P., Gomez-Guillen, M. C. and Borderias, J. (1996) Influence of subspecies, season and stabilization procedures in gel-forming ability of frozen minced muscle of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Science and Technology International* 2, 111-122.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods* 65, 55-63.
- Moyano, F. J., Diaz, M., Alarcon, F. J. and Sarasquete, C. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 121-130.
- Mukundan, M., Antony, P. and Nair, M. (1986) A review on autolysis in fish. *Fisheries Research* 4, 259-269.
- Munoz, P., Caldach-Giner, J., Sitja-Bobadilla, A., Alavrez-Pellitero, P. and Perez-Sanchez, J. (1998) Modulation of the respiratory burst activity of mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish and Shellfish Immunology* 8, 25-36.
- Muzinic, L., Thompson, K., Morris, A., Webster, C., Rouse, D. and Manamaitis, L. (2004) Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and brewer's grains with yeast in practical diets for australian red cklaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 230, 359-376.

## N

- Naganuma, T., Degnan, B., Horikoshi, K. and Morse, D. (1994) Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone *Haliotis rufescens*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 131-140.
- Nardi, J., Pilas, B., Bee, C., Zhuang, S., Garsha, K. and Kanost, M. (2006) Neuroglial-positive plasmacytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 447-462.
- Nebel, C. (2005) L'adaptation du loup (bar) *Dicentrarchus labrax* à la salinité au cours de l'ontogénèse. Approche écophysiological, cellulaire et moléculaire. Thèse, Université de Montpellier II. pp 237.
- Nelson, L. and Sheridan, M. (2006) Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *General and Applied Endocrinology*, in press.
- Nilsen, I., Overbo, K., Sandsdalen, E., Santaker, E., Sletten, K. and Myrnes, B. (1999) Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysosyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Letters* 464, 153-158.
- Nilsson, K. and Ekstrand, B. (1993) The effect of storage on ice and various freezing treatments on enzyme leakage in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung-Forschung* 197, 3-7.
- Nolting, M., Ueberschar, B. and Rosenthal, H. (1999) Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. *Journal of Applied Ichthyology* 15, 138-142.

## O

- Oldsen, O., Nilsen, I., Sletten, K. and Myrnes, B. (2003) Multiple invertebrate lysosomes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 136, 107-115.
- Oliva-Telez, A., Cerqueira, A. and Goncalves, P. (1999) The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture* 179, 195-201.
- Ono, K. (1971) Lysosomal enzyme activation and proteolysis of bovine muscle. *Journal of Food Science* 41, 216-217.

## P

- Panserat, S. and Kaushik, S. (2002) Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique chez les poissons: exemple de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), faible utilisatrice des glucides alimentaires. *INRA Productions Animales* 15, 109-117.
- Penny, I. F. (1980) The enzymology of conditioning. (London.), pp 115-143.
- Peres, A., Zambonino Infante, J. L. and Cahu, C. (1998) Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 145-152.
- Perez, H. and Oliva-Telez, A. (1999) Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, 325-334.
- Perrin, A. (2004) Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Cephalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Thèse, Université de Caen. pp 152.
- Perrin, A., Le Bihan, E. and Koueta, N. (2004) Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311, 267-285.
- Peterson, B. and Small, B. (2004) Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology* 26, 231-240.
- Peterson, B., Small, B. and Bosworth, B. (2004) Effects of bovine growth hormone (Posilac<sup>®</sup>) on growth performance, body composition, and IGF-BPs in two strains of channel catfish. *Aquaculture* 232, 651-663.
- Petrynyi, G. (2002) The complexity of immune and alloimmune response. *Transplant Immunology* 10, 91-100.
- Philip, P. and Balas, D. (2002) Cours d'histologie générale. (Université de Nice Sophia-Antipolis: Nice), pp 37.
- Picot, L., Bordenave, S., et al. (2006) Antiproliférative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Processing in Biochemistry* 41, 1217-1222.
- Pihan, F. (2001) Caractérisation de Mollusques Gastéropodes terrestres en tant que bioindicateurs de la contamination polymétallique. Thèse, Université de Metz. pp 442.
- Pike, I., Andorsdottir, G. and Mundheim, H. (1990) The role of fish meal in diets for salmonids. *International Association of Fish meal manufacturers*, pp 24-35.
- Pillay, T. and Dill, W. (1979) Evaluation of squid mantle meal as a protein source in penaeid nutrition. *Advances in aquaculture*, 601-605.
- Pipe, R., Farley, S. and Coles, J. (1997) The separation and characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell & Tissue Research* 289, 537-545.
- Pirini, M., Gatta, P. P., Testi, S., Trigari, G. and Monetti, P. G. (2000) Effect of refrigerated storage on muscle lipid quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed on diets containing different levels of vitamin E. *Food Chemistry* 68, 289-293.

- Prescott, L., Harley, J. and Klein, D. (1996) Microbiologie. (De Boeck), pp 1137.
- Press, C. and Evensen, O. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology* 1-9.
- Privalov, P. L. (1990) Cold denaturation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25, 281-305.
- Purves, W., Savada, D., Orians, G. and Hellers, H. (2006). Life: The Science of Biology, 4th Edition, by Sinauer Associates. <http://www.sinauer.com/>.

## R

- Raa, J. and Gildberg, A. (1976) Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *Journal of Food Technology* 11, 619-628.
- Raa, J. and Gildberg, A. (1982) Fish silage: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 4, 383 - 419.
- Ravallec-Plé, R., Charlot, C., Pires, C., Braga, V., Batista, I., Van Wormhoudt, A., Le Gal, Y. and Fouchereau-Péron, M. (2001) The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1120-1125.
- Ravallec-Plé, R. and Van Wormhoudt, A. (2003) Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134, 669-679.
- Resch-Sedlmeier, G. and Sedlmeier, D. (1999) Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology* 123, 187-192.
- Reynaud, S. and Deschaux, P. (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology* 77, 229-238.
- Richard, A. (1971) Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (mollusque: céphalopode). Thèse, Université de Université de Lille 1. pp 264.
- Richard, G. (2001). Valorisation des co-produits issus de la transformation de la seiche. DESS Exploitation des Ressources Vivantes Côtières, Caen, pp 33.
- Robledo, Y. and Carajaville, M. P. (1996) Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells in vitro. *European Journal of Cell Biology* 72, 362-369.
- Rocha, F., Guerra, A. and Gonzalez, A. (2001) A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Review* 76, 291-304.
- Romano, N., Ceccariglia, S., Mastrolia, L. and Mazzini, M. (2002) Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae). *Tissue & Cell* 34, 63-72.
- Royer, J. (2002) Modélisation des stocks de céphalopodes de Manche. Thèse, Université de Caen. pp 242.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J. and Montero, P. (2002) The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (*Illex coindetii*). *Food Chemistry* 78, 149-156.

## S

- Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.

- Sakai, T., Satake, H. and Takena, M. (2006) Nutrient-induced alpha amylase and protease activity is regulated by crustacean cardioactive peptides (CCAP) in the cockroach midgut. *Peptides* in press.
- Saleuddin, A., Sevala, V., Sevala, V., Mukai, S. and Khan, H. (1992) Involvement of mammalian and insulin-like peptides in shell growth and shell regeneration in molluscs. *Hard tissue mineralization and dimerization*, 149-169.
- Samain, J. F. (1985) Amylase and trypsin activities during *Artemia* development on artificial axenic media; effect of starvation and specific deletions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 86, 255-270.
- Santandreu, I. and Diaz, N. (1994) Effect of 17-alpha-methyltestosterone on growth and nitrogen excretion in masu salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort). *Aquaculture* 124, 321-333.
- Sato, M., Funakoshi, I., Hayashi, K. and Yamashina, I. (1982) Isolation and characterization of four forms of kallikrein from hog pancreas autolysate. *Journal Biochemistry* 92, 1337-1345.
- Scapigliati, G., Scalia, D., Marras, A., Meloni, S. and Mazzini, M. (1999) Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation. *Aquaculture* 174, 207-212.
- Scapigliati, G., Romano, N., et al. (2002) The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 151-160.
- Serpentini, A. (2001) Etude du collagène des hémocytes d'un mollusque nacrier, *Haliotis tuberculata*: dosage et caractérisation. Mise en relation avec le processus de biominéralisation. Thèse, Université de Caen. pp 176.
- Sidermann, C., J. (2000) Ocean pollution and Shellfish diseases. (Sinderman Edt., Marine science series: New york), pp 63-77.
- Silvestre, M. P. C. (1997) Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 60, 263-271.
- Smith, G. (1999) Introduction to the reviews on peptides and the control of food intake and the body weight. *Neuropeptides* 33, 323-328.
- Sokal, R. and Rohlf, F. (1981) Biometry. (Freeman, W.H.: San Francisco), pp 859.
- Sorgeloos, P. (2006). Life history of the brine shrimp *Artemia*. University of Ghent. [www.aquaculture.ugent.be/coursmat/artbiol/arc.htm](http://www.aquaculture.ugent.be/coursmat/artbiol/arc.htm).
- Staats, N., De Winder, B., Stal, L. J. and Mur, L. R. (1999) Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology* 34, 161-169.
- Stevens, E. and Devlin, G. (2000) Intestinal morphology in growth hormone transgenic Pacific coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* W. *Journal of Fish Biology* 56, 191-195.
- Stevens, E., Wagner, G. and Sutterlin, A. (1999) Gut morphology in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 55, 517-526.
- Stewart-Tull, D., Bleakley, C. and Galloway, T. (2004) Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens. *Vaccine* 22, 3026-3034.
- Stone, F., Hardy, R., Shearer, K. and Scott, T. (1989) Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 76, 109-118.
- Sykes, A., Domingues, P., Correia, M. and Andrade, P. (2006) Cuttlefish culture - State of the art and future trends. *Vie et Milieu- Life and Environment* 56, 129-137.
- Szlaminska, M., Escaffre, A., Charlon, N. and Bergeot, P. (1991) Preliminary data on semisynthetic diets for Goldfish (*Carassius auratus* L.) larvae. In 'Fish Nutrition in Practice, Les Colloques INRA'. Paris. pp. 607-612.

## T

- Tatterson, I. N. (1982) Fish silage- Preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology* 7, 153-159.
- Tatterson, I. N. and Windsor, M. L. (1974) Fish silage. *Journal of Science Food Agricultural* 25, 369-379.
- Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1995) The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocopetence of rainbow trout. *Aquaculture* 133, 91-102.
- Tonheim, S., Espe, M., Hamre, K. and Ronnestad, I. (2005) Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321, 19-34.
- Tovar-Ramirez, D. (2002) Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Thèse, Université de Mexico. pp 184.
- Tovar-Ramirez, D., Zambonino Infante, J. L., Cahu, C., Gatesoupe, F. J. and Vazquez-Juarez, R. (2004) Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234, 415-427.
- Tovar, D., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vazquez-Juarez, R. and Lésel, R. (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113-123.
- Tsunematsu, H., Nishimura, H., Mizusaki, K. and Makisumi, S. (1985) Kinetics of hydrolysis of amide and anilide substrates of p-guanidino-l-phenylalanine by bovine and porcine trypsins. *Journal of Biochemistry* 97, 617-623.
- Turker, A., Yigit, M., Ergun, S., Karaali, B. and Erteken, A. (2005) Potential of poultry by-product meal as a substitute for fishmeal in diets for black sea turbot *Scophthalmus maeoticus*: growth and nutrient utilization in winter. *The Israeli Journal of Aquaculture* 57, 49-61.

## V

- Van Wormhoudt, A. and Sellos, D. (1980) Aspects biochimiques de la croissance: acides nucléiques et enzymes digestives chez *Palaemon serratus* (Crustacea Natantia). *Oceanologica Acta* 3, 97-105.
- Vasquez, J., Gonzalez, M. and Murado, M. (2004) A new marine medium. Use of different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 385-392.
- Vasta, G., Ahmaed, H. and Odom, E. (2004) Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, prochordates and ectothermic vertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 617-630.
- Versaw, W. K., Cuppett, S. L., Winters, D. D. and Williams, L. E. (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in non-fat dry milk. *Journal of Food Science* 54, 1557-1558.
- Viana, M. T., Lopez, L. M., Garcia-Esquivel, Z. and Mendez, E. (1996) The use of silage made from fish and abalone viscera as an ingredient in abalone feed. *Aquaculture* 140, 87-98.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J. and Lopez, M. C. (1993) Effect of infection by the protistan parasite *Martelia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (N. W. Spain). *Disease Aquatic Organisms* 17, 205-213.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J. and Azedo, C. (1993) Marteliiasis affecting cultured mussel *M. galloprovincialis* of Galicia (N.W. Spain) Etiology, phases of infection, temporal and spatial variability in prevalence. *Disease Aquatic Organism* 16, 61-72.



- Villamil, L., Figueras, A. and Novoa, B. (2003) Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14, 157-169.
- Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J. and Boucaud-Camou, E. (2002) Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia nauplii* and compound diets. *Aquaculture* 205, 269-286.
- Villeneuve, L. (2005) Influence nutritionnelle de la vitamine A et de la nature des lipides sur la morphogénèse de la larve de bar (*Dicentrarchus labrax*): implication de la voie des rétinoides. Thèse, Université de Rennes. pp 266.
- Vizcarra-Magana, L., Avila, E. and Sotelo, A. (1999) Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in boilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1915-1922.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. and Garland, C. D. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128, 219-240.

## W

- Walford, J. and Lam, T. J. (1993) Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187-205.
- Whiting, R. C., Montgomery, M. W. and Anglemier, A. F. (1975) Stability of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) muscle lysosomes and their relationship to *rigor mortis*. *Journal of food Science* 40, 854-857.
- Williams, K., Smith, D., Barclay, M., Tabrett, S. and Riding, G. (2005) Evidence of a growth factor in some crustacean-based feed ingredients in diets for the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 250, 377-390.

## X

- Xue, Q., Schey, K., Volety, A., Chu, F. and La Peyre, J. (2004) Purification and characterisation of lysosome from the plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 11-25.

## Z

- Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. (1994) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109, 209-212.
- Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. (1999) High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 129, 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130, 477-487.
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Peres, A. (1997) Partial substitution of Di- and Tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 127, 608-614.
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Peres, A., Quazuguel, P. and Le Gall, M. M. (1996) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129-138.







---

### Résumé

En Basse-Normandie, la pêche de la seiche *Sepia officinalis* représente une part majeure de la pêche. Ces animaux sont principalement exportés sous forme pelée, eviscérée et congelée vers les pays méditerranéens et le Japon. Il existe donc une quantité importante de co-produits issu de la transformation des céphalopodes. L'étude enzymologique et biochimique des co-produits a démontré un fort potentiel de valorisation des viscères par la technique de l'ensilage. Les ensilages développés au sein du laboratoire (LBBMA4 et LBBMA25) ont d'abord été testés *in vitro* en tant que milieu de culture pour micro-organismes. Il s'avère que l'ensilage LBBMA25 permet une cinétique de croissance et l'obtention de biomasse équivalente à ce qui est obtenue avec des peptones commerciales. De plus, l'utilisation des ensilages en tant que compléments alimentaires pour post-larves de crustacés ou juvéniles de mollusques et de poissons, montre un très fort potentiel. Ainsi, leur utilisation permet une nette amélioration des paramètres zootechniques, associée à une stimulation de l'ontogénèse. La recherche de molécules bio-actives dans les ensilages, montre la présence de molécules à caractère facteur de croissance, régulateur de la digestion et immuno-modulateur. L'ensemble de ces données permet d'envisager de nombreuses applications aux ensilages de co-produits de la seiche.

---

### **Valorisation of waste from cephalopods transformation factories: applications to the cuttlefish *Sepia officinalis***

---

#### Summary

The cuttlefish *Sepia officinalis*, is one of the main species capted in the Basse-Normandie fisheries. These animals are principally exportated in eviscerated and frozen form to mediteranean countries and to Japan. Then, high quantities of co-products are available from factories transformation of cephalopods. Enzymological and biochemical studies on co-products demonstrated an elevated potential in the valorisation of viscera by silage technical. Two silages are developed in our laboratory: LBBMA4 and LBBMA25. Primarily, they are studed *in vitro* as substrate for the culture of micro-organisms. This study established that silage LBBMA25 permits to obtain good growth cinetic and biomass, with comparable results to commercial peptone. Secondary, silages can be used as dietary complement. In this way, using silage LBBMA4 or LBBMA25 at low level in diet of post-larvae crustacean or juvenile mollusca and fish allowed to increase zootechnical parameters and to stimulate ontogenesis. Research on bioactive molecules in silage shows the presence of growth factors-like, digestion regulator and immunostimulator molecules. All data obtained during this study, demonstrated that our cuttlefish silage from co-products possess numerous applications.

---

**Mots clés :** Aquaculture, Caractérisation molécules bioactives, Céphalopodes, Co-produits, Ensilages, Micro-organismes, Mollusque, *Sepia officinalis*, Valorisation

**Discipline :** Sciences Agronomiques, Biotechnologies Alimentaires

---

*Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen*