

N° d'ordre : 3717

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par **Mlle Catherine-Inès KOLDITZ**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**DÉTERMINISME NUTRITIONNEL ET GÉNÉTIQUE DE LA TENEUR EN LIPIDES
MUSCULAIRES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*) :
ÉTUDE PAR ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES CANDIDATS, DU PROTÉOME ET
DU TRANSCRIPTOME DU FOIE ET DU MUSCLE**

Soutenu le : 9 Décembre 2008

Après avis de :

MM. HOCQUETTE Jean-François, Directeur de Recherches, INRA **Rapporteurs**
GONDRET Florence, Chargée de Recherches (HDR), INRA

Devant la commission d'examen formée de :

MM. HIGUERET Paul, Professeur, Université BORDEAUX 1 **Président**
NN. HOCQUETTE Jean-François, Directeur de Recherches, INRA **Examineurs**
GONDRET Florence, Chargée de Recherches (HDR), INRA
MEDALE Françoise, Directeur de Recherches, INRA
LEFEVRE Florence, Chargée de Recherches, INRA
DAMON Marie, Chargée de Recherche, INRA

Membre invité

FAUCONNEAU Benoit, Directeur de Recherches, INRA

Remerciements

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont bénéficié du soutien financier de L'institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et du conseil régional d'Aquitaine.

Je tiens à remercier très sincèrement Jean-François Hocquette, Florence Gondret, Marie Damon ainsi que Benoit Fauconneau, qui ont accepté de juger ce travail. Ils ont également contribué, par leurs remarques et suggestions, à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante. Je tiens à remercier le Professeur Paul Higuieret pour avoir accepté de présider le jury.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je souhaite remercier mon directeur de thèse, Françoise Médale, pour la formation scientifique de qualité qu'elle m'a donnée. Je voudrais aussi la remercier pour le temps et la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années, et surtout d'avoir cru en mes capacités.

J'aimerais également témoigner de ma gratitude envers Florence Lefèvre, co-directrice de ma thèse, pour sa contribution à mes travaux de doctorat.

Je remercie très sincèrement Stéphane Panserat pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions avec enthousiasme et bienveillance.

Un merci tout particulier à Gilles Paboeuf qui m'a tout enseigné sur l'art de l'électrophorèse bi-dimensionnelle, avec beaucoup de patience et de gentillesse. Merci également à Jérôme Montfort, Aurélie Le Cam et Philippe Bardou pour leur assistance technique précieuse lors des analyses du transcriptome.

Vous avez tous été très généreux de votre temps et je vous en suis très reconnaissante.

.

Mes travaux de thèse ont fait l'objet de trois articles et j'aimerais exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont permis d'aboutir à ces résultats : Maïena Borthaire, Christiane Vachot, Edwige Quillet, Elisabet Plagnes-Juan, Magali San Cristobal et bien évidemment Florence Lefèvre et Françoise Médale. Merci aussi à ceux qui, par leurs suggestions et commentaires lors de la relecture de mes

manuscrits, m'ont permis d'en améliorer le contenu. Je pense notamment à Sachhi Kaushik, Stéphane Panserat et Geneviève Corraze.

Je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui m'ont permise d'évoluer dans un environnement scientifique dynamique au sein des deux unités, NuAGE et SCRIBE, et que je n'ai pas citées précédemment:

- Au sein de l'unité NuAGE de Saint-Pée sur Nivelle : Inge Geurden, Iban Seiliez, Sandrine Skiba, Stéphanie Fontagné, Peyo Aguirre, Fred Vallée, Janine Brèque...*
- Au sein de l'unité SCRIBE de Rennes : Jérôme Bugeon, Jean-Charles Gabillard, Pierre-Yves Rescan, Hélène Rime, Nathalie Sabin...*
- Les étudiants des deux unités: Nadège Richard, Marine Lansard, Morgan Raguenes, Emilie Lataillade, Daniel Baron...*

Je remercie également tous les membres du personnel de la Station d'Hydrobiologie de Saint Pée-sur-Nivelle pour leur accueil chaleureux et notamment Marie-Christine Artola, Elisabeth Azcarraga, Marie-Josée Elissalde, Philippe Laborde, Pantxo Ostiz et Maité Jorajuria pour leur soutien et leur sympathie.

Je souhaite aussi remercier mes collègues et à présent amis : Jacques, Jean-Christophe, Vincent, François, Thomas... ainsi que mes amis et non-collègues : Collette, Marie-Laure, Estelle, Jeanne...

Merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment.

Mais surtout, je ne serais jamais parvenue à cette étape majeure de mon cheminement personnel et professionnel, le dépôt de ma thèse de doctorat, sans le soutien de ma famille et de mes proches. Je tiens à remercier de tout coeur mes parents, ainsi que Vincent, pour avoir supporté tout au long des ces années avec beaucoup de patience et de compréhension, mes doutes, mes épanchements et mes accès d'enthousiasme pour des sujets pas toujours évidents à saisir pour qui ne travaille pas dans le monde si particulier qu'est la recherche. A vous ; mille mercis; et encore pardon.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS DANS DES REVUES À COMITÉ DE LECTURE

- **Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., and Médale, F.**, 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1154-R1164
- **Kolditz, C., Paboeuf, G., Borthaire, M., Piumi, F., Esquerré, D., San Cristobal, M., Lefèvre, F., and Médale, F.**, 2008. Transcriptome and proteome analyses of the changes induced by dietary energy and selection for high or low muscle fat content in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* **9**,506
- **Panserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerré, D., Médale F., Corraze, G., and Kaushik, S.**, 2008. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fish meal or fish oil free diets. *Br. J. Nutr.* **100**, 953–967.
- **Panserat, S., Ducasse-Cabanot, S., Plagnes-Juan, E., Srivastava, P.P., Kolditz, C., Piumi, F., Esquerré, D., and Kaushik, S.**, 2008. Dietary fat level modifies the expression of hepatic genes in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by microarray analysis. *Aquaculture* **275**, 235-241.

COMMUNICATIONS ORALES

- Dans le cadre de congrès internationaux

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Quillet, E., and Medale, F., 2006.** Metabolic pathways involved in nutritional and genetic determination of fat deposition in body compartments of rainbow trout : gene candidates and liver proteome analysis. XII International Symposium on Fish Nutrition & Feeding, Biarritz, France, 28 Mai - 1 Juin 2006.

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Borthaire, M., Paboeuf, G., and Médale, F., 2007.** Transcriptome and proteome analysis of changes induced in trout liver by suppression of dietary fish oil. FASEB J. Experimental Biology 2007 Annual Meeting. Washington, USA, 28 Avril – 5 Mai 2007.

- **Kolditz, C., Borthaire, M.J., Lefèvre, F., Quillet, E., and Medale, F., 2007.** Changes in liver metabolic pathways induced by dietary energy and selection for muscle fat content in rainbow trout. In "Energy and protein metabolism and nutrition" 2. International Symposium on Energy and protein metabolism and nutrition ISEP 2007. Vichy, France, 9 - 13 Septembre 2007.

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Borthaire, M., and Médale, F., 2007.** Transcriptome and proteome analysis of changes induced in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver by suppression of dietary fish oil. In "EAS Aquaculture Europe 2007 meeting Competing claims" European aquaculture society (BEL) Aquaculture Europe 07. Istanbul, Turquie, 24 – 27 Octobre 2007.

- Dans le cadre de réunions de groupe de travail

- **Kolditz, C., 2005.** Etude du déterminisme nutritionnel et génétique de la localisation des dépôts lipidiques chez la truite arc-en-ciel par analyse des variations du transcriptome et du protéome. Groupe qualité poisson du 10 octobre 2005 et Fish-AGENAE du 21 octobre 2005

- **Kolditz, C., 2006.** Etude du déterminisme génétique et nutritionnel de l'adiposité chez la truite arc-en-ciel: Analyse du protéome hépatique. Fish-AGENAE du 15 mai 2006

- **Kolditz, C., 2007.** Déterminisme nutritionnel et génétique de la localisation des dépôts de lipides chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*): étude par analyse de gènes candidats, du protéome et du transcriptome. Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, France, 5 avril 2007

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

-Dans le cadre de congrès internationaux

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Borthaire, M., Paboeuf, G., and Médale, F., 2007** Transcriptome and proteome analysis of changes induced in trout liver by suppression of dietary fish oil. FASEB J. Experimental Biology 2007 Annual Meeting. Washington, USA, 28 Avril – 5 Mai 2007.

- **Kolditz, C., Quillet, E., Richard, N., Labbé, L., Corraze, G., Médale, F., 2006.** Response of rainbow trout selected for high or low muscle lipid content to different dietary energy supply. 9th International Symposium for Genetics in Aquaculture, Montpellier, France, 25-30 Juin 2006.

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Paboeuf, G., Quillet, E., Guitton, N., and Médale, F., 2006.** Nutritional and genetic determinism of fat storage allocation in body compartments of rainbow trout: liver proteome analysis. Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Saint-Malo, France, 16-18 Octobre 2006.

- **Kolditz, C., and Médale, F., 2008.** Changes in white muscle transcriptome induced by dietary energy levels in two strains of rainbow trout selected for muscle fat content. XIII International Symposium on Fish Nutrition & Feeding, Florianopolis, Brazil, 1-5 Juin 2008.

-Dans le cadre de congrès nationaux

- **Kolditz, C., Lefèvre, F., Quillet, E., Médale, F., 2006.** Recherche des gènes impliqués dans le déterminisme génétique et nutritionnel de l'adiposité chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Rencontres de l'Ichtyologie en France, Paris, Mars 2006.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC : Acétyl-CoA carboxylase
ACO : Acyl-CoA oxydase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AG : Acide gras
AGMI : Acides gras monoinsaturés
AGNE : Acides gras libres non estérifiés
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AGLPI : Acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS : Acide gras synthase
AGsat : Acides gras saturés
Apo : Apolipoprotéine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BM : Biomasse
ChREBP : Carbohydrate-responsive element-binding protein
CoA : Coenzyme A
COX : Cytochrome oxydase
CPT1 : Carnitine palmitoyltransferase 1
CS : Citrate synthase
DHA : Acide docosahexaénoïque (22:6 n-3)
dNTP : Désoxyribonucléotides tri-phosphates
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique
EF1 α : Elongation factor 1 α
EM : Enzyme malique
EPA : Acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3)
EST : Expressed Sequence Tag
FDR : False discovery rate (taux de faux positifs)
G6P : Glucose-6-phosphate
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GK : Glucokinase
HDL : High density lipoprotein
HK : Hexokinase
HOAD : Hydroxyacyl-CoA deshydrogénase
ICDH : Isocitrate deshydrognase
IDL : Intermediate density lipoprotein
IEF : Isoelectric focusing (focalisation iso-électrique)
IHS : Indice hépato-somatique
IVS : Indice viscéro-somatique
kDa : kilo Dalton
kJ : kilo joules
LDL : Low density lipoprotein
LPL : Lipoprotéine lipase

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight
MS: Matière sèche
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PCR : Polymerase chain reaction
Pi : Pyrophosphate
pI : point iso-électrique
PK : Pyruvate kinase
PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor
RNase : Ribonucléase
RT-PCR : Reverse transcription-PCR
SAM : Significance analysis of microarray
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis
SREBP : Sterol regulatory element binding protein
SSC : Salt Sodium Citrate
VLDL : Very low density lipoprotein

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
Figure I-1: Structure des principales catégories d'acides gras.....	4
Figure I-2: Voie de biosynthèse des acides gras poly-insaturés à longue chaîne.....	6
Figure I-3: Température de fusion des principaux acides gras.....	6
Figure I-4: Structure générale du muscle chez les poissons.....	12
Figure I-5: Principales sources d'acétyl-CoA dans la cellule.....	28
Figure I-6 : Origine et devenir des acides aminés dans l'organisme.....	28
Figure I-7 : Réaction biochimique du catabolisme des acides aminés.....	30
Figure I-8 : Voie biochimique de la glycolyse anaérobie.....	32
Figure I-9 : Voie biochimique de la lipogénèse.....	34
Figure I-10 : Structure générale d'une lipoprotéine et devenir métabolique de ses composants	38
Figure I-11 : Aspect en microscopie électronique et caractéristiques des principales lipoprotéines plasmatiques.....	38
Figure I-12 : Vue d'ensemble du métabolisme plasmatique des lipoprotéines.....	40
Figure I-13 : Mécanismes de transport des acides gras plasmatiques à travers l'endothélium des capillaires et les membranes plasmatique des cellules	44
Figure I-14 : Système de transport des acyl-CoA à travers des membranes interne et externe de la mitochondrie....	48
Figure I-15 : Réaction de β -oxydation mitochondriale des acides gras (Hélice de Lynen).....	48
Figure I-16 : Réaction de β -oxydation des acides gras dans les péroxysomes	50
Figure I-17 : Activation de PPAR (α , β ou γ) par liaison au ligand et hétérodimerisation avec RXR	52
Figure I-18 : Cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs).....	54
Figure I-19 : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	56
Figure II-1 : Procédure de sélection basée sur l'estimation de la teneur en lipides du muscle.....	76
Figure II-2 : Exemple de courbe de fusion obtenue après RT-PCR en temps réel.....	88
Figure II-3 : Exemple de Gamme étalon obtenue après RT-PCR en temps réel.....	88
Figure II-4 : Différences et complémentarité des approches classiques (« candidats ») et post-génomiques.....	92
Figure II-5 : Plan de dépôt des membranes nylon micro-réseaux AGENAE – truite.....	96
Figure II-6 : Principe du protocole d'hybridation en deux étapes des micro-réseaux.....	96
Figure II-7 : Exemple de table de Delta, généré par le logiciel SAM d'après la structure des données	106
Figure II-8 : Représentation graphique de la structure des données générée par le logiciel SAM.....	106
Figure II-9 : Bandelettes IPG drystrips à gradient de pH 3-10 non linéaire, 24cm.....	110
Figure II-10 : Représentation des spots en trois dimension par le logiciel ImageMaster™ 2D Platinum	118
Figure II-11 : Analyse qualitative des données : illustration des différents cas de figure de détection des spots.....	120
Figure III-1 : Composition corporelle des truites des deux lignées à l'issue des 6 mois d'alimentation.....	130
Figure III-2 : Concentrations en métabolites plasmatiques.....	140

Figure III-3 : Expression de PPAR dans le foie.....	142
Figure III-4 : Expression de PPAR dans le muscle blanc	142
Figure III-5 : Activité spécifique (UI/mg de protéines) de la LPL au niveau du tissu adipeux péri-viscéral	146
Figure III-6: Représentation graphique de l'homogénéité d'hybridation entre membranes (dot plot).....	152
Figure III-7: Répartition des signaux log-transformés pour chaque hybridation (box plot).....	152
Figure III-8: Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'ANOVA ($p < 0,01$).....	154
Figure III-9: Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de la procédure de Benjamini-Hochberg ($\alpha = 0,05$).....	158
Figure III-10: Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'analyse SAM	160
Figure III-11 : Position des protéines identifiées sur le gel 2D	170
Figure III-12 : Représentation graphique de l'homogénéité d'hybridation entre membranes (dot plot).....	182
Figure III-13: Répartition des signaux log-transformés pour chaque hybridation (box plot).....	182
Figure III-14: transcriptome musculaire : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'ANOVA ($\alpha = 0,01$).....	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Pages
Tableau I-1 : Réponse à la sélection des truites arc-en-ciel après deux générations de sélection divergente sur la base de l'indice d'adiposité musculaire (d'après Quillet <i>et al.</i> , 2005).....	24
Tableau I-2: Réponse à la sélection et à la teneur en lipides du régime des truites ar-cen-ciel après deux générations de sélection (d'après Quillet et al., 2007).....	24
Tableau II-1: Composition analytique des régimes expérimentaux LE (Low energy) et HE (High Energy).....	78
Tableau III-1: Paramètres de croissance et utilisation des aliments expérimentaux LE et HE par les truites des lignées L et F à l'issue des 6 mois d'alimentation.....	132
Tableau III-2: Analyse du transcriptome hépatique : nombre de gènes sélectionnés et de faux positifs potentiels en fonction du test statistique et les ajustements utilisés.....	154
Tableau III-4 : Nombre de spots spécifiquement présent ou absent dans chaque condition expérimentales.....	164
Tableau III-5 : Rendement en identification en fonction du type de coloration utilisée pour la révélation des protéines sur les gels 2D.....	164
Tableau III-6 : Effet du contenu énergétique alimentaire sur l'expression des gènes et des protéines dans le foie des truites des 2 lignées.....	168
Tableau II-7 : Effet de la sélection divergente pour la teneur en lipides du muscle sur l'expression des gènes et des protéines dans le foie des truites.....	174
Tableau III-8: Analyse du transcriptome musculaire : nombre de gènes sélectionnés et de faux positifs potentiels en fonction du test statistique et les ajustements utilisés.....	184

Sommaire

	Pages
Introduction.....	1
Chapitre I - Revue bibliographique.....	3
I-1 Les lipides.....	5
I-1.1 Structure et fonction des lipides.....	5
I-1.2 Particularités des lipides chez les poissons.....	8
I-1.3 Les lipides dans l'alimentation des poissons d'élevage.....	9
I-2 Les dépôts lipidiques	11
I-2.1 Sites de stockage des lipides chez les poissons.....	11
I-2.2 Le tissu adipeux périviscéral et le muscle comme sites de stockage des lipides: <i>impacts sur la qualité du produit</i>	11
I-2.2.1 <u>Le tissu adipeux péri-viscéral</u>	11
I-2.2.2 <u>Le muscle</u>	13
I-3 Facteurs de variation de la teneur et de la répartition des lipides corporels.....	19
I-3.1 La température.....	19
I-3.2 L'âge/ la croissance.....	20
I-3.3 La maturation sexuelle.....	20
I-3.4 L'alimentation.....	21
I-3.5 Le patrimoine génétique/ la sélection.....	23
I-4 Voies métaboliques impliquées dans la constitution des dépôts lipidiques.....	27
I-4.1 les lipides alimentaires.....	27
I-4.2 Les lipides endogènes.....	29
I-4.2.1 La lipogénèse.....	29
I-4.2.2 Elongation et désaturation des acides gras.....	36
I-4.2.3 Esterification des acides gras.....	37
I-4.2.4 le foie : site principal de la lipogénèse chez les poissons.....	37
I-4.3 Transport plasmatique des lipides et captage par les différents tissus	39
I-4.3.1 Les différentes classes de lipoprotéines.....	39
I-4.3.2 Métabolisme plasmatique des lipoprotéines.....	41
I-4.3.3 Captage des lipides par les tissus extra-hépatiques.....	42
I-4.4 Oxydation et utilisation des lipides à des fins énergétiques.....	46
I-4.4.1 Les tissus utilisateurs.....	46
I-4.4.2 La β -oxydation des acides gras : des acides gras aux acétyls-CoA.....	46
I-4.4.3 Le cycle des acide tricarboxyliques (cycle de Krebs).....	55

I-4.4.4 la chaîne respiratoire mitochondriale.....	57
I-5 Effet des lipides alimentaires sur les voies métaboliques.....	58
I-5.1 Effet des lipides alimentaires sur la lipogénèse.....	58
I-5.2 Effets des lipides alimentaires sur la concentration en lipides plasmatiques.....	60
I-5.3 Effets des lipides alimentaires sur le captage des AG par les tissus périphériques.....	61
I-5.4 Effet des lipides alimentaires sur la β -oxydation des acides gras	62
I-6 Influence de la sélection génétique sur les voies métaboliques	66
Chapitre II- Matériel et méthodes	73
II-1 Matériel biologique	77
II-1.1 Lignées de truites arc-en-ciel	77
II-1.2 Régimes alimentaires	79
II-1.3 Modalités d'alimentation	79
II-1.4 Prélèvement des échantillons	80
II-2 Paramètres zootecniques	81
II-3 Analyses de composition corporelle des poissons et de la composition des aliments	82
II-4 Mesures des activités enzymatiques.....	85
II-5 Analyse de l'expression différentielle des gènes par qRT-PCR.....	86
II-6 Analyses à haut débit de l'expression des gènes et des protéines.....	91
II-7 Analyse différentielle du transcriptome sur membranes nylon.....	97
II-8 Analyse différentielle du protéome hépatique par électrophorèse bidimensionnelle.....	108
Chapitre III- Résultats	125
III-1 Effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur la teneur en lipides musculaires: évaluation des différences métaboliques par approche "candidats" (Publication n°1).....	128
III-2 Effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel: étude du profile d'expression des gènes et des protéines hépatiques (publication n°2)	151
III-3 Effets de la teneur en lipides de l'aliment et de la sélection génétique chez la truite arc-en-ciel: étude du transcriptome musculaire (Publication n°3)	181
Chapitre IV- Discussion générale	193
IV-1 L'intérêt et les limites du protocole expérimental	197
IV-1.1 Les aliments LE et HE.....	197
IV-1.2 Temps de prélèvement	198
IV-2 Effet de l'apport énergétique alimentaire	199
IV-2.1 Sur les performances de croissances	199
IV-2.2 Sur la composition corporelle des poissons	199
IV-2.3 Sur la concentration en métabolites plasmatiques	200
IV-2.4 Sur le métabolisme hépatique.....	200

<i>IV-2.5 Sur le métabolisme musculaire</i>	205
IV-3 Effet de la sélection génétique basée sur l'indice d'adiposité musculaire	209
<i>IV-3.1 Effet de la sélection génétique sur les performances de croissance</i>	209
<i>IV-3.2 Effet de la sélection génétique sur la composition corporelle des truites</i>	209
<i>IV-3.3 Effet de la sélection génétique sur la concentration en lipides plasmatiques</i>	210
<i>IV-3.4 Effet de la sélection sur le métabolisme hépatique</i>	211
<i>IV-3.5 Effet de la sélection sur le métabolisme musculaire</i>	213
IV-4 Effets combinés du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique	215
IV-5 Intérêts et limites des approches utilisées	217
<i>IV-5.1 Intérêt et limites de l'approche «candidat»</i>	217
<i>IV-5.2 Intérêts et limites de l'approche transcriptomique</i>	217
<i>IV-5.3 Intérêts et limites de l'analyse du protéome</i>	218
Chapitre V- Conclusions	221
Chapitre VI- Références bibliographiques.....	225
Annexes	263

Introduction

La composition particulière de la chair du poisson, sa richesse en protéines hautement digestibles, en minéraux (notamment en phosphore et en iode), en vitamines (en particulier la vitamine D) et en acides gras poly-insaturés de la série n-3, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docohexaénoïque (DHA), en fait un aliment aux caractéristiques nutritionnelles uniques parmi les produits d'origine animale.

La consommation mondiale de poisson par habitant a augmenté au cours des quatre dernières décennies, passant de 9 kg par an et par personne en 1961 à 16,5 kg en 2003 (FAO 2006). Les pêches de capture et l'aquaculture ont produit en 2004 environ 106 millions de tonnes de poissons destinés à l'alimentation. Actuellement, près de 50% des poissons (et la presque totalité des saumons et des truites) consommés dans le monde proviennent de l'élevage (FAO, 2006). La pisciculture constitue le secteur de production vivrière à plus forte croissance au monde (avec un taux moyen de 8,8% par an depuis 1970).

Les produits de pisciculture prennent par conséquent une place de plus en plus importante dans l'alimentation humaine. Cependant, les poissons issus de l'élevage souffrent parfois d'une image négative en comparaison des produits de la pêche, et sont souvent jugés plus gras et de qualité moindre que leurs homologues sauvages par les consommateurs. Pourtant, outre la fiabilité des approvisionnements, la traçabilité et la fraîcheur, l'un des atouts de l'élevage piscicole est la possibilité de contrôler et de moduler la composition et la qualité de la chair des poissons.

Parmi les différents composants tissulaires, les lipides font partie des déterminants majeurs de la qualité globale des poissons. Leur teneur, leur composition et leur répartition dans les différents compartiments corporels du poisson, sont autant de paramètres qui affectent la qualité finale du produit. Ainsi, la quantité et la composition des lipides influent sur les qualités organoleptiques (odeur, couleur, flaveur, texture) et nutritionnelles de la chair, tandis que la répartition des dépôts de lipides dans les différentes parties du poisson revêt un aspect économique important: un stockage conséquent de lipides au niveau péri-viscéral constitue une perte de rendement pour le producteur lors de l'éviscération.

La possibilité de moduler la teneur en lipides des filets et de maîtriser la répartition des dépôts lipidiques entre parties consommables (le muscle) et non-consommables (essentiellement les viscères pour les salmonidés) constitue par conséquent un enjeu majeur pour la filière piscicole.

La teneur et la répartition des lipides dans les différents compartiments corporels du poisson sont des caractères complexes et dont le déterminisme est multifactoriel. L'alimentation et la sélection génétique constituent les deux leviers majeurs utilisés pour moduler la teneur en lipides des animaux d'élevage.

Mon projet de thèse a pour objectif d'identifier des transcrits et des protéines qui jouent un rôle important dans l'engraissement musculaire chez la truite arc-en-ciel, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Afin d'obtenir des animaux présentant une large gamme de variation en termes de quantité et de localisation des dépôts lipidiques, nous avons combiné l'effet de la sélection génétique et de l'alimentation. Nous avons utilisé comme modèle deux lignées expérimentales de truites arc-en-ciel sélectionnées par l'INRA sur la base de leur teneur en lipides musculaires et analysé leur réponse à une alimentation pauvre ou riche en lipides. Nous avons procédé à une analyse différentielle de l'expression des gènes et des protéines en alliant approches « enzymes candidates » et approches globales à l'échelle du transcriptome et du protéome chez les alevins des deux lignées après 6 mois d'alimentation. Ces analyses ont porté sur le muscle blanc, cible de la sélection génétique, et le foie, carrefour métabolique et site de la lipogenèse chez les poissons.

Chapitre I

- Revue bibliographique –

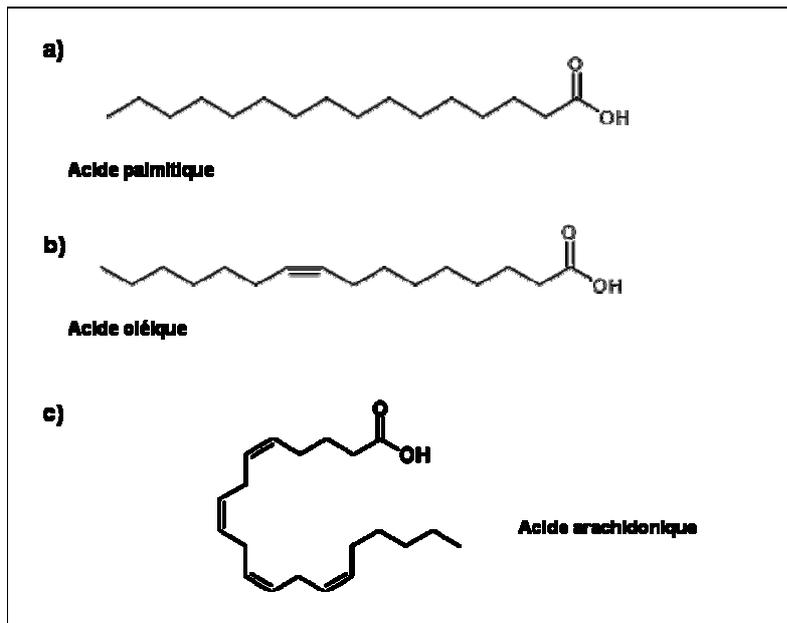


Figure I-1 : Structure des principales catégories d'acides gras. Exemple d'acide gras saturé : l'acide palmitique (a). Exemple d'acide gras mono-insaturé : l'acide oléique (b). Exemple d'acide gras poly-insaturé : l'acide arachidonique (c)

I-1 Les lipides

I-1.1 Structure et fonction des lipides

Parmi les macronutriments, les lipides constituent la forme de stockage d'énergie la plus efficace, puisqu'ils contiennent 39,5kJ par gramme, contre 23,7 kJ et 17,2 kJ par gramme pour les protéines et les glucides, respectivement. Outre leur valeur énergétique élevée, les lipides participent aux structures cellulaires et servent de vecteurs des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) et des pigments liposolubles comme les caroténoïdes (Sargent *et al.*, 1989). Il est maintenant démontré que les lipides jouent aussi un rôle actif dans la régulation de nombreux processus métaboliques et inflammatoires.

I-1.1.1 Les acides gras

Les acides gras sont les constituants de base des lipides. Ils sont caractérisés par la longueur de leur chaîne, c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbones qui la compose, et leur degré d'insaturation. Les acides gras sont dits "à chaîne courte" lorsque le nombre d'atomes de carbone est ≤ 6 , et "à chaîne longue" lorsque le nombre de carbones est ≥ 12 . Si la plupart des acides gras à longue chaîne peuvent être synthétisés *de novo* par l'organisme, certains doivent être impérativement apportés par l'alimentation : ce sont les acides gras dits essentiels. En fonction du nombre de doubles liaisons contenues dans la chaîne hydrocarbonée, on distingue (Figure I-1):

1) les acides gras saturés (AGSat), caractérisés par l'absence de doubles liaisons (Figure I-1a). Chez la plupart des animaux, l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18 :0) sont les acides gras saturés les plus abondants.

2) les acides gras mono-insaturés (AGMI), qui comportent une seule double liaison (Figure I-1b).

3) les acides gras poly-insaturés (AGPI), caractérisés par la présence de deux doubles liaisons ou plus (Figure I-1c).

La position de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle de la chaîne hydrocarbonée définit la famille à laquelle appartient l'acide gras insaturé. Dans la nature, on trouve essentiellement des acides gras insaturés des familles n-3 (double liaison entre le 3^{ème} et le 4^{ème} atome de carbone), n-6, ainsi que des acides gras des familles n-7 et n-9.

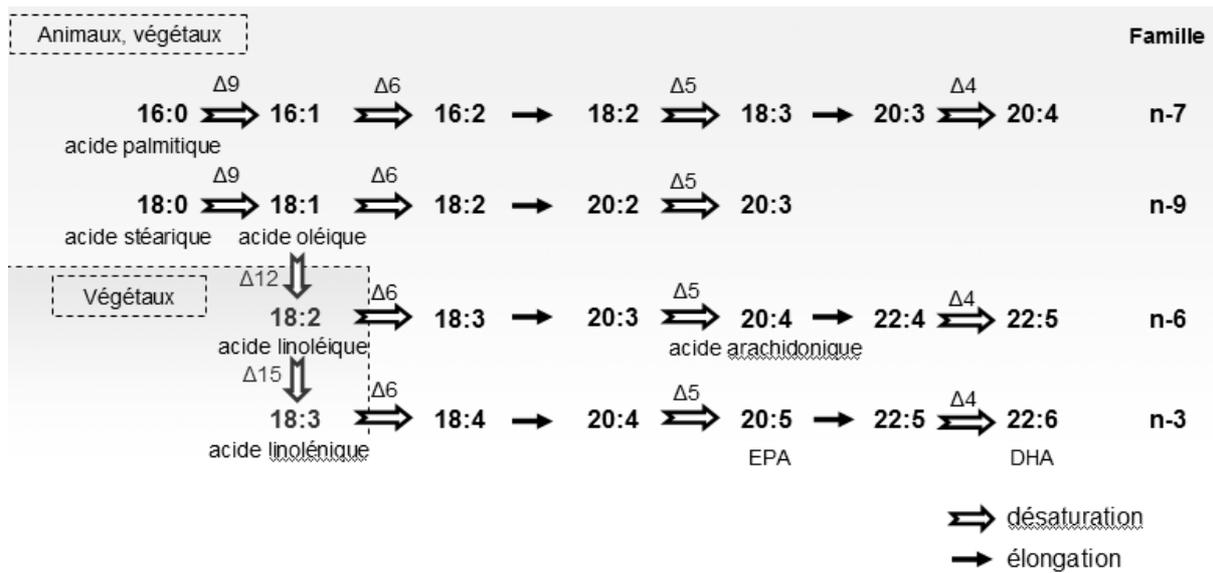


Figure I-2: Voie de biosynthèse des acides gras poly-insaturés à longue chaîne

Les réactions de désaturation catalysées par les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ -désaturases, présentes uniquement chez les végétaux, ainsi que les produits qui en sont directement issus (acides linoléique et linoléique) sont figurés en rouge. EPA: acide eicosapentaénoïque; DHA: acide docosahexaénoïque.

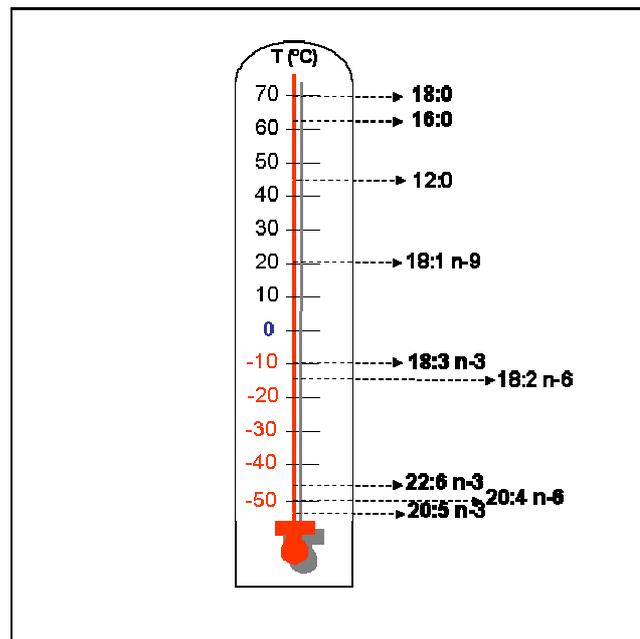


Figure I-3: Température de fusion des principaux acides gras

La désaturation des acides gras, catalysée par des désaturases, se fait au niveau du réticulum endoplasmique des cellules. Les désaturases présentent une grande spécificité de site (par exemple, la $\Delta 5$ -désaturase ne peut introduire de doubles liaisons qu'entre les carbones 5 et 6 d'un acide gras), mais une faible spécificité de substrat. Certaines désaturases sont communes aux animaux et aux végétaux ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ -désaturases), tandis que d'autres sont spécifiques du monde végétal ($\Delta 12$ et $\Delta 15$ -désaturases). Ces deux dernières désaturases sont à l'origine d'acides gras essentiels, qui ne peuvent être synthétisés par les cellules animales. Il s'agit de l'acide α -linoléique (18 :2 n-6), dont sont issus tous les acides gras de la série n-6, et l'acide α -linoléique (18 :3 n-3), précurseur des acides gras de la série n-3. Les voies de biosynthèse des AGPI sont résumées dans la figure I-2.

Certains acides gras polyinsaturés essentiels des familles n-3 et n-6, le 20 :4 n-6, le 20 :3 n-6, l'EPA et le DHA, jouent un rôle important dans la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, leukotriènes et thromboxanes), qui agissent sur le système nerveux, la reproduction, l'osmorégulation ainsi que sur l'excrétion rénale et branchiale (Henderson *et al.*, 1985; Bell *et al.*, 1986).

Plusieurs études ont établi que les AGPI d'origine alimentaire pouvaient réguler l'expression de nombreux gènes (Jump et Clarke, 1999, Sampath et Ntambi, 2005). Les AGPI n-6 et n-3 inhibent de façon similaire la transcription de plusieurs gènes hépatiques lipogéniques et glycolytiques tandis que, au contraire, les acides gras saturés et mono-insaturés sont plutôt inefficaces sur les niveaux d'expression génique (Desvergne et Walhi, 1999). Les AGPIs répriment la synthèse d'acides gras, diminuent l'activité d'enzymes estérifiant les acides gras et augmentent leurs oxydations mitochondriale et péroxysomale dans le foie.

I-1.1.2. Les triglycérides

Les triglycérides sont composés d'une molécule de glycérol dont les trois fonctions alcool sont estérifiées par trois acides gras semblables ou différents. Ils constituent la classe la plus importante de lipides neutres. Les triglycérides représentent de 95 à 98 % de l'apport en lipides alimentaires. Chez les mammifères comme chez les poissons, les triglycérides sont les principaux lipides de stockage. Totalement apolaires, ils s'accumulent dans les vacuoles de cellules spécialisées, les adipocytes, ou sous forme d'inclusion (gouttelettes) dans le cytoplasme.

I-1.1.3 Les phospholipides

Les phospholipides sont des esters de glycérol dont deux fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras, et la troisième par un acide phosphorique lui-même associé à un sucre

(inositol) ou à une amine (choline, éthanolamine, sérine). En raison de leur polarité, les phospholipides jouent un rôle majeur de constituants des interfaces membranaires, de transporteurs d'acides gras et d'émulsifiant. Le degré d'insaturation des acides gras détermine leur température de fusion : plus celui-ci est élevé, plus leur température de fusion sera basse (Figure I-3). C'est par cette propriété que la nature des acides gras constitutifs des phospholipides participe à l'état de fluidité des membranes.

I-1.1.4. Les stérols

Les stérols sont des molécules complexes comportant une fonction alcool. Les stérols peuvent exister sous la forme non estérifiée, composants essentiels des membranes cellulaires, ou sous la forme de lipide neutre estérifié à un acide gras, constituant un mode de stockage de l'énergie. Le plus abondant est le cholestérol. La synthèse endogène de cholestérol, effectuée essentiellement par les cellules de l'intestin et du foie, suffit à couvrir les besoins de l'organisme. Le cholestérol est le précurseur de la synthèse de la vitamine D et des différentes hormones stéroïdes, incluant les oestrogènes, la testostérone, le cortisol ou la cortisone.

I-1.2 Particularités des lipides chez les poissons

Par rapport aux animaux terrestres, les lipides des poissons sont caractérisés par une proportion importante d'acides gras poly-insaturés à longue chaîne (AGLPI) de la série n-3. Ceci s'explique en partie par les contraintes d'ordre physico-chimique auxquelles sont exposés les poissons dans leur environnement. En effet, les poissons sont des vertébrés poïkilothermes, leur température corporelle est identique à celle du milieu ambiant. Il est donc primordial pour les poissons de pouvoir incorporer aux structures membranaires de leurs cellules des acides gras présentant un degré d'insaturation suffisant pour supporter les variations de température du milieu.

Ceux-ci leurs sont apportés par l'alimentation. Dans leur milieu naturel, les poissons marins à la base de la chaîne trophique les trouvent dans le phytoplancton dont ils se nourrissent, et qui présente une forte concentration en AGLPI n-3 (Sargent *et al.*, 1989). Eux-mêmes serviront de source d'AGLPI n-3 aux poissons de niveau trophique plus élevé, la composition des lipides corporels, phospholipides comme triglycérides, reflétant celle des lipides ingérés (Reinitz, 1983 ; Watanabe, 1982 ; Henderson et Tocher, 1987). L'alimentation naturelle des poissons d'eau douce, en revanche, est plus riche en acide linoléique et linoléinique (Tocher, 2003). Ces derniers doivent donc pouvoir convertir ces acides gras en C18 en EPA et DHA

pour préserver la fluidité de leurs membranes. Par conséquent, et contrairement à bon nombre d'espèces marines, la plupart des poissons d'eau douce présentent une bonne capacité à allonger et désaturer leurs acides gras C18 en acides gras à plus longue chaîne (Sargent *et al.*, 1999).

I-1.3 Les lipides dans l'alimentation des poissons d'élevage

Dans le milieu naturel, l'alimentation des poissons est particulièrement riche en lipides et en protéines, mais pauvre, voire quasiment dépourvue de glucides. De nombreuses espèces de poissons, en particulier les espèces "carnivores" comme la truite arc-en-ciel, ont une faible capacité à digérer les glucides complexes tel que l'amidon à l'état natif (Hemre *et al.*, 1990; Wilson, 1994). Même si de nombreux tissus ont des capacités glycolytiques, tels que le cerveau, le cœur ou les reins, les protéines et les lipides sont rapidement et efficacement métabolisés pour subvenir aux besoins énergétiques (Cowey et Walton, 1989). Les glucides représentent donc une source énergétique mineure pour les poissons, excepté pour le muscle blanc, lors de périodes de nage intense (Richards *et al.*, 2002).

En revanche, les poissons ont un besoin en protéines alimentaires élevé par rapport aux autres animaux. Les acides aminés d'origine alimentaire ou endogène participent à la synthèse de protéines et de nombreux autres composés azotés tels que les nucléotides, les amines, mais aussi à la synthèse de lipides. D'autre part, les poissons présentent une aptitude remarquable à utiliser les protéines alimentaires comme source d'énergie (Van den Thillart, 1986; Dabrowski et Guderley, 2002). L'oxydation des substances azotées peut couvrir de 40 à 85% des besoins énergétiques du poisson (Van Waarde, 1983). Cependant, plusieurs études ont montré qu'une augmentation de la teneur en lipides de l'aliment permettait une meilleure utilisation des protéines pour la croissance, les lipides servant alors de substrat énergétique préférentiel (Takeuchi *et al.*, 1978; Hillestad et Johnsen, 1994). C'est la notion d'épargne protéique par les lipides, qui, en plus d'améliorer les performances de croissance, permet une réduction des rejets azotés, par limitation de l'oxydation des acides aminés (Kaushik et Oliva-Teles, 1985; Kaushik, 1997; Cho et Bureau, 2001; Hemre *et al.*, 2002; Dabrowski et Guderley, 2002).

Chez les poissons, la digestibilité des lipides est bien souvent supérieure à 92%, et ce, quelle que soit leur origine (animale ou végétale). A noter toutefois que la nature des acides gras composant les lipides influe sur leur digestibilité, celle-ci augmentant avec leur degré d'insaturation (Takeuchi *et al.*, 1979; Sigurgisladottir *et al.*, 1992; Johnsen *et al.*, 2000). Pourtant, toutes les espèces n'ont pas la même capacité à utiliser les lipides et épargner les

protéines. De fortes teneurs en lipides alimentaires peuvent entraîner une diminution de la digestibilité des lipides, comme cela a été observé chez le cabillaud (Lie *et al.*, 1988), le poisson chat (Andrews *et al.*, 1978) ou l'esturgeon (Médale *et al.*, 1991). Chez le turbot, une teneur en lipides supérieure à 10% dans l'aliment entraîne un ralentissement du taux de croissance (Regost *et al.* 2001). Néanmoins, certaines espèces tolèrent de fortes teneurs en lipides alimentaires (jusqu'à 30% de la masse sèche de l'aliment), comme la truite arc-en-ciel, le saumon Atlantique ou encore le flétan (Aksnes *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 2000; Tortensen *et al.*, 2001).

Au cours de ces 25 dernières années, la composition des aliments piscicoles commerciaux a progressivement évolué avec une diminution de la teneur en protéines associée à une augmentation de l'apport lipidique, apport souvent supérieur à 25% de l'aliment chez le saumon (Hemre et Sandnes, 1999) et pouvant atteindre près de 40% de l'aliment (Einen et Roem, 1997; Torstensen *et al.*, 2001). Or, s'ils permettent une amélioration des performances de croissance, ces aliments à haute teneur énergétique conduisent également un accroissement des dépôts lipidiques (Cowey et Sargent, 1979; Watanabe, 1982; Corraze et kaushik, 1999). Un développement excessif de ces dépôts peut avoir des répercussions négatives sur la qualité des produits piscicoles.

I-2 Les dépôts lipidiques

I-2.1 Sites de stockage des lipides chez les poissons

Chez les poissons, comme chez les mammifères, les lipides non utilisés pour la fourniture d'énergie sont stockés sous forme de lipides neutres (triglycérides essentiellement). A la différence des mammifères, qui stockent les lipides principalement dans un tissu bien spécifique, le tissu adipeux, localisé dans les différents compartiments corporels (cavités thoracique, abdominale, au niveau sous-cutané et au sein de muscles), les poissons sont capables de stocker les graisses en différents sites dont les principaux sont les tissus adipeux péri-viscéral et sous-cutané, le foie et le muscle (Sheridan, 1988). L'importance relative de ces sites de stockage varie selon les espèces. Le foie représente le site préférentiel de stockage des lipides chez les espèces marines de fond comme le bar (*Dicentrarchus labrax*) ou la morue (*Gadus morhua*) (Jobling *et al.*, 1991; Dos Santos *et al.*, 1993; Nanton *et al.*, 2001), alors que chez les espèces marines pélagiques comme le maquereau (*Scomber scombus*), le hareng (*Clupea harengus*) ou la sardine (*Sardina pilchardus*), les lipides sont préférentiellement déposés au niveau du tissu musculaire. Chez les salmonidés, comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ou le saumon Atlantique (*Salmo salar*), les sites préférentiels de stockage des lipides de réserve sont le tissu adipeux périviscéral et, dans une moindre mesure, le muscle et les tissus adipeux sous-cutanés (Takeuchi *et al.*, 1978 ; Corraze et Kaushik, 1999).

I-2.2 Le tissu adipeux péri-viscéral et le muscle comme sites de stockage des lipides : impacts sur la qualité du produit

I-2.2.1 Le tissu adipeux péri-viscéral

Le tissu adipeux entourant le tractus digestif des poissons est considéré comme un site de stockage des graisses à long terme. Il contient plus de 90% de son poids en lipides (Sheridan, 1988). Le tissu adipeux est un tissu hétérogène constitué principalement d'adipocytes et d'un stroma vasculaire dans lequel se trouvent des cellules précurseurs d'adipocytes (préadipocytes), des cellules endothéliales, des cellules conjonctives et des macrophages (Vernon, 1986).

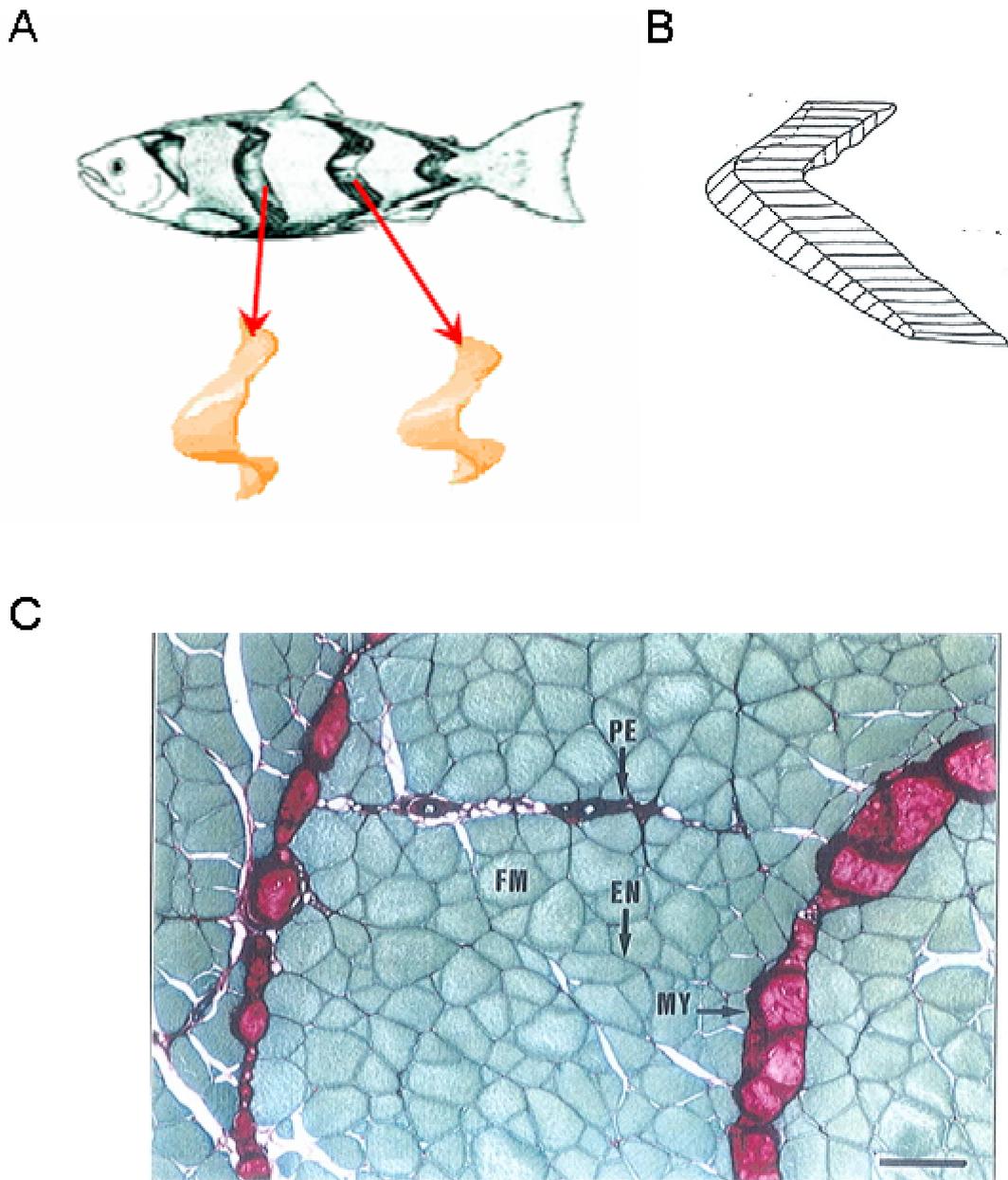


Figure I-4: Structure générale du muscle chez les poissons. A: forme des myomères chez les poissons (d'après Van Leeuwen, 1999); B: Myomère: les fibres musculaires sont parallèles entre elles et perpendiculaires aux myoseptes. C: coupe transversale de muscle de truite: en vert, les fibres musculaires (FM), en rose les structures conjonctives: myosepte (MY), périmysium (PE), endomysium (EN); Coloration de Rojkind ; Barre=100µm (image J. Bugeon)

Chez les mammifères, il est généralement admis que le nombre d'adipocytes au sein d'un tissu adipeux donné est déterminé de façon précoce au cours de la période foetale et post-natale, puis plus tardivement au moment de la puberté (Hirsch et Han, 1969; Salans *et al.*, 1971; Robelin, 1981; Reyne *et al.*, 1985). L'accroissement du tissu adipeux à l'âge adulte se ferait donc principalement par accroissement de la taille des cellules existantes (hypertrophie), le nombre d'adipocytes étant supposé constant. Certaines études (Faust *et al.*, 1978; Faust et Miller, 1981) ont montré qu'il pouvait également exister un recrutement de nouvelles cellules (hyperplasie) en réponse à des régimes riches en lipides ou en glucides, mais ce phénomène semble néanmoins limité chez les mammifères.

Chez les poissons, en revanche, on distingue dans le tissu adipeux péri-viscéral différentes populations de cellules sphériques dont le diamètre varie de 5 à plus de 200 μm , la majorité mesurant entre 20 et 60 μm (Zhou *et al.*, 1996). La présence en grand nombre d'adipocytes de petite taille est caractéristique d'un développement hyperplasique du tissu adipeux. Chez les poissons, le volume du tissu adipeux augmente aussi bien par hypertrophie de cellules déjà existantes que par hyperplasie, et ce, tout au long de la vie de l'animal (Fauconneau *et al.*, 1997; Gelineau *et al.*, 2001).

☞ Chez les salmonidés, le tissu adipeux périviscéral constitue le site principal de stockage des réserves lipidiques, et l'ensemble tractus digestif - tissu adipeux périviscéral peut représenter de 7 à 22% du poids vif. Un développement excessif des dépôts lipidiques péri-viscéraux diminue le rendement en carcasse et constitue de ce fait une perte préjudiciable pour le producteur et le transformateur.

I-2.2.2 Le muscle

I-2.2.2.1 Localisation et rôle des lipides dans la fonction musculaire

Le muscle représente la principale masse corporelle (45 à 65% du poids vif), et constitue l'essentiel de la partie consommable du poisson (filets). La masse musculaire est répartie le long de l'axe vertébral selon une structure métamérique particulière aux vertébrés inférieurs, avec alternance de feuillet musculaires, ou myomères, en forme de "W" (Figure I-4A), séparés par des cloisons de tissus conjonctifs, ou myoseptes.

Les feuillet musculaires sont rattachés aux myoseptes par des jonctions tendineuses. Le tissu conjonctif intramusculaire forme un réseau de soutien dans lequel on distingue trois niveaux de structures conjonctives (Figure I-4C). La première structure est le myosepte, qui

correspond à l'épimysium des animaux terrestres. Localisé entre les myomères, il traverse la masse musculaire de façon continue depuis l'axe vertébral jusqu'à la peau (Bremner et Hallett, 1985). Au sein de chaque myomère, une seconde structure, le pérимysium, sépare les groupes de fibres. Enfin, autour de chaque fibre, on observe une troisième structure, l'endomysium. Le tissu conjonctif est traversé par des capillaires sanguins; il assure la vascularisation des tissus et c'est à son niveau que se font les échanges entre le tissu musculaire et le système vasculaire, par diffusion des différents métabolites, comme les acides gras libres (Zhou *et al.*, 1996).

La masse musculaire squelettique du poisson se compose essentiellement de deux types de muscles qui se distinguent par des propriétés contractiles et métaboliques spécifiques: le muscle rouge, superficiel, et le muscle blanc, qui représente l'essentiel de la musculature du poisson (Johnston, 1981).

1) Le muscle rouge

Le muscle rouge (encore appelé noir ou brun chez les espèces marines) est constitué de fibres à contraction lente et à métabolisme de type oxydatif (fibres de type I). Le muscle rouge est fortement vascularisé ; il est surtout sollicité lors de la nage à faible vitesse (Beamish, 1978). Il est généralement présent sous la forme d'une fine couche localisée sous la peau et est plus abondant le long de la ligne latérale où il forme une bande qui s'invagine en forme de V dans le muscle profond. Il est également plus abondant dans la zone caudale, fortement sollicitée lors de la nage à faible régime. Sa proportion dans la chair varie en fonction de l'activité de nage de l'espèce considérée (de 1,5 à 28% de la masse musculaire) (Bone, 1978).

Les lipides du muscle rouge sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques localisées au sein même des fibres musculaires, mais aussi au sein d'adipocytes localisés au niveau de l'endomysium conjonctif (Zhou *et al.*, 1996). Cette abondance de lipides au sein ou à proximité étroite des fibres permet un approvisionnement immédiat et continu des fibres en lipides, dont l'oxydation dans les nombreuses mitochondries localisées à proximité des gouttelettes lipidiques constitue la source majeure d'énergie utilisée pour la contraction des fibres lors de la nage d'endurance et de faible intensité.

2) Le muscle blanc

Chez les salmonidés, il est situé en profondeur de part et d'autre de l'axe vertébral. Il est séparé du muscle rouge par une trame conjonctive. Le muscle blanc est le plus important quantitativement puisqu'il peut constituer jusqu'à 90% de la masse musculaire squelettique (et

plus de 50% de la masse corporelle totale). Il se compose de fibres à contraction rapide et à métabolisme anaérobie de type glycolytique. Il est sollicité lors d'une activité de nage intense et de courte durée (Beamish, 1978; Rome *et al.*, 1988).

Les lipides du muscle blanc sont stockés dans des adipocytes dispersés entre les fibres musculaires, au sein des myoseptes et, de façon moins importante, au niveau du perimysium, voire de l'endomysium (Sheridan, 1994; Zhou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Ces adipocytes sont de façon générale, de petite taille, la majorité mesurant entre 10 et 30 μm de diamètre (Zhou *et al.*, 1996).

Contrairement au muscle rouge, on n'observe quasiment pas de gouttelettes lipidiques au sein des fibres du muscle blanc (Zhou *et al.*, 1996). En revanche, on y observe des granules de glycogène, qui seraient la source principale d'énergie mobilisée lors de la sollicitation brève et intense du muscle blanc, après déplétion des réserves intracellulaires d'ATP et de phosphocréatine (Dobson et Hochachka, 1987; Wood, 1991; Milligan, 1996). L'oxydation des lipides provenant des adipocytes du tissu conjonctif permettrait la restauration des réserves d'ATP, de phosphocréatine et de glycogène des fibres musculaires lors de la phase de récupération (Wang *et al.*, 1994, Richards *et al.*, 2002).

Les lipides de réserve ne sont pas stockés de façon uniforme dans la musculature. Chez de nombreuses espèces, des gradients de dépôts lipidiques existent au sein du muscle blanc. Chez les salmonidés par exemple, on observe un double gradient lipidique décroissant selon l'axe antéro-postérieur d'une part, et ventro-dorsal d'autre part (Katikou *et al.*, 2001). Ainsi, les teneurs en lipides les plus élevées sont observées au niveau ventral, en avant des nageoires pelviennes.

La teneur en phospholipides intramusculaires est relativement stable. La variabilité de la teneur en lipides musculaires résulte donc essentiellement de variations de la teneur en triglycérides (Ando *et al.*, 1993).

La capacité du tissu musculaire à stocker les lipides varie d'une espèce à l'autre et cette propriété est communément utilisée comme critère de classification des poissons (Henderson et Tocher, 1987; Ackman 1995). Ainsi, on distingue:

- les poissons maigres, avec une teneur en lipides musculaires inférieure à 1%, qui stockent majoritairement les lipides dans le tissu hépatique (allant jusqu'à 75% du poids du foie). Les poissons marins de fond comme la sole (*Solea solea*), l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*) ou le cabillaud (*Gadus morhua*) sont considérées comme des espèces typiquement maigres.

- les poissons gras, avec des teneurs en lipides musculaires supérieures à 15%. On y retrouve les espèces pélagiques comme le hareng (*Clupea harengus*), le maquereau (*Scomber japonicus*) ou le sprat (*Sprattus sprattus*), mais aussi l'anguille (*Anguilla anguilla*), espèce catadrome.

- les poissons dits "intermédiaires", qui déposent les lipides dans le muscle et dans d'autres sites tels que le tissu adipeux péri-viscéral, comme c'est le cas pour les salmonidés (Henderson et Tocher, 1987; Sheridan, 1994; Ackman, 1995)

I-2.2.1.2 Les lipides musculaires et la qualité de la chair

La qualité de la chair se définit comme l'ensemble des caractéristiques morphologiques, histologiques, biochimiques et rhéologiques qui définissent les propriétés organoleptiques (texture, flaveur, couleur) et nutritionnelles du produit perçues par le consommateur. La qualité des poissons d'élevage recouvre à la fois les qualités nutritionnelles et organoleptiques de la chair, ainsi que l'aptitude à la transformation (notamment les notions de rendements à l'éviscération, au filetage, à la cuisson ou au fumage des filets).

1) Qualités nutritionnelles

Les qualités nutritionnelles ou diététiques sont principalement liées à la composition de la chair. Les lipides de la chair de poisson constituent une source naturellement importante en AGPI n-3, les fameux "oméga 3", qui sont des acides gras essentiels pour l'homme. De nombreuses études ont démontré que les AGPI n-3 exerçaient un effet bénéfique pour la santé humaine, en contribuant notamment à diminuer le risque de maladies cardio-vasculaires grâce à leur effet hypolipémiant et hypocholestérolémiant (Kelly, 1991; Hooper *et al.*, 2001; Mori et Beilin, 2001). Il est donc important pour la santé publique de préserver cette particularité, tant sur un plan quantitatif que qualitatif.

2) Qualités organoleptiques

La quantité et la nature des lipides de la chair conditionnent la flaveur du produit, notamment l'intensité du goût et de l'odeur (Lindsay, 1990; Josephson, 1991). Les AGPI de la chair sont très sensibles aux phénomènes d'oxydations enzymatiques initiés par des lipoxygénases, et de peroxydation (oxydation chimique des lipides). Cette oxydation des AGPI favorise le développement d'une saveur rance. Les composés volatiles dérivant de l'oxydation enzymatique ou chimique des AGPI influent fortement sur l'odeur de la chair, en lui donnant des composantes *végétales* ou *métalliques* plus ou moins prononcées en fonction de leur

nature. La quantité et la nature des lipides déposés dans la chair déterminent aussi la couleur des filets, en influant sur la quantité et la localisation des pigments, composés liposolubles, qui vont venir se fixer dans les fibres musculaires (Choubert et Storebakken, 1989).

La texture comprend à la fois la perception de paramètres de fermeté et de jutosité. La texture de la chair des poissons dépend principalement des caractéristiques des protéines structurales qui la composent (protéines myofibrillaires, collagène) et de leur organisation au sein du muscle (taille des fibres musculaires, densité du réseau de tissu conjonctif) (Johnston 1999). Néanmoins, la quantité de lipides du tissu musculaire peut affecter les qualités texturales du produit. Si l'engraissement confère à la chair une plus grande tendreté et favorise sa jutosité, l'accumulation excessive de lipides au niveau musculaire peut entraîner un défaut de texture des filets, lié à une mauvaise tenue de la chair au niveau des myoseptes, qui peut constituer un motif de rejet de la part du consommateur (impression de chair molle, gouttelettes lipidiques à la surface des produits emballés sous film plastique) ou du transformateur.

Il est difficile de définir des critères universels pour les qualités organoleptiques du poisson, ces critères étant différents en fonction des appréciations culturelles, culinaires ou gastronomiques régionales.

3) Qualités technologiques

Les qualités technologiques regroupent les critères d'aptitude à la transformation, à la conservation et de rendement à la découpe. Un développement excessif du tissu adipeux sous cutané favorise les pertes au parage et au filetage. De même, pour les produits destinés au fumage, même si une certaine teneur en lipides de la chair est nécessaire, car ils limitent les pertes au salage et favorisent la fixation des composés aromatique de fumée, de trop forts taux induisent des pertes au cours du traitement qui peuvent aller jusqu'à 25 % du poids du filet frais.

☞ Il n'existe pas, pour le poisson, de teneur en lipides « idéale » de la chair, puisque la valeur optimale requise varie en fonction des marchés internationaux et du processus de transformation que va subir le produit.

La possibilité de moduler la teneur en lipides des filets en fonction de la destination du produit, tout en contrôlant la répartition des dépôts lipidiques entre parties consommables (filets) et non consommables du poisson constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour la filière piscicole.

I-3 Facteurs de variation de la teneur et de la répartition des lipides corporels chez les poissons

Outre les différences interspécifiques évoquées précédemment, la teneur et la répartition des lipides dans les différents compartiments corporels du poisson varient en fonction de facteurs environnementaux, comme la température et la salinité du milieu ambiant, et de facteurs physiologiques, comme l'âge, la maturation sexuelle, le contexte nutritionnel ou le patrimoine génétique de l'animal.

I-3.1 La température

Les poissons étant poïkilothermes, leur température corporelle est intimement liée à celle du milieu environnant. La température de l'eau constitue donc un facteur de variation important pour de nombreux processus physiologiques, cellulaires et biochimiques. La température est notamment un régulateur majeur des besoins énergétiques et de l'utilisation métabolique des nutriments (Médale *et al.*, 1991), ainsi que du taux de remplissage et du temps de vidange gastrique (Brett 1979 ; Kaushik, 1986). De façon générale, l'absorption des nutriments est plus lente chez les poissons que chez les mammifères, en raison de leur température corporelle plus basse (Kapoor *et al.*, 1975).

Il est cependant nécessaire de rappeler que chaque espèce ne peut survivre qu'au sein d'une plage de températures définie. La plage des températures optimales pour la croissance est encore plus étroite (autour de 16°C pour la truite). Au-delà, la température ralentit la croissance et peut devenir un facteur de stress. Dans la gamme de température dite optimale, où la croissance peut s'exprimer, l'élévation de la température augmente la prise alimentaire parallèlement au métabolisme basal (Brett et Groves, 1979; Elliott, 1982). Par ailleurs, les concentrations d'hormones comme la thyroxine et l'hormone de croissance (GH), connues pour favoriser la prise alimentaire (Le Bail et Bœuf, 1997), sont augmentées par la température (Gabillard *et al.*, 2003), induisant, en plus d'une augmentation du métabolisme général, une amélioration du coefficient de conversion alimentaire (Donaldson *et al.*, 1979). Ainsi, une élévation de la température s'accompagne d'un accroissement de la teneur en lipides corporels chez la truite arc-en-ciel, résultant essentiellement d'une augmentation de la quantité d'aliment ingéré (Brauge *et al.*, 1995b).

La température de l'eau est également susceptible d'affecter la composition en lipides du poisson: une augmentation de la teneur en AGPI et une diminution de la teneur en AGSat sont observées lorsque la température diminue (Greene et Selivonchick, 1987), ce qui permet aux poissons de préserver la fluidité des structures membranaires.

☞ Moduler la teneur en lipides des filets par le biais de la température de l'eau dans les bassins d'élevage est donc possible, mais reste cependant limité étant donné la gamme étroite de température favorable à la croissance des poissons, premier critère d'intérêt pour les producteurs.

I-3.2 L'âge/ la taille/ la croissance

Les poissons se distinguent des autres vertébrés par une croissance prolongée tout au long de leur vie dans des conditions environnementales, physiologiques et alimentaires favorables (Greer-Walker, 1970; Stickland, 1983; Weatherley et Gill, 1987). De façon générale, la teneur en lipides corporels tend à augmenter avec la taille du poisson (Denton et Yousef, 1976; Reinitz, 1983; Rasmussen et Ostefeld, 2000). Cette augmentation de la teneur lipidique s'accompagne généralement d'une diminution de la teneur en eau, alors que la teneur en protéines reste relativement stable en fonction du poids (Henderson et Tocher, 1987; Shearer, 1994; Jobling *et al.*, 1998). Cette augmentation des lipides corporels avec la taille du poisson semble affecter de façon prépondérante les sites de dépôt préférentiels de l'espèce considérée. Ainsi, chez les salmonidés, le tissu adipeux péri-viscéral se développerait plus intensément avec la croissance que les autres sites de dépôt des lipides, dont le muscle (Weatherley et Gill, 1983, Lie *et al.*, 1988

I-3.3 La maturation sexuelle

Le développement des gonades au moment de la maturation sexuelle entraîne une mobilisation des lipides corporels chez les poissons. Chez les salmonidés, la teneur en lipides peut diminuer de 40 à 60% dans le muscle, et de plus de 70% au niveau du tissu adipeux péri-viscéral (Aksnes *et al.*, 1986; Nassour et Léger, 1989). Cette mobilisation des lipides corporels est plus marquée chez la femelle que chez le mâle, les besoins énergétiques liés au développement des ovaires et des ovocytes étant plus élevés (Henderson et Tocher, 1987). Les sites de stockage affectés par cette mobilisation diffèrent en fonction du stade de

développement des gonades : au niveau du tissu adipeux péri-viscéral, la mobilisation des lipides s'étend du début du développement des gonades jusqu'à l'ovulation, tandis qu'au niveau musculaire, elle débute plus tardivement, au cours de la phase de développement des gonades, mais se prolonge jusqu'à 1 mois environ après l'ovulation. Les lipides ainsi mobilisés sont essentiellement des triglycérides (Nassour et Léger, 1989).

☞ *Cette mobilisation tissulaire importante des lipides, notamment au niveau musculaire, peut entraîner une perte de rendement en filets, mais aussi une altération des qualités organoleptiques du produit, et donc une diminution de son acceptabilité et de sa valeur marchande.*

En élevage, cette mobilisation des réserves énergétiques tissulaires au profit des œufs est évitée en stérilisant les femelles par triploïdisation (par choc thermique ou hyperbare) à un stade très précoce, juste après la fécondation.

I-3.4 L'alimentation

De nombreuses études ont montré que la composition corporelle du poisson pouvait être modifiée par l'alimentation, notamment par la composition du régime alimentaire et son contenu énergétique (Shearer *et al.*, 1997; Jobling *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2000; Médale *et al.*, 2003). Bien que ce soit la teneur en énergie digestible de l'aliment qui conditionne les dépôts lipidiques, il existe une relation étroite entre teneur en lipides de l'aliment et teneur en lipides corporels (Cowey, 1993; Kaushik, 1997).

Ainsi, chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) nourrie avec des régimes isoprotéiques, mais de teneurs en lipides différentes (allant de 5% à 20% de lipides), on observe un accroissement important des dépôts lipidiques péri-viscéraux, un accroissement modéré de la teneur en lipides du muscle, mais pas de variation significative de la teneur en lipides du foie (Takeuchi *et al.*, 1978; Corraze et Kaushik, 1999). Des résultats similaires ont été rapportés chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*) (Hillestad et Johnsen, 1994; Hillestad *et al.*, 1998). Chez les poissons marins, comme le bar (*Dicentrarchus labrax*) ou la morue (*Gadus morhua*), ce sont surtout les lipides du foie qui augmentent en réponse à un régime riche en lipides, les teneurs en lipides du muscle et des viscères n'étant pas modifiées de façon significative (Dias *et al.* 1998; Nanton *et al.*, 2001).

De façon générale, la nature des lipides alimentaires n'influe pas sur la quantité de lipides corporels du poisson, mais affecte en revanche la composition de leurs acides gras (Arzel *et al.*, 1994). La composition en acides gras du muscle du poisson reflète en effet la composition en acides gras de l'aliment (Watanabe, 1982; Henderson and Tocher, 1987).

Une période de jeûne avant abattage est une pratique parfois employée dans la production de certaines espèces comme le saumon atlantique, nourries avec des aliments très riches en lipides, dans le but de stimuler la mobilisation des lipides de la chair et d'améliorer les rendements en carcasse après éviscération des poissons (Einen and Skrede, 1998). En effet, lors d'une période de jeûne, le poisson puise son énergie en premier lieu dans ses réserves de glycogène, qui sont faibles, puis dans ses réserves lipidiques, et enfin protéiques (Jobling, 1980; Hemre *et al.*, 1993). La diminution des réserves lipidiques résulte principalement d'une mobilisation des triglycérides au niveau des sites préférentiels de stockage de l'espèce (Takeuchi et Watanabe, 1982). En revanche, le jeûne prolongé, s'il permet de réduire la quantité de lipides du muscle, entraîne aussi une perte de poids et une diminution du rendement en filet (Regost *et al.*, 2001; Rasmussen, 2001); en outre, cette pratique va à l'encontre des efforts visant à limiter le stress des animaux en élevage, et a des conséquences notables sur le métabolisme *post-mortem* et les qualités organoleptiques du produit.

☞ L'apport énergétique et la composition de l'aliment permettent donc une modulation de l'accumulation des réserves, mais affectent en premier lieu les sites préférentiels de stockage de l'espèce (Takeuchi et al., 1978; Watanabe, 1982). Il semble donc difficile d'orienter de façon ciblée l'engraissement d'un compartiment corporel donné par voie alimentaire uniquement.

Toutefois, de récentes études suggèrent que la nature des différents nutriments pourraient aussi affecter la répartition des dépôts lipidiques : une différence de répartition des lipides a ainsi été observée chez des truites arc-en-ciel nourries avec deux régimes iso-protéiques (50 % de protéines) et iso-énergétiques (23 kJ/g de matière sèche), mais de source protéique d'origine différente (farine de poisson vs farines végétales). Les truites nourries avec l'aliment « farines végétales » présentaient un taux de lipides plus élevé au niveau viscéral comparé à celles nourries avec l'aliment « farine de poisson », qui présentaient une teneur en lipides musculaires plus importante (De Francesco *et al.*, 2004).

I-3.5 La sélection génétique

La sélection génétique constitue une autre voie pour contrôler l'engraissement chez les animaux d'élevage. Des estimations de l'héritabilité de différents indicateurs de l'état d'adiposité chez les salmonidés ont fourni des valeurs allant de 0,22 à 0,28 pour le tissu adipeux périviscéral (Gjerde et Schaeffer, 1989 ; Kause *et al.*, 2002) et de 0,2 à 0,47 pour la teneur en lipides des filets (Gjerde et Schaeffer, 1989; Iwamoto *et al.*, 1990; Rye et Gjerde, 1996), suggérant un déterminisme génétique de l'adiposité chez les poissons. Cependant, si les effets de l'alimentation sur les modifications de composition corporelle sont plutôt bien documentés chez le poisson, ceux exercés par la sélection génétique sont encore largement inexplorés.

En effet, la sélection génétique ciblée sur un caractère est une pratique récente en aquaculture, puisque les premiers travaux sur l'évaluation des bases génétiques de la croissance, premier critère d'intérêt zootechnique, datent de la fin des années 70. Ceux-ci ont été conduits simultanément sur la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique (Gjedrem, 1975; Chevassus, 1976; Kincaid *et al.*, 1977). Concernant la sélection génétique ciblée sur la composition corporelle, comme la teneur en lipides des filets, la principale difficulté résidait dans le développement de méthodes de mesure des caractères qui soient non létales, précises et rapides à mettre en oeuvre au bord des bassins. La mise au point d'une méthode d'évaluation indirecte de la teneur en lipides des filets par micro-ondes (2 GHz) avec le Torry Fish Fat Meter[®] a permis de répondre à cette attente. Différentes mesures ont donné un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,7 avec les méthodes d'estimation de la teneur en lipides par mesure chimique ou par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) chez la truite arc-en-ciel et le bar (Dourin *et al.*, 1998).

Sur la base de cette mesure indirecte de l'adiposité musculaire, deux lignées de truite arc-en-ciel, dénommées lignées « *Fat muscle line* » (F ; lignée muscle gras) et « *Lean muscle line* » (L ; lignée muscle maigre), ont été produites par sélection divergente (pression de sélection : 10% par génération). Une première caractérisation de ces lignées après deux générations de sélection a montré l'efficacité de la procédure appliquée (Quillet *et al.*, 2005) : les deux lignées se distinguaient par leur teneur en lipides musculaires, significativement plus élevée chez les individus de la lignée F que chez ceux de la lignée L (Tableau I-1). Ces données préliminaires, obtenues au stade « portion » (260 g, soit environ un an, âge auquel a été appliquée la procédure de sélection), ont été confirmées par une autre étude menée sur des

Tableau I-1: Réponse à la sélection des truites arc-en-ciel à un an (stade portion), après deux générations de sélection divergente sur l'indice d'adiposité musculaire (d'après Quillet *et al.*, 2005).

	Lignée L	Contrôle	Lignée F	p-value
Longueur (mm)	267 ^a	255 ^b	263 ^{ab}	0.025
Poids (g)	268 ^a	237 ^b	266 ^a	0.029
IVS (% PF)	9.2	8.9	9.0	0.201
Carcasse (% PF)	88.9	88.5	89.0	0.418
Filets (% PF)	64.1	64	65	0.443
Teneur en lipides musculaires (%MS)	25.6^b	-	29.6^a	0.003
Fat	2.59^c	3.26^b	4.16^a	p<10⁻⁴
FI	1.08^c	1.37^a	1.72^b	p<10⁻⁴

% PF: poids frais ; MS : matière sèche ; IVS : indice viscéro-somatique [IVS (%)=100x viscères (g)/ poids (g)] ; Carcasse: rendement en carcasse (%); Filet: rendement en filet (%); Fat : valeur indiquée par le fatmeter; FI: Indice d'adiposité [AI=Fat/ log (poids)]. ^{a,b} : indiquent une différence significative observée entre lignées L, F et contrôle. Les données présentées en gras correspondent aux paramètres pour lesquels une différence significative entre les lignées L et F a été observée.

Tableau I-2: Réponse à la sélection et à la teneur en lipides du régime des truites arc-en-ciel à un an et demi, après deux générations de sélection divergente sur l'indice d'adiposité musculaire (d'après Quillet *et al.*, 2007)

Régime	LE		HE		p-value		
	L	F	L	F	lignée	régime	interaction
Longueur (mm)	342	335	355	346	0.01	0.003	0.70
Poids (g)	625	586	752^a	691^b	0.02	0.001	0.62
Efficacité alimentaire	0.93	0.84	1.06	1.00	0.13	0.03	0.78
Rétention protéique (% ingéré)	31.6	27.1	38.4	35.5	0.08	0.01	0.64
Rétention lipidique (% ingéré)	128.7	174.5	81.4	92.1	0.04	0.002	0.14
IVS (% PF)	7.80	7.86	10.20	9.91	0.37	<10 ⁻³	0.19
Carcasse (% PF)	90.0	90.2	87.8	88.1	0.22	0.001	0.86
Filets (% PF)	67.6	67.4	66.8	67.7	0.58	0.65	0.31
Composition corporelle							
Teneur en eau (% PF)	65.2	63.9	62.4	60.6	0.12	0.02	0.76
Teneur en protéines (% PF)	18.4	17.6	17.1	16.8	0.08	0.008	0.29
Teneur en lipides (% PF)	13.4	16.2	18.1	20.4	0.02	0.002	0.58
Composition des filets							
Teneur en protéines (%)	21.9	21.0	20.3	20.5	0.21	0.01	0.10
Fat	2.61	4.34	4.09	5.95	<10⁻³	<10⁻³	0.56
FI	0.94	1.58	1.43	2.10	<10⁻³	0.001	0.67

Composition des aliments : LE- 58.7% protéines (% MS), 8.3% lipides (% MS), 14% glucides (% MS), 21.7 kJ/g MS ; HE- 47.7% protéines, 26.7% lipides (% MS), 11.4% glucides (% MS), 25 kJ/g MS ; Carcasse. ^{a,b} : indiquent une différence significative entre lignées L et F nourries avec un régime donné. Les données présentées en gras correspondent aux paramètres pour lesquels une différence significative entre les lignées L et F ont été observées.

individus de tailles plus importantes (un an et demi), nourries avec deux aliments de valeur énergétique différente (Quillet *et al.* 2007) (Tableau I-2).

D'autre part, les deux lignées présentaient des valeurs équivalentes d'indice viscéro-somatique (indicatif de l'importance des dépôts lipidiques au niveau viscéral), ainsi que de rendements en carcasse et en filets dans les deux études (Tableaux I-1 et I-2).

☞ Ces données suggèrent que la teneur en lipides musculaires peut-être efficacement modulée par la sélection génétique, avec des effets négatifs limités sur les autres critères de qualité du produit final, notamment sur le développement du tissu adipeux et les rendements en carcasse et en filets.

Ces lignées constituent donc un matériel pertinent pour étudier les mécanismes qui déterminent la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel.

Il faut toutefois rappeler que ces résultats préliminaires ont été obtenus sur des poissons après deux générations de sélection seulement. Il reste à vérifier que ces caractères soient maintenus chez les individus issus de générations de sélection ultérieures, et puissent être généralisés, en analysant la réponse des poissons à la sélection dans d'autres conditions expérimentales (alimentation, température).

Comme nous venons de le voir, la quantité et la répartition des lipides corporels sont des caractères complexes, contrôlés par de multiples facteurs. Parmi les facteurs influençant la teneur en lipides intramusculaires, la sélection génétique de l'animal et son alimentation sont, sans aucun doute, les moyens les plus efficaces et les plus aisés à maîtriser en conditions d'élevage.

Les données fournies par Quillet *et al.* (2007) ont montré qu'il était possible d'obtenir une large gamme de variations de la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel en combinant les effets de la sélection génétique et de la valeur énergétique de l'aliment (Tableau I-2). Ces travaux suggèrent par ailleurs des différences métaboliques dans l'utilisation d'un même aliment par ces lignées. Les mécanismes à l'origine de ces variations n'ont fait l'objet, à l'heure actuelle, d'aucune étude permettant d'expliquer les différences de phénotype observées entre lignées d'une part, et de réponse de celles-ci à un régime plus ou moins riche en lipides.

I-4 Voies métaboliques impliquées dans la constitution des dépôts lipidiques

Les dépôts lipidiques sont la résultante de plusieurs processus métaboliques :

- apport en lipides alimentaires
- synthèse endogène des lipides à partir des autres nutriments
- transport sanguin et captage des lipides par les différents tissus
- stockage des lipides dans les tissus
- lipolyse et utilisation des lipides à des fins énergétiques

Les principales voies métaboliques impliquées dans la genèse des dépôts lipidiques chez les poissons sont, de façon générale, comparables à celles mises en jeu chez les mammifères (Walton et Cowey, 1982).

I-4.1 Apport en lipides alimentaires

Les lipides stockés proviennent à la fois des lipides alimentaires et de la synthèse *de novo* à partir des squelettes carbonés des protéines et des glucides. Comme évoqué précédemment, les aliments utilisés en aquaculture, et plus particulièrement pour l'élevage des salmonidés, sont de plus en plus riches en lipides. Les lipides alimentaires constituent plus de 25 %, voir 35%, de la matière sèche de l'aliment pour des espèces comme le saumon ou la truite arc-en-ciel (Hemre et Sandnes, 1999 ; Tortensen *et al.*, 2004).

Les lipides alimentaires sont hydrolysés dans l'intestin sous l'action des sels biliaires et de lipases pancréatiques en mono- et diglycérides, acides gras libres et glycérol. Comme chez les mammifères, l'absorption des lipides s'effectue essentiellement au niveau de la partie proximale de l'intestin. L'absorption des dérivés lipidiques issus du processus de digestion n'a fait l'objet que de peu d'études chez les poissons, mais il semble que les mécanismes d'émulsification et de transport de ces composés soient les mêmes que ceux décrits chez les mammifères (Vernier et Sire, 1983).

Les dérivés lipidiques issus de l'hydrolyse des AGL sont solubilisés ou émulsifiés dans des micelles d'acides biliaires, qui diffusent ensuite vers la muqueuse intestinale, où ils sont

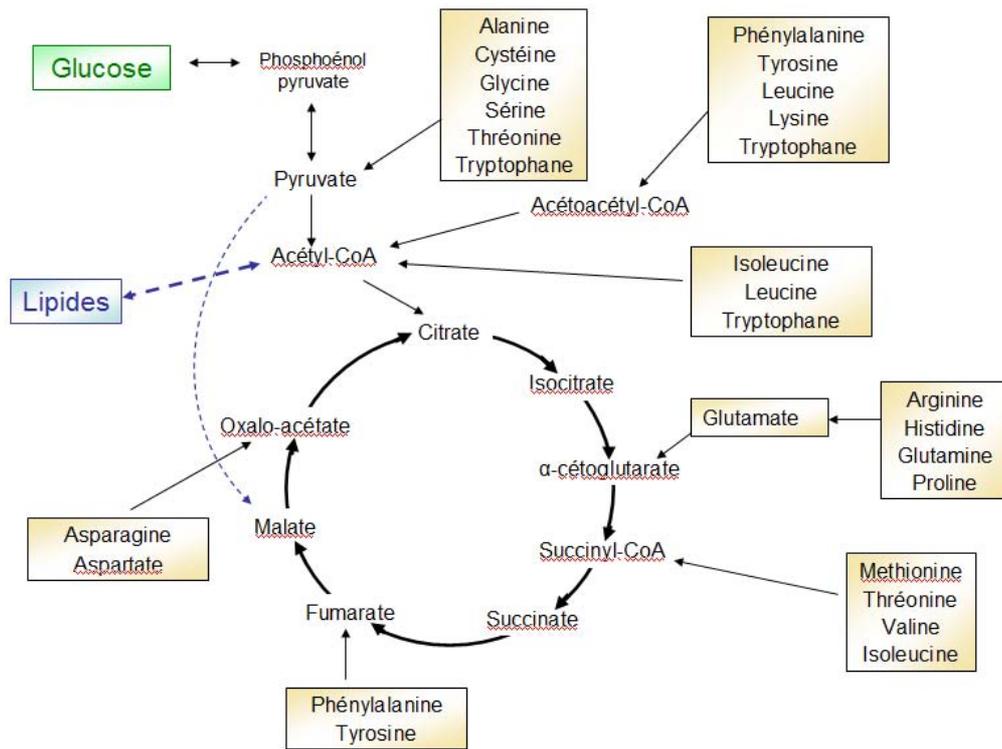


Figure I-5 : Principales sources d'acétyl-CoA dans la cellule

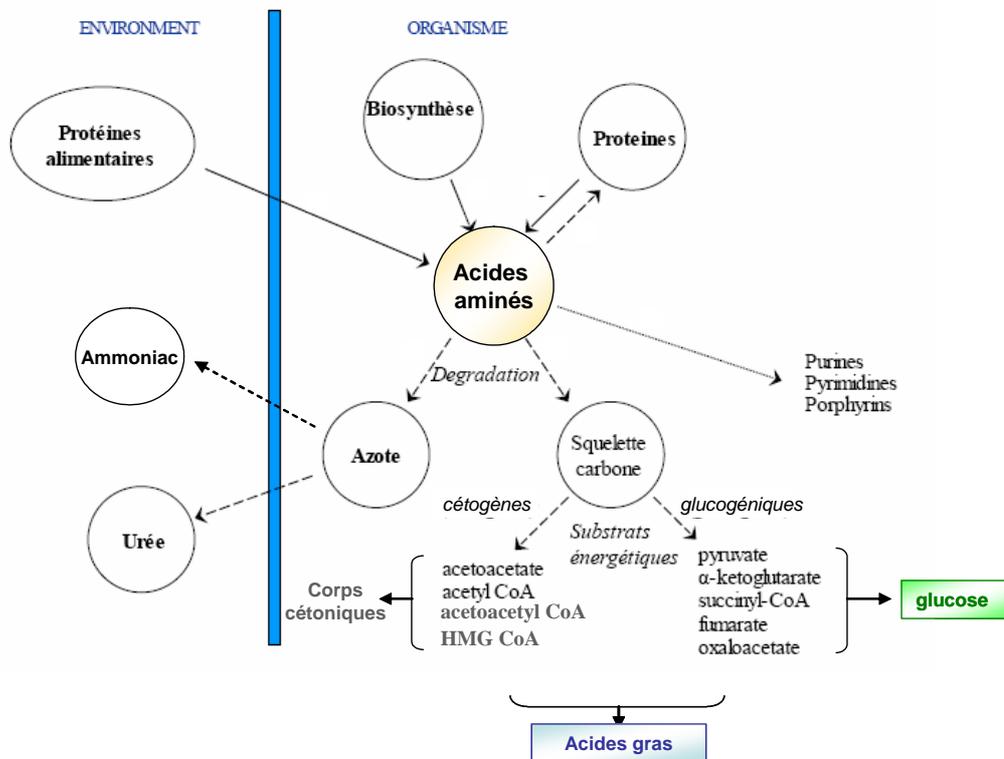


Figure I-6 : Origine et devenir des acides aminés dans l'organisme

captés par les entérocytes par diffusion passive essentiellement. Au sein des cellules de la muqueuse intestinale, les acides gras à chaîne courte, suffisamment solubles pour être transportés à l'état libre dans le cytosol, sont libérés rapidement dans la circulation (dans les 30 minutes après ingestion) au niveau de la veine portale. Les acides gras libres à longue chaîne, quant à eux, sont réestérifiés avec du glycérol pour former des triglycérides et des phosphoglycérides (Sargent *et al.*, 1989). La réaction de réestérification se fait au niveau du reticulum endoplasmique et conduit à la production de particules lipoprotéiques de type chylomicron et VLDL (very-low-density-lipoprotein). Ces lipoprotéines sont libérées dans la circulation dans les 12 à 24 heures suivant l'ingestion de l'aliment.

I-4.2 Synthèse endogène des lipides

I-4.2.1 la lipogénèse

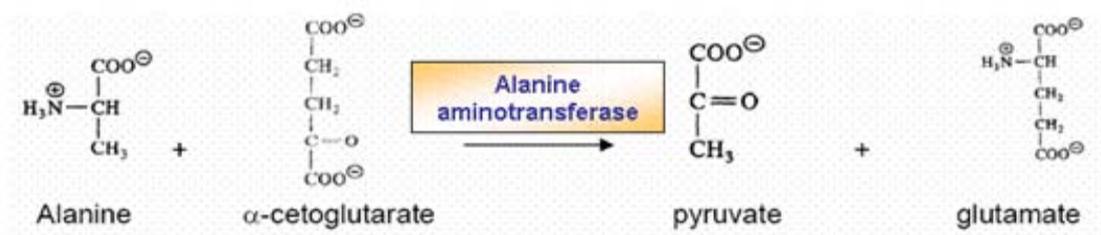
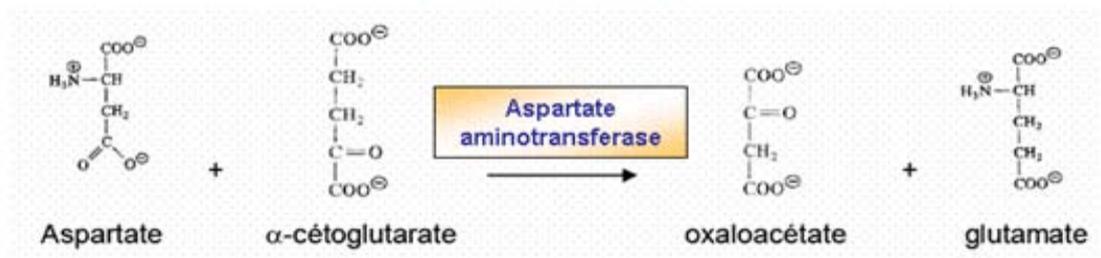
La lipogénèse convertit les chainons carbonés issus du catabolisme des glucides ou de certains acides aminés en acides gras. La synthèse *de novo* des acides gras consiste en la formation d'acyl-CoA à partir d'acétyl-CoA dérivant du catabolisme des glucides ou de la dégradation oxydative des acides aminés dits céto-gènes. Certains métabolites issus du catabolisme des acides aminés peuvent aussi entrer dans la lipogénèse au niveau du cycle des acides tricarboxyliques (Hellerstein, 1996) (figure I-5).

Chez les mammifères et les oiseaux, le glucose représente la principale source de carbone utilisée pour la synthèse des acides gras alors que chez les poissons, dont l'alimentation en milieu naturel est riche en protéines, ce sont les acides aminés qui sont les principaux substrats utilisés pour la lipogénèse (Henderson et Tocher, 1987 ; Hillgartner *et al.*, 1995). Chez la truite arc-en-ciel, il a été montré *in vitro* que le taux de synthèse des acides gras à partir de l'alanine était beaucoup plus élevé que celui réalisé à partir du glucose (Henderson et Sargent, 1981).

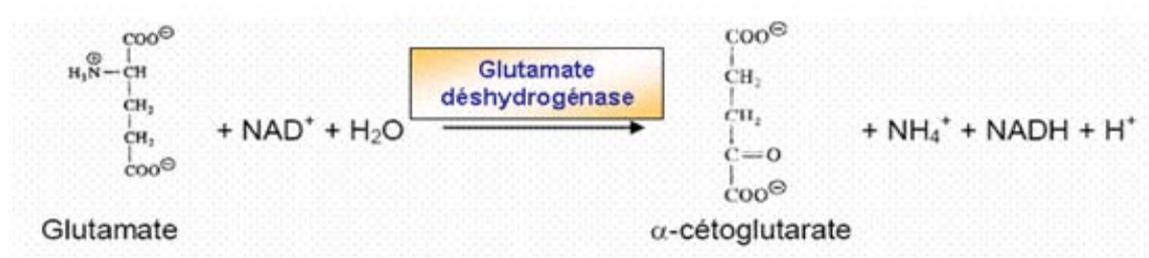
I-4.2.1.1 Les acides aminés comme source d'acétyl-CoA

Le pool des acides aminés libres et celui des protéines sont en équilibre dynamique. Les facteurs conditionnant cet équilibre sont le flux d'acides aminés à partir des protéines alimentaires, leur synthèse *de novo* et réactions d'interconversion, la synthèse et l'hydrolyse des protéines corporelles et enfin l'oxydation des acides aminés à des fins énergétiques (figure I-6). Lors du catabolisme des acides aminés, leur squelette carboné peut servir à la synthèse d'autres composés azotés, comme les nucléotides ou les amines, ou encore à la synthèse de

Transamination



Désamination oxydative



FigureI-7 : Réactions de transamination de l'aspartate et de l'alanine et de désamination oxydative du glutamate

lipides. Chez les poissons comme chez les mammifères, le foie est le site principal de dégradation des acides aminés.

La première étape de la dégradation des acides aminés est une réaction de transamination, au cours de laquelle le groupement NH_2 des acides aminés est transféré sur une molécule d' α -cétooglutarate qui se transforme alors en glutamate. L'élimination du groupement NH_2 transforme les acides aminés donneurs en α -cétoacides, squelettes carbonés des acides aminés. Cette réaction de transamination est catalysée par des transaminases (ou aminotransférases), dont les plus importantes quantitativement sont l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT, encore appelée glutamate oxaloacétate transaminase [GOT]) (figure I-7).

Le glutamate, formé en grande quantité à l'issue de la transamination des différents acides aminés, est ensuite transporté dans les mitochondries où il subit une réaction de désamination oxydative catalysée par la glutamate déshydrogénase (GDH), qui libère une molécule de NH_3 et permet la régénération de l' α -cétooglutarate qui pourra participer à de nouvelles réactions de transamination (Figure I-7). La concentration hépatique de la glutamate déshydrogénase est plus élevée dans le foie des poissons que dans celui des vertébrés supérieurs, ce qui suggère un rôle majeur de cette enzyme dans l'oxydation des acides aminés chez les poissons. Trois isoformes de la GDH, codées par des gènes différents (*gdh1*, *gdh2* et *gdh3*) ont été décrites chez la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique (Bureau *et al.*, 2002). Celles-ci se distinguent par leur profil d'expression tissulaire, la *gdh1* étant exprimée de façon prépondérante dans les reins, la *gdh2* étant essentiellement exprimée dans le foie et le muscle, et la *gdh3*, dans le foie et les reins. Certains acides aminés (comme la sérine, la thréonine, le tryptophane, la méthionine, l'asparagine, l'histidine ou encore la glutamine) peuvent être également directement désaminés dans les tissus pour former de l'ammoniac (NH_3) et de l' α -cétoacide correspondant. Toutefois, ces réactions de désamination directe nécessitent l'intervention d'enzymes très spécifiques dont la concentration dans les différents tissus des poissons est trop faible pour constituer une voie majeure du catabolisme des acides aminés et de la production d'ammoniac. Les α -cétoacides produits par transdésamination ou désamination directe des acides aminés peuvent ensuite être oxydés via le cycle des acides tricarboxyliques, ou intégrer les processus de lipogénèse ou de néoglucogénèse. Quant à l'ammoniac NH_3 , celui-ci est rapidement transformé en ammoniacque NH_4^+ . Chez les mammifères et les oiseaux, l'ammoniacque ainsi produit est éliminé sous forme essentiellement sous forme d'urée ou d'acide urique, respectivement.

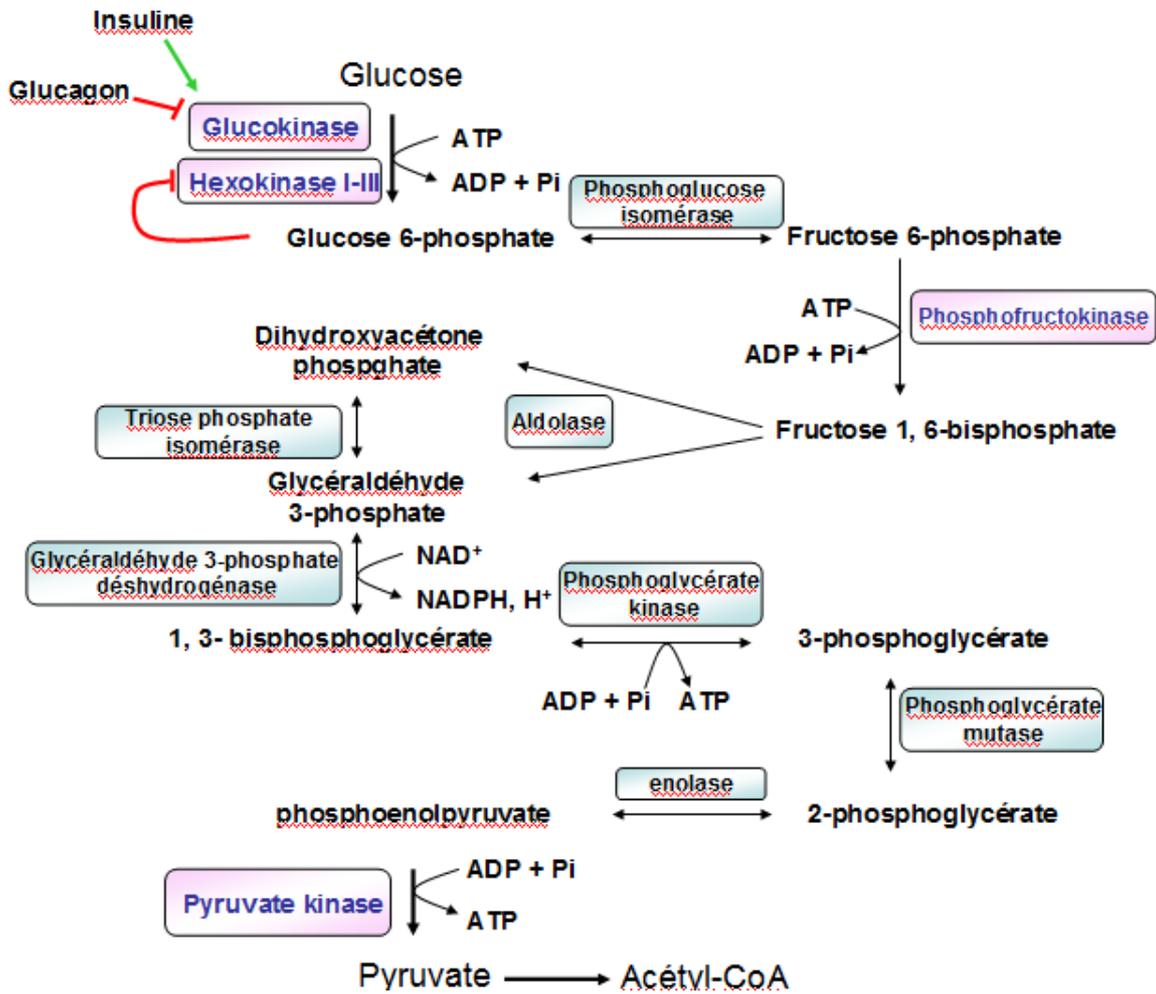


Figure I-8: voie biochimique de la glycolyse anaérobie

En revanche, chez la plupart des animaux aquatiques, et la grande majorité des poissons, près de 80% des rejets azotés se font sous forme d'ammoniaque, qui est éliminé directement dans le milieu extérieur par les branchies, la peau ou dans les urines (Mommsen et Walch, 1992; Wright, 1995).

I-4.2.1.2 La glycolyse comme source d'acétyl-CoA

Des études *in vivo* (Hilton et Atkinson 1982, Dias 1999) et *in vitro* (Alvarez *et al.*, 2000) ont montré que des taux élevés de glucides alimentaires stimulaient la lipogenèse dans le foie de truite arc-en-ciel.

Les sucres simples (glucose, fructose, galactose) issus de la digestion sont libérés dans la circulation sanguine par les cellules de la muqueuse intestinale et acheminés vers le foie via la veine porte. L'entrée du glucose dans les hépatocytes se fait par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques du glucose de la famille Glut (Glucose transporter). Comme chez les autres vertébrés, les réactions catalysées par les enzymes de la glycolyse sont toutes réversibles et peuvent donc fonctionner aussi dans le sens de la néoglucogénèse, à l'exception des réactions catalysées par l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK), qui sont les enzymes clés de la glycolyse (figure I-8). Ce processus de glycolyse anaérobie aboutit à la formation de pyruvate, qui sera ensuite transformé dans les mitochondries en acétyl-CoA par la pyruvate-déshydrogénase.

L'hexokinase est la première enzyme de la glycolyse. Quatre isoenzymes sont connus chez les vertébrés: HK-I, HK-II, HK-III et HK-IV, toutes codées par des gènes différents (Wilson, 1995). L'HK-I est exprimée de façon ubiquitaire mais plus fortement dans les tissus hautement glycolytiques, comme le cerveau, le cœur ou les reins. Elle se caractérise par une forte affinité pour le glucose, et une inhibition par son produit, le glucose 6-phosphate (G6P), qui peut-être levée en présence d'une forte concentration en Pyrophosphate (Pi). Ces caractéristiques suggèrent un rôle essentiellement catabolique de l'HK-I pour la production d'énergie (ATP) à partir du glucose (Wilson, 1995). Au contraire, l'HK-IV, ou glucokinase (GK), présente une faible affinité pour le glucose et n'est pas inhibée par le G6P. Elle est régulée en revanche par l'insuline, qui l'active, et le glucagon, qui l'inhibe. Elle est exprimée essentiellement au niveau du foie et des cellules β du pancréas où elle joue un rôle de senseur de glucose circulant. La GK jouerait un rôle clé dans l'homéostasie glucidique en orientant le glucose en excès vers la synthèse de glycogène et de lipides (Wilson, 1995, Seoane *et al.*, 1996; Dentin *et al.*, 2004). Des études réalisées chez la carpe et la truite suggèrent qu'il en serait de même chez les poissons.

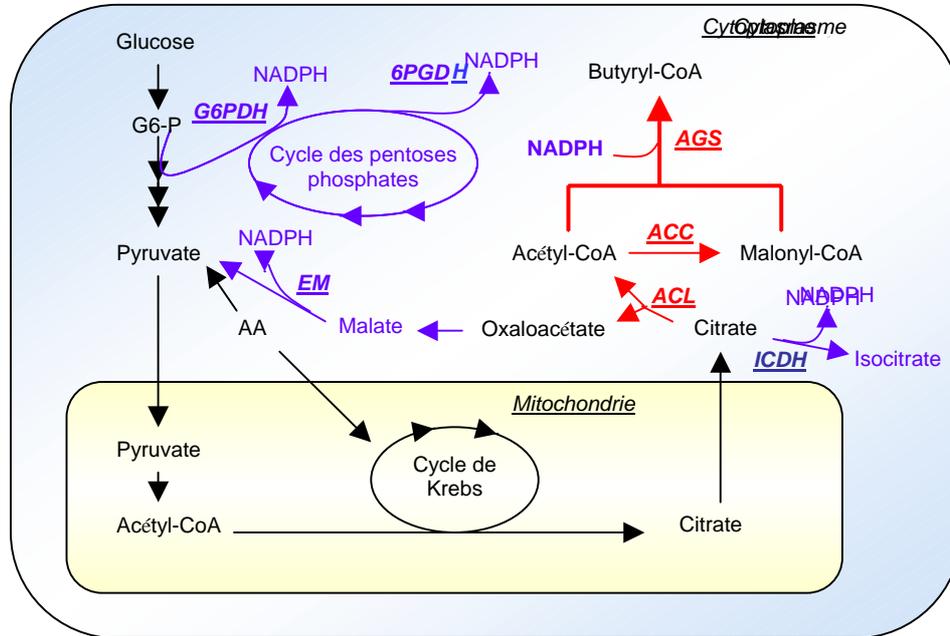


Figure I-9 : Voie biochimique de la lipogénèse. Enzyme de la lipogénèse per se (en rouge) : ACC : Acétyl-CoA carboxylase ; ACL : ATP-citrate lyase ; AGS : Acide gras synthase ; Enzymes génératrices de NADPH pour la lipogénèse (en bleu) : EM : Enzyme malique ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; ICDH : Isocitrate déshydrogénase ; 6-PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase.

I-4.2.1.3 Mécanismes biochimiques de la lipogénèse

Chez les poissons, les mécanismes biochimiques de la synthèse des lipides sont comparables à ceux des mammifères (Iritani *et al.*, 1984 ; Sargent *et al.*, 1989).

Le pyruvate, issu de la glycolyse et du catabolisme des acides aminés, est converti dans la mitochondrie par les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques en citrate. Le citrate est ensuite transporté hors de la mitochondrie pour être pris en charge dans le cytoplasme par l'ATP-citrate lyase qui le clive en acétyl-CoA et oxaloacétate. L'acétyl-CoA est transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), première enzyme clé de la lipogénèse. La synthèse d'acyl-CoAs, catalysée par l'acide gras synthase (AGS), principale enzyme de la lipogénèse, débute par la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, suivie de réactions de décarboxylation, réduction et déshydratation qui aboutissent à la formation de butyryl (4C). L'allongement de la chaîne hydrocarbonée se fait ensuite par ajout séquentiel de malonyl-CoA à la chaîne préexistante.

Chez les mammifères, l'AGS synthétise principalement de l'acide palmitique (16:0), de l'acide stéarique (18:0) et, en plus faible quantité, de l'acide myristique (14:0). Il en est de même chez les poissons, mais la proportion de ces acides gras varie selon les espèces. Chez la truite, les principaux acides gras produits par l'AGS sont le 16:0 et le 14:0 alors que chez les poissons plats, ce sont le 18:0 et le 16:0 (Sargent *et al.*, 1989).

L'ensemble de ces réactions nécessite l'intervention de NADPH, cofacteur indispensable à la réaction catalysée par l'AGS. Celui-ci est formé principalement au cours de réactions catalysées par 4 déshydrogénases cytoplasmiques intervenant dans:

1 - le cycle des pentoses phosphate, voie alternative à la glycolyse pour l'oxydation du glucose. La voie des pentoses phosphate comprend deux phases principales : a) une phase oxydative et irréversible au cours de laquelle le glucose-6-phosphate est déshydrogéné et décarboxylé, générant du NADPH et du ribulose-5-phosphate. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), première enzyme intervenant dans le cycle des pentoses phosphate, oxyde le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone. La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), deuxième enzyme du cycle des pentoses phosphate, catalyse la transformation du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate ; b) une phase non oxydative et réversible au cours de laquelle le ribulose-5-phosphate peut être converti en ribose-5-phosphate (nécessaire à la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques) ou retourner dans la voie de la glycolyse sous forme de fructose-6-phosphate ou de 3-phosphoglyceraldéhyde.

2 - la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate et CO₂, avec production de NADPH. Cette réaction est catalysée par l'enzyme malique (EM).

3 - la conversion du citrate en isocitrate. Cette réaction est catalysée par l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺-dépendante (ICDH-NADP⁺).

L'importance relative de ces voies à la fourniture d'équivalents réducteurs varie en fonction des espèces chez les poissons comme chez les vertébrés terrestres: chez la plupart des mammifères monogastriques, comme l'humain et le rat, la G6PDH et la 6-PGDH, suivies de l'EM sont les principaux générateurs de NADPH (Iritani *et al.*, 1984), alors que chez les oiseaux et le porc, la plupart du NADPH est fournie par la réaction catalysée par l'EM (Iritani *et al.*, 1984, Hillgartner *et al.*, 1995 ; Kouba et Mourot, 1999). Chez les ruminants et le lapin, les réactions catalysées par la G6PD, la 6-PGD et l'ICDH sont prépondérantes pour la fourniture de NADPH, tandis que l'EM semble être inopérante.

Le NADPH nécessaire à l'activité de l'AGS serait principalement fourni par le cycle des pentoses phosphate chez le bar (Alvarez *et al.*, 1998 ; Dias *et al.*, 1998), la truite arc-en-ciel (Alvarez *et al.*, 1998 ; Barroso *et al.*, 1998 ; Gélinau *et al.*, 2001), le turbot (Regost *et al.*, 2001, 2003) ou la perche (Borrebaek et Christophersen, 2001). En revanche, chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) et l'esturgeon (*Acipenser transmontanus*), la contribution de l'ICDH serait supérieure à celle de la l'EM, elle-même plus élevée que celle de la G6PDH (Arnesen *et al.*, 1993 ; Menoyo *et al.*, 2003 ; Torstensen *et al.*, 2004).

I.4.2.2 Elongation et désaturation des acides gras

La production d'acides gras à plus longue chaîne et d'acides gras poly-insaturés nécessite l'intervention d'élongases et de désaturases, localisées dans le réticulum endoplasmique. Les élongases, bien que n'appartenant pas au complexe multienzymatique de l'AGS, catalysent les mêmes réactions : condensation des acyls-CoA avec une molécule de malonyl-CoA, décarboxylation, réduction et déshydratation.

La Δ^9 -Désaturase, ou stéaroyl-CoA désaturase (SCD), est la première enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras mono-insaturés. Elle est inhibée par des taux élevés d'acides oléique, linoléique et linoléinique. L'acide linoléique et l'acide linoléinique sont des acides gras essentiels chez les poissons comme chez les autres animaux, car seuls les végétaux sont équipés des enzymes Δ^{12} et Δ^{15} -désaturases, nécessaires à leur synthèse à partir de l'acide oléique. La Δ^6 -Désaturase (D6D) catalyse la première réaction limitante de la synthèse des AGPI à partir de l'acide oléique, linoléique ou linoléinique. Certaines espèces ont une

meilleure capacité à désaturer les acides gras que d'autres, le gène de la delta-6-désaturase y étant plus exprimé. Il en est de même chez les poissons. En effet, contrairement à la plupart des poissons d'eau douce, comme la truite arc-en-ciel, qui sont capables de synthétiser l'EPA et le DHA à partir de l'acide linoléique et linoléinique (Cho *et al.*, 1999 ; Seiliez *et al.*, 2001), les poissons marins présentent une faible capacité de conversion des acides gras mono-insaturés en AGLPI.

I-4.2.3 Estérification des acides gras en triglycérides

La synthèse des triglycérides et des phospholipides a lieu au niveau du réticulum endoplasmique à partir d'acyls-CoA et de L-glycérol-3-phosphate, produit par réduction du 3-phosphodihydroxyacétone (formé lors de la glycolyse) par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. La réaction d'estérification du glycérol-phosphate se fait par intervention successive de glycérol-3-phosphate acyltransferases (GPATs), 1-acylglycerol-phosphate acyltransferases (AGPATs) et de diacylglycérol acyltransferase (DGATs). Les triacylglycérols sont libérés dans le cytosol pour y être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques ou dans la lumière du réticulum endoplasmique pour former des lipoprotéines de très basse densité (VLDLs), qui sont ensuite libérées dans la circulation sanguine. La voie d'estérification des acides gras en triglycérides n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études chez le poisson, mais le peu de données disponibles suggèrent que les mécanismes mis en jeu chez les poissons sont les mêmes que ceux observés chez les mammifères (Sargent *et al.*, 1989).

I-4.2.4 Le foie : site principal de la lipogénèse chez les poissons

Chez les mammifères, la synthèse *de novo* des lipides (lipogénèse) a lieu dans le foie et les tissus adipeux (sous cutanés, abdominaux et viscéraux, intermusculaire) (Hillgartner *et al.*, 1995). Les glandes sébacées et les glandes mammaires des mammifères ainsi que la glande uropygiale des oiseaux synthétisent également les acides gras à un taux élevé (Hillgartner *et al.*, 1995). L'importance relative des tissus adipeux et du foie dans la néosynthèse des acides gras diffère en fonction des espèces : la synthèse *de novo* des acides gras a lieu principalement dans le foie chez l'homme (Hillgartner *et al.* 1995) et chez les oiseaux (O'Hea et Leveille, 1969a; Leveille *et al.*, 1975). En revanche la lipogénèse se déroule essentiellement dans les tissus adipeux chez le porc (O'Hea et Leveille, 1969b), le chat (Richard *et al.*, 1989), ainsi que chez les ruminants (Ingle *et al.*, 1972 Liepa *et al.*, 1978 ; Hood *et al.*, 1980). Chez le rat, la souris et le lapin, la synthèse *de novo* est importante dans les deux tissus (Clarke *et al.*, 1977 ; Baker *et al.*, 1978 ; Gondret *et al.*, 1998).

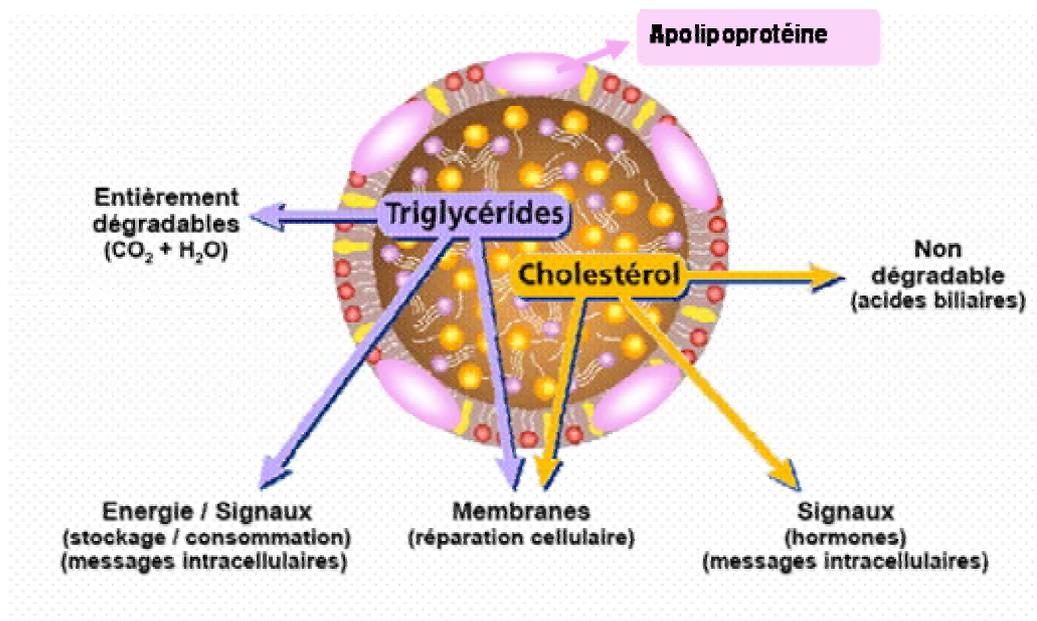


Figure I-10: Structure générale d'une lipoprotéine et devenir métabolique de ses composants

chylomicrons		<p>Origine: entérocytes</p> <p>Diamètre: > 1000 Å</p> <p>Densité: < 0.99 g/ml</p> <p>Composition</p> <p>Triglycérides: 80%</p> <p>Esters de cholestérol: 3%</p> <p>Protéines: 2%, dont:</p> <p>Apo B48, Apo C-II, Apo C-III</p> <p>Apo A-I, Apo A-IV</p>	VLDL		<p>Origine: hépatocytes (+ entérocytes)</p> <p>Diamètre: 400 - 1000 Å</p> <p>Densité: ≈ 1.006 g/ml</p> <p>Composition</p> <p>Triglycérides: 60%</p> <p>Esters de cholestérol: 15%</p> <p>Protéines: 10%, dont:</p> <p>Apo B100, Apo C-II, Apo E</p>
LDL		<p>Origine: VLDL</p> <p>Diamètre: 200-300 Å</p> <p>Densité: ≈ 1.04 g/ml</p> <p>Composition</p> <p>Triglycérides: 10%</p> <p>Esters de cholestérol: 50%</p> <p>Protéines: 20%, dont:</p> <p>Apo B100, Apo Lp(a)</p>	HDL		<p>Origine: hépatocytes (+ entérocytes)</p> <p>Diamètre: 60 - 140 Å</p> <p>Densité: ≈ 1.15 g/ml</p> <p>Composition</p> <p>Triglycérides: 10-15%</p> <p>Esters de cholestérol: 30%</p> <p>Protéines: 40-45%, dont:</p> <p>Apo A-I, Apo A-II</p>

Figure I-11: Aspect en microscopie électronique et caractéristiques des principales lipoprotéines plasmatiques

Chez les poissons, la synthèse *de novo* des acides gras est très limitée dans le tissu adipeux, et c'est essentiellement le foie qui assure la synthèse des acides gras à partir des glucides et des acides aminés alimentaires (Greene et Selivonchick, 1987). L'activité des principales enzymes intervenant dans la synthèse *de novo* des acides gras est considérablement plus élevée dans le foie que dans le tissu adipeux périviscéral et le muscle chez la truite arc-en-ciel (Baldwin et Reed, 1976; Henderson et Sargent, 1981), le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) (Likimani et Wilson, 1982), ou le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Lin *et al.*, 1977a). Chez cette dernière espèce, la synthèse des acides gras est 30 fois plus élevée dans le foie que dans le tissu adipeux périviscéral (Lin *et al.*, 1977b). Chez les poissons, tout comme d'ailleurs chez l'humain et les oiseaux, le transport plasmatique des AG, sous forme de triglycérides ou d'AGNE, du foie vers les tissus extra-hépatiques constitue donc une étape importante du stockage périphérique des lipides d'origine endogène.

I-4.3 Transport plasmatique des lipides et captage par les différents tissus

Les lipides alimentaires ainsi que les lipides endogènes issus de la lipogénèse sont véhiculés dans les capillaires sanguins jusqu'aux tissus utilisateurs. Le transport des lipides chez les poissons, est réalisé, comme chez les mammifères, par les lipoprotéines plasmatiques (Chapman, 1980 ; Babin et Vernier, 1989 ; Tocher, 2003). Une faible proportion des lipides (5 à 10%) est véhiculée sous forme d'acides gras libres ou complexée à l'albumine.

I-4.3.1 Les différentes classes de lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules sphériques de type pseudo-micelles, formées d'un noyau central apolaire contenant des triglycérides et des esters de cholestérol, entouré d'une enveloppe hydrophile composée de phospholipides, cholestérol et de protéines appelées apolipoprotéines (figure I-10).

On distingue différentes classes de lipoprotéines en fonction de leurs propriétés physiques, notamment leur densité, leur diamètre et leur migration électrophorétique : chylomicrons, VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) et HDL (high density lipoprotein) (figure I-11).

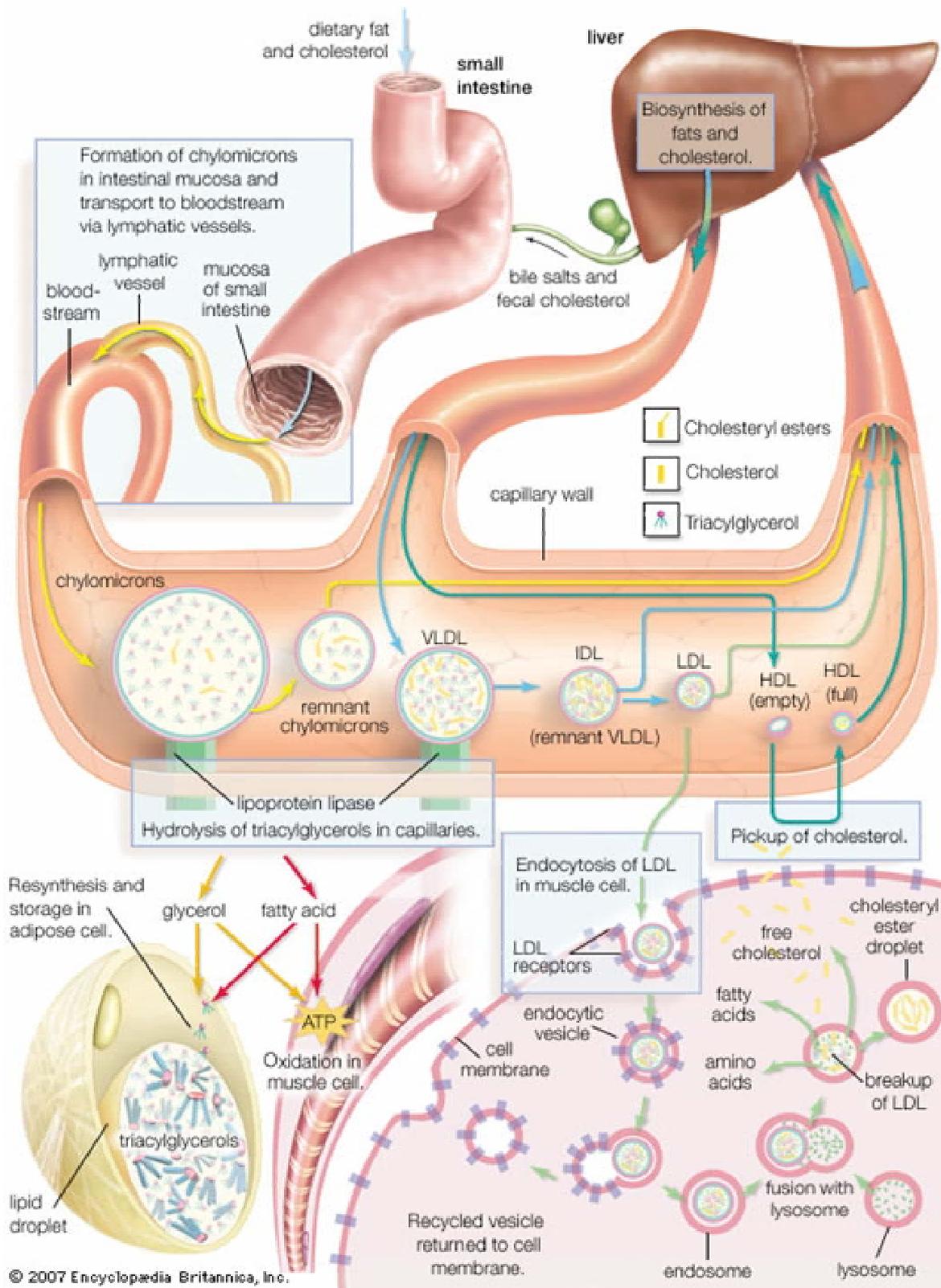


Figure I-12 : Vue d'ensemble du métabolisme plasmatique des lipoprotéines (Encyclopaedia Britannica, 2007).

Ces différentes classes de lipoprotéines plasmatiques existent chez les poissons, comme chez les mammifères (Chapman, 1980 ; Babin et Vernier, 1989). La structure et la nature des apolipoprotéines, ainsi que la composition lipidique des différentes classes de lipoprotéines sont assez similaires à celles des mammifères (Babin et Vernier, 1989). Les lipoprotéines des poissons contiennent cependant des teneurs en AGPI n-3 plus élevés que chez ces derniers. D'autre part, chez de nombreuses espèces, dont la truite arc-en-ciel, les HDL sont les lipoprotéines majoritaires, à la différence des mammifères, chez lesquels les LDL sont prépondérantes.

Chez les vertébrés ovipares, dont les poissons, il existe également une autre classe de lipoprotéines, de très haute densité, supérieure à celle des HDL ($d > 1,21$ g/ml): la vitellogénine. Cette lipoprotéine est constituée d'environ 80% de protéines et de 20% de lipides (majoritairement des phospholipides). Elle est synthétisée par le foie, sous le contrôle des oestrogènes (Norberg et Haux, 1985 ; Wallaert et Babin, 1992). La vitellogénine est captée par les ovocytes après sa sécrétion, pour servir de précurseur du vitellus de l'oeuf. Elle apparaît dans le plasma des femelles environ 1 mois avant l'ovulation puis disparaît progressivement (Babin and Vernier 1989 ; Wallaert et Babin, 1994). Cette lipoprotéine ne semble pas participer au transport des acides gras alimentaires.

I-4.3.2 Métabolisme plasmatique des lipoprotéines

Chez les mammifères, les lipoprotéines intestinales sont transportées presque exclusivement via le système lymphatique. De façon similaire, chez les poissons, la majorité des lipoprotéines délivrées par le tractus digestif est transportée dans le système lymphatique, avant de rejoindre la circulation sanguine (Sheridan *et al.*, 1988). Chez certaines espèces comme la truite et la carpe, une partie de ces lipoprotéines, ainsi que certains acides gras libres complexés à l'albumine, peuvent être transportés directement vers le foie via le système porte.

Les chylomicrons sont produits exclusivement au niveau du tractus digestif. Les VLDLs, bien qu'également produites au niveau de l'intestin, sont majoritairement synthétisées par le foie (Gurr et Harwood, 1991). Ces lipoprotéines sont riches en triglycérides et constituent le mode de transport majeur des lipides exogènes et endogènes vers les tissus périphériques. Après avoir rejoint la circulation générale, les chylomicrons et les VLDL (d'origine intestinale et hépatique) subissent l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) enzyme lipolytique ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins de nombreux tissus périphériques (tissu adipeux, cœur, muscle squelettique, cerveau) (Fielding et Fielding, 1996).

La lipolyse catalysée par la LPL permet de délivrer les acides gras contenus dans les chylomicrons et les VLDL aux différents tissus (Figure I-12). L'action de la LPL sur les chylomicrons génère des remnants de chylomicrons, appauvris en triglycérides, qui sont ensuite principalement captés par le foie, via des récepteurs aux LDL (R-LDL) et des "LDL receptor-related protein", pour y être dégradés (Havel, 1998). Quant aux VLDL, elles sont progressivement transformées en IDL, puis en LDL. Ces LDL, pauvres en triglycérides et riches en cholestérol, sont ensuite captées par endocytose au niveau du foie et des tissus extra-hépatiques par l'intermédiaire des R-LDL (Kovanen, 1987; Schneider, 1996). Une fois internalisée, la particule de LDL est dégradée pour permettre la libération des esters de cholestérol qu'elle contient. Les LDL constituent ainsi une voie majeure d'apport de cholestérol aux cellules des tissus périphériques. La dernière classe de lipoprotéines communément observées, les HDL, particulièrement abondante chez les poissons, participe au transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Les HDL naissantes, de forme discoïdale, sont synthétisées et sécrétées par le foie et l'intestin, et sont riches en phospholipides et en apolipoprotéine A-1.

Au contact des cellules des tissus périphériques, elles vont progressivement se charger en cholestérol, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques comme le scavenger-receptor BI et l'ATP binding cassette A1, qui reconnaissent l'apo-AI des particules (Rader, 2006) pour devenir, à terme des HDL matures. Les HDL matures ainsi formées sont en grande partie reconnues et dégradées dans les cellules hépatiques par l'intermédiaire de récepteurs qui reconnaissent les apoA-I présentes dans la structure des HDL. Le cholestérol ainsi retourné au foie est éliminé dans la bile ou dégradé en acides biliaires.

I-4.3.3 Captage des lipides par les tissus extra-hépatiques

Les acides gras utilisés par les cellules pour le stockage ou l'oxydation des lipides proviennent directement du plasma, soit sous la forme d'acide gras non estérifiés liés à l'albumine, soit de l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les lipoprotéines par la lipoprotéine lipase (LPL).

La LPL est donc une enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines qui contrôle le captage des acides gras par les tissus. La LPL catalyse l'hydrolyse des liaisons esters des triglycérides présents dans les lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL principalement) en 2-monoacylglycérol et acides gras libres (Goldberg, 1996). Elle appartient à la même famille de lipases que la lipase pancréatique (sécrétée dans le duodénum et agissant sur les triglycérides alimentaires) et la lipase hépatique (présente à la surface de l'endothélium des

capillaires hépatiques, elle hydrolyse les triglycérides et phospholipides des lipoprotéines et a une forte affinité pour les HDL) (Hide *et al.*, 1992). Au cours de l'hydrolyse des triglycérides par la LPL, des acides gras non estérifiés sont libérés et rapidement captés par les tissus.

Chez la truite, le tissu adipeux périviscéral, principal site de stockage des lipides chez cette espèce, est le tissu qui présente la plus forte activité LPL, tandis que l'activité LPL mesurée au niveau du muscle rouge, du muscle blanc, du coeur ou du cerveau est plus faible (Black *et al.*, 1983 ; Black et Skinner, 1986 ; Lindberg et Olivecrona, 1995, Arantzamendi, 2002).

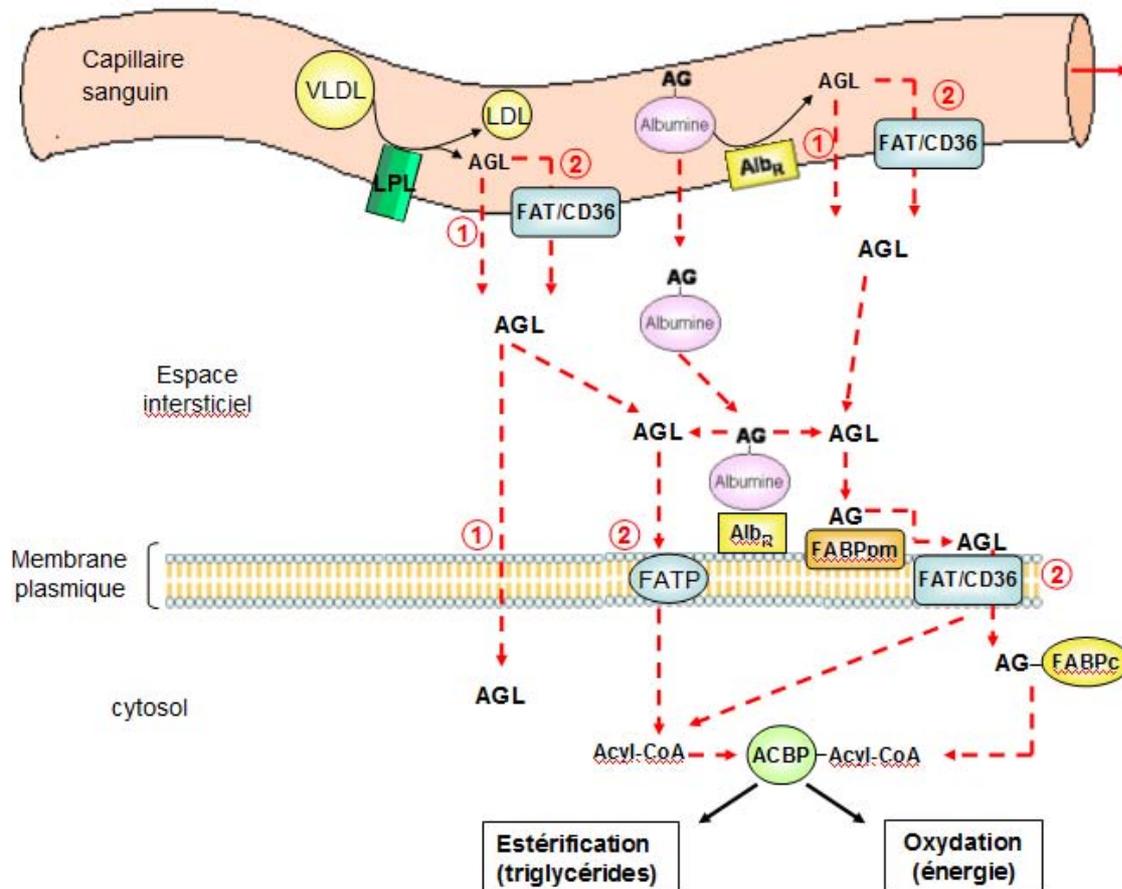


Figure I-13: Mécanismes de transport des acides gras plasmatiques à travers l'endothélium des capillaires et les membranes plasmiques des cellules. Les deux principaux types de mécanismes proposés sont représentés : 1- mode de transport passif, 2- transport médié par des protéines spécifiques. AGL : acides gras libres ; Alb_R : récepteur à l'albumine ; FAT/CD36 : Fatty Acid Translocase ; FABP_{pm} : Fatty Acid Binding Protein, plasma membrane ; FABP_c : Fatty acid Binding Protein, cytosolique ; ACBP : Acyl-CoA Binding Protein

Le passage des acides gras à travers l'endothélium des capillaires, l'espace interstitiel et la membrane des cellules n'est pas encore élucidé et est sujet à controverse. Deux mécanismes ont été proposés

- transport passif des acides gras libres par un phénomène de « flip-flop » membranaire, grâce à un gradient de concentration créé par l'utilisation ou la réestérification de ces acides gras dans les cellules (Scow *et al.*, 1985, Zakim *et al.*, 1996).

- transport médié par un système spécifique impliquant les protéines FAT/ CD36 (Fatty Acid Translocase), FATP (Fatty acid Transport protein) et FABPpm (Fatty Acid Binding Protein, plasma membrane) (Bonen *et al.*, 1998; Abumrad *et al.*, 1999).

Selon de récentes études, il semblerait que ce passage se fasse par l'intermédiaire des deux mécanismes (Pownall et Hamilton, 2003) (Figure I-13):

A l'intérieur de la cellule, les acides gras sont pris en charge par des protéines de transport cytosoliques : des FABPs cytosoliques, qui lient les acides gras libres, et l'ACBP (AcylCoA Binding Protéine), qui lie les acides gras activés en acyl-CoA. Les acides gras activés sont ensuite orientés vers la voie de l'estérification ou de l'oxydation des acides gras.

La présence d'une protéine de type FABPpm a été détectée au niveau du muscle rouge et du muscle blanc chez la truite arc-en-ciel (Richards *et al.*, 2004), avec probablement une différence de structure de la protéine entre ces deux tissus.

I-4.4 Oxydation et utilisation des lipides à des fins énergétiques

I-4.4.1 Les tissus utilisateurs

Le devenir des acides gras varie selon les tissus. Par exemple, dans le tissu adipeux, ils sont re-estérifiés en triglycérides pour être stockés dans les adipocytes, tandis que dans le muscle squelettique ou cardiaque, ils sont surtout oxydés pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP. L'oxydation des acides gras constitue une source importante d'énergie pour de nombreux tissus comme le foie, le cœur, le muscle rouge. Il a également été démontré chez le saumon atlantique que le muscle blanc jouait un rôle significatif dans l'oxydation totale des acides gras (Froyland *et al.*, 1998 ; 2000). En effet, si l'activité oxydative des acides gras par g de muscle blanc est faible par rapport aux autres tissus (Froyland *et al.* 2000 ; Tortensen *et al.* 2000), ce tissu constitue près de 60% du poids corporel total. Par conséquent la contribution de la masse totale du muscle blanc à l'oxydation des acides gras serait bien plus élevée que celle du foie ou du muscle rouge qui ne représentent qu'un faible pourcentage du poids corporel.

I-4.4.2 La β -oxydation des acides gras : des acides gras aux acétyls-CoA

La β -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Elle consiste en une succession de réactions au cours desquelles les acides gras sont découpés progressivement en acétyl-CoA. Elle a lieu principalement dans la matrice mitochondriale, mais est également observée au niveau d'un autre type d'organite, le péroxysome. C'est dans ce dernier qu'est initiée l'oxydation des acides gras à très longue chaîne, des AGLPI, qui sont de faibles substrats pour la β -oxydation mitochondriale (Osmundsen *et al.*, 1991, Reddy *et al.*, 1994). Les mitochondries sont plus abondantes que les péroxysomes dans la plupart des cellules animales, et contribuent, dans des conditions physiologiques normales, à plus de 90% de l'oxydation cellulaire des acides gras (Mannaerts *et al.*, 1979). En revanche, chez les poissons, la β -oxydation péroxysomale est prépondérante dans le foie. Des études menées chez la bocasse (*Notothenia gibberifrons*), l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), ou encore le saumon atlantique (*Salmo salar*), ont montré que la β -oxydation péroxysomale pouvait représenter de 30% à 100% de l'oxydation hépatique des acides gras (Crockett and Sidell, 1993; Froyland *et al.*, 2000; Nanton *et al.*, 2003). Elle semble, par contre, plus limitée au niveau du muscle blanc et du muscle rouge, où la β -oxydation mitochondriale prédomine largement (Crockett and Sidell, 1993; Froyland *et al.*, 1998; Nanton *et al.*, 2003).

I-4.4.2.1 Activation des acides gras

La β -oxydation débute dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale, par l'activation des acides gras en acyl-CoAs. Cette réaction, ATP-dépendante, est catalysée par des enzymes de la famille des acyl-CoA synthétases, qui diffèrent par leur spécificité de longueur de chaîne et leur localisation sub-cellulaire (Watkins, 1997). On distingue :

- des synthétases d'acyl-CoA à chaîne courte, spécifiques des acides gras < 6 C, localisées au niveau de la matrice mitochondriale et du cytosol dans le foie et le tissu adipeux,
- des synthétases d'acyl-CoA à chaîne moyenne, localisée dans la matrice mitochondriale,
- des synthétases d'acyl-CoA à chaîne longue, spécifiques des acides gras > 12 C, et localisées à la surface de la membrane externe des mitochondries, des péroxysomes et du réticulum endoplasmique,
- des synthétases d'acyl-CoA à très longue chaîne (> 20 C). Les acyls-CoA à très longue chaîne sont générés uniquement dans les péroxysomes et le réticulum endoplasmique (Uchida *et al.*, 1996).

I-4.4.2.2 La β -oxydation mitochondriale des acides gras

Les acyls-CoA à chaîne courte et moyenne peuvent traverser les membranes mitochondriales externes et internes par simple diffusion (Eaton *et al.* 1996), contrairement aux acyls-CoA à chaîne longue, qui nécessitent un système de transport. Ce système de transport est composé de trois enzymes principales (Figure I-14):

- la carnitine palmitoyltransferase I (CPT I), localisée sur la membrane mitochondriale externe, transfère le radical acyl des acyl-coenzymes A sur la carnitine, cofacteur indispensable de la β -oxydation. Le produit issu de cette réaction est un acyl-carnitine, formé dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie.
- l'acyl-carnitine translocase et la carnitine palmitoyltransferase II (CPT II), localisées toutes deux sur la membrane mitochondriale interne. L'acyl-carnitine translocase permet la translocation de l'acyl-carnitine à travers la membrane interne de la mitochondrie. La CPT II reporte le radical acyl et l'énergie de l'acyl-carnitine sur un coenzyme A de la matrice mitochondriale pour reformer un acyl-CoA.

La CPT I est décrite comme l'enzyme limitante de la β -oxydation mitochondriale dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques (Kerner et Hoppel, 1998; Eaton *et al.*, 2002). Chez les mammifères, la CPT I est inhibée allostériquement par le malonyl-CoA, produit par l'ACC

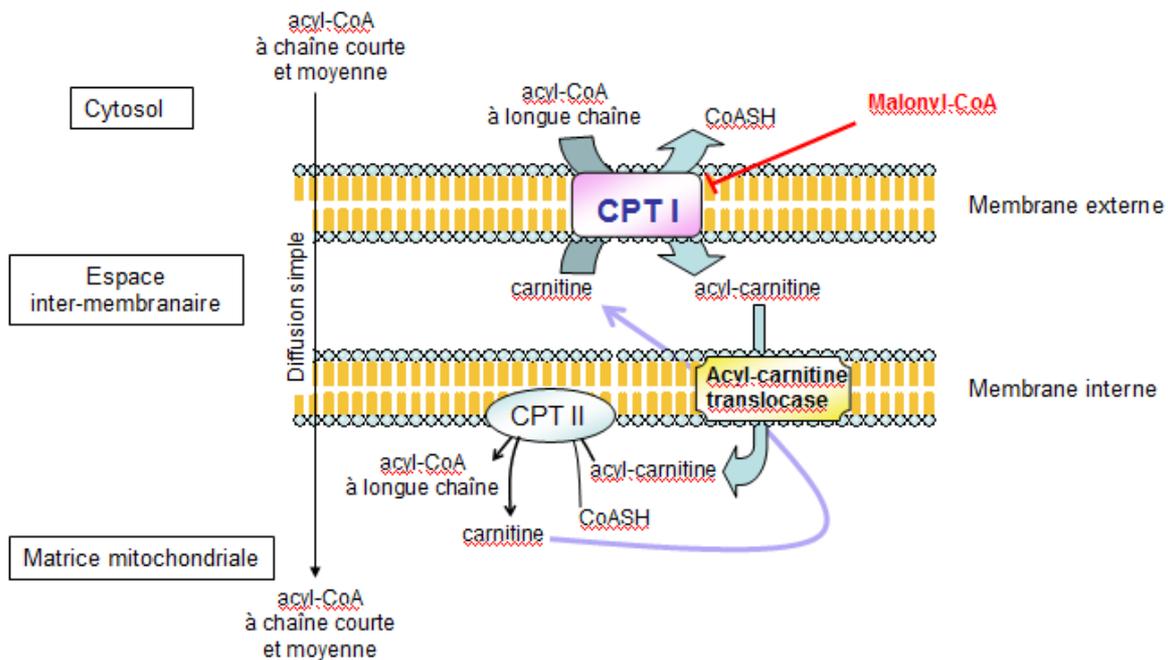


Figure I-14 : Système de transport des acyl-CoA à travers des membranes interne et externe d'une mitochondrie. CoA-SH : CPT : Carnitine palmitoyltransferase

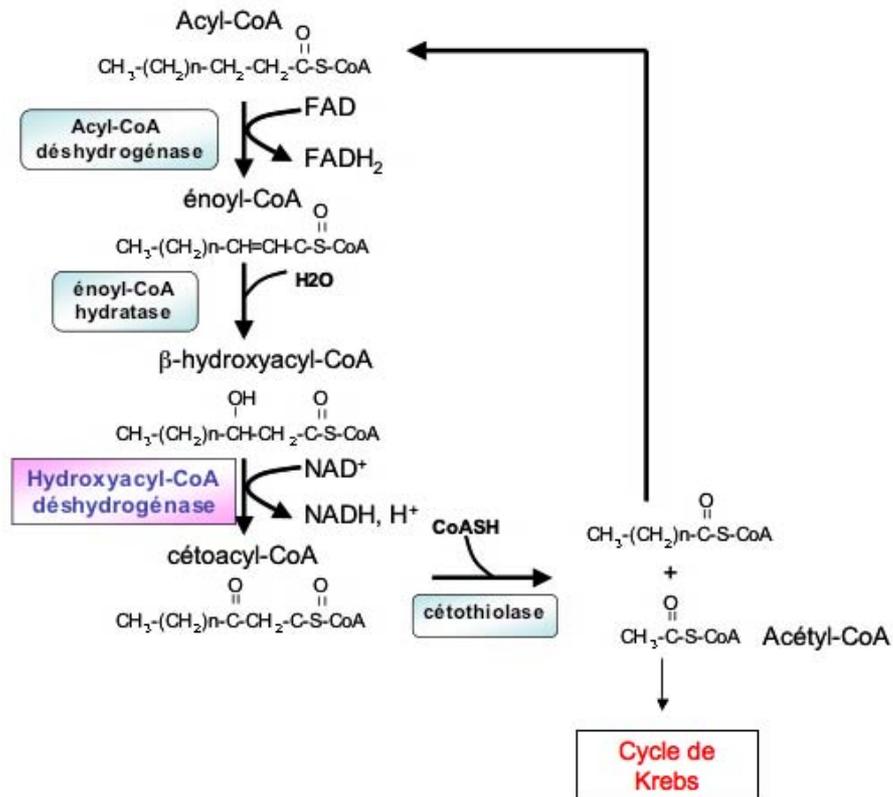


Figure I-15: Réaction de β -oxydation mitochondriale des acides gras (Hélise de Lypen), constituée des 4 réactions enzymatiques de la β -oxydation se déroulant dans la matrice mitochondriale.

et premier intermédiaire formé lors de la lipogénèse (Brown et McGarry, 1997). L'effet inhibiteur du malonyl-CoA a également été démontré chez les poissons (Froyland, 1998 ; Gutieres *et al.*, 2003). Le malonyl-CoA assure ainsi un contrôle coordonné entre deux mécanismes opposés, la lipogénèse, en tant que substrat de l'AGS, et l'oxydation des acides gras, en tant qu'inhibiteur de l'activité de la CPT I. Le système CPT I/ malonyl-CoA permet un ajustement de l'oxydation des acides gras en fonction de l'apport énergétique alimentaire. Trois isoformes de CPT I, codées par des gènes différents, ont été décrites chez les mammifères : la CPT I-A (anciennement L-CPT I) exprimée de façon prépondérante dans le foie et les reins (Esser *et al.*, 1993), la CPT I-B (anciennement M-CPT I), exprimée surtout au niveau des muscles squelettique et cardiaque, des testicules et des tissu adipeux (brun et blanc) chez le rat (Esser *et al.*, 1996, McGarry *et al.*, 1997) et la CPT I-C, qui s'exprime essentiellement au niveau des testicules et de certaines régions du cerveau (Price *et al.*, 2002). Quatre isoformes de la CPT I ont récemment été décrits chez la truite arc-en-ciel (données non publiées par le laboratoire) : la CPT I a, la CPT I b, la CPT I c et la CPT I d. Ces quatre isoformes sont toutes dotées des mêmes caractéristiques structurales que les CPT I des mammifères (Gutieres *et al.*, 2003) et présentent une plus forte homologie de séquence avec la CPT I-A mammalienne (de 65 à 68%) qu'avec les isoformes CPT I-B (58 à 62%) ou CPT I- C (50 à 52%). On ne sait toujours pas, pour le moment, quel est le rôle exact joué par chacune de ces isoformes, ni quels sont leurs profils d'expression et de régulation respectifs chez la truite.

La β -oxydation se poursuit ensuite dans la matrice par une succession de cycles à 4 réactions enzymatiques (figure I-15) :

- une première réaction d'oxydation FAD-dépendante de l'acyl-CoA, catalysée par différentes acyl-CoA déshydrogénases, qui produit un dérivé insaturé, l'énoyl-CoA, ainsi qu'un FADH₂ .
- une réaction d'hydratation de la double liaison de l'énoyl-CoA par l'énoyl-CoA hydratase (ou crotonase), qui produit un β -hydroxyacyl-CoA
- une deuxième réaction d'oxydation, NAD⁺-dépendante, catalysée par l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD), et qui produit un β -cétoacyl-CoA et un NADH, H⁺.
- une réaction de thiolyse, avec clivage du β -cétoacyl-CoA et libération d'un acétyl-CoA et d'un acyl-CoA raccourci de 2 carbones, catalysée par la céthiolase.

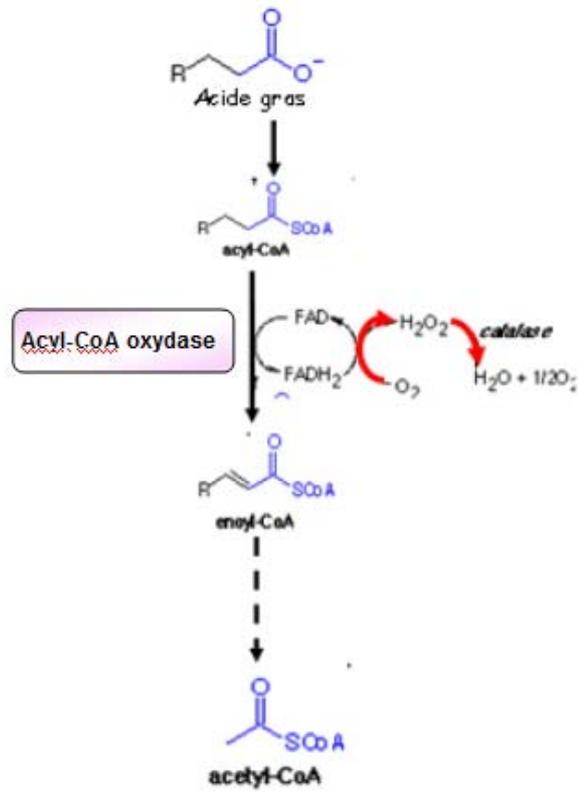


Figure I-16: Réaction de β -oxydation des acides gras dans les péroxysomes.

La succession de cycles décrit une hélice, l'hélice de Lynen, qui libère à chaque cycle un l'acyl-CoA raccourci de 2 carbones, un acétyl-CoA, un FADH₂ et un NADH,H⁺, jusqu'à ce que l'acide gras soit totalement dégradé en acétyl-CoA.

Les acétyls-CoA ainsi formés vont ensuite intégrer le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques, pour générer davantage de NADH. Les équivalents réducteurs FADH₂ et NADH,H⁺ produits lors de la β-oxydation et du cycle de Krebs seront ensuite régénérés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, avec production d'ATP.

L'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD), qui catalyse la troisième réaction de l'hélice de Lynen, est inhibée par un rapport NADH, H⁺/NAD⁺ élevé (Guzman et Geelen, 1993), ce qui constitue un mode de rétrocontrôle négatif de la β-oxydation mitochondriale.

I-4.4.2.3 La β-oxydation péroxysomale

Contrairement aux mitochondries, les péroxysomes sont dépourvus de chaîne respiratoire et ne peuvent oxyder les acétyl-CoA via le cycle de Krebs, qui a lieu exclusivement dans la mitochondrie. La β-oxydation péroxysomale correspond en fait à une β-oxydation partielle, au cours de laquelle les AGPI à très longue chaîne (AGLPI) sont seulement raccourcis (Lazarow, 1978; Guzman et Geelen, 1993; Eaton, 2002). La β-oxydation des acides gras dans les péroxysomes diffère de celle des mitochondries uniquement au niveau de la conversion de l'acyl-CoA en énoyl-CoA. C'est l'acyl-CoA oxydase (ACO) qui génère l'énoyl-CoA et le FADH₂ formé cède ses électrons directement à l'oxygène, générant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est ensuite converti par la catalase en oxygène et eau. Les acyls-CoA à chaîne courte et moyenne quittent ensuite le péroxysome pour rejoindre le cytosol. Leur oxydation se poursuit dans la mitochondrie, pour donner des acétyls-CoA, qui vont intégrer le cycle de Krebs.

I-4.4.2.4 Contrôle transcriptionnel des enzymes impliquées dans la β-oxydation mitochondriale et péroxysomale

En plus du contrôle allostérique exercé par le malonyl-CoA sur la CPTI, la régulation de l'oxydation des acides gras peut se faire au niveau transcriptionnel, via des facteurs de transcription de la famille des PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) qui peuvent réguler de façon spécifique l'expression d'un certain nombre de gènes, parmi lesquels ceux codant pour la CPTI et l'ACO.

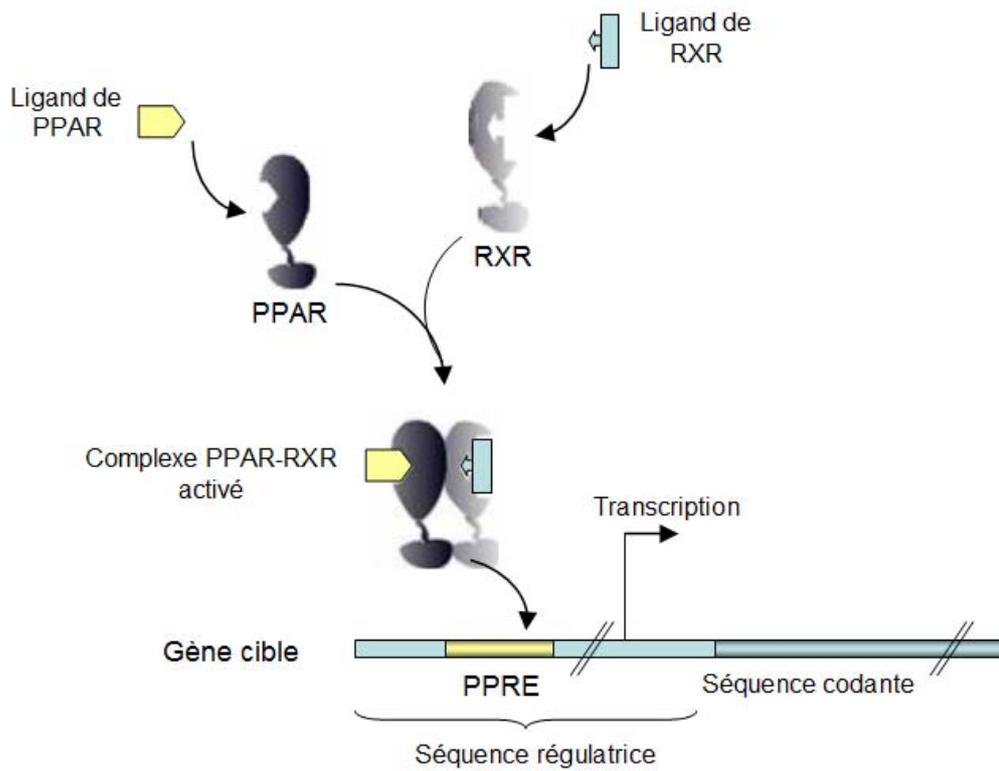


Figure I-17 : Activation de PPAR (α , β ou γ) par liaison au ligand et hétérodimerisation avec RXR pour induire l'expression des gènes cibles. Ligands en commun entre de PPAR et RXR : fibrates, phtalates, acides gras et dérivés (AGsat, AGLPIs, eicosanoïdes...).

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et comptent trois isotopes : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . PPAR α est exprimé de façon prépondérante au niveau du foie, des reins et du coeur (Braissant *et al.* 1996), où il exerce un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et dans l'assemblage des VLDL (Sampath et Ntambi, 2005). PPAR γ est surtout exprimé au niveau du tissu adipeux (Braissant *et al.*; 1996), où il joue un rôle clé dans la différenciation adipocytaire. PPAR β/δ est exprimé de façon ubiquitaire (Braissant *et al.*, 1996), mais ses fonctions exactes ne sont pas encore clairement définies, car les études portant sur les rôles physiologiques de PPAR β/δ ont été longtemps rendues difficiles du fait du manque d'activateurs spécifiques et puissants de cette isoforme. PPAR β/δ pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol (Oliver *et al.*, 2001) et interviendrait dans la régulation de l'oxydation des lipides, comme PPAR α (Takana *et al.*, 2003).

La modulation de la transcription des gènes cibles par les PPARs nécessite une activation du facteur de transcription par liaison à des ligands, parmi lesquels figurent les acides gras. Les facteurs de transcription PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont ainsi capables de relayer l'effet transcriptionnel des acides gras. Tous les acides gras n'ont pas la même aptitude à activer PPAR α : les AGPI n-3 sont des activateurs plus puissants que les AGPI n-6, eux même plus puissants que les acides gras saturés (Desvergne et Wahli, 1999). Une fois activé, PPAR α va former un hétérodimère avec RXR (Retinoid X Receptor) qui va pouvoir se fixer sur une séquence d'ADN spécifique, le PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element), dans la séquence régulatrice du gène cible (Figure I-17). L'association des hétérodimères PPAR/RXR avec les PPREs des gènes cibles permet le recrutement de coactivateurs qui vont permettre le remodelage de la chromatine et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Des PPRE ont ainsi été identifiées au niveau des séquences régulatrices de la CPT I et de l'ACO (Desvergne et Wahli, 1999) chez les mammifères.

PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ ont récemment été décrits chez plusieurs espèces de poissons, comme le saumon atlantique (*Salmo salar*) (Ruyter *et al.*, 1997), le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Ibabe *et al.*, 2002), le fugu (*Takifugu rubripes*) (Maglich *et al.*, 2003), la truite fario (*Salmo trutta*) (Batista-Pinto *et al.*, 2005), le carrelet (*Pleuronectes platessa*) et la daurade royale (*Sparus aurata*) (Leaver *et al.*, 2005). Cependant, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles concernant la régulation des gènes du métabolisme lipidique par PPAR α chez les poissons. Ainsi, à ce jour, des PPRE ont été identifiés dans les séquences régulatrices de l'ACO uniquement chez le poisson zèbre (Heinäniemi *et al.*, 2007). Néanmoins, un certain

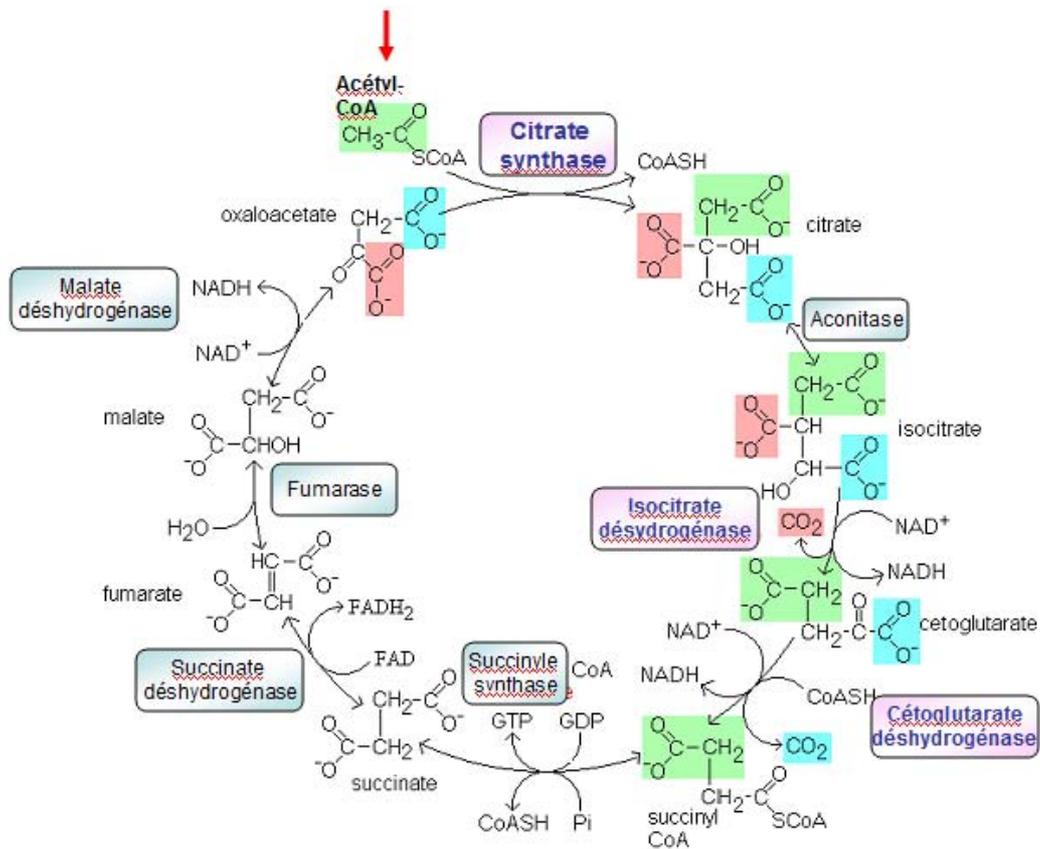


Figure : I-18 : Cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs)

nombre d'éléments suggère que la régulation des gènes du métabolisme lipidique par PPAR α observée chez les mammifères existerait également chez les poissons. Ainsi, une augmentation de l'activité de l'ACO en réponse à l'administration de fibrates, ligands naturels des PPARs, a été observée chez le poisson rouge (Trudeau *et al.*, 2005). De même, Laville *et al.* (2004) ont décrit une induction de la production d'espèces activées d'oxygène en réponse à une exposition aux fibrates dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel en culture.

I-4.4.3 Le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs)

Le cycle de Krebs est formé d'une succession de 8 réactions enzymatiques (figure I-18) qui se déroulent dans la matrice mitochondriale. C'est l'étape finale du catabolisme oxydatif des glucides, des acides gras et des acides aminés, qui couvre la plus grande part des besoins énergétiques de la cellule grâce à la formation de coenzymes réduits qui sont réoxydés dans la chaîne respiratoire. Trois réactions du cycle sont irréversibles, et constituent des points de contrôle du flux global du cycle de Krebs. Ces trois réactions sont catalysées par

- la citrate synthase (CS) qui catalyse la condensation d'un acétyl-CoA avec un oxalo-acétate (4 C).

- l'isocitrate déshydrogénase (ICDH), qui catalyse la première réaction d'oxydo-réduction du cycle. Chez la plupart des vertébrés, il existe deux isocitrate déshydrogénases : l'une à NAD⁺ rencontrée exclusivement dans les mitochondries et fonctionnant dans le cycle tricarboxylique, l'autre à NADP⁺ présente à la fois dans les mitochondries et dans le cytoplasme (Lowenstein et Smith, 1962). La forme cytosolique de l'ICDH-NADP⁺ fournit du NADPH pour la lipogénèse, et de α -cétoglutarate pour la formation de glutamate et d'aspartate lors des réactions de transamination (Saxrud *et al.*, 1996). Chez les poissons, il n'existerait qu'une forme active de l'ICDH, la forme NADP⁺-dépendante.

- le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Cette enzyme est activée par le calcium. Elle est inhibée par son produit, le succinyl-CoA et un rapport NADH, H⁺/NAD⁺ élevé.

Les réactions suivantes permettent, par réductions et hydratations, la régénération de l'oxalo-acétate, qui peut alors prendre en charge un nouvel acétyl-CoA.

Pour un acétyl-CoA entrant dans le cycle, sont produits 1 coenzyme A, 2 CO₂, 1 GTP 1 NADPH, H⁺, 1 NADH, H⁺ et 1 FADH₂.

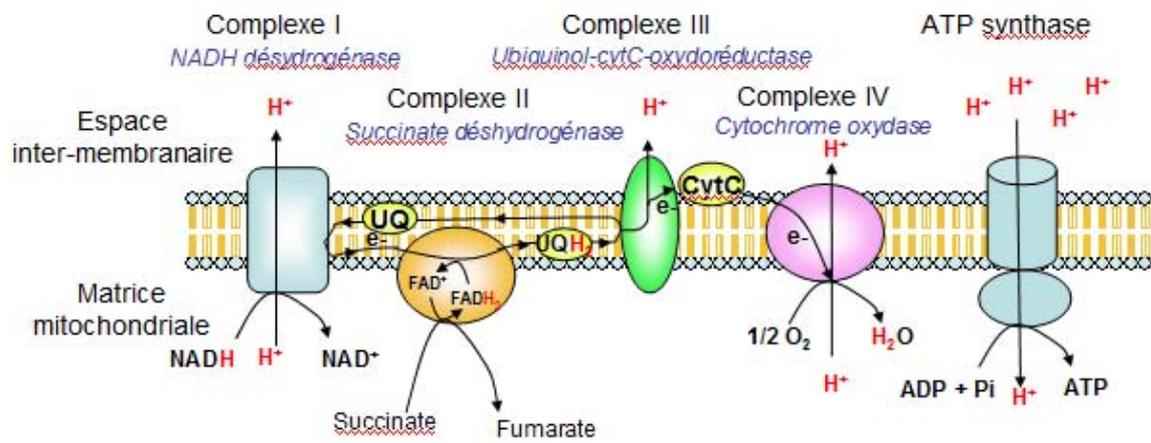


Figure I-19 : Chaîne respiratoire mitochondriale

I-4.4.4 la chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire est un ensemble de cinq complexes protéiques inclus dans la membrane interne des mitochondries, auxquels sont associés deux cofacteurs qui assurent l'interface entre les complexes (Figure I-19).

- Complexe I (NADH déshydrogénase) : le premier complexe oxyde le NADH^+ , H^+ , et transmet deux électrons au coenzyme Q ou ubiquinone (UQ). L'énergie de cette oxydoréduction permet d'éjecter quatre protons hors de la matrice mitochondriale.

- Complexe II (succinate déshydrogénase) : le second complexe est commun au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Ce second complexe oxyde le FADH_2 en FAD. En réalité, le FAD est interne au complexe. Le complexe va en fait oxyder le succinate en fumarate, (réaction du cycle de Krebs), les électrons récupérés servant à réduire le FAD en FADH_2 . Le FADH_2 est réoxydé en FAD en transmettant deux électrons à l'ubiquinone.

- l'ubiquinone réduit transporte les électrons à travers la membrane jusqu'au complexe III qu'il va réduire.

- Complexe III (Ubiquinol- Cytochrome C- oxydoréductase) : ce complexe se réoxyde en transmettant les électrons au cytochrome C. Cette réoxydation fournit l'énergie nécessaire pour éjecter quatre protons hors de la matrice mitochondriale.

- Le cytochrome C transporte les électrons jusqu'au complexe IV, qu'il va réduire à son tour.

- Complexe IV : (Cytochrome oxydase, COX) est l'oxydant qui va permettre au complexe IV de retrouver son état antérieur et d'éjecter quatre protons est l'oxygène. L'oxygène réduit va former, avec des protons de la matrice, une molécule d'eau, ce qui va encore augmenter le gradient de proton.

-enfin, le dernier complexe, l'ATP-synthase.

I-5 Influence des lipides alimentaires sur les voies métaboliques associées à l'engraissement musculaire

L'augmentation des masses lipidiques corporelles résulte d'un bilan positif de la balance énergétique de l'organisme. En raison de la forte densité énergétique des triglycérides, un déséquilibre de l'homéostasie énergétique est facilement obtenu dans le cadre d'un régime riche en lipides. L'énergie en excès est alors principalement stockée sous forme de triglycérides. Contrairement aux lipides, les capacités de stockage du glycogène dans l'organisme sont limitées chez les poissons comme chez les mammifères (quelques centaines de grammes chez l'humain) (Fournier *et al.*, 2004). Une exposition prolongée à un régime à haute valeur énergétique favorise par conséquent le développement des masses adipeuses, affectant en premier lieu les sites préférentiels de stockage des triglycérides de l'espèce. Chez les mammifères, le muscle squelettique présente une certaine capacité à stocker des lipides. Ce site de stockage, bien que limité, constitue une source d'énergie non négligeable dans le cadre de l'exercice musculaire. Plusieurs études ont montré que chez des sujets physiquement entraînés, un régime riche en lipides favorisait l'augmentation de la teneur en lipides du muscle (Kiens *et al.*, 1987; Starling *et al.*, 1997). Une élévation de la quantité de lipides musculaires a également été observée chez le mini-porc du Yucatan nourri avec un régime hyperénergétique/hyperlipidique (Guillerm-Regost *et al.*, 2006). Un apport énergétique alimentaire plus élevé favorise aussi l'accrétion des dépôts lipidiques corporels, y compris dans le muscle, chez la plupart des espèces de poissons (Ackman *et al.*, 1995), et la plupart des vertébrés en général (Pérusse et Bouchard, 2000 ; Geay *et al.*, 2001; Zanusso *et al.*, 2003).

I-5.1 Effet des lipides alimentaires sur la lipogénèse

De nombreuses études ont montré que l'activité des enzymes de la lipogénèse était modifiée par la teneur en lipides de l'aliment chez les poissons comme chez les mammifères. En effet, l'ingestion d'aliments à forte teneur en lipides diminue l'activité des enzymes de la lipogénèse chez les rongeurs, le porc et les ruminants (Clarke et Hembree, 1990 ; Chilliard, 1993 ; Hillgartner *et al.*, 1995). Chez le rat, l'ingestion d'un aliment riche en lipides entraîne une diminution du taux d'ARN messager de l'AGS, fortement corrélée à la diminution de l'activité de l'enzyme, ce qui suggère une régulation transcriptionnelle de l'AGS chez les

mammifères (Clarke *et al.*, 1990; Shillabeer *et al.*, 1990), alors que la diminution de l'activité de la G6PD semble plutôt résulter d'une régulation de type post-transcriptionnelle (Hodge et Salati, 1997 ; Stabile *et al.*, 1998). Cet effet inhibiteur des lipides alimentaires sur la lipogénèse est plus marqué lorsque l'alimentation est riche en AGPI, et notamment en AGPI n-3 d'origine marine (Zampelas *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 2001). Ainsi, l'expression de gènes codant pour des enzymes de la lipogénèse hépatique (AGS, EM, ACC et la protéine spot S14) et de la glycolyse (glucokinase [GK] et pyruvate kinase [PK]) est réprimée chez des rats nourris avec des régimes hyperlipidiques contenant des AGPI n-3 d'origine marine (Jump *et al.*, 1994, 1999). Cette répression par les AGPI n-3 chez les mammifères se ferait, du moins en partie, via une diminution de l'activité des facteurs de transcription SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) et ChREBP ("Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein) (Clarke, 2001 ; Pégrier *et al.*, 2004 , Dentin *et al.*, 2005). Chez les mammifères, des éléments de réponse au facteur de transcription SREBP-1c ont été identifiés au niveau des séquences régulatrices de nombreux gènes codant pour des enzymes de la lipogénèse, dont l'acétyl-CoA synthase (Luong *et al.*, 2000), l'ACC (Magana *et al.*, 1997), et l'AGS (Magana et Osborne, 1996). De même, des éléments de réponse à ChREBP ont été identifiés au niveau des séquences promotrices de l'ACC (O'Callaghan *et al.*, 2001) et de l'AGS (Rufo *et al.*, 2001). Les AGPI affecteraient l'activité de SREBP à la fois en diminuant la stabilité de son ARNm et son taux de maturation (Xu *et al.*, 2001).

Chez les poissons, une forte augmentation de la teneur en lipides de l'aliment diminue également l'activité de l'AGS, de l'ACC, ainsi que des principales enzymes génératrices de NADPH (G6PDH et EM) dans le foie. Ceci a été démontré chez de nombreuses espèces, comme la truite arc-en-ciel (Gélineau *et al.*, 2001; Rollin *et al.*, 2003), le saumon Atlantique (Arnesen *et al.*, 1993), le bar européen (Dias *et al.*, 1998, 1999; Boujard *et al.*, 2004), la carpe (Shimeno *et al.*, 1995), le poisson chat (Likimani et Wilson, 1982). Concernant l'effet de la composition en lipides de l'aliment, une augmentation de la teneur en AGPI n-3 dans des aliments iso-lipidiques est associée à une diminution de l'activité des principales enzymes de la lipogénèse chez le saumon atlantique (Menoyo *et al.*, 2004). De même il a été observé *in vitro* un effet inhibiteur de l'EPA, du DHA et de l'acide linoléique sur les activités G6PDH et AGS sur des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Alvarez *et al.*, 2000). Par contre, selon d'autres études, le remplacement de l'huile de poisson, riche en AGPI n-3, par des huiles végétales, riches en AGPI n-6, ne semble pas affecter l'activité des principales enzymes de la lipogénèse chez le saumon Atlantique (Tortensen *et al.*, 2004), la truite arc-en-ciel (Richard *et*

al., 2006a), ou le bar européen (Richard *et al.*, 2006b). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par une différence insuffisante des teneurs en AGPI n-3 et AGPI n-6 dans le cadre des dernières études évoquées. En effet, chez les poissons, la régulation de la lipogénèse semble, de façon générale, moins finement contrôlée par la teneur et la composition en lipides de l'aliment que chez les mammifères. Ainsi, chez les poissons, la diminution de l'activité des principales enzymes de la synthèse *de novo* des acides gras n'est effective que pour des taux de lipides alimentaires supérieurs à 10% (Henderson et Sargent, 1981; Brauge *et al.*, 1995a), contrairement aux mammifères chez lesquels le seuil d'inhibition est de l'ordre de 3% (Iritani *et al.*, 1984; Kelley *et al.*, 1987).

☞ *Un apport alimentaire élevé en lipides (supérieur à 10%) diminue l'activité les principales enzymes de la lipogénèse (ACC, AGS, G6PD et EM) chez les poissons. En revanche, et contrairement aux mammifères, l'effet des variations de la teneur en lipides de l'aliment sur l'expression des gènes codants pour ces enzymes n'a pas été étudié jusqu'à présent.*

D'autre part, l'existence des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP, ainsi que la présence d'éléments de réponse à ces facteurs de transcription au niveau des séquences régulatrices des principaux gènes de la lipogénèse n'ont pas encore été démontrées chez les poissons.

I-5.2 Effets des lipides alimentaires sur la concentration en lipides plasmatiques

Selon certaines études menées chez l'Homme et le rat, l'ingestion d'aliments à forte teneur en lipides entraîne une diminution de la concentration en triglycérides et VLDL plasmatiques par rapport à celle d'un aliment isocalorique à faible taux de lipides, mais riche en glucides (Parks et Hellerstein, 2000; Axen et Axen, 2006). Cette diminution de la concentration en triglycérides plasmatiques serait principalement due à une diminution de la synthèse endogène des triglycérides, de la sécrétion et de la clairance des VLDL (Parks *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2003). Dans le cadre d'une alimentation eucalorique (qui satisfait une balance énergétique neutre), la teneur en triglycérides plasmatiques chez l'homme n'est pas modifiée par une alimentation riche en lipides alors qu'elle est fortement augmentée par une alimentation riche en glucides (Schwarz *et al.*, 2003). La quantité de lipides de l'aliment semble donc ne pas avoir d'effet sur la concentration en triglycérides plasmatiques. En

revanche, un apport alimentaire hypercalorique en lipides induit une augmentation du taux de lipides plasmatiques chez le rat (Akiyama *et al.*, 1996). La nature des acides gras de l'aliment influe également sur la concentration en lipides plasmatiques chez les mammifères. Plusieurs études ont rapporté une diminution des lipides plasmatiques après l'administration d'AGPI n-3 chez l'homme (Beynen et Katan, 1989; Harris, 1989; Volek *et al.*, 2000). L'effet hypolipémiant des AGPI n-3 semble être dû à une réorientation des acyls-CoA vers les voies oxydatives au détriment de la synthèse de nouveaux triglycérides.

Chez les poissons, l'effet de l'augmentation de la teneur en lipides de l'aliment sur la concentration en triglycérides plasmatiques reste controversé. Une teneur en lipides élevée de l'aliment ne semble pas modifier la concentration en triglycérides plasmatiques chez le turbot (Regost *et al.*, 2003), la truite fario (Regost *et al.*, 2001) ou le saumon Atlantique (Hemre et Sandnes, 1999; Torstensen *et al.*, 2001). Par contre, des études menées sur la truite arc-en-ciel ont montré que l'ingestion d'aliments enrichis en lipides apportés par de l'huile de poisson entraînait une élévation du taux de triglycérides plasmatiques (Arantzamendi, 2002; Panserat *et al.*, 2002). La nature des acides gras alimentaires ne semble pas non plus affecter la concentration en triglycérides plasmatiques chez le saumon atlantique (Torstensen *et al.*, 2000; 2004), la truite arc-en-ciel ou le bar européen (Arantzamendi, 2002; Figueiredo-Silva *et al.*, 2005). En revanche, la composition en acides gras des lipides contenus dans les lipoprotéines est modulée par la nature des acides gras de l'aliment (Lie *et al.*, 1993; Torstensen *et al.*, 2000; 2004).

I-5.3 Effets des lipides alimentaires sur le captage des lipides plasmatiques par les tissus périphériques

Kiens *et al.* (1987) ont montré que chez l'être humain entraîné physiquement, un régime riche en lipides administré de façon prolongée augmentait l'activité de la LPL au niveau du muscle *vastus lateralis*. Des résultats similaires ont été obtenus par Thompson *et al.* (1984). Chez le rat, l'ingestion d'aliments riches en lipides induit une augmentation de l'activité LPL dans le tissu adipeux brun, le coeur, le diaphragme et une diminution dans le tissu adipeux blanc épидidymal et périrénal (Deshaies *et al.*, 1988 ; Erskine *et al.*, 1994). Chez cette même espèce, une alimentation riche en lipides augmente le taux d'ARNm LPL dans le tissu adipeux brun et le diminue dans le tissu adipeux blanc épидidymal, mais le taux d'ARNm n'est pas modifié dans le tissu adipeux blanc périrénal, le coeur et le diaphragme (Takahashi *et al.*, 2000; Erskine *et al.*, 1994 ; Takahashi et Ide, 2001). Le niveau de régulation de la LPL

par la teneur en lipides de l'aliment paraît donc variable selon les tissus chez les mammifères. D'autre part, certaines études ont montré que l'activité de la LPL pouvait être modifiée par le degré d'insaturation des acides gras alimentaires : une augmentation de l'activité de la LPL a ainsi été observée chez des individus nourris avec des régimes enrichis en AGPI (Coiffier *et al.*, 1987, Levy *et al.*, 1993).

Très peu d'études ont analysé l'effet des lipides alimentaires sur l'activité de la LPL chez les poissons. Chez la truite arc-en-ciel, l'activité LPL est augmentée dans le tissu adipeux périvercélal lorsque l'aliment est riche en lipides alors qu'elle n'est pas modifiée dans le muscle et le foie (Arantzamendi, 2002). Chez la daurade royale, une augmentation du taux de lipides dans l'alimentation entraîne une élévation du taux d'ARNm LPL dans le foie, alors qu'il n'y a pas de modification du taux d'ARNm LPL dans le tissu adipeux périvercélal (Liang *et al.*, 2002).

☞ *Ces données suggèrent une régulation tissu-spécifique de la LPL par la teneur en lipides de l'aliment, avec une augmentation de la capacité de captage des acides gras par la LPL au niveau des sites préférentiels de stockage de l'espèce considérée (tissu adipeux chez la truite et foie chez la daurade) lorsque l'apport de lipides alimentaires est élevé.*

I-5.4 Effet des lipides alimentaires sur la β -oxydation des acides gras

I-5.4.1 Au niveau du foie

Outre son rôle prépondérant dans la synthèse *de novo* des lipides chez les poissons, les oiseaux et l'Humain, le foie joue également un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, et notamment lipidique. En effet, les différents nutriments apportés par l'alimentation sont délivrés au foie via la veine porte: acides aminés et peptides, glucides simples ainsi qu'une partie des lipides d'origine alimentaire. Le foie reçoit également les métabolites plasmatiques comme les acides gras libres libérés dans le sang lors de la lipolyse. Le foie joue un rôle de senseur métabolique, et adapte son métabolisme en fonction des flux de nutriments.

De nombreuses études menées chez les mammifères, et en particulier chez le rat, ont montré qu'un apport élevé en lipides alimentaires, notamment en huiles de poisson, augmentait la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale dans le foie (Ishii *et al.*, 1980, Neat *et al.*, 1980, Thomassen *et al.*, 1982). De même, il a été démontré que le taux de

transcription hépatique de la CPTI-A était élevé chez des rats nourris avec un régime riche en lipides, et diminuait chez des rats nourris avec un régime riche en glucides (Thumelin *et al.*, 1994). La comparaison de lignées de souris congéniques invalidées pour le gène PPAR α (PPAR α -/-) et de souris contrôle ont montré par ailleurs que l'effet stimulant d'un régime riche en lipides sur l'expression des principales enzymes de la β -oxydation des acides gras était relayé par PPAR α au niveau du foie (Patsouris *et al.*, 2006). Tout comme pour la lipogénèse, les effets de l'apport en lipides sur les enzymes de la β -oxydation varient en fonction de la nature des acides gras alimentaires, avec un effet plus prononcé exercé par les AGLPI. L'administration répétée d'EPA purifié chez le rat stimule l'activité et l'expression de la CPTI et de l'ACO au niveau hépatique (Aarsland *et al.*, 1990; Totland *et al.*, 2000), tandis que l'administration de DHA induit exclusivement une augmentation de l'expression de l'ACO (Totland *et al.*, 2000). Les péroxysomes jouent un rôle majeur dans l'oxydation des AGLPI (Osmundsen *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1994). Il n'est donc pas étonnant qu'un apport alimentaire élevé en huile de poisson, riche en 20:5 n-3 et en 22:6 n-3, induise une augmentation de l'expression des enzymes de la β -oxydation péroxysomale (Baillie *et al.*, 1999; Neschen *et al.*, 2002).

L'effet de la teneur en lipides de l'aliment sur la capacité d'oxydation hépatique des acides gras n'a fait l'objet que de peu d'études chez le poisson. Une étude menée chez le saumon atlantique montre néanmoins un effet stimulant d'un régime riche en lipides sur l'activité de l'HOAD dans le foie (Menoyo *et al.*, 2003). Dans une autre étude, Kennedy et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'ingestion d'un régime riche en lipides augmentait la β -oxydation hépatique des acides gras, ainsi que l'expression de la CPTI, mais sans que celle-ci ne soit accompagnée d'une augmentation de son activité. Les travaux de Gutieres (2003) sur la truite arc-en-ciel ont montré que l'activité hépatique de la CPTI était plus élevée avec un régime riche en lipides (28%) qu'avec un régime de teneur en lipides plus faible (14%), mais que cette différence d'activité ne s'accompagnait pas d'une différence du niveau d'expression de l'isoforme a de la CPTIa mesuré au même moment (5 heures après le dernier repas). Des analyses complémentaires, effectuées en comparant les cinétiques post-prandiales de l'activité et du niveau d'ARNm de la CPTIa au niveau du foie, ont par ailleurs montré un décalage probable de la réponse à la prise alimentaire de la CPTI entre le niveau transcriptionnel et le niveau post-transcriptionnel chez cette espèce (Gutieres, 2003). Tandis que la régulation transcriptionnelle de la CPTIa au niveau du foie surviendrait à très court terme après repas (dans les 2 heures), la régulation post-transcriptionnelle se mettrait en place beaucoup plus tard. Cependant, ces résultats contradictoires et l'absence de relation directe

observée pour la CPTI entre le niveau d'ARNm d'une part et d'activité d'autre part pourrait aussi s'expliquer par la co-existence de différentes isoformes de la CPTI chez les salmonidés. Enfin, chez la carpe (Du *et al.*, 2006), aucune différence n'a été observée pour la β -oxydation mitochondriale et l'activité de la CPTI au niveau du foie en réponse à des régimes de teneur en lipides différentes (2, 6 et 10% de lipides), tandis que la β -oxydation péroxyssomale était significativement plus faible avec le régime le plus riche en lipides. A noter que les performances de croissance étaient également plus faibles chez les carpes nourries avec cet aliment. Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, la nature des acides gras du régime ne semble pas modifier les capacités de β -oxydation chez le saumon atlantique (Tortensen *et al.*, 2000; Stubhaug *et al.*, 2007).

☞ *Ces données suggèrent que la régulation hépatique de la β -oxydation, et notamment de la CPTI, par la quantité et la nature des lipides d'origine alimentaire est moins efficace chez la truite arc-en-ciel que chez les mammifères.*

I-5.4.2 Au niveau musculaire

Plusieurs études conduites chez le rat et la souris ont montré une augmentation de l'oxydation globale des acides gras, y compris au niveau du muscle squelettique, lors d'une alimentation à long terme avec un régime riche en lipides (Miller *et al.*, 1984; Nemeth *et al.*, 1992; Iossa *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2007). Cette augmentation des capacités oxydatives du muscle est associée à une activité et une expression plus élevées des enzymes de la β -oxydation des acides gras, comme l'HOAD, la CPT I ou l'ACO. Garcia-Roves *et al.* (2007) ont montré qu'une augmentation d'acides gras libres plasmatiques résultant de l'administration d'héparine chez le rat, induisait l'expression de la citrate synthase (CS), d'enzymes de la chaîne respiratoire (ATP-synthase, cytochrome oxydase et NADH-ubiquinone oxydoréductase), de la CPT I et de PPAR α dans le muscle. Ces données suggèrent qu'un apport plus important en acides gras délivré au muscle induirait une augmentation de ses capacités à utiliser les lipides comme source d'énergie. Chez l'humain également, l'ingestion d'aliments riches en lipides par des sujets physiquement entraînés provoque dans le muscle une expression plus élevée des gènes codant pour la CPT I et l'HOAD par rapport à des sujets nourris avec un aliment iso-calorique riche en glucides (Cameron-Smith *et al.*, 2003). En revanche, chez le mini-porc du Yucatan nourri avec un aliment hyperénergétique riche en lipides saturés, l'élévation de la teneur en lipides musculaires est associée à une diminution de l'expression de la CPT I, mais sans que celle-ci ne soit accompagnée d'une

réduction de l'activité ou de l'expression de l'HOAD (Guillerm-Regost *et al.*, 2006). La nature des acides gras alimentaires influe sur la β -oxydation au niveau du muscle chez le rat, en modifiant notamment l'activité de la CPT I, celle-ci étant plus élevée avec un régime riche en AGPI n-3 qu'avec un régime riche en AGPI n-6 ou en AG saturés (Power et Newsholme., 1997).

L'effet de la teneur en lipides de l'aliment sur l'utilisation des acides gras au niveau musculaire a également été peu étudié chez les poissons. Chez le saumon atlantique, Kennedy *et al.* (2006) ont observé une augmentation de l'expression de PPAR β et de l'activité de la CPTI au niveau du muscle blanc en réponse à un régime riche en lipides, mais pas de différence d'expression des gènes codant pour la CPTI ou PPAR α . L'activité totale de β -oxydation, mesurée par suivi de l'utilisation de lipides radiomarqués, n'était pas non plus modifiée par la teneur en lipides de l'aliment. Dans ses travaux de thèse, Gutieres (2003) a montré que l'expression de la CPTIa dans le muscle blanc était plus élevée suite à un régime riche en lipides par rapport à un régime de teneur en lipides plus faible, mais sans qu'aucune différence d'activité de la CPTI ne soit mise en évidence. Par ailleurs, des mesures de cinétique post-prandiale ont montré une augmentation significative du niveau d'ARNm de la CPTIa seulement 72 heures après la prise alimentaire (Gutieres, 2003), effet attribuable au jeûne. Aucune différence post-prandiale de l'activité CPTI n'a été mise en évidence. Là encore, ces contradictions entre le niveau de transcrit et l'activité de la CPTI pourraient s'expliquer en partie par la présence de différentes isoformes de la CPTI chez la truite.

I-6 Influence de la sélection génétique sur les voies métaboliques associées à l'engraissement musculaire

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la sélection ciblée sur la composition corporelle est un phénomène récent en aquaculture. De ce fait, il n'existe pour le moment aucune donnée relative à ses effets sur les principales voies métaboliques impliquées dans l'engraissement des différents compartiments corporels chez les poissons. Seules les données relatives à la sélection sur les performances de croissance sont disponibles.

En revanche, chez les autres animaux d'élevage, de domestication plus ancienne, davantage de données sont disponibles dans la littérature concernant l'effet de la sélection génétique. Cependant, l'effort de sélection mené jusqu'à présent chez la plupart de ces espèces a surtout eu pour objectif de d'améliorer les rendements en viande en diminuant l'état d'engraissement des carcasses, entraînant en même temps une diminution de la teneur en lipides intramusculaires. Ainsi, chez le porc, les schémas de sélection se sont surtout focalisés sur l'épaisseur de graisse sous-cutanée au niveau dorsal (bardière), sans considération particulière pour la teneur en lipides musculaires, à tel point que l'objectif actuel de sélection est d'augmenter le taux de lipides intramusculaires (actuellement entre 1,5 et 2 %) pour les races porcines sans pour autant augmenter l'adiposité générale de la carcasse (Wood et Warriss, 1992). De même, chez le poulet, la dinde ou encore le canard, l'effort de sélection a, jusqu'à présent, essentiellement porté sur la réduction des dépôts adipeux abdominaux ainsi que sur l'augmentation de la vitesse de croissance. Si aucune différence de teneur en lipides musculaires n'a été observée entre les animaux issus de cette sélection pour le poulet et la dinde (Ricard et Touraille, 1988), la réduction des tissus adipeux abdominaux a en revanche entraîné une diminution de teneur en lipides du muscle chez le canard (Baeza *et al.*, 1997). Chez le lapin, c'est essentiellement sur la vitesse de croissance, avec pour objectif la diminution de l'âge à l'abattage, que s'est effectuée la sélection. Les données relatives à l'évolution de la teneur en lipides musculaire en fonction de la vitesse de croissance chez cette espèce restent contradictoires et semblent dépendre du muscle considéré (Piles *et al.*, 2000, Hernández *et al.*, 2004; Larzul *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2005).

Les différences de teneurs en lipides musculaires engendrés par la sélection opérée chez ces différentes espèces ne sont donc finalement qu'un effet collatéral, et non pas le résultat d'une sélection ciblée sur ce caractère, comme c'est le cas pour la truite.

I-6.1 Effet du potentiel génétique pour la teneur en lipides musculaires sur la lipogénèse

La comparaison de races de porcs connues pour présenter des différences d'adiposité corporelle, comme la race chinoise Meishan, plus grasse que les races européennes Large White ou Piétrain a permis de mettre en évidence des différences de capacité de lipogénèse au niveau du muscle *Semimembranosus*, avec des activités basales plus élevées de la G6PDH mais surtout de l'EM, (principal fournisseur de NADPH pour la lipogénèse chez le porc) chez la race Meishan (Mourot *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus en comparant des porcs de race Ibérique (caractérisée par une teneur en lipides corporels, et notamment musculaires, particulièrement élevée) et Landrace (Morales *et al.*, 2002). En revanche, aucune différence n'a été observée pour l'AGS, l'ACC ou l'EM du muscle *Longissimus* entre des porcs (Duroc x Large White) présentant des différences de teneur en lipides musculaires (Damon *et al.*, 2006). Chez les bovins, Bonnet *et al.* (2005) ont montré que l'activité de la G6PDH au sein des muscles *Longissimus thoracis*, *Rectus abdominis* et *Semitendinosus* était plus faible chez des boeufs Limousin (faible niveau de persillé) par rapport à des Angus et des croisés Angus x Noire Japonaise (niveau de persillé élevé), et que le niveau d'activité de l'enzyme était lié à la quantité de tissu adipeux intramusculaire.

☞ *Ces données suggèrent que les différences de teneur en lipides musculaires observées entre les différentes races de porcs et de bovins sont positivement associées à des différences de lipogénèse.*

Cependant, contrairement au porc et aux bovins, qui présentent la particularité d'avoir une lipogénèse active au niveau du tissu adipeux, y compris dans le muscle au niveau des adipocytes interfasciaux (O'Hea et Leveille, 1969b, Gondret *et al.*, 1998), la truite arc-en-ciel, et les poissons en général, ont une lipogénèse essentiellement hépatique. Les modèles bovins et porcins ne sont donc pas les plus pertinents pour établir une comparaison avec la truite, puisque la modulation des dépôts lipidiques par la lipogénèse au niveau des tissus adipeux et musculaires s'effectue *in situ*.

En revanche, chez les oiseaux, la synthèse *de novo* des lipides s'effectue également majoritairement au niveau du foie (O'Hea et Leveille, 1969a). Les oiseaux peuvent, de ce fait, constituer un modèle de comparaison plus adapté.

Le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) est essentiellement élevé pour la production de viande et le canard Pékin (*Anas platyrhynchos*), est élevé pour la production d'œufs et

d'hybrides (♀ Pékin x ♂ Barbarie). Ces deux espèces présentent des différences de capacité de stockage des lipides aussi bien au niveau du foie qu'au niveau des tissus périphériques (Hermier *et al.*, 2003). Le canard de Barbarie stocke davantage de lipides au niveau hépatique par rapport au canard Pékin, qui lui dépose davantage de lipides au niveau musculaire et au niveau du tissu adipeux abdominal. La comparaison de ces différents « génotypes » a montré que si les activités de la GK et de la G6PD étaient plus élevées dans le foie des canards Pékin, celles de l'AGS et de l'ACC étaient plus faibles chez cette espèce par rapport aux canards de Barbarie (Baeza *et al.*, 2005). Il semblerait donc que la lipogénèse hépatique soit moins efficace chez le canard Pékin que chez le canard de Barbarie. En revanche, les concentrations plasmatiques en triglycérides, phospholipides et cholestérol sont plus élevées chez le canard Pékin que chez le canard de Barbarie, quel que soit le temps après la prise alimentaire et la modalité l'alimentation (à satiété ou gavage). Ces données suggèrent une capacité d'exportation des lipides plus importante chez le génotype Pékin, qui favoriserait l'engraissement des tissus périphériques.

☞ *Chez les oiseaux, la teneur en lipides des tissus périphériques, dont le muscle, ne semble pas corrélée à la lipogénèse hépatique. Comparé aux mammifères, il semble que la capacité de sécrétion par le foie des lipides néo-synthétisés et leur transport plasmatique soit une étape plus déterminante dans l'engraissement des tissus périphériques.*

I-6.2 Effet du patrimoine génétique sur le captage des lipides par le muscle

D'après les travaux de McNamara et Martin (1982) portant sur deux lignées de porcs sélectionnées de façon divergente sur la base de l'épaisseur de la bardière, l'activité de la LPL au cours de la gestation est plus élevée au niveau du tissu adipeux sous cutané chez les individus de lignée grasse (McNamara et Martin, 1982). La comparaison des profils d'expression génique obtenus par analyse du transcriptome musculaire entre les races bovines Holstein et Noire Japonaise (Wang *et al.*, 2005) indique un niveau de transcrit codant pour la LPL plus élevé pour cette dernière, qui se distingue de la race Holstein par un niveau de lipides intermusculaires plus élevé. En revanche, pour le porc, la même approche menée chez des porcs de races Duroc et Taoyuan (Lin et Hsu, 2005) révèle au contraire un niveau de transcrit codant pour la LPL plus faible chez la race Taoyuan, pourtant globalement plus grasse que la race Duroc, y compris au niveau musculaire. Chez le mouton également, l'expression de la LPL au niveau du muscle apparaît plus faible chez des béliers de race

kazakh que chez ceux de race Xinjiang, bien que leur teneur en lipides musculaire soit plus élevée que chez ces derniers (Qiao *et al.*, 2008).

☞ *De façon générale, l'activité de la LPL est la plus élevée dans les muscles de type oxydatif (Hocquette et al., 1998), mais aucune relation n'a pu être mise en évidence à ce jour entre l'activité de la LPL ou son niveau d'expression et le contenu en graisse intramusculaire chez les bovins ou le porc (Hocquette et al., 2003 ; Bonnet et al., 2005).*

D'après les travaux de Davail et al. (2003) sur les canards Pékins et Barbarie, l'activité plasmatique de la LPL, est équivalente entre les deux génotypes de canard nourris ad-libitum. Cependant, mesurée au niveau du muscle, l'activité de la LPL est supérieure chez le canard Pékin par rapport au canard de Barbarie, et ce quel que soit la quantité d'aliment ingéré (Chartrin *et al.*, 2006), ce qui pourrait expliquer la teneur en lipides musculaires plus importante observé chez ce génotype.

I-6.3 Effet du patrimoine génétique sur l'utilisation des lipides par le muscle

D'après l'étude menée par Lefaucheur *et al.* (2004), l'activité de l'HOAD et de la CS mesurées au niveau des muscles *Longissimus* et *Rhomboïdeus* est plus élevée chez les porcs de race Meishan comparé avec ceux de race Large White. En revanche, l'activité lactate déshydrogénase (LDH), marqueur du métabolisme glycolytique, est plus élevée chez les porcs Large White que chez les porcs Meishan. L'activité des enzymes HOAD et CS est supérieure dans le muscle *Rhomboïdeus*, de type oxydatif, par rapport au muscle *longissimus*, de type glycolytique. Chez les bovins également, la comparaison des races Limousine, Angus et Angus x Noire Japonaise a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la teneur en lipides musculaire et l'activité des enzymes oxydatives HOAD, CS, COX et ICDH, tandis qu'une corrélation négative était observée entre la teneur en lipides musculaires et l'activité des enzymes glycolytiques phosphofruktokinase (PFK) et LDH (Jurie *et al.*, 2007). Ces corrélations étaient d'autant plus fortes que le muscle considéré était de type oxydatif (*Rectus abdominis* < *Semitendinosus* < *Longissimus thoracis*). Une étude précédente portant sur la comparaison de taurillons de race Limousine, Angus et Bleu Belge avait déjà montré que la teneur en lipides musculaires était corrélée à l'activité de la COX (Barnola et al. 2005). En revanche aucune différence vis-à-vis de l'activité de l'HOAD et de la CS, ou de

l'expression de la CPT1 et de PPAR β n'a été observée entre porcs (Duroc x Large White) présentant des teneurs en lipides musculaires différentes (Damon *et al.*, 2006).

☞ Ces données suggèrent que, chez le porc et les bovins, une teneur en lipides musculaires plus élevée est associée à un catabolisme des acides gras plus important.

Ceci peut paraître surprenant à priori, puisqu'une utilisation plus intense des lipides musculaires devrait en toute logique limiter leur accréation au niveau de ce tissu. Il ne faut cependant pas oublier que chez ces espèces, la lipogénèse s'effectue également au niveau musculaire, et que celle-ci, comme nous l'avons vu précédemment, est positivement corrélée à la teneur en lipides du muscle. Il semblerait donc qu'un turn-over élevé des lipides au niveau musculaire favorise leur dépôt *in situ* chez ces espèces (Gondret et Hocquette, 2006).

L'activité de l'HOAD, utilisée comme marqueur du métabolisme oxydatif, est plus élevée au niveau des muscles *pectoralis major* et *sartorius* chez le canard Pékin que chez le canard de Barbarie, qui présente pourtant de plus faibles teneurs en lipides musculaires.

☞ Il semblerait donc qu'un flux plus important de lipides dans le muscle tende à augmenter le métabolisme oxydatif des acides gras chez les oiseaux comme chez les mammifères.

De façon générale, les muscles les plus riches en lipides sont caractérisés par un métabolisme plus oxydatif. Cela est également vrai chez les poissons, le muscle rouge, caractérisé par un métabolisme oxydatif, a un contenu en lipides plus élevé que le muscle blanc, caractérisé par un métabolisme de type glycolytique.

Malgré de nombreuses recherches effectuées sur ce sujet au cours de ces dernières années, les mécanismes métaboliques qui président à l'établissement de la teneur en lipides intramusculaires chez ces différentes espèces restent mal connus.

- Objectifs de la thèse –

Parmi les facteurs influençant la teneur en lipides intramusculaires, le patrimoine génétique de l'animal et son alimentation sont sans doute les plus aisés à contrôler et/ou manipuler en condition d'élevage.

Les salmonidés ont une aptitude particulièrement importante à stocker les lipides au niveau musculaire, et l'importance de ces dépôts peut être efficacement modulée par l'apport énergétique alimentaire, allant de 3% à plus de 18% de lipides dans ce tissu (Einen *et al.*, 1998 ; Gélinau *et al.*, 2001; Robb *et al.*, 2002). Les salmonidés constituent par conséquent un modèle pertinent pour étudier les mécanismes de dépôts et de mobilisation des lipides au niveau du muscle. Cependant, si les effets d'un apport plus important en lipides alimentaires sur la lipogénèse hépatique sont plutôt bien documentés chez les poissons, ceux exercés sur les autres voies métaboliques restent encore méconnus.

D'autre part, la création de lignées de truite arc-en-ciel par sélection divergente sur la teneur en lipides du muscle dorsal a montré que la sélection génétique pouvait permettre de moduler efficacement et de façon ciblée la teneur en lipides d'un compartiment corporel donné, le muscle, avec des effets limités sur les autres compartiments corporels (Quillet *et al.*, 2005). Lorsque j'ai débuté ma thèse, aucune caractérisation métabolique n'avait été entreprise sur ces lignées, et les mécanismes à l'origine de ces différences de phénotype étaient donc inconnus. En combinant l'effet de l'alimentation à celui de la sélection génétique, Quillet *et al.* (2007) ont montré qu'il était possible d'obtenir un effet cumulatif de ces deux facteurs sur la teneur en lipides musculaires. Toutefois, il n'existait pas de données permettant d'affirmer, a priori, que les mécanismes cellulaires à l'origine de la variabilité génétique du taux de lipides intramusculaires soient identiques à ceux impliqués dans la modulation de ce caractère par l'alimentation.

Ma thèse a donc eu pour objectifs :

- d'approfondir nos connaissances sur l'effet d'une augmentation de l'apport alimentaire en lipides sur la régulation des principales voies métaboliques impliquées dans l'engraissement chez la truite arc-en-ciel,
- de caractériser pour la première fois au niveau moléculaire les différences métaboliques existant entre lignées,

- d'évaluer dans quelle mesure la sélection génétique et la valeur énergétique de l'aliment, utilisées pour moduler la teneur en lipides du muscle, interagissent entre elles pour réguler les différentes voies métaboliques et contrôler les dépôts lipidiques dans le muscle,
- de déterminer si ces deux facteurs empruntent les mêmes mécanismes pour moduler la teneur en lipides musculaires.

Pour cela, nous avons utilisé des individus des deux lignées de truite arc-en-ciel sélectionnées sur la teneur en lipides du muscle issus de la troisième génération de sélection divergente, et nous les avons nourris pendant 6 mois avec un régime faible ou riche en lipides. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la constitution des dépôts lipidiques observés en réponse à la sélection et à l'alimentation, nous avons procédé à une analyse différentielle à l'échelle des gènes et des protéines selon une approche « enzymes candidates », en mesurant dans un premier temps l'expression et l'activité d'enzymes clé des principales voies métaboliques impliquées dans l'utilisation de l'énergie chez les alevins après 6 mois d'alimentation. Nous avons ensuite élargi l'étude en utilisant des approches plus globales à l'échelle du transcriptome et du protéome dans les mêmes échantillons. Ces analyses ont porté sur le muscle blanc, tissu cible de la sélection, et le foie, carrefour métabolique et site de la lipogenèse chez les poissons. L'analyse du tissu adipeux péri-viscéral était également prévue dans le cadre de mes travaux de thèse. Malheureusement, ces analyses n'ont pas pu être réalisées en raison d'une qualité insuffisante des ARN extraits à partir de nos échantillons, la plupart étant en grande partie dégradés. La cause pourrait être liée à des problèmes techniques notamment lors du stockage des échantillons avant extraction.

Chapitre II

Chapitre II

- Matériel et Méthodes -

Les analyses décrites dans ce chapitre ont toutes été réalisées à l'unité INRA-NuAGe de Saint-Pée sur Nivelles, à l'exception des analyses du protéome hépatique, qui ont été réalisées à l'unité INRA-SCRIBE de Rennes

A
B



Torry Fish Fatmeter®

A
B

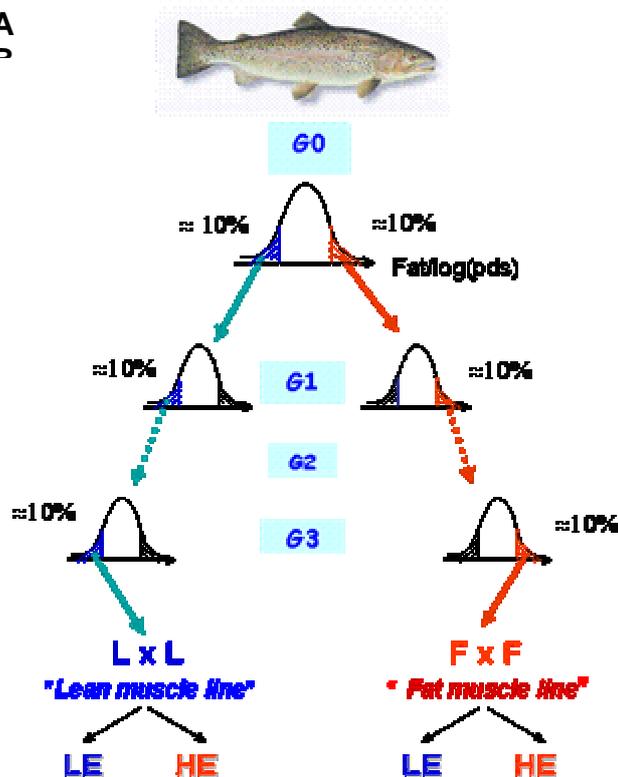


Figure II-1 : Procédure de sélection basée sur l'estimation de la teneur en lipides du muscle, à l'origine des lignées divergentes de truites arc-en-ciel utilisée dans l'expérience. A : l'estimation de la teneur en lipides musculaire est réalisée à l'aide du Torry Fish Fatmeter, en appliquant l'appareil au contact de la peau, sur la partie antérieure dorsale du filet. B : Schéma de la sélection effectuée de façon divergente à partir de l'indice d'adiposité [$FI = \text{fat} / \log(\text{poids})$], en exerçant une pression de sélection de 10% par génération pour chacune des deux lignées. Les truites de chaque lignée issues de géniteurs de 3^{ème} génération de sélection sont celles qui ont été utilisées dans le cadre de la thèse. Les poissons de chaque lignée ont été nourris dès le premier repas et pendant 6 mois avec l'un des deux aliments expérimentaux, LE ("Low Energy diet", 10% de lipides) ou HE ("High Energy diet", 23% de lipides).

II-1 Matériel biologique

II-1.1 Lignées de truites arc-en-ciel

Les deux lignées expérimentales ont été obtenues par sélection divergente sur la base de la teneur en lipides musculaires à partir d'une souche printanière (G0) de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La sélection repose sur une mesure indirecte et non invalidante de la teneur en lipides du muscle dorsal, réalisée à l'aide d'un appareil, le Torry Fish Fatmeter® (Figure II-1A). Cet instrument évalue la teneur en eau des tissus, elle-même inversement corrélée à la quantité de lipides (Craig *et al.*, 1978; Shearer, 1994). Les mesures ont été faites en plaçant la sonde au niveau du muscle dorsal, en avant de la nageoire dorsale et au dessus de la ligne latérale, sur des animaux immatures âgés de 1 an, afin d'éviter le phénomène de mobilisation des lipides musculaires par les gonades observé lors de la maturation sexuelle (Shearer, 1994). Les individus ayant mûri précocement au moment de la sélection ont été écartés de la procédure. De nombreuses études ayant montré l'existence d'une corrélation positive entre teneur en lipides des filets et poids des poissons (Shearer, 1994; Alsted *et al.*, 1995; Johansen et Jobling, 1998), l'estimation de la teneur en lipides fournie par l'appareil (notée Fat) a été corrigée de l'effet du poids des animaux pour donner l'indice d'adiposité (FI), sur lequel s'est basée la sélection des individus: $FI = fat / \log(\text{poids})$. Une pression de sélection de 10% a été exercée à chaque génération, en retenant les animaux situés dans une limite de 10% inférieure (lignée **L**, pour "*Lean muscle line*") ou supérieure (lignée **F**, pour "*Fat muscle line*") de la distribution des individus par rapport à leur valeur de FI (Figure II-1B). Les individus utilisés dans le cadre de ma thèse ont été obtenus à partir des géniteurs issus de la troisième génération de sélection. Seuls les croisements (L x L et F x F) ont été étudiés.

Les fécondations ont été réalisées en Avril 2003, dans les structures expérimentales de la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée (PEIMA, Barrage du Drennec, Sizun, Finistère).

Tableau II-1: Composition analytique des régimes expérimentaux LE (pour "Low energy") et HE (pour "High Energy").

Régime	LE	HE
Huile de poisson	0	15%
MS (%)	93.0	93.3
Protéines (% MS)	57.6	51.1
Lipides (% MS)	9.8	23.1
AGPI n-3 / AGPI n-6	1.5	2.5
Amidon (%MS)	12.1	9.2
Energie brute (kJ/g MS)	21.0	23.8

MS : Matière sèche; AGPI: acides gras polyinsaturés

II-1.2 Régimes alimentaires

Deux aliments expérimentaux (Tableau II-1), désignés **LE** (pour "*Low Energy*") et **HE** (pour "*High Energy*") ont été formulés par l'UMR NuAGe de St-Pée-sur-Nivelle et fabriqués par un producteur d'aliment à partir d'un même mélange d'ingrédients contenant de la farine de poisson comme source protéique. L'aliment **LE** a été retiré de la chaîne de fabrication avant l'ajout d'huile de poisson. Les lipides qu'il contient (9,8%) proviennent de la farine de poisson. Le mélange a été additionné de 15% d'huile de poisson pour fabriquer l'aliment **HE**, qui présente une teneur en lipides de 23%, proche de la teneur maximale en lipides des aliments commerciaux utilisés pour l'élevage des jeunes stades de salmonidés. L'augmentation de la teneur en lipides de l'aliment **HE** (+135%) est accompagnée d'une augmentation de la valeur énergétique de l'aliment (+13,3%) ainsi que du rapport en acides gras polyinsaturés n-3/n-6, et d'une diminution de la proportion de protéines (-11%) et d'amidon (-23%).

II-1.3 Modalités d'alimentation

Au moment de l'émergence, c'est-à-dire juste avant le début de l'alimentation (environ 40 jours après fécondation et 20 jours après éclosion), les poissons de chaque lignée (de poids moyen de 0,16g) ont été répartis en 6 lots de 500 poissons chacun et élevés sur eau de source à température stable ($11,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Trois lots de chaque lignée ont été nourris dès le premier repas et pendant 6 mois avec l'un des deux aliments expérimentaux, **LE** ou **HE** (Figure II-1B). Les aliments ont été distribués en excès jusqu'à ce que les alevins aient atteint un poids moyen de 900mg afin de s'assurer que l'apport alimentaire n'était pas limitant. Au-delà de ce poids, l'aliment a été distribué selon les tables usuelles de rationnement majorées de 10 % pour se placer dans des conditions de satiété, les rations étant réajustées régulièrement en fonction du gain de poids des poissons. A partir du cinquième mois d'alimentation, la taille des poissons a permis de changer la granulométrie des aliments. La quantité d'aliment ingéré par les groupes de poissons a pu être alors mesurée de façon fiable (collecte du non consommé et pesée). Les mesures de l'ingéré ont été effectuées quotidiennement pendant les deux derniers mois de la période de distribution des deux aliments expérimentaux.

II-1.4 Prélèvement des échantillons

A l'issue des 6 mois d'alimentation précoce, 19 poissons par bacs (soit 57 par condition) ont été anesthésiés 24 heures après le dernier repas avec du 2-phenoxyethanol, selon la dose recommandée pour les procédures chirurgicales (0,2 ml/l). Les poissons ont été pesés et mesurés individuellement. Une prise de sang a été effectuée au niveau de la veine caudale à l'aide d'une seringue contenant un mélange d'oxalate de potassium et de fluorure de sodium à 4% pour éviter la coagulation du sang. Le plasma a été collecté après centrifugation à 3500g pendant 10 min, aliquoté et conservé à -20°C jusqu'aux analyses. Les poissons ont été ensuite sacrifiés par section des cervicales. Le foie et les viscères ont été prélevés et pesés afin de calculer les indices hépato-somatique [IHS (%) = 100 x (poids du foie / poids corporel total)] et viscéro-somatique [IVS(%) = 100 x (poids du tractus digestif / poids corporel total)]. Des échantillons de muscle blanc ont été prélevés sur la partie dorsale du filet droit pour les dosages d'activités enzymatiques.

Le filet gauche de chaque poisson a été prélevé, paré et pelé pour analyser la teneur en lipides musculaires. Dans chaque bac, 3 poissons supplémentaires ont été sacrifiés et des échantillons de foie, de muscle blanc et de tissu adipeux péri-viscéral ont été prélevés avec soin pour éviter toute contamination par des RNAses. Tous les tissus prélevés ont été congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'aux extractions.

II-2 Paramètres zootechniques

$$\diamond \text{ Poids moyen initial des poissons (g)} = \frac{\text{BM initiale du bassin (g)}}{\text{Nombre de poissons}}$$

où la biomasse (BM) initiale correspond à celle mesurée en début d'expérimentation, au stade émergence.

$$\diamond \text{ Poids moyen final (g)} = \frac{\text{BM finale du bassin (g)}}{\text{Nombre de poissons}}$$

$$\diamond \text{ Gain de poids frais (kg)} = \text{BM finale} - \text{BM initial}$$

$$\diamond \text{ Taux de croissance journalier (\%)} = \frac{(\text{Poids moyen final}^{1/3} - \text{poids moyen initial}^{1/3})}{\text{Nombre de jours}} \times 100$$

Dans cette formule, le nombre de jours pris en compte sont ceux correspondant à la durée de l'expérimentation, soit les six mois d'alimentation.

$$\diamond \text{ Ingéré volontaire (g MS/kg/jour)} = \frac{\text{Quantité d'aliment ingéré (kg MS)}}{[(\text{BM finale} - \text{BM initiale})/2] \times \text{nombre de jours}}$$

Dans cette formule, la BM initiale est celle mesurée en début de période de mesure de l'ingéré, qui correspond aux deux derniers mois d'alimentation. Le nombre de jours pris en compte ici concerne cette même période. MS : matière sèche (voir paragraphe III-1)

$$\diamond \text{ Efficacité alimentaire (\%)} = \frac{\text{Gain de poids frais}}{\text{Quantité d'aliment sec ingéré (kg MS)}} \times 100$$

$$\diamond \text{ Coefficient d'efficacité protéique} = \frac{\text{Gain de poids frais}}{\text{Quantité de protéines ingérées (kg)}}$$

- ◆ Gain en azote et en lipides :

$$\text{Gain (mg/kg/jour)} = \frac{(\text{Tcorp finale du composé} - \text{Tcorp initiale du composé})}{\text{BM} \times \text{nombre de jours d'expérimentation}}$$

Dans cette formule, le terme *composé* renvoie à l'azote et aux lipides ; Tcorp : teneur corporelle.

- ◆ Rétention des protéines et des lipides :

$$\text{Rétention (\% ingéré)} = \frac{\text{BM finale} \times \text{Tcorp finale du composé} - \text{BM initiale} \times \text{Tcorp initiale du composé}}{\text{Quantité totale du composé ingéré}} \times 100$$

Dans cette formule, le terme *composé* renvoie aux protéines et aux lipides ; Tcorp : teneur corporelle.

Les analyses chimiques nécessaires au calcul de ces formules, comme le taux de matière sèche (MS), ou les teneurs corporelles en composés, sont détaillées dans le paragraphe suivant.

II-3 Analyses de composition corporelle des poissons et de la composition des aliments

II-3.1 Teneur en matière sèche

La teneur en matières sèches (%MS) est obtenue par pesée de l'échantillon avant et après séchage dans une étuve à 105°C pendant 24 heures et refroidissement dans un dessiccateur sous vide.

$$\% \text{ de matière sèche (MS)} = \frac{\text{masse de l'échantillon après dessiccation (g)}}{\text{masse de l'échantillon avant dessiccation (g)}} \times 100$$

II-3.2 Détermination des protéines brutes

La teneur en protéines est déterminée par titration de l'azote total selon la méthode de Kjeldhal pour le dosage de l'azote à l'aide de l'appareil Kjeltex Auto Analyser 1030. L'échantillon est minéralisé à 440°C en présence d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) et d'un catalyseur (mélange de sulfate de potassium (K₂SO₄) et de sélénium (Se)). L'azote produit est fixé par de l'acide sous forme de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). L'ammoniac

est libéré par addition d'une solution de soude, et recueilli dans une solution d'acide borique (H_3BO_3). L'ammoniac est ensuite titré par une solution d'acide sulfurique de concentration connue (0,125 N). Le taux de protéines ($N \times 6,25$) est directement indiqué par le Kjeltec, en fonction de la masse de l'échantillon. Les résultats sont exprimés par rapport au taux de matière sèche.

II-3.3 Détermination des lipides totaux de l'aliment

Le dosage des lipides totaux est réalisé par la méthode de Soxhlet. L'extraction des lipides est effectuée à $155^\circ C$ à l'aide d'éther de pétrole. Le solvant est éliminé par évaporation et le résidu est séché dans une étuve à $105^\circ C$ pendant 1 heure. La masse de lipides totaux est déterminée par pesée après évaporation de la totalité du solvant. Le pourcentage de lipides totaux est exprimé par rapport au taux de matière sèche.

$$\text{Lipides (\% MS)} = \frac{\text{masse de lipides totaux (g)}}{\text{masse de l'échantillon (g) x MS}} \times 100$$

II-3.4 Détermination de la teneur en amidon

La teneur en amidon est mesurée par méthode enzymatique (glucose-amylase-glucose oxydase) selon Thivend *et al.* (1972). L'échantillon est soumis à un traitement hydrothermique qui détruit la structure des grains d'amidon : l'empesage de l'amidon est réalisé par ébullition pendant 3 minutes suivi d'un autoclavage à $135^\circ C$ pendant 1 heure. L'amidon est hydrolysé par la gluco-amylase, à $60^\circ C$ pendant 2 heures, dans une solution de tampon acétique. Les solutions sont ensuite filtrées pendant 12 heures. L'analyseur automatique Beckman permet de déterminer le taux de glucose des hydrolysats. Une solution d'amidon de concentration connue, soumise au même protocole, permet de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse.

$$\text{Glucose (\%)} = \frac{\text{Concentration mesurée x volume d'hydrolysât (L)}}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100$$

Une correction est ensuite effectuée pour évaluer la concentration en amidon (le taux d'amidon est estimé à 90% du taux de glucose). Les résultats sont exprimés par rapport au taux de matière sèche.

II-3.5 Détermination de l'énergie brute

La teneur en énergie brute est déterminée par mesure de l'énergie dégagée par la combustion de l'échantillon, sous pression d'oxygène (20 bars) à l'aide d'un calorimètre adiabatique (IKA, C4000). La teneur en énergie brute est exprimée par rapport au taux de matière sèche.

$$\text{Energie brute kJ / g} = \frac{[(\Delta \times C) - Q]}{\text{Masse de l'échantillon (g) x MS}} \times 100$$

ΔT : augmentation de la température qui se produit au cours de la combustion

C : capacité de la bombe (quantité de chaleur nécessaire pour élever la température de la bombe de 1°C, déterminée à partir d'un témoin, l'acide benzoïque, dont on connaît la chaleur émise par combustion)

Q : quantité de chaleur dégagée par le fil de nickel et de coton servant à l'ignition (0,076kJ)

II-3.6 Détermination de la teneur en lipides musculaires

La teneur en lipides des filets (filet gauche entier) est déterminée selon la méthode de Folch et al. (1957) modifiée, le chloroforme, solvant d'extraction des lipides, étant remplacé ici par du dichlorométhane, moins toxique.

L'échantillon est broyé à l'aide d'un Ultraturrax IKA T 25 dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2/1), contenant 0,01% de BHT (agent antioxydant) puis est filtré 3 fois sous vide (filtre Wathman GF/A55mm déposé sur membrane de filtration en acier inox, recouvert de silice). Le volume final du filtrat obtenu est ajusté à 150 ml avec le même mélange de solvants. Le filtrat est lavé avec 37,5 ml d'une solution de NaCl à 0,73% puis subi une décantation de 12 heures. Durant la décantation, les impuretés hydrosolubles passent dans la phase méthanol/eau tandis que les lipides restent dans le dichlorométhane. La phase inférieure organique est collectée et le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor Büchi). A l'issue de l'évaporation, la quantité de lipides est déterminée par pesée après dessiccation.

II-3.7 Détermination de la concentration en métabolites plasmatiques

Les concentrations en métabolites plasmatiques sont mesurées par des méthodes colorimétriques (lecture spectrophotométrique) réalisées à l'aide de kits enzymatiques

commerciaux : glucose RTU kit (*Biomérieux*, Marcy-l'étoile, France) pour le glucose, PAP 150 kit (*Biomérieux*, Marcy-l'étoile, France) pour les triglycérides et Wako NEFA C kit (*Wako Chemicals*, Neuss, Germany) pour les acides gras libres. Le taux d'acides gras libres totaux est déterminé par une réaction à la ninhydrine selon la méthode décrite par Moore (1968) en utilisant la glycine comme standard, et exprimé en équivalent glycine.

II-4 Mesures des activités enzymatiques

Les mesures d'activité enzymatique ont été effectuées sur 6 échantillons de tissu par condition expérimentale (lignée x aliment), prélevés sur 2 poissons de chaque bac. Pour chaque échantillon, les dosages ont été réalisés en duplicats techniques. Les activités enzymatiques sont exprimées en UI / g de tissu, et en UI/mg de protéines (activité spécifique).

II-4.1 Mesure de l'activité des enzymes de la lipogénèse dans le foie

Les enzymes de la lipogénèse dont l'activité a été mesurée dans cette étude sont l'acide gras synthase (AGS, EC 2.3.1.38), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD, EC 1.1.1.49), l'enzyme malique (EM, EC 1.1.1.40) et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC, EC 6.4.1.2). Les activités ont été mesurées par dosage isotopique pour l'AGS (Hsu *et al.*, 1969) et l'ACC (Holland *et al.*, 1984), et par spectrophotométrie pour la G6PD (Bautista *et al.*, 1988) et l'EM (Ochoa, 1995).

II-4.2 Mesure de l'activité de l'HOAD dans le foie et le muscle blanc

Les dosages d'activité de la carnitine palmitoyl transférase (CPT1, EC 2.3.1.21) n'ont pas été réalisés car ils nécessitent du tissu frais. Ceux de l'acyl-CoA oxydase (ACO, EC 1.3.99.3) n'ont pas été réalisés en raison de la quantité limitée de tissus disponibles. L'activité de l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD, EC 1.1.1.35) a été mesurée d'après la méthode de Kobayashi et al. (1996)

II-4.3 Mesure de l'activité des enzymes de la glycolyse

Les enzymes de la glycolyse mesurées dans cette étude sont la glucokinase (GK, EC 2.7.1.2), mesurée dans le foie uniquement, l'hexokinase I (HK-I, EC 2.7.1.1) et la pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40), mesurées au niveau du foie et du muscle blanc. Les activités des enzymes de la

glycolyse ont été mesurées par dosage spectrophotométrique d'après Tranulis et al. (1996) pour la GK et l'HK-I et d'après Foster et Moon (1985) pour la PK.

II-4.4 Mesure de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL)

L'activité de la lipoprotéine lipase (LPL, EC 3.1.1.34) a été mesurée au niveau du muscle blanc et du tissu adipeux péri-viscéral, par dosage isotopique d'après Bengtsson-Olivecrona et Olivecrona (1992). Le dosage est basé sur la mesure de la radioactivité des acides gras libérés par hydrolyse de la trioléine tritiée par la LPL.

II-4.5 Dosage des protéines solubles

La concentration en protéines solubles est déterminée pour chaque homogénat d'après la méthode de Bradford (1976) à l'aide du kit commercial Protein assay (Biorad). Cette mesure permet de calculer les activités spécifiques de chaque enzyme citée ci-dessus.

$$\text{Activité spécifique (UI/ mg protéines)} = \frac{\text{Activité (UI / g tissu)}}{\text{Concentration en protéines (mg/g tissu)}}$$

II- 5 Analyse de l'expression différentielle des gènes par qRT-PCR

II-5.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit Trizol Reagent (*Invitrogen*, Carlsbad, CA). L'intégrité des ARN totaux extraits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, via l'observation des bandes correspondant aux ARNr 18S et 28S, qui représentent la grande majorité des ARN totaux. Le dosage des ARN totaux est effectué en spectrophotométrie en mesurant la densité optique (DO) à 260nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} permet d'estimer la contamination par les protéines. Les extraits sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

II-5.2 RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel, permet de suivre en temps réel l'évolution de la quantité d'ADN synthétisée au cours des cycles. C'est une méthode précise, sensible et rapide qui permet la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence.

II-5.2.1 Principe

Après une étape de reverse transcription des ARNm en ADNc, une partie de la séquence du gène d'intérêt est amplifiée *in vitro*, en présence de matrice (ADNc), d'un couple d'amorces spécifiques du gène d'intérêt, et d'une ADNc polymérase. A ce mélange réactionnel « classique » est ajouté un agent intercalant fluorescent (SYBRGreen), qui ne se lie qu'à l'ADN double brin. Lorsque le SYBRGreen est lié à l'ADN double brin, il émet une fluorescence directement proportionnelle à l'ADN double brin présent dans le milieu réactionnel. Dans le cadre de la PCR en temps réel on l'utilise donc pour mesurer la quantité d'ADN double brin produite au cours de la réaction, en quantifiant et en enregistrant à chaque cycle l'intensité de la fluorescence émise. La synthèse d'ADN évolue selon une courbe de type exponentiel avec un doublement de la quantité d'ADN de chaque échantillon à chaque cycle.

Un seuil de sensibilité, commun à l'ensemble des échantillons, est ensuite fixé en début de phase exponentielle (c'est en effet à ce moment que la variabilité de la réaction est la plus faible et les quantités de réactifs non limitantes). En déterminant le nombre de cycles PCR nécessaires pour atteindre ce seuil (CT, pour Cycle Threshold), il est alors possible de calculer la quantité relative d'ADNc du gène d'intérêt initialement présente dans les différents échantillons. Ainsi, une valeur de CT plus élevée signifie une quantité de matrice initiale plus faible.

Afin de standardiser et normaliser les différentes analyses, une quantification d'ARNm endogène ubiquitaire, dont l'expression ne varie pas entre les conditions expérimentales étudiées, est réalisée en parallèle. Les qRT-PCR de ces gènes dits de référence permettent de comparer les résultats, et de pouvoir déterminer l'expression de plusieurs gènes dans un échantillon par rapport à leur expression dans un autre échantillon. Nous avons utilisé ici le gène du facteur d'élongation EF1 α comme gène de référence (Olsvik *et al.*, 2005), après avoir vérifié que son expression ne variait pas dans nos différents échantillons.

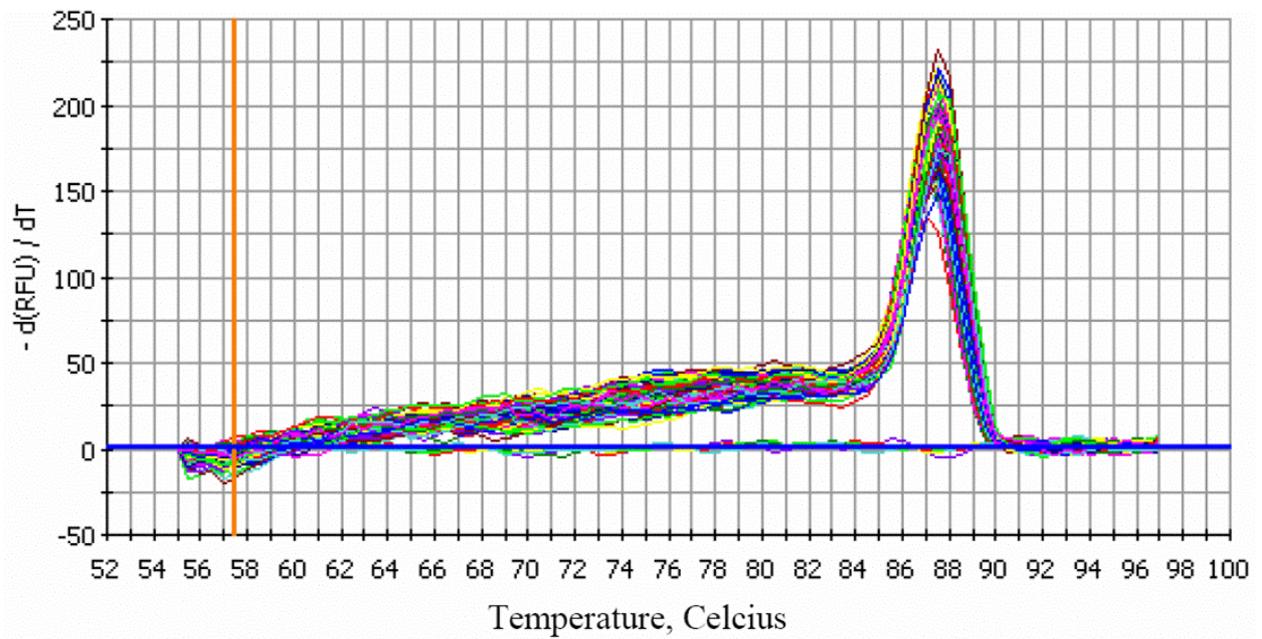


Figure II-2: Courbe de fusion obtenue par gradient croissant de température (0,5°C/10 secondes de 55°C à 94°C) après RT-PCR temps réel d'ARN totaux de muscle de truite arc-en-ciel avec les amorces EF1 α .

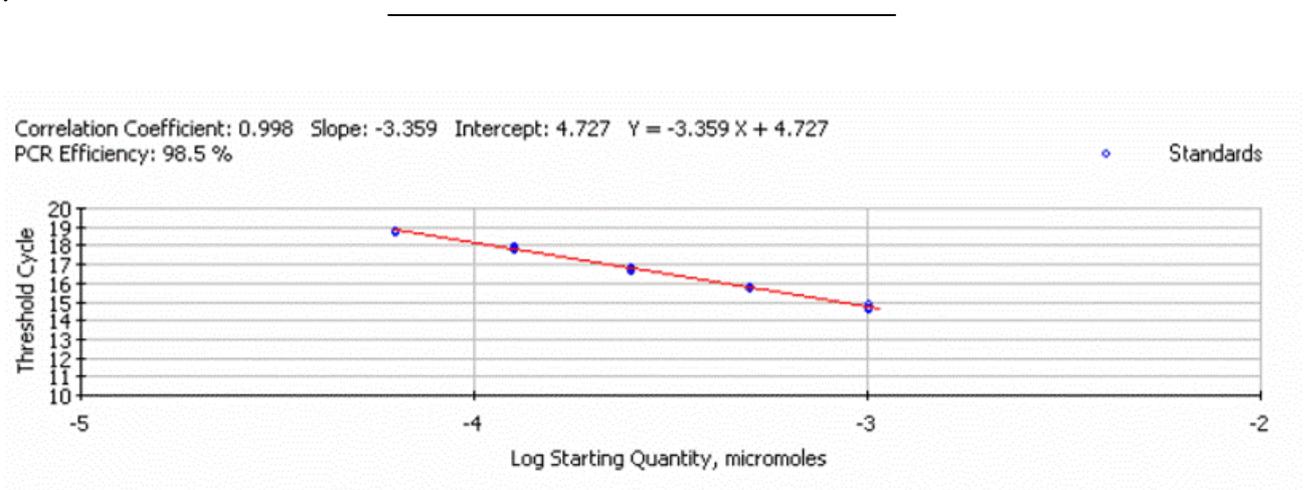


Figure II-3: Gamme étalon (dilutions successives de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$) obtenue après RT-PCR en temps réel d'ARN totaux de foie de truite arc-en-ciel avec les amorces EF1 α . Chaque point de dilution est réalisé en triplicat. Les résultats donnent une efficacité de PCR de 98,5%

II-5.2.2 Choix des amorces

Les amorces ont été choisies en fonction de leur position, de façon à éviter l'amplification d'ADN génomique, d'autant plus que les extraits n'ont pas été traités à la DNase : la première amorce chevauchant deux exons consécutifs et la seconde amorce située sur l'exon suivant. Le choix du couple d'amorces tient compte de la température d'hybridation optimale, qui doit être comprise entre 55 et 65°C et ne pas différer de plus d'1°C entre les deux amorces. De plus, elles doivent contenir le minimum de structures secondaires et de séquences répétées pour éviter les dimérisations d'amorces qui nuisent à l'amplification. Enfin, la taille de l'amplicon doit être comprise entre 100 et 250 pb. Nous avons utilisé un logiciel en ligne (Primer3 : <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) pour définir les couples d'amorces satisfaisant à ces exigences. La pertinence du choix opéré est ensuite testée par RT-PCR classique suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La présence d'un amplicon unique et de taille attendue est une première étape de validation du couple d'amorces utilisé. Un séquençage de l'amplicon, excisé du gel et purifié sur colonne (Microcon PCR, *Millipore Corporation*, USA) permet ensuite de le valider définitivement.

II-5.2.3 Rétrotranscription des ARNm en ADNc

Les ADNc sont générés à partir 1µg d'ARN totaux à l'aide du kit Superscript™ Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (*Invitrogen*, Carlsbad, CA). Pour chaque échantillon, cette étape de rétrotranscription est effectuée en duplicat.

II-5.2.4 PCR quantitative en temps réel

Les réactions de PCR quantitative en temps réel sont effectuées à partir de 10 µl d'ADNc dilué. Le facteur de dilution appliqué dépend du niveau d'expression du gène étudié. A ces 10 µl sont ajoutés 200 mM d'amorces et 12,5 µl de SYBR® Green (kit SYBR® Green PCR Super-Mix, *Bio-Rad*). Le volume final de la réaction est de 25 µl.

Les PCR en temps réel sont réalisées grâce au thermo-cycleur *iCycler iQ™* (*Bio-Rad*, Hercules, CA). Les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à 95°C pour activer l'ampliTaq gold DNA polymérase. Les échantillons sont ensuite soumis à une succession de 35 cycles. Chaque cycle de PCR se décompose en deux phases :

- une phase de dénaturation de l'ADNc double brin à 95°C, pendant 20 secondes,

- une phase d'hybridation des amorces à l'ADN dénaturé et d'élongation du brin néosynthétisé, au cours de laquelle les échantillons sont maintenus pendant 20 secondes à une température qui dépend du couple d'amorce utilisé.

A l'issue du dernier cycle de PCR, l'ADN double brin est soumis à un gradient de température croissant de 55 à 94°C, à raison de 0,5°C par pas de 10 secondes. Cette étape permet l'obtention d'une courbe de fusion spécifique de la séquence d'ADNc amplifiée (Figure II-2). L'observation d'un pic unique permet de s'assurer de l'absence de contamination par amplification d'un amplicon unique.

Pour chaque gène d'intérêt, l'amplification est réalisée simultanément sur une gamme de dilution, réalisée à partir d'un pool de tous les échantillons, et encadrant la dilution utilisée pour l'analyse des échantillons. Chaque point de gamme est amplifié en triplicat. Les valeurs de CT obtenues pour chaque point de la gamme (qui comprend 5 points de dilution) permettent de calculer l'efficacité de la PCR, dont la détermination est nécessaire à la quantification relative de l'expression du gène en fonction des conditions expérimentales (Figure II-3).

II-5.2.5 Traitement des données et analyses statistiques

La quantification relative de l'expression du gène cible par rapport au gène de référence (EF1 α) est réalisée en utilisant le modèle mathématique décrit par Pfaffl (2001). Cette méthode peut être utilisée même si les efficacités de PCR sont différentes entre le gène cible et le gène de référence (EF1 α). Les rapports d'expression relative (R) du gène cible sont calculés sur la base de l'efficacité de la PCR (E) et de la différence de CT (Δ CT) entre l'échantillon et un calibrateur interne, obtenus pour le gène cible et pour le gène de référence (EF1 α). Le calibrateur interne que nous avons choisit pour chaque plaque est le point de la gamme étalon correspondant à la dilution utilisée pour analyser l'expression du gène dans les échantillons.

$$R = \frac{(E_{\text{gène cible}})^{\Delta CT_{\text{gène cible (calibrateur-échantillon)}}}}{(E_{EF1\alpha})^{\Delta CT_{EF1\alpha (calibrateur-échantillon)}}}$$

Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm erreur standard. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SAS (SAS Inst., NC, USA). Pour chaque analyse, les effets du régime alimentaire, de la sélection génétique et des interactions « régime x lignée » ont été testés à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs. Pour

l'ensemble des analyses, les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0,05$. Lorsqu'une interaction significative est observée entre les deux facteurs, une analyse de variance simple est réalisée et les moyennes comparées par le test de Student-Newman-Keuls.

II-6 Analyses à haut débit de l'expression des gènes et des protéines

L'objectif de la génomique est l'acquisition de données relatives à la structure et aux fonctions de l'ensemble des gènes d'un organisme, obtenues de façon systématique en utilisant des techniques à haut débit, combinées à des analyses statistiques et informatiques des résultats. La stratégie fondamentale est de pouvoir étendre le champ d'investigation de l'étude d'un seul gène ou protéine à l'étude, en théorie, de tous les gènes ou protéines de manière systématique (Hieter et Boguski, 1997).

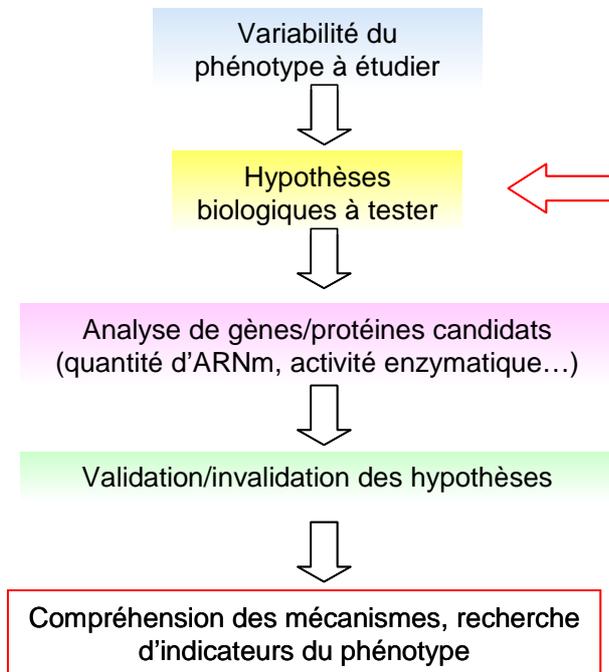
La génomique comprend deux grands domaines : la génomique structurale, dont l'objectif est l'analyse de la nature physique des génomes entiers (séquençage, localisation chromosomique..), et la génomique fonctionnelle, qui vise à caractériser l'expression, la fonction et la régulation de réseaux de gènes et de protéines survenant au sein d'une entité biologique (cellule, tissu, organe, individu...) dans un contexte biologique donné.

II-6.1 Du séquençage des génomes à la génomique fonctionnelle

La toute première étape consiste à obtenir l'intégralité du patrimoine génétique d'un organisme: sa séquence génomique. Cette première étape de la génomique structurale, ne se limite pas à fournir la séquence "brute" d'un génome. Un important travail de recherche informatique est effectué pour prédire la position des gènes dans la séquence et leurs fonctions: c'est l'annotation du génome. Reste ensuite à caractériser la fonction des milliers de gènes séquencés. Si l'on veut comprendre la fonction d'un gène il est important de savoir quand, où et à quel niveau ce gène est exprimé. C'est précisément l'enjeu de la génomique fonctionnelle (encore appelée post-génomique). L'analyse simultanée de milliers de gènes permet de mieux appréhender le fonctionnement cellulaire, les processus biochimiques et les mécanismes de régulation matérialisant ainsi le caractère « intégratif » de l'approche.

L'analyse fonctionnelle des gènes n'est pas nouvelle. La nouveauté réside dans le caractère global des démarches : alors que l'approche classique s'intéresse tout au plus à quelques séquences à la fois, dont le choix est basé sur des hypothèses biologiques formulées a priori (approche « candidats »), la génomique fonctionnelle opère en parallèle sur plusieurs

Approche candidats



Approches post-génomiques

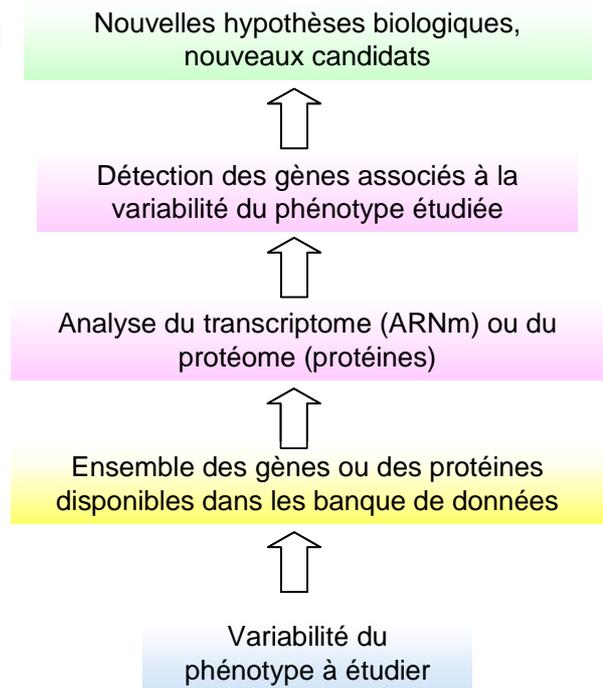


Figure II-4: Différences et complémentarité des approches classiques (« candidats ») et post-génomiques

centaines ou milliers de séquences d'ADN et de protéines fournies par les projets de séquençage. L'avantage clé des démarches de post-génomique réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de prédire quels seront les gènes importants ou les mécanismes recherchés dans le processus biologique étudié : elles donnent une vision plus complète et objective des mécanismes mis en jeu (Lockhart et Winzeler, 2000). Ce type d'approche, globale et sans a priori, offre donc la possibilité de mettre en évidence de nouveaux gènes candidats, ainsi que l'implication de nouveaux processus biologiques jusqu'alors négligés ou non suspectés dans l'élaboration d'un phénotype (Figure II-4). De puissants outils informatiques et des méthodes biologiques automatisées, en constante évolution, permettent une analyse de plus en plus rapide des données. L'enjeu est celui d'une description aussi complète que possible des caractéristiques d'un individu, à diverses échelles depuis le transcriptome (analyse des produits de la transcription des gènes, les ARNm), le protéome (analyse des produits de la traduction des ARNm exprimés, les protéines) jusqu'au métabolome (étude des produits du métabolisme des cellules ou des organes) et aux caractères d'intérêt pour les productions.

II-6.2 La transcriptomique

La transcription d'un gène en ARN est la première étape de la synthèse des protéines et des variations dès cette étape peuvent être responsables de changements morphologiques (développement), physiologiques ou indiquer une réponse cellulaire à des perturbations physiologiques ou environnementales.

De nombreuses méthodes ont été développées pour quantifier l'abondance des ARNm au sein d'un échantillon. Bien que les méthodes classiques du Northern blot et de la PCR quantitative soient sensibles et permettent une quantification précises de transcrits spécifiques, elles ne sont pas adaptées pour des criblages systématiques.

Les puces à ADN, également appelées *DNA arrays*, *DNA chips*, *DNA micro-arrays* ou *micro-arrays*, ont été développées au début des années 1990. Elles permettent de mesurer simultanément et quantitativement l'expression de plusieurs milliers de gènes à partir d'un support solide de taille réduite (quelques cm²).

Le terme « puce à ADN » est générique. On distingue actuellement deux grands types de puces qui se distinguent essentiellement par leur procédé de fabrication et leur densité : (1) les macro et microréseaux avec un dépôt direct de molécules d'ADN sur leur support et (2) les puces avec la synthèse in situ des sondes oligonucléotidiques sur une surface solide. Dans le

premier cas, il est nécessaire d'établir une collection de sondes spécifiques d'un grand nombre de gènes, dans le second, il est nécessaire d'en connaître la séquence.

Dans le cas des poissons, les efforts de séquençage se sont pendant longtemps focalisés sur certaines espèces modèles, comme le poisson-zèbre (*Danio rerio*), le fugu (*Takifugu rubripes*) ou encore le médaka (*Oriza latipes*) afin d'étudier la biologie du développement et de l'évolution (Shima *et al.*, 2003). Plus récemment, ces efforts se sont étendus à certaines espèces d'élevage comme la carpe, le saumon atlantique, la truite arc-en-ciel et ont permis le séquençage partiel de leur génome et la construction de banques d'EST (Expressed Sequence Tag).

La technique de séquençage d'EST est apparue au début des années 90 chez l'humain (Adams *et al.*, 1991) et a ensuite été appliquée à un grand nombre d'espèces. Les EST sont des séquences générées automatiquement et en simple lecture, à partir de banques d'ADNc (molécule d'ADN rétrotranscrite à partir d'une population d'ARNm). Les banques d'ADNc contiennent des dizaines de milliers de clones représentant une photographie instantanée de l'expression des gènes d'un tissu dans une condition physiologique précise. Le coût relativement faible du séquençage d'EST en fait le moyen le plus attractif pour avoir une description du transcriptome. Le séquençage d'EST à partir de l'extrémité 5' des ADNc clonés directionnellement a initialement été favorisé. En effet, les séquences 5' sont à même de contenir plus de région codante que celles obtenues à partir de l'extrémité 3' qui contient une partie significative de région non traduite (UTR). A l'heure actuelle, le séquençage à partir de l'extrémité 3' est également pris en compte car il permet d'obtenir plus de séquences uniques et peut être utilisé pour distinguer les gènes paralogues (Rudd, 2003).

II-6.2 La protéomique

La protéomique a pour objectif une description dynamique du protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines exprimées par le génome dans un tissu donné, à un moment donné, dans un contexte biologique donné. L'approche la plus répandue combine la séparation des protéines par électrophorèse bi-dimensionnelle (gel 2D) et la spectrométrie de masse.

L'analyse des profils d'expression protéique comporte trois étapes principales qui font appel à différentes technologies. L'analyse débute par une électrophorèse bidimensionnelle (gel 2D) qui combine deux types de séparations protéiques réalisées selon le point isoélectrique puis la

masse, ce qui lui confère un pouvoir de résolution élevé (O'Farrell, 1975). La deuxième étape est la mise en image et le traitement des cartes protéiques que constituent les gels 2D. La dernière étape est celle de l'identification et de la caractérisation des protéines, réalisée par spectrométrie de masse. Deux grands types de spectromètre sont utilisés en protéomique : MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight) et MS/MS (spectromètre de masse en tandem). L'appareil MALDI-TOF sépare les peptides obtenus par digestion trypsique d'une protéine selon leur masse et permet d'obtenir une carte peptidique massique (CPM). La protéine peut être identifiée en comparant la carte peptide massique obtenue expérimentalement aux cartes peptidiques massiques théoriques des séquences présentes dans les bases de données protéiques. Si la séquence protéique est inconnue et donc non répertoriée dans les bases de données, l'identification par carte peptidique massique est inopérante. On peut alors avoir recours au spectromètre MS/MS, qui permet le séquençage de peptides (Thebault *et al.*, 2001).

L'analyse des protéines sur gel 2D permet d'obtenir des informations complémentaires à celle des transcrits sur microarray. Elle fournit une information sur l'abondance des protéines, et permet donc d'avoir une vision plus précise des régulations dans la cellule. Les ARN messagers transcrits sont éventuellement traduits en protéines, mais la corrélation entre les abondances de ces deux types de molécules n'est pas absolue, en raison principalement de l'existence des régulations post-traductionnelles (méthylation, glycosylation, phosphorylations...), et peut être gène-spécifique (Greenbaum *et al.*, 2002). De plus, l'activité des protéines dépend beaucoup de leur environnement physico-chimique (pH, potentiel d'oxydo-réduction, conformation...), dimension qui n'est évidemment pas prise en compte par la seule analyse du transcriptome (Cantor, 2000).

Largement répandues en médecine et sur les espèces modèles, les approches haut-débit font dorénavant leur apparition pour étudier les espèces d'intérêt agronomique, comme le porc, le poulet ou la truite arc-en-ciel.

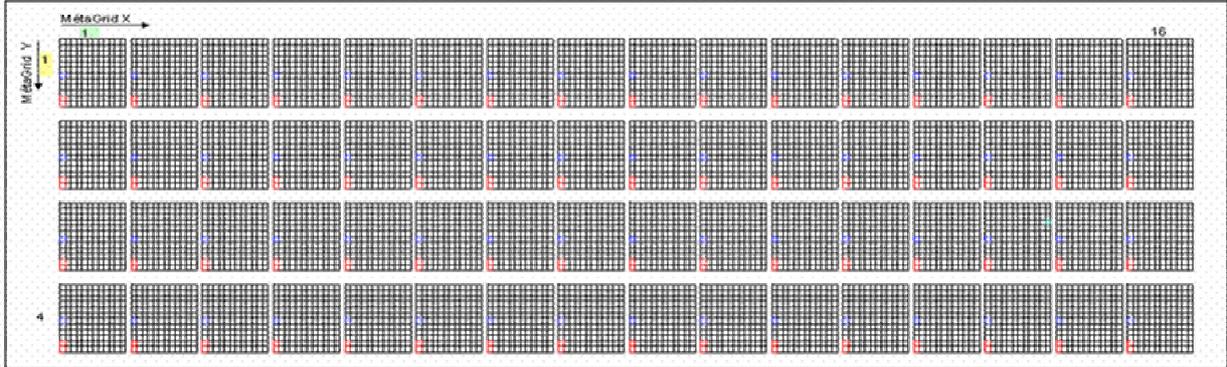


Figure II-5 : Plan de dépôt des membranes nylon micro-réseaux AGENAE – truite

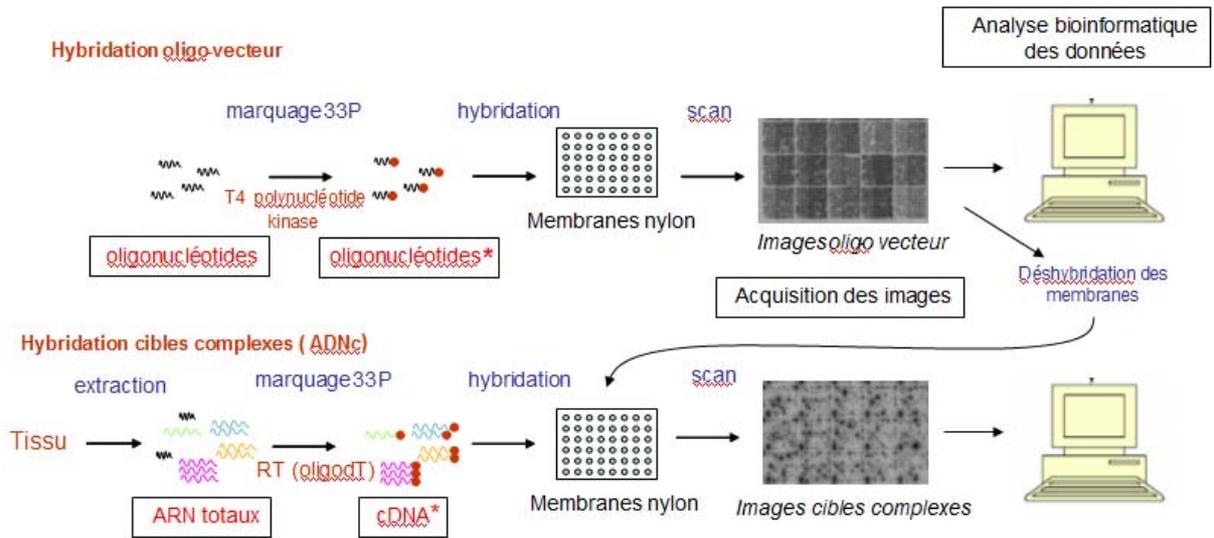


Figure II-6 : Principe du protocole d'hybridation en deux étapes des micro-réseaux. 1^{ère} étape : hybridation oligovecteur ; 2^{ème} étape : hybridation cibles complexes

II-7 Analyse différentielle du transcriptome sur membranes nylon

II-7.1 Support micro-réseaux haute densité d'ADNc

Nous avons utilisé comme support des membranes nylon (Figure II-5) sur lesquelles ont été déposées des produits PCR purifiés issus d'une banque multi-tissus normalisée de truite (Govoroun *et al.*, 2006). Chaque membrane comprend au total 9216 dépôts parmi lesquels :

- 9023 dépôts de clones d'ADNc issus de la banque multi-tissus normalisée de truite
- 128 dépôts d'ADNc modifié de luciférase (CVU03687, *Photinus pyralis*) et servant de témoins positifs (en rouge)
- 64 spots « vides », correspondant à des dépôts d'eau (témoins négatifs, ou blancs) (en bleu)
- 1 dépôt correspondant à un clone d'*Arabidopsis thaliana* (Y10291, gène gag1) servant de témoin négatif (en vert)

Les membranes ont été produites au Centre de Ressources Biologiques (CRB) de Jouy-en-Josas.

II-7.2 Principe du protocole d'hybridation des micro-réseaux

Les membranes ont été hybridées selon le protocole décrit par Mazurais *et al.* (2005). Il comprend deux étapes (Figure II-6). Une première hybridation, dite 'hybridation oligo-vecteur', sert à estimer le taux d'ADNc sonde déposé au niveau de chaque spot. Elle consiste à hybrider les membranes avec un mélange d'amorces oligomères marquées au ^{33}P , spécifiques des séquences plasmidiques bordant le site de clonage des ADNc déposés sur la puce. Cette étape permet d'une part, de s'assurer de la qualité et de l'homogénéité des membranes produites, et de procéder à la normalisation inter-membranes et de s'affranchir ainsi des variations de la quantité de sonde déposée sur les membranes d'autre part. Les membranes sont ensuite déshybridées puis hybridées à nouveau avec les échantillons d'ADNc d'intérêt marqués au ^{33}P . Cette deuxième hybridation est nommée 'hybridation cible complexe'. Afin de rendre les intensités indépendantes des quantités déposées, les valeurs obtenues lors de l'hybridation avec un échantillon sont corrigées pour chaque gène par la valeur de l'intensité du spot obtenue à l'issue de l'hybridation oligo-vecteur (Mazurais *et al.*, 2005).

II-7.2.1 Hybridation Oligonucléotide-vecteur

II-7.2.1.1 Pré-hybridation des membranes

Les membranes sont dans un premier temps hybridées pendant 6 heures à 68°C en présence de 1ml de tampon d'hybridation composé de Denhardt's 5X (0.1% de ficoll 400, 0.1% de Polyvinylpyrrolidone, 0.1% d'albumine Bovine fraction V), de SSC 5X, de SDS 0.5%, et dans lequel a été ajouté de l'ADN dénaturé de placenta humain (*Sigma*) en quantité de 0.1mg par membrane. Cette étape permet de saturer les sites d'hybridation non spécifique.

II-7.2.1.2 Préparation de l'oligonucléotide-vecteur radiomarqué

Une quantité de 10 pmol d'oligonucléotide-vecteur (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', *Proligo*) par membrane est radio-marquée en phosphorylant l'extrémité hydroxylée 3'. Cette phosphorylation est réalisée à l'aide de 1µl de T4 polynucléotide kinase 10UI/µl (*Amersham Biosciences*) en présence de 3µl de [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP 10µci/µl (*Amersham biosciences*), 5µl de tampon 10X T4 polynucléotide kinase (*Amersham Biosciences*), ajusté à 25µl avec de l'eau stérile. La solution est incubée dans un premier temps à 37°C pendant 10 min, puis à 65°C pendant 10min. L'efficacité de marquage est ensuite évaluée en introduisant 1µl de produit de marquage dans 3ml de liquide scintillant Ultima Gold (*Packard*) et analysée avec l'analyseur à scintillation liquide (1900TR, *Packard*). Les valeurs de comptage obtenues doivent être supérieures à 100 000cpm/µl. Les oligos ainsi marqués sont ensuite purifiés sur colonne « *microSpin G-25 column* » (*Amersham biosciences*) par centrifugations sériées à 1000g. La quantité de radioactivité contenue dans la fraction d'oligo-vecteur purifié est mesurée selon la procédure décrite précédemment.

II-7.2.1.3 Hybridation de l'oligonucléotide radio-marqué

Le tampon d'hybridation ayant servi à la pré-hybridation des membranes est alors remplacé par 1ml de tampon d'hybridation dans lequel ont été introduit 50 000 cpm d'oligonucléotide-vecteur marqué. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant 48 heures. Les membranes sont ensuite lavées pendant 1 heure par 3 bains successifs dans une solution composée de SSC 2X et de SDS 0.1%, à 68°C, puis rincées dans du SSC 2X à température ambiante. Les membranes exposées pendant 48 heures au contact d'écrans Fujifilm radio-sensibles.

II-7.2.1.4 Désybridation des membranes

Les membranes sont désybridées par lavage dans un bain de tampon de désybridation contenant du SSC 0.1X et du SDS 0.2% à 68°C pendant 3 heures, en changeant le tampon de lavage toutes les heures. Elles sont ensuite rincées dans du tampon SSC 2X et la désybridation est contrôlée par une exposition des membranes au contact des écrans radio-sensibles pendant 24 heures. A l'issue de l'exposition, les écrans sont scannés à l'aide du Phosphorimager FujiBAS 5000.

II-7.2.2 Hybridation des cibles complexes

Les cibles complexes, qui désignent le mélange complexe d'ADNc représentatif de la population d'ARNm de départ présente au sein de l'échantillon, ont été préparées à partir des mêmes extraits d'ARN totaux utilisés en RT-PCR en temps réel. Pour chaque tissu analysé, l'hybridation des cibles complexes a été réalisée en utilisant 8 échantillons par condition expérimentale (L-LE, L-HE, F-LE et F-HE) choisis au hasard parmi les 9 qui ont été extraits, à raison d'une membrane individuelle par échantillon.

II-7.2.2.1 Pré-hybridation des membranes

Les membranes sont pré-hybridées pendant 6 heures à 42°C selon la procédure décrite précédemment (voir chapitre II-7.2.1.1).

II-7.2.2.2 Préparation des échantillons

La concentration en ARN totaux de chaque échantillon extrait est mesurée de façon précise à l'aide du BioAnalyzer d'Agilent. Cet appareil permet en outre de vérifier la qualité des ARN. Les cibles complexes sont obtenues par transcription inverse des ARN totaux. Pour chaque échantillon, 5µg d'ARN totaux sont incubés pendant 8min à 70°C en présence de 2µg d'OligodT15 () et de 0,3ng d'ARNm exogène de luciférase (*Promega*) servant de témoin positif de rétrotranscription et d'hybridation. Cette étape, dite étape d'Annealing, permet l'hybridation préalable des amorces avant rétrotranscription. La rétrotranscription des ARNm est réalisée dans un mélange réactionnel contenant 1µl de RNase out (xU/µl), 1µl de reverse transcriptase Superscript III (100U/µl), 6µl de tampon premier brin 5X, 2µl de DTT 0.1M, 0.6µl de d(A/T/G)TP 20mM, 0.6µl de dCTP 120µM et 3µl de [α^{33} P]dCTP 10µCi/µl, pendant 1 heure à 42°C. 1µl de reverse transcriptase Superscript III (100U/µl) est ensuite de nouveau ajouté dans chaque tube, suivi d'une nouvelle phase d'incubation à 42°C pendant 1heure. Les

ARN restants sont ensuite dégradés par incubation pendant 30min à 68°C en présence de 1µl de SDS 10%, 1µl d'EDTA 0,5M et 3µl de NaOH 3M, suivie d'une phase de 15 min à température ambiante. Les solutions sont ensuite neutralisées par ajout de 10µl de Tris 1M et de 3µl d'HCL 2N. Afin de saturer les extensions polyT des cibles complexes, source d'hybridations non spécifiques, 2µg de polyA 80mers sont ensuite ajoutés aux mélanges réactionnels.

II-7.2.2.3 Hybridation des cibles complexes

Le tampon d'hybridation ayant servi à la pré-hybridation des membranes est alors remplacé par 1ml de tampon d'hybridation dans lequel a été introduit la totalité du mélange réactionnel de cibles complexes. L'hybridation est réalisée à 68°C pendant 48 heures. Les membranes sont ensuite lavées par 3 bains successifs d'1 heure dans une solution composée de SSC 2X et de SDS 0.1%, à 68°C, et rincées dans du SSC 2X à température ambiante. Les membranes sont mises à exposer pendant 48 heures au contact d'écrans Fujifilm radio-sensibles.

II-7.2.2.4 Déshybridation des membranes

Les membranes sont déshybridées par lavage dans un bain de tampon contenant du SDS 0.5% et 1mM d'EDTA à 85°C pendant 5 heures, en changeant le tampon de lavage toutes les heures. Elles sont ensuite rincées dans du tampon SSC 2X et la déshybridation est contrôlée par une exposition des membranes au contact des écrans radio-sensibles pendant 24 heures. A l'issue de l'exposition, les écrans sont scannés à l'aide du Phosphorimager FujiBAS 5000.

II-7.3 Analyse des données d'hybridation des micro-membranes

II-7.3.1 Acquisition des images

A l'issue des hybridations oligo-vecteur et cibles complexes, les écrans sont scannés à l'aide du Bio-Imaging Analyser BAS-5000 (Fujifilm) selon une densité de 16 bit/Pixel et une résolution de 25 µm/Pixel. Les images obtenues pour chaque écran sont sauveées au format image .img. Les images de membranes individuelles sont découpées grâce au logiciel ImageJ (Fujifilm) et sauveées au format .tif.

II-7.3.2 Traitement des images et quantification

Les images de membranes individuelles (obtenues à l'issue de l'hybridation oligo-vecteur et de l'hybridation cibles complexes) sont ensuite analysées avec le logiciel AGScan (Cathelin *et al.*, 2007), développé par la plateforme de bioinformatique INRA Sigenae, et qui est une évolution du logiciel BZScan, développé par l'équipe du TAGC de Marseille (Lopez *et al.*, 2004). Ce logiciel permet de procéder à la détection et la quantification des spots de façon automatisée. Plusieurs modalités de calcul de l'intensité des signaux d'hybridation sont offertes par le logiciel :

- intensité calculée d'après l'image /diamètre constant : l'algorithme de quantification s'appuie sur le nombre de pixels détectés sur l'image (sans réajustements) dans une zone de diamètre défini, fixé lors de la construction de la grille.

- intensité calculée d'après l'image/ diamètre variable : l'intensité du signal est mesurée d'après les pixels de l'image, mais dans une zone dont le diamètre est recalculé d'après le profil du spot.

- intensité corrigée /diamètre constant : l'intensité du signal est estimée d'après un modèle mathématique s'appuyant sur le profil du spot dans la zone de détection de diamètre défini.

- intensité corrigée/ diamètre variable : le modèle mathématique évoqué ci-dessus est appliqué sur le spot dans une zone dont le diamètre est recalculé d'après son profil.

Pour l'analyse des données oligo-vecteur et cibles complexes obtenues, notre choix s'est porté sur le mode de calcul le plus simple (intensité calculée d'après l'image/ diamètre constant) car l'application de modèles mathématiques complexes (intensité corrigée ou diamètre variable) augmentait la variabilité des résultats.

II-7.3.3 Transformation et normalisation des données

Les données de quantification des signaux d'expression ont été transformées et normalisées à l'aide du logiciel BASE (BioArray Software Environment), qui permet le stockage et l'analyse des données issues d'analyses du transcriptome. Ce logiciel répond aux exigences du standard MIAME (Minimum Information About Microarray Experiment), qui requiert qu'un minimum d'informations soit minutieusement renseigné afin que les résultats provenant de leur analyse puissent être reproduits indépendamment (Brazma *et al.*, 2001). BASE permet ainsi de conserver les informations relatives aux échantillons, au plan d'expérience, aux protocoles d'extraction et d'hybridation ainsi que les données d'intensité et les procédures de

normalisation utilisées. BASE permet de créer des jeux de données, appelés 'bioassay set', sur lesquels il est possible d'appliquer des algorithmes sans modifier les données originales. L'affichage permet de voir chaque étape de l'analyse de façon chronologique. Il est possible d'accéder aux données à chaque étape de l'analyse. L'exportation des données dans un format délimité par des tabulations permet ensuite d'approfondir l'analyse statistique à l'aide d'Excel ou TMeV4.

Filtre des données : Afin d'éliminer les spots pour lesquels la quantité de sonde déposée sur la puce est trop faible pour être fiable, les données sont filtrées d'après une valeur seuil arbitraire. Celle-ci est calculée pour chaque membrane à partir de la valeur médiane des blancs (les 64 spots vides, correspondant à des dépôts d'eau) mesurée après hybridation oligo-vecteur. Tous les signaux dont l'intensité est inférieure à 3 fois cette valeur seuil sont systématiquement écartés de l'analyse. L'élimination d'un spot sur une membrane entraîne son élimination systématique pour toutes les membranes.

Transformation des données en log10 : La transformation en log10 des valeurs mesurées permet de diminuer l'effet d'échelle entre les signaux les plus faibles et les plus élevés et de faciliter l'étape de normalisation des données. Cette transformation corrige une distribution de variable trop dissymétrique) et réduit l'influence de grandes valeurs qui pourraient être atypiques.

Normalisation inter-spots : Pour chaque membrane, la valeur d'intensité du signal cible complexe de chaque spot est divisée par la valeur du signal oligo-vecteur correspondant, de sorte à s'affranchir des éventuelles variations de quantité de dépôts de produits PCR sur les micro-réseaux (obtention d'un rapport cible complexe/oligo-vecteur).

Normalisation inter-membranes : Afin de pouvoir comparer les membranes entre elles, les valeurs de chaque spot (ratio cibles complexes / oligo-vecteur) sont divisées par la valeur médiane des intensités mesurées sur chaque membrane. Cette étape de normalisation permet de corriger les variations d'intensité liées à d'éventuelles différences de quantité d'ARN de départ, d'efficacité de rétrotranscription ou d'hybridation, ou encore d'efficacité de lavage pouvant survenir entre les différentes membranes. Pour chaque membrane, les données ainsi normalisées sont ensuite centrées sur la médiane.

II-7.5 Analyses statistiques des données d'hybridation

Plusieurs méthodes d'identification des gènes différentiellement exprimés, plus ou moins sensibles et fiables, sont aujourd'hui disponibles (Murphy, 2002 ; Leung and Cavalieri, 2003). Les premières analyses microarrays effectuées se contentaient de déclarer un gène comme étant différentiellement exprimé si le ratio de l'intensité mesurée dans les deux conditions était supérieur à un certain seuil fixé arbitrairement (habituellement de 2) (Barrans *et al.*, 2001). Cette approche ne s'appuie sur aucun test statistique, et est à l'origine de faux positifs, notamment pour les gènes faiblement exprimés, et de faux négatifs, en particulier pour les gènes fortement exprimés. D'autre part, elle est basée sur un seuil n'ayant aucune légitimité biologique, une variation d'un facteur 2 n'ayant pas la même signification selon le niveau d'expression et la fonction du gène considéré. Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas retenu cette méthode pour l'analyse de nos données.

II-7.5.1 Analyse de variance (ANOVA)

L'analyse de variance (ANOVA) permet d'apprécier l'effet d'une ou de plusieurs variables qualitatives (= facteurs) sur une variable quantitative (ici le niveau d'expression des gènes) (Fisher, 1954). Pour l'analyse de nos données, un modèle d'ANOVA à deux facteurs (génotype, régime) permet de mettre en évidence des effets des deux principaux facteurs que sont le régime alimentaire et l'origine génétique des truites (génotype ou lignée), ainsi que leur interaction éventuelle sur l'expression des différents gènes.

Le modèle d'ANOVA considéré s'écrit

$$y_{ijk} = \mu + R_i + G_j + (R \cdot G)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

où y_{ijk} représente le logarithme du niveau d'expression du gène considéré k ($k = 1, \dots, x$), pour le régime i ($i = 1, 2$; 1=LE, 2=HE) et le génotype (ou lignée) j ($j = 1, 2$; 1=L, 2=F); μ est la moyenne globale des valeurs d'intensité log-transformées; R_i représente l'effet du régime i , G_j celui l'effet du génotype (ou lignée) j , $(R \cdot G)_{ij}$ représente l'effet de l'interaction du régime i et du génotype j et ε_{ijk} représente l'erreur stochastique. L'hypothèse nulle H_0 suppose que toutes les variances sont égales, et donc que le gène considéré n'est pas différentiellement exprimé entre les diverses conditions. L'hypothèse alternative, H_1 , suppose une différence d'expression.

Pour réaliser cette analyse, nous avons utilisé le logiciel d'analyse TMeV4 (Saeed *et al.*, 2003), à partir des données normalisées, centrées et réduites. Pour chaque gène le seuil de significativité a été fixé à une valeur p de 10^{-2} . Lorsqu'une interaction significative est

observée entre les deux facteurs, une ANOVA simple est réalisée et les moyennes comparées par le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,01$).

Avec ce modèle, il est nécessaire de faire autant d'analyses de variance que de gènes étudiés mais nous disposons d'une variance estimée par gène, et les résultats ne sont pas influencés par l'hétérogénéité des valeurs car il ne se concentre que sur un gène à la fois. Toutefois, la limite d'une telle analyse est qu'en règle générale, le nombre d'observations par gène est très faible, ce qui peut conduire à une perte de puissance du test car la variance estimée pour chaque gène peut-être élevée. D'autre part, ce type d'analyse pose le problème de la multiplicité des tests, qu'il est dans certains cas préférable de corriger.

II-7.5.2 Correction pour la multiplicité des tests

L'objectif de l'analyse statistique est de déterminer quels sont les gènes différentiellement exprimés entre les 2 génotypes et les 2 régimes. De façon générale, quelle que soit la méthode statistique utilisée, il existe une probabilité non nulle (risque de première espèce) de détecter des faux positifs (gènes déclarés différentiellement exprimés alors qu'ils ne le sont pas) et une autre probabilité non nulle (risque de deuxième espèce) de ne pas identifier des gènes qui sont pourtant réellement exprimés de façon différentielle entre les conditions testées (faux négatifs). La difficulté avec la détection de gènes dans le cadre d'une analyse du transcriptome réside dans le nombre relativement important de comparaisons qui nécessite d'ajuster le seuil de chaque comparaison afin de minimiser ces deux probabilités d'erreur sachant que, toutes choses égales par ailleurs, la seconde augmente quand la première diminue et réciproquement. Par exemple, prendre un risque de 1% dans une expérimentation où près de 10 000 gènes sont étudiés simultanément peut conduire à obtenir 100 faux positifs, ce qui peut s'avérer beaucoup trop élevé, surtout quand peu de gènes se révèlent être significativement différentiels à l'issue de l'analyse.

Un certain nombre de méthodes ont été développées afin de limiter l'occurrence de faux positifs à l'issue des analyses statistiques. Les plus utilisées sont les méthodes de Bonferroni (Bland et Altman, 1995) et de Benjamini-Hochberg (Benjamini et Hochberg, 1995).

II-7.5.2.1 La méthode de Bonferroni

Pour avoir un risque global α , il faut que chacune des n comparaisons soit effectuée avec un risque ajusté $\alpha' = \alpha/n$. En pratique, la méthode de Bonferroni fournit une liste de gènes différentiellement exprimés dans laquelle on contrôle le nombre de faux positifs, mais,

lorsque le nombre des gènes testé est grand, cette méthode s'avère souvent beaucoup trop drastique. Ainsi, lorsque la méthode est appliquée à une analyse de 10 000 gènes, accepter de prendre un risque première espèce de 5% revient à fixer le seuil de significativité à une p-value de $5 \cdot 10^{-6}$. L'intérêt de cette méthode est d'offrir une grande confiance vis à vis des gènes détectés différenciellement exprimés, mais c'est également accepter de ne pas détecter des gènes qui seraient différenciellement exprimés (faux négatifs).

II-7.5.2.2 Le False Discovery Rate (FDR) de Benjamini-Hochberg

Avec cette méthode, on contrôle l'espérance du taux de faux positifs parmi les différences déclarées significatives. Pratiquement, on ordonne par ordre croissant les n p-values des n tests (les gènes) et on recherche le plus haut rang k des p-values tel que : $p\text{-value}(k) \geq \alpha k/n$ (Benjamini et Hochberg, 1995). Choisir de contrôler le FDR, c'est accepter de sélectionner une certaine proportion de faux positifs dans la liste des gènes différenciellement exprimés.

Ces méthodes de correction pour la multiplicité des tests n'ont, à l'heure actuelle, pas encore été implémentée dans le logiciel TMeV, mais peuvent être appliquées sans trop de difficulté sur Excel.

delta	# med false pos	# called	median FDR	90th perc FDR	cutlo	cuthi
0	4022,924051	4643	0,866449289	0,943175681	-0,120456592	1,231734248
0,00037654	4022,924051	4643	0,866449289	0,943175681	-0,120456592	1,231734248
0,009413507	3934,217773	4561	0,862577894	0,939152631	-0,120456592	1,299652914
0,01355545	3921,949884	4553	0,861399052	0,93833633	-0,120456592	1,31019939
0,018450474	3909,210152	4548	0,859544888	0,937272231	-0,120456592	1,319453653
0,024096578	3824,27061	4451	0,859195374	0,936602464	-0,120456592	1,402518506
0,073801895	3644,978688	4293	0,849051639	0,924339714	-0,120456592	1,602945339
0,135931041	2277,109016	2874	0,792313508	0,934851132	-0,535946984	1,937520108
0,150616112	1949,650736	2559	0,761879928	0,933431962	-0,654007685	1,997945757
0,166054263	1574,064583	2163	0,727722877	0,920168057	-0,812523667	2,037324611
0,182245495	717,19969	1130	0,634689991	0,977172051	-1,307298855	2,082175603
0,235337675	398,2345647	717	0,555417803	0,916044528	-1,520279769	3,128982085
0,254541229	305,7535521	591	0,517349496	0,904084212	-1,640745502	3,202357595
0,274497864	241,1112116	500	0,482222423	0,887251511	-1,743618196	3,202357595
0,295207579	210,441488	484	0,45353789	0,864365552	-1,799174173	3,251898368
0,338886252	152,876776	389	0,392999424	0,791093285	-1,93075492	3,332056013
0,361855209	127,3973134	346	0,368200328	0,772129724	-2,000618353	3,603728909
0,410052365	84,93154224	272	0,312248317	0,715048646	-2,155701728	3,603728909
0,487996202	49,54339964	207	0,239340095	0,60632824	-2,351674533	3,887335234
0,515483643	42,46577112	192	0,221175891	0,579972337	-2,407265164	3,887335234
0,543724164	32,08524929	162	0,198057094	0,530676509	-2,501913651	4,57591567
0,572717765	28,31051408	157	0,180321746	0,486868713	-2,544676767	4,57591567
0,602464447	23,59209507	146	0,161589692	0,440170322	-2,611510014	4,57591567
0,63296421	20,76104366	140	0,148293169	0,405109975	-2,649651222	4,57591567
0,664217053	16,04262464	127	0,126319879	0,378959637	-2,719989944	4,57591567
0,696222977	12,26788943	118	0,103965185	0,327890135	-2,80836689	4,57591567
0,728981981	12,26788943	117	0,104853756	0,322626941	-2,818796871	4,57591567
0,762494066	10,38052183	109	0,095234145	0,303017735	-2,880356565	4,57591567
0,796759232	7,549470421	95	0,07946811	0,278138384	-2,975742077	4,57591567
0,831777478	6,605786618	93	0,071029964	0,253678442	-3,020358168	4,57591567
0,867548804	5,662102816	84	0,067405986	0,235920951	-3,084968955	4,57591567
0,904073211	4,718419013	77	0,061278169	0,208345775	-3,163052739	4,57591567
0,941350699	2,831051408	64	0,044235178	0,206430832	-3,261162069	4,57591567
0,979381267	1,887367605	56	0,033702993	0,185366461	-3,363527206	4,57591567
1,018164916	1,887367605	53	0,03561071	0,160248193	-3,440024355	4,57591567
1,057701646	1,887367605	50	0,037747352	0,150989408	-3,465302777	5,136702453
1,097991456	0,943683803	47	0,020078379	0,120470273	-3,550169509	5,136702453
1,139034346	0,943683803	46	0,020514865	0,104625813	-3,572563349	5,136702453
1,180830317	0,943683803	44	0,021447359	0,085789437	-3,661426978	5,136702453
1,223379369	0,943683803	41	0,023016678	0,092066712	-3,72998248	5,136702453
1,266681501	0	37	0	0,076514903	-3,813392509	5,136702453
1,310736714	0	34	0	0,083286218	-3,84686835	10000000000

■ Nombre de gènes sélectionnés
■ FDR (%) correspondant

Figure II-7: Exemple de table de Delta, généré par le logiciel SAM d'après la structure des données

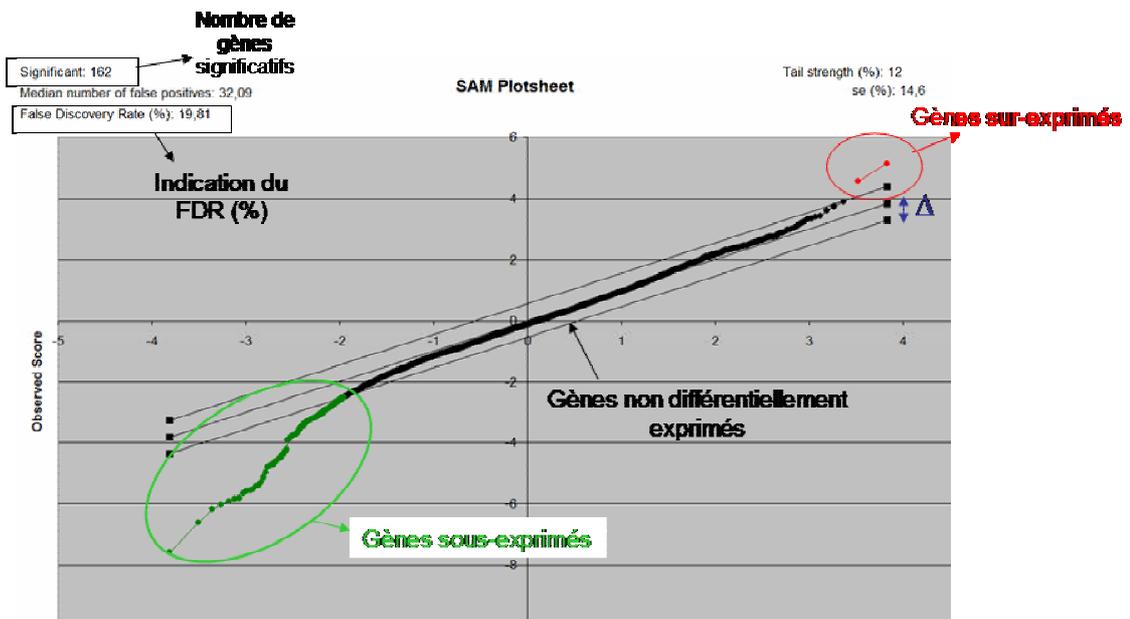


Figure II-8: Représentation graphique de la structure des données générée par le logiciel SAM

II-7.5.3 Significance analysis of microarray (SAM)

La méthode statistique SAM (Significance Analysis of Microarrays) est certainement aujourd'hui l'une des plus utilisée. Les modifications apportées au test t (test t modifié) tiennent compte du fait qu'il est difficile d'estimer la variance lorsque la taille des échantillons est petite. Il est possible d'obtenir un estimé plus stable en combinant les données de tous les gènes mais ceci implique que la variance est homogène entre les échantillons. SAM ajoute ainsi une petite constante au dénominateur du test t gène par gène (Tusher et al, 2001). Sur la base de ce test t modifié et de l'utilisation de permutations aléatoires des échantillons (ne faisant pas d'hypothèse sur la distribution des données étudiées), SAM estime le pourcentage de faux positifs (gènes identifiés seulement par chance) par méthode FDR et permet de sélectionner un groupe de gènes différentiels tout en contrôlant le pourcentage estimé de faux positifs à l'aide d'une table de delta (Figure II-7), générée d'après la structure des données. Le logiciel génère également une représentation graphique qui permet de visualiser la structure des données (Figure II-8).

Le logiciel est accessible gratuitement sous forme d'une macro Excel® et prend en charge la comparaison de deux conditions expérimentales (test t, sur données appariées ou non) ou plus (multiclasse, études cinétiques). L'utilisation de la technologie microarray nylon-marquage radioactif n'autorise l'hybridation que d'un seul échantillon par membrane. Les données sont donc considérées comme étant non appariées. Les données ont été analysées en utilisant un test t non apparié sur les groupes suivants :

- effet global du régime : LE contre HE, les 2 lignées confondues
- effet global de la sélection génétique : L contre F, les 2 régimes confondus
- effet de l'aliment, lignée fixée : L-LE contre L-HE d'une part, et F-LE contre F-HE d'autre part
- effet de la sélection génétique, régime fixé : L-LE contre F-LE d'une part, et L-HE contre F-HE d'autre part.

II-8 Analyse différentielle du protéome hépatique par électrophorèse bidimensionnelle

Pour l'analyse de foie de truite arc-en-ciel, nous nous sommes basés sur les protocoles utilisés par Martin et al. (2001) et avons testés les paramètres suivants : quantité de protéines déposées (100, 150 et 200 µg), temps de focalisation (50 000 Vhrs et 70 000 Vhrs) et temps de révélation pour la coloration (7 à 13 min). Seuls sont décrits ici les protocoles optimisés que nous avons retenus suite à ces mises au point.

Cinq échantillons par condition (L-LE, L-HE, F-LE et seulement 4 pour la condition F-HE, en raison de la perte d'échantillons pour des raisons indépendantes de l'expérimentation) ont été analysés par cette approche.

II-8.1 Préparation des échantillons

II-8.1.1 Solubilisation des protéines

Les échantillons de foie, conservés à -70°C et transportés dans l'azote liquide en vue de l'extraction, sont fractionnés encore congelés à l'aide d'un pilon. Pour chaque échantillon, 100mg de tissu sont ainsi prélevés et introduits dans 1,5 ml de solution de solubilisation. Cette solution de solubilisation est constituée de tampon de lyse de pH compris entre 9.8 et 10, et contenant 8M d'urée, 40mM de Tris et 4% de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane-sulfonate, *GE Healthcare*), qui peut être conservé à -20°C, et dans lequel sont ajoutés, extemporanément à l'extraction, 1mM d'EDTA (*Pharmacia*), 50mM de DTT (dithiothréitol, *GE Healthcare*), 1mM d'AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride) et 10µM d'E-64 (*Sigma*). L'urée est un agent chaotrope qui perturbe les liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires tandis que le DTT, agent réducteur, rompt les ponts disulfure intra- et inter-moléculaires des polypeptides, permettant la dénaturation et le dépliement total de la protéine. Le CHAPS est un détergent zwitterionique qui permet la solubilisation des protéines hydrophobes et prévient la précipitation des protéines en empêchant leur agrégation. L'élimination des interactions moléculaires permet en effet de s'assurer que chaque spot du gel 2D final corresponde à un seul polypeptide, alors que la dénaturation des protéines rend les acides aminés ionisables accessibles pour l'IEF. L'AEBSF est un inhibiteur irréversible des sérine-protéases (trypsine, chymotrypsine...). L'EDTA inhibe les métallo-protéases tandis que l'E-64 inhibe les cystéine-protéases (papaine, calpaïne, cathepsine B et L ...).

Les échantillons sont broyés mécaniquement à l'Ultra-Turrax pendant 10 secondes à température ambiante dans la solution de solubilisation et soumis à une première centrifugation, à 15 000g pendant 30min à 18°C, pour éliminer les débris cellulaires. A l'issue de cette centrifugation, les surnageants sont ensuite prélevés et soumis à une ultracentrifugation à 150 000g pendant 1h à 18°C, permettant ainsi l'élimination dans le culot des acides nucléiques, nuisibles à la résolution des gels bidimensionnels. A l'issue de la procédure d'extraction, des ampholytes porteurs (IPG buffer 3-10NL, Amersham Biosciences) sont rajoutés aux homogénats à raison de 1% du volume final. Les ampholytes augmentent la solubilité et assurent une conductibilité uniforme au cours de la focalisation. Chaque échantillon est ensuite aliquoté par 100µl et conservé à -70°C jusqu'à utilisation.

II-8.1.2 Dosage des protéines

La concentration protéique des échantillons est évaluée par la méthode Bradford, basée sur un dosage colorimétrique au bleu de Coomassie G-250 (Réactif BioRad Protein Assay®) et lecture de la densité optique à 595 nm. Le dosage de chaque échantillon est obtenu par comparaison avec une gamme étalon effectuée à partir d'albumine sérique bovine (BSA) solubilisée et diluée dans le même tampon de lyse que celui ayant servi à la solubilisation des protéines des échantillons. Cette gamme est composée de 8 concentrations réparties régulièrement entre 0,05 et 1 mg/mL.

II-8.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle

L'électrophorèse 2D combine deux techniques de séparation des protéines basées toutes deux sur des propriétés intrinsèques différentes des polypeptides et appliquées successivement selon deux dimensions: La première dimension consiste en une focalisation isoélectrique (IEF), qui permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI), suivi d'une Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), qui permet leur séparation dans la deuxième dimension suivant leur masse moléculaire. Cette combinaison permet de séparer les protéines avec une haute résolution. Chaque échantillon extrait est analysé en triplicats.

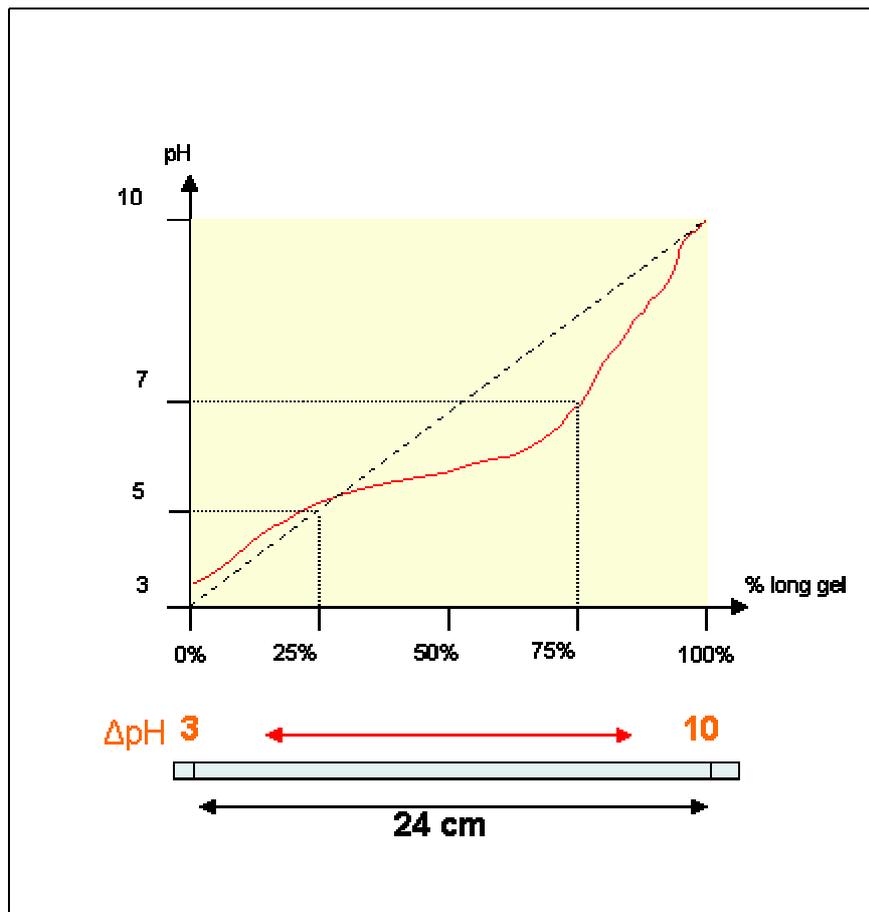


Figure II-9 : Bandelettes IPG drystrips à gradient de pH 3-10 non linéaire, 24cm: correspondance entre la position des protéines sur la bandelette et leur valeur de pI.

II-8.2.1 Focalisation isoélectrique (IEF)

L'application d'un champ électrique permet aux protéines de migrer jusqu'à la zone de pH de la strip correspondant à leur pI (pH auquel leur charge globale devient nulle). Nous avons choisi de travailler sur des bandelettes commerciales de gel précoulées (*Amersham Biosciences*) à gradient de pH immobilisé (IPG pour Immobilized pH Gradient), très reproductibles et permettant d'éviter les phénomènes de dérive cathodique que l'on pouvait rencontrer avec les ampholytes porteurs. Nous avons utilisé des bandelettes IPG de 24 cm de longueur, couvrant une gamme de pH allant de 3 à 10 non linéaire (IPG drystrips 3-10NL, 24cm). Cette « non linéarité » permet une meilleure résolution des protéines dont le pI se situe dans des valeurs de pH entre 5 et 7 (Figure II-9).

La première dimension est effectuée avec l'appareil Ettan™ IPGphor IEF Unit (*Amersham Biosciences*) qui permet de réaliser jusqu'à 12 IEF simultanément. Cet appareil permet en outre de réaliser à la fois la réhydratation des bandelettes, en présence d'échantillon, et l'IEF selon une procédure automatisée. La migration s'effectue dans des supports en céramique indépendants désignés sous le terme de sarcophages (IPGphor strip holder, *Amersham Biosciences*). Les échantillons sont passés en première dimension par série de 6, en prenant soin de représenter les 4 traitements (L-LE, L-HE, F-LE et F-HE) et en évitant de faire passer un même échantillon plusieurs fois dans la même série, de façon à éviter un biais de reproductibilité technique.

II-8.2.1.1 Réhydratation des bandelettes

La réhydratation des bandelettes IPG préalable à l'IEF est effectuée en présence de l'échantillon dans un tampon de réhydratation contenant de l'Hydroxyethyl Disulfide (Destreak® Rehydratation Solution, *Amersham Biosciences*). L'Hydroxyethyl Disulfide (HED) empêche la reformation des ponts disulfure en se complexant aux groupements thiol des résidus cystéines, pour former, de façon irréversible, des groupements oxydés S-thiohydroxyethyl. Afin d'obtenir une résolution optimale, avec un nombre maximal de spot et un minimum de bruit de fond ou de traînées, la quantité de protéines déposée doit être adaptée en fonction de la complexité des échantillons analysés, de la taille du gel d'électrophorèse, de la gamme de pH étudiée et de la coloration utilisée. 150 µg de protéines sont mélangés au tampon de réhydratation (qsp 447.7µl), auquel sont ajoutés 2.3µl (0.5% du volume final) d'IPG buffer (3-10NL, 24cm ; *Amersham Biosciences*). Après une heure d'incubation, les 450µl de solution sont déposés le long de la rigole du sarcophage, entre les deux électrodes. Une bandelette IPG 3-10 NL est délicatement déposée sur l'échantillon. L'ensemble est

protégé de la déshydratation et de l'oxydation par environ 2 mL d'huile minérale (Drystrip Cover fluid, Amersham Biosciences). L'application d'un faible voltage (30V) pendant 12 heures améliore la pénétration des protéines de haut poids moléculaire (PM > 100 kDa) dans la matrice du gel IPG : la réhydratation est alors dite active.

II-8.2.1.2 Migration

Le programme de focalisation comprend plusieurs phases à 20°C:

- une phase de réhydratation active, évoquée précédemment, qui s'effectue en appliquant un courant de 30 V, pendant 12 h

- une phase de conditionnement au cours de laquelle le voltage est augmenté graduellement: 200V, 500V puis 1 000V pendant 1h pour chaque pallier. En plus de favoriser la pénétration de l'échantillon dans la matrice du gel, cette phase de conditionnement permet d'éliminer l'excès éventuel de sels en les faisant migrer vers les électrodes. La conductivité du système ainsi diminuée, un voltage plus important peut alors être appliqué sans risques d'échauffement par effet Joule.

- une montée linéaire en voltage (de 1000 à 8000 V en 1 h30)

- une phase de focalisation (8000 V pendant 8h45, cumulant ainsi 70 000 Volts-heures totales) au cours de laquelle les protéines vont migrer jusqu'à atteindre leur pI respectif.

Les bandelettes peuvent alors être directement utilisées pour la deuxième dimension ou stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

II-8.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les bandelettes IPG sont mises en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), agent dénaturant qui se lie aux protéines, leur conférant ainsi une charge négative importante qui masque la charge propre des protéines. Les protéines de l'échantillon sont ainsi dotées d'une charge globale négative et vont, sous l'action d'un courant, migrer vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à leur masse moléculaire. A cela vient s'ajouter un effet de tamisage moléculaire de la part du gel de polyacrylamide. Nous avons utilisé des gels de polyacrylamide 12.5% coulés au laboratoire.

II-8.2.2.1 Réduction/alkylation des protéines

Les bandelettes IPG sont équilibrées 15 min dans 20 ml d'un tampon d'équilibration, de pH 8,8 et contenant 6 M d'urée, 2% (m/v) de SDS, 1,5 M de Tris-HCl, 30% (v/v) de glycérol et 65mM de DTT. Cette étape permet de saturer le gel en SDS et de réduire les ponts disulfures des protéines. Les bandelettes sont ensuite placées 10 min dans le même tampon en substituant le DTT par 2,5% (m/v) d'iodoacétamide (Sigma), permettant l'alkylation des protéines et du DTT résiduel, qui est alors neutralisé. Du bleu de bromophénol 0,05% (quelques grains) est ajouté à la solution afin de colorer la bandelette et de visualiser la progression du front de migration des protéines.

II-8.2.2.2 Migration

Pour la réalisation des électrophorèses SDS-PAGE, nous avons utilisé l'appareil Ettan Dalt6 (*Amersham Biosciences*) qui permet d'effectuer 6 électrophorèses en parallèle. La bandelette équilibrée est placée sur un gel 25cm x 20cm x 1mm, composé de 12.5% d'Acrylamide/Bisacrylamide (rapport 37.5/1), de 0.1% SDS, et de 375mM de tris/HCl (pH 8.8). La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'addition d'un système initiateur de radicaux libres, constitué de persulfate d'ammonium (0.1% final) et de N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine (TEMED, 0.023% final). La bandelette est disposée en haut du gel d'acrylamide, et 2 µL de marqueur de Poids Moléculaire de large gamme (10 à 250 kDa) (Full-Range Rainbow Molecular weight Markers RPN800, *Amersham Biosciences*) sont déposés sur le haut du gel du côté de l'anode. L'ensemble est ensuite recouvert d'une solution d'agarose 1% à bas point de fusion diluée dans du tampon de migration (*Amersham Biosciences*). La migration des protéines est réalisée dans la cuve inférieure de l'appareil remplie d'un "tampon Anode" 1X composé de 25 mM Trisbase, 192 mM glycine et 0,1% SDS, la cuve supérieure contenant du "tampon Cathode" 2X (50mM de Trisbase, 384mM de glycine et 0.2% de SDS). Une tension de 1000V et une intensité de 400mA sont appliquées tout au long de la migration qui se déroule en 2 phases : une première phase de 40 min à 2.5 W par gel (soit 15W pour 6gels), suivi d'une seconde phase à 17W par gel (limité par l'appareil à 100W pour 6 gel) jusqu'à la fin de la migration (la migration est arrêtée lorsque le bleu de Bromophénol, situé en avant du front de migration des protéines, s'apprête à sortir du gel, soit en moyenne après 4h de migration en phase 2). A l'issue de la migration, les gels sont immédiatement fixés dans une solution contenant 10% d'acide acétique, 40% d'éthanol et 50% d'eau bidistillée.

II-8.2.3 Coloration des protéines

Les protéines ainsi séparées par électrophorèse bidimensionnelle doivent être ensuite visualisées. Les méthodes de détection des protéines en gel 2D reposent principalement sur l'emploi de métaux lourds, comme les sels d'argent, ou de colorants organique, tel que le bleu de Coomassie. La sensibilité de ces colorations est très différente, ainsi que leur compatibilité avec les analyses de spectrométrie de masse pour l'identification des peptides. La coloration au nitrate d'argent est la plus sensible (hors méthodes basées sur la radioactivité) et permet une bonne quantification des protéines (Rabilloud, 2000). Elle rend cependant plus difficile l'identification des protéines en spectrométrie de masse (Gevaert et Vandekerckhove, 2000), avec souvent de plus faibles rendements d'identification observés par rapports à la coloration au Bleu. D'autre part, et du fait justement de sa haute sensibilité, la quantité de protéines introduite est plus faible afin d'éviter la saturation des spots, si bien que la quantité de protéines contenues dans les spots peut être insuffisante pour une détection en spectrométrie de masse. De ce point de vue, utiliser une coloration moins sensible pour les gels destinés à l'identification par spectrométrie de masse permet d'introduire de plus grandes quantités de protéines, et d'améliorer l'identification des protéines d'intérêt.

Afin d'optimiser les résultats, nous avons choisi la stratégie suivante : les gels destinés à l'analyse des images sont révélés avec une coloration à l'argent haute résolution, mais incompatible avec les analyses de spectrométrie de masse, tandis que l'identification des protéines d'intérêt est réalisé à partir d'autres gels, avec soit une coloration à l'argent moins résolutive, mais compatible avec les analyses en MALDI-TOF, soit une coloration au bleu de Coomassie R-250. Nous avons également testé par la suite une coloration optimisée au bleu de Coomassie colloïdal R-350.

Les gels destinés à l'analyse informatique des données ont été réalisés en introduisant 150µg de protéines totales extraites à partir d'échantillons individuels de foie.

Les gels destinés à l'identification des protéines en spectrométrie de masse ont été réalisés en introduisant un mélange d'extraits protéique constitué à partir d'un pool de tous les extraits. La quantité de protéines déposée est choisie en fonction de la sensibilité de la coloration utilisée. Au total, quatre gels colorés au nitrate d'argent compatible à la masse ont été réalisés, avec pour chacun, les quantités de protéines totales suivantes : 150, 300, 400 et 600µg. Deux gels colorés au bleu ont été réalisés, l'un avec la coloration au bleu de Coomassie R-350, l'autre avec la coloration au bleu de Coomassie G-250. Pour ces deux gels, la quantité de protéines introduite était de 600µg.

II-8.2.3.1 Coloration au nitrate d'argent pour l'analyse des images

Pour les gels destinés à l'analyse informatiques des données, les protéines sont révélées en utilisant une coloration à l'argent haute résolution (Merril *et al.*, 1979). Cette coloration au nitrate d'argent est largement utilisée pour révéler les protéines, mais ne permet pas l'analyse des spots issus de l'électrophorèse 2D en spectrométrie de masse en raison de la présence de lutaraldéhyde et de formaldéhyde lors de la coloration. Le glutaraldéhyde augmente la sensibilité de la coloration en interagissant avec le nitrate d'argent.

Les gels sont incubés pendant 30 min dans une solution de sensibilisation composée de thiosulfate de sodium (*Sigma*) 0,02%, acétate de sodium et de glutaraldéhyde. Les gels sont ensuite lavés à l'eau bidistillée 3 x 10 min et incubés pendant 40 min dans une solution de nitrate d'argent (*Sigma*) 0,01% et de formaldéhyde, sous agitation. Après un lavage à l'eau bidistillée pendant 2 min afin d'éliminer le nitrate d'argent en excès, les gels sont placés dans la solution de révélation (formaldéhyde (*Sigma*) 0,04%, carbonate de sodium (*Sigma*) 2%), sous agitation, jusqu'à apparition des spots. Le temps de révélation choisi (11 min) est le même pour tout les gels. Il permet un bon compromis entre la révélation des protéines minoritaires, la saturation des protéines majoritaires et importance des trainées horizontales résultant de la mauvaise focalisation de polypeptides tels que des protéines hydrophobes ou encore la présence de lipides résiduels. La réaction est arrêtée en plongeant les gels dans une solution d'EDTA, agent chelateur des ions Ag^+ .

II-8.2.3.2 Coloration au Nitrate d'Argent compatible à la masse

La coloration utilisée est celle décrite par Shevchenko *et al.* (1996). C'est une coloration dite "de surface", moins résolutive que la précédente, mais qui offre une meilleure compatibilité vis-à-vis de l'analyse des spots issus des gels 2D par spectrométrie de masse. Les gels sont incubés pendant 1 min dans une solution de sensibilisation composée de thiosulfate de sodium (*Sigma*) 0,02%. Les gels sont ensuite lavés à l'eau bidistillée 2 x 1 min et incubés pendant 30 min dans une solution de nitrate d'argent (*Sigma*) 0,01%. Après deux lavages à l'eau bidistillée pendant 1 min, les gels sont placés dans la solution de révélation (formaldéhyde (*Sigma*) 0,04%, carbonate de sodium (*Sigma*) 2%), sous agitation, jusqu'à apparition des spots. La réaction est arrêtée en plongeant les gels dans une solution d'acide acétique (5%).

II-8.2.3.3 Coloration au Bleu de Coomassie R-350

Un gel destiné à l'identification a été réalisé à partir d'un pool de tous les échantillons, en déposant 600µg de protéines totales. A l'issue de l'électrophorèse 2D, les gels sont fixés dans une solution d'éthanol (40%) et d'acide acétique (10%) pendant la nuit, sous agitation. Les gels sont ensuite lavés à l'eau bidistillée et incubés pendant 1 heure dans une solution de coloration (bleu de Coomassie R-350 0,1%, méthanol 30%, acide acétique 10%). Après rinçage à l'eau bidistillée, les gels sont incubés dans une solution de décoloration (éthanol 20%, acide acétique 10%) jusqu'à obtention du contraste souhaité.

II-8.2.3.4 Coloration au Bleu colloïdal G-250

La coloration utilisée est adaptée de celle de Neuhoff *et al.* (1988) avec des modifications rapportées par Candiano *et al.* (2004). Il s'agit d'une coloration au bleu optimisée. Nous avons utilisé cette coloration lors d'une seconde série d'analyses en spectrométrie de masse. Un gel a été réalisé à partir d'un pool de tous les échantillons, et en introduisant quantité de protéines totales de 600µg. Le gel est plongé dans une solution de coloration (acide ortho-phosphorique (PANREAC) 10%, sulfate d'ammonium (Fluka) 10%, bleu de Coomassie (CBB) G-250 (Bio-Rad) 1,2% et méthanol 20%) pendant 20 à 22 h. Le gel est ensuite décoloré à l'eau bidistillée, sous agitation douce, en renouvelant régulièrement la solution jusqu'à ce que le rapport entre l'intensité des spots et le bruit de fond soit satisfaisant et que l'équilibre avec l'eau de décoloration soit obtenu (18 à 24 h).

II-8.3 Analyses informatisées des gels

Les gels sont scannés à l'aide du scanner à transmission ImageScanner™ II (*Amersham Biosciences*) à une résolution de 200 dpi (*dots per inch*) et les images sont sauvegardées au format .TIFF en niveaux de gris. Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageMaster 2D Platinum™ version 5 (*Amersham Biosciences*), qui permet une détection et une quantification automatisée des spots.

Les images des gels issues du scan, au format .TIF, sont importées dans ImageMaster et converties sous un format .MEL, propre au logiciel. Elles sont ensuite intégrées dans un plan d'expérience virtuel, ou workspace, créé pour l'expérience: les images des gels sont ainsi ordonnées selon un plan hiérarchisé en fonction de leur appartenance à un échantillon

(réplicat technique), lui-même classé en rapport à son appartenance à l'un des quatre traitements L-LE, L-HE, F-LE ou F-HE (réplicat biologique). C'est au niveau du workspace que sont centralisées toutes les données d'analyse des gels : détection des spots, appariement, quantification...

II-8.3.1 Détection des spots

Après avoir importé les images des gels dans le logiciel, il faut définir les paramètres qui vont permettre au programme d'optimiser la détection des spots à partir d'une région restreinte et représentative des gels: seuil de détection par rapport à une intensité représentative du bruit de fond (*saliency*), aire minimale (*minimum area*, qui permet d'éliminer certains spots artéfactuels engendrés par la présence de poussières, de particules d'argent...) et lissage du signal (*smooth*). Les paramètres enregistrés sont les mêmes pour tous les gels. La détection automatique des spots peut alors être effectuée sur l'ensemble des images.

Néanmoins, une fois la détection automatique des spots effectuée, une intervention manuelle est nécessaire afin de nettoyer les gels: cette phase de nettoyage permet d'écarter de l'analyse les spots artéfactuels engendrés par la présence de bulles, poussières, qui auraient échappé au filtre mis en place pour la détection, ou bien encore les traînées horizontales et verticales, classiquement observées sur des gels colorés au nitrate d'argent). Cette étape est primordiale pour l'étape de quantification, car une des méthodes de normalisation des données utilisées s'appuie sur le volume total des spots détectés sur chacun des gels, et ne pas écarter ces artéfacts engendrerait un biais d'analyse. Une correction manuelle des contours de spots peut également être nécessaire du fait de variabilités d'origine diverses inhérentes à la technique: parmi les cas les plus fréquents, la saturation des spots correspondant aux protéines majoritaires qui engendre un effondrement du signal, générant une fragmentation artéfactuelle des spots concernés (Figure II-9B).

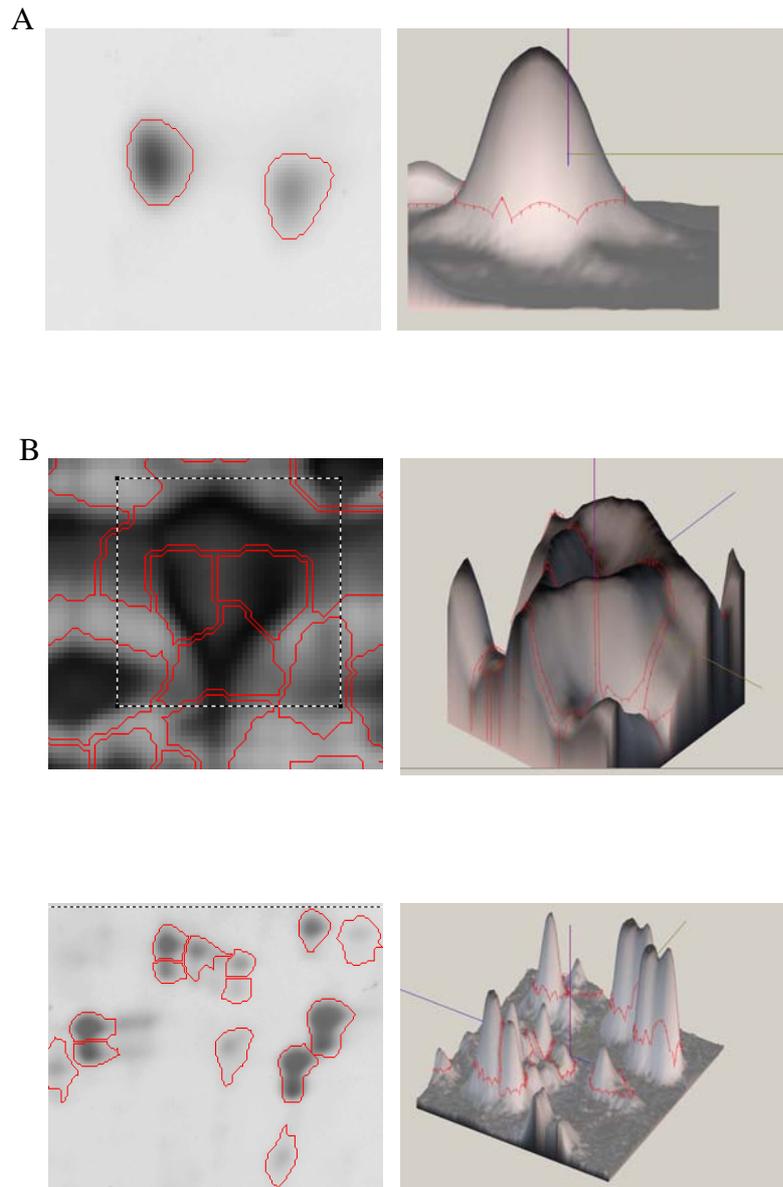


Figure II-10 : Représentation des spots en trois dimension par le logiciel ImageMaster™ 2D Platinum

A : spot « idéal », sans problème technique particulier. B : fragmentation artéfactuelle due à la saturation du spot. C : dédoublement artéfactuel des spots due à un problèmes de transfert des protéines de la première vers la deuxième dimension.

Les dédoublements de spots, dus à des problèmes de transfert des protéines de la première vers la deuxième dimension, ou encore la fusion de spots différents, trop rapprochés sur certains gels constituent d'autres cas communément rencontrés (Figure II-9C). Dans ce contexte, le recours à la vision 3D, possibilité offerte par le logiciel, constitue une aide majeure à la décision. Les spots résultants de cette étape sont appelés "spots valides".

II-8.3.2 Appariement des spots (ou "matching")

Cette étape permet d'établir la correspondance entre mêmes spots de tous les gels analysés. Le logiciel ImageMaster compare et apparie deux à deux les différents spots de chaque gel à ceux d'un gel référence (ou *Master gel*) défini pour l'ensemble des gels. Ce gel référence doit contenir tous les spots présents sur les différents gels, sachant que tout spot absent du gel référence sera ignoré dans la suite de l'analyse. Nous avons opté pour un gel réalisé avec un pool de tous les échantillons, en introduisant une quantité de protéines totales identique pour chacun d'entre eux. Le choix de la quantité de protéines totale déposées résulte d'un compromis entre augmentation de cette quantité afin de compenser la dilution des spots spécifique d'une ou plusieurs conditions, tout en limitant la saturation des spots correspondant aux protéines les plus abondantes ainsi que les traînées, gênantes pour la détection des spots. Notre choix s'est porté sur une quantité de 200µg de protéines totales pour le gel référence, contre 150µg utilisés pour l'analyse de nos échantillons.

Cette procédure d'appariement des spots est effectuée de façon automatique par le logiciel. Il est cependant nécessaire de définir manuellement des spots invariants répartis sur l'ensemble du gel comme points de repère (*landmarks*) afin que le logiciel puisse compenser les différences de migrations entre gels et les déformations de ceux-ci. Malgré ces précautions, il peut arriver que le programme n'apparie pas correctement certains spots et une intervention manuelle peut dans ce cas être nécessaire. Une fois tous les spots appariés, l'étape de quantification peut être effectuée. Celle-ci est effectuée de façon automatique par le logiciel et prend en compte le volume des spots, qui correspond à la surface détectée multipliée par la DO de chaque spot.

II-8.3.3 Normalisation des données

Le volume des spots peut varier d'un gel à l'autre en raison d'un certain nombre de facteurs expérimentaux : différences de quantité de protéines déposées, pertes de protéines lors de l'IEF ou du transfert de la première vers la deuxième dimension, variabilité de coloration, différences de température ambiante...

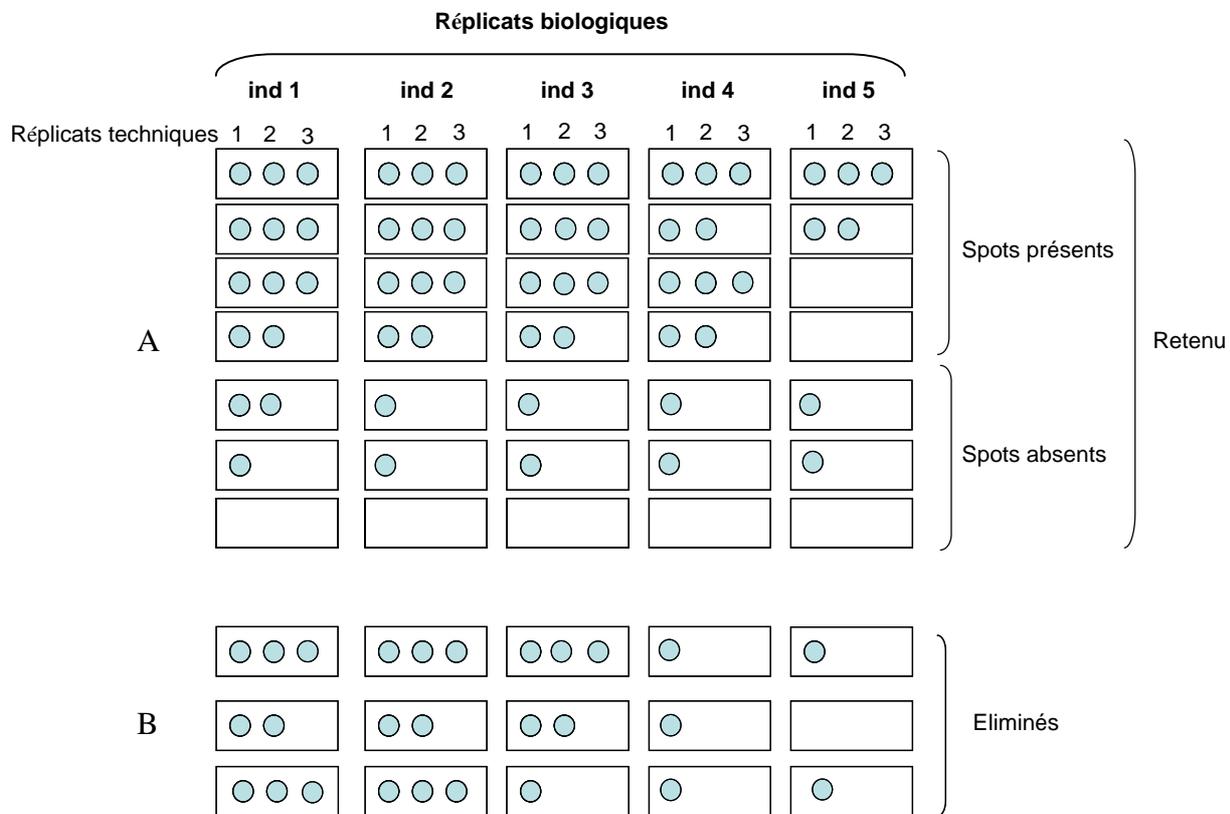


Figure II-11 : Analyse qualitative des données : illustration des différents cas de figure rencontrés dans la détection des spots à l'échelle des réplicats techniques et biologiques. A : situations pour lesquelles la règle appliquée permet de statuer sur la présence ou l'absence d'un spot à l'échelle de la condition expérimentale considérée; B : situations conflictuelles pour lesquelles les spots ont été écartés de l'analyse des données

Afin de pouvoir effectuer une analyse comparative fiable du niveau d'expression des protéines entre échantillons, il est nécessaire de corriger ces variations techniques, indépendantes du contexte biologique, en appliquant une normalisation des données. Il existe plusieurs manières de normaliser les gels :

- par rapport à un groupe de spots que l'on sait être invariants entre échantillons.
- par rapport au volume total des spots détectés pour chacun des gels (les valeurs de quantification pour chaque spot sont alors exprimées en pourcentage de volume total des spots détectés pour chaque gel).

Ne sachant pas quels sont les spots invariants, nous avons opté pour le deuxième mode de normalisation. L'ensemble de ces données peut être exporté sous forme de fichiers Excel pour être analysé en détail par des logiciels d'analyse statistique adaptés.

II-8.4 Analyse des données

L'analyse différentielle des gels revêt deux aspects complémentaires : un aspect qualitatif, qui renvoie à la notion de spots induits ou réprimés (spots présents/ absents) et un aspect quantitatif, vis-à-vis des spots sur- ou sous-exprimés.

II-8.4.1 Analyse qualitative des données

L'analyse qualitative des gels a été menée en appliquant la règle suivante (Figure II-11) :

Ont été considérés comme présents (Figure II-11A)

- à l'échelle de l'échantillon, les spots détectés au moins deux fois sur trois (triplicats techniques)
- à l'échelle des réplicats biologiques, représentatifs de chaque condition (L-LE, L-HE, F-LE ou F-HE), les spots détectés pour au moins quatre échantillons sur cinq.

Ont été considérés comme absent (Figure II-11B)

- à l'échelle de l'échantillon, les spots détectés au plus une fois sur trois (triplicats techniques)
- à l'échelle de chaque condition (L-LE, L-HE, F-LE, F-HE), les spots déclarés présents dans un seul échantillon au maximum

Les spots ne satisfaisant pas à l'une ou l'autre de ces modalités ont été écartés de l'analyse.

II-8.4.2 Analyse quantitative des données

Pour effectuer l'analyse quantitative des gels, une MANOVA à deux facteurs (génotype, régime sur les données normalisées de l'ensemble des spots, en fixant un seuil de significativité de 5%, a été réalisée avec le logiciel Statistica pour Windows (version 5.1). A l'issue de ces analyses, l'appariement correct des spots dont l'expression varie de façon significative entre conditions est de nouveau vérifié visuellement. Les données ont également été analysées à l'aide d'une MANOVA imbriquée à trois facteurs ($p \leq 0,05$), en imbriquant le facteur "réplicat technique" dans les réplicats biologiques.

II-8.5 Identification des protéines par spectrométrie de masse

Parmi les spots présentant une expression différentielle significative à l'issue des analyses qualitative et quantitatives, seuls ceux qui présentent une qualité suffisante en terme de quantité et de séparation sur les gels sont sélectionnés afin d'optimiser les chances d'identification en spectrométrie de masse.

Le prélèvement des spots d'intérêt est l'étape la plus critique vis-à-vis du risque de contamination des gels par de la kératine. Toutes les précautions doivent être prise (blouse intégrale, lunettes de protection, masque..) et l'opération se déroule en salle blanche. Les spots d'intérêt sont excisés manuellement des gels en utilisant un cône de pipette coupé comme emporte pièce. Chaque fragment de gel prélevé est transféré dans le puit d'une microplaque 96 puits et ces fragments de gel sont lavés plusieurs fois à l'eau milliQ avant leur digestion trypsique.

II-8.5.1 Digestion des protéines et extraction des peptides générés

La préparation de l'échantillon est très importante pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse. L'étape de digestion des protéines est réalisée automatiquement par un robot Ettan[®] Spot Handling Workstation, *Amersham Biosciences*). Les morceaux de gels sont immergés dans 50 μ L d'acétonitrile (ACN, *Merck*, Darmstadt, Allemagne) 50% et mis 15 min sous agitation. Cette opération est répétée une seconde fois et les surnageants sont éliminés. Les morceaux de gels sont alors déshydratés dans 50 μ L d'ACN pur (5 min, sous agitation). Après élimination du surnageant, les échantillons sont réhydratés 5 min dans 50 μ L de tampon NH_4HCO_3 (*Fluka*, Buchs, Suisse) 25mM, pH 7,8 puis 50 μ L d'ACN pur sont ajoutés. Les surnageants sont ensuite éliminés et les morceaux de gel séchés sous vide quelques minutes (Speed-vac, Savant). Les échantillons sont alors réduits puis alkylés. La

réduction se fait par incubation 45 min à 56°C en présence de 50 µL de tampon NH₄HCO₃ 25 mM additionné de DTT 10 mM. Les surnageants sont éliminés puis les protéines sont alkylées : les morceaux de gel recouverts immédiatement avec 50 µL de tampon NH₄HCO₃ 25 mM additionné d'iodoacétamide 55 mM. Les échantillons sont agités pendant 30 min à l'obscurité et les surnageants éliminés. Les gels sont lavés deux fois par 50 µL d'une solution comprenant 50% d'ACN et 50% de tampon NH₄HCO₃ 25 mM (sous agitation, 5 min). Un troisième lavage est réalisé avec de l'ACN pur. Après élimination des surnageants, ces échantillons déshydratés sont séchés sous vide. La digestion "in gel" consiste à réhydrater les morceaux de gel avec une solution de trypsine (Promega, Madison, WI) à 15 ng/µL dans du tampon NH₄HCO₃ 25mM. Après absorption complète de cette solution, 2 µL de tampon NH₄HCO₃ 25 mM sont ajoutés. Les échantillons sont incubés une nuit à 37°C. Le lendemain, les peptides sont extraits par 4 µL d'une solution composée de 70% d'ACN et 3% d'acide formique et les échantillons sont soniqués 10 min. Les peptides sont dessalés et concentrés sur microcône ZipTip C₁₈ (Millipore) puis élués dans 4 µL d'ACN 50%.

II-8.5.2 Analyse des échantillons par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse des fragments tryptiques se fait par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight), sur un BiflexIII (*Bruker*, Bremen, Allemagne). Cette technique, particulièrement sensible, permet de mesurer la masse de peptides présents dans un mélange à une concentration subpicomolaire. Cette technique est basée sur l'analyse de l'échantillon co-cristallisé avec une matrice (acide cyano hydroxycinnamique) selon la préparation "sandwich" décrite par Kussman et collaborateurs (*Kussmann et al.*, 1997). L'ensemble est bombardé par un rayon laser. L'énergie du laser est absorbée par les co-cristaux et provoque le passage en phase gazeuse de la matrice et de l'analyte (*Yates*, 1998). Les peptides sont ensuite ionisés par un mécanisme de transfert de protons depuis la matrice vers les peptides donnant des ions préférentiellement monochargés ([M+H]⁺). Les ions produits au niveau de la source sont ensuite accélérés par un champ électrique uniforme (19 kV) puis traversent un tube de vol, libre de champ, où ils volent littéralement jusqu'à l'analyseur selon une vitesse inversement proportionnelle au rapport masse sur charge (les ions les plus chargés et les plus légers atteignent le détecteur les premiers). Une calibration interne est effectuée en utilisant les fragments d'autolyse de la trypsine ([M+H]⁺ à m/z 842,510, 1045,546 et 2211,104). L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF permet ainsi d'obtenir une liste de masses des différents fragments de la protéine obtenus après la digestion tryptique, appelée empreinte peptidique.

II-8.5.3 Identification des protéines par recherche dans les banques de données

Les empreintes de masse peptidique sont ensuite comparées à des banques de données (SWISSPROT, Banque de données d'EST poissons..). Cette comparaison est associée à une valeur (ou "score") fondée sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus dont les masses peuvent correspondre à celles des fragments protéolytiques des banques de données, et par la précision avec laquelle les masses sont déterminées. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables. Un seuil de significativité, au-delà duquel on considère que l'identification est valide, est fixé par le logiciel de recherche. On peut ainsi caractériser une protéine connue (soit identifiée, soit répertoriée comme produit de gène) uniquement grâce à une liste de masses peptidiques. De plus, les logiciels de recherche utilisés (Mascot) permettent l'identification de modifications chimiques (carbamidométhylation par exemple) ou post-traductionnelles (phosphorylation par exemple) sur les peptides analysés. En plus d'un score significatif, l'identification des spots a été validée par comparaison des masses moléculaires (MW) et de pI théoriques de la protéine avec les valeurs mesurées sur nos gels 2D.

Chapitre III

- Résultats-

Les résultats issus des travaux réalisés au cours de ma thèse ont fait l'objet de trois publications. Je les présenterai donc sous forme de trois sections, chacune correspondant à l'objet de ces trois publications.

Publication n°1

- **Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., and Médale, F., 2008.** Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1154-R1164.

Les résultats présentés dans cet article concernent la caractérisation du matériel biologique (composition corporelle, paramètres de croissance et d'utilisation de l'aliment) et l'évaluation des différences métaboliques entre lignées et régime par une approche "candidat", en mesurant l'expression et l'activité des principales enzymes impliquées dans l'utilisation métabolique de l'énergie.

Publication n°2

- **Kolditz, C., Paboeuf, G., Borthaire, M., Esquerré, D., SanCristobal, M., Lefèvre, F., and Médale, F., 2008.** Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. *BMC Genomics* **9**, 506

Cet article présente l'analyse des effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur les profils d'expression des gènes et des protéines hépatiques, en combinant analyse du transcriptome (microarray nylon) et du protéome (électrophorèse bi-dimensionnelle-spectrométrie de masse).

Publication n°3 (à soumettre)

- **Kolditz, C., Plagnes-Juan, E., Lefèvre, F., and Médale, F. A soumettre.** Changes in white muscle transcriptome induced by dietary energy levels in two lines of rainbow trout selected for muscle fat content;

Cet article présente l'analyse des effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur les profils d'expression des gènes au niveau du muscle blanc, cible de la procédure de sélection, en procédant à une analyse du transcriptome (microarray nylon)

III-1 Effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel: évaluation des différences métaboliques par approche "candidats"

La quantité de lipides stockés au niveau musculaire dépend de l'équilibre entre l'apport alimentaire en lipides, la synthèse de novo de lipides (qui a lieu dans le foie chez les poissons) à partir des squelettes carbonés des autres nutriments, le captage des lipides plasmatiques par le muscle et finalement le stockage ou l'utilisation musculaire des lipides à des fins énergétiques. Plusieurs hypothèses peuvent donc être formulées pour expliquer les différences de teneur en lipides musculaires observées entre régimes alimentaires, d'une part, et entre lignées, d'autre part :

- 1) Un apport en lipides alimentaires accru, lié à la plus forte teneur en lipides du régime HE, d'une part, et à une prise alimentaire plus élevée chez les individus de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L, d'autre part.
- 2) Une sécrétion accrue de lipides par le foie, liée à une synthèse de novo plus importante des lipides (lipogénèse) à partir des autres nutriments ou une plus faible utilisation des lipides à des fins énergétiques, chez les individus de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L.
- 3) une activité plus importante de la LPL, enzyme contrôlant le captage des lipides, dans le muscle des poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE d'une part et de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L d'autre part.
- 4) Une utilisation plus faible des lipides à des fins énergétiques dans le muscle, favorisant leur accumulation *in situ*.

Dans cette première étude, nous avons analysé les effets de la sélection génétique et du régime alimentaire sur la composition corporelle, la prise alimentaire, l'utilisation de l'aliment et les performances de croissance des jeunes truites pour expliquer les variations de teneur en lipides du muscle. Afin de tester les différentes hypothèses évoquées, nous avons analysé l'expression et/ou l'activité de plusieurs enzymes clé impliquées dans:

- la lipogénèse hépatique : l'acide gras synthase (AGS), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), qui interviennent directement dans la conversion des acétyl-CoAs en acide palmitique, ainsi que la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et

l'enzyme malique (EM), enzymes génératrices de NADPH nécessaire pour la synthèse de novo des acides gras.

- la β -oxydation des acides gras : l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HOAD), marqueur de la β -oxydation mitochondriale des acides gras, les différentes isoformes de la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1a, b, c et d), qui contrôle l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, l'acyl-CoA oxydase (ACO), marqueur de la β -oxydation péroxysomale des acides gras, et enfin PPAR α et PPAR β , facteurs de transcription qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, en intervenant notamment dans la régulation des principales enzymes de la β -oxydation.
- la glycolyse : l'hexokinase I (HK-I), qui catalyse la première étape de la glycolyse et la pyruvate kinase (PK), dernière enzyme de la glycolyse anaérobie.
- le métabolisme énergétique mitochondrial : l'isocitrate déshydrogénase-NADP dépendante (ICDH-NADP) et la citrate synthase (CS), marqueurs du cycle de Krebs, et la cytochrome oxydase (COX), au niveau de la chaîne respiratoire.
- le captage des lipides par le muscle: lipoprotéine lipase (LPL)

Ces analyses ont été effectuées au niveau du foie, site principal de la lipogénèse chez les poissons et centre du métabolisme intermédiaire, et sur le muscle, tissu cible de la procédure de sélection appliquée.

Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

C. Kolditz,¹ M. Borthaire,¹ N. Richard,¹ G. Corraze,¹ S. Panserat,¹ C. Vachot,¹ F. Lefèvre,² and F. Médale¹

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1067 Nutrition Aquaculture and Genomics, Pôle d'Hydrobiologie, Saint-Pée-sur-Nivelle; and ²INRA, Unité de Recherche 1037 Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement, Campus de Beaulieu, Rennes Cedex, France

Submitted 22 October 2007; accepted in final form 30 January 2008

Kolditz C, Borthaire M, Richard N, Corraze G, Panserat S, Vachot C, Lefèvre F, Médale F. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1154–R1164, 2008. First published January 30, 2008; doi:10.1152/ajpregu.00766.2007.—We combined genetic selection and dietary treatment to produce a model to study metabolic pathways involved in genetic and nutritional control of fat deposition in fish muscle. Two experimental lines of rainbow trout, selected for a lean (L) or fat (F) muscle, were fed with diets containing either 10 or 23% lipids from the first feeding, up to 6 mo. At the end of the feeding trial, trout were distinguished by very different muscle fat content (from 4.2 to 10% wet weight), and line × diet interactions were observed for parameters related to fat storage. We analyzed the activity and gene expression of key enzymes involved in lipid metabolism (fatty acid synthase, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferase 1 isoforms, and peroxisome proliferator-activated receptor α) and glycolysis (hexokinase 1 and pyruvate kinase) as well as energy production (isocitrate dehydrogenase, citrate synthase, and cytochrome oxidase) in the liver and the white muscle of rainbow trout. The lipid-rich diet repressed the activity of the lipogenic enzymes and stimulated enzymes involved in fatty acid oxidation and glycolysis in liver but had little effect on muscle enzymes assessed in this study. Regarding the selection effect, enzyme activity and expression suggest that compared with the L line, the F line presented reduced hepatic fatty acid oxidation as well as reduced mitochondrial oxidative capacities and enhanced glucose utilization in both liver and muscle. Very few line × diet interactions were found, suggesting that the two factors (i.e., dietary energy content and selection) used in this study to modify muscle lipid content exerted some additive but mostly independent effects on these metabolic actors.

fish nutrition; metabolism; enzyme activity; gene expression

MUSCLE LIPID STORES CONSTITUTE an important energy source for muscle functions [e.g., during a prolonged muscular exercise (18, 35) or during fasting (17)]. In addition, muscle lipid level has become of considerable interest for the farm animal industry, since it strongly affects meat quality in terms of its nutritional value and sensory properties (1, 36, 44). Dietary manipulation and genetic selection are currently the main tools used to manage muscle fat content in farm animals. Energy intake and genetic factors also have a major influence on obesity in humans (30).

Increasing dietary energy supply promotes fat deposition in the whole body, including muscle in most fish (1, 36), as well as in other farm animals (11, 45). Salmonids have a high ability to store fat in muscle and show a wide range of variation for muscle lipid content under dietary manipulation, from 3% to as much as 18% (12, 36, 8), thus making salmonids particularly suitable species in which to study the mechanisms involved in muscle fat deposition and mobilization.

As mentioned above, selective breeding is another commonly used way to manage body fat content (9, 28). Recently, Quillet et al. (32) developed two experimental lines of rainbow trout through divergent selection for low or high muscle fat content, using a nondestructive measurement on live fish. Analysis of body composition after two generations of selective breeding showed that the selection procedure was efficient. Feeding the lines with diets differing in energy content enlarged the range of muscle fat level (33), suggesting a cumulative effect of the genetic background and the dietary treatment on muscle fattening. Combining genetic selection and dietary treatment thus resulted in a relevant model to gain further knowledge about the metabolic changes that occur when manipulating muscle fat content by these ways. Muscle lipid content results from the metabolic balance among dietary fat supply, de novo fatty acid synthesis in the liver, uptake of plasma triglycerides by muscle, and subsequent partitioning of fatty acids toward storage or oxidation for energy requirement. An increase in dietary fat level has been shown to depress the activity of different lipogenic enzymes in salmonids (12), but the effects on the other metabolic actors involved in energy utilization have been scarcely explored. With regard to the genetic selection effect, nothing is presently known about the contribution of these metabolic pathways in the differences in muscle fat content observed between lines. The question we addressed was whether these two factors, i.e., genetic selection and dietary manipulation, used to modify muscle fat content, affect in the same way key actors involved in the main metabolic pathways of energy utilization.

In the present study, we used trout from the two divergent lines described above but resulting from the third generation of selective breeding, and we fed them two diets, either with added fish oil (23% lipids) or without (10% lipids) from the first feeding onward, over a period of 6 mo. We analyzed the effects of genetic selection and dietary energy supply on body composition and growth parameters as well as feed utilization

Address for reprint requests and other correspondence: F. Médale, INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture and Genomics, Pôle d'Hydrobiologie, CD 918, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France (e-mail: medale@st-pee.inra.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

and examined the response of several key actors involved in fatty acids uptake by tissue (lipoprotein lipase), lipogenesis (fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and acetyl-CoA carboxylase), fatty acid oxidation (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferase 1, acyl-CoA oxidase, and peroxisome proliferator-activated receptor α), glycolysis (hexokinase 1 and pyruvate kinase), and energy production (isocitrate dehydrogenase, citrate synthase, and cytochrome oxidase). The objectives were 1) to examine the response of these key metabolic actors to the dietary treatment, 2) to identify those that were modified by the genetic selection, and 3) to evaluate the possible cumulative effects of the genetic background and long-term feeding of a high-energy diet on the selected metabolic actors. These latter analyses were conducted in the liver, which is the center of intermediary metabolism and the main site of lipogenesis in fish, and in the muscle, the target tissue of the selection applied.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Fish and Diets

The two lines of rainbow trout, designed as L (lean muscle line) and F (fatty muscle line), were obtained after three generations of divergent selection for high or low muscle fat content using a nondestructive method (Distell Fish Fatmeter). The selection process has been detailed by Quillet et al. (32). Fish were reared in the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) experimental facilities (PEIMA, Drennec, Sizun, Finistère, France) at a constant water temperature of $11.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The experiment was conducted following the *Guidelines of the National Legislation on Animal Care of the French Ministry of Research*.

Two experimental diets, designed as LE (low-energy diet) and HE (high-energy diet), were formulated by INRA and manufactured by a feed producer as extruded pellets. They were made from the same fishmeal-based mixture. About 15% fish oil was added to the HE diet to induce a large difference in lipid content between the two diets. The LE diet contained 9.8% lipids, provided by fishmeal, whereas the HE diet contained 23% lipids (Table 1), which is close to the highest values of fat content of commercial diets for young rainbow trout. The increase in dietary crude fat content was accompanied by a decrease in the proportions of protein and starch in the HE diet and an increased ratio of *n-3/n-6* polyunsaturated fatty acids (Table 1).

Feeding Trial

Just before the first feeding time, fish of each line were distributed into six tanks of 500 animals (mean body weight: 0.16 g). Triplicate groups of each genotype were fed either the LE or the HE diet for 6 mo. During the first 4 mo, food was distributed in excess to ensure that food supply was not limiting. From the fifth mo, food pellet size was high enough to enable collection of uneaten food. The fish were group-weighted every 2 wk and counted to calculate the average body

weight. Feed intake was recorded daily during the last 2 mo of the trial and feed efficiency calculated for the 2-mo period.

Sampling Procedure

To study the long-term effect of dietary treatment and not the effect of a test meal, fish were sampled 24 h after the meal to ensure that digestion and transit were completed. This postfeeding time does not correspond to a fasting state, since in trout, as in other ectothermic animals, basal metabolic levels are reached later than in mammals. This is due to a slower transit and a longer gastric emptying time at low temperature compared with that in endothermic animals. Ten fish per tank were sampled at the beginning of the "feed intake measurement period" (5th month) and at the end (6th month). They were pooled per tank, ground, and freeze-dried before being analyzed for protein and fat content of whole body.

At the end of the 6-mo feeding trial, all fish were anesthetized with 2-phenoxyethanol at the recommended dose for surgical procedures (0.2 ml/l) 24 h after a meal. They were individually measured for weight and length. Nineteen fish per tank were killed by a sharp blow on the head. Liver and viscera were weighed to calculate the hepatosomatic index [HSI (%) = $100 \times (\text{liver weight/body weight})$], and the viscerosomatic index [VSI (%) = $100 \times (\text{total viscera weight/body weight})$]. Pieces of white muscle were excised from the dorsal right fillet for enzyme activity measurements. Fillets from the left side of the fish were kept after trimming and skin withdrawal as samples for analysis of lipid content. Three additional fish per tank were sampled for liver and white muscle under RNase-free conditions to perform gene expression analysis. All the tissues samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Chemical Analysis

The chemical composition of the diets and the freeze-dried samples of whole body collected at the fifth and sixth months was analyzed using the following procedures: dry matter after drying at 105°C for 24 h, lipids after petroleum ether extraction at 160°C , protein by the Kjeldahl method, gross energy in an adiabatic bomb calorimeter, and starch in the diets by the glucose-amylase-glucose-oxidase method (40). Total lipid content in the muscle was measured according to the Folch method (10) with dichloromethane instead of chloroform as a solvent.

Metabolic Pathways

The effects of genetic selection and dietary treatment on lipogenesis, fatty acid oxidation, glycolysis, and energy production were studied through the analysis of gene expression and activity of the key enzymes involved in these pathways. The lipogenic enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC; EC 6.4.1.2) as well as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49) and malic enzyme (ME; EC 1.1.1.40), which provide NADPH for fatty acid synthesis, were analyzed only for activity because of the absence of sequence information for rainbow trout in the databases. Gene expression of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) was measured as a key regulator of fatty acid oxidation.

Gene expression analysis: quantitative RT-PCR. Total RNAs were extracted from liver and white muscle using the TRIzol reagent method (Invitrogen, Carlsbad, CA). Nine individual samples per experimental condition were used as biological replicates. Total RNA was quantified using spectrophotometry based on absorbance at 260 nm, and integrity was controlled using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Sweden). Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed to cDNA with the SuperScript III RNase H reverse transcriptase kit (Invitrogen) using oligo(dT)₁₅ primers (Promega). Reverse transcription of each RNA extract was done in duplicate. Real-time PCR was performed with the iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA) on triplicates of 10 μl of the RT reaction mixtures using

Table 1. Approximate composition of experimental diets

Diets	LE	HE
DM, %	93.0	93.3
Protein, %DM	57.6	51.1
Lipid, %DM	9.8	23.1
<i>n-3/n-6</i> FA	1.5	2.5
Starch, %DM	12.1	9.2
Energy, kJ/g DM	21.0	23.8

LE, low-energy diet; HE, high-energy diet; DM, dry matter; FA, fatty acids.

the iQ SYBR green Supermix (Bio-Rad). The total volume of the PCR reaction mixture was 25 μ l, containing 200 nM of primers. Specific primer pairs were designed using Primer3 software and chosen to contain an overlapping intron when it was possible, using known sequences in nucleotide databases (GenBank, http://www.genome.ad.jp/htbin/www_bfind?dna-today; National Institute of Agronomic Research INRA-Sigenae, <http://ensembl-sigenae.jouy.inra.fr/>; Tigr Gene Index, <http://www.tigr.org/tdb/tgi/>). Database accession numbers and the sequences of the forward and reverse primers used for each gene tested for its expression are shown in Table 2. All the different PCR products were controlled by sequencing the amplicon. Thermal cycling was initiated with the incubation at 95°C for 90 s for hot-start iTaq DNA polymerase activation. Thirty-five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95°C for 20 s for denaturing and 30 s at the corresponding primer pair's annealing temperature (see Table 3) for hybridization and extension. After the final cycle of the PCR, melting curves were systematically monitored (increasing set point temperature from 59 to 95°C by 0.5°C/10 s). Negative controls (sample without reverse transcriptase, samples without RNA) were done for each reaction. mRNA levels of all target genes were normalized with the housekeeping gene α -elongation factor 1 (EF1 α), previously used as a gene reference in salmonids (29). Expression levels were calculated according to threshold cycle ($\Delta\Delta C_T$) method (31).

Enzyme activities. Enzyme activities were measured on thawed samples of liver and white muscle. Activities of fatty acid synthase (FAS; EC 2.3.1.85), ACC, G6PDH, and ME were measured in liver as described by Richard et al. (34), using homogenates obtained from individual whole liver. Lipoprotein lipase (LPL; EC 3.1.1.34) activity was measured in muscle samples as described by Richard et al. (34).

Activities of the following enzymes were measured in liver and muscle samples. Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD; EC 1.1.1.35) enzyme activity was performed according to Kobayashi et al. (22). The glycolysis pathway was studied by measuring activity of hexokinase 1 (HK1; EC 2.7.1.1) and pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) as previously described (21). Citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7) was measured according to Singer et al. (38) by following the reduction of DTNB at 412 nm. To measure NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH-NADP; EC 1.1.1.42) activity, samples were homogenized in an ice-cold buffer (20 mM Tris·HCl, 250 mM mannitol, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 10 mM mercaptoethanol, and 0.5 mM PMSF), sonicated, and centrifuged at 12,000 *g*. Activity was assessed following NADP reduction at 340 nm after addition of 89.7 mM tetraethylammonium chloride at pH 7.4, 41 mM NaCl, 0.34 mM NADP, 0.43 mM MnSO₄, and 4.17 mM D,L-isocitrate to supernatants. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the hydrolysis of 1 μ mol of substrate per minute at assay temperature. Enzyme activities were expressed per milligram of

soluble protein. Protein concentration was determined according to the Bradford method, using a Bio-Rad protein assay kit (Munich, Germany) with bovine serum albumin as a standard.

Statistics

Data are means \pm SE. Angular transformation was applied to proportions (lipid, protein, and moisture content, VSI, and HSI) before performing analyses to meet assumptions of variance analysis (homogeneity of variance and normally distributed residuals). The effects of dietary treatments, lines, and line \times diet interactions on the different parameters were tested using the statistical software SAS by means of a two-way (line and diet) analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant when the probability level was <0.05 . When interactions were significant, means were compared using the Student-Newman-Keuls test.

RESULTS

Growth Performance, Feed Intake, and Nutrient Efficiency

Data on growth and feed utilization are reported in Table 4. Feed intake was the same irrespective of the line or the diet. As expected, the HE diet improved feed and protein efficiencies ($P = 0.003$ and 0.0001 , respectively), with a protein sparing effect provided by the higher amount of lipids of this diet. The higher energy content of the HE diet enhanced weight gain ($P = 0.0001$) and growth ($P = 0.043$) of fish irrespective of the line. Protein retention was not affected by dietary treatment, contrary to lipid retention that was increased in fish fed the LE diet ($P = 0.0006$), with values above 100%, indicating an active de novo lipid synthesis.

Higher feed efficiency and protein efficiency were observed in L fish ($P = 0.03$ and 0.026 , respectively), particularly when fed the HE diet, but no significant line \times diet interaction was recorded for these traits ($P = 0.09$ and 0.07 , respectively). At the end of the feeding trial, fish of the L line showed higher body weight ($P = 0.0001$) and total length ($P = 0.0001$) than fish of the F line. Daily protein and lipid gains were not significantly different among the two lines.

Whole Body and Tissue Composition

Dietary treatment modified whole body composition of fish of both lines (Table 5). Fish fed the HE diet had lower moisture and protein content ($P = 0.0001$ and 0.0007 , respectively) and

Table 2. Accession number and corresponding database of target gene sequences

Target Gene	Abbreviation	Database	Accession No.
Lipoprotein lipase	LPL	GenBank	AJ224693
Fatty acid synthase	FAS	Sigenae	tcaa0001c.m.06_5.1.om.4
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HAD	Sigenae	tcad0001a.i.15_3.1.om.4
Carnitine palmitoyl transferase 1a	CPT1a	GenBank	AF327058
Carnitine palmitoyl transferase 1b	CPT1b	GenBank	AJ606076
Carnitine palmitoyl transferase 1c	CPT1c	GenBank	AJ619768
Carnitine palmitoyl transferase 1d	CPT1d	GenBank	AJ620356
Acetyl-CoA oxidase	ACO	GenBank	BX085367
Peroxisome proliferator-activated receptor α	PPAR α	GenBank	AY494835
Hexokinase 1	HK1	GenBank	AY864082
Pyruvate kinase	PK	Sigenae	tcav0004c.c.07_3.1.om.4
Isocitrate dehydrogenase-NADP	ICDH	Sigenae	15072560.1.om.4
Cytochrome oxidase subunit 4	COX4	Sigenae	tcav0004c.i.22_3.1.s.om.8
Citrate synthase	CS	Tigr	TC89195
Elongation factor 1 α	EF1 α	GenBank	AF498320

Table 3. Sequences of rainbow trout primers used for amplification of target genes by qRT-PCR

Gene	5'-3' Forward Primer	5'-3' Reverse Primer	Annealing Temperature, °C	Amplicon Size, bp
LPL	taattggctgcagaaaacac	cgtcagcaaacctaaagg	59	164
FAS	gagacctagtggaggtgtc	tctgttgatggtgagctgt	54	186
HAD	ggacaaagtggcaccagcac	gggacggggtgaagaagt	59	126
CPT1a	tcgatttcaagggtcttcg	cacaacgatcagcaactgg	55	166
CPT1b	ccctaagcaaaaagggtctca	catgatgtcactcccagacg	55	149
CPT1c	cgcttcaagaatggggtgat	caaccacctgctgtttctca	59	187
CPT1d	ccgttctaacagaggtgct	acaactcctagccatcgtct	59	154
ACO	gcgccaagtactctctcaac	tcacaaactcctgtgtgctg	55	210
PPAR α	ctggagctggatgacagtga	ggcaagttttgcagcagat	55	195
HK1	ctgggacgctgaagaccaga	cggtgctgcatacctcctg	59	159
PK	cctgtatcgcggatctcc	ccacacgcattggttgga	59	192
ICDH	gacagcaccaacagggcaa	aagccagcctcgtggtctc	59	163
COX4	tacgtggggacatgggtt	cccaggagccttctcttc	59	150
CS	ggccaagtactggagttca	ctcatggtcactgtgatgg	55	229
EF1	tccttggctggttcgctg	accgaggacatcctgtg	59	159

higher lipid content ($P = 0.0001$) than fish fed the LE diet. Muscle lipid content and VSI were higher in fish fed the HE diet compared with fish fed the LE diet ($P < 0.0001$ and $P = 0.0001$, respectively).

Whole body composition was similar for the two lines fed the same diet. A line \times diet interaction was observed for this trait ($P = 0.003$), with a marked increase in F fish fed the HE diet. Muscle lipid contents were different among each experimental group: the lowest values were seen in L fish fed the LE diet (4.2% of wet weight) and the highest in F fish fed the HE diet (10.1% of wet weight). Furthermore, similar values (6.3% of wet weight) were recorded for the L fish fed the HE diet and F fish fed the LE diet. HSI was not modified by the genetic selection or the diet. VSI was high in L fish ($P = 0.0001$), indicating an increased fat deposition as visceral adipose tissue compared with F fish. A line \times diet interaction was recorded for VSI ($P = 0.003$), with L fish fed the HE diet showing the highest values.

Hepatic Metabolic Actors

Metabolic actors in liver were studied at the enzymatic level (Table 6) and at molecular level (Fig. 1) when trout sequences of the corresponding genes were available in the databases. Lipogenesis was assayed in liver only, since this organ is the major site for de novo lipid synthesis in fish (26, 27). Activities of FAS, G6PDH, ME, and ACC were decreased when fish were fed the HE diet ($P = 0.0002, 0.0003, 0.03, \text{ and } 0.0002$, respectively). There was no significant difference in FAS mRNA level among dietary treatments ($P = 0.56$). Regarding fatty acid oxidation pathway, the HE diet enhanced specific activity of HAD ($P = 0.04$) as well as gene expression of acetyl-CoA oxidase (ACO; $P = 0.0004$), carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) a and b isoforms ($P < 0.0001$ for both). We did not find any change in expression of PPAR α among diets. The HE diet led to higher HK1 and PK activities ($P = 0.003$ and $P < 0.00010$) as well as HK1 and PK mRNA level

Table 4. Growth performance and nutrient utilization of trout from L and F lines fed LE and HE diets for 6 mo

	L Line		F Line		P Values		
	LE	HE	LE	HE	Diet	Line	Line \times Diet
Final body weight, g	73.0 \pm 2.9	92.4 \pm 2.9	57.8 \pm 2.0	77.4 \pm 2.5	0.0001	0.0001	0.66
Length, mm	174.9 \pm 2.1	186.3 \pm 1.7	165.5 \pm 1.8	176.9 \pm 1.7	0.0001	0.0001	0.38
Daily growth index, %/day	2.57 \pm 0.04	2.67 \pm 0.05	2.37 \pm 0.08	2.52 \pm 0.03	0.053	0.011	0.64
Feed intake, g DM/kg	16.5 \pm 0.1	16.3 \pm 0.5	16.6 \pm 0.1	15.8 \pm 0.2	0.10	0.53	0.34
Feed efficiency	1.22 \pm 0.01	1.27 \pm 0.02	1.21 \pm 0.01	1.23 \pm 0.01	0.003	0.03	0.10
Protein efficiency ratio	2.11 \pm 0.01	2.49 \pm 0.02	2.10 \pm 0.02	2.41 \pm 0.02	0.0001	0.026	0.07
Nitrogen gain, mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ day $^{-1}$	572 \pm 8	471 \pm 20	550 \pm 22	467 \pm 10	0.0005	0.44	0.61
Fat gain, g \cdot kg $^{-1}\cdot$ day $^{-1}$	1.93 \pm 0.04	3.50 \pm 0.28	2.23 \pm 0.07	3.48 \pm 0.17	0.0001	0.34	0.29
Retention, %							
Protein	37.6 \pm 0.5	35.6 \pm 2.7	35.9 \pm 1.4	36.1 \pm 0.8	0.58	0.72	0.59
Fat	119.2 \pm 2.6	93.5 \pm 10.2	140.6 \pm 6.0	95.3 \pm 5.6	0.0006	0.11	0.16

Weight and length are expressed as means \pm SE of 57 individuals in all groups. The other traits were calculated for each tank, which represented 1 experimental unit. Daily growth index was calculated as $100 \times (\text{mean final body weight}^{1/31} - \text{mean initial body weight}^{1/3})/\text{day}$. Feed intake was recorded only during the last 2 mo of trial, so these traits were calculated for this period. Daily feed intake was calculated as the total amount of ingested food (kg DM) divided by the mean biomass over the trial [(initial biomass + final biomass)/2, expressed in kg wet weight (WW)] and the number of days. Feed efficiency was estimated as the gain in total biomass [(final biomass - initial biomass) (kg WW)] divided by the amount of ingested dry matter (kg DM). Protein efficiency ratio was the gain in total biomass divided by the amount of ingested crude protein (kg). Nitrogen and fat gain were calculated as (final carcass nutrient content - initial carcass nutrient content) divided by the mean biomass over the trial [(initial biomass + final biomass)/2 (kg WW)] and the number of days, where nutrient refers to nitrogen and fat. Protein and fat retention were calculated as $[100 \times (\text{final body weight} \times \text{final carcass nutrient content}) - (\text{initial body weight} \times \text{initial carcass nutrient content})]/\text{nutrient intake}$, where nutrient refers to protein and lipid. Values are expressed as means \pm SE ($n = 3$ in all groups). P values < 0.05 indicate significant differences [multivariate analysis of variance (MANOVA), 2 factors].

Table 5. Whole body composition, morphological parameters, and muscle lipid content of trout from L and F lines fed LE and HE diets for 6 mo

	L Line		F Line		P Values		
	LE	HE	LE	HE	Diet	Line	Line × Diet
Whole body composition, %WW							
Moisture	70.7±0.3	65.9±0.6	69.9±0.2	66.9±1.3	0.0001	0.75	0.08
Protein	17.3±0.4	15.6±0.3	16.8±0.7	15.4±0.4	0.0003	0.21	0.67
Lipid	9.5±0.2	15.3±1.1	10.8±0.5	15.2±1.0	0.0001	0.27	0.16
HSI, %	1.3±0.2	1.2±0.2	1.3±0.2	1.3±0.3	0.14	0.99	0.33
VSI, %	8.3±0.8 ^c	12.4±1.3 ^a	7.7±0.9 ^d	11.0±1.9 ^b	0.0001	0.0001	0.0034
Muscle lipid content, %WW	4.3±0.8 ^c	6.4±1.2 ^b	6.3±1.2 ^b	10.1±2.3 ^a	<0.0001	<0.0001	0.0026

Values are means ± SE ($n = 57$ individuals in all groups, except for muscle lipid content, for which $n = 30$). HSI, P values <0.05 indicate significant differences (MANOVA, 2 factors). ^{a,b,c,d} $P < 0.05$, means with different superscript letters are significantly different from each other (ANOVA).

($P = 0.003$ and 0.02), despite the lower starch content of this diet [9.2% dry matter (DM)] compared with LE diet (12.1% DM). Activity of glucokinase was also assayed in the liver, but the levels were too low 24 h after meal to be informative. The HE diet depressed the activity and gene expression of ICDH ($P = 0.0001$ and $P < 0.0001$) but did not modify those of CS. An interaction was observed for cytochrome oxidase 4 (COX4) at the molecular level ($P = 0.013$), with the HE diet decreasing COX4 mRNA level in the F line only. A slight interaction was also observed for CS gene expression, with higher values observed in L fish fed the LE diet ($P = 0.053$).

Activities of FAS, G6PDH, and ME were not significantly different between lines, but that of ACC was higher in F fish compared with L fish ($P < 0.0001$). Concerning fatty acid catabolism, no difference was recorded between lines for HAD activity; however, an interaction was observed at the molecular level ($P = 0.006$), since the HE diet increased HAD mRNA level in the L line only. Gene expression of ACO, CPT1a, and CPT1b was increased in fish of the L line ($P = 0.007$, 0.01 , and <0.0001 , respectively). CPT1c gene expression was similar in L-HE and F-LE groups and higher than in L-LE and F-HE groups ($P = 0.0003$). PPAR α was upregulated in the liver of L fish compared with F fish. Regarding glycolysis, lines differed only for HK1 activity ($P < 0.0001$) and mRNA level ($P = 0.03$), which were increased in F fish. Regarding enzymes involved in energy production (CS, ICDH, and COX4), only ICDH was affected, with a

lower activity and gene expression in the F line ($P = 0.012$ and 0.001 , respectively).

Muscle Metabolic Actors

Data on enzyme activities and gene expression are reported in Table 7 and Fig. 2, respectively. Dietary treatment induced no change in LPL activity or gene expression. No change was recorded for HAD activity, but gene expression of HAD was increased in fish fed the HE diet ($P = 0.008$). This diet decreased gene expression of CPT1b ($P = 0.04$), whereas mRNA levels of CPT1a and CPT1c, as well as ACO and PPAR α , were not significantly affected by the diets. No diet effect was recorded for either of the two glycolytic enzymes tested. Specific activity and gene expression of ICDH were increased with the LE diet ($P = 0.008$ and $P < 0.0001$) as well as the COX4 mRNA level ($P = 0.05$). Gene expression and activity of CS were unchanged with dietary treatments, although CS activity tended to be higher with the LE diet ($P = 0.06$). No line × diet interaction was found for enzymes involved in glycolysis and energy production in muscle.

LPL activity and gene expression were not modified by selection; however, the activity of LPL tended to be lower in muscle of L fish fed the LE diet ($P = 0.08$). No change in gene expression was recorded between L and F fish for CPT1a, CPT1c, ACO, HAD, and PPAR α , whereas CPT1b gene expression was enhanced in F fish ($P = 0.02$). Activities and gene

Table 6. Specific enzyme activities in liver of trout from the L and F lines fed the LE and HE diets for 6 mo

	L Line		F Line		P Values		
	LE	HE	LE	HE	Diet	Line	Line × Diet
Lipogenesis							
FAS	36.5±2.0	24.8±1.3	34.8±3.5	26.7±0.7	0.0002	0.95	0.42
G6PDH	444.4±39.1	308.8±16.3	492.4±35.5	348.3±33.5	0.0003	0.19	0.90
ME	76.2±6.2	60.7±3.7	80.1±5.9	66.1±8.4	0.03	0.46	0.93
ACC	3.8±0.2	2.9±0.2	6.1±0.3	4.6±0.3	<0.0001	<0.0001	0.20
β -Oxidation							
HAD	109.9±5.9	129.3±13.7	97.6±4.6	115.3±9.2	0.04	0.13	0.92
Glycolysis							
HK1	2.9±0.1	3.6±0.2	4.8±0.1	5.8±0.2	<0.0001	<0.0001	0.31
PK	117.5±7.9	230.3±8.8	174.3±4.0	229.9±2.0	<0.0001	0.80	0.84
Energy metabolism							
CS	115.7±5.4	118.4±5.0	103.3±7.6	113.3±6.7	0.33	0.19	0.61
ICDH	415.4±9.9	357.6±9.1	395.6±6.9	330.4±8.0	0.0001	0.012	0.67

Values are specific activities expressed in mU/mg protein, except for FAS, for which values are expressed in μ U/mg protein, and are means ± SE ($n = 6$ in all groups except for HAD and CS, for which $n = 5$). G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; ME, malic enzyme; ACC, acetyl-CoA carboxylase.

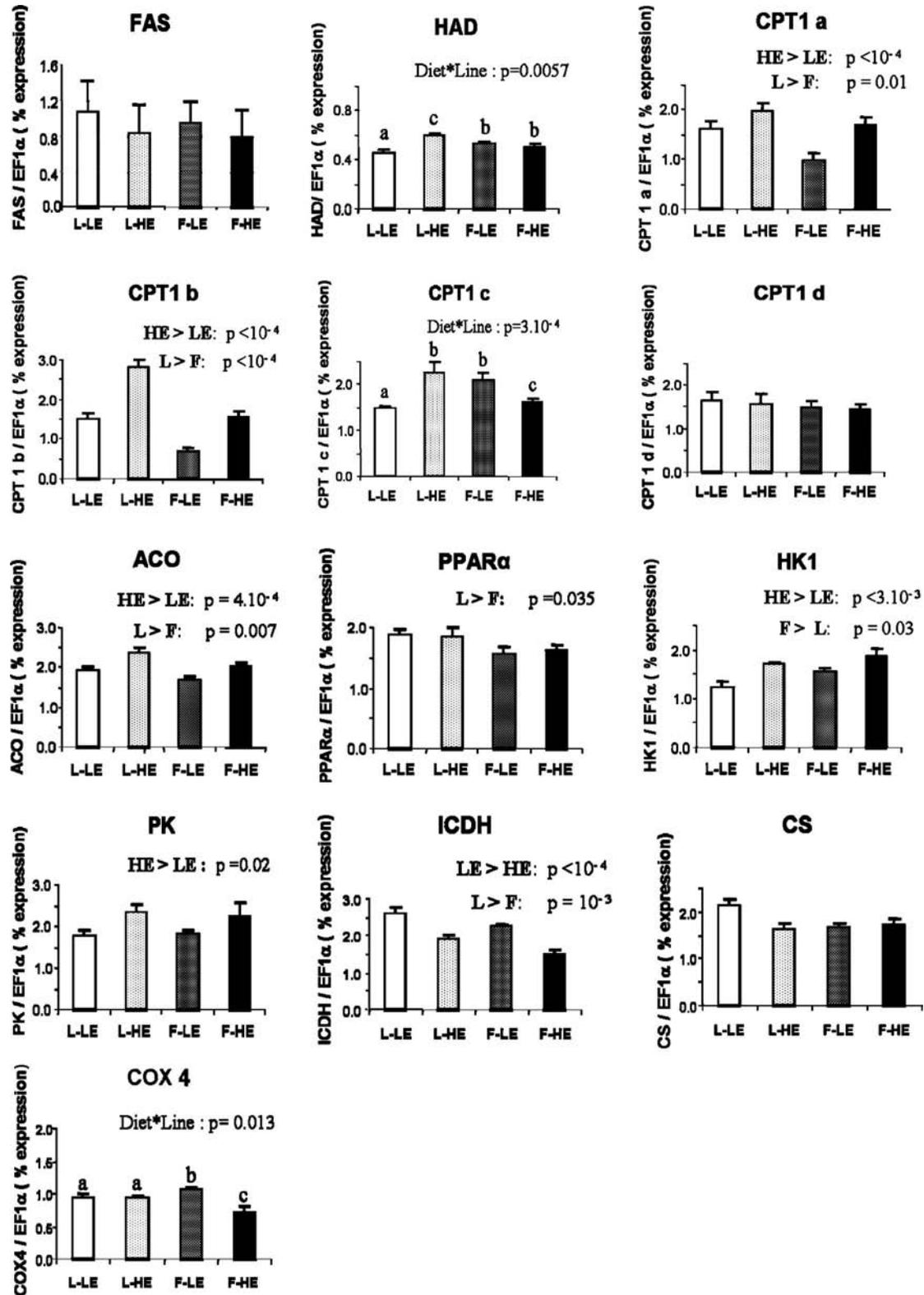


Fig. 1. Gene expression of selected enzymes in the liver of rainbow trout of a lean muscle line (L) and a fatty muscle line (F) fed a high- (HE) or low-energy (LE) diet, measured using real-time quantitative RT-PCR. Lipid metabolism: fatty acid synthase (FAS), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD), carnitine palmitoyltransferase 1 isoforms (CPT1a, CPT1b, CPT1c, and CPT1d), acetyl-CoA oxidase (ACO), and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Glycolysis: hexokinase 1 (HK1) and pyruvate kinase (PK). Energetic metabolism: isocitrate dehydrogenase (ICDH), citrate synthase (CS), and cytochrome oxidase 4 (COX4). mRNA was prepared from individual livers ($n = 9$ per group). Data are means \pm SE of 9 samples performed in triplicate. Expression values are normalized with α -elongation factor 1 (EF1 α)-expressed transcripts. ^{a,b,c,d} $P < 0.05$, means not sharing a common letter are significantly different from each other.

Table 7. Specific enzyme activities in muscle of trout from the L and F lines fed the LE and HE diets for 6 mo

	L Line		F Line		P Values		
	LE	HE	LE	HE	Diet	Line	Line × Diet
Fatty acid uptake							
LPL	0.40±0.05	0.60±0.09	0.60±0.07	0.55±0.06	0.28	0.26	0.083
Fatty acid β-oxidation							
HAD	40.8±1.7	45.3±3.3	40.9±4.5	47.6±2.9	0.10	0.71	0.74
Glycolysis							
HK	0.42±0.01	0.42±0.02	0.51±0.01	0.51±0.01	0.79	<0.0001	0.54
PK	7.8±0.3	7.7±0.2	9.2±0.2	9.3±0.2	0.87	<0.0001	0.60
Energy metabolism							
CS	253.4±9.4	212.9±8.2	185.3±11.7	170.3±8.1	0.06	0.0001	0.21
ICDH	422.2±9.3	395.7±12.8	432.2±12.9	392.9±8.8	0.008	0.74	0.57

Values are specific activities expressed in mUI/mg protein, except for PK, for which values are expressed in UI/mg protein, and are means ± SE ($n = 6$ in all groups except for LPL and CS, for which $n = 7$ and 4, respectively).

expression of HK1 ($P < 0.0001$ and $P = 0.007$) and PK ($P < 0.0001$ and $P = 0.03$) were higher in F fish muscle than in L fish. Specific activity of CS was significantly lowered in fish of this line ($P = 0.001$). There were no significant differences in gene expression of enzymes involved in energy metabolism (CS, ICDH, and COX4), although the CS mRNA level was slightly lower in F fish ($P = 0.055$) than in L fish.

DISCUSSION

The combination of genetic selection and dietary energy level led to the obtention of animals having very different values for muscle lipid content: from 4.2 to 10.1% of wet weight, with similar values (6.4%) recorded for the L line fed the HE diet and the F line fed the LE diet. The objective of our study was to identify the metabolic actors that were modified by genetic selection for muscle fat content compared with those affected by long-term feeding with a HE diet.

HE Diet Enhances Fish Growth and Whole Body Fat Content

The HE diet improved growth of fish of the two lines and resulted in increased body fat content with a concomitant decrease in moisture, in agreement with previous observations (19, 41). In salmonids, like rainbow trout, fat deposition mainly occurs in visceral adipose tissue, and to a lesser extent in muscle, within adipocytes scattered between myofibers (6, 42). Accordingly, the HE diet resulted in increased visceral fat deposition (as reflected by a higher VSI) and increased muscle lipid content in both lines.

Divergent Selection for Muscle Fat Content Affects Growth Performance and Fat Allocation Without Modifying Whole Body Fat Content of Fish

According to the selection target, muscle lipid content was significantly higher in the F line than in the L line, whereas L fish had a higher VSI, reflecting a higher fat deposition in visceral adipose tissue in this line. There was no significant difference in either fat gain or whole body fat content between the L and F lines. The data indicate that L fish deposited fat preferentially in visceral adipose tissue compared with F fish, which stored comparatively more fat in the muscle. Body weight and length of F fish were significantly lower than those of L fish, irrespective of the diet. This seems not to be attributable

to a difference in feed intake (expressed as g DM/kg body wt), since similar values were found for both lines, but rather to a better feed efficiency and protein utilization for growth in L fish. It is noteworthy that the effect of the HE diet on these two storage sites differed between L and F fish. Whereas visceral and muscle fat deposition were similarly enhanced by the HE diet compared with the LE diet in the L genotype (+49.4 and 48.8%, respectively), in the F genotype, a change of greater magnitude was observed in muscle (+58.7%) compared with visceral adipose tissue (+42.8%).

Actors of Liver Metabolism

Activity of key enzymes involved in hepatic lipogenesis are affected by the dietary treatment but not by the genetic selection. Liver is the major site of de novo fatty acid synthesis in fish (15, 26, 27), as in human and most avian species (16). The lower activity of lipogenic enzymes, i.e., FAS, G6PDH, ME, and ACC, when fish were fed the HE diet is in accordance with an inhibition of lipogenesis by dietary lipid content higher than 10% DM, already described in fish (12). Furthermore, fish oil has a high content of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), known to depress lipogenesis in mammalian liver (16), as well as in rainbow trout hepatocytes (2). In the present study, the lower amounts of dietary protein and carbohydrate that were provided by feeding the HE diet were also expected to account for the decrease of the activity of the lipogenic enzymes.

A study by Corraze et al. (6) evidenced that in rainbow trout, neosynthesized lipids were preferentially incorporated in the muscle, rather than in the storage sites such as visceral adipose tissue. This led us to hypothesize that enhanced lipogenic capacities might have contributed to the preferential partition of fat toward muscle in the F line compared with the L line. This hypothesis was not confirmed, since we found that activities of lipogenic enzymes were not modified between lines, except for ACC, the first step enzyme of fatty acid biosynthesis, which was higher in the F line. This could not be related to an increase in lipogenesis in F fish, since neither FAS activity nor activities of G6PDH and ME, which provide NADPH for fatty acid synthesis, were changed. It thus seems that these lipogenic actors do not account for differences in muscle fat deposition between lines.

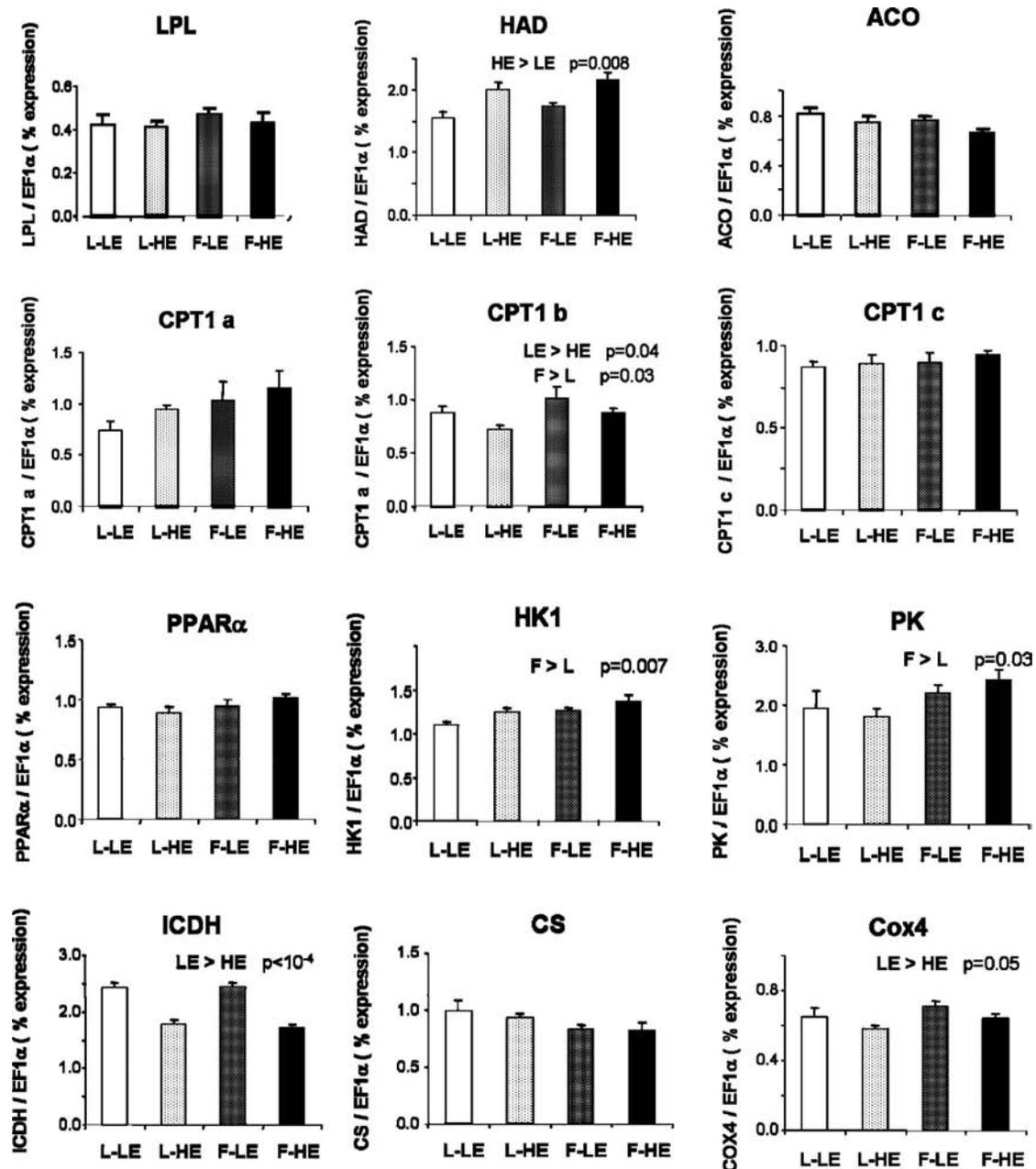


Fig. 2. Gene expression of selected enzymes in the white muscle of rainbow trout of the L and F lines fed a HE or LE diet, measured by real time quantitative RT-PCR. Lipid metabolism: lipoprotein lipase (LPL), HAD, CPT1a, CPT1b, CPT1c, ACO, and PPAR α . Glycolysis: HK1 and PK. Energetic metabolism: ICDH, CS, and COX4. mRNA was prepared from individual samples of white muscle ($n = 9$ per group except for HAD, CPT1a, CPT1b, and PPAR α , for which $n = 8$). Data are means \pm SE of 9 samples performed in triplicate. Expression values are normalized with EF1 α -expressed transcripts.

Actors of fatty acid oxidation in the liver are stimulated with the HE diet but repressed in the F line. Gene expressions of enzymes catalyzing fatty acid β -oxidation, i.e., ACO, CPT1a, and CPT1b, as well as HAD activity, were upregulated in the liver of fish fed the HE diet. ACO and CPT1 are rate-limiting enzymes of peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation, respectively, which suggests that both mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation were induced in liver by the higher dietary lipid supply. In mammals, fatty acids, especially n -3 PUFAs, enhance peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation through the activation of the transcription factor PPAR α , leading to an upregulation of the corresponding genes

(37). The major role played by PPAR α in upregulating the expression of several key enzymes involved in fatty acid oxidation such as CPT1 and ACO has been demonstrated in rodent liver (23), but little is known yet about nutritional regulation involving PPARs in fish. Recently, Kennedy et al. (20) showed that PPAR α was upregulated in Atlantic salmon fed a diet rich in fish oil. In the present study, gene expression of PPAR α was not affected by the dietary treatments. One possible reason for this discrepancy might be that the diet used by Kennedy and coworkers contained much more lipids ($\sim 33\%$ DM) than the HE diet (23% DM) in the present experiment. Potential interspecies differences also have to be

considered. Nevertheless, because PPARs are activated by binding to fatty acids, notably PUFAs, to act on gene expression, a posttranscriptional activation of PPAR α might be responsible for the stimulation of fatty acid β -oxidation related genes in fish fed the HE diet.

Gene expression of ACO, CPT1a, and CPT1b was significantly depressed in F fish liver, suggesting that both peroxisomal and mitochondrial pathways of fatty acid β -oxidation were repressed in the liver of the F line, although no differences were found between lines for liver HAD activity and mRNA level. PPAR α gene expression was significantly lower in the liver of the F line compared with the L line. This weaker expression of PPAR α gene might be at least in part responsible for the lower expression observed for ACO, CPT1a, and CPT1b in F fish liver.

Liver HK1 activity and gene expression are stimulated with the HE diet and in the F line. Regarding to the dietary effect, the elevated gene expression and activity of HK1 and PK in the liver suggest that hepatic glycolysis was enhanced in trout fed the HE diet. This result was quite unexpected because of the slightly lower starch intake by trout fed this diet and the usual depressive effect of dietary PUFA on hepatic glycolysis through the inhibition of PK gene expression (25). Further investigations are needed to explain such an effect. This could reflect a disturbance of carbohydrate metabolism in response to an alteration of lipid homeostasis after long-term feeding a high-fat diet in fish.

Regarding to the selection effect, the F line showed higher hepatic HK1 activity and mRNA level, suggesting enhanced glucose utilization in the liver. Further studies monitoring glucose utilization by the two genotypes, i.e., using radiolabeled glucose, are required to confirm this observation. These data show that feeding the HE diet and upward selection for muscle fat content affected HK1 in the same way at both the molecular and activity level.

Hepatic ICDH activity and gene expression are depressed in fish fed the HE diet and in the F line. Hepatic activity and gene expression of ICDH were lowered with the HE diet. ICDH is one of the key enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA). Our results suggest a stimulation of both hepatic fatty acid oxidation and glycolysis by the HE diet. Hence, the reduction of TCA cycle with the HE diet, as suggested by the lowered ICDH activity and mRNA level, might be due to a lowered catabolism of dietary amino acid in the liver, since the overall protein intake was lower with the HE diet. Indeed, proteins appear as important lipogenic precursors in rainbow trout hepatocytes (5). The reduced activity of ICDH, which produces NADPH, is in line with the lower activity of lipogenic enzymes.

Hepatic activity and gene expression of ICDH were lower in the F line than in the L line. These data suggest a depressed mitochondrial oxidative metabolism in liver of the F line compared with the L line, probably related to the lower liver fatty acid oxidation in this line.

Actors of Muscle Metabolism

Increased muscle fat content induced by dietary treatment and selection are not attributable to a difference in LPL activity or gene expression. LPL is described in mammals as the rate-limiting enzyme for the import of triglyceride-derived fatty acids into muscle (24). We thus hypothesized that a

higher LPL activity could be responsible for the higher muscle fat content resulting from feeding the HE diet and from upward selection for muscle fat content. The data did not confirm this hypothesis. There was no significant difference for LPL gene expression or activity level whatever the diet or the genotype, with great interindividual variations. Nevertheless, it is noteworthy that in muscle, LPL activity was slightly lower in L fish fed the LE diet, which had the lowest muscle fat content among the four experimental groups. Very little information is available in fish with regard to dietary regulation of LPL in white muscle, and to our knowledge, the effects of a high dietary energy supplied mainly as fat on LPL activity or mRNA level in muscle has never been investigated until now. It would be interesting to study the postprandial kinetics of muscle LPL activity and gene expression in response to a high-fat diet to definitively deal with the role of the LPL in muscle fattening.

Dietary treatment and genetic selection have little effect on the enzymes involved in fatty acid oxidation in muscle. No change in gene expression or activity was recorded between the two dietary groups for the fatty acid oxidative enzymes assayed in muscle, except for the HAD mRNA level, which was increased in fish fed the HE diet, and CPT1b gene expression, which was concomitantly lowered. This opposite nutritional effect on the gene expression of these two fatty acid oxidative enzymes remains to be clarified. CPT1 is described as the rate-limiting enzyme of β -oxidation flux in liver, heart, and skeletal muscle of mammals (7). In rainbow trout, four isoforms of CPT1 with all of the structural features characteristics of mammalian CPT1 have been identified (13). All of the four predicted amino acid sequences share a better similarity with human CPT1A protein sequence (65–68%) than with human CPT1B (58–62%) and CPT1C (50–52%) protein sequences. The present data show that rainbow trout CPT1a, -b, and -c are expressed in both the liver and the skeletal muscle, whereas CPT1d expression is not detectable in the skeletal muscle. Regulation of each isoform needs to be further investigated, since we observed differential expression between these isoforms for the first time in fish.

Regarding the lines, no significant differences were recorded for any of the enzymes involved in fatty acid oxidation that we tested, except CPT1b gene expression, which was increased in F fish. Hence, these data suggest that the increased muscle fat level observed in fish from the F line did not result from a decrease in fatty acid oxidation capacity, as we first hypothesized.

Muscle activity and gene expression of HK and PK are stimulated in the F line and remain unchanged with dietary treatment. There was no change in gene expression or activity for HK and PK between the two dietary treatments. Activity levels of these two glycolytic enzymes were also low compared with the liver. This is in conformity with the general observation that in rainbow trout, white muscle poorly utilizes glucose as an energy source (43).

In contrast, activity and gene expression of HK and PK were higher in muscle of the F line, whatever the diet, suggesting that glycolysis was enhanced in the F line compared with the L line. This is particularly interesting, since, as mentioned previously, dietary glucose usually contributes weakly as an oxidative fuel for muscle energy need. One possibility is that the F line might have a genetic predisposition to higher glucose utilization in muscle than the L line. Increased capacity to

oxidize glucose in this tissue for energy purpose might have led to a concomitant relative decrease in the use of lipid, thus increasing availability of lipids for subsequent storage in muscle of the F line. Another possibility would be that this increased glucose oxidation capacity might have been installed consequently to an impaired capacity of the F line to increase fatty acid oxidation in a context of elevated muscle triglyceride level. The underlying mechanism remains to be defined, but it appears to be an interesting lead to explore in the future.

Enzymes involved in energy production are depressed in muscle of fish fed the HE diet and in the F line. Enzymes involved in energy production, i.e., ICDH and COX4, were depressed in muscle of fish fed the HE diet, likely reflecting a decrease in their mitochondrial oxidative capacities. Such a phenomenon has been already described in skeletal muscle of mammals after long-term feeding of a high-energy diet (4, 39). A negative relationship between mitochondrial oxidative capacities and triglyceride content in muscle has also been reported (3, 14). Whether reduced muscle oxidative capacities are a cause or a consequence of the increased muscle lipid content in fish fed the HE diet is unclear and needs further investigation.

In muscle, CS activity was significantly lower in the F line than in the L line. The activity of this enzyme is generally correlated with the number of mitochondria and the capacity of a tissue in aerobic oxidative metabolism. A lower mitochondrial oxidative capacity in the muscle of F fish could have contributed to reduce triglyceride depletion in the muscle of this line.

Conclusion

Dietary treatment induced significant changes in metabolic actors involved in lipid metabolism, glycolysis, and energy production in the liver but had little effect on those assayed in the muscle. It is likely that the higher muscle lipid content resulting from the 6-mo feeding of the high-energy diet in both genotypes is directly related to an oversupply of dietary fat in this tissue. Our data show that the genetic selection for high muscle fat content does not affect feed intake, with similar whole body fat content between the two lines fed the same diet. The higher muscle fat level observed in the F line was associated with neither a stimulation of lipogenic enzymes or muscle LPL-mediated lipid uptake nor alteration of fatty acid oxidation enzymes in muscle. Instead, our data suggest that the F line has enhanced glycolytic capacity in both liver and muscle and decreased hepatic fatty acid oxidation capacity compared with the L line. With regard to their muscle-fattening effect, the dietary treatment and the genetic selection seem to act through different metabolic actors, since additive effects were observed only for enzymes involved in glycolysis (HK) and the TCA cycle (ICDH) in the liver.

Perspectives and Significance

The use of more global approaches such as microarrays and proteomics might allow us to gain further insight into metabolic differences existing between the two strains and to improve our understanding of the effect of nutrient-gene interactions on the regulation of metabolism. By combining dietary treatment and genetic selection for muscle fat content, we obtained a relevant model to investigate mechanisms conditioning not only muscle fattening but also fat partitioning in

different body compartments in fish. The identification of markers discriminating the two genotypes would be of critical interest to our understanding of the mechanisms that are responsible for differences of fat allocation in not only fish but also other animals, including humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge M. J. Borthaire for skilled technical assistance as well as the technical staff at the INRA's experimental facilities of La Pisciculture Expérimentale Inra des Monts D'Arrée (PEIMA; Drennec, Sizon, Finistère, France). We thank Dr. S. J. Kaushik for stimulating discussion.

GRANTS

This work was partially supported by a grant from INRA and the Aquitaine region. This research was funded by the French national program AGENOP (contract no. A02483, Systematic Analysis of Rainbow Trout Genome) and the 6th Programme Cadre de Recherche et Développement European Project [contract no. 016249-2, Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers (AQUAMAX)].

REFERENCES

1. Ackman RG. Composition and nutritional value of fish and shellfish lipids. In: *Fish and Fishery Products. Composition, Nutritive Properties and Stability*, edited by Ruiter A. Wallingford: CAB International, 1995, p. 117–156.
2. Alvarez MJ, Diez A, Lopez-Bote C, Gallego M, Bautista JM. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Br J Nutr* 84: 619–628, 2000.
3. Barazzoni R, Zanetti M, Bosutti A, Biolo G, Vitali-Serdoz L, Stebel M, Guarneri G. Moderate caloric restriction, but not physiological hyperleptinemia per se, enhances mitochondrial oxidative capacity in rat liver and skeletal muscle—tissue specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology* 146: 2098–2106, 2005.
4. Chanseaux E, Malpuèche-Brugère C, Patrac V, Bielicki G, Rousset P, Couturier K, Salles J, Renou JP, Boirie Y, Morio B. Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J Nutr* 136: 2194–2200, 2006.
5. Christiansen DC, Klungsoyr L. Metabolic utilization of nutrients and the effect of insulin in fish. *Comp Biochem Physiol* 88B: 701–711, 1987.
6. Corraze G, Kaushik SJ. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 6: 111–115, 1999.
7. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 41: 197–239, 2002.
8. Einen O, Skrede G. Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquac Nutr* 4: 99–108, 1998.
9. Eisen EJ. Selection experiments for body composition in mice and rats: a review. *Livest Prod Sci* 23: 17–32, 1989.
10. Folch J, Lees M, Sloan Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509, 1957.
11. Geay Y, Bauchard D, Hocquette JF, Culioli J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev* 41: 1–26, 2001.
12. Gélinau A, Corraze G, Boujard T, Larroquet L, Kaushik S. Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod Nutr Dev* 41: 487–503, 2001.
13. Gutiérrez S, Damon M, Panerat P, Kaushik S, Médale F. Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B* 135: 139–151, 2003.
14. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 50: 817–823, 2001.
15. Henderson RJ, Sargent J. Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets differing in lipid content. *Comp Biochem Physiol C* 69: 31–37, 1981.
16. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* 75: 47–76, 1995.

17. Jaromowska M, Górski J. Effect of fasting on skeletal muscle triglyceride content. *Experientia* 41: 357–358, 1985.
18. Jeukendrup AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann NY Acad Sci* 967: 217–s35, 2002.
19. Jobling M, Koskela J, Savolainen R. Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 29: 601–607, 1998.
20. Kennedy SR, Leaver MJ, Campbell PJ, Zheng X, Dick JR, Tocher DR. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids* 41: 423–436, 2006.
21. Kirchner S, Kaushik S, Panserat S. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr* 133: 2561–2564, 2003.
22. Kobayashi A, Jiang LL, Hashimoto T. Two mitochondrial 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in bovine liver. *J Biochem* 119: 775–782, 1996.
23. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7473–7478, 1999.
24. Levak-Frank S, Radner H, Walsh A, Stollberger R, Knipping G, Hoefler G, Sattler W, Weinstock PH, Breslow JL, Zechner R. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest* 96: 976–986, 1995.
25. Liimatta M, Towle HC, Clarke s Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate kinase gene transcription. *Mol Endocrinol* 8: 1147–1153, 1994.
26. Likimani TA, Wilson RP. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J Nutr* 112: 112–117, 1982.
27. Lin H, Romsos DR, Tack PI, Leveille GA. Influence of diet on in vitro and in vivo rates of fatty acid synthesis in coho salmon [*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)]. *J Nutr* 107: 1677–1682, 1977.
28. Marshall DM. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. *J Anim Sci* 72: 2745–2755, 1994.
29. Olsvik P, Lie K, Jordal A, Nilsen T, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* 17: 6–21, 2005.
30. Pérusse L, Bouchard C. Gene-diet interactions in obesity. *Am J Clin Nutr* 72, Suppl: 1285S–90S, 2000.
31. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002–2007, 2001.
32. Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B. Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245: 49–61, 2005.
33. Quillet E, Guillou S, Aubin J, Labbé L, Fauconneau B, Médale F. Response of a lean muscle and a fat muscle rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) line on growth, nutrient utilization, body composition and carcass traits when fed two different diets. *Aquaculture* 269: 220–231, 2007.
34. Richard N, Kaushik S, Larroquet L, Panserat S, Corraze G. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 96: 200–309, 2006.
35. Richards J, Heigenhauser G, Wood C. Lipid oxidation fuels recovery from exhaustive exercise in white muscle of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R89–R99, 2002.
36. Robb DHF, Kestin SC, Warriss PD, Nute GR. Muscle lipid content determines the eating quality of smoked and cooked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 205: 345–358, 2002.
37. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 25: 317–40, 2005.
38. Singer TD, Mahadevappa VG, Ballantyne JS. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can J Fish Aquat Sci* 47: 873–881, 1990.
39. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR. A high-fat diet co-ordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54: 1926–1933, 2005.
40. Thievend P, Mercier C, Guilbot A. Determination of starch with glucoamylase. In: *Methods in Carbohydrates Chemistry*, edited by Whilster RL, Bernillier JN. New York: Academic, 1972, vol. II, p. 100–105.
41. Watanabe T. Lipid nutrition in fish. *Comp Biochem Physiol B* 73: 3–15, 1982.
42. Weatherup RN, McCracken KJ, Foy R, Rice D, McKendry J, Mairs RJ, Hoey R. The effects of dietary fat content on performance and body composition of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 151: 173–184, 1997.
43. West TG, Arthur PG, Suarez RK, Doll CJ, Hochachka PW. In vivo utilization of glucose by heart and locomotory muscles of exercising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 177: 63–79, 1993.
44. Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR, Enser M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 66: 21–32, 2003.
45. Zanusso J, Régnon H, Guy G, Manse H, Babilé R. The effects of overfeeding on myofibre characteristics and metabolic traits of the breast muscle in Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Reprod Nutr Dev* 43: 105–115, 2003.

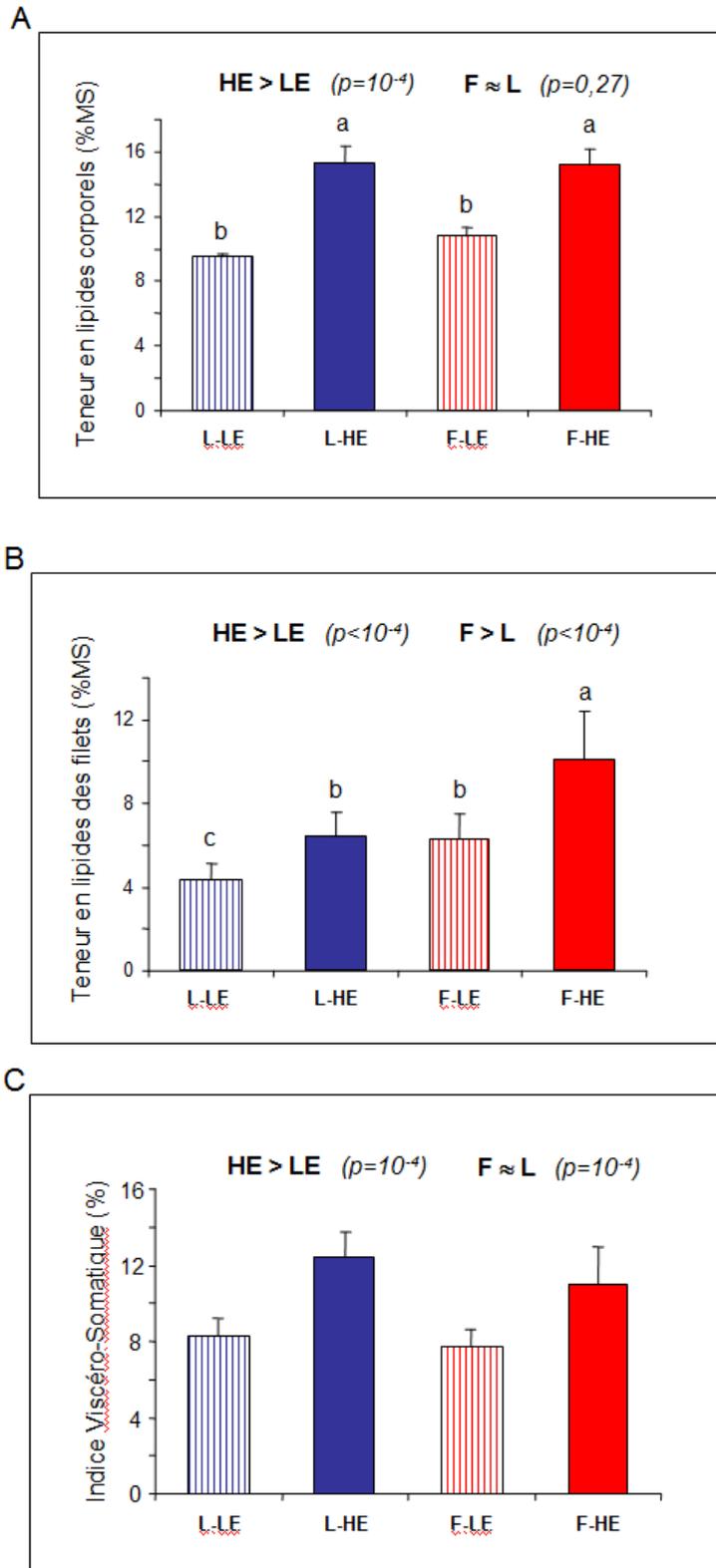


Figure III-1 : Composition corporelle des truites des deux lignées à l'issue des 6 mois d'alimentation.
 A: teneur en lipides corporels (%MS); B: teneur en lipides des filets (%MS); C: indice viscéro-somatique (IVS, %)

III-1.2 Principaux résultats

III-1.2.1 Composition corporelle des truites des deux lignées à l'issue des 6 mois d'alimentation (Figure III-1)

- La composition corporelle est significativement modifiée par le régime alimentaire : on observe une augmentation de la teneur en lipides ($P < 10^{-3}$), associée à une diminution de la teneur en eau ($P < 10^{-3}$) et en protéines ($P < 10^{-3}$) chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE, quelle que soit la lignée. Les poissons nourris avec l'aliment HE ont une teneur en lipides musculaires ($P < 10^{-4}$) et un indice viscéro-somatique ($P = 10^{-4}$) supérieurs à ceux nourris avec l'aliment LE. L'indice hépatosomatique n'est pas modifié par le régime alimentaire ($P = 0,14$), probablement parce que les prélèvements ont été effectués 24 heures après le dernier repas.

☞ La plus forte quantité de lipides apportés par l'aliment HE contribue à un engraissement global plus important des poissons, avec en particulier, un stockage accru des lipides au niveau du tissu adipeux périviscéral et du muscle.

- On observe une composition corporelle identique entre lignées nourries avec un même régime : les poissons de deux lignées ont des teneurs en lipides, en eau et en protéines semblables ($P > 0,05$). En revanche, la teneur en lipides musculaires des poissons de la lignée F est supérieure ($P > 10^{-4}$) à celle des poissons de la lignée L, conformément à ce qui était attendu dans le cadre de la procédure de sélection appliquée. D'autre part, l'indice viscéro-somatique est plus élevé chez les poissons de la lignée L ($P = 10^{-4}$), ce qui suggère un stockage des lipides accrus chez les poissons de cette lignée par rapport à ceux de la lignée F. Cette différence n'apparaissait pas à la seconde génération de sélection.

☞ La sélection génétique affecte la répartition corporelle des dépôts lipidiques sans modification de la teneur globale en lipides des poissons : ainsi, les poissons de la lignée F stockent davantage

Tableau III-1: Paramètres de croissance et utilisation des aliments expérimentaux LE et HE par les truites des lignées L et F à l'issue des 6 mois d'alimentation

Régime	lignée L		Lignée F		p-values		
	LE	HE	LE	HE	régime	Lignée	Lignée*régime
Poids final (g)	73,0 ± 2,9	92,4 ± 2,9	57,8 ± 2,0	77,4 ± 2,5	<i>P=10⁻⁴</i>	<i>P=10⁻⁴</i>	P=0,66
Longueur (mm)	174,9 ± 2,1	186,3 ± 1,7	165,5 ± 1,8	176,9 ± 1,7	<i>P=10⁻⁴</i>	<i>P=10⁻⁴</i>	P=0,38
Indice journalier de croissance (% jour ⁻¹)	2,57 ± 0,04	2,67 ± 0,05	2,37 ± 0,08	2,52 ± 0,03	P=0,053	<i>P=0,011</i>	P=0,64
Ingéré volontaire (g MS/ kg)	16,5 ± 0,1	16,3 ± 0,5	16,6 ± 0,1	15,8 ± 0,2	P=0,10	P=0,53	P=0,34
Efficacité alimentaire	1,22 ± 0,01	1,27 ± 0,02	1,21 ± 0,01	1,23 ± 0,01	<i>P=0,003</i>	<i>P=0,03</i>	P=0,10
Coefficient d'efficacité protéique	2,11 ± 0,01	2,49 ± 0,02	2,10 ± 0,02	2,41 ± 0,02	<i>P=10⁻⁴</i>	<i>P=0,026</i>	P=0,07
Gain en azote (mg/kg/jour)	572 ± 8	471 ± 20	550 ± 22	467 ± 10	<i>P=5,10⁻⁴</i>	P=0,44	P=0,61
Gain en lipides (g/kg/jour)	1,93 ± 0,04	3,50 ± 0,28	2,23 ± 0,07	3,48 ± 0,17	<i>P=10⁻⁴</i>	P=0,34	P=0,29
Rétention (%)							
Protéique	37,6 ± 0,5	35,6 ± 2,7	35,9 ± 1,4	36,1 ± 0,8	P=0,58	P=0,72	P=0,59
Lipidique	119,2 ± 2,6	93,5 ± 10,2	140,6 ± 6,0	95,3 ± 5,6	<i>P=6,10⁻⁴</i>	P=0,11	P=0,16

de lipides au niveau musculaire que les poissons de la lignée L, qui stockent préférentiellement leurs lipides en excès au niveau viscéral.

- Des interactions lignée x aliment significatives sont observées pour la teneur en lipides musculaires ($P=0,003$), particulièrement élevée chez les poissons de lignée F nourris avec l'aliment HE (F-HE), et l'indice viscéro-somatique ($P=0,003$), particulièrement élevé chez les poissons de lignée L nourris avec l'aliment HE (L-HE).

☞ La combinaison de la sélection génétique divergente pour l'indice d'adiposité musculaire et de l'apport énergétique alimentaire a permis d'obtenir des truites présentant des écarts importants de teneurs en lipides musculaires: de 4,2 % (groupe L-LE) à 10,1 % du poids frais (groupe F-HE), écarts non liés au poids des poissons.

III-1.2.2 Performances de croissance et utilisation de l'aliment (Tableau III-1)

- Les mesures effectuées au cours des deux derniers mois d'alimentation ont montré une quantité d'aliment ingéré semblable entre lignées et régimes ($P=0,53$ et $P=0,10$, respectivement).

☞ En conséquence, les poissons nourris avec l'aliment HE ont reçu un apport plus important en lipides et en énergie, condition favorable à l'accroissement des réserves lipidiques au niveau des sites préférentiels de stockage de l'espèce, à savoir le tissu adipeux péri-viscéral et le muscle chez la truite arc-en-ciel.

☞ La plus forte teneur en lipides musculaires observés chez les poissons de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L n'est pas liée à un apport en lipides plus élevé, puisqu'il n'y a pas de différence significative de prise alimentaire entre lignées.

- Comme attendu, l'aliment HE améliore les performances de croissance des poissons (poids, $P<10^{-4}$; longueur, $P<10^{-4}$), quelle que soit leur origine génétique (lignée L ou F). De même, l'efficacité alimentaire et protéique sont significativement plus élevées ($P=0,003$ et 10^{-4} , respectivement) chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE. La rétention protéique n'est pas affectée par le régime ($P=0,58$), contrairement à la rétention lipidique, qui est significativement plus élevée ($P<10^{-3}$) chez les poissons nourris avec l'aliment LE, avec des valeurs supérieures à 100% indiquant une synthèse de novo des lipides active chez ces poissons.

- Les poissons de la lignée L se caractérisent par de meilleures performances de croissance (poids, $P < 10^{-4}$; longueur, $P < 10^{-4}$; indice journalier de croissance, $P = 0,011$), ainsi qu'une meilleure efficacité alimentaire et protéique par rapport aux poissons de la lignée F ($P = 0,03$ et $0,0026$ respectivement). Les autres paramètres (gains lipidiques et azotés, rétentions lipidique et protéique) ne diffèrent pas significativement entre lignées.

☞ L'augmentation du taux de lipides musculaire chez la lignée F n'est pas la conséquence d'un taux de croissance plus élevé.

III-1.2.3 Caractérisation métabolique des poissons par analyse de l'expression et de l'activité d'enzymes clés des principales voies du métabolisme énergétique

III-1.2.3.1 Acteurs clés du métabolisme hépatique

III-1.2.3.1.1 Enzymes de la lipogénèse

- L'activité des différentes enzymes impliquées dans la synthèse de novo de lipides (AGS, ACC, G6PDH et l'EM) est significativement plus faible chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE (AGS : $P < 10^{-3}$; ACC : $P < 10^{-4}$; G6PDH : $P < 10^{-3}$; EM : $P = 0,03$). L'activité de la G6PDH est supérieure à celle de l'EM (de 5 à 6 fois selon la condition expérimentale), en accord avec le fait que la G6PDH est le principal fournisseur de NADPH pour la lipogénèse chez la truite (Alvarez *et al.*, 1998; Gélinau *et al.*, 2001). En revanche, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la quantité d'ARNm de l'AGS ($P = 0,56$), ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle de cette enzyme chez la truite, contrairement à ce qui est généralement observé chez les mammifères (Hillgartner, 1995),

*☞ L'apport en lipides plus élevé (> 10%), et notamment en AGPI n-3, de l'aliment HE induit une diminution de l'activité des principales enzymes de la lipogénèse, phénomène déjà décrit chez les poissons, à des stades moins précoces (Dias *et al.*, 1999 ; Gélinau *et al.*, 2001).*

- Parmi les principales enzymes de la lipogénèse, seule l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase diffère significativement entre lignées. Elle est significativement plus élevée ($P < 10^{-4}$) dans le foie de la lignée F que dans le foie de la lignée L.

☞ *Ces données suggèrent que la synthèse endogène de lipides n'est pas responsable de l'accroissement de la teneur en lipides du muscle de la lignée F.*

III-1.2.3.1.2 Acteurs clés de la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale

- Au niveau du foie, on observe une activité spécifique de l'HOAD, ainsi qu'une expression de l'ACO et de la CPT1 a et b plus élevées chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE. L'expression de la CPT1 d, et de PPAR α ne sont pas significativement affectées par le régime alimentaire ($P > 0,05$).

☞ *L'apport plus élevé en lipides par l'aliment HE semble stimuler la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras dans le foie, conformément aux résultats généralement observés chez les mammifères (Sampath et Ntambi, 2005), notamment dans le cadre d'un régime enrichi en AGPI n-3 et chez le saumon atlantique (Menoyo et al., 2003).*

- Par rapport aux individus de lignée L, on observe chez les individus de lignée F une expression plus faible des gènes codant pour l'ACO ($P=0,007$), la CPT1 a ($P=0,01$), la CPT1b ($P < 10^{-4}$), et PPAR α ($P=0,035$). Aucune différence significative n'est observée entre lignée concernant l'activité de l'HOAD ($P=0,13$), ni de l'expression de la CPT1d. Une interaction régime x lignée est observée pour l'expression de l'HOAD ($P=0,0057$) dont le niveau de transcrite est plus élevée en réponse à l'aliment HE uniquement chez les individus de lignée L, et pour la CPT1c ($P < 10^{-3}$), avec un niveau de transcrite significativement plus élevé chez les truites des groupes L-HE et F-LE que chez celles des groupes L-LE et F-HE.

☞ *La lignée F semble avoir une capacité plus faible que la lignée L à utiliser les acides gras comme substrat pour la production d'énergie au niveau du foie. Ceci pourrait être dû à une expression plus faible de PPAR α , dont l'origine reste encore à déterminer.*

III-1.2.3.1.3 Enzymes de la glycolyse

- De façon surprenante, l'expression et l'activité de l'HK-I et de la PK sont également plus élevées dans le foie chez les individus nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE, malgré un apport légèrement plus faible en amidon (-23%) et surtout l'effet généralement inhibiteur des lipides alimentaires sur cette voie métabolique (Liimata et al., 1994 ; Jump et al., 1994, 1999). Nous n'avons pas, à l'heure actuelle, d'explication à ce phénomène.

- L'expression et l'activité de l'HK-1 sont significativement plus élevées chez les poissons de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L.

☞ La lignée F semble avoir une meilleure capacité à utiliser le glucose comme substrat pour la production d'énergie que la lignée L au niveau du foie, résultat qui reste à confirmer par des études complémentaires, telles que le suivi de l'utilisation métabolique du glucose après marquage radioactif par exemple.

III-1.2.3.1.4 Enzymes du métabolisme énergétique

- L'expression et l'activité de l'ICDH, enzyme clé du cycle de Krebs, sont significativement plus faibles ($P=10^{-3}$ et $P=0,012$, respectivement) chez les poissons nourris avec l'aliment HE que chez les poissons nourris avec l'aliment LE. Une interaction régime x lignée significative ($P=0,013$) est observée pour l'expression de la sous unité 4 de la COX, son niveau de transcrite étant diminuée par l'aliment HE seulement chez les truites de lignée F. Une interaction régime x lignée, toutefois non significative ($P=0,053$), est également observée pour l'expression de la CS, avec des valeurs plus élevées chez les truites L-LE.

☞ L'expression et l'activité plus faible de l'ICDH, qui fournit également du NADPH pour la lipogénèse, chez les poissons nourris avec l'aliment HE sont en accord avec la diminution de l'activité des principales enzymes lipogéniques observée.

- L'expression et l'activité de l'ICDH, sont significativement plus faibles ($P=10^{-3}$ et $P=0,012$, respectivement) chez les poissons de la lignée F que chez ceux de la lignée L. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre lignées au niveau de l'expression de la CS et de la sous unité 4 de la COX. L'activité de la CS n'est pas non plus modifiée par la sélection génétique.

III-1.2.3.2 Acteurs clés du métabolisme musculaire

III-1.2.3.2.1 Captage des lipides par le muscle

- L'expression et l'activité de la LPL ne sont pas significativement différentes entre régime. L'absence de différence d'activité de la LPL par la teneur en lipides du régime 24 heures après repas est en accord avec les résultats obtenus par Arantzamendi (2002), sur des

stades moins précoces (350g en moyenne contre 75 g dans cette étude). Néanmoins, il est possible qu'une régulation de la LPL par la teneur en lipides alimentaires se fasse plus tôt après le dernier repas. Il serait intéressant de procéder à des mesures de cinétique postprandiale de l'expression et de l'activité de la LPL dans le muscle en réponse à des régimes de teneur en lipides différentes, ce qui n'a fait l'objet d'aucune étude chez des truites de cette taille.

☞ L'activité et l'expression de la LPL au niveau musculaire ne semblent pas être modifiées par un apport à long terme riche en lipides.

- L'expression et l'activité de la LPL ne sont pas non plus significativement différentes entre lignée.

☞ Il n'existe pas de différences constitutives entre lignées vis-à-vis de l'expression et de l'activité de la LPL au niveau du muscle, ce qui nous invalide l'une de nos hypothèses. Cependant, une différence de réponse de la LPL à plus court terme après le dernier repas ne peut être exclue.

III-1.2.3.2.2 Acteurs clé de la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale

- Au niveau du muscle, l'expression de l'HOAD est plus élevée ($P=0,008$), tandis que l'expression de la CPT1b est plus faible ($P=0,04$) lorsque les poissons sont nourris avec l'aliment HE. Cet effet opposé du régime sur la régulation de l'expression de ces deux enzymes reste inexpliqué. Nos résultats montrent que les isoformes a, b et c de la CPT1 sont exprimés dans le foie et dans le muscle. En revanche, l'ARNm correspondant à la CPT1d, détecté au niveau du foie, ne l'est pas au niveau du muscle. L'expression de PPAR α n'est pas significativement modifiée dans le muscle en réponse à un apport alimentaire en lipides plus élevé.

☞ L'effet opposé de l'aliment sur l'expression l'HOAD et de la CPT1b observé dans le muscle reste à clarifier. Nos données mettent cependant en évidence, pour la première fois, une différence de régulation entre les différentes isoformes de la CPT1 connues chez la truite (CPT1 a, b, c et d), tant au niveau du foie que du muscle.

- Aucune différence significative n'est observée entre lignées en ce qui concerne les différentes enzymes de la β -oxydation analysées dans cette étude, excepté pour la CPT1b

dont l'expression est plus élevée ($P=0,02$) dans le muscle de la lignée F que dans celui de la lignée L.

☞ Ces données suggèrent que, contrairement à l'une de nos hypothèses, la teneur en lipides musculaires plus élevée de la lignée F n'est pas liée à une diminution de l'oxydation des acides gras dans le muscle de ces poissons.

III-1.2.3.2.3 Enzymes de la glycolyse

- Au niveau du muscle, l'expression et l'activité de deux enzymes glycolytiques, HK1 et PK, ne sont pas significativement différentes entre régime. L'activité de ces deux enzymes est de façon générale plus faible que dans le foie.

☞ Un apport à long terme riche en lipides ne semble pas avoir d'effet sur la capacité à utiliser le glucose comme substrat pour la production d'énergie au niveau du muscle, contrairement à ce que nous avons observé au niveau du foie.

- L'expression et l'activité de l'HK-1 ($P<10^{-4}$ et $P=0,007$) et de la PK ($P<10^{-4}$ et $P=0,03$) sont significativement plus élevées chez les poissons de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L.

☞ La lignée F semble avoir une meilleure capacité à utiliser le glucose comme substrat pour la production d'énergie que la lignée L au niveau du muscle.

III-1.2.3.2.4 Enzymes du métabolisme énergétique mitochondrial

- L'expression et l'activité de l'ICDH ($P<10^{-4}$ et $P=0,008$), ainsi que l'expression de la sous unité 4 de la COX ($P=0,05$) sont significativement plus faibles chez les poissons nourris avec l'aliment HE que chez ceux ayant reçu l'aliment LE. L'activité et l'expression de la CS ne sont pas significativement modifiées par le régime alimentaire. A noter que l'activité de la CS est en limite de significativité ($P=0,055$), avec des valeurs légèrement inférieures observées chez les poissons nourris avec l'aliment HE.

☞ Il semble que l'apport plus élevé en lipides et/ou en énergie du régime HE diminue l'activité oxydative mitochondriale dans le muscle par rapport au régime LE. Ce phénomène a déjà été décrit chez la souris et le rat après un régime à long terme riche en énergie (Sparks et al., 2005; Chanseau et al., 2006).

- Aucune différence significative n'est observée entre lignée pour l'expression de la CS, de l'ICDH ou de la sous-unité 4 de la COX. En revanche, l'activité de la CS est significativement plus faible ($P=10^{-3}$) dans le muscle des poissons de la lignée F par rapport à ceux de la lignée L.

☞ De façon générale, l'activité de la CS dans un tissu donné est considérée comme un bon marqueur du nombre de mitochondries. Il se pourrait donc qu'une plus faible capacité oxydative mitochondriale dans le muscle des poissons de la lignée F ait contribué à une diminution de l'utilisation des triglycérides musculaires chez cette lignée par rapport à la lignée L.

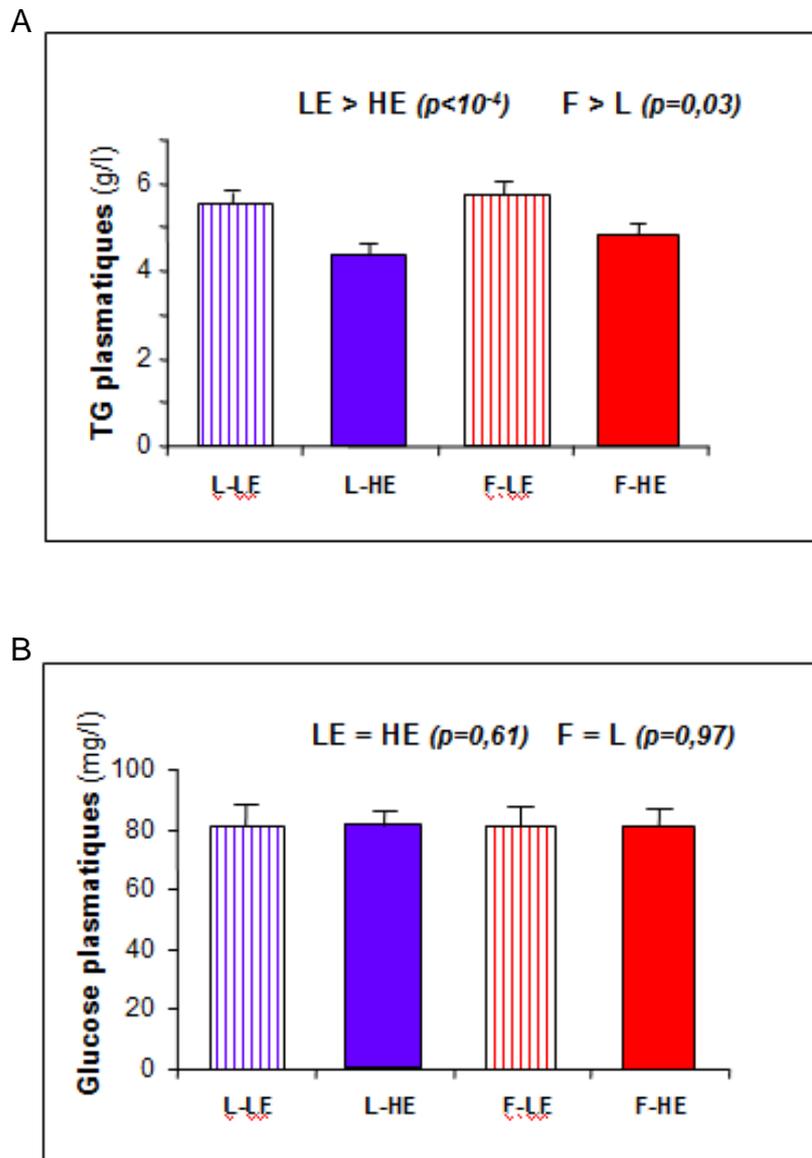


Figure III-2 : Concentrations en métabolites plasmatiques : A : Concentration en TG plasmatiques (g/l); B : Concentration en glucose plasmatique (mg/l).

I-1.3 Résultats complémentaires

Les résultats suivants ne figurent pas dans l'article présenté ici, et ont donc été ajoutés dans ce chapitre en tant que résultats complémentaires.

I-1.3.1 Concentration en métabolites plasmatiques (TG et glucose plasmatiques)

- La concentration en TG plasmatique est significativement plus faible chez les poissons nourris avec l'aliment HE que chez ceux nourris avec l'aliment LE ($P < 10^{-4}$) et significativement plus élevée chez les poissons de la lignée F que chez ceux de la lignée L ($P = 0,03$) (Figure III-2.A). Aucune interaction régime x lignée significative n'est observée pour ce paramètre.

☞ Malgré un apport alimentaire plus élevé en lipides, le taux de triglycérides plasmatiques, mesuré 24 heures après le dernier repas, est significativement plus faible chez les poissons nourris avec l'aliment HE. L'effet hypolipidémiant exercé par les AGPIs n-3, dont la teneur est plus élevée dans l'aliment HE que dans l'aliment LE, est plutôt bien documenté chez les mammifères (Nestel et al., 1984 ; Dagnelie et al., 1994, Yaqoob, et al., 1995), mais n'a pas été démontrée chez les poissons. La diminution de la lipogénèse et la stimulation de la β -oxydation des acides gras dans le foie en réponse à un apport alimentaire plus riche en lipides (notamment en AGPI n-3), comme le suggèrent nos résultats, pourrait être à l'origine d'une diminution de la sécrétion hépatique de VLDL dans la circulation sanguine.

☞ La concentration en triglycérides plasmatique plus élevée observée chez la lignée F que chez la lignée L pourrait s'expliquer en partie par une utilisation plus faible des lipides à des fins énergétiques au niveau du foie, et donc une disponibilité accrue des triglycérides pour leur sécrétion dans la circulation.

- Il n'y a pas de différence significative de la glycémie (24 heures après le repas) entre régimes ni entre lignées.

■

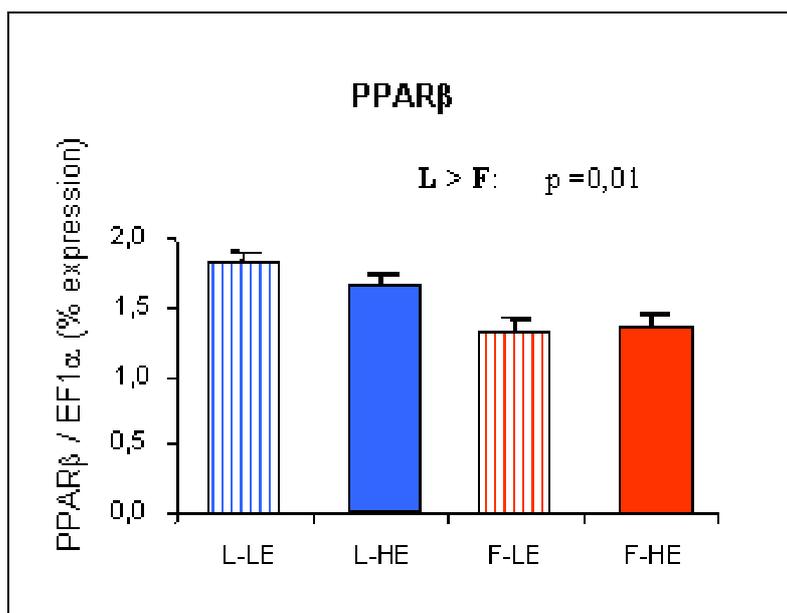


Figure III-3 : Expression de PPAR β dans le foie: effet de la teneur en lipides du régime et de la sélection génétique en fonction de l'indice d'adiposité du muscle

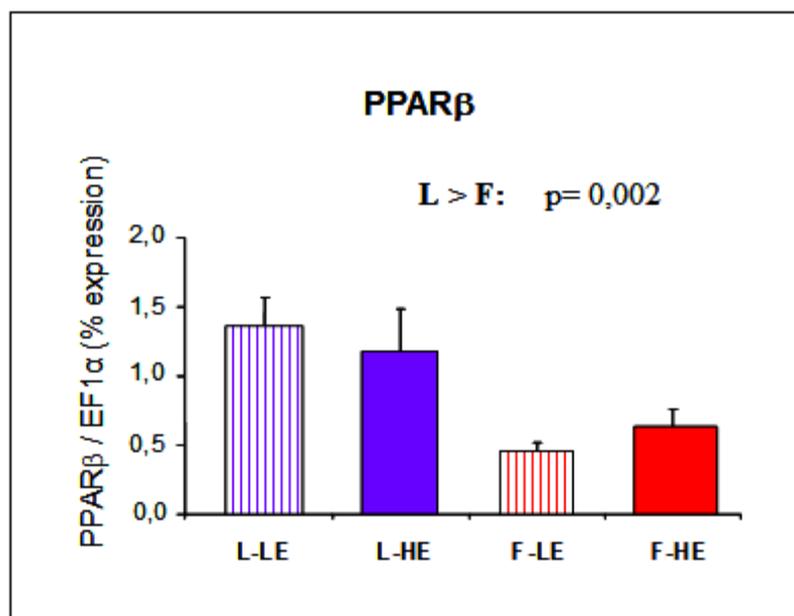


Figure III-4 : Expression de PPAR β dans le muscle blanc: effet de la teneur en lipides du régime et de la sélection génétique en fonction de l'indice d'adiposité du muscle

I-1.3.2 Expression de PPAR β/δ dans le foie et le muscle

En plus de PPAR α , nous avons également mesuré l'expression du facteur de transcription PPAR β/δ dans le foie et le muscle. Contrairement aux isotypes PPAR α et PPAR γ , sa fonction exacte est encore mal définie : PPAR β/δ pourrait intervenir dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol (Oliver *et al.*, 2001), et dans le contrôle de l'oxydation des acides gras, notamment dans le muscle, où PPAR β/δ est l'isotype le plus fortement exprimé chez les mammifères (Muoio *et al.*, 2002). Il pourrait ainsi partager des fonctions avec PPAR α (Muoio *et al.*, 2002; Gilde *et al.*, 2003; Takana *et al.*, 2003). Enfin, PPAR β/δ pourrait intervenir dans la régulation d'une large gamme de fonctions biologiques, comme les réponses pro-inflammatoires et l'accumulation des lipides dans les macrophages (Lee *et al.*, 2003; Barish *et al.*, 2008), la prolifération cellulaire et l'apoptose (Müller *et al.*, 2008).

Les fonctions de PPAR β/δ chez les poissons n'ont pas encore été démontrées. D'autre part, de multiples isoformes de PPAR β/δ seraient présents chez les poissons, et notamment chez les salmonidés (Leaver *et al.*, 2007). Ne sachant pas quel est le rôle exact joué par PPAR β/δ chez les poissons, ni quelle isoforme nous avons mesuré dans notre étude, nous avons donc décidé de ne pas publier ces résultats dans l'article.

➤ L'expression de PPAR β n'est pas significativement modifiée dans le foie en réponse à une alimentation plus riche en lipides (P=0,23). En revanche, l'expression de PPAR β est significativement plus élevée dans le foie des individus de la lignée L que dans celui des individus de la lignée F (P=0,01) (Figure III-3). Aucune interaction régime x lignée n'est observée pour ce gène au niveau du foie (P=0,24).

☞ L'expression de PPAR β suit le même profil que PPAR α dans le foie. Il se pourrait que les deux facteurs de transcription soient régulés via les mêmes mécanismes dans le foie et participent tous deux au contrôle de l'oxydation des acides gras dans ce tissu. Nos données ne permettent pas d'inférer d'autres fonctions pour PPAR β

➤ Comme observé dans le foie, l'expression de PPAR β n'est pas significativement modifiée dans le muscle en réponse à un apport alimentaire plus riche en lipides (P=0,97). Par contre, et à la différence de PPAR α , l'expression de PPAR β est significativement plus élevée dans le muscle des individus de la lignée L que dans celui des individus de la lignée F (Figure III-4). Aucune interaction régime x lignée n'est observée pour ce gène au niveau du foie (P=0,21).

Contrairement à PPAR α , PPAR β est différenciellement exprimé entre lignées au niveau du muscle blanc. Des études menées chez la souris ont montré que PPAR β pourrait se substituer à PPAR α dans le contrôle de la β -oxydation des acides gras au niveau musculaire (Muoio *et al.*, 2002). Cependant, le niveau de transcrit plus élevé de PPAR β dans le muscle de la lignée L que dans celui de la lignée F n'est pas associée à une activité plus élevée de l'HOAD, ni à une expression plus élevée de l'ACO ou des différentes isoformes de la CPTI chez ces individus. Au contraire, l'isoforme b de la CPTI est plus faible dans le muscle des truites de la lignée L que dans celui des truites de la lignée F.

☞ Il semblerait donc que PPAR β , ou du moins l'isoforme mesurée, ne participe pas au contrôle de la β -oxydation des acides gras dans le muscle blanc de la truite arc-en-ciel.

I-1.3.3 Expression de PPAR γ dans le muscle

Nous avons également analysé l'expression de PPAR γ , facteur de transcription jouant un rôle majeur dans le contrôle de l'adipogénèse et la différenciation adipocytaire. Chez la truite arc-en-ciel, et les poissons en général, les lipides de réserves au niveau du muscle blanc sont essentiellement stockés au sein d'adipocytes localisés entre les fibres musculaires. Nous voulions savoir si l'augmentation de la teneur en lipides du muscle induite par une alimentation riche en lipides ou la sélection génétique était associée à un niveau d'expression de ce gène plus élevé, signe d'une différenciation ou d'un développement adipocytaire accru.

Nous n'avons obtenue qu'une amplification très tardive de la gamme étalon, signe que PPAR γ est très faiblement exprimé dans le muscle des truites de ce stade. Ces amorces ont été validées au laboratoire et ont permis d'obtenir un signal suffisant sur des larves de truites arc-en-ciel. Il est possible que d'autres isoformes de PPAR γ existent chez la truite arc-en-ciel, comme c'est le cas pour de nombreux autres gènes (dont PPAR α et PPAR β), chez la plupart des espèces de poissons (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001), et que l'isoforme analysée ne soit exprimée qu'à des stades très précoces de développement.

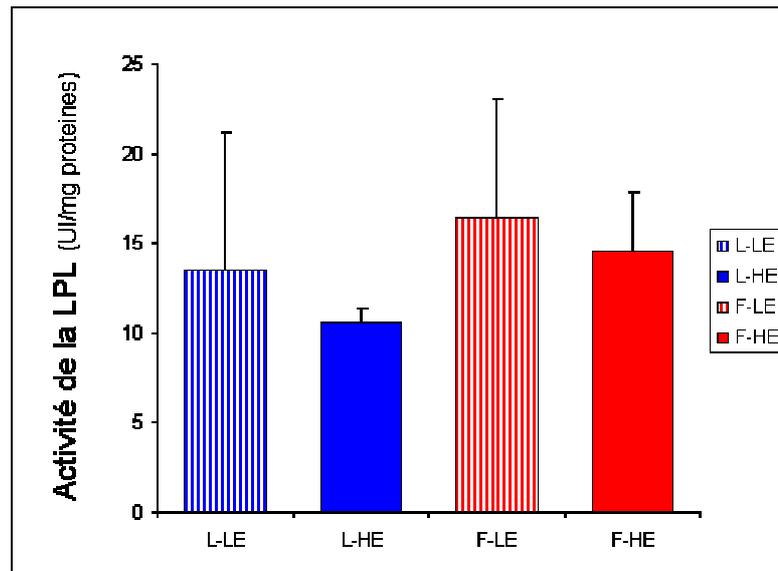


Figure III-5 : Activité spécifique (UI/mg de protéines) de la LPL au niveau du tissu adipeux péri-viscéral : effet de la teneur en lipides du régime et de la sélection génétique en fonction de l'indice d'adiposité du muscle.

I-1.3.4 Activité de la LPL au niveau du tissu adipeux péri-viscéral

L'analyse du tissu adipeux péri-viscéral, initialement prévue dans le cadre du projet, n'a pu être réalisée en raison :

- de la faible quantité de tissu disponible qui ne nous a permis de mesurer que l'activité de la LPL
- de la qualité des ARN extraits, ceux-ci s'étant avérés complètement dégradés.

La LPL est décrite comme l'enzyme limitante du captage des lipides sanguins par les tissus extra-hépatiques comme le muscle ou le tissu adipeux. Le tissu adipeux péri-viscéral constitue le site prépondérant de stockage des réserves lipidiques chez la truite arc-en-ciel. L'IVS, indicateur de l'importance des dépôts lipidiques au niveau péri-viscéral, est plus élevé chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE, et plus élevé chez les truites de la lignée L que chez celles de la lignée F. Nous avons donc mesuré l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux péri-viscéral pour voir si des différences d'activité de cette enzyme pouvaient expliquer les différences d'IVS observées. Les hypothèses testées étaient :

- une activité de la LPL plus élevée chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE, un apport alimentaire plus important favorisant le développement du tissu adipeux péri-viscéral,
 - une activité de la LPL plus élevée chez les individus de la lignée L
- Aucune différence significative d'activité de la LPL n'a pu être mise en évidence entre régimes ou entre lignées au niveau du tissu adipeux péri-viscéral, avec une forte variabilité interindividuelle (Figure III-5).

☞ L'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux péri-viscéral n'est pas modifiée par un apport à long terme riche en lipides. Il semblerait que la régulation de la LPL par le contenu énergétique de l'aliment se fasse à plus court terme après la prise alimentaire. En effet, d'après Albalat et al. (2006), l'activité de la LPL est induite dans ce tissu dans les 4 à 6 heures suivant la prise alimentaire.

☞ Comme pour le muscle, il n'existe pas de différence constitutive entre lignées vis-à-vis de l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux, cependant, une différence de régulation à plus court terme après alimentation reste envisageable.

III-1.4 Principales conclusions

➤ En combinant les effets d'une alimentation riche en lipides et de la sélection sur la base de la teneur en lipides musculaires, nous avons obtenu ***un modèle pertinent non seulement pour l'étude des mécanismes conditionnant la teneur en lipides musculaires, mais aussi la répartition des lipides dans les deux principaux compartiments corporels impliqués dans le stockage des lipides chez la truite, le tissu adipeux péri-viscéral et le muscle.***

➤ Nos données mettent en évidence des changements significatifs de l'activité et de l'expression des principales enzymes du métabolisme lipidique, de la glycolyse et de la production d'énergie par la teneur en lipides de l'aliment au niveau du foie, mais peu de variation de ces enzymes au niveau du muscle. ***Il semble que la plus forte teneur en lipides observés dans le muscle des individus nourris pendant six mois avec l'aliment HE soit essentiellement liée à un apport plus important de lipides alimentaires plutôt qu'à une modification de voies métaboliques dans ce tissu.***

➤ Concernant l'effet de la sélection, nos données montrent que celle-ci ne modifie pas l'ingestion volontaire d'aliment, avec des valeurs de lipides corporels totaux semblable entre lignées nourries avec régime donné. Contrairement à nos hypothèses de départ, ***la différence de teneur en lipides musculaires induite par la sélection génétique n'est pas associée à une activité LPL plus élevée au niveau du muscle, ni à une activité plus importantes des enzymes de la lipogénèse chez les individus de la lignée " muscle gras" (F). Elle ne semble pas non plus être liée à une oxydation des acides gras plus faible dans le muscle de ces individus,***

En revanche, ***il semble que les lignées se distinguent par leur capacité à oxyder les lipides et les glucides au niveau du foie,*** avec une expression plus faible des principales enzymes de la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale, et une plus forte expression et activité des enzymes glycolytiques chez les individus de lignée F. Ces individus ont également une plus forte activité glycolytique au niveau de leur muscle blanc. Des analyses complémentaires par mesure de l'utilisation de nutriments radiomarqués, par exemple, devraient permettre de confirmer ces résultats.

➤ De façon générale, le faible nombre d'interactions (régime x lignée) et d'effets additifs observés (ICDH et HK1 dans le foie) suggèrent que *les deux facteurs (alimentation et sélection génétique) utilisés pour accroître la teneur en lipides musculaires agissent de façon indépendante sur les acteurs métaboliques analysés* dans cette étude.

Ces analyses ont permis d'approfondir nos connaissances sur l'effet d'un apport en lipides plus élevé sur le métabolisme hépatique et musculaire chez la truite arc-en-ciel. L'effet inhibiteur des lipides alimentaires sur l'activité des principales enzymes de la lipogénèse, déjà décrit chez la truite arc-en-ciel à des stades de développement plus avancés, est confirmé dans cette étude. En outre de précieuses informations concernant l'effet de l'apport en lipides alimentaires sur les autres voies métaboliques nous sont fournies, puisque les données suggèrent une stimulation de la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale, de la glycolyse et une diminution du métabolisme énergétique mitochondrial dans le foie par l'ingestion d'aliment à plus forte teneur en lipides.

Par contre, les résultats n'ont pas permis de conforter les hypothèses formulées pour expliquer les différences de teneur en lipides musculaires observées entre lignées. La seule "piste" mise en évidence est une différence d'utilisation du glucose et des acides gras (au niveau du foie) pour la fourniture d'énergie. L'approche « candidat » se révèle donc limitée pour expliquer les différences observées entre lignées. C'est pourquoi il nous a paru pertinent de procéder à une analyse sans a priori, à l'échelle du transcriptome et du protéome, des effets de la sélection génétique et la teneur énergétique de l'aliment.

III-2 Effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel: étude du profile d'expression des gènes et des protéines hépatiques

Les résultats présentés dans ce chapitre et les différents éléments de discussion sont développés dans la publication suivante:

Kolditz, C., Paboeuf, G., Borthaire, M., Esquerré, D., SanCristobal, M., Lefèvre, F., and Médale, F., 2008. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. *BMC Genomics*. *Sous presse*.

Cet article décrit les gènes et les protéines identifiées par les analyses du transcriptome et du protéome hépatique comme différenciellement exprimés dans le foie, soit entre lignées soit en réponse à l'aliment, soit par ces deux facteurs utilisés pour moduler la teneur en lipides du muscle.

Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver

Catherine-Ines Kolditz¹, Gilles Paboeuf², Maïena Borthaire¹, Diane Esquerré³,
Magali SanCristobal⁴, Florence Lefèvre², and Françoise Médale^{1,*}

¹INRA, UMR 1067 Nutrition Aquaculture & Genomics - Pôle d'Hydrobiologie, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

² INRA, UR 1037 SCRIBE – Campus de Beaulieu – F-35042 Rennes Cedex, France

³INRA, DGA, UMR 314, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, CRB GADIE, F-78350 Jouy en Josas, France

⁴INRA, UMR 444, Laboratoire de Génétique Cellulaire, F-31326 Castanet-Tolosan, France

*Corresponding author

Email addresses

CIK: kolditz@st-pee.inra.fr

GP: Gilles.Paboeuf@rennes.inra.fr

MB: maienaborthaire@hotmail.com

DE : diane.esquerre@jouy.inra.fr

MS: magali.san-cristobal@toulouse.inra.fr

FL: Florence.Lefevre@rennes.inra.fr

FM: medale@st-pee.inra.fr

Abstract

Background: Growing interest is turned to fat storage levels and allocation within body compartments, due to their impact on human health and quality properties of farm animals. Energy intake and genetic background are major determinants of fattening in most animals, including humans. Previous studies have evidenced that fat deposition depends upon balance between various metabolic pathways. Using divergent selection, we obtained rainbow trout with differences in fat allocation between visceral adipose tissue and muscle, and no change in overall body fat content. Transcriptome and proteome analysis were applied to characterize the molecular changes occurring between these two lines when fed a low or a high energy diet. We focused on the liver, center of intermediary metabolism and the main site for lipogenesis in fish, as in humans and most avian species.

Results: The proteome and transcriptome analyses provided concordant results. The main changes induced by the dietary treatment were observed in lipid metabolism. The level of transcripts and proteins involved in intracellular lipid transport, fatty acid biosynthesis and anti-oxidant metabolism were lower with the lipid rich diet. In addition, genes and proteins involved in amino-acid catabolism and proteolysis were also under expressed with this diet. The major changes related to the selection effect were observed in levels of transcripts and proteins involved in amino-acid catabolism and proteolysis that were higher in the fat muscle line than in the lean muscle line.

Conclusions: The present study led to the identification of novel genes and proteins that responded to long term feeding with a high energy/ high fat diet. Although muscle was the direct target, the selection procedure applied significantly affected hepatic metabolism, particularly protein and amino acid derivative metabolism. Interestingly, the selection procedure and the dietary treatment used to increase muscle fat content exerted opposite effects on the expression of the liver genes and proteins, with little interaction between the two factors. Some of the molecules we identified could be used as markers to prevent excess muscle fat accumulation.

Background

The levels of fat storage and allocation within body compartments have become the focus of critical interest during the last few years, due to their impact on human health [1] and meat quality of farm animals [2,3]. Dietary manipulation and genetic selection constitute the two ways to manage body fat content in farm animals. Energy intake and genetic factors also have a major influence on fattening in humans [4].

Storage of triglycerides in the different body compartments depends on the availability of plasma lipids originating from either the diet or lipogenesis. In fish, human and most avian species, lipogenesis mainly takes place in the liver [5,6] and is negligible in muscle [7,8]. The liver has a central role in metabolic homeostasis and in coordinating body metabolism in response to dietary conditions. An increase in dietary lipid generally leads to modification of lipid metabolism in most animals, with inhibition of lipogenic enzymes [9,6,10], and stimulation of fatty acid oxidation [11], especially when the dietary fatty acids are provided as polyunsaturated fatty-acids (PUFAs) [12,13,14]. However, most of the studies investigating the hepatic metabolic changes induced by long term feeding a high fat diet focused on lipid metabolism.

Body fat distribution is clearly a heritable trait [15]. In farm animals, genetic selection has been used to manage fat content of target body compartments [16,17], but it generally leads to changes in whole body fat content. In humans, studies comparing groups with different fat distribution patterns have highlighted differences in postprandial plasma metabolites [18,19,20], suggesting differences in fat, glucose and protein metabolism. However, the physiological mechanisms responsible for these differences have not been described to date.

Using divergent selection on muscle fat content in rainbow trout, we obtained animals that were characterized by differences in fat allocation between visceral adipose tissue and muscle, with no change in overall body fat content between lines. We then decided to characterize the differences in metabolic changes occurring between these two lines when fed a low or a high energy diet. We focused on the liver, since this organ is the center of intermediary metabolism and main site for lipogenesis in fish [5]. The aims of the study were 1) to assess the overall changes in gene and protein expression induced in the rainbow trout liver by long term feeding of a high energy/high fat diet, 2) to identify the differences in gene and protein expression profiles induced in the liver as a consequence of the selection for muscle fattening, and 3) to evaluate to what extent the two factors used to modulate muscle fat content may

have interacted on the different metabolism-related genes and proteins. This was achieved through two complementary approaches at the transcriptomic and proteomic levels, using microarray and bidimensional electrophoresis.

Results

Growth, biometry and biochemical parameters (Table 1)

The higher energy content of the HE diet enhanced growth rate ($p=10^{-4}$) of fish irrespective of the line. At the end of the feeding trial, fish of the lean muscle line (L) showed higher whole body weight ($p=10^{-4}$) compared to those of the fat muscle line (F). Whole body lipid content was increased in fish fed the HE diet compared to those fed the low energy diet (LE), and was similar for the two lines fed the same diet. Muscle lipid content was higher in fish fed the HE diet ($p<10^{-4}$) and in the F line ($p<10^{-4}$). Viscero-somatic index (VSI), used as an indicator of fat deposition as visceral adipose tissue, was increased in fish fed the HE diet ($p=10^{-4}$) and in fish from the L line ($p=10^{-4}$). Plasma triglyceride levels were higher in fish fed the LE diet ($p=10^{-4}$) and in fish of the F line ($p=0.02$). Glycemia was not significantly different between diets ($p=0.61$) or lines ($p=0.97$) 24 hours after the meal.

Microarray data analysis

Hepatic transcripts differentially expressed between the dietary treatments

The results derived from ANOVA ($p<0.01$) and SAM ($FDR<0.15$) analysis for global dietary effects (whatever the lines) on hepatic gene expression are summarized in Table 2. A comparison of the two lists of genes generated by these two analytical methods [see additional file 1] revealed that 106 genes were significant according to both statistical analyses. With regard to the ontology of these 106 clones, 83 were attributed a biological function (Table 2). Our study was focused more particularly on genes involved in the metabolic process since it was the largest category represented (44.6% of the transcripts that had a biological function). Lipid metabolism was the metabolic pathway that contained the majority of the differentially expressed transcripts (40.5%), with, in particular, genes encoding for proteins involved in lipid transport (acyl-CoA binding protein [ACBP], heart-type fatty acid-binding protein [H-FABP]), fatty acid desaturation (delta-6-desaturase [$\Delta 6$ -FAD]) and cholesterol/steroid metabolism (cholesteryl ester transfer protein [CETP]), down-regulated in trout from both lines fed the HE diet (Table 3). There were two different transcripts corresponding to the H-FABP protein (of ~800 bp and ~600 bp) that shared 88% of sequence similarity. Their deduced amino acid sequences contained 94% similar residues, suggesting that these two transcripts may be different isoforms of H-FABP.

Several clones corresponding to enzymes involved in generation of precursor metabolites and energy (6-phosphogluconate dehydrogenase [6-PGD], pyruvate carboxylase [PC] and subunits of the respiratory chain complexes), amino acid metabolism (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase [3-PGDH], cystathionine γ -lyase [CGL] and acetylcholinesterase precursor [AChE]) and proteolysis were also found to be significantly reduced in the livers of fish fed the HE diet compared to those fed the LE diet.

Hepatic transcripts affected by the selection procedure

The results derived from ANOVA ($p < 0.01$) and SAM ($FDR < 0.15$) analysis for global genetic selection effects (whatever the diet) on hepatic gene expression are summarized in Table 4. [For a complete list of genes identified as significantly different between the two lines according to each statistical approach see Additional file 2]. Seventy transcripts were found to be significant by both statistical methods. Transcripts involved in metabolic pathways accounted for 46% of the transcripts that had received a biological function (Table 4). Only two of these transcripts were involved in lipid metabolism (ceramide kinase 1 and a nonspecific lipid-transfer protein) (Table 5). A greater proportion of differential transcripts encoded for proteins involved in xenobiotic and oxidant metabolism (22.2%), generation of precursors and energy (6-PGDH, malate dehydrogenase [MDH], ubiquinol cytochrome c reductase), amino-acid metabolism (transcripts encoding for two aspartate aminotransferases [GOT], a betaine-homocysteine S-methyltransferase [BHMT] and a 4-aminobutyrate aminotransferase) and proteolysis (proteasome and protein ubiquitinylation components). All were expressed at higher levels in the F line than in the L line (Table 5).

Hepatic transcripts involved in a line per diet interaction

Twenty-six transcripts for which the effects of the diet were dependent on genotype were detected by the two-way ANOVA. Two of these encoded for proteins involved in immune function, eight in cellular processes, and one in trafficking, four encoded for transcription factors, and ten were involved in metabolic pathways. The latter are represented in figure 1. It is of note that six of the ten significant interactions that concerned metabolic genes occurred in the F-LE group: transcript levels of four genes involved in lipid metabolism and energy production (glucose 6-phosphate dehydrogenase [*g6pd*], endothelial lipase [*lipg*], NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 (*ndus8*), and cytochrome b-c1 complex subunit [*uqcrfs1*]) were increased in the F-LE group, whereas the expression of long-chain acyl-CoA synthetase 5 [*acs15*], involved in the activation of long chain fatty acids, and

ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase [*usp5*], involved in proteolysis, were concomitantly decreased.

Confirmation of microarray data by real time RT-PCR

Changes in gene expression demonstrated by microarray analysis were further confirmed with a small set of genes using real time RT-PCR performed on nine trout liver samples per experimental group, including the samples we used in the microarray experiment (see additional file 3). Genes were selected for each category of effects we observed, i.e. *fads2* (encoding for the protein Δ 6-FAD, or delta-6-desaturase) and *pgdh3* (D3-phosphoglycerate dehydrogenase), which exhibited a significant diet-induced change, *got2* (aspartate aminotransferase) and *mdh* (malate dehydrogenase), that were found to be differentially expressed between lines, *pgd* (6-phosphogluconate dehydrogenase), that was regulated by both factors, and finally *g6pd* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) and *gk* (glucokinase), for which a line/diet interaction was detected. The real time RT-PCR analysis of *fads2* (delta-6-desaturase) not only confirmed the dietary effect detected by microarray analysis, but also revealed a significant line effect, with higher expression in the F line than in the L line.

2-D gel analysis of soluble liver proteins

Over 900 different spots were detected in at least one experimental condition, and 570 were detected in all four groups. According to the two-way ANOVA analysis, 265 protein spots showed a change in abundance between experimental conditions ($p < 0.05$). Of them, 70 were deemed to be of sufficient quality to allow peptide mass fingerprinting, and 36 yielded significant identities (see Additional file 4). Of the 36 proteins identified, 28 corresponded to proteins involved in metabolic pathways (78%). In particular, we identified two protein species of heart-type fatty acid binding protein (H-FABP), with different isoelectric points and molecular weights (figure 2). The best match for trypsin digest products from these two spots corresponded to the two EST printed on the microarray that we found to be differentially expressed using transcriptome analysis (Genbank accession numbers BX298066 and CU069693). We also identified two α -1 enolase and two transketolase protein species.

Three proteins involved in intracellular lipid transport (two H-FABPs and ACBP) were reduced with the HE diet, in agreement with the results observed with the transcriptome analysis. In addition, the two H-FABPs showed greater abundance in the F line than in the L line, an effect that was not evidenced at the transcript level. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) that is involved in phospholipid biosynthesis was also more highly

expressed in the F line than in the L line. Finally, apolipoprotein A-1 (Apo A-1), the major protein in high-density plasma lipoprotein, was specifically up-regulated in the L line fed the HE diet (L-HE group).

Two proteins involved in the generation of precursor metabolites and energy were identified, i.e. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH-NADP), which was lower in fish fed the HE diet, and ubiquinol cytochrome c reductase, a component of the respiratory chain, that was more abundant in the F line than in the L line. ICDH-NADP was in addition markedly reduced in L fish fed the HE diet (L-HE group).

Six proteins involved in carbohydrate metabolism, particularly in glycolysis/gluconeogenesis (GAPDH, transaldolase, two α -1 enolase and two transketolase species) were expressed at lower levels in fish fed the HE diet compared to fish fed the LE diet. With regard to the selection effect, GAPDH, phosphoglucomutase (PGM), one α -enolase and one transketolase were more abundant in the F line than in the L line. In addition, line/diet interactions were observed for PGM, the two α -1 enolases and the two transketolases that were considerably less abundant in L fish fed the HE diet (L-HE group).

Several key enzymes involved in amino acid metabolism were identified: glutamate dehydrogenase (GDH) and alanine:glyoxylate aminotransferase (AGX), both involved in amino acid transamination, and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH), involved in sulfur amino acid bioconversion pathways, were expressed at lower levels in fish fed the HE diet, whereas serine hydroxymethyl transferase was expressed at higher level in these fish. Aspartate aminotransferase (GOT), GDH, AGX and homogentisate 1, 2-dioxygenase (HGD) were detected in greater abundance in the F line than in the L line. In contrast, serine hydroxymethyltransferase (SHMT) and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD) were expressed at higher levels in the L line.

Finally, we identified four proteins related to oxidative cell status, i.e. glutathione peroxidase (GPX) and glutathione S transferase (GST), involved in the anti-oxidant process, as well as stress-activated protein kinase 3 (MK12) and arylamine N-acetyltransferase, that are induced by oxidative stress conditions. Lower levels of the two anti-oxidant enzymes were detected in the F line than in the L line, whereas the two stress-induced proteins were less abundant in the latter. Of these four proteins, only GPX showed a diet-induced change in abundance, with higher protein levels upon HE diet feeding.

Discussion

Agreement between transcriptome and proteome analyses

Transcriptome and proteome analysis constitute powerful tools for obtaining a view of the changes induced by genetic selection procedures and molecular adaptations to dietary treatments. The combination of the two approaches was justified in several respects. Indeed, the expression of a transcript and that of its corresponding protein are not necessarily related. Although much relevant information can be obtained from proteome analysis alone, the current proteomics technologies have some limitations of a technical order [21]. In addition, we are currently limited in the sequenced proteins available for fish species, in particular rainbow trout. About half of the spectra generated in this study led to significant protein identification. The combination of microarray and proteome analyses therefore makes it possible, to some extent, to get round the drawbacks associated with each method and to extract complementary information from these two independent methods.

In the present study, these two overall approaches provided consistent results. Some of the differentially expressed proteins we identified were also found on microarray to have altered mRNA levels (two H-FABPs, ACBP, GOT, GAPDH and the stress-activated protein kinase 3 [MK12]). The changes in abundance detected for these proteins were in accordance with the changes observed at the mRNA level.

Long term effects of a high energy/high lipid diet on the hepatic gene and protein expression profiles

One of the aims of the present study was to examine the changes in hepatic gene and protein expression profiles induced by long term feeding of a high energy/ high fat diet. As could be expected, given the large number of genes that are transcriptionally regulated by dietary fatty acids, particularly PUFAs [22], a high proportion of the transcripts that showed differential expression between dietary groups were involved in lipid metabolism. Three proteins involved in intracellular fatty acid transport (one ACBP and two H-FABPs) exhibited lower abundance at both mRNA and protein levels in fish fed the HE diet. H-FABPs belong to a family of small, cytosolic proteins that bind long-chain fatty acids and cholesterol. They are predominantly expressed in the heart, skeletal muscle and testes of mammals [23], but have been detected in a wider range of tissues, including the liver, in several fish species such as zebrafish, mummichog and lamprey [24,25,26]. Whereas H-FABP is thought to be involved

in fatty acid uptake and transport toward mitochondrial β -oxidation in muscle tissues, as evidenced in mammals and Atlantic salmon [27,28,29], indications that H-FABP may also mediate intracellular fatty acid sequestration and transport toward the lipogenic process in the liver and oocytes have been reported in zebrafish [26]. Our results support the latter assumption, since the change in H-FABP level coincided with a decrease in the activity of key lipogenic enzymes [30]. ACBP is an intracellular lipid-binding protein that selectively binds medium and long chain acyl-CoA esters (C14-C22) with high specificity [31]. Studies in yeast [32] and the mouse [33] have suggested that ACBP may play a role in the synthesis of very long chain fatty acids, with dual regulation by both PPAR α and SREBP-1, as for Δ 5 and Δ 6 desaturases [34]. The HE diet down-regulated the gene expression of 6-phosphogluconate dehydrogenase (*6-pgd*), a key enzyme of the pentose phosphate pathway that provides NADPH for the lipogenic process. The HE diet also decreased transcript level of Δ 6-desaturase (*Δ 6-fad*), a rate-limiting enzyme for the synthesis of highly unsaturated fatty acids (HUFAs). Fish oil is particularly rich in (n-3) polyunsaturated fatty acid and several studies performed in mammals [35] and salmonids [36,37,38] have demonstrated that a HUFA-rich diet reduces hepatic mRNA levels of Δ 5- and Δ 6-desaturases. Increasing the level of dietary (n-3) fatty acid supply has been shown to enhance enzymes of the antioxidant defense system such as GPX and catalase at both activity and mRNA levels [39]. Accordingly, we found that protein levels of GPX, a key enzyme in the antioxidant defense system, were increased in fish fed the HE diet, which contained 15% fish oil.

The protein abundance of GDH and AGX, two key enzymes of amino acid transamination and indicators of metabolic utilization of dietary amino acids, was lower in fish that received the HE diet. Some transcripts involved in proteasome-dependent proteolysis were also expressed at lower level with this diet. Fish swiftly use proteins as oxidative substrates [40,41]. Thus, increasing non-protein energy-yielding nutrients such as lipids generally leads to a protein sparing effect, probably by redirecting dietary protein and amino acids from energy production toward tissue deposition [42,43]. This is consistent with the enhanced protein efficiency ratio and growth performance observed in fish fed the HE diet, as previously described [30]. Feeding the HE diet was also associated with reduced levels of transcripts and proteins involved in sulfur amino acid bioconversion, such as 3-PGDH, CGL, or BADH. This might reflect a decrease in amino acid turnover in response to higher lipid supply, a nutritional context that would allow the cell to rely less heavily on the use of essential amino acids such as methionine to meet their energy requirements.

Long term feeding a diet supplemented in fish oil has been shown to induce substantial lowering of blood triglycerides (at least in part) by inhibiting the production and secretion of triglyceride-rich lipoprotein particles by the liver [44]. The plasma triglyceride level was consistently lower in fish fed the HE diet than in fish fed the LE diet. A reduction in lipogenesis associated to a stimulation of fatty acid oxidation in the liver, as suggested by our previous results [30], resulting from the higher level of fish oil provided by the HE diet might have decreased triglyceride and VLDL secretion in circulating blood.

Hepatic transcripts and proteins affected by the selection procedure

In contrast to the results observed regarding the dietary effect on hepatic gene expression, the transcriptome analyses revealed minor changes in lipid metabolism induced by the selection procedure. However, the proteome approach yielded some complementary information, as higher levels of the two H-FABP proteins were present in the livers of the F line compared to the L line. This might have been due to post-transcriptional regulation, or to increased stability of these two proteins in the F line hepatocytes. Abundance of G3PDH, involved in phospholipids biosynthesis, was also increased in F fish livers. In addition, real time RT-PCR measurement of *fads2*, encoding for the delta-6-desaturase, an enzyme involved in fatty acid desaturation, showed increased mRNA levels in the F line. All these results, together with increased gene expression of 6-PGD, a key enzyme that provide NADPH for lipogenic process, suggest greater hepatic lipid biosynthesis in the F line. This is in good agreement with the higher activity of acetyl-CoA carboxylase, as previously evidenced [30], although no differences in fatty acid synthase activity could be found between the two lines [30].

However, most of the alterations induced by the selection procedure we observed occurred in protein and amino acid metabolism. In particular, levels of mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT), GDH and AGX, three key enzymes that play a major role in amino acid catabolism, were increased in the livers of F fish. Transcripts and proteins that functioned in amino acid bioconversion (BHMT and GABT) and in proteasome-dependent proteolysis were also enhanced in this line. All these findings may reflect an increase in hepatic flux for energy production through amino acid metabolism in the F line compared to the L line. This is in agreement with the lower growth rate and protein efficiency observed for the F line [30]. Interestingly, some studies have reported strong evidence that amino acid catabolism may be negatively regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in rodent liver [45,46,47]. In agreement with this, PPAR α expression was lower in the F line than in the L line [30]. The increase in amino acid metabolism suggested here could thus be mediated

through weaker inhibition of related genes by PPAR α . This phenomenon has previously only been described in the mouse and rat. Although this remains to be confirmed by appropriate experiments in fish, the fact that such a mechanism might also operate in lower vertebrates would support the idea that regulation of amino acid metabolism by PPAR α might be evolutionarily conserved throughout vertebrates.

The lower protein levels of two key enzymes in the antioxidant defense system (GPX and GST) observed in the F line might be explained by a lower production of reactive oxygen species (ROS) derived from fatty acid oxidation.

Taken together, all these findings suggest that a difference in nutrient utilization occurs between the two lines, the L line having a higher propensity to oxidize fatty acids than the F line [30], which may use comparatively more protein and amino acids for energy production. This difference in nutrient utilization could be at least in part orchestrated by PPAR α , exerting opposing controls of fatty acid oxidation and amino-acid catabolism.

Plasma triglyceride levels were higher in the F line than in the L line. Increased fatty acid synthesis and decreased fatty acid oxidation in the liver of the F line might have led to enhanced fatty acid availability for triglyceride and subsequently VLDL production. Another hypothesis might be that a decreased extra-hepatic tissue lipid uptake in the F line compared to the L line also contribute to their higher blood triglyceride levels by lowering triglyceride clearance from plasma. Further analysis of the muscle and visceral adipose tissue lipid uptake should enlighten this point.

Comparing the effects of the HE diet and upward selection for muscle fat content on hepatic expression profiles

Significant effect exerted by both dietary treatment and genetic background were observed for some liver transcripts and proteins involved in processes such as cell cycle, transcription/translation, immune response and metabolic pathways. Overall, the HE diet and upward selection for muscle fat content exerted opposite effects in the liver. In particular, the expression of genes and proteins involved in lipid biosynthesis and amino acid and protein catabolism were decreased by the HE diet, and were increased in the F line compared to the L line. Some transcripts and proteins were involved in line/diet interactions, but they did not fall into function-related groups, except for the protein involved in glycolysis/neoglucogenesis, the abundance of which was decreased in the livers of fish from the L-HE group. Gene expression level of GK, a key enzyme of glycolysis that plays a major role in glucose homeostasis, was particularly high in the L-HE group compared to the three other groups. We

are currently not able to explain the magnitude of changes observed for GK gene expression, since these changes are not correlated with glycaemia. This might reflect a disturbance of carbohydrate metabolism in the L line. Further analyses are needed, such as glucose tolerance test or post-prandial kinetics of glycaemia and GK gene expression. The relative few number of genes and proteins affected by both factors as well as line/ diet interactions observed in the present work is in agreement with the results derived from our previous study [30]. All together, these results suggest that the dietary treatment and the genetic selection used in this study to manage muscle fattening are likely to act through different metabolic actors in the liver. The present study reveals that the cumulative effect exerted by the genetic selection and the high energy diet on muscle fattening is not associated with cumulative changes of hepatic metabolic pathways.

Conclusions

The combination of liver transcriptome and proteome analysis led to the identification of several molecules that responded to the dietary treatments and the genetic selection for muscle fattening.

The increase in dietary energy and lipid supply provided by the HE diet induced significant changes in the hepatic transcriptome and proteome. The present findings confirmed the effects of long term feeding of a high-PUFA diet on the expression of genes and proteins involved in fatty acid desaturation and anti-oxidant metabolism previously described in mammals, suggesting that the underlying molecular mechanisms are evolutionarily conserved. The use of high throughput technologies led to the identification of previously unappreciated molecular actors, such as those involved in amino acid and protein metabolism, which responded to long term feeding with a high energy/ high fat diet. They provide complementary information on the effects of dietary fat levels on genes involved in the regulation of energy metabolism.

Although muscle was the direct target, the selection procedure applied significantly affected hepatic metabolism. The main changes observed were in transcripts and proteins involved in amino acid and protein catabolism that were higher in the F line than in the L line. Some transcripts involved in lipogenesis were also increased in the F line compared to the L line. To our knowledge, the present study is the first that provides insights into the hepatic metabolic changes associated with differences in body fat distribution in a context of similar whole body

fat content. We identified genes and proteins that could be used as markers to prevent excess muscle fat accumulation.

Further analysis of the muscle and visceral adipose tissue transcriptome and/or proteome will provide greater understanding of the mechanisms that are responsible for the differences in fat allocation between the two lines and of the fattening effects of a high energy/high fat diet on these body compartments.

Methods

Experimental animals and diets

The animals used in this study were the same as those described in Kolditz et al. [30]. Briefly, two lines of rainbow trout, a lean muscle line (L) and a fatty muscle line (F), were obtained after three generations of divergent selection for high or low muscle fat content, evaluated using a non-destructive method (Distell Fish Fatmeter) in live fish. Triplicate groups of fish of both lines were fed diets containing either 100 g (LE diet) or 230 g (HE diet) lipids/kg dry matter, from the first feeding for six months. Both diets were made from the same fishmeal-based mixture. About 15% fish oil was added to the HE diet to create a large difference in lipid content between the two diets. The inclusion of fish oil in the HE diet resulted in an increase in the overall energy content of the HE diet (+13%) compared to the LE diet. The main change in nutrient content involved the lipid fraction (+135% higher level in the HE diet) with an increase in n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids ratio (+67% in the HE diet). Minor changes occurred in protein and starch content, both being decreased in the HE diet (-11% and -24%, respectively) as a consequence of a dilution effect (Table 6). At the end of the 6 month feeding trial, all fish were anesthetized with 2-phenoxyethanol at the recommended dose for surgical procedures (0.2 ml/l) 24 hours after the meal, and individually weighed. Nineteen fish per tank were sacrificed by a sharp blow on the head. Livers and viscera were weighed in order to calculate the hepato-somatic index ($HSI (\%) = [100 \times (\text{liver weight} / \text{body weight})]$), and the viscero-somatic index ($VSI (\%) = [100 \times (\text{total viscera weight} / \text{body weight})]$). Fillets from the left side of the fish were kept after trimming and skin removal as samples for analysis of lipid content. The livers of three fish per tank were sampled under RNase-free conditions to perform gene and protein expression analysis. All the tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The experiment was conducted according to the *National Guidelines for Animal Care of the French Ministry of Research*.

RNA extraction

The RNA extracts used for the present microarray and real time PCR analyses were the same as used by Kolditz et al. [30]. Total RNA was extracted from 9 individual livers per experimental condition using the TRIzol reagent method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was quantified using spectrophotometry based on absorbance at 260nm, and

integrity was ascertained using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Sweden).

cDNA microarray production

Nylon microarrays were obtained from the INRA-GADIE Biological Resources Center (Jouy-en-Josas, France) [48]. The microarrays contained 9023 distinct rainbow trout cDNAs originating from a normalized multi-tissue library [49]. Positive (luciferase) and negative (water) controls were also spotted on each microarray. This rainbow trout generic array was deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (Platform# GPL3650) [50].

Microarray hybridization

Six hepatic RNA samples out of the 9 that were extracted from each experimental condition were randomly chosen and used for microarray hybridization at the INRA UMR1067 transcriptome facility (St-Pée-sur-Nivelle, France). A first hybridization was performed at 42°C for 48h using a ³³P-labelled oligonucleotide (TAATACGACTCACTATAGGG, sequence which is present at the extremity of each PCR product) to monitor the amount of cDNA in each spot. After stripping (3 hours 68°C, 0.1× SSC, 0.2% SDS), arrays were prehybridized for 1 h at 42°C in hybridization solution (5× Denhardt's, 5× SSC, 0.5% SDS). Labelled cDNAs were prepared from 3 µg of RNA by simultaneous reverse transcription and labelling for 1 hour at 42°C in the presence of 30 µCi [alpha-³³P] dCTP, 0.6 µl 120µM cold dCTP, 0.6µl 20 mM dATP, dTTP, dGTP and 200 units SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 30 µL final volume. RNA was degraded by treatment at 68°C for 30 min with 1 µl 10% SDS, 1 µl 0.5 M EDTA and 3 µl 3 M NaOH, and then equilibrated at room temperature for 15 min. Neutralization was done by adding 10 µl 1 M Tris- HCl plus 3 µl 2N HCl. 2µg of PolydA 80mers were then added to the solution to saturate polyA tails. Arrays were incubated with the corresponding denatured labelled cDNAs for 48h at 65°C in hybridization solution. After 3 washes (1 hours 68°C, 0.1× SSC 0.2% SDS), arrays were exposed 60 hours to phosphor-imaging plates before scanning using a FUJI BAS 5000.

Microarray signal processing

Signal intensities were quantified using AGScan software [51], and normalization was performed using BASE software (BioArray Software Environnement), a MIAME-compliant database available at the bioinformatics facility SIGENAE [52]. Spots with an oligonucleotide signal lower than three times the background level were excluded from the analysis. After this

filtering step, signal processing was performed using the vector oligonucleotide data to correct each spot signal according to the actual amount of DNA present in each spot. After correction, the signal was normalized by dividing each gene expression value by the median value of the array and then log transformed. Microarray data from this study have been deposited in the GEO database (Series# GSE12031) [50].

Statistical analysis of microarray data

A total of 7740 clones out of 9023 (86%) passed through the background filter and were kept for further analysis. To evaluate potential interactions of diet and genotype, variations in gene expression were analyzed by two-way ANOVA ($p < 0.01$) for each gene, using Tiger TMEV 3.1 software [53], with dietary treatment and genotype as independent variables. When interactions were significant, means were compared using the Student Newman Keuls test. Analysis of the global effect of each mean factor (diet or genotype) was complemented by a two class unpaired comparison of Significance Analysis of Microarray (SAM) [54] using the Microsoft Excel software. The SAM analyses were performed on the whole set of data using different FDR cut offs (from 0 to 25% estimated false positives) on the following group comparisons: 1) HE vs LE, whatever the line 2) L vs F, whatever the diet. We chose a moderate FDR cut off of 0.15 that allow sufficient power while keeping the estimated number of false positives acceptable. Only transcripts concordantly identified by both statistical approaches were considered in the present study to assess the global effect of the diet on one hand, of the genotype on the other hand. Their expression ratios were calculated as $10^{\log(A) - \log(B)}$, A and B being respectively the mean expression value of HE and LE calculated within each line, or F and L, calculated within each dietary group.

Data mining

Rainbow trout sequences originating from INRA AGENAE [55] and USDA [56] EST sequencing programs were used to generate publicly available contigs. The 8th version (Om.8, released January 2006) was used for BlastX [57] comparison against the Swiss-Prot database (January 2006) [58]. This was performed automatically for each EST spotted onto the membrane and used to annotate the 9023 clones of the microarray. For all genes identified as differentially abundant in the transcriptome analysis, ontologies were obtained using the GoMiner software [59] and complemented when necessary with information from the literature. When feasible, functional categories were allocated as they related to liver biology.

Gene expression analysis: qRT-PCR

Nine individual samples per experimental condition were used as biological replicates, including the six samples used for microarray hybridization. Real-time PCR measurements were performed as described in Kolditz et al. [30] on a set of genes selected for each category of effects observed (dietary effect alone, selection effect alone, dietary effect + selection effect, line/diet interaction). The Genbank accession numbers, the sequences of the forward and reverse primers and the corresponding annealing temperature used for each gene tested for its expression are described in Additional file 5. Relative quantification of the target gene transcript with *eflα* reference gene transcript [60] was made following the method described by Pfaffl [61] using the equation 1. The effect of dietary treatment, lines and line/diet interaction on real-time PCR data were tested using the statistical software SAS® by means of a two-way ANOVA. Differences were considered significant when the probability level was <0.05. When interactions were significant, means were compared using the Student-Newman-Keuls test.

Protein extraction

Five individual liver samples for each experimental condition were used for proteome analyses. They were randomly chosen among the 6 animals per condition used for microarray analysis. Samples (100 mg) of frozen tissue were homogenized in lysis buffer (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 1 mM AEBSF, 10 μM E-64) at room temperature, using an Ultra-Turrax homogenizer. Following homogenization, the tissue lysates were first centrifugated at 15,000g for 30 min at 18°C, and subsequent supernatants were then centrifugated at 105,000g for 1 hour at 18°C to remove any insoluble particles. The supernatant was then added to 1% (w/v) IPG buffer pH 3-10 NL (Amersham Biosciences) and stored at 70°C until gel electrophoresis was performed.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Gels were made in triplicate for each sample. Samples (150 μg total proteins) were diluted to 450 μL with DeStreak solution supplemented with 0.5% IPG buffer pH 3-10 NL (Amersham Biosciences). After incubation for 1 hour at room temperature, samples were loaded onto a 24 cm nonlinear immobiline dry strip, pH range 3–10 (IPG drystrips 3-10NL, 24cm; Amersham Biosciences). Isoelectric focusing (IEF) was performed using an IPGphor IEF system (Amersham Biosciences). After active in-gel sample rehydration, carried out at 30V over 12 hours, proteins were focused using five phases of stepped voltages from 200 to 8000 V, with

total focusing of 78,810 Vh (all stages at 2 mA and 5 W). The strips were then equilibrated twice for 15 min with gentle shaking in equilibration solution containing 6 M urea, 50 mM Tris-HCl buffer, 30% glycerol, 2% SDS. DTT (65mM) was added to the first equilibration solution in order to reduce disulfide bridges. Iodoacetamide (2.5%) and 0.5% bromophenol blue were added to the second solution. SDS-PAGE was then carried out using an Ettan Dalt6 unit (Amersham Biosciences). The IPG strip was laid onto a 12.5% constant concentration polyacrylamide slab gel (24x18 cm). Running was conducted using a two-step program, with 2.5 W/gel for 40 min, and then increased to 17 W/gel for 4 hours. For subsequent image analysis, fixed 2-D gels were silver-stained as described by Heukeshoven and Dernick [62]. Molecular masses of the proteins were determined by coelectrophoresis with standard protein markers. Isoelectric points were determined according to the IPG strip manufacturer's specifications.

Analysis of 2D gels

The gels were scanned at a resolution of 200 dpi using an ImageScanner apparatus (GE Healthcare) and stored as TIF files. Subsequent analysis of the gel images was performed using the software package Image Master 2D Platinum Version 5.0 (Amersham Biosciences). Protein spots were detected using an automated procedure from the software combined with manual editing to remove artefacts. A reference gel was developed using 200µg of total protein from a pool of all sample protein extracts in order to represent all the proteins they expressed, and against which all the remaining gels were matched using standard routines from the software. After the matching procedure, all protein spots were assigned a spot number from the reference gel. Individual protein spot abundance was determined by the area of the spot, multiplied by the density and referred to as the volume. The spot volumes were normalized to the total volume of all proteins detected on each gel. The normalized spot volume is described as the abundance of a particular protein spot. Data were subsequently analyzed using two-way ANOVA. The level of significance of difference was set at $P < 0.05$.

Protein identification by peptide mass mapping

For protein identification, proteins resolved by 2D-PAGE were detected using silver staining compatible with protein mass spectrometry identification, as described by Yan et al. [63] and Coomassie Blue G250 [64]. Sample loading was increased from 150µg to 600µg. Proteins of interest were excised from the stained gel and subjected to in-gel trypsin digestion, as described by Com et al. [65]. The eluted peptides were subsequently analyzed by mass

fingerprinting in a Matrix-assisted laser desorption time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For protein identification, trypsin peptide masses were used to search the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant sequences database using the MASCOT search program [66]. To utilize the EST nucleotide sequences now available for salmonid fish (108,000 sequences), the trypsin digest products were searched for in a database containing all fish cDNA sequences available (last update September 2006).

Authors' contribution

CIK performed sample preparation, microarray hybridizations, bidimensional-electrophoresis, integrated the data and drafted the manuscript. GP contributed to the proteome analysis. MB performed quantitative RT-PCR. DE produced the microarrays. MS participated to statistical analysis. FL supervised the proteome analysis. FM supervised the whole study, conceived the experimental design, formulated diets and participated in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Authors would like to thank the technical staff of the INRA experimental facilities PEIMA (Drennec, Sizun, Finistère, France). We acknowledge A. Le Cam, J. Montfort and G. Guernec from INRA-SCRIBE genomics facility (Rennes, France) for excellent technical assistance, the SIGENAE team (INRA Toulouse, France) and P. Bardou for development of bioinformatic tools and assistance. We also thank the Proteomics core facility at OUEST-genopole (Rennes, France), Dr. Nathalie Guitton for valuable technical assistance in 2D electrophoresis and D. Raine for revision of the English text. The first author received a fellowship from the "Institut National de la Recherche Agronomique" (INRA) and the Aquitaine region. This work was supported by funds from the French national program AGENOP (contract no. A02483, Systematic Analysis of Rainbow Trout Genome) and the 6th PCRD [European Project, contract no. 016249-2, Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers (AQUAMAX)].

References

1. Sowers JR: **Obesity and cardiovascular disease.** *Clin Chem* 1998, **44**:1821-1825.
2. Robb DHF, Kestin SC, Warriss PD, Nute GR: **Muscle lipid content determines the eating quality of smoked and cooked Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Aquaculture* 2002, **205**:345–358.
3. Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR, Enser M: **Effects of fatty acids on meat quality: a review.** *Meat Sci* 2003, **66**:21–32.
4. Pérusse L, Bouchard C: **Gene-diet interactions in obesity.** *Am J Clin Nutr* 2000, **72**:1285S-1290S.
5. Henderson RJ, Sargent J: **Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets differing in lipid content.** *Comp Biochem Physiol* 1981 **69(C)**:31–37.
6. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG: **Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis.** *Physiol Rev* 1995, **75**:47-76.
7. Schwarz JM, Neese RA, Turner S, Dare D, Hellerstein MK: **Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection.** *J Clin Invest* 1995, **96**:2735–2743.
8. Rollin X, Médale F, Gutierres S, Blanc D, Kaushik SJ: **Short- and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Br J Nutr* 2003, **89**:803-810.
9. Clarke SD, Hembree J: **Inhibition of triiodothyronine's induction of rat liver lipogenic enzymes by dietary fat.** *J Nutr* 1990, **120**:625–630.

10. Gélinau A, Corraze G, Boujard T, Larroquet L, Kaushik S: **Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout.** *Reprod Nutr Dev* 2001, **41**:487-503.
11. Kim S, Sohn I, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS: **Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model.** *Gene* 2004, **340**:99-109.
12. Berge RK, Nilsson A, Husoy AM: **Rapid stimulation of liver palmitoyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase and glycerophosphate acyltransferase compared to peroxisomal β -oxidation and palmitoyl-CoA hydrolase in rats fed high fat diets.** *Biochim Biophys Acta* 1988, **960**:417-426.
13. Thomassen MS, Christiansen EN, Norum KR: **Characterization of the stimulatory effect of high fat diets on peroxisomal β -oxidation in rat liver.** *Biochem J* 1982, **206**:195-202.
14. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, Christian B: **Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription.** *Chem Phys Lipids* 2008, **153**:3-13.
15. Bouchard C, Tremblay A: **Genetic influences on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins.** *J Nutr* 1997, **127**:943S-947S.
16. Hetzer HO, Miller LR: **Selection for high and low fatness in swine: correlated responses of various carcass traits.** *J Anim Sci* 1973, **37**:1298-1301.
17. Hermier D: **Lipoprotein metabolism and fattening in poultry.** *J Nutr* 1997, **127**:805S-808S.
18. Solini A, Bonora E, Bonadonna R, Castellino P, DeFronzo RA: **Protein metabolism in human obesity: Relationship with glucose and lipid metabolism and with visceral adipose tissue.** *J Clin Endocrinol Metab* 1997, **82**:2552–2558.

19. Mekki N, Christophilis MA, Charbonnier M, Atlan-Gepner C, Defoort C, Juhel C, Borel P, Portugal H, Pauli AM, Vialettes B, Lairon D: **Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**:184-191.
20. Wajchenberg BL: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.** *Endocrine Reviews* 2000; **21**:697–738.
21. Garbis S, Lubec G, Fountoulakis M: **Limitations of current proteomics technologies.** *J. Chromatogr.* 2005, **1077(A)**:1-18.
22. Duplus E, Glorian M, Forest C: **Fatty acid regulation of gene transcription.** *J Biol Chem* 2000, **275**:30749–30752.
23. Heuckeroth RO, Birkenmeier EH, Levin MS, Gordon JI: **Analysis of the tissue specific expression, developmental regulation and linkage relationships of a rodent gene encoding heart fatty acid binding protein.** *J Biol Chem* 1987, **282**:9709-9717.
24. Baba K, Takahashi Y, Aoyagi Y, Odani S: **The amino acid sequence of a lamprey (*Entosphenus japonicus*) liver fatty acid-binding protein identified its close relationship to cardiac fatty acid-binding proteins of Mammalia.** *Comp Biochem Phys B Biochem Mol Biol* 1999, **123**:223–228.
25. Bain LJ: **cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*).** *Mar Environ Res* 2002, **54**:379-383.
26. Liu RZ, Denovan-Wright EM, Wright JM: **Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding gene (fabp3) from zebrafish (*Danio rerio*).** *Eur J Biochem* 2003, **270**:3223-3234.
27. Hertzell AV, Bernlohr DA: **The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function.** *Trends Endocrinol Metab* 2000, **11**:175-180.

28. Haunerland NH, Spener F: **Fatty acid-binding proteins – insights from genetic manipulations.** *Prog Lipid Res* 2004, **43**:328-349.
29. Jordal AEO, Hordvik I, Pelsers M, Bernlohr DA, Torstensen BE: **FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)- General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations.** *Comp Biochem Physiol* 2006, **145(B)**:147-158.
30. Kolditz C, Borthaire M, Richard N, Corraze G, Panserat S, Vachot C, Lefèvre F, Médale F: **Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, **294**:R1154-R1164.
31. Rasmussen JT, Borchers T, Knudsen J: **Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters.** *Biochem J* 1990, **265**:849-855.
32. Gaigg B, Neergaard TBF, Schneiter R, Hansen JK, Færgeman NJ, Jensen NA, Andersen JR, Friis J, Sandhoff R, Schröder HD, Knudsen J: **Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:1147–1160.
33. Sandberg MB, Bloksgaard M, Duran-Sandoval D, Duval C, Staels B, Mandrup S: **The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor α in hepatocytes.** *J Biol Chem* 2005, **280**:5258-5266.
34. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N: **Dual regulation of mouse Δ^5 - and Δ^6 -desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR α .** *J Lipid Res* 2002, **43**:107-114.

35. Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD: **Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase.** *J Biol Chem* 1999, **274**:471–477.
36. Seiliez I, Panserat S, Kaushik S, Bergot P: **Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Δ 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout.** *Comp Biochem Physiol* 2001, **130(B)**:83-93.
37. Zheng XZ, Tocher DR, Dickson CA, Bell JG, Teale AJ: **Effects of diets containing vegetable oils on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Aquaculture* 2004, **236**:467-483.
38. Jordal AEO, Tortensen BE, Tsoi S, Tocher DR, Lall SP, Douglas SE: **Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *J Nutr* 2005, **135**:2355-2361.
39. Nanji AA, Griniuviene B, Sadrzadeh SMH, Levitsky S, McCullyf JD: **Effect of type of dietary fat and ethanol on antioxidant enzyme mRNA induction in rat liver.** *J Lipid Res* 1995, **36**:736-744.
40. Van den Thillart G: **Energy metabolism of swimming trout (*S. gairdneri*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate.** *J Comp Physiol* 1986, **156(B)**:511-520.
41. Dabrowski K, Guderley H: **Intermediary metabolism.** In *Fish Nutrition*. Edited by Halver JE, Hardy RW. San Diego: Academic Press; 2002:309-365.
42. Takeuchi T, Watanabe T, Ogino C: **Optimum ratio of dietary energy to protein for rainbow trout.** *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1978, **44**:729–732.
43. Hillestad M, Johnsen F: **High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality.** *Aquaculture* 1994, **124**:109–116.

44. Nestel PJ, Connor WE, Reardon MR, Connor S, Wong S, Boston R: **Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man.** *J Clin Invest* 1984, **74**:72-89.
45. Kersten S, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B, Wahli W: **The peroxisome proliferator receptor α regulates amino acid metabolism.** *FASEB J* 2001, **15**:1971-1978.
46. Edvardsson U, Brockenhuus Von Löwenhielm H, Panfilov O, Nyström AC, Nilsson F, Dahllöf B: **Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators.** *Proteomics* 2003, **3**:468-478.
47. Sheikh K, Camejo G, Lanne B, Halvarsson T, Landergrén MR, Oakes ND: **Beyond lipids, pharmacological PPAR α activation has important effects on amino-acid metabolism as studied in the rat.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **292**:E1157-E1165.
48. **INRA-GADIE Biologicals Resources Centre home page** [<http://w3.jouy.inra.fr/unites/lreg/CRB/BRC/index.html>]
49. Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y: **Generation of a large scale repertoire of expressed sequences tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries.** *BMC Genomics* 2006, **7**:196-203.
50. **Gene Expression Omnibus home page** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]
51. Cathelin R, Lopez F, Klopp C: **AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the Image J library.** *Bioinformatics* 2007, **23**:247-248.
52. **SIGENAE home page** [<http://www.sigenae.org/>]
53. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabat N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.** *Biotechniques* 2003, **34**:374-378.

54. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Nat Acad Sci* 2001, **98**:5116-5121.
55. Aegerter S, Baron D, Carpentier C, Chauvigne F, Dantec C, Estampes A, Goupil AS, Jumel A, Jutel I, Mazurais D, Melaine N, Montfort J, Bobe J, Chardon P, Chevalet C, Fauconneau B, Fostier A, Govoroun M, Le Cam A, Le Gac F, Klopp C, Panserat S, Piumi F, Rallièrè C, Rescan PY, Guiguen Y: **The INRA AGENAE program and the Agenae trout EST collections: first results applied to fish physiology research.** *Comp Biochem Physiol* 2004, **137(A)**:135-141.
56. Rexroad CE, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B, Gahr SA, Palti Y, Quackenbush J: **Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index.** *Cytogenet Genome Res* 2003, **102**:347-354.
57. Gish W, States DJ: **Identification of protein coding regions by database similarity search.** *Nat Genet* 1993, **3**:266-272.
58. **The Swiss-Prot database** [<http://www.expasy.org/sprot/>]
59. **GoMiner software home page** [<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>]
60. Olsvik P, Lie K, Jordal A, Nilsen T, Hordvik I: **Evaluation of potential reference genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon.** *BMC Mol Biol* 2005, **17**:6-21.
61. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:2002–2007.
62. Heukeshoven J, Dernick R: **Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.** *Electrophoresis* 1985, **6**:103–112.
63. Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ: **A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-**

assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000, **21**:3666-3672.

64. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: **Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis* 2004, **25**:1327-1333.

65. Com E, Evrard B, Roepstorff P, Aubry F, Pineau C: **New insights into the rat spermatogonial proteome: identification of 156 additional proteins.** *Mol Cell Proteomics* 2003, **2**:248-261.

66. **MASCOT search program home page** [<http://www.matrixscience.com>].

Figure legends

Figure 1. Mean-centered, unit-normalized transcript levels of metabolism-related genes exhibiting significant line/diet interactions in the microarray experiment.

g6pd, glucose 6-phosphate dehydrogenase; *Acs15*, long-chain acyl-CoA synthetase 5; *lipg*, endothelial lipase; *ndufs8*, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8; *uqcrfs1*, cytochrome b-c1 complex subunit; *gk*, glucokinase; *usp5*, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5; *psme2*, Proteasome activator complex subunit 2; *psmd1*, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1; *Sbp2*, selenium-binding protein 2. Data are presented as means of 6 samples \pm SD. * P < 0.01.

Figure 2. Representative two-dimensional gel electrophoresis of rainbow trout liver proteins. Total liver protein extract (150 μ g) was separated first by IEF on 3-10 non-linear IPG drystrips, and then SDS-PAGE was performed on 12.5% polyacrylamide gel. The proteins were revealed by silver staining as described by Heukeshoiven and Dernick (1985). Differentially abundant proteins positively identified by trypsin digest fingerprinting are located by arrows, with their corresponding identity and spot ID.

Tables

Table 1. Fish growth, morphological and biochemical parameters, and whole body and muscle lipid content

Diet	L line		F line		Diet	p-values	
	LE	HE	LE	HE		Line	Line*Diet
Daily Growth index (% day ⁻¹)	2.57 ± 0.04	2.67 ± 0.05	2.37 ± 0.01	2.52 ± 0.03	<i>p=0.011</i>	<i>p=0.043</i>	p=0.64
Final body weight (g)	73.0 ± 2.9	92.4 ± 2.9	57.8 ± 2.0	77.4 ± 2.5	<i>p=10⁻⁴</i>	<i>p=10⁻⁴</i>	p=0.66
Whole body lipid content (% WW)	9.5 ± 0.2	15.3 ± 1.1	10.8 ± 0.5	15.2 ± 1.0	<i>p=10⁻⁴</i>	p=0.27	p=0.16
HSI (%)	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	p=0.14	p=0.99	p=0.33
VSI (%)	8.3 ± 0.8 ^c	12.4 ± 1.3 ^a	7.7 ± 0.9 ^c	11.0 ± 1.9 ^b	<i>p=10⁻⁴</i>	<i>p=10⁻⁴</i>	<i>p=0.003</i>
Muscle lipid content (% WW)	4.3 ± 0.8 ^c	6.4 ± 1.2 ^b	6.3 ± 1.2 ^b	10.1 ± 2.3 ^a	<i>p<10⁻⁴</i>	<i>p<10⁻⁴</i>	<i>p=0.003</i>
Plasma triglycerides (g/l)	5.52 ± 0.77	4.38 ± 1.31	5.74 ± 0.84	4.83 ± 1.31	<i>p<10⁻⁴</i>	<i>p=0.03</i>	p=0.47
Plasma glucose (mg/l)	81.42 ± 6.68	80.90 ± 5.61	81.34 ± 6.16	81.01 ± 5.71	p=0.61	p=0.97	p=0.91

% WW, percentage of wet weight. Values are expressed as means ± SD (n=57 individuals in all groups, except for muscle lipid content, for which n=30); HIS, hepato-somatic index; VSI, Viscero-somatic index; p-values are presented in italics when the differences are significant (p<0.05, MANOVA 2 factors). Means with different superscript letters are significantly different (p<0.05, ANOVA).

Table 2. Overview of transcripts in livers of rainbow trout significantly affected by the dietary treatment (HE vs LE diet)¹

Statistical analysis	ANOVA (p<0.01)	SAM FDR≤0.15	ANOVA∩SAM
Total	165	111	106
HE> LE	37	8	8
HE< LE	128	103	98
Number of transcripts with known biological function	132	87	83
Biological function			
Metabolism	52 (39.4%)	38 (43.7 %)	37 (44.6%)
<i>Lipid</i>	19 (14.4%)	15 (17.2 %)	15 (18.1%)
<i>Energy</i>	7 (5.3%)	5 (5.7%)	5 (6.0%)
<i>Carbohydrate</i>	1 (<1%)	1 (1.1%)	1 (1.2%)
<i>Amino acid and derivative</i>	5 (3.8%)	3 (3.4%)	3 (3.6%)
<i>Protein folding/synthesis/breakdown</i>	11 (8.3%)	6 (6.9%)	6 (7.2%)
<i>Xenobiotic and oxidant metabolism</i>	5 (3.8%)	4 (4.6%)	4 (4.8%)
<i>Purine and pyrimidine</i>	4 (3%)	4 (4.6%)	3 (3.6%)
Transcription/translation	21 (15.9%)	13 (15.1%)	12 (14.5%)
Cell cycle	13 (9.8%)	6 (6.9%)	6 (7.2%)
Trafficking	9 (6.8%)	6 (6.9%)	6 (7.2%)
Signal transduction	8 (6.1%)	7 (8.0%)	7 (8.4%)
Extracellular matrix and structural components	6 (4.5%)	5 (5.7%)	5 (6%)
Immune and stress response	6 (4.5%)	5 (5.7%)	4 (4.8%)
Others	17 (12.9%)	7 (8.0%)	6 (7.2%)

¹ According to ANOVA (p< 0.01), SAM analysis (FDR < 0.15) and both statistical methods

Table 3. Metabolism-related hepatic transcripts exhibiting differential expression between the two dietary groups (HE vs LE)¹

<i>Biological function</i>		HE/LE ratio		ANOVA	SAM
		L line	F line	P-value	FDR cut off
GenBank Acc.	Best-hit Swiss-Prot description				
<i>Lipid metabolism (40.5%)</i>					
CA344881	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor	-1.3	-1.4	<5.10 ⁻⁴	0
BX885839	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (ACAT2)	-1.5	-2.1	<10 ⁻³	0
BX861803	Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein (PIG-F)	-1.3	-1.2	0.003	0.1
BX080468	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7 precursor	-1.3	-1.1	0.004	0.15
<i>Fatty acid desaturation (2.7%)</i>					
CA371783	putative delta-6 fatty acid desaturase (Δ 6-FAD)	-1.9	-2.0	0.005	0.05
<i>Lipid transport (10.8%)</i>					
CU069821	Acetyl coenzyme A binding protein (ACBP)	-2.1	-1.9	<5.10 ⁻⁵	0
BX078901	Vitellogenin precursor (VTG)	-1.2	-1.4	<10 ⁻³	0.05
CU069693	Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP)	-1.4	-1.5	<10 ⁻³	0
BX298066	Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP)	-1.6	-1.5	0.004	0.05
<i>Cholesterol metabolism (16.2%)</i>					
BX875391	Probable ergosterol biosynthetic protein 28 (ERG28)	-1.8	-2.3	<5.10 ⁻⁶	0
CU069450	24-dehydrocholesterol reductase precursor (DHC24)	-1.8	-2.7	<5.10 ⁻⁴	0
CA344888	Retinol dehydrogenase 12 (RDH12)	-1.2	-2.0	0.003	0.05
CA382526	Orphan nuclear receptor NR1D2 (Rev-erb β)	-1.2	-1.2	0.004	0.15
CA377380	C-4 methylsterol oxidase (ERG25)	-1.2	1.5	0.006	0.1
CU069541	Cholesteryl ester transfer protein precursor (CETP)	-1.4	-1.2	0.006	0.15
<i>Generation of precursor metabolites and energy (13.5%)</i>					
BX084640	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (6-PGD)	-1.4	-2.2	<5.10 ⁻⁴	0
BX080843	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 9.5 kDa protein	-1.4	-1.3	<5.10 ⁻⁴	0
BX886412	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (ATPA)	-1.1	-1.4	0.001	0.1
CA377924	Vacuolar ATP synthase subunit δ (V-ATPase δ subunit)	-1.2	-1.4	0.002	0.05
CU067427	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	-1.2	-1.1	0.008	0.15
<i>Carbohydrate metabolism (2.7%)</i>					
CA383037	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11	-1.7	-1.6	<10 ⁻⁴	0
<i>Amino-acid derivative metabolism (8.1%)</i>					
CU068986	Acetylcholinesterase precursor (EC 3.1.1.7) (AChE)	-1.7	-1.7	<5.10 ⁻⁴	0
CU070780	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH)	-1.4	-1.2	0.002	0.05
CU067302	Cystathionine gamma-lyase (CGL)	-1.4	-1.0	0.008	0.15

Table 3. (continued)

<i>Biological function</i>		HE/LE ratio		ANOVA	SAM
GenBank Acc. N°	Best-hit Swiss-Prot description	L line	F line	P-value	FDR cut of
<i>Protein folding/synthesis/breakdown (16.2%)</i>					
CU072931	Tripeptidyl-peptidase 2	-1.3	-1.7	<10 ⁻⁴	0
CA362332	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (UB2E1)	-1.3	-1.3	0.002	0.15
CU068585	STIP1 homology and U box-containing protein 1	-1.4	-1.5	0.003	0.05
BX307921	McKusick-Kaufman/Bardet-Biedl syndromes putative chaperonin	-1.2	-1.4	0.005	0.15
CA342952	Proteasome subunit beta type 7 precursor (PSB7)	-1.2	-1.1	0.01	0.15
CU066852	F-box/WD repeat protein 2	-1.4	-1.1	0.03	0.1
<i>Xenobiotic and oxidant metabolism (10.8%)</i>					
CU070243	Peptide methionine sulfoxide reductase	-1.3	-1.3	10 ⁻³	0.05
CU071592	Cytochrome P450 2J2 (Arachidonic acid epoxygenase)	1.9	2.2	0.003	0.1
BX081745	Matrix metalloproteinase-16 precursor	1.9	1.6	0.003	0.15
BX308633	Stress-activated protein kinase 3 (MK12)	-1.2	-1.3	0.008	0.15
<i>Purine metabolism (8.1%)</i>					
CU073027	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	-1.3	-1.1	<10 ⁻³	0.05
CA363765	Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	-1.3	-1.2	<10 ⁻⁴	0.05
CA371563	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	2.6	3.9	0.001	0.05

¹ According to both ANOVA (p<0.01) and SAM (FDR<0.15) analysis

Table 4. Overview of hepatic transcripts exhibiting differential expression between the two genotypes (F vs L)¹

Statistical analysis	ANOVA (p<0.01)	SAM FDR≤0.15	ANOVA∩SAM
Total	154	77	70
F > L	90	65	58
F < L	64	12	12
Transcripts with known biological function	127	64	58
Biological function			
Metabolism	47 (37.0%)	30 (46.7%)	27 (46.6 %)
<i>Lipid</i>	(4.67%)	2 (3.1%)	2 (3.4 %)
<i>Precursor metabolites and energy</i>	7 (5.5%)	6 (9.4%)	5 (8.6%)
<i>Carbohydrate</i>	2 (1.6%)	1 (1.6%)	1 (1.7%)
<i>Amino acid and derivative</i>	9 (7.1%)	6 (9.4%)	5 (8.6 %)
<i>Protein folding/synthesis/breakdown</i>	11 (8.7%)	6 (9.4%)	5 (8.6%)
<i>Xenobiotic and oxidant</i>	7 (5.5%)	6 (9.4%)	6 (10.3%)
<i>Purine and pyrimidine</i>	3 (2.4%)	3 (4.7%)	2 (3.4%)
<i>Iron</i>	2 (1.6%)	1 (1.6%)	1 (1.7%)
Transcription/translation	19 (15.0%)	3 (4.7%)	2 (3.4%)
Immune response	7 (5.5%)	5 (7.8%)	5 (8.6%)
Trafficking	11 (8.7%)	5 (7.8%)	5 (8.6%)
Signal transduction	7 (5.5%)	3 (4.7%)	3 (5.2%)
Cell cycle	9 (7.1%)	5 (7.8%)	4 (6.9%)
Extracellular matrix and structural components	9 (7.1%)	3 (4.7%)	2 (3.4%)
Others	18 (14.2%)	10 (15.6%)	10 (17.2%)

¹ According to ANOVA (p< 0.01), SAM analysis (FDR < 0.15) and both statistical methods

Table 5. Hepatic transcripts exhibiting differential expression between the two genotypes (F vs L)¹

<i>Biological function</i>		F/L ratio		ANOVA	SAM
GenBank Acc. N°	Best-hit Swiss-Prot description	LE diet	HE diet	P-value	FDR cut off
<i>Lipid metabolism (7.4%)</i>					
BX857103	Ceramide kinase	-1.6	-2.8	<10 ⁻³	0.1
CA376046	Nonspecific lipid-transfer protein (NLTP)	1.4	1.1	10 ⁻³	0.1
<i>Generation of precursor metabolites and energy (18.5%)</i>					
CA366638	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1.8	1.5	<5.10 ⁻⁴	0
CA342644	6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)	2.0	1.3	0.002	0.15
BX860760	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2.0	1.9	0.003	0
CA351158	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (MDH)	1.4	1.2	0.003	0.1
BX301878	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	1.6	1.4	0.006	0.1
<i>Carbohydrate metabolism (3.7%)</i>					
BX306300	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D	1.3	1.5	0.008	0.15
<i>Amino-acid derivative metabolism (18.5%)</i>					
CA343008	Betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT)	1.5	1.2	<5.10 ⁻⁴	0
BX076291	Aspartate aminotransferase, mitochondrial (GOT2)	1.6	1.2	10 ⁻³	0.1
CA353510	Aspartate aminotransferase, mitochondrial (GOT2)	1.1	1.2	0.004	0.15
CA345122	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial (GABT)	1.4	1.1	0.004	0.15
CA365793	Histone H3-K9 methyltransferase 4	1.3	1.2	0.006	0.15
<i>Protein folding/synthesis/breakdown (18.5%)</i>					
CA345680	Calpain-9	1.3	1.1	<5.10 ⁻⁴	0.15
CA362332	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (UB2E1)	1.3	1.4	<10 ⁻³	0.1
CA351453	α -1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	1.3	1.2	<10 ⁻³	0.1
CA342952	Proteasome subunit beta type 7 precursor (PSB7)	1.6	1.5	0.002	0.1
BX302854	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	1.5	1.6	0.003	0.1
<i>Xenobiotic and oxidant (22.2%)</i>					
CA359966	UDP-glucuronosyltransferase 2A1 precursor	1.3	1.6	<5.10 ⁻⁴	0
BX302905	Metal-regulatory transcription factor 1	1.2	1.4	0.003	0.1
CA387417	Stress-activated protein kinase 3 (MK12)	1.5	1.3	0.004	0.15
BX078145	7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase	1.8	1.0	0.004	0.15
BX305962	ATP-binding cassette sub-family G member 2	1.5	1.6	0.007	0.1
BX299516	Cytochrome P450 2K4	1.3	1.2	0.007	0.15
<i>Purine and pyrimidine metabolism (15%)</i>					
BX295336	Nucleoside diphosphate kinase A	-1.3	-1.1	<5.10 ⁻⁴	0.15
CA381176	Equilibrative nucleoside transporter 1	-1.4	-1.4	<10 ⁻³	0.15
<i>Iron metabolism (3.7%)</i>					
BX909008	Transferrin receptor protein 1	-1.6	-1.4	0.005	0.15

1 According to both ANOVA ($p < 0.01$) and SAM ($FDR < 0.15$) analysis

Table 6. Chemical composition of experimental diets

Diets	LE	HE
DM (%)	93.0	93.3
Protein (% DM)	57.6	51.1
Lipid (% DM)	9.8	23.1
n-3 FA / n-6 FA	1.5	2.5
Starch (% DM)	12.1	9.2
Energy (kJ/g DM)	21.0	23.8

DM, Dry Matter; FA, Fatty acids

Additional files

Additional file 1

File format: XLS

Title: Transcripts exhibiting differential expression between the two dietary treatments (HE vs LE)

Description: The data provided represent the complete list of transcripts exhibiting differential expression between the two dietary treatments (HE vs LE) derived from each statistical method (ANOVA, $p < 0.01$ and SAM, FDR cut-off=0,15)

Additional file 2

File format: XLS

Title: Transcripts exhibiting differential expression between the two genetic lines (F vs L)

Description: The data provided represent the complete list of transcripts exhibiting differential expression between the two lines (F vs L) derived from each statistical method (ANOVA, $p < 0.01$ and SAM, FDR cut-off=0,15)

Additional file 3

File format: DOC

Title: Hepatic mRNA level of selected genes measured by RT-PCR (controls of the microarray data)

Description: mRNA levels of delta-6-desaturase, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, malate dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase and glucokinase in the liver of trout of both lines fed the diet LE or HE. Expression values (arbitrary units) are normalized with α -elongation factor 1 (EF1 α)-expressed transcripts.

Additional file 4

File format: DOC

Title: Hepatic proteins exhibiting differential expression between the experimental groups

Description: The data provided represent the complete list of liver proteins exhibiting differential expression according to two-way ANOVA ($p < 0.05$), and positively identified by trypsin digest fingerprinting.

Additional file 5

File format: DOC

Title: Accession numbers and primer sequences of genes selected for analysis by real time RT-PCR

Description: Reverse and forward primer sequences and annealing temperature used to measure expression of 8 selected genes by real time RT-PCR.

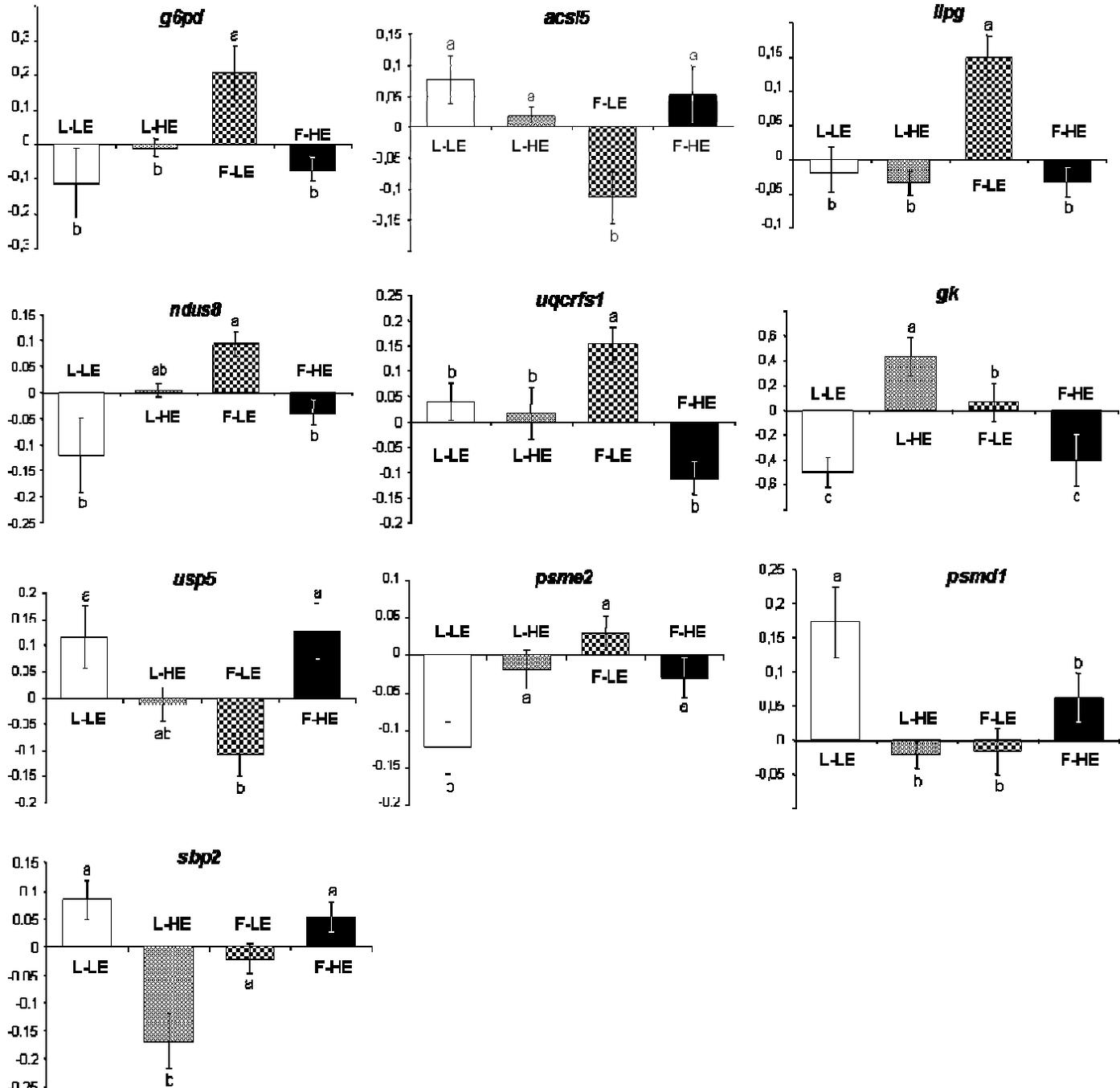


Figure 1

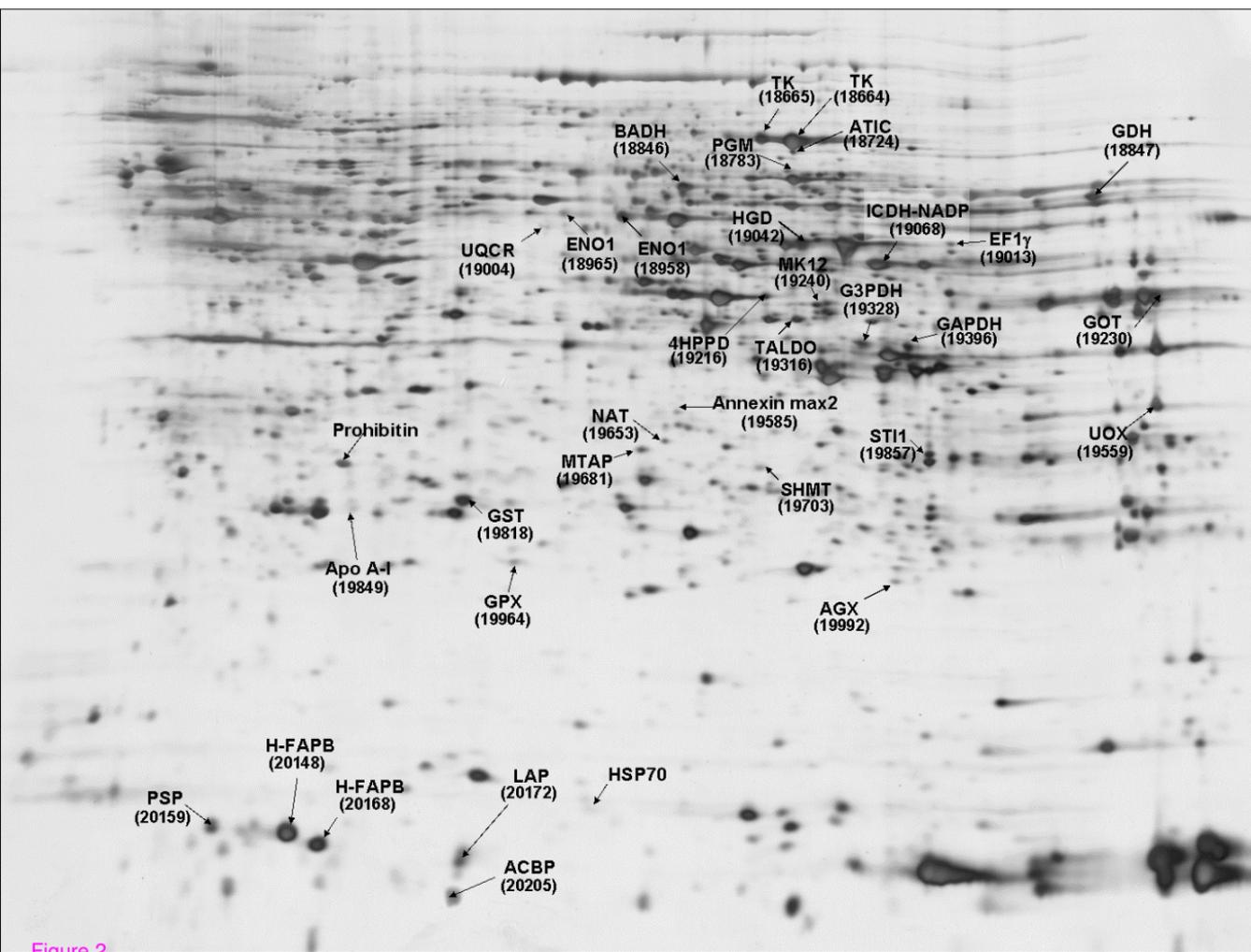


Figure 2

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: add file 1 - kolditz et al.xls, 170K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/3952912812301941/supp1.xls>

Additional file 2: add file 2 - kolditz et al.xls, 167K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1969846023019418/supp2.xls>

Additional file 3: add file 3 - kolditz et al .doc, 52K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/2012051735230195/supp3.doc>

Additional file 4: add file 4 - kolditz et al.doc, 128K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1275837267230195/supp4.doc>

Additional file 5: add file 5 - kolditz et al.doc, 40K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1681120526230195/supp5.doc>

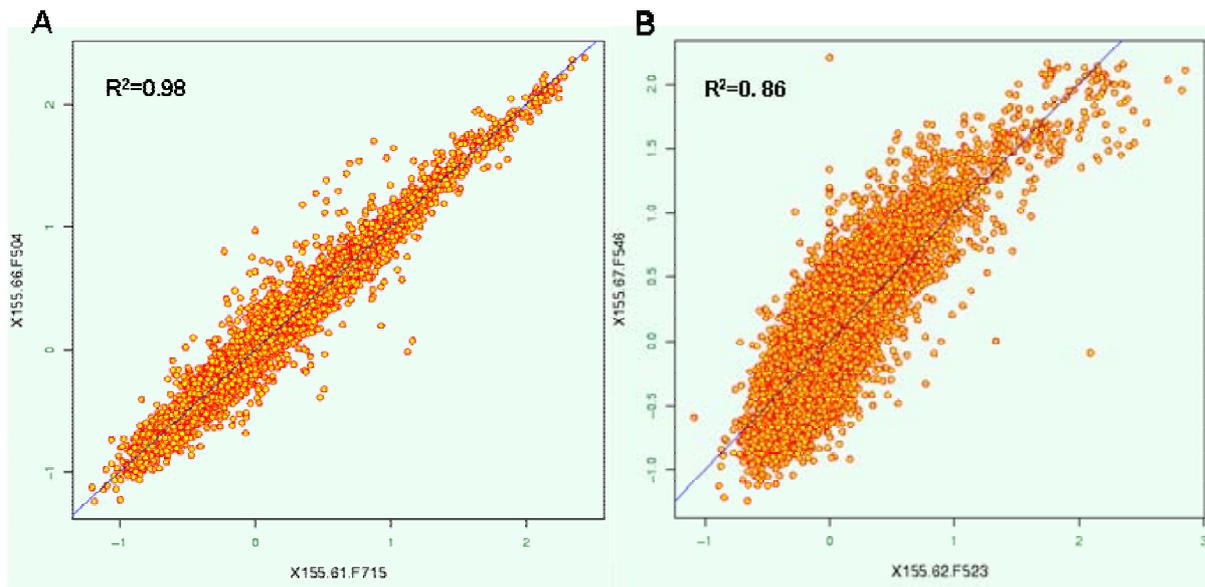


Figure III-6: Représentation graphique de l'homogénéité d'hybridation entre membranes (dot plot); A : qualité d'hybridation satisfaisante ; **B :** qualité d'hybridation insuffisante de la membrane 67, faiblement hybridée (échantillon F-HE)

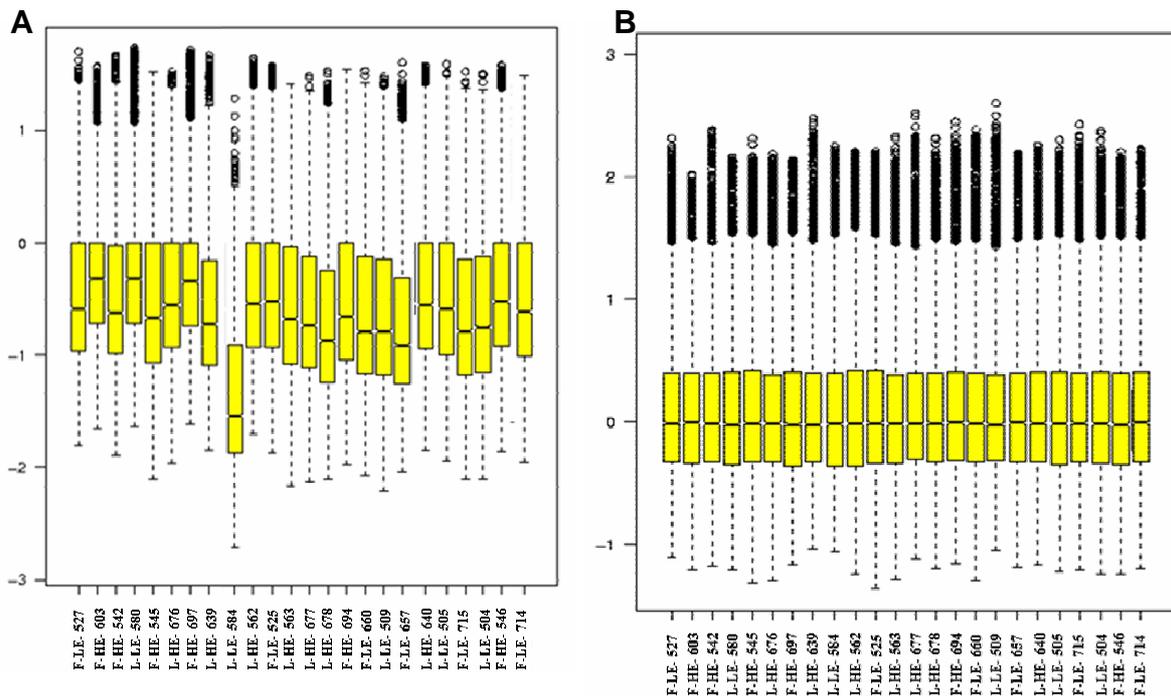


Figure III-7: Répartition des signaux log-transformés pour chaque hybridation (box plot) avant (A) et après normalisation (B).

III-2.1 Critères de choix et de traitement des données

Avant de décrire brièvement les principaux résultats issus de l'analyse du transcriptome et du protéome hépatique, il m'a semblé important de détailler certains aspects du traitement des données qui n'ont pas été évoqués dans l'article issu de ces travaux.

III-2.1.1 Analyse du transcriptome hépatique

III-2.1.1.1 Contrôle de la qualité des membranes

La comparaison deux à deux des valeurs d'intensité des signaux obtenus pour chaque membrane à l'issue de l'hybridation des cibles complexes a permis d'identifier des membranes pour lesquelles la qualité de l'hybridation était insuffisante pour l'analyse des données (exemple en figure III-6B). Etaient concernées tout particulièrement une membrane correspondant à l'hybridation d'un échantillon F-LE, 2 membranes correspondant aux hybridations d'échantillons L-LE et 2 membranes correspondant aux hybridations d'échantillons F-HE. Ces membranes ont donc été écartées des analyses. Afin d'éviter tout biais lié à une hétérogénéité de représentation des différentes conditions expérimentales, nous avons choisi d'homogénéiser le nombre de membranes en ne conservant que 6 membranes par conditions pour la suite des analyses. La figure III-7 représente, pour chacune des 24 membranes retenues, les boîtes à moustaches (ou box plot) des données brutes avant et après normalisation par la médiane de chaque membrane. D'après ce graphique, la moyenne des signaux est proche de zéro suite à la normalisation, ce qui montre que la méthode choisie pour la normalisation est efficace.

Tableau III-2: Analyse du transcriptome hépatique : nombre de gènes sélectionnés et de faux positifs potentiels en fonction du test statistique et les ajustements utilisés.

tests statistiques et ajustements	Nombre de gènes significatifs (nombre de faux positifs potentiels)		
	Régime (R)	Sélection (S)	Interactions R*S
ANOVA ($\alpha=0,01$) sans correction	165 (77)	154 (77)	26 (26)
Bonferroni ($\alpha=0,01$)	1 (0)	0	0
Bonferroni ($\alpha=0,05$)	7 (0)	1 (0)	0
Benjamini-Hochberg (FDR=0,01)	14 (1)	0	0
Benjamini-Hochberg (FDR=0,05)	30 (2)	1 (0)	0
SAM (FDR=0)	40 (0)	9 (0)	ND
SAM (FDR<0,05)	58 (3)	9 (0)	ND
SAM (FDR<0,10)	71 (7)	38 (4)	ND
SAM (FDR<0,15)	111 (17)	77 (12)	ND
SAM (FDR<0,20)	122 (24)	103 (20)	ND

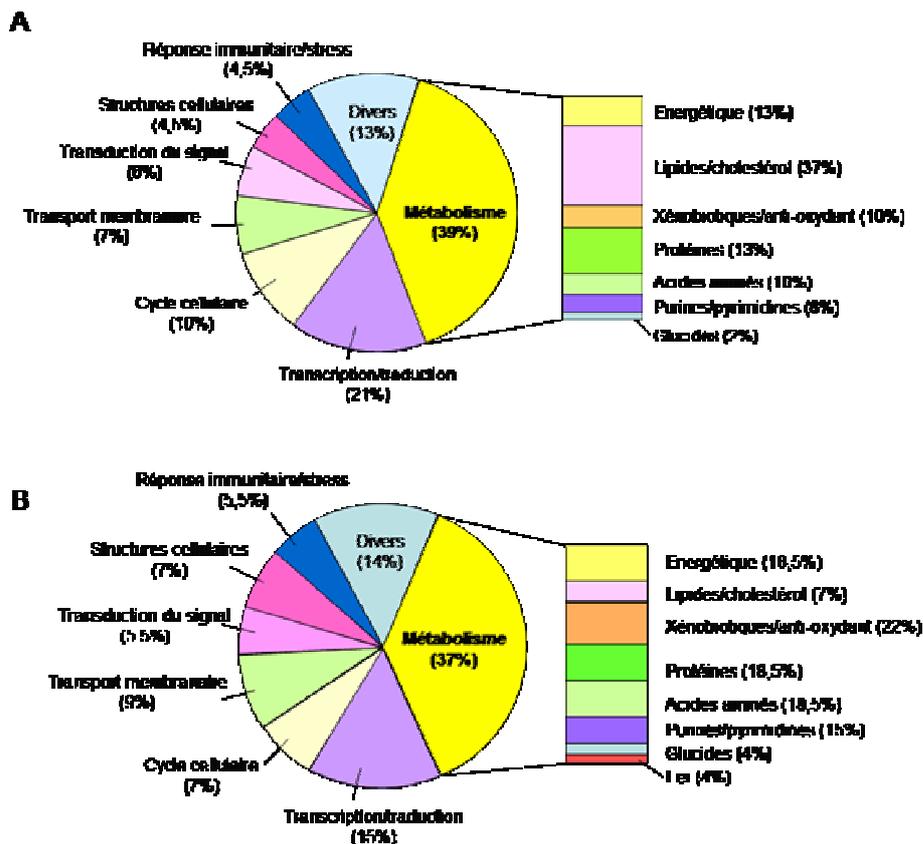


Figure III-8: Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'ANOVA ($\alpha=0,01$, sans ajustement). A : effet du régime alimentaire ; B : effet de la sélection génétique.

III-2.1.1.2 Analyses statistiques des données : choix de l'approche utilisée

Sur le total de 9023 séquences qui ont été déposées sur les membranes, 7740 ont été retenues après filtrage des données d'après le signal oligo-vecteur (seuil fixé arbitrairement à 3 fois la valeur médiane des blancs présents sur chaque membrane). Les valeurs d'intensité de ces 7740 transcrits ont été soumises aux analyses statistiques suivantes, en utilisant 6 membranes par conditions expérimentales préalablement sélectionnées d'après leur qualité d'hybridation. Le nombre de gènes significatifs identifiés en fonction du test statistique utilisé (ANOVA ou SAM) et des ajustements pour la correction de la multiplicité des tests (sans ajustement, Bonferroni ou Benjamini-Hochberg) est présenté dans le tableau III-2.1. Les listes complètes des gènes identifiés par ces différentes méthodes comme ayant une expression modifiée par effet de l'alimentation d'une part, et de la sélection d'autre part, sont présentées en annexe (tableaux VII-1 et VII-2).

III-2.1.1.2.1 ANOVA sans ajustement

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

Sur les 7740 gènes analysés par ANOVA ($P < 0,01$), 165 présentent une expression différentielle significative entre régime : 37 sont surexprimés et 128 sous exprimés chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE. Sur ces 165 gènes différentiellement exprimés de façon significative, 132 ont une fonction biologique connue. Parmi ceux-ci, 52 (soit environ 39%) sont impliqués dans des voies métaboliques, 21 (16%) dans la régulation de la transcription ou de la traduction, 13 (10%) dans la régulation du cycle cellulaire, 9 (6%) dans le trafic membranaire, 8 (6%) dans la signalisation cellulaire, les autres gènes se répartissant dans des fonction cellulaires diverses (figure III-8A).

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

D'après l'ANOVA ($P < 0,01$) réalisée sur les 7740 gènes retenus pour l'analyse, 154 sont significativement exprimés de façon différentielle entre lignées, 90 étant surexprimés et 64 étant sous-exprimés chez les truites de la lignée F par rapport à celles de la lignée L. Sur ces 154 gènes, 127 ont une fonction biologique connue. Parmi ceux-ci, 47 (37%) sont impliqués dans des processus métaboliques, 19 (15%) dans la régulation de la transcription ou de la traduction, 11 (9%) dans la transduction de signaux cellulaires, les autres opérant dans des processus cellulaires divers (figure III-8B).

Etude des interactions régime x lignée

Vingt-six transcrits impliqués dans une interaction (régime x lignée) significative ont été identifiés. Sur ces 26 transcrits, 2 codent pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire, 8 pour des protéines opérant dans la régulation du cycle cellulaire, 4 pour des facteurs de transcription, et 10 correspondent à des enzymes impliquées dans des voies métaboliques. Parmi ces derniers figurent 4 gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (la glucose-6-phosphate déshydrogénase [G6PDH] et la lipase endothéliale [LIPE]), et dans le métabolisme énergétique mitochondrial (la NADH déshydrogénase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 [*ndus8*] et la sous-unité1 du complexe cytochrome b-c1 [*uqcrfs1*]) dont le niveau d'expression est significativement plus élevé chez les truites F-LE par rapport aux trois autres groupes. En revanche, l'expression de la synthétase d'acyl-CoA à chaîne longue ACSL5, impliquée dans l'activation des acides gras à longue chaîne, est diminuée de façon significative chez les truites F-LE. Le niveau de transcrit codant pour la glucokinase (GK), enzyme clé de la glycolyse hépatique, est significativement plus élevé chez les individus L-HE par rapport aux trois autres conditions expérimentales.

L'absence de correction pour la multiplicité des tests implique le risque d'obtenir un nombre élevé de faux positifs. *En effectuant une ANOVA en choisissant un risque de première espèce α de 0,01 pour les 7740 gènes retenus pour l'analyse, il faut s'attendre à ce que, parmi les gènes identifiés comme significativement exprimés de façon différentielle, 77 soient des faux positifs (sous l'hypothèse d'indépendance des données), soit près de la moitié des gènes identifiés comme étant différentiellement exprimés entre régimes ou entre lignées.*

Nous avons donc testé différentes méthodes de correction afin de limiter l'occurrence de faux positifs potentiels dans chaque liste de gènes.

III-2.1.1.2.2 ANOVA avec ajustement de Bonferroni

D'après la méthode de correction pour la multiplicité des tests de Bonferroni, choisir de prendre un risque global de première espèce (risque α) de 5 % sur un tel jeu de données revient à choisir un seuil corrigé α' de $6,5 \cdot 10^{-6}$ (cf chapitre II-6).

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

Sur les 7740 gènes analysés par ANOVA, 7 gènes sont significativement exprimés de façon différentielle entre les deux régimes HE et LE (tous sous-exprimés avec l'aliment HE par rapport à l'aliment LE). Parmi ces 7 gènes, un seul code pour une protéine impliquée dans une voie métabolique, celle de la biosynthèse du cholestérol (ergostérol biosynthetic protein 28, erg28). Les autres gènes se répartissent selon les catégories fonctionnelles suivantes: 2 transcrit impliqués dans le processus de signalisation cellulaire, 1 transcrit impliqué dans la régulation de la transcription (nucléoporeine NUP53), 1 dans le processus de cytolysse (perforine) et 2 n'ont pas d'homologie significative avec des gènes connus dans les banques de données (clones tcag0001.a.09 et tcag0001.b.03).

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

Un seul gène s'est révélé être différentiellement exprimé entre lignées à l'issue de l'ANOVA corrigée par la méthode de Bonferroni ($\alpha=0.05$). Ce gène, dont le niveau de transcrit était plus élevé dans la lignée F que dans la lignée L, correspond à celui de la perforine, protéine impliquée dans la cytolysse. Aucune interaction entre l'effet de l'aliment et de la sélection génétique sur l'expression des différents gènes testés n'a été mise en évidence par cette méthode.

Si une grande confiance peut être accordée à ces résultats, le faible nombre de gènes significativement différents en terme d'expression rend difficile l'interprétation biologique des effets observés. De façon générale, il est admis que l'ajustement de la p-value par la méthode de Bonferroni est beaucoup trop drastique pour la plupart des analyses du transcriptome.

La correction de Bonferroni est plutôt adaptée à des études visant à caractériser des gènes discriminants à l'origine du phénotype observé, avec le minimum de risque d'y trouver de faux positifs, mais en contrepartie un risque important d'omettre un grand nombre de gènes réellement différentiels. Cette correction ne prend en compte que le nombre de tests réalisés, et un gène considéré comme étant différentiellement exprimé par cette méthode sur un jeu de donnée de 1000 gènes ne le sera peut-être plus sur un jeu de données plus grand.

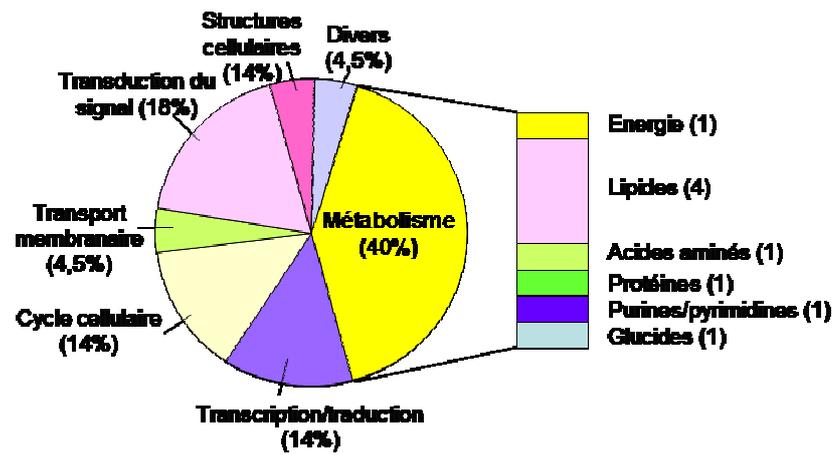


Figure III-9 : Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de la procédure de Benjamini-Hochberg ($\alpha'=0,05$): effet du régime alimentaire.

III-2.1.1.2.3 ANOVA avec ajustement de Benjamini-Hochberg (FDR=0,05)

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

Trente gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés de façon significative entre régimes à l'issue de l'analyse ANOVA ajustée par la méthode de Benjamini-Hochberg. Sur ces 30 gènes, 22 ont une fonction biologique connue. Ces différents gènes se répartissent selon les catégories fonctionnelles suivantes : 9 gènes (40%) sont impliqués dans des processus métaboliques, 4 (18%) opèrent dans la transduction du signal, 3 (14%) dans la régulation de la transcription ou de la traduction, 3 (14%) sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, les 3 derniers opérant dans des fonctions cellulaires diverses (figure III-9). Parmi les gènes impliqués dans des voies métaboliques, 4 appartiennent au métabolisme lipidique (dont *erg28*, impliqué dans la voie de biosynthèse du cholestérol, ainsi que l'Acyl-CoA Binding protein [ACBP] et la forme cardiaque de la protéine de liaison aux acides gras [H-FABP], impliqués dans le transport intracellulaire des lipides), 1 est impliqué dans la production d'énergie (Ubiquinol-cytochrome c réductase []), 1 dans le transport facilité du glucose (Glucose transporter type 10/11 [*glut11*]), 1 dans le catabolisme des acides aminés (acétylcholinestérase, [*ache*]).

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

Seul le gène de la perforine, déjà identifié avec la méthode de correction de Bonferroni, est significativement exprimé de façon différentielle entre lignées. Comme avec la précédente méthode, aucune interaction entre l'effet de l'aliment et de la sélection génétique sur l'expression des différents gènes testés n'a été mise en évidence avec l'ajustement de la p-value par la procédure de Benjamini-Hochberg.

La procédure de Benjamini-Hochberg, bien que moins stringente que celle de Bonferroni, n'a permis d'obtenir qu'un nombre restreint de gènes dont l'expression est significativement différente, notamment entre lignées. Là encore, l'interprétation biologique des données s'avère limitée.

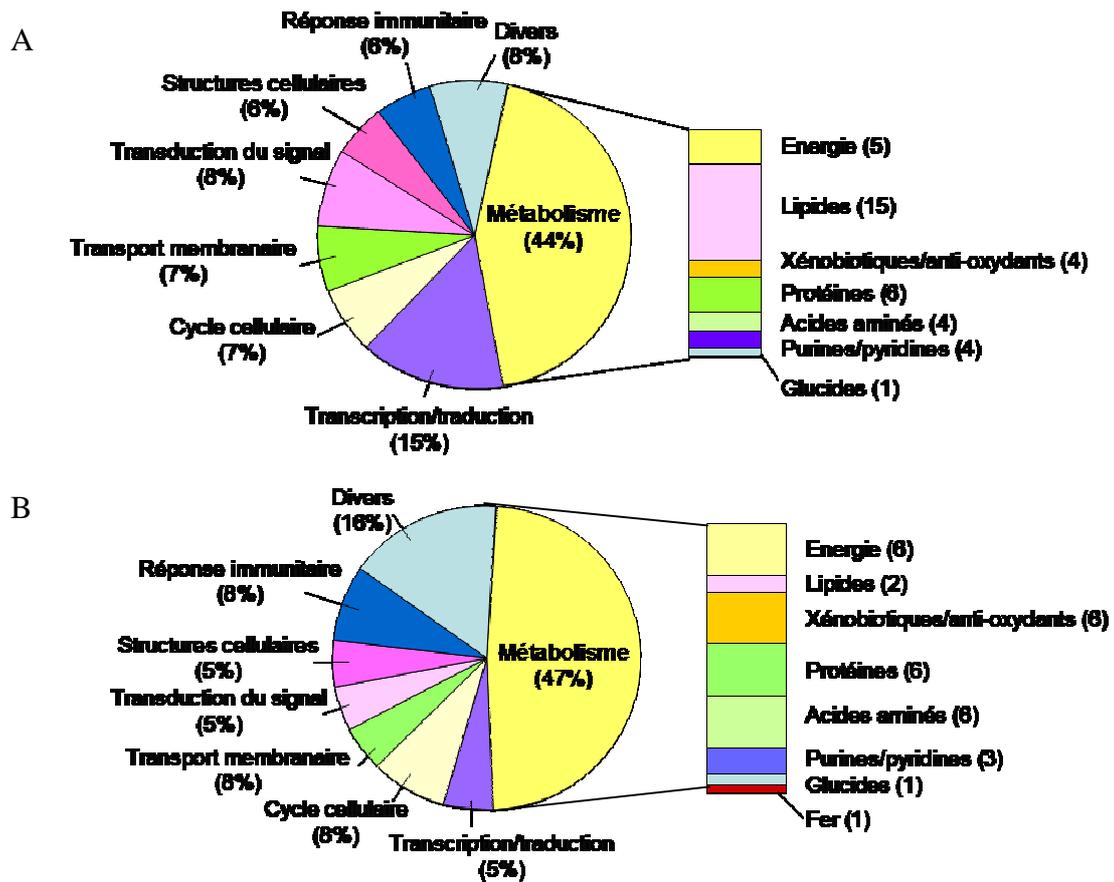


Figure III-10: Transcriptome hépatique : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'analyse SAM (*Significance analysis of microarray*) ($FDR < 0,15$). A : effet du régime alimentaire, B : effet de la sélection génétique.

III-2.1.1.2.4 Significance analysis of microarray (SAM)

Les tests paramétriques comme l'ANOVA supposent l'indépendance des données. Or, il existe une corrélation forte entre les tests statistiques, liée à la co-régulation des gènes et une dépendance des erreurs de mesure des niveaux d'expression. Les tests non paramétriques comme le test SAM, en opérant par permutations, permettent de s'affranchir de l'hypothèse d'indépendance des données et de calculer des probabilités ajustées en contrôlant le taux de faux positifs (FDR). Nous avons choisi un taux de faux positifs toléré de 15%, qui permet de sélectionner un nombre suffisant de gène tout en conservant un nombre de faux positifs potentiels acceptable

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

En choisissant un taux de faux positifs toléré (FDR) de 15%, 111 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre régime par l'analyse SAM, 6 étant surexprimés et 103 sous-exprimés chez les truites nourries avec l'aliment HE par rapport à celles nourries avec l'aliment LE. Une fonction biologique a pu être attribuée à 87 d'entre eux (figure III-10A). Parmi ceux-ci, 38 gènes (43,7%) étaient impliqués dans des voies métaboliques. La liste détaillée de l'ensemble de ces transcrits est disponible dans le tableau VII-I, en annexe. La comparaison entre les résultats générés par cette analyse et ceux fournis par l'ANOVA ($\alpha=0,01$, sans ajustement) révèle que 106 gènes sont communs entre les deux listes de gènes.

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

Soixante-dix sept gènes différemment exprimés de façon significative ont été identifiés entre lignées à l'issue de l'analyse SAM ($FDR < 0,15$) : 65 sont surexprimés et 12 sous-exprimés chez les truites de lignée la F par rapport à celles de lignée la L. Soixante cinq ont une fonction biologique connue. La catégorie fonctionnelle la plus représentée (47% des gènes ayant une fonction connue) est celle du métabolisme, avec un total de 30 gènes. Les autres gènes se répartissant dans des processus biologiques divers (figure III-10B). La liste complète des gènes différentiellement exprimés retenus par cette méthode est présentée dans le tableau VII-2, en annexe.

La comparaison entre les résultats générés par cette analyse et ceux fournis par l'ANOVA ($\alpha=0,01$, sans ajustement) met en évidence 70 gènes identifiés de façon concordante par les deux types d'analyses.

L'analyse de l'effet global de chaque facteur de variation principal (régime et sélection) sur l'expression des gènes a permis d'obtenir un nombre suffisant de gènes dont l'expression est significativement modifiée par les deux facteurs, tout en contrôlant le nombre de faux positifs dans chaque liste. Cependant, l'analyse SAM par t-test non apparié ne permet pas de tester d'éventuelles interactions entre l'effet du régime et celui de la sélection sur les gènes sélectionnés.

Nous avons donc opté pour la stratégie suivante : ne considérer que les gènes significatifs identifiés à la fois par ANOVA ($P < 0,01$) et par SAM ($FDR < 0,15$), tout en s'assurant, pour certains gènes, de la validité des résultats en réalisant des mesures indépendantes (RT-PCR en temps réel et éventuellement protéome).

III-2.1.1.3 Contrôle indépendant des résultats par RT-PCR en temps réel

La validation des résultats issus de l'analyse des puces à ADN a été faite par RT-PCR en temps réel, en choisissant des gènes parmi la liste de gènes sélectionnés pour chaque effet observés :

Nous avons donc choisi de mesurer :

- deux gènes dont l'expression est significativement modifiée en réponse à la teneur en lipides de l'aliment : la delta-6 désaturase (D6D), enzyme clé de la désaturation des acides gras, et la 3-phosphoglycérate déshydrogénase (3-PGDH), impliquée dans le catabolisme des acides aminés.

- deux gènes dont l'expression est significativement différente entre lignées : l'aspartate aminotransferase (GOT) enzyme clé de la transamination des acides aminés, et la malate déshydrogénase, cytoplasmic (MDH).

- un gène dont l'expression est significativement modifiée à la fois par le régime et la sélection : la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), enzyme du cycle des pentoses phosphates qui fournit du NADPH pour la lipogénèse.

- deux gènes pour lesquels une interaction régime x lignée significative a été observée : la glucokinase (GK), enzyme clé de la glycolyse, et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), principal fournisseur de NADPH pour la lipogénèse

Tableau III-4 : Nombre de spots spécifiquement présent ou absent dans chaque condition expérimentale

	Condition expérimentale				Lignée		Régime	
	L-LE	L-HE	F-LE	F-HE	L	F	LE	HE
Présents	14	114	16	20	23	19	7	6
Absent	18	54	16	23	19	23	6	7

Tableau III-5 : Rendement en identification en fonction du type de coloration utilisée pour la révélation des protéines sur les gels 2D.

Coloration	Nitrate d'argent					CB R-350	CB G-250
	150	300	400	600	Total		
µg de protéines totales introduites	150	300	400	600	Total	600	600
Nombre de spots prélevés	48	100	20	54	222	32	46
Nombre de protéines identifiées	6	8	1	5	20	15	10
Rendement d'identification (%)	12,5	8	5	9,25	9	46,8	21,7
Absence d'identification liée à							
Une quantité insuffisante de peptides	25	65	13	30	133	11	16
Un score insuffisant	16	24	5	13	58	2	15
L'absence d'homologie	1	3	1	6	11	4	5

III-2.1.2 Analyse du protéome hépatique

III-2.1.2.1 Détection, analyse quantitative et qualitative des spots

La coloration haute résolution à l'argent utilisée dans notre analyse du protéome hépatique nous a permis de détecter et d'analyser près de 900 spots différents sur nos gels. Sur ces 900 spots, 570 étaient détectés dans les quatre conditions expérimentales. Les profils d'expression des spots restants (spécifique d'une condition expérimentale particulière) se répartissent comme indiqué dans le tableau III-4. L'analyse ANOVA à deux facteurs (effet lignée, effet aliment et interactions lignée x aliment) menée sur les 570 spots détectés sur l'ensemble des gels a permis d'identifier 265 spots dont l'expression varie de façon significative entre conditions ($p < 0,05$):

- 82 spots sont significativement différents entre lignées.
- 113 spots varient de façon significative entre aliments
- 44 spots sont à la fois affectés par le régime et l'aliment
- 26 spots sont impliqués dans une interaction entre lignée et aliment

III-2.1.2.2 Prélèvement des spots et identification des protéines en spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Pour l'identification de ces spots, quatre gels colorés au nitrate d'argent compatible à la masse ont été réalisés, avec pour chacun, les quantités de protéines totales suivantes : 150, 300, 400 et 600 μ g. Deux gels colorés au bleu ont été réalisés, l'un avec la coloration au bleu de Coomassie R-350, l'autre avec la coloration au bleu de Coomassie G-250. Pour ces deux gels, la quantité de protéines introduite était de 600 μ g. Les protéines introduites provenaient d'un mélange d'extraits protéiques constitué à partir d'un pool de tous les extraits. Le nombre de spots prélevés et le nombre de protéines identifiées à partir de chaque gel sont indiqués dans le tableau III-5. Au total, 300 spots ont été prélevés sur l'ensemble des gels, représentant une centaine de spots différents. Leur analyse en spectrométrie de masse a abouti à l'identification de 36 protéines différentes.

III-2.1.2.3 Remarques sur les rendements en identification

Le faible nombre d'identifications en spectrométrie de masse (13% au total) s'explique en grande partie par la quantité insuffisante de peptides contenue dans la plupart des spots excisés à partir de nos gels (60% des cas pour la coloration argent, 34% pour la coloration au bleu). Ce faible rendement s'explique aussi par le fait que les résultats obtenus pour certains

spots n'ont pas trouvé d'homologie dans les banques de données. La coloration au Nitrate d'argent a fourni le plus faible rendement, avec 20 protéines identifiées sur 222 spots analysés (soit 9% de rendement en identification). La sensibilité plus élevée de cette coloration permet la visualisation d'un plus grand nombre de spots, mais limite en contrepartie la quantité de protéines introduite dans les gels pour éviter les phénomènes de saturation des spots, rendant de ce fait l'identification des protéines plus difficile par manque de signal exploitable en MALDI-TOF. La coloration au Bleu de Coomassie R-350, moins résolutive, nécessite l'introduction d'une plus grande quantité de protéines, et, par conséquent, la quantité en peptides contenue dans les spots étant plus élevée, le rendement en identification est considérablement amélioré, avec 15 protéines identifiées sur 32 spots analysés (soit 46,8% d'identification), et 3 spots pour lesquels une identification reste possible en MS/MS (MALDI-TOF-TOF). La sensibilité de cette coloration reste néanmoins insuffisante, avec une visualisation d'un nombre beaucoup plus faible de spots par rapport à la coloration à l'argent, expliquant le nombre plus faible de spots prélevés sur le gel. La coloration au Bleu de Coomassie G-250, plus sensible que le Bleu de Coomassie R-350, a permis de visualiser et de prélever davantage de spots, mais a conduit à un rendement d'identification moins élevé (21,7%). Introduire davantage de protéines totales constitue une possibilité séduisante en théorie, permettant d'augmenter à la fois le nombre de spots visibles et le rendement en identification, mais reste peu envisageable en pratique sans risquer de perturber la focalisation des protéines au cours de l'IEF.

Tableau III-6 : Effet du contenu énergétique alimentaire sur l'expression des gènes et des protéines dans le foie des truites des 2 lignées:

<i>Voie métabolique</i> Gène/Protéine	Méthode d'identification		
	Transcriptome	RT-PCR	Protéome
<i>Métabolisme lipidique</i>			
<i>Transport des lipides</i>			
H-Fatty acid binding protein a (H-FABPa)	LE>HE		LE>HE
H-Fatty acid binding protein b (H-FABPb)	LE>HE		LE>HE
Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	LE>HE		LE>HE
<i>Désaturation des lipides</i>			
Delta-6-désaturase (D6D)	LE>HE	LE>HE	
<i>Biosynthèse du cholestérol</i>			
ergostérol biosynthetic protein 28 (ERG28)	LE>HE		
24-dehydrocholesterol reductase (DHC24)	LE>HE		
Retinol dehydrogenase 12 (RDH12)	LE>HE		
C-4 methylsterol oxidase (ERG25)	LE>HE		
Cholesteryl ester transfer protein (CETP)	LE>HE		
<i>Production de cofacteurs et d'énergie</i>			
6-Phosphogluconate déshydrogénase	LE>HE	LE>HE	
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	F-LE > (L-LE, L-HE, F-HE)	LE>HE	
Isocitrate déshydrogénase		LE>HE*	LE>HE
Ubiquinol cytochrome c reductase	LE >HE		
ATP synthase subunit alpha	LE >HE		
<i>Catabolisme des acides aminés</i>			
3-phosphoglycérate déshydrogénase	LE>HE	LE>HE	
Aspartate aminotransferase		F-LE>F-HE	LE>HE
Alanine :glyoxylate aminotransferase			LE >HE
Glutamate déshydrogénase			LE>HE
Cystathionine gamma-lyase	LE>HE		
<i>Protéolyse</i>			
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (UB2E1)	LE>HE		
Proteasome subunit beta type 7 precursor (PSB7)	LE>HE		
<i>Métabolisme oxydatif</i>			
Glutathione peroxidase			HE > LE
Stress-activated protein kinase 3 (MK12)	LE >HE		LE>HE

* l'analyse de ce transcript en RT-PCR en temps réel a été effectuée dans le cadre de la publication n°1, avec les mêmes échantillons que ceux utilisés dans cette étude. Les amorces utilisées pour son amplification avaient été définies d'après la même séquence que celle déposée sur la puce.

III-2.3 Principaux résultats

III-2.3.1 Analyse du transcriptome et du protéome hépatique

- Le métabolisme est la «catégorie fonctionnelle» la plus représentée parmi les gènes et les protéines identifiées et exprimées de façon différentielle entre régime et entre lignées: elle représente près de 45% des gènes de fonction biologique connue identifiés au niveau du transcriptome, à la fois par ANOVA ($P < 0,01$) et par SAM ($FDR < 0,15$), et 78% des protéines identifiées au niveau du protéome.
- Les résultats fournis par l'analyse du transcriptome et du protéome hépatiques sont concordants. Certaines protéines que nous avons pu identifier à l'échelle du protéome comme différentes en abondance ont également été détectées comme étant différentiellement exprimées par l'approche microarray (notamment deux isoformes correspondant à l'H-FABP, l'ACBP, l'aspartate aminotransférase et la protéine MK12).

III-2.3.1.1 Effet de l'apport énergétique alimentaire

- D'après l'analyse du transcriptome hépatique, le métabolisme lipidique est la voie métabolique où se trouve la plus grande proportion (40,5%) de transcrits différentiellement exprimés entre régime. La plupart sont significativement moins exprimés chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE. Parmi ceux-ci figurent des transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du cholestérol, dans la désaturation des acides gras (Δ^6 -désaturase [D6D]), et dans la fourniture de NADPH pour la lipogénèse (6-phosphogluconate déshydrogénase 6-PGDH). Enfin, trois transcrits codant pour des protéines impliquées dans le transport intracellulaire des lipides (acyl-CoA binding protein [ACBP] et deux transcrits codants pour la *heart-type* fatty acid binding protéin [H-FABP]) sont également moins abondants chez les truites ayant reçu l'aliment HE.

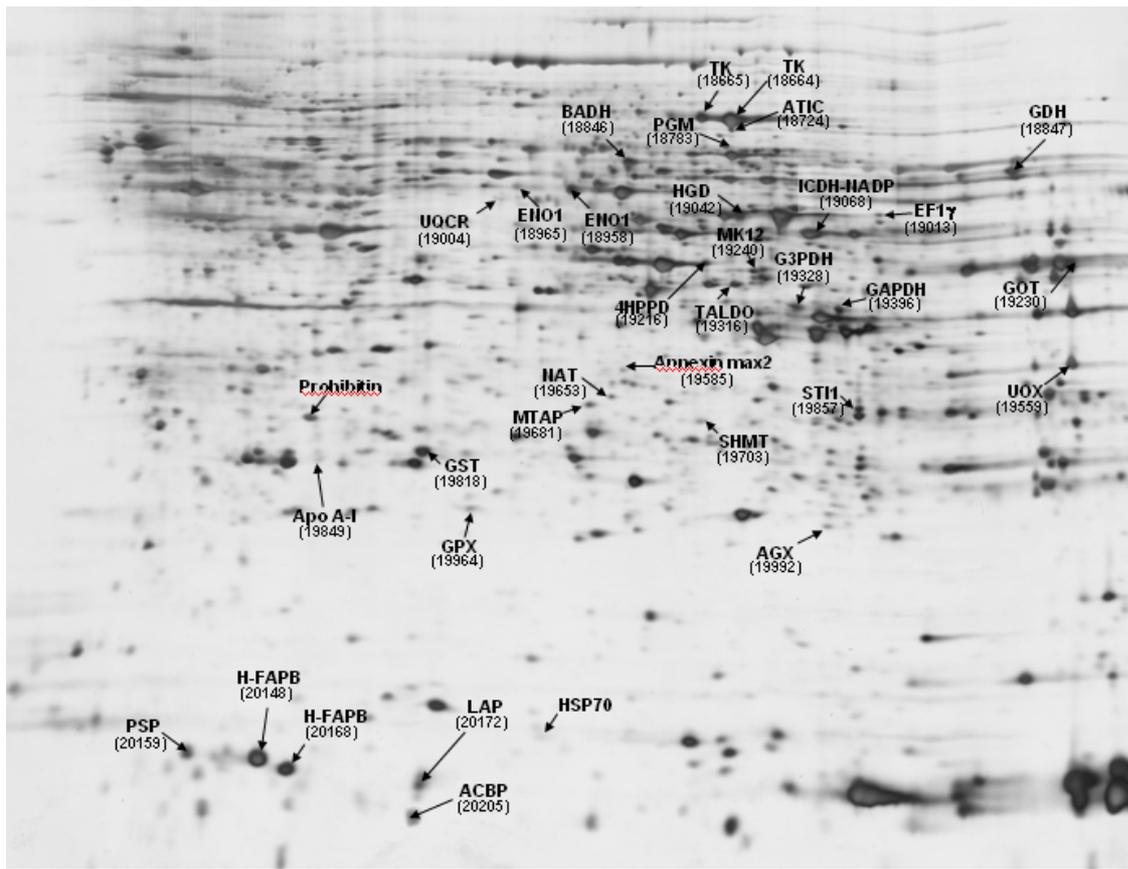


Figure III-11 : Position des protéines identifiées sur le gel 2D : gel bidimensionnel sur lequel sont indiquées les protéines identifiées en spectrométrie de masse. 4HPPD : ACBP : acyl-CoA-binding protein ; AGX : alanine : glyoxylate déshydrogénase ; ApoA-I : apolipoprotéine A-I ; BADH : bétaine aldéhyde déshydrogénase ; EF1 γ : elongation factor 1 γ ; ENO1 : α -énolase 1 ; G3PDH : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; GAPDH : glycéraldéhyde déshydrogénase ; GDH : Glutameta déshydrogénase ; GOT : aspartate aminotransférase ; GPX : glutathione peroxydase ; GST : glutathione S-transférase ; HGD : homogentisate 1,2 dioxygénase ; H-FABP : *heart-type* fatty acid-binding protein ; ICDH-NADP : isocitrate déshydrogénase, NADP dépendante ; LAP : MTAP ; NAT : PGM : phosphoglucomutase ; SHMT : sérine hydroxyméthyl transférase ; TALDO : transaldolase ; TK ; transcétolase ; UOCR : ubiquinol cytochrome c réductase ; UOX : urate oxydase ;

- L'expression plus faible de la D6D observée avec l'aliment HE au niveau du transcriptome ($P=5.10^{-3}$; $FDR<0,05$) est confirmée par l'analyse de ce gène par RT-PCR en temps réel ($P<10^{-4}$).

☞ L'expression plus faible de la D6D, impliquée dans la désaturation des acides gras, chez les truites nourries avec l'aliment HE, est conforme avec les résultats observés par ailleurs chez le saumon Atlantique (Zheng et al., 2004, Jordal et al., 2005), la truite arc-en-ciel (Seilliez et al., 2001) ainsi que chez les mammifères (Cho et al., 1999) dans le cadre d'une alimentation contenant de huile de poisson, riche en AGPI n-3.

- L'expression plus faible de la 6-PGDH observée avec l'analyse du transcriptome ($P<5.10^{-4}$, $FDR=0$) est également confirmée par l'analyse de ce gène en RT-PCR en temps réel ($P<10^{-4}$). D'autre part, les résultats de l'analyse par RT-PCR en temps réel de la G6PDH, pour laquelle seule une interaction régime x lignée significative était détectée en transcriptome (niveau de transcrit de la G6PDH significativement plus élevé chez les truites F-LE que dans les trois autres conditions), indiquent une expression significativement plus faible chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE ($P<10^{-4}$).

☞ L'expression significativement plus faible de la G6PDH et de la 6-PGDH, enzymes clés de la voie des pentoses-phosphate, source principale de NADPH pour la lipogénèse, sont en accord avec la diminution de l'activité des principales enzymes lipogéniques obtenus dans le cadre de l'approche « candidats » (publication n°1). Ces données suggèrent une régulation transcriptionnelle de ces enzymes par la teneur en lipides de l'aliment.

- Deux transcrits et deux protéines présentant une forte homologie de séquence avec la forme cardiaque de la protéine de liaison aux acides gras (H-FABP) ont été détectés dans le foie des truites arc-en-ciel. D'après leur position sur les gels 2D, le pHi des deux protéines se trouve aux alentours de 5,3 et 5,5, et leur poids moléculaire (PM), aux alentours de 14500 Daltons, ce qui correspond au pHi et au PM de l'H-FABP mammalienne. D'autre part, l'alignement des séquences protéiques déduites à partir de

chacun des deux transcrits avec les produits de digestion trypsique des deux protéines suggère que les deux protéines détectées sur nos gels correspondent aux protéines codées par les deux transcrits déposés sur la puce, avec 100% d'homologie de séquence. De plus, la forte homologie de séquence observée au niveau nucléotidique et protéique entre les deux transcrits (88% et 94%, respectivement) suggère que ces deux formes d'H-FABP détectées sont en fait deux isoformes différentes.

- Le niveau significativement plus faible de transcrits codant pour l'ACBP et pour les deux isoformes de l'H-FABP observé avec l'aliment HE en transcriptome est retrouvé au niveau du protéome, avec une quantité de protéines correspondantes significativement plus faibles chez les truites nourries avec l'aliment HE.
- D'après l'analyse du transcriptome, la glutamate déshydrogénase (GDH) et l'alanine aminotransférase (ALAT, aussi dénommée AGX), deux enzymes clé impliquées dans la transamination des acides aminés, sont significativement moins abondantes ($P=0,004$ et $0,015$, respectivement) chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE. D'autre part, des transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la bioconversion des acides aminés (cystathionine γ -lyase [CGL], 3-phosphoglycérate déshydrogénase [3-PGDH]) et dans la protéolyse par la voie du protéasome (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 [UB2E1], Proteasome subunit beta type 7 precursor [PSB7]) sont également exprimés à un niveau plus faible avec l'aliment HE par rapport à l'aliment LE. L'expression plus faible de la 3-PGDH est d'ailleurs confirmée en RT-PCR en temps réel ($P<10^{-3}$).

☞ Ces données suggèrent une diminution du catabolisme des protéines et des acides aminés en réponse à un apport en lipides alimentaires plus élevé par l'aliment HE. Ces résultats sont en accord avec les performances de croissance plus importantes et la meilleure efficacité protéique observées chez les poissons nourris avec l'aliment HE.

- La quantité de protéines correspondant à la glutathione peroxydase (GPX), enzyme anti-oxydante clé, est significativement plus élevée ($P < 10^{-4}$) chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE.

☞ La plus grande quantité de GPX détectée chez les truites nourries avec l'aliment HE, contenant de l'huile de poisson, est en accord avec l'augmentation de l'expression et de l'activité de la GPX et de la catalase observée chez le rat dans le cadre d'une alimentation plus riche en AGPI n-3 (Nanji et al., 1995).

Tableau II-7 : Effet de la sélection divergente pour la teneur en lipides du muscle sur l'expression des gènes et des protéines dans le foie des truites.

<i>Voie métabolique</i> Gène/Protéine	Méthode d'identification		
	Transcriptome	RT-PCR	Protéome
<i>Métabolisme lipidique</i>			
<i>Transport des lipides</i>			
H-Fatty acid binding protein a (H-FABPb)			F>L
H-Fatty acid binding protein b (H-FABPa)			F>L
<i>Désaturation des lipides</i>			
Delta-6-désaturase (D6D)		F>L	
<i>Esterification des lipides</i>			
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)			F >L
<i>Production de cofacteurs et d'énergie</i>			
6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH)	F>L	F>L	
Ubiquinol cytochrome c reductase	F >L		F>L
Malate dehydrogenase, cytoplasmic (MDH)	F>L	F>L	
10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	F>L		
<i>Catabolisme des acides aminés</i>			
Aspartate aminotransferase (GOT)	F>L	F>L	F>L
Alanine :glyoxylate aminotransferase (AGX)			F>L
Glutamate déshydrogénase (GDH)			F>L
Betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT)	F>L		
<i>Protéolyse</i>			
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (UB2E1)	F>L		
Proteasome subunit beta type 7 precursor (PSB7)	F>L		
Proteasome-associated protein ECM29 homolog	F>L		
<i>Métabolisme oxydatif</i>			
Glutathione peroxidase (GPX)			L>F
Glutathione S-transferase (GST)			L>F

III-2.3.1.2 Effet de la sélection génétique

- Contrairement à ce qui est observé pour l'effet de l'aliment, l'analyse du transcriptome hépatique révèle peu d'effet de la sélection génétique sur le métabolisme lipidique, avec seulement deux transcrits différenciellement exprimés de façon significative (une protéine de transfert non spécifique des lipides [NLTP], et la céramide kinase). En revanche, la catégorie fonctionnelle la plus représentée concerne le métabolisme des protéines et des acides aminés.
- En particulier, l'expression de deux transcrits codant pour l'aspartate aminotransferase, GOT, une des principales enzymes de l'oxydation des acides aminés, est plus élevée chez les individus de lignée F que chez ceux de lignée L ($P=10^{-3}$ et 0,004), ce qui est confirmé par l'analyse de l'expression de l'un des transcrits en RT-PCR en temps réel ($P<10^{-4}$). De plus, à l'échelle du protéome, les quantités de protéines correspondant à la GOT, la GDH et l'AGX sont plus élevées pour la lignée F que pour la lignée L ($P<10^{-4}$, 0,0017 et 0,048, respectivement). D'autre part, des transcrits correspondant à des enzymes impliquées dans la bioconversion des acides aminés (Betaine-homocysteine S-methyltransferase [BHMT], 4-aminobutyrate aminotransferase [GABT]) et dans la protéolyse par voie du protéasome (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 [UB2E1]), Proteasome subunit beta type 7 [PSB7]) sont également plus abondants chez les truites de lignée F.

☞ L'ensemble de ces résultats suggère une augmentation de l'utilisation des protéines et des acides aminés à des fins énergétiques. Ces résultats sont en accord avec les plus faibles performances de croissance et la plus faible efficacité protéique observées chez les individus de lignée F, les protéines étant moins utilisées pour la croissance et davantage pour la fourniture d'énergie.

- L'analyse du protéome hépatique fournit aussi des informations complémentaires concernant le métabolisme des lipides, avec une quantité de protéines correspondant à la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) ainsi qu'aux deux H-FABPs, précédemment décrites, plus élevée chez les truites de lignée F, effet non détecté au niveau des ARNm. Le niveau de transcrit codant pour la 6-PGDH, impliquée dans le cycle des pentoses phosphate, est également plus élevé chez les truites de lignée F que chez celle de lignée L (transcriptome et RT-PCR en temps réel : $P=0,002$). D'autre part,

l'analyse en RT-PCR en temps réel de l'expression de la D6D montre une expression plus élevée ($P < 10^{-3}$) chez les truites de lignée F.

☞ L'ensemble de ces résultats semble indiquer une synthèse endogène des lipides plus élevée chez les truites de lignée F par rapport à celles de lignée L. Ces résultats sont en accord avec la plus forte activité de l'ACC observée chez les individus de la lignée F, bien qu'aucune différence d'activité de l'AGS, de la G6PDG et de l'EM n'ait été observée entre lignées (publication n°1).

- La quantité de protéines correspondant à la GPX et à la glutathione S-transferase (GST) est plus élevée chez les truites de la lignée L par rapport à celles de la lignée F ($P = 0,019$ et $0,004$, respectivement).

☞ La présence en plus grande quantité de ces deux enzymes anti-oxydantes chez les truites de la lignée L pourrait s'expliquer par une β -oxydation des acides gras plus importante chez les poissons de cette lignée, comme le suggèrent les résultats de notre approche « enzymes candidate » (publication n°1), qui pourrait être à l'origine d'une production plus importante d'espèces activées d'oxygène (ROS).

III-2.3.1.3 Effet combiné du régime alimentaire et de la sélection génétique

- Un certain nombre de transcrits et de protéines identifiées ont un niveau d'expression modifié à la fois par le régime alimentaire et la sélection génétique. Au total, 14 transcrits identifiés en transcriptomique sont concernés, parmi lesquels la 6-phosphogluconate déshydrogénase pour le métabolisme. A ceux-ci s'ajoute la $\Delta 6$ -désaturase dont l'effet lignée a été révélé par l'analyse de ce transcrit en RT-PCR en temps réel. Sur les 36 protéines identifiées, 7 ont un niveau d'expression modifiée à la fois par le régime et la sélection, parmi lesquelles figurent les deux formes de l'H-FABP identifiées, la GAPDH, l'AGX, la GDH, l'urate oxydase et la prohibitine. Dans tous les cas, leur abondance dans le foie est plus faible avec l'aliment HE qu'avec l'aliment LE, et plus élevée dans la lignée F que dans la L.

☞ Les deux facteurs utilisés pour augmenter la teneur en lipides musculaire dans notre étude (aliment plus riche en lipide et sélection en faveur d'une teneur en

lipides musculaires plus élevée) exercent des effets opposés sur l'abondance de ces transcrits et protéines.

- Une interaction régime x lignée significative a été détectée pour 26 transcrits ainsi que pour 13 protéines identifiées. Ces différents acteurs moléculaires ne semblent a priori pas intervenir dans des processus cellulaires fonctionnellement reliés les uns avec les autres, excepté pour certaines protéines impliquées dans le métabolisme glucidique, dont la quantité est significativement plus faible chez les truites du groupe L-HE. Le niveau de transcrit codant pour la glucokinase (GK), pour lequel l'interaction significative du régime et de la sélection est confirmée en RT-PCR en temps réel ($P < 0,01$), est quant à lui plus élevé chez ces dernières (truites L-HE).

☞ Il semble donc que l'alimentation et la sélection génétique exercent dans l'ensemble des effets indépendants sur le métabolisme hépatique, à l'exception du métabolisme glucidique pour lequel la réponse à la sélection semble dépendre du contenu énergétique de l'aliment. Les résultats suggèrent que le métabolisme du glucose chez les individus de la lignée L est perturbé par un apport alimentaire plus important en lipides. Il serait intéressant d'analyser plus en détail la régulation de cette voie métabolique chez les deux lignées.

III-2.4 Principales conclusions

- L'analyse du transcriptome et du protéome hépatique a fourni de nouvelles connaissances concernant l'effet d'un apport en lipides alimentaires plus important sur l'expression de gènes et de protéines impliqués dans le métabolisme énergétique. En particulier, ces analyses indiquent qu'un apport alimentaire plus riche en lipides diminue l'expression et la quantité de protéines de plusieurs enzymes clés impliquées dans le catabolisme des acides aminés et des protéines. *Ceci suggère fortement une diminution de l'utilisation des protéines et des acides aminés d'origine alimentaires pour la fourniture d'énergie au profit de la croissance, phénomène connu sous le nom d'épargne protéique. Ce phénomène d'épargne des protéines par un apport en lipides alimentaires plus important est bien décrit chez les poissons (Takeuchi et al., 1978 ; Hillestad et Johnsen, 1994), mais c'est la première fois, à notre connaissance, que les mécanismes à l'origine de ce phénomène sont observés au niveau moléculaire.*
- Les résultats fournis par ces analyses confirment l'effet d'une alimentation à long terme riche en lipides sur l'expression de gènes et de protéines impliquées dans la désaturation des acides gras et dans le métabolisme antioxydant.
- Le transcriptome et le protéome hépatique sont significativement affectés par la procédure de sélection appliquée, bien que celle-ci ait été directement exercée sur le muscle. Les principaux effets de la sélection observés portent sur des enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés et des protéines, dont le niveau hépatique de transcrits et de protéines est significativement plus élevé chez les truites de la lignée F que chez celles de la lignée L. *Il semblerait donc que les deux lignées se distinguent non seulement par leur capacité à utiliser les lipides et les glucides au niveau du foie, comme nous le suggèrent les résultats de notre approche « enzymes candidates » (publication n°1), mais également par leur aptitude à utiliser les protéines pour pourvoir à leur besoin énergétiques. Les individus de la lignée L auraient donc une plus grande aptitude à oxyder les lipides au niveau du foie que ceux de la lignée F, qui eux utiliseraient davantage les glucides et les protéines comme source d'énergie.*

➤ De façon générale, l'aliment HE et la sélection génétique en faveur d'une teneur en lipides accrue exercent des effets opposés sur les voies métaboliques au niveau du foie. En particulier, l'expression des gènes et des protéines impliquées dans la biosynthèse des lipides et dans le catabolisme des protéines et des acides aminés est diminuée en réponse à l'aliment HE, et plus élevée chez les individus de la lignée F que dans ceux de la lignée L. D'autre part, le nombre relativement faible de gènes et de protéines affectées simultanément par le régime et la sélection génétique, et le faible nombre d'interactions observées confortent les résultats obtenus dans le cadre de notre première étude. *Ces résultats indiquent que l'effet additif exercé par la sélection génétique et une alimentation riche en lipides sur la teneur en lipides du muscle n'est pas associée à des effets cumulatifs de ces deux facteurs au niveau des voies métaboliques dans le foie. Ces deux facteurs semblent agir de façon indépendante sur les différents acteurs impliqués dans ces voies métaboliques.*

III-3 Effets de la teneur en lipides de l'aliment et de la sélection génétique basée sur la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel: étude du transcriptome musculaire

Les résultats présentés dans ce chapitre et les différents éléments de discussion sont développés dans la publication suivante:

Kolditz, C.I., Borthaire, M., Lefèvre, F., and Médale, F. Changes in white muscle transcriptome induced by dietary energy levels in two lines of rainbow trout selected for muscle fat content. [A soumettre](#)

Cet article présente l'analyse des effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur les profils d'expression des gènes au niveau du muscle blanc, cible de la procédure de sélection, en procédant à une analyse du transcriptome (microarray nylon).

Nous n'avons pas analysé le protéome musculaire, pour des raisons de temps, mais aussi en raison du peu d'effets observés au niveau du muscle par notre approche «candidat».

1 **Changes in white muscle transcriptome induced by dietary energy levels**
2 **in two lines of rainbow trout selected for muscle fat content**

3
4 Catherine-Ines Kolditz¹, Elisabeth Plagnes-Juan¹, Edwige Quillet², Florence Lefèvre³, and
5 Françoise Médale¹

6
7 ¹INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture & Genomics - Pôle d'Hydrobiologie. F-64310
8 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

9 ² INRA, UR0544 Laboratoire de Génétique des Poissons F-78350 Jouy-en-Josas, France

10 ³ INRA, UR1037 SCRIBE - Campus de Beaulieu - F-35042 Rennes Cedex, France

11

12 **Corresponding author:**

13 Dr Françoise Médale

14 INRA. UMR1067 Nutrition Aquaculture & Genomics. Pôle d'Hydrobiologie. CD 918. F-
15 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle. France

16 Tel : (33) 5 59 51 59 97

17 Fax : (33) 5 59 54 51 52

18 e-mail : medale@st-pee.inra.fr

19

20 **Running head:** Muscle transcriptome in rainbow trout

21

22

23 **Keywords:** Muscle fattening, genetic selection, dietary treatment, microarray

24

25

1 **ABSTRACT**

2

3 Energy intake and genetic background are major determinants of muscle fat content in most
4 animals, including humans. We combined genetic selection and dietary treatment to produce
5 a model to study the metabolic pathways involved in genetic and nutritional control of fat
6 deposition in fish muscle. Two experimental lines of rainbow trout, selected for lean (L) or
7 fat (F) muscle, were fed with diets containing either 10 or 23% lipids from the first feeding,
8 up to 6 months. At the end of the trial, trout exhibited very different muscle fat content
9 values (from 4.2 to 10.1% wet weight). The transcriptome was analyzed to characterize the
10 molecular changes occurring between these two lines when fed a low or a high energy diet.
11 The results from microarray analysis revealed little metabolic change induced by the dietary
12 treatment. The most striking result was the increased level of transcripts encoding the VLDL
13 receptor and FAT/CD36 following both high fat diet and upward selection for muscle fat
14 content, suggesting that these two genes could be molecular markers related to muscle
15 fattening.

16

17

1 INTRODUCTION

2

3 Muscle lipid storage provides an important energy source for muscle functions [e.g.
4 during a prolonged muscular exercise (26, 43) or during fasting (25)]. Moreover, the
5 focus on muscle lipid levels by the animal farming industry has increased because they
6 affect meat quality in terms of its nutritional value and sensory properties (44, 58).
7 Dietary manipulation and genetic selection are the main two tools to manage muscle fat
8 content in farm animals. Genetic factors and energy intake are also known to affect
9 muscle fat mass in humans (38). However, the molecular mechanisms controlling muscle
10 lipid deposition are not fully understood.

11 Salmonids have a high ability to store fat in white muscle (57) and they have been
12 reported to show a wide range of variations in muscle lipid content under dietary
13 manipulation (from 3% to as much as 18% fresh matter) (12, 16, 44), thus making these
14 species particularly suitable for the study of mechanisms involved in muscle fat
15 deposition and mobilization. Using divergent selection on muscle fat content in rainbow
16 trout, we have already obtained a genetic model of muscle fattening, with a fatty muscle
17 line (F) and a lean muscle line (L), characterized by differences for muscle fat content
18 (41). We combined the use of those two trout lines with long term feeding of diets of
19 different energy levels and we obtained animals that presented very different levels of
20 muscle fat content (from 4.2 to 10.1% wet weight) depending on their genetic background
21 (L or F line) and the level of dietary energy they received (LE or HE diet).

22 As in humans and birds, endogenous lipids in fish are mainly synthesized in the liver, and
23 then transported to peripheral tissues by the blood stream (20, 22). Muscle lipid content in
24 these species thus results from the metabolic balance among dietary fat supply, de novo
25 fatty acid synthesis in the liver, uptake of plasma triglycerides by muscle, and subsequent

1 partitioning of fatty acids toward storage or oxidation for energy requirement. Studying
2 gene expression and activity levels of selected key enzymes of lipid metabolism,
3 glycolysis and energy production provided the first information on the metabolic changes
4 induced in the liver and the white muscle by the changes in dietary energy and selection
5 process (27). The high-energy diet repressed the activity of the lipogenic enzymes and
6 stimulated those involved in β -oxidation and glycolysis in the liver but induced minor
7 changes in the muscle enzymes we tested. Contrary to our first hypotheses, the change in
8 muscle fat content induced by selection was neither associated with a change in LPL-
9 mediated lipid uptake nor with a change in activity or expression of enzymes involved in
10 fatty acid oxidation in muscle. In order to identify the molecular mechanisms responsible
11 for the difference in muscle fat content induced by the selection process and dietary
12 treatment in our model, we used in the present study an overall approach at the
13 transcriptome level. Our aims were 1) to assess the overall metabolic changes induced in
14 rainbow trout white muscle by long term feeding a high energy/high fat diet, 2) to identify
15 the metabolic differences induced in muscle as a consequence of the selection procedure
16 and 3) to compare the metabolic effects of the two factors (genetic *versus* nutritional)
17 used to modify muscle fat content and to evaluate to what extent the two factors may
18 interact on the different metabolic pathways.

19

20

1 **MATERIALS & METHODS**

2

3 *Experimental animals and diets*

4 The animals used in this study were the same as those described in Kolditz et al. (27).
5 Briefly, two lines of rainbow trout, designated L (lean muscle line) and F (fat muscle
6 line), were obtained after three generations of divergent selection for high or low muscle
7 fat content, evaluated using a non-destructive method (Distell Fish Fatmeter) in live fish.
8 Triplicate groups of fish of both lines were fed diets containing either 100 (LE diet) or
9 230 (HE diet) g lipid/kg dry matter from the first feeding for six months. The two diets
10 were made from the same fishmeal-based mixture, and about 15% fish oil was added to
11 the HE diet to create a wide difference in lipid content between the two diets. The
12 increase in dietary crude fat content (+135%) was accompanied by a decrease in the
13 proportions of protein (-11%) and starch (-23%) in the HE diet (Table 1). At the end of
14 the 6 month feeding trial, all fish were anesthetized with 2-phenoxyethanol at the
15 recommended dose for surgical procedures (0.2 ml/l) 24 hours after meal, and
16 individually weighed. Nineteen fish per tank were sacrificed by a sharp blow on the head.
17 Fillets from the left side of the fish were kept as samples for analysis of lipid content after
18 trimming and skin removal. Three additional fish per tank were sampled under RNase-
19 free conditions to perform analysis of gene expression in muscle. All the tissue samples
20 were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The experiment was
21 conducted following the *National Guidelines on Animal Care of the French Ministry of*
22 *Research.*

23

24

25

1 ***RNA extraction***

2 The RNA extracts used for the present microarray and real time PCR analyses were those
3 used by Kolditz et al. (27) for expression analysis of candidate genes. Total RNA was
4 extracted from 8 individual muscles per experimental condition using the TRIzol reagent
5 method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was quantified using
6 spectrophotometry based on absorbance at 260nm and integrity was monitored using the
7 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kista, Sweden).

8

9 ***cDNA microarray production***

10 Nylon microarrays were obtained from INRA-GADIE Biological Resources Center
11 (<http://www.crb.jouy.inra.fr>) (Jouy-en-Josas, France). A total of 9023 rainbow trout
12 cDNAs originating from a normalized multi-tissue library (19) were spotted after PCR
13 amplification onto Hybond N+ membranes as previously described (34). Positive
14 (luciferase) and negative (water) controls were also spotted on each microarray.

15

16 ***Microarray hybridization and signal processing***

17 Five muscle RNA samples from each experimental condition were used for microarray
18 hybridization at the INRA UMR1067 transcriptome facility (St-Pée-sur-Nivelle, France).
19 Initial hybridization was performed at 42°C for 48h using a ³³P-labeled oligonucleotide
20 sequence (TAATACGACTCACTATAGGG) present at the extremity of each PCR
21 product to monitor the amount of cDNA in each spot. After stripping (3 hours at 68°C,
22 0.1× SSC, 0.2% SDS), arrays were prehybridized for 1 h at 65°C in hybridization solution
23 (5× Denhardt's solution, 5× SSC, 0.5% SDS). Labeled cDNA samples were prepared from
24 3 µg of RNA by simultaneous reverse transcription and labeling for 1 hour at 42°C in the
25 presence of 50 µCi [alpha-³³P] dCTP, 5 µM cold dCTP, 0.8 mM each dATP, dTTP, dGTP

1 and 200 units SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
2 in 30 µL final volume. RNA was degraded by treatment at 68°C for 30 min with 1 µl 10%
3 SDS, 1 µl 0.5 M EDTA and 3 µl 3 M NaOH, and then equilibrated at room temperature
4 for 15 min. Neutralization was performed by adding 10 µl 1 M Tris- HCl plus 3 µl 2N
5 HCl. Two micrograms of PolydA 80mers were then added to the solution to saturate the
6 polyA tails. Arrays were incubated with the corresponding denatured labeled cDNA for
7 40h at 65°C in hybridization solution. After 3 washes (1 hour at 68°C, 0.1× SSC 0.2%
8 SDS), arrays were exposed for 60 hours to phosphor-imaging plates before scanning using
9 a FUJI BAS 5000.

10

11 *Microarray signal processing*

12 Signal intensities were quantified using AGScan software (8), and normalization was
13 performed using BASE software (BioArray Software Environnement), a MIAME-
14 compliant database available at the SIGENAE bioinformatics facility
15 (<http://www.sigenae.org/>). Spots with an oligonucleotide signal lower than three times the
16 background level were excluded from the analysis. After correction, signal processing
17 was performed using the oligonucleotide vector data to correct each spot signal according
18 to the actual amount of DNA present in each spot. After correction, the signal was
19 normalized by dividing each gene expression value by the median value of the array
20 before log transformation.

21

22 *Statistical analysis of microarray data*

23 A total of 7688 clones out of 9023 (85%) passed through the background filter and were
24 kept for further analysis. To evaluate potential interactions of diet and genotype,
25 variations in gene expression were analyzed for each gene by two-way ANOVA ($p < 0.01$)

1 using Tiger TMEV 3.1 software (46), with dietary treatment and genotype as independent
2 variables. Means were compared using the Student Newman Keuls test.

3

4 ***Data mining***

5 Rainbow trout sequences originating from INRA AGENAE (1) and USDA (42) EST
6 sequencing programs were used to generate publicly available contigs (Sigenae:
7 <http://www.sigenae.org>). The 8th version (Om.8, released January 2006) was used for
8 BlastX (17) comparison against the Swiss-Prot database (January 2006) (Swiss-Prot:
9 <http://www.expasy.org/sprot/>). This was performed automatically for each EST spotted
10 onto the membrane and used to annotate the 9023 clones of the microarray. For all genes
11 identified as differentially expressed in the transcriptome analysis, ontologies were
12 obtained using the GoMiner software (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>) and
13 completed when necessary with information from the literature. When feasible, functional
14 categories were allocated as they relate to muscle biology.

15

16 ***Gene expression analysis: qRT-PCR***

17 Eight individual samples per experimental condition, including the five samples used for
18 microarray hybridization, were used as biological replicates. Real-time PCR measurements
19 were performed as described in Kolditz et al. (27). Specific primer pairs were designed using
20 the Primer3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) according to
21 the transcript sequences that were spotted onto the array. The Genbank accession numbers,
22 the sequences of the forward and reverse primers and the corresponding annealing
23 temperature used for each gene tested for its expression are summarized in Table 2. Relative
24 quantification of the target gene transcript with *ef1a* reference gene transcript (37) was
25 performed according to the $\Delta\Delta$ CT method described by Pfaffl (39). The effects of dietary

1 treatment, lines and line/diet interaction on real-time PCR data were tested using the statistical
2 software SAS[®] by a two-way ANOVA. Differences were considered significant when the
3 probability level was <0.05. When interactions were significant, means were compared using
4 the Student-Newman-Keuls test.

5

6 **RESULTS**

7

8 Growth parameters and body lipid content of fish are reported in Fig 1. The higher energy
9 content of the HE diet enhanced whole body weight and length ($p=10^{-4}$) irrespective of the
10 line. As expected, whole body and muscle lipid content as well as the viscero-somatic index
11 were higher in fish fed the HE diet compared to fish fed the LE diet ($p=10^{-4}$ and $p<10^{-4}$,
12 respectively), whatever the line. At the end of the 6 months trial, the whole body weights and
13 lengths of the trout of the lean muscle line (L) were higher ($p=10^{-4}$) than those of the fat
14 muscle line (F). Whole body lipid content was similar for the two lines fed the same diet
15 ($p=0.27$). Muscle lipid content was significantly higher in fish of the F line ($p<10^{-4}$), whereas
16 visceral fat deposition was increased in the L line ($p<10^{-4}$). A line x diet interaction was
17 observed for muscle fat level ($p=0.003$), with a marked increase in F fish fed the HE diet.
18 Muscle fat content thus ranged from 4.2% wet weight in the L line fed the LE diet to 10% wet
19 weight in the F line fed the HE diet at the end of the feeding trial (mean fish weight 60 -90 g).
20 The other two groups (L-HE and F-LE) had similar muscle fat content (6.4% wet weight).

21

22 ***Muscle transcripts differentially expressed between the dietary treatments***

23 Analysis of microarray findings showed that 35 genes were differentially expressed between
24 the two dietary treatments ($p<0.01$); 15 genes were over-expressed and 20 were under-
25 expressed in white muscle from the HE-fed group, compared to the LE-fed group. The

1 categories of biological function represented in this set of genes are summarized in Fig 2a.
2 The complete list of genes that were differentially expressed is presented in Table 4. The
3 identity and biological function of four of them are unknown. About one third (11 genes,
4 31%) of the differentially expressed genes were related to metabolic processes: 7 were
5 involved in protein and amino-acid metabolism, 3 in lipid metabolism, and 1 in the anti-
6 oxidant pathway. In particular, 2 clones exhibiting significant sequence homology with
7 mammalian transcripts encoding the very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) and the
8 fatty acid translocase (FAT/CD36), both involved in muscle and adipose tissue lipid uptake,
9 were significantly more abundant in fish fed the HE diet than in fish fed the LE diet. The HE
10 diet also increased the expression of the gene encoding lipoic acid synthase (LIAS), involved
11 in the detoxification of activated oxygen species. Concomitantly, genes encoding proteins
12 involved in the regulation of ubiquitin-dependent proteasomal proteolysis (Ubiquitin
13 carboxyl-terminal hydrolase 2 [UBP2], Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 [UCH-L1],
14 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 [PSD7]), amino-acid catabolism (L-serine
15 dehydratase [SDH]), and peroxisomal fatty acid oxidation (Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA
16 isomerase [PECI]) were under-expressed in the HE-fed group.

17

18 *Transcripts expressed differentially between the two lines*

19 According to the two-way ANOVA ($p < 0.01$), 82 genes showed differential expression
20 between the two rainbow trout lines. Sixty genes were over-expressed and 22 were under-
21 expressed in the muscle of the F line compared to the L line. The list of the genes that were
22 differentially expressed in muscle of the two lines is presented in Table 5, and Fig 2b
23 summarizes the different categories of biological function represented in this set of genes. The
24 identity and biological function of eleven of them are unknown. The largest number of genes
25 differentially expressed between the two genotypes were those related to metabolic processes

1 (26 genes, 32%), 7 of which were involved in lipid and sterol metabolism, 5 in energy
2 production, 2 in the anti-oxidant pathway, 6 were related to protein metabolism, 4 had
3 functions in amino acid metabolism, 1 in carbohydrate metabolism and 1 in copper
4 metabolism. Transcript levels of ATP/ADP translocase [ADT], cytochrome c oxidase subunit
5 3 [COX3], isocitrate dehydrogenase –NADP dependent, isoform 2 [ICDH2], involved in
6 mitochondrial energy production, and cardiolipin synthase (CLS), the last enzyme involved in
7 the synthesis of cardiolipin phospholipid (an important component of the inner mitochondrial
8 membrane) were significantly higher in the F line than in the L line. Transcript levels
9 corresponding to carboxyl ester lipase (CEL) and prosaposin [PSAP], a precursor of
10 sphingolipid activator proteins required for lysosomal degradation of sphingolipids, were also
11 higher in the F line than in the L line.

12 Transcripts encoding a peroxisomal proliferator activated receptor α (PPAR α), microsomal
13 prostaglandin E synthase 2 (mPGES-2) and two transcripts encoding enzymes involved in the
14 anti-oxidant pathway (ATP-binding cassette transporter 7 [ABCB7] and Cytochrome P450
15 2K1 [CP2K1]) were expressed at lower levels in the F line than in the L line.

16

17 ***Transcripts involved in a line-diet interaction***

18 Nineteen transcripts were detected for which the effects of the diet were dependent on
19 genotype. The different categories of biological function represented are summarized in Fig
20 2c and the corresponding list of genes is presented in Table 5. Four of these have unknown
21 functions, 1 encoded proteins involved in cell cycle, 1 in vesicle-mediated transport, 1 in
22 vesicle-mediated transport, 5 encoded transcription factors and 2 were involved in metabolic
23 pathways. The latter two had functions in purine metabolism and encoded P2X purinoceptor 3
24 (P2X3), that was significantly lower in the L-HE group than in the other three groups, as was
25 Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase), that was concomitantly over-

1 expressed in the L-HE group. It is of note that most of the significant line/diet interactions
2 observed (14 out of the 19) consisted of increased/decreased transcript levels in the L-HE
3 group. Their biological relevance was difficult to interpret in light of the phenotype traits
4 recorded, especially regarding how they related to muscle fat content.

5

6 ***Confirmation of microarray findings with real-time RT-PCR***

7 We then selected a set of candidates from the gene lists described above and proceeded to
8 real-time RT-PCR analysis of their transcript levels using 8 RNA extracts, including the five
9 used for microarray hybridization. These genes were those encoding VLDL-R and
10 FAT/CD36, due to their function in cellular uptake of blood-derived lipids, PPAR α , due to its
11 key role in lipid metabolism, CEL, that encodes carboxyl ester lipase, also known as bile-salt
12 activated lipase, ADT, a rate-limiting enzyme of the respiratory chain, and finally L-serine
13 dehydratase (SDH), a key enzyme of amino acid catabolism (Fig3).

14 The diet-induced changes detected in the expression of VLDL-R, FAT/CD36 and SDS in the
15 microarray experiment were confirmed by real time RT-PCR analysis, with higher transcript
16 levels for VLDL-R and FAT/CD36 ($p=10^{-3}$, 10^{-4} , respectively) and concomitant lower
17 transcript levels for SDH ($p<10^{-4}$) in fish fed the HE diet than in fish fed the LE diet. In
18 addition, real-time RT-PCR measurement of VLDL-R and FAT/CD36 transcript levels
19 revealed a significant line effect ($p<10^{-2}$ and $<5.10^{-3}$, respectively) with higher expression in
20 the F line than in the L line, an effect that was not revealed by the microarray findings. In
21 real-time RT-PCR analysis, hybridization conditions (annealing temperature, primer probe
22 design) are optimized according to the sequence of the target genes. This technique is
23 generally more reliable, sensitive and specific for quantification of mRNA expression than
24 microarray.

1 Real time RT-PCR results also confirmed the higher transcript levels observed in the F line
2 for ADT ($p < 10^{-4}$). In agreement with the microarray results, no significant difference in ADT
3 transcript level was observed between the two dietary groups. In contrast, the specific primer
4 pairs we designed for PPAR α and CEL did not allow sufficient amplification of these
5 transcripts for effective detection, indicating a very low level of expression of these
6 transcripts in our samples.

7

8 **DISCUSSION**

9

10 Muscle fat content in farm animals has a great impact on both meat quality and muscle
11 physiology. However, relatively little is known about the molecular mechanisms that
12 determine muscle fat accretion. Because the white muscle of rainbow trout and other
13 salmonids contains considerable lipid reserves, these species can be considered as particularly
14 suitable for the study of mechanisms involved in muscle fat deposition and mobilization. In
15 the present study, we used transcriptome analysis of white skeletal muscle to identify the
16 mechanisms underlying muscle fat accretion in response to a high energy/high lipid diet and
17 genetic selection for muscle fat content in rainbow trout.

18

19 ***Long term effects of a high energy/high lipid diet on muscle gene expression profile***

20 The microarray experiment used in this study showed little diet-induced change in the muscle
21 transcriptome. This is consistent with the results derived from a previous study conducted on
22 the same animals, in which we analyzed several key enzymes involved in lipid metabolism,
23 glycolysis and energy production at gene expression and activity levels (27). Interestingly,
24 two transcripts encoding proteins involved in mediating blood-derived lipid delivery to the
25 cell, i.e. fatty acid translocase (FAT/CD36) and the very-low density lipoprotein receptor

1 (VLDL-R), were significantly over-expressed in muscle following long-term feeding of the
2 high energy diet. L-Serine dehydratase, a key enzyme of amino acid catabolism that
3 transforms serine into pyruvate, and transcripts involved in the regulation of the proteasome-
4 dependent proteolysis process were under-expressed in fish fed the HE diet, compared to
5 those fed the LE diet. Fish swiftly use proteins as oxidative substrates to meet energy
6 requirements (54, 10). It has been fully established in fish that increasing non-protein energy-
7 yielding nutrients such as lipids generally leads to a protein sparing effect, probably by
8 redirecting dietary protein and amino acids from energy production toward tissue deposition
9 (53, 21). White muscle protein accretion determines whole body growth rate (56) and results
10 from the balance between the protein synthesis and protein degradation rates. Our results
11 suggest a decrease in muscle protein breakdown and subsequent amino acid catabolism
12 associated with increased availability of dietary fatty acids for energy purposes. This is
13 consistent with the enhanced growth performance observed in fish fed the HE diet and the
14 higher protein efficiency ratio in the same group of fish (27).

15 Taken together, these results suggest that increasing the energy content of the diet induced
16 minor changes in white muscle metabolism of rainbow trout, and that transporter-facilitated
17 uptake of circulating lipids by muscle is likely to be the major mechanism responsible for the
18 muscle fattening effect of a high energy/high fat diet in salmonids. This is in agreement with
19 the close correlation generally observed between dietary and muscle fatty acid composition in
20 fish (48) as in most monogastric animals (49, 14, 28).

21

22 ***Muscle transcripts affected by the selection process***

23 Compared to L line muscle, F line muscle exhibited higher levels of transcripts encoding
24 ATP/ADP translocase (ADT) and cytochrome c oxidase sub-unit 3 (COX3). ADT and COX3
25 are both rate-controlling enzymes of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS),

1 thus suggesting that higher ATP production occurred in F line muscle than in L line muscle.
2 In a previous study using the same animals (27), we evidenced higher activity and gene
3 expression of both hexokinase-I and pyruvate kinase in muscle of the F line compared to the
4 L line, suggesting greater glycolytic activity in the muscle for the former. We did not find any
5 significant effect on key enzymes of peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation in
6 muscle induced by selection, except for one isoform of CPTI (CPTIb), the mRNA level of
7 which was higher in the F line than in the L line. The white muscle of rainbow trout is mainly
8 composed of fast glycolytic fibers, which are poorly able to use fatty acids for fuel
9 requirement except during recovery from exhausting swimming (43). Hence, the enhanced
10 OXPHOS activity in the F line suggested herein may be related to a greater reliance of F line
11 muscle on glycolysis for energy production.

12 Surprisingly, a higher level of expression of a transcript exhibiting high sequence similarity
13 with carboxyl ester lipase was detected in muscle of the F line. Carboxyl ester lipase, also
14 known as bile-salt activated lipase, is a nonspecific lipolytic enzyme capable of hydrolyzing
15 cholesteryl esters, tri-, di-, and mono-acylglycerols, phospholipids, lysophospholipids and
16 ceramide (24). This enzyme is synthesized primarily in the pancreatic cells and lactating
17 mammary glands of higher mammals. Although small amounts of CEL have been reported in
18 other tissues, particularly the liver, macrophages and endothelial cells (7, 30, 31), its detection
19 in muscle in the present experiment was quite unexpected. However, in an experiment that
20 aimed at comparing the muscle transcriptome of two pig breeds (Duroc and Taoyuan) Lin and
21 Hsu (33) also detected CEL expression in skeletal muscle. Interestingly, it was found that the
22 CEL transcript level was higher in muscle of the Chinese breed, which displayed greater body
23 fat deposition than the western breed, including in the muscle. This led us to believe CEL to
24 be a potential genetic marker for muscle fat content and an interesting candidate with regard
25 to its involvement in lipid metabolism and probably in lipoprotein modification, as suggested

1 by *in vitro* (50) and *in vivo* studies (32). However, no further amplification of CEL could be
2 obtained using RT-PCR performed with probes specifically designed according to the
3 sequence that was spotted on the array in the present study. The same was observed for the
4 PPAR α transcript assessed in this experiment. One possible reason for these discrepancies
5 between the microarray and RT-PCR results may be that other transcripts with high sequence
6 similarity (i.e. other isoforms) may be functionally expressed in white muscle cells and that
7 the primers used in this study were too specific to allow their amplification and effective
8 detection. This is a major pitfall to be taken into account when working with rainbow trout,
9 due to the many potential paralogs for a still unappreciated number of genes arising from the
10 recent salmonid genome duplication (3).

11 The most striking result was undoubtedly provided by the real-time RT-PCR measurement of
12 FAT/CD36 and VLDL-R gene expression, since it revealed that, in addition to being
13 significantly enhanced by the high fat diet, muscle VLDL-R/VTG-R and FAT/CD36
14 transcript levels were also increased by upward selection for muscle fat content, with a
15 transcript level that paralleled the muscle fat content of fish.

16

17 ***VLDL-R and FAT/CD36 as potential molecular markers for muscle fattening in rainbow*** 18 ***trout***

19 VLDL-R is a member of the low density lipoprotein receptor superfamily. These receptors
20 mediate the internalization and degradation of lipoproteins. In mammals, VLDL-R is
21 expressed predominantly on the capillary endothelium (59) of heart, muscle and adipose
22 tissue (47). VLDL-R binds with high affinity to VLDL, intermediate density lipoproteins
23 (IDL) and chylomicrons, but not to LDL (52, 35). Recent studies using VLDLR-deficient
24 mice have provided compelling evidence that in mammals VLDL-R has a role in the
25 metabolism of triglyceride-rich lipoproteins, and is important for postprandial plasma

1 triglyceride clearance and storage in peripheral tissues (51, 18, 60, 11). In contrast, VLDL-R
2 homolog expression in oviparous animals was thought to be restricted to ovarian tissue where
3 it probably has a key function in oocyte development by specifically binding to vitellogenin.
4 It was therefore renamed vitellogenin-receptor (VTG-R) (36). In fact it has been demonstrated
5 that at least two VTG-R variants co-exist in the chicken, as well as in rainbow trout (5, 40)
6 and that are distinguished by the presence or absence of an O-linked sugar domain. Whereas
7 the O-linked sugar domain-lacking variant has been found to be highly and exclusively
8 expressed in the ovary, the O-linked sugar-containing variant is expressed as a major form in
9 heart and muscle (5, 40). Because studies of VTG-R/VLDL-R in egg-laying species such as
10 rainbow trout merely focused on oocyte development, the role played by the somatic form of
11 this receptor and its ligand binding properties in these species have received little attention.
12 Nevertheless, considering that this receptor is expressed in almost the same tissues as in
13 mammals, it could be argued that this receptor is likely to perform similar functions in
14 oviparous species than in mammals. Our results support the hypothesis, as VLDL-R was
15 highly expressed in the white muscle of immature rainbow trout, and its mRNA level
16 correlated with the muscle fat level observed across the different experimental groups.

17 With regard to the physiological role of FAT/CD36, studies in humans and mice genetically
18 deficient in FAT/CD36 have indicated that this transporter determines LCFA uptake and lipid
19 metabolism in the heart, muscle and adipose tissue (55, 15, 9). Recent findings in mammals
20 have also indicated a possible role for FAT/CD36 in regulating mitochondrial long chain fatty
21 acid uptake and subsequent oxidation, possibly involving translocation of FAT/CD36 to the
22 mitochondria (6, 23, 4). The higher FAT/CD36 transcript levels observed in the F line and in
23 the HE-fed group in our model were not associated with a significant increase in enzyme
24 activity and/or expression of key enzymes of fatty acid oxidation (27), suggesting that the

1 increase in FAT/CD36 expression observed in our study is not related to the latter cellular
2 function proposed for this transporter.

3 Expression of FAT/CD36 and VLDL-R is notably induced during adipocyte differentiation
4 (2). As we worked with the whole white muscle tissue, we did not know whether the increase
5 in VLDL-R and FAT/CD36 mRNA levels observed therein was derived from adipocytes
6 located between the fibers, from the white muscle cells or from both. However, since fat
7 deposition in white muscle in fish mainly occurs as lipid accumulation within adipocytes
8 located in connective tissue surrounding the fibers, it seems reasonable to suggest that this
9 increase in expression of FAT/CD36 and VLDL-R may have mostly occurred in adipose
10 cells.

11 Taken together, our results suggest that lipid uptake is the major mechanism conditioning
12 muscle fattening in rainbow trout, irrespective of the tools used to modify the muscle lipid
13 content. Plasma lipids taken up by muscle are transported in the blood-stream either as the
14 form of TG-rich lipoproteins (i.e. chylomicrons and VLDL) or as free fatty acids bound to
15 albumin. TG-rich lipoproteins are hydrolyzed by lipoprotein lipase (LPL) which generates
16 free fatty acids, 2-monoglycerols and remnant lipoprotein particles. Free fatty acids are then
17 transported across the plasma membrane into muscle cells by simple diffusion or by
18 membrane-associated transporters, FAT/CD36 being among the best characterized to date.
19 Remnant lipoprotein particles can be also taken up into cells by receptors such as VLDL-R.
20 LPL is thus generally considered as the rate-limiting enzyme in the uptake of fatty acids
21 derived from circulating lipoproteins in peripheral tissues (13). In our experiment, neither
22 transcript levels nor activity of LPL were modified by the dietary treatment, or by the
23 selection procedure used to increase muscle lipid content (27). This is in line with the lack of
24 correlation observed in muscle between LPL activity and TG-derived lipid uptake in the rat
25 treated with a PPAR γ agonist (29), suggesting that the extent of muscle TG-derived lipid

1 uptake could be independent of changes in LPL *per se*. When LPL activity is not limiting, the
2 increase expression of VLDL-R and FAT/CD36 could be sufficient to mediate an increase in
3 muscle lipid uptake. Some studies have reported a strong relationship between LPL and
4 VLDL-R in mammals (45, 60, 11) suggesting functional cooperation of these proteins in the
5 control of post-prandial delivery of lipoprotein-derived fatty acids to tissues. In addition to
6 mediate the internalisation of lipoprotein remnant into the muscle cells, VLDL-R may also act
7 by facilitating the hydrolysis of TG-rich lipoproteins by maintaining them in close interaction
8 with LPL.

9

10 **PERSPECTIVES AND SIGNIFICANCE**

11

12 This report presents an original model to study muscle fat accretion, an important and poorly
13 understood metabolic process. The increase in muscle fat deposition in rainbow trout resulting
14 from feeding a high energy diet seems more likely to be related to enhanced transport and
15 uptake of fatty acids than to significant changes in nutrient metabolism in the muscle. This is
16 consistent with the close relationship generally observed between the dietary lipid profile and
17 the muscle fatty acid composition of muscle in various monogastric species. The present
18 results also indicate that VLDL-R in an oviparous species is not only related to vitellogenesis,
19 but may also play an important role in muscle lipid uptake as in mammals, since its transcript
20 level, together with those of FAT/CD36, correlated well with the increase in muscle lipid
21 content upon combining genetic and nutritional manipulations. These two genes could be
22 potential molecular markers for further investigations aimed at improving the understanding
23 of molecular mechanisms underlying intramuscular fat accretion in glycolytic muscle.
24 According to our results, VLDL-R and FAT/CD36 could be the rate-controlling enzymes for
25 circulating lipid uptake in rainbow trout white muscle and not LPL.

1

2 **ACKNOWLEDGMENTS**

3

4 We thank M. J. Borthaire for skilled technical assistance and the technical staff at the INRA
5 experimental facilities of La Pisciculture Expérimentale des Monts d'Arrée (PEIMA;
6 Drennec, Sizun, Finistère, France).

7

8 **GRANTS**

9

10 C Kolditz was partially supported by a grant from INRA and the Aquitaine region. This
11 research was funded by the French national AGENOP program (Contract No. A02483,
12 Systematic Analysis of Rainbow Trout Genome) and the 6th European Project Cadre de
13 Recherche et Développement [Contract No. 016249-2, Sustainable Aquafeeds to Maximize
14 the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers (AQUAMAX)].

15

1 **REFERENCES**

2

3 1. **Aegerter S, Baron D, Carpentier C, Chauvigne F, Dantec C, Estampes A, Goupil**
4 **AS, Jumel A, Jutel I, Mazurais D, Melaine N, Montfort J, Bobe J, Chardon P,**
5 **Chevalet C, Fauconneau B, Fostier A, Govoroun M, Le Cam A, Le Gac F, Klopp**
6 **C, Panserat S, Piumi F, Rallièrre C, Rescan PY, Guiguen Y.** The INRA AGENAE
7 program and the Agenae trout EST collections: first results applied to fish physiology
8 research. *Comp Biochem Physiol* 137(A):135-141, 2004.

9

10 2. **Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA.** Cloning of rat
11 adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain fatty acids
12 that is induced during preadipocyte differentiation: homology with human CD 36. *J.*
13 *Biol. Chem.* 268: 17665-17668, 1993.

14

15 3. **Bailey GS, Poulter RT, Stockwell PA.** Gene duplication in tetraploid fish: model for
16 gene silencing at unlinked duplicated loci. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5575-5579,
17 1978.

18

19 4. **Benton CR, Holloway GP, Campbell SE, Yoshida Y, Tandon NN, Glatz JFC,**
20 **Luiken JJFP, Spriet LL, Bonen A.** Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and
21 fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle
22 mitochondria. *J Physiol* 586: 1755-1766, 2008.

23

- 1 5. **Bujo H, Lindstedt KA, Hermann M, Mola Dalmau L, Nimpf J, Schneider WJ.**
2 Chicken Oocytes and Somatic Cells Express Different Splice Variants of a
3 Multifunctional Receptor. *J Biol Chem* 270: 23546-23551, 1995.
4
- 5 6. **Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G, Luiken JJFP, Glatz JFC, Bonen A.** A
6 novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36. *J Biol Chem* 279: 36235–36241,
7 2004.
8
- 9 7. **Camulli EA, Linke MJ, Brockman HL, Hui DY.** Identity of a cytosolic neutral
10 cholesterol esterase in rat liver with the pancreatic bile salt stimulated cholesterol
11 esterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1005:177–182, 1989.
12
- 13 8. **Cathelin R, Lopez F, Klopp C.** AGScan: a pluggable microarray image
14 quantification software based on the Image J library. *Bioinformatics* 23: 247-248, 2007.
15
- 16 9. **Coburn CT, Knapp FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA.**
17 Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissue
18 of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275: 32523–32529, 2000.
19
- 20 10. **Dabrowski K, Guderley H.** Intermediary metabolism. In *Fish Nutrition*. Edited by
21 Halver JE, Hardy RW. San Diego: Academic Press; 309-365, 2002.
22
- 23 11. **Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, Gresti J, Du Z-Y, Chardigny M, Sébédio J-**
24 **L, Clouet P.** Upregulation of liver receptor and FAT/CD36 expressions in LDLR-/-

- 1 apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res* 47: 2647-
2 2655, 2006.
- 3
- 4 12. **Einen O, Skrede G.** Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic
5 salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquac Nutr* 4:99–108, 1998.
- 6
- 7 13. **Fielding BA, Frayn KN.** Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids.
8 *Br J Nutr* 80: 495–502, 1998.
- 9
- 10 14. **Flachowsky G, Schultz E, Kratz R, Glodek P.** Effects of different dietary fat
11 sources on the fatty acid profile of backfat and intramuscular fat of pigs of various sire
12 breeds. *J Anim Feed Sci* 17: 363-371, 2008.
- 13
- 14 15. **Fukuchi K, Nozaki S, Yoshizumi T.** Enhanced myocardial glucose use in patients
15 with a deficiency in long-chain fatty acid transport (CD36 deficiency). *J Nucl Med* 40:
16 239–243, 1999.
- 17
- 18 16. **Gélineau A, Corraze G, Boujard T, Larroquet L, Kaushik S.** Relation between
19 dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and
20 hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod Nutr Dev* 41: 487–503, 2001.
- 21
- 22 17. **Gish W, States DJ.** Identification of protein coding regions by database similarity
23 search. *Nat Genet* 3: 266-272, 1993.
- 24

- 1 18. **Goudriaan JR, Tacken PJ, Dahlmans VE, Gijbels MJ, Van Dijk KW, Havekes**
2 **LM, Jong MC.** Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor.
3 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1488–1493, 2001.
- 4
- 5 19. **Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y.** Generation of a large-scale repertoire of
6 Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC*
7 *Genomics* 7, 196-203, 2006.
- 8
- 9 20. **Henderson RJ, Sargent J.** Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed
10 diets differing in lipid content. *Comp Biochem Physiol C* 69: 31–37, 1981.
- 11
- 12 21. **Hillestad M, Johnsen F.** High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects
13 on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture* 124: 109–116, 1994.
- 14
- 15 22. **Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG.** Physiological and molecular
16 mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* 75:
17 47–76, 1995.
- 18
- 19 23. **Holloway GP, Bezaire V, Heigenhauser GJF, Tandon NN, Glatz JFC, Luiken**
20 **JJFP, Bonen A, Spriet LL.** Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid
21 translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal
22 muscle during aerobic exercise. *J Physiol* 571:201–210, 2006.
- 23
- 24 24. **Hui DY.** Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in
25 mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1303:1–14, 1996.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25. **Jaromowska M, Górski J.** Effect of fasting on skeletal muscle triglyceride content. *Experientia* 41: 357–358, 1985.

26. **Jeukendrup AE.** Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann NY Acad Sci* 967: 217-235, 2002.

27. **Kolditz C, Borthaire M, Richard N, Corraze G, Panserat S, Vachot C, Lefèvre F, Médale F.** Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1154–R1164, 2008.

28. **Kouba M, Benatmane F, Blochet JE, Mourot J.** Effect of a linseed diet on lipid oxidation, fatty acid composition of muscle, perirenal fat, and raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci* 80: 829-834, 2008.

29. **Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Blanchard PG, Renaud A, Berger JP, Olivecrona G, Deshaies Y.** Tissue-specific postprandial clearance is the major determinant of PPAR γ -induced triglyceride lowering in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R57-R66, 2009.

30. **Li F, Hui DY.** Modified low density lipoprotein enhances the secretion of bile salt-stimulated cholesterol esterase by human monocyte-macrophages. Species-specific

- 1 difference in macrophage cholesteryl ester hydrolase. *J. Biol. Chem.* **272**: 28666–28671,
2 1997.
- 3
- 4 31. **Li F, Hui DY.** Synthesis and secretion of the pancreatic-type carboxyl ester lipase by
5 human endothelial cells. *Biochem J* 329: 675–679, 1998.
- 6
- 7 32. **Li L, Weng W, Harrison EH, Fisher EA.** Plasma carboxyl ester lipase activity
8 modulates apolipoprotein B-containing lipoprotein metabolism in a transgenic mouse
9 model. *Metab Clin Experimental* 57:1361–1368, 2008.
- 10
- 11 33. **Lin CS, Hsu CW.** Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and
12 Taoyuan pigs. *J Anim Sci* 83:2075-2086, 2005.
- 13
- 14 34. **Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldif M, Bernard K, Naquet P, Jordan B.**
15 Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization
16 of arrayed cDNA clones. *Genomics* 29(1): 207-16, 1995.
- 17
- 18 35. **Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U.** VLDL
19 receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res*
20 37:733–1742, 1996.
- 21
- 22 36. **Okabayashi K, Shoji H, Nakamura T, Hashimoto O, Asashimi M, Sugino H.**
23 cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin receptor. *Biochem*
24 *Biophys Res Commun.* 224:406–413, 1996.
- 25

- 1 37. **Olsvik P, Lie K, Jordal A, Nilsen T, Hordvik I.** Evaluation of potential reference
2 genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* 17:6-21, 2005.
3
- 4 38. **Pérusse L, Bouchard C.** Gene-diet interactions in obesity. *Am J Clin Nutr* 72:1285S-
5 90S, 2000.
6
- 7 39. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real time RT-
8 PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002–2007, 2001.
9
- 10 40. **Prat F, Coward K, Sumpter JP, Tyler C.R.** Molecular characterization and
11 expression of two ovarian lipoprotein receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus*
12 *mykiss*. *Biol Reprod* 58: 1146-1153, 1998.
13
- 14 41. **Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B.** Two-way selection for muscle
15 lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245: 49–
16 61, 2005.
17
- 18 42. **Rexroad CE, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B, Gahr SA,**
19 **Palti Y, Quackenbush J.** Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and
20 creation of a gene index. *Cytogenet Genome Res* 102:347-354, 2003.
21
- 22 43. **Richards J, Heigenhauser G, Wood C.** Lipid oxidation fuels recovery from
23 exhaustive exercise in white muscle of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp*
24 *Physiol* 282; R89–R99, 2002.
25

- 1 44. **Robb DHF, Kestin SC, Warriss PD, Nute GR.** Muscle lipid content determines the
2 eating quality of smoked and cooked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 205:
3 345–358, 2002.
- 4
- 5 45. **Roberts CK, Barnard RJ, Liang KH, Vaziri ND.** Effect of diet on adipose tissue
6 and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and
7 hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 161: 133–141, 2002.
- 8
- 9 46. **Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M,**
10 **Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A,**
11 **Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J.** TM4:
12 a free, open-source system for microarray data management and analysis.
13 *Biotechniques*, 34:374-378, 2003.
- 14
- 15 47. **Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y,**
16 **Yamamoto T.** Structure, chromosome location, and expression of the human very low
17 density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 269: 2173-2182, 1994.
- 18
- 19 48. **Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR.** The lipids. In: Fish Nutrition (Eds: Halver,
20 J.E.) Academic Press, INC, pp. 153-218, 1989.
- 21
- 22 49. **Sawosz E, Chachulowa J, Lechowski R, Fiedorowicz S.** Influence of dietary
23 lecithin and oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the fatty acid content
24 of rat muscle and serum. *J Anim Feed Sci* 8: 485-497, 1999.
- 25

- 1 **50. Shamir R, Johnson WJ, Morlock-Fitzpatrick K, Zolfaghari R, Li L, Mas E,**
2 **Lombardo D, Morel DW, Fisher EA.** Pancreatic carboxyl ester lipase: A circulating
3 enzyme that modifies normal and oxidized lipoproteins in vitro. *J Clin Invest* 97:1696–
4 1704, 1996.
- 5
- 6 **51. Tacke PJ, Teusink B, Jong MC, Harats D, Havekes LM, Willems van Dijk K,**
7 **Hofker MH.** LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism
8 in VLDL receptor transgenic and knock out mice. *J Lipid Res* 41: 2055-2062, 2000.
- 9
- 10 **52. Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T.** Rabbit very low
11 density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with
12 distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci* 89: 9252-9256, 1992.
- 13
- 14 **53. Takeuchi T, Watanabe T, Ogino C.** Optimum ratio of dietary energy to protein for
15 rainbow trout. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44:729–732, 1978.
- 16
- 17 **54. Van den Thillart G.** Energy metabolism of swimming trout (*S. gairdneri*). Oxidation
18 rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate. *J Comp Physiol*
19 156(B):511-520, 1986.
- 20
- 21 **55. Watanabe K, Ohta Y, Toba K.** Myocardial CD36 expression and fatty acid
22 accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency. *Ann Nucl Med* 12: 261–
23 266, 1998.
- 24

- 1 **56. Weatherly AH, Gill HS.** The role of muscle in determining growth and size in teleost
2 fish. *Experientia* 45: 875–878, 1989.
- 3
- 4 **57. Weatherup RN, McCracken KJ, Foy R, Rice D, McKendry J, Mairs RJ, Hoey R.**
5 The effects of dietary fat content on performance and body composition of farmed
6 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 151: 173–184, 1997.
- 7
- 8 **58. Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E,**
9 **Sheard PR, Enser M.** Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 66: 21–
10 32, 2003.
- 11
- 12 **59. Wyne KL, Pathak RK, Seabra MC, Hobbs HH.** Expression of the VLDL Receptor
13 in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 407-415, 1996.
- 14
- 15 **60. Yagyu H, Lutz EP, Kako Y, Marks S, Hu Y, Choi SY, Bensadoun A, Goldberg**
16 **IJ.** Very Low Density Lipoprotein (VLDL) Receptor-deficient Mice Have Reduced
17 Lipoprotein Lipase Activity. *J Biol Chem* 277: 10037–10043, 2002.
- 18

1 **FIGURES**

2

3 Figure 1: Final body weight, whole body and muscle lipid content of trout from the L and F
4 lines fed the LE and HE diets for 6 months. A) Final body weight (g); B) Final body length
5 (mm); C) Whole body lipid content (%WW); D) Muscle lipid content (%WW); E) Viscero-
6 somatic index (%). % WW: percentage of wet weight. Values are expressed as means \pm SE
7 (n=57 individuals in all groups, except for muscle lipid content, for which n=30); p-values are
8 presented in italics when the differences were significant ($p < 0.05$, ANOVA 2 factors). Means
9 with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$, ANOVA).

10

11 Figure 2: Biological functions of the genes differentially expressed according to ANOVA,
12 $p < 0.01$: A) Between the two dietary treatments (HE vs LE); B) Between the two genetic lines
13 (F vs L); C) Genes involved in a significant line/diet interaction effect.

14

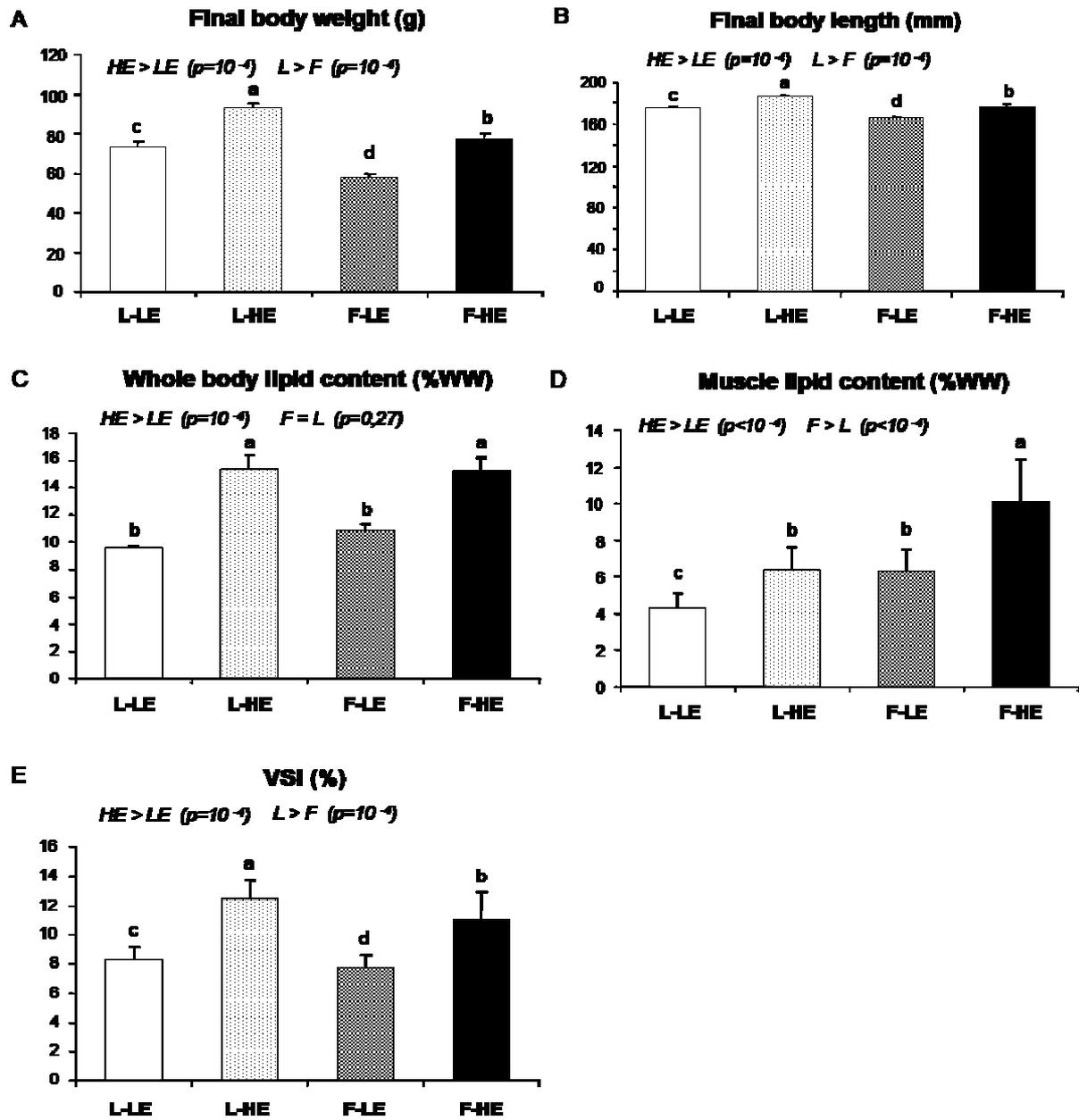
15 Figure 3: Gene expression of selected genes measured by RT-PCR (controls of the microarray
16 data) in the white muscle of rainbow trout of the L and F lines fed a HE or LE diet, measured
17 by real time quantitative RT-PCR. A) gene expression measurement of VLDL receptor
18 (VLDL-R); B) gene expression measurement of fatty acid translocase (FAT/CD36); C) gene
19 expression measurement of L-serine dehydratase (SDH); D) gene expression measurement of
20 ATP/ADP translocase (ADT). Data represent means \pm SE of 8 samples performed in
21 triplicate. Expression values are normalized with EF1 α -expressed transcripts.

22

23

24

25



1

2

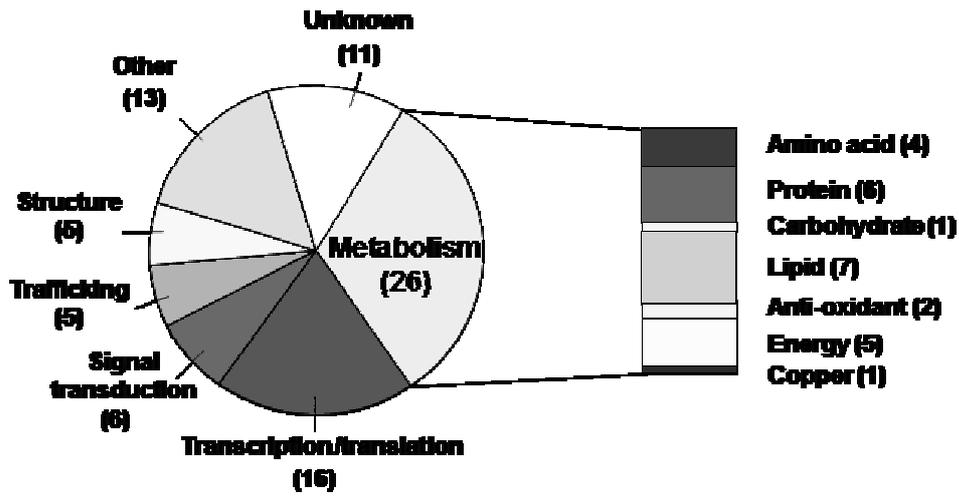
3

4

5 Figure 1

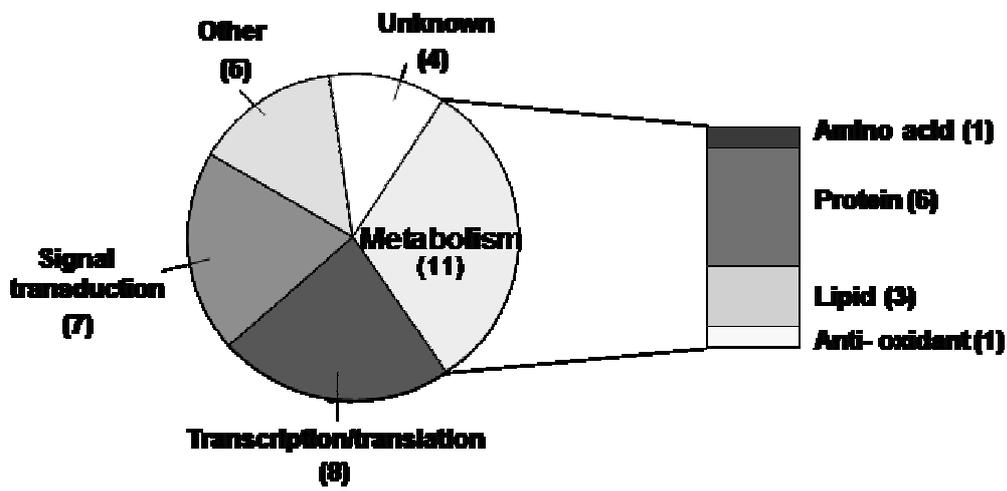
6

1 A



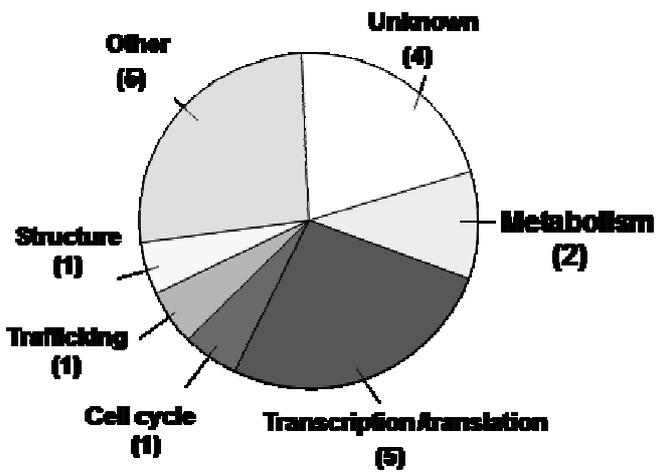
2

3 B



4

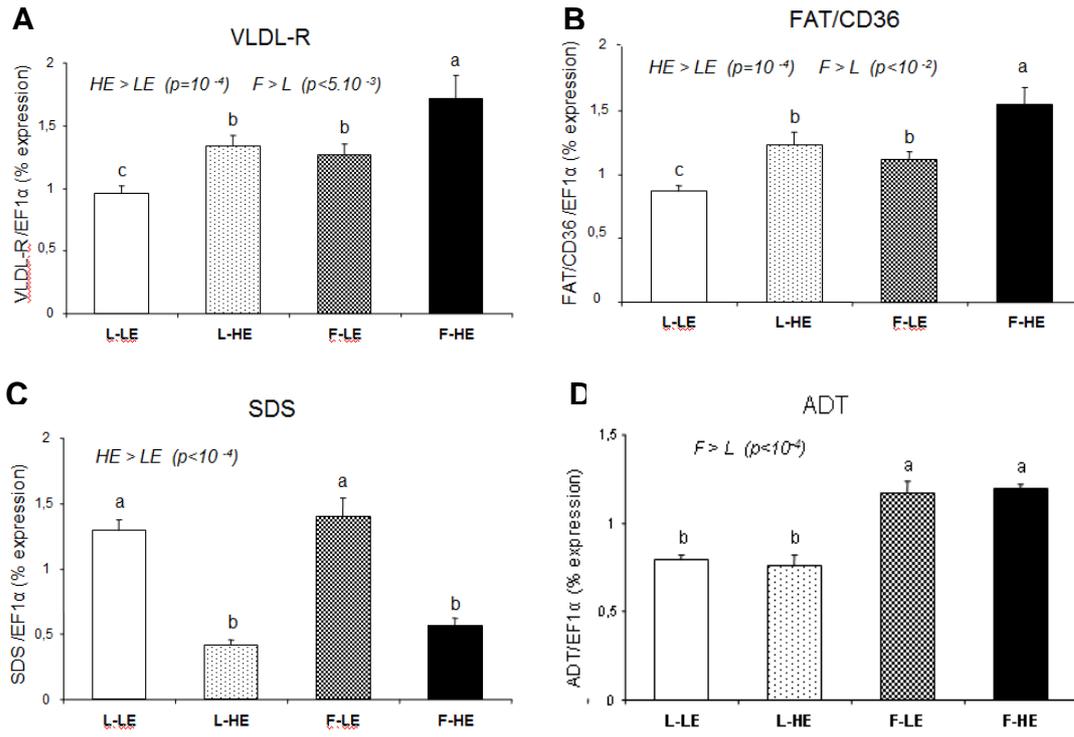
5 C



6

7 Figure 2

8



1

2

3 Figure 3

4

1 **Table 1.** Chemical composition of experimental diets LE (Low Energy) and HE (High
2 Energy)

3		LE	HE
4	DM (%)	93.0	93.3
5	Protein (% DM)	57.6	51.1
6	Lipid (% DM)	9.8	23.1
7	Starch (% DM)	12.1	9.2
8	Energy (kJ/g DM)	21.0	23.8

9

10 LE diet, *Low Energy diet*; HE diet, *High Energy diet*; DM, Dry Matter; FA, Fatty acids

Table 2. Accession numbers and primer sequences of genes selected for analysis by real time RT-PCR

Target gene	abbreviated name	Databank	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature (C°)	Amplicon size (pb)
VLDL receptor	<i>vldlr</i>	Genbank	BX077158	<i>gttttgacagatgggaga</i>	<i>agccttcattgcaccagt</i>	60	160
Fatty acid translocase/ CD36	<i>fat/cd36</i>	Genbank	BX300637	<i>ccactgaagttgagccatga</i>	<i>tgctagactcatgccgtgc</i>	60	121
L-serine dehydratase	<i>sdhl</i>	Genbank	CA354115	<i>caacaaccctggatggatct</i>	<i>tccacctccaacagacaaca</i>	60	136
Carboxylester lipase	<i>cel</i>	Genbank	BX073438	<i>accgcgatgtctccaaatac</i>	<i>atthggcgttgatctccag</i>	60	145
Peroxisome proliferator-activated receptor α	<i>ppar α</i>	Genbank	BX300814	<i>ccctcattgctgattccat</i>	<i>acatgatggagcccaagttc</i>	60	133
ATP/ADP translocase	<i>adt2</i>	Genbank	BX865617	<i>acaaagggatcatggactgc</i>	<i>cttctgtccactctccaa</i>	60	175
Elongation factor I alpha	<i>ef1a</i>	Genbank	AF498320	<i>tctcttggtcgtttcgctg</i>	<i>accgagggacatcctgtg</i>	59	159

Table 3. Metabolism-related muscle transcripts exhibiting differential expression between the two dietary treatments (HE vs LE) identified by ANOVA analysis ($p < 0.01$)

<i>Biological function</i>		HE/LE ratio	
		L line	F line
Clone name			
<i>Metabolism (31%)</i>			
<i>Lipid metabolism (8.9%)</i>			
BX077158	Very low-density lipoprotein receptor precursor (VLDL-R)	1.4	1.4
BX300637	Fatty acid translocase/antigen cd36 (FAT/CD36)	1.4	1.4
BX867423	Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	-1.5	-1.5
<i>Amino-acid derivative metabolism (2.9%)</i>			
CA354115	L-serine dehydratase (SDS)	-1.5	-1.2
<i>Protein folding/synthesis/breakdown (17%)</i>			
BX861348	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	-1.4	-1.1
CA348824	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	-1.2	-1.5
CA343951	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	-1.6	-1.3
CA384189	Putative serine protease F56F10.1 precursor	1.5	1.3
CA365863	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial precursor	1.7	1.2
BX872771	Augmenter of liver regeneration	-1.5	-1.3
<i>Xenobiotic and oxidant (2.9%)</i>			
CA373646	Lipoic acid synthetase	1.3	1.8
<i>Regulation of transcription/translation</i>			
BX303258	DNA-directed RNA polymerase III largest subunit	1.2	1.5
CA353007	Translation initiation factor eIF-2B subunit β	1.1	1.3
BX298782	Polycomb group RING finger protein 4	1.2	1.3
CA365421	Homeobox protein Hox-A2b	-3.6	-1.6
BX087067	Methyl-CpG-binding domain protein 3	-1.6	-1.2
CA343779	CCAAT/enhancer-binding protein δ (C/EBP delta)	-1.8	-1.2
CA349800	Nuclear pore complex protein Nup93	-1.4	-1.3
CA347895	Transcription factor 21	-1.4	-2.3
<i>Signal transduction</i>			
CA346554	Mitogen-activated protein-binding protein-interacting protein	1.3	1.2
CA385556	Ras GTPase-activating protein 2	1.2	1.5

CA355642	Regulator of G-protein signaling 18	-1.4	-1.4
CA344992	Frizzled-7 precursor (Fz-7)	-1.1	-1.6
CA344649	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 precursor	-1.3	-1.2
CA385863	Brother of CDO precursor (Protein BOC)	-1.2	-1.4
CA364621	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	-1.4	-1.3

Miscellaneous

BX888224	Calponin homology domain-containing protein 1	1.4	1.4
CA355259	Annexin A13	1.8	1.3
BX867827	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a precursor	1.4	1.2
CA367722	Hsp90 co-chaperone Cdc37	1.2	1.3
CA342763	YTH domain family protein 2	1.2	1.5

Unknown

BX084012	Protein C14orf4 homolog	1.2	1.4
CA358365	Hypothetical protein yw1C	1.8	1.1
CA354428	Unknown	1.3	1.7

Table 4. Metabolism-related transcripts exhibiting differential expression between the two lines (F vs L) identified by ANOVA analysis ($p < 0.01$)

<i>Biological function</i>		<i>F/L ratio</i>	
		LE diet	HE diet
<i>Metabolism (32%)</i>			
<i>Lipid metabolism</i>			
	Clone name		
	BX311641	Cardiolipin synthetase-1.1	1.1 2.5
	BX073438	Carboxyl ester lipase	1.3 2.2
	CA352463	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase	1.2 1.2
	CA347411	Proactivator polypeptide precursor	1.2 1.3
	BX302544	Protein ARV1	1.3 1.3
	BX300814	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-1.2 -2.0
	CA366030	Prostaglandin E synthase 2	-1.5 -1.3
<i>Generation of precursor metabolites and energy</i>			
	CA345607	Isocitrate dehydrogenase [NADP] 2	1.3 1.5
	BX865617	ADP/ATP translocase	1.2 1.4
	CA352391	Cytochrome c oxidase subunit 3	1.8 1.4
	CA379757	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	1.3 1.3
	CA365064	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1 B	1.2 1.2
<i>Amino-acid derivative metabolism</i>			
	CA357276	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	1.2 1.3
	CA345917	Guanidinoacetate N-methyltransferase	1.3 1.7
	CA345342	Serine-pyruvate aminotransferase, mitochondrial precursor	-1.3 -1.6
	CA344534	Kynureninase	-1.7 -1.7
<i>Protein folding/synthesis/breakdown (17%)</i>			
	BX297091	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	1.2 1.5
	CA346736	Acetohydroxy-acid synthase	1.3 1.8
	CA341937	T-complex protein 1 subunit theta	1.1 1.6
	CA342154	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	1.1 1.4
	CA346477	Alpha-2,8-sialyltransferase 8F	1.4 1.3
	BX303582	F-box only protein 6	1.2 1.5
<i>Xenobiotic and oxidant metabolism</i>			

BX074191	ATP-binding cassette sub-family B member 7	-1.5	-1.1
CA348235	Cytochrome P450 2K1	-1.3	-1.2

Carbohydrate metabolism

BX084018	Trehalase precursor (EC 3.2.1.28)	-1.1	-1.5
----------	-----------------------------------	------	------

Copper metabolism

BX305643	Copper-transporting ATPase 1	1.2	1.7
----------	------------------------------	-----	-----

Regulation of transcription/translation

CA363479	Cysteinyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.16)	1.9	1.3
CA358296	Mitochondrial 39S ribosomal protein L39	1.2	1.4
CA344147	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	1.5	1.1
CA365421	Homeobox protein Hox-A2b	1.6	3.8
CA377690	Nuclear transcription factor Y subunit beta	1.3	1.4
CA378568	Pre-mRNA-splicing factor syf2	1.3	1.4
BX314809	DNA-directed RNA polymerase III subunit F (EC 2.7.7.6)	1.1	2.2
CA341803	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 4	1.4	1.4
CA343545	40S ribosomal protein S13	1.4	1.3
BX875597	40S ribosomal protein S17	1.3	1.4
CA343637	60S acidic ribosomal protein P2	1.3	1.4
CA345781	60S ribosomal protein L24	1.2	1.5
CA342765	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.19)	-1.4	-1.4
CA351058	RNA polymerase II elongation factor ELL	-1.3	-1.2
CA362326	Zinc finger protein-like 1	-1.3	-1.6
BX297360	Homeobox protein GBX-1	-1.2	-1.6

Table 4. (Continued)

<i>Biological function</i>	Clone name	F/L ratio		P-value
		LE diet	HE diet	
<i>Signal transduction</i>				
	CA378399	TNF receptor-associated factor 2	1.3	1.3
	CA364863	Serine/threonine-protein kinase 19	1.4	1.2
	CA357556	Guanine nucleotide-binding protein γ -3 subunit	1.4	1.3
	BX866310	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2	-1.2	-1.4

CA341936	Serine/threonine-protein kinase D3	-1.3	-1.6
BX320696	Casein kinase II subunit β	-1.2	-1.3

Cellular trafficking

CA346849	Unc-13 homolog C	1.5	1.2
CA376723	Gelsolin precursor	1.4	1.2
CA351559	Latrophilin-2 precursor	1.8	1.2
CA360465	B-cell receptor-associated protein 29	1.5	1.7
CA358906	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	1.5	1.5

Structure

CA363233	Spondin-1 precursor	1.5	1.2
CA363745	Tubulin-specific chaperone A	1.2	1.3
BX860799	Bullous pemphigoid antigen 1 (Hemidesmosomal protein)	1.1	1.9
CA345128	Cellular myosin heavy chain, type A	1.5	2.1

Miscellaneous

CA387939	Chromosome region maintenance 1 protein homolog	1.6	1.5
CA358005	Hemoglobin subunit alpha	1.4	1.9
CA346506	Osteopetrosis-associated transmembrane protein 1 precursor	1.3	1.3
CA379313	DNA repair protein RAD51 homolog A	1.5	1.3
CA342488	Polypyrimidine tract-binding protein 2	1.3	1.6
BX080425	Zygotic DNA replication licensing factor mcm6	1.4	1.5
CA361755	Cell division cycle 5-related protein		
BX869597	Uromodulin-like 1 precursor	-1.4	-1.2
CA352407	H-2 class II histocompatibility antigen, alpha chain precursor	-1.8	-1.2
BX877741	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17.6	-1.2	-1.5
CA343383	Nocturnin	-1.5	-1.4
BX301281	TBC1 domain family member 8	-1.2	-1.7

Unknown

CA345936	Hypothetical 29.3 kDa protein	1.3	1.1
CA350374	Ankyrin repeat domain-containing protein 39	1.3	1.3
CA376426	Adrenal medulla 50 kDa protein	1.4	1.2
CA356186	AFG3-like protein 2	1.3	1.3
BX076268	Neutrophil cytosol factor 2	1.4	1.8
CA354044	Sulfatase-modifying factor 2 precursor	1.3	1.2

BX877019	WD repeat protein 35	-1.6	-1.6
BX074012	THAP domain-containing protein 11	-1.3	-1.3
BX876294	Protein KIAA0415	-1.3	-1.3

Table 5

<i>Biological function</i>		L-LE	L-HE	F-LE	F-HE
<i>Metabolism</i>					
BX856197	P2X purinoceptor 3	0.014 ± 0.013 ^a	-0.152 ± 0.036 ^b	0.008 ± 0.028 ^a	0.043 ± 0.028 ^a
CA342307	Deoxyuridine dUTP pyrophosphatase	-0.107 ± 0.016 ^b	0.081 ± 0.035 ^a	0.012 ± 0.35 ^{ab}	-0.027 ± 0.050 ^{ab}
<i>Regulation of transcription/translation</i>					
CA342029	Zinc-binding protein A33	0.077 ± 0.055 ^{ab}	0.031 ± 0.021 ^{ab}	-0.127 ± 0.042 ^a	0.127 ± 0.055 ^b
BX872208	MORC family CW-type zinc finger protein 2A	-0.099 ± 0.019 ^b	0.153 ± 0.031 ^a	0.020 ± 0.031 ^{ab}	-0.008 ± 0.051 ^b
BX314809	DNA-directed RNA polymerase III subunit F	0.005 ± 0.039 ^{ab}	-0.136 ± 0.063 ^b	-0.003 ± 0.042 ^{ab}	0.207 ± 0.078 ^a
CA387701	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	-0.032 ± 0.022 ^{ab}	0.217 ± 0.092 ^a	0.005 ± 0.023 ^{ab}	-0.090 ± 0.023 ^b
CA351413	Histone H1-beta, late embryonic	-0.075 ± 0.035 ^b	0.157 ± 0.054 ^a	0.049 ± 0.045 ^{ab}	-0.016 ± 0.032 ^{ab}
<i>Vesicle-mediated transport</i>					
CA370385	Kinesin-like protein KIF1B	-0.080 ± 0.045 ^b	0.164 ± 0.056 ^a	0.033 ± 0.019 ^{ab}	-0.068 ± 0.040 ^b
<i>Structure</i>					
CA343182	Gamma-adducin	-0.005 ± 0.040 ^{ab}	0.165 ± 0.060 ^a	0.092 ± 0.038 ^{ab}	-0.101 ± 0.042 ^b
<i>Cell cycle</i>					
CA361563	NGF-inducible anti-proliferative protein PC3	-0.013 ± 0.035 ^{ab}	0.104 ± 0.039 ^a	0.014 ± 0.014 ^{ab}	-0.127 ± 0.062 ^b
<i>Miscellaneous</i>					
CB486388	Phosphorylase b kinase γ catalytic chain, skeletal muscle isoform	0.150 ± 0.045 ^a	-0.116 ± 0.041 ^b	-0.072 ± 0.027 ^b	0.058 ± 0.066 ^{ab}

BX084629	Gamma-aminobutyric-acid receptor subunit alpha-1	-0.043 ± 0.042^b	0.173 ± 0.025^a	-0.015 ± 0.030^b	-0.006 ± 0.039^b
BX082422	Globoside α -1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-0.116 ± 0.034^b	0.171 ± 0.046^a	-0.030 ± 0.034^b	0.020 ± 0.041^{ab}
BX082670	Protein odd-skipped-related 1	-0.054 ± 0.024^b	0.026 ± 0.042^{ab}	0.130 ± 0.010^a	-0.017 ± 0.036^{ab}
CA346811	Retrotransposable element Tf2 155 kDa protein type 1	0.014 ± 0.032^{ab}	0.150 ± 0.031^a	0.011 ± 0.035^{ab}	-0.097 ± 0.028^b

Unknown

BX882876	Scrapie-responsive protein 1 precursor	-0.078 ± 0.024^b	0.208 ± 0.055^a	0.018 ± 0.031^b	0.002 ± 0.027^b
BX860222	Hypothetical oxidoreductase yulF	-0.010 ± 0.035^{ab}	-0.163 ± 0.056^b	0.015 ± 0.052^{ab}	0.231 ± 0.069^a
BX869292	Unknown	0.036 ± 0.017^a	-0.156 ± 0.025^b	-0.015 ± 0.028^a	-0.012 ± 0.025^a
BX297572	Unknown	-0.001 ± 0.032^{ab}	-0.071 ± 0.027^b	-0.042 ± 0.035^b	0.125 ± 0.022^a

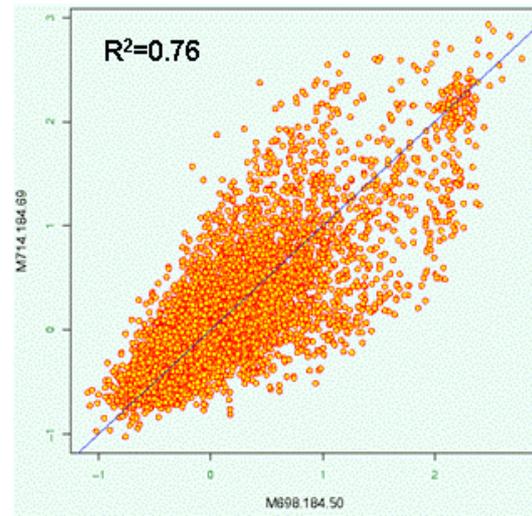
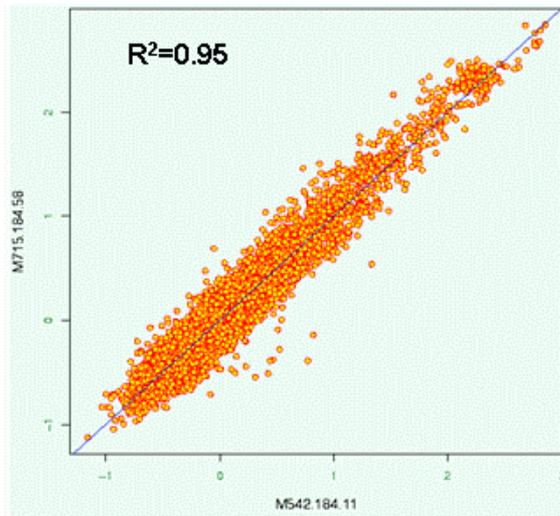


Figure III-12 : Représentation graphique de l'homogénéité d'hybridation entre membranes (dot plot); A : qualité d'hybridation satisfaisante ; **B :** qualité d'hybridation insuffisante des la membrane 69 (échantillon F-HE).

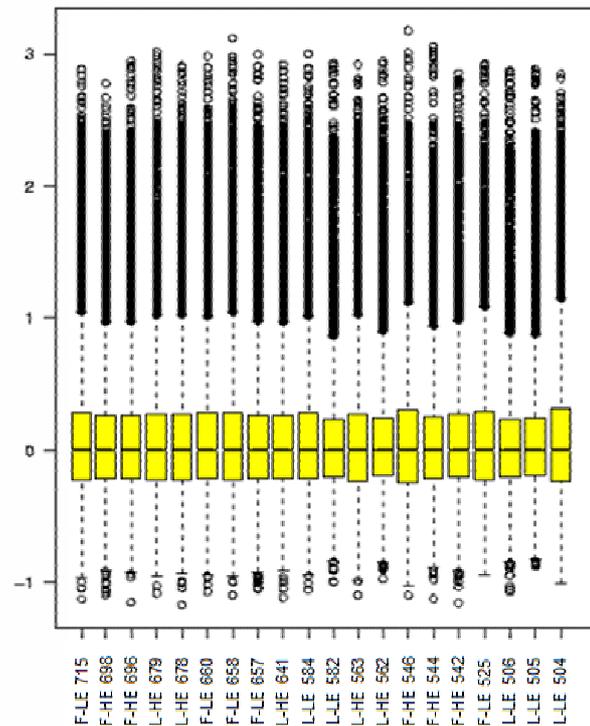
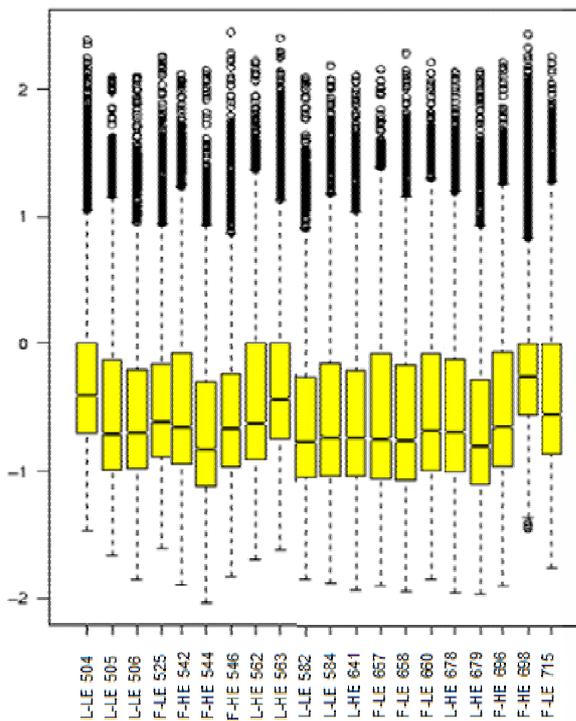


Figure III-13: Répartition des signaux log-transformés pour chaque hybridation (box plot) avant (A) et après normalisation (B).

III-3.2 Critères de choix et de traitement des données

III-3.1.1 Analyse du transcriptome musculaire

III-3.1.1.1 Contrôle de la qualité des membranes

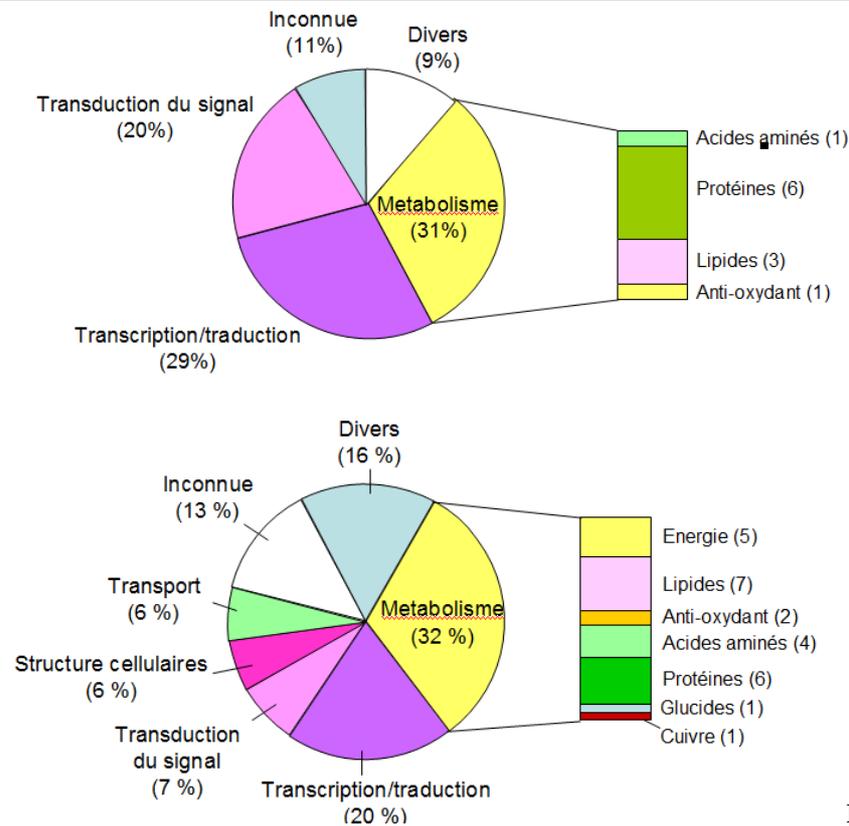
Suite à un problème technique au moment de l'hybridation, certaines membranes se sont révélées inexploitable pour l'analyse des données, avec une grande hétérogénéité de l'intensité des signaux. La comparaison deux à deux des valeurs d'intensité des signaux obtenus pour ces membranes révèle en effet un profil "éclaté" (exemple en figure III-12B). Au total 9 membranes présentaient ce profil atypique : 1 membrane L-HE, 2 membranes F-LE, 3 membranes L-LE et 3 membranes F-HE. Nous avons donc décidé d'exclure ces membranes de l'analyse. Nous avons également décidé d'homogénéiser la représentation de chaque condition expérimentale, comme nous l'avons fait pour le foie, en ne conservant que 5 membranes par condition expérimentale pour la suite des analyses. La figure III-13 représente, pour chacune des 20 membranes retenues, les boîtes à moustaches (ou box plot) des données brutes avant et après normalisation par la médiane de chaque membrane. La moyenne des signaux est proche de zéro suite à la normalisation, ce qui prouve l'efficacité de la méthode de normalisation pour ce jeu de données.

III-3.1.1.2 Analyses statistiques des données : choix de l'approche utilisée

Sur les de 9023 séquences qui ont été déposées sur les membranes, 7687 ont été retenues après filtrage des données d'après le signal oligo-vecteur (seuil fixé arbitrairement à 3 fois la valeur médiane des blancs présents sur chaque membrane). Les valeurs d'intensité de ces 7687 transcrits ont été soumises aux analyses statistiques suivantes, en utilisant 5 membranes par condition expérimentales préalablement sélectionnées d'après leur qualité d'hybridation. Le nombre de gènes significatifs identifiés en fonction du test statistique utilisé (ANOVA ou SAM) et des ajustements pour la correction de la multiplicité des tests (sans ajustement, Bonferroni ou Benjamini-Hochberg) est présenté dans le tableau III-8. Les listes complètes des gènes identifiés par le biais de ces différentes méthodes comme différentiellement exprimées en réponse à l'alimentation d'une part, et à la sélection d'autre part, sont présentées en annexe (tableaux VII-3 et VII-4).

Tableau III-8: Analyse du transcriptome musculaire : nombre de gènes sélectionnés et de faux positifs potentiels en fonction du test statistique et les ajustements utilisés.

tests statistiques et ajustements	Nombre de gènes significatifs (nombre de faux positifs potentiels)		
	Régime (R)	Sélection (S)	Interactions R*S
ANOVA ($\alpha=0,01$) sans correction	35 (35)	82 (77)	26 (26)
Bonferroni ($\alpha=0,01$)	0	0	0
Bonferroni ($\alpha=0,05$)	0	0	0
Benjamini-Hochberg (FDR=0,01)	0	0	0
Benjamini-Hochberg (FDR=0,05)	0	0	0
SAM (FDR=0)	2 (0)	3 (0)	ND
SAM (FDR<0,05)	2 (0)	4 (0)	ND
SAM (FDR<0,10)	2 (0)	12 (1)	ND
SAM (FDR<0,15)	2 (0)	12 (1)	ND
SAM (FDR<0,20)	2 (0)	16 (3)	ND



F

Figure III-14: transcriptome musculaire : proportion des différentes catégories fonctionnelles représentées par les gènes identifiés à l'issue de l'ANOVA ($\alpha=0,01$, sans ajustement). A : effet du régime alimentaire ; B : effet de la sélection génétique.

III-3.1.1.2.1 ANOVA sans ajustement

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

Sur les 7687 gènes analysés par ANOVA ($P < 0,01$), seuls 35 présentent une expression différentielle significative entre régime : 15 sont surexprimés et 20 sous exprimés chez les poissons nourris avec l'aliment HE par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE. Sur ces 35 gènes différentiellement exprimés de façon significative, 31 ont une fonction biologique connue. Parmi ceux-ci, 11 (soit environ 31% des gènes différentiellement exprimés) sont impliqués dans des voies métaboliques, 10 (29%) dans la régulation de la transcription ou de la traduction, 7 (20%) dans la signalisation cellulaire, les autres gènes se répartissant dans des fonctions cellulaires diverses (Figure III-14A). Parmi ces transcrits, deux nous ont semblé particulièrement intéressant du fait de leur implication dans le captage des lipides plasmatiques par les cellules : il s'agit du transcrit codant pour le récepteur au VLDL (VLDL-R) et celui codant pour la translocase des acides gras (fatty acid translocase [FAT/CD36]). Ces deux transcrits sont significativement plus abondants dans le muscle des truites nourries avec l'aliment HE que dans celui des truites nourries avec l'aliment LE.

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

D'après l'ANOVA ($P < 0,01$) réalisée sur les 7687 gènes retenus pour l'analyse, 82 sont significativement exprimés de façon différentielle entre lignées, 60 étant surexprimés et 22 étant sous-exprimés chez les truites de lignée F par rapport à celles de lignées L. Sur ces 82 gènes différentiellement exprimés, 77 ont une fonction biologique connue. Parmi ceux-ci, 26 (32% des gènes différentiellement exprimés) sont impliqués dans des processus métaboliques, 16 (20%) dans la régulation de la transcription ou de la traduction, 6 (7%) dans la transduction de signaux cellulaires, les autres opérant dans des processus cellulaires divers (Figure III-14B).

Etude des interactions régime x lignée

Dix-neuf transcrits impliqués dans une interaction (régime x lignée) significative ont été identifiés. Sur ces 19 transcrits, 4 n'ont pas d'homologie significative dans les banques de données, 2 codent pour des enzymes impliquées dans des voies métaboliques, 2 pour des protéines impliquées dans le transport membranaire intracellulaire, 6 codent pour des facteurs de transcription.

III-3.1.1.2.2 ANOVA avec ajustement de Bonferroni

Aucun gène différemment exprimé de façon significative entre régimes ou entre lignées n'a été identifié à l'issue de l'ANOVA corrigée par la méthode de Bonferroni ($\alpha'=0,05$). Aucune interaction régime x lignée significative n'a été révélée par cette méthode.

III-3.1.1.2.2 ANOVA avec ajustement de Benjamini-Hochberg (FDR=0,05)

Comme pour la méthode précédente, aucun effet significatif du régime ou de la sélection n'a été mise en évidence à l'issue de l'ANOVA avec ajustement de la p-value par la méthode de Benjamini-Hochberg. Il en est de même pour les interactions entre l'aliment et la sélection génétique.

III-3.1.1.2.4 Significance analysis of microarray (SAM)

Effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes

Seuls 2 transcrits ont été identifiés comme significativement exprimés de façon différente entre régimes alimentaires par cette méthode. Ces deux transcrits, moins abondants dans le muscle des truites nourries avec l'aliment HE que dans celui des truites nourries avec l'aliment LE, codent pour deux facteurs de transcription (Transcription factor 21 et Hox-2Ab).

Effet de la sélection génétique sur l'expression des gènes

Douze transcrits sont ainsi identifiés comme différentiellement exprimés entre lignées en choisissant un FDR de 10% (8 étant surexprimés et 2 sous-exprimés chez les truites de la lignée F par rapport à celles de la lignée L), et parmi lesquels 11 figurent également dans la liste de gènes significatifs identifiés par l'ANOVA ($p<0,01$). Au total, 3 transcrits codent pour des facteurs de transcription (protéine Hox-2Ab, facteur de transcription Y) ou de traduction (facteur d'initiation de la traduction eIF-3 δ), 3 codent pour des protéines impliquées dans des processus divers (transport de l'oxygène: α -globine; protéine associée au récepteur au GABA; défense de la cellule: neutrophil NADPH oxidase factor 2), 2 sont impliqués dans des voies métaboliques (la sous unité 3 de la COX, et la L-kynurenine hydrolase, impliquée dans le catabolisme des acides aminés) et 3 ont une fonction biologique inconnue. En augmentant le FDR à 20%, 4 transcrits supplémentaires sont sélectionnés, mais au prix d'un enrichissement en faux positifs relativement élevé, puisque 3 de ces 4 transcrits sont susceptibles d'être des faux positifs.

III-2.1.1.3 Contrôle indépendant des résultats par RT-PCR en temps réel

Nous avons décidé de contrôler, par RT-PCR en temps réel, l'expression différentielle de gènes qui nous semblaient particulièrement intéressants parmi ceux identifiés comme étant significativement exprimés de façon différente entre régimes d'une part, et entre lignées d'autre part, à l'issue de l'ANOVA ($p < 0,01$, sans ajustement).

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre régimes alimentaires, nous avons décidé d'analyser les transcrits codant pour :

- la translocase des acides gras (FAT/CD36), impliquée dans le transport des acides gras libres (AGL) circulants à travers la paroi de l'endothélium vasculaire et la membrane plasmique des cellules.

- le récepteur aux VLDL (VLDL-R), impliqué dans le captage des lipoprotéines riches en TG comme les VLDL et les chylomicrons par les tissus périphériques comme le cœur, les muscles striés squelettiques et les tissus adipeux.

- la serine déshydratase SDS, impliquée dans le catabolisme des acides aminés, en catalysant la transformation de la sérine en pyruvate.

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre lignées, nous avons choisi d'analyser les transcrits codant pour :

- le facteur de transcription PPAR α , qui joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme lipidique, en contrôlant notamment l'expression des principales enzymes du catabolisme des acides gras. A noter que la séquence du transcrit identifié comme différentiellement exprimé dans cette étude (Genbank : BX300814) n'est pas la même que celle du transcrit de PPAR α analysé dans le cadre de notre étude « gène candidat » (Genbank : AY494835).

- la carboxyl ester lipase (CEL), enzyme pancréatique aussi connue sous le nom de lipase activée par les acides biliaires. Cette enzyme hydrolyse les esters de cholestérol d'origine alimentaire, libérant ainsi du cholestérol et des acides gras libres. Cette enzyme est normalement exprimée au niveau du pancréas et de l'intestin. Dans une étude portant sur la comparaison du transcriptome musculaire entre deux races de porcs, Duroc et Taoyuan, le transcrit de la CEL a été détecté dans le tissu musculaire avec un niveau d'expression plus élevé dans le muscle de la race chinoise que dans celui de la race Duroc (Lin et Hsu, 2005).

Nous avons donc pensé que ce transcrit pouvait être potentiellement un bon candidat, voir un marqueur de la teneur en lipides musculaire.

- l'ATP/ADP translocase (ADT), impliquée dans le métabolisme énergétique mitochondrial.

III-3.3 Principaux résultats

III-3.3.1 Effet de l'apport énergétique alimentaire

- Peu de gènes significatifs ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés entre les deux régimes à l'issue de l'analyse statistique des données par ANOVA ($P < 0,01$).

*☞ Le faible de nombre de gènes différentiellement exprimés entre régimes identifiés par notre analyse du transcriptome musculaire est cohérent avec les résultats obtenus dans le cadre de notre première étude : **un apport alimentaire plus élevé en lipides et en énergie aurait peu d'effets sur le métabolisme musculaire.***

- Parmi les transcrits identifiés, deux transcrits codant pour des protéines membranaires impliquées dans le captage des lipides plasmatiques (le récepteur au VLDL [VLDL-R] et la translocase des acides gras [FAT/CD36]) sont significativement plus abondants dans le muscle des truites nourries avec l'aliment HE que dans celui des truites nourries avec l'aliment LE. L'analyse en RT-PCR en temps réel de ces transcrits a confirmé ces résultats ($P = 10^{-3}$ et 10^{-4} , respectivement).

☞ L'expression plus élevée des gènes codant pour le VLDL-R et la FAT/CD36 chez les truites nourries avec l'aliment HE coïncide avec une teneur en lipides musculaires plus élevée chez ces poissons par rapport à ceux nourris avec l'aliment LE.

- Le niveau d'expression plus faible de la sérine déshydratase (SDS) chez les truites nourries avec l'aliment HE que chez celles nourries avec l'aliment LE, observé en transcriptome, est confirmé en RT-PCR en temps réel ($P < 10^{-4}$). Cette plus faible expression de SDS chez les truites nourries avec l'aliment HE est accompagnée d'une plus faible expression de gènes codant pour des enzymes intervenant dans la protéolyse (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2 [UBP2], Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 [*uchl1*], 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 [PSD7])

☞ Ces données suggèrent une diminution du catabolisme des protéines et des acides aminés dans le muscle en réponse à un apport alimentaire en lipides plus élevé. Ces

résultats sont en accord avec les performances de croissance plus importantes et la meilleure efficacité protéique observées chez les poissons nourris avec l'aliment HE, et refléteraient les mécanismes sous-jacents du phénomène d'épargne des protéines par les lipides.

III-3.3.1 Effet de la sélection

- Nous n'avons pas obtenu d'amplification suffisante des transcrits *ppara* et *cel* en RT-PCR en temps réel, signe que ces transcrits sont très faiblement exprimés dans nos échantillons. Il se peut que le signal détecté en microarray pour ces deux transcrits soit le résultat d'un phénomène d'hybridation non spécifique.
- Le niveau de transcrit des gènes codant pour l'ICDH, la COX3 et l'ADT est significativement plus élevé chez les truites de la lignée F que chez celles de la lignée L. L'expression plus élevée de l'ATP/ADP translocase chez les truites de la lignée F est confirmée par l'analyse de ce transcrit en RT-PCR en temps réel ($P < 10^{-4}$).

☞ Ces résultats suggèrent une production d'ATP par le métabolisme énergétique mitochondrial plus élevée dans le muscle des truites de la lignée F que dans celui des truites de la lignée L. Cette production d'ATP plus importante pourrait résulter d'une activité glycolytique plus élevée dans le muscle des individus de L lignée F que dans celui des truites de la lignée L, comme le suggère les résultats de l'approche "candidat" (publication n°1).

- L'analyse en RT-PCR en temps réel des transcrits *fat/cd36* et *vldlr* a révélé que ces transcrits étaient significativement plus abondants dans le muscle des truites de la lignée F que dans celui de la lignée L ($P < 5 \cdot 10^{-3}$ et $< 10^{-2}$, respectivement). Cet effet significatif de la sélection génétique sur l'expression de ces deux gènes n'a pas été mis en évidence par l'approche transcriptome.

☞ Comme pour l'effet de l'alimentation, l'expression plus élevée des gènes codant pour le VLDL-R et la FAT/CD36 chez les truites de la lignée F coïncide avec une teneur en lipides musculaires plus importante chez les individus de cette lignée par rapport à celles de la lignée L

III-3.4 Principales conclusions

➤ Les résultats fournis par l'analyse du transcriptome musculaire confortent la conclusion faite à l'issue de l'analyse du métabolisme musculaire par approche «candidat», puisque, là encore, peu de gènes impliqués dans le métabolisme ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les deux régimes. ***La plus forte teneur en lipides observés dans le muscle des individus nourris pendant six mois avec l'aliment riche en lipides serait essentiellement liée à un apport plus important de lipides alimentaires plutôt qu'à une modification des voies métaboliques dans ce tissu.***

➤ Très peu d'interactions significatives entre les effets du régime et ceux de la sélection génétique ont été observées sur le transcriptome musculaire. Comme pour le foie, il semble donc que ***ces deux facteurs agissent de façon indépendante sur les différents acteurs impliqués dans ces voies métaboliques, non seulement au niveau du foie, mais également au niveau du muscle***

➤ Ces analyses ont permis d'identifier deux candidats particulièrement intéressants pour expliquer les différences de teneur en lipides musculaires induites par l'alimentation et la sélection génétique: le récepteur aux VLDL (VLDL-R) et la translocase des acides gras (FAT/CD/36). ***Cet effet exercé à la fois par un apport alimentaire plus riche en lipide et par la sélection génétique en faveur d'un indice d'adiposité musculaire plus élevé sur ces deux transporteurs membranaires des acides gras circulants suggère que ce sont des marqueurs potentiels de l'engraissement musculaire. Il conviendra de rechercher l'existence d'une corrélation entre l'expression de ces gènes et la teneur en lipides de différents échantillons de muscle.***

Chapitre IV

- Discussion générale –

La maîtrise de la répartition des lipides entre les différents compartiments corporels des poissons, en particulier les parties consommables et non consommables, constitue un enjeu majeur pour les producteurs. Cette maîtrise ne pourra être obtenue qu'avec une meilleure connaissance des mécanismes qui contrôlent la dynamique des dépôts lipidiques.

De nombreuses études ont montré que la composition corporelle du poisson pouvait être modifiée par l'alimentation, notamment par la composition du régime alimentaire et son contenu énergétique (Shearer *et al.*, 1997; Jobling *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2000; Médale *et al.*, 2003). Bien que ce soit la teneur en énergie digestible de l'aliment qui conditionne les dépôts lipidiques, il existe une relation étroite entre teneur en lipides de l'aliment et teneur en lipides corporels (Cowey, 1993; Kaushik, 1997) du fait de la densité énergétique des lipides. En particulier, les salmonidés ont une aptitude importante à stocker les lipides au niveau musculaire, et l'importance de ces dépôts peut être efficacement modulée par l'apport énergétique alimentaire (Einen *et al.*, 1998; Gélineau *et al.*, 2001; Robb *et al.*, 2002). Si les effets d'un apport plus important en lipides alimentaires sur l'activité des enzymes de la lipogénèse hépatique sont assez bien documentés chez les poissons, ceux exercés sur les autres voies métaboliques dans le foie et les autres tissus comme le muscle sont encore largement méconnus.

La sélection génétique constitue une autre voie pour contrôler l'engraissement chez les animaux d'élevage. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu par la sélection génétique dans le contrôle de la répartition des lipides corporels et la teneur en lipides intramusculaires restent une énigme chez les poissons comme chez la plupart des mammifères. Récemment, deux lignées de truite arc-en-ciel divergentes pour leur teneur en lipides musculaires ont été sélectionnées par l'INRA (Quillet *et al.*, 2005). Lorsque j'ai débuté ma thèse, aucune caractérisation métabolique de ces lignées n'avait été entreprise, et aucune indication sur les mécanismes à l'origine de ces différences de phénotype n'était par conséquent disponible.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires pouvant expliquer la différence de teneur en lipides musculaires observés en réponse à la sélection génétique et à l'alimentation énergétique. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle les deux lignées expérimentales sélectionnées par l'INRA et analysé leur réponse à des aliments pauvre ou riche en lipides. Nous avons d'abord utilisé une approche «candidats» pour tester des hypothèses émises sur des différences d'utilisation des nutriments. Afin d'élargir nos connaissances, nous avons ensuite procédé à une analyse différentielle de l'expression des gènes et des protéines en alliant des approches globales à l'échelle du transcriptome et du

protéome chez les alevins après 6 mois d'alimentation avec ou sans huile de poisson. Ces analyses ont porté sur le foie, carrefour métabolique et site de la lipogenèse, et le muscle blanc, tissu cible de la sélection.

Ces analyses devaient permettre:

- d'approfondir nos connaissances sur l'effet à long terme d'un apport alimentaire plus riche en lipides sur la régulation des principales voies métaboliques impliquées dans l'engraissement chez la truite arc-en-ciel,
- de caractériser pour la première fois au niveau moléculaire les différences métaboliques existant entre lignées,
- d'évaluer dans quelles mesures la sélection génétique et la valeur énergétique de l'aliment, utilisées pour moduler la teneur en lipides du muscle interagissent entre elles pour réguler les différentes voies métaboliques et contrôler les dépôts lipidiques dans le muscle.
- de déterminer si ces deux facteurs mettent en jeu les mêmes mécanismes pour moduler la teneur en lipides musculaires,
- éventuellement, d'identifier des marqueurs moléculaires potentiels de l'engraissement musculaire.

Dans ce chapitre, je réunirai l'ensemble des résultats obtenus au cours des différentes analyses pour dresser un bilan des connaissances acquises sur les différences d'expression induites à l'échelle des gènes et des protéines par ces deux facteurs. Ces résultats seront discutés à la lumière des connaissances acquises chez les poissons et les mammifères. Je terminerai enfin sur une discussion des intérêts et des limites des approches utilisées le cadre de ma thèse.

IV-1. L'intérêt et les limites du protocole expérimental

IV-1.1 Les aliments LE et HE

Une des principales difficultés rencontrées dans le cadre des études réalisées en nutrition est qu'il est impossible de changer la quantité d'un composant donné de l'aliment sans que la proportion relative des autres composants ne soit en même temps affectée. En conséquence, il est difficile d'attribuer précisément la cause d'un effet observé à la seule variation d'un composant particulier de l'aliment.

Les deux aliments expérimentaux utilisés dans le cadre de cette expérience ont été formulés de façon à obtenir de grandes différences de teneur en lipides de l'aliment. La différence majeure induite par l'ajout d'huile de poisson dans l'aliment HE porte sur la teneur en lipides (+135% dans l'aliment HE par rapport à l'aliment LE). Etant donné la plus forte valeur énergétique des lipides par rapport aux protéines et aux glucides, cette augmentation de la teneur en lipide dans l'aliment HE se répercute sur la valeur énergétique total de l'aliment, qui s'en trouve augmentée (+13.3% dans l'aliment HE comparé à l'aliment LE). En contrepartie, par effet de dilution, la proportion de glucides et de protéines est également modifiée (respectivement -23% et -11% dans l'aliment HE par rapport à l'aliment LE).

Dans notre étude, les différences observées entre les régimes LE et HE sur les différents paramètres étudiés peuvent donc être dues aux variations:

- du taux de lipides alimentaires
- de la teneur en énergie brute de l'aliment
- du rapport AGPI n-3/ AGPI n-6
- de la teneur en protéines digestibles
- de la teneur en glucides digestibles

Cependant, étant donné que l'amplitude de la différence de teneur en lipides existant entre l'aliment LE et HE est bien plus élevée que celles des autres nutriments, la différence de teneur en lipides entre les deux régimes est susceptible d'être à l'origine de la plupart des effets observés. L'interprétation des différents résultats présentés dans ce manuscrit a été faite sur la base des connaissances déjà acquises chez les poissons et les autres espèces animales, tout en ayant à l'esprit les différences de teneur des autres composants de l'aliment.

Une autre approche possible aurait été d'utiliser la méthode de l'alimentation appariée (*pair-feeding*). Cette méthode consiste à ajuster la quantité d'aliment distribué en fonction de la quantité de protéines et de glucides contenus dans chaque aliment de manière à éliminer tout

changement d'apport de nutriments autre que les lipides. On peut citer en exemple l'article de Panserat *et al.* (2008), dans laquelle je figure parmi les auteurs et qui est disponible en annexe. Par cette méthode, si les poissons des deux groupes alimentaires reçoivent bien la même quantité de protéines et de glucides, la quantité de lipides ingérés n'est pas le seul paramètre à être modifiée entre les deux groupes alimentaires, puisque la quantité d'aliment (et d'énergie) ingérée par le groupe nourris avec l'aliment plus riche en lipides doit-être nécessairement supérieure à celle ingéré par le groupe nourri avec l'aliment pauvre en lipides. Cette méthode de distribution des aliments implique qu'au moins l'un des groupes soit en restriction énergétique alimentaire.

Il n'existe donc pas d'approche idéale en nutrition, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients.

IV-1.2 Temps de prélèvement

L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier les effets d'une alimentation "à long terme" riche en lipides sur les voies métaboliques impliquées dans l'utilisation de l'énergie, et non pas la réponse ponctuelle à un repas de contenu énergétique plus élevé. Les prélèvements de sang et de tissus ont été effectués 24 heures après le dernier repas afin de se placer dans des conditions d'équilibre physiologique et de s'affranchir des variations liées à la digestion et à l'absorption des différents nutriments.

Cependant, l'absence de différence constatée pour un gène ou une enzyme donnée à un temps t ($t=24$ heures dans notre étude) ne nous permet pas d'affirmer que ce gène ou cette protéine n'est pas affectée par le contenu énergétique alimentaire. En effet, une réponse plus précoce au cours de la période postprandiale, et qui n'est donc plus détectable 24 heures après le repas, reste possible. Des analyses à différents temps après le repas auraient apporté d'autres connaissances, mais n'étaient pas réalisables dans le temps imparti pour réaliser une thèse.

IV-2 Effet de l'apport énergétique alimentaire

IV-2.1 Effet de l'apport énergétique alimentaire sur les performances de croissances

De nombreuses études ont démontré l'effet bénéfique de régimes riches en énergie sur la croissance ainsi que sur l'efficacité alimentaire et protéique des poissons (Lee and Putnam, 1973; Kaushik et Oliva-Teles, 1985; Beamish et Medland, 1986; Arzel *et al.*, 1994; Dias *et al.*, 1998; 1999). Conformément à ces observations, dans notre étude, un apport en lipides plus important a permis d'obtenir une meilleure efficacité alimentaire, un meilleur rapport d'efficacité protéique ainsi que de meilleures performances de croissance de la part des poissons, avec un gain journalier en poids et une longueur accrue. Cet effet est généralement attribué à un phénomène d'épargne des protéines par les sources énergétiques non protéiques de l'aliment, notamment les lipides, les protéines étant alors moins métabolisées comme substrat énergétique et mieux utilisées pour la croissance. Cependant, ce phénomène a jusqu'à présent été évalué de façon indirecte, à travers l'augmentation du coefficient de rétention protéique et la diminution des rejets azotés (Lee et Putnam, 1973; Kaushik et Oliva-Teles, 1985; Beamish et Medland, 1986), mais pas au niveau des mécanismes moléculaires, à travers la régulation de l'expression ou de l'activité des principales enzymes du catabolisme des acides aminés et des protéines, ou de la β -oxydation des acides gras. Nous verrons plus loin que les analyses réalisées dans le cadre de ma thèse ont permis d'apporter des indications sur la modulation de ces voies métaboliques par l'apport alimentaire en lipides.

IV-2.2 Effet de l'apport énergétique alimentaire sur la composition corporelle des poissons

Quelle que soit l'origine génétique des poissons, la composition corporelle des poissons a été significativement modifiée par le régime alimentaire. Le régime riche en énergie a entraîné une augmentation de la teneur en lipides corporels (+61% chez les truites de lignée L, et +40% chez celles de lignée F) avec une diminution concomitante de la teneur en eau (-6,8% et -4,3%) et en protéines (-9,8% et -8,3%). Il est aujourd'hui bien établi qu'un apport alimentaire riche en énergie favorise l'engraissement global des poissons (Shearer, 1994; Jobling *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2000), mais que ce sont surtout les sites préférentiels de l'espèce qui sont affectés. Ainsi, chez les salmonidés, comme la truite arc-en-ciel, l'augmentation du dépôt des lipides de réserve se fait surtout au niveau du tissu adipeux périvercéral, mais aussi au niveau du muscle, au sein d'adipocytes dispersés entre les fibres musculaires (Sheridan, 1994;

Zhou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Par rapport à l'aliment sans huile ajoutée, l'aliment avec huile a augmenté l'indice viscéro-somatique (de 49% chez les truites de lignées L et de 43% chez les truites de lignée F), ainsi que la teneur en lipides des filets (+ 49% chez les truites de lignée L et +60% chez les truites de lignée F).

Les différences importantes de teneur en lipides corporels induites par les régimes semblent liés en grande partie à la différence de quantité de lipides ingérés quotidiennement par les truites nourries avec les aliments expérimentaux (+135% de lipides chez les truites nourries avec l'aliment HE par rapport à celles nourries avec l'aliment LE), du fait de la relation étroite existant entre la teneur en lipides de l'aliment et teneur en lipides corporels (Cowey, 1993; Kaushik, 1997).

IV-2.3 Effet de l'apport énergétique alimentaire sur la concentration en métabolites plasmatiques

Le taux de triglycérides plasmatiques, mesuré 24 heures après le dernier repas, était significativement plus faible chez les poissons nourris avec l'aliment avec huile par rapport à ceux nourris avec l'aliment sans huile ajoutée, malgré la quantité de lipides plus importante ingérée par ces poissons. L'effet hypolipidémiant exercé par les AGPIs n-3, dont la teneur est plus élevée dans l'aliment HE que dans l'aliment LE, est plutôt bien documenté chez les mammifères (Nestel *et al.*, 1984; Beynen et Katan, 1989; Harris, 1989; Yaqoob, *et al.*, 1995, Volek *et al.*, 2000), mais n'a pas été démontrée chez les poissons. Chez ces derniers, l'effet d'un apport alimentaire plus élevé en huile de poissons, particulièrement riche en AGLPI n-3, sur la teneur en lipides plasmatiques reste très controversée, la concentration en triglycérides plasmatiques mesurée 24 après heures le repas étant soit non significativement modifiée (Regost *et al.*, 2001 ; Torstensen *et al.*, 2001), soit augmentée (Panserat *et al.*, 2002), soit diminuée dans le cas de notre étude. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des différences interspécifiques, par une différence de taille des poissons (600g en moyenne pour le saumon Atlantique dans l'étude de Tortensen *et al.*, contre 75 g en moyenne dans notre étude), ou encore une différence dans la durée des expériences (8 semaines dans l'étude sur la truite arc-en-ciel de Panserat *et al.*, 12 semaines dans l'étude sur le turbot de Regost *et al.*, contre 24 semaines dans notre expérience).

IV-2.4 Effet de l'apport énergétique alimentaire sur le métabolisme hépatique

Les résultats obtenus par le biais des différentes approches utilisées au cours du projet (approches « candidats », transcriptome et protéome) nous ont fourni de précieuses

informations concernant la régulation des principales voies métaboliques hépatiques par la teneur en lipides alimentaires. Si certains confortent des résultats déjà observés chez les poissons en général, notamment en ce qui concerne la régulation de la lipogénèse hépatique et de la désaturation des acides gras, la plupart apportent des connaissances nouvelles.

Les résultats obtenus confirment l'effet inhibiteur d'un apport en lipides plus important (>10%) sur l'activité des principales enzymes de la lipogénèse hépatique (ACC, AGS, G6PD et EM), déjà observé chez diverses espèces de poissons (Likimani *et al.*, 1982; Arnesen *et al.*, 1993; Shimeno *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1998; 1999; Gélineau *et al.*, 2001 ; Rollin *et al.*, 2003), mais sur des poissons de plus grande taille. Cette étude montre par ailleurs que la teneur en lipides de l'aliment n'influe pas sur la quantité de transcrits codant pour l'AGS, du moins 24 heures après le dernier repas, ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle de l'AGS chez les poissons, contrairement à ce qui est communément décrit chez les mammifères (Jump *et al.*, 1994; 1999). Ceci devra être vérifié par des analyses de cinétique postprandiale de l'expression de l'AGS.

L'analyse du transcriptome, entreprise dans le cadre de notre étude, a montré que la teneur en lipides de l'aliment affectait également le niveau de transcrits codant pour la G6PDH et la 6-PGDH, qui sont les deux enzymes limitantes du cycle des pentoses phosphates, et principaux fournisseurs de NADPH pour la synthèse de novo des acides gras chez la truite arc-en-ciel (Alvarez *et al.*, 1998; Barroso *et al.*, 1998; Gélineau *et al.*, 2001). Les résultats de l'analyse en RT-PCR en temps réel de ces transcrits confirment une diminution du niveau d'ARNm de ces deux enzymes chez les truites ayant reçu l'aliment plus riche en lipides, en accord avec la diminution de l'activité des différentes enzymes de la lipogénèse mesurées dans le cadre de notre approche « candidats ». La diminution de l'activité de la G6PDH en réponse à l'augmentation de l'apport alimentaire en lipides est ainsi accompagnée d'une diminution concomitante de son niveau d'ARNm, suggérant une régulation transcriptionnelle (du moins en partie) de cette enzyme en fonction de la teneur en lipides de l'aliment, ce qui est contraire à ce qui a été décrit chez le rat (Hodge et Salati, 1997; Stabile *et al.*, 1998).

Le régime additionné d'huile de poisson conduit à une diminution du niveau de transcrit codant pour la $\Delta 6$ -désaturase (D6D), enzyme limitante de la synthèse des AGLPI à partir des acides linoléique et linoléique. L'huile de poisson contenue dans cet aliment est particulièrement riche en AGLPI n-3, et de nombreuses études ont montré que l'ingestion d'aliments riches en AGLPI n-3 diminuait l'expression de la $\Delta 5$ - et de la $\Delta 6$ -désaturase au niveau hépatique, et ce, chez les mammifères (Cho *et al.*, 1999) comme chez les poissons, en particulier les salmonidés (Seiliez *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2004; Jordal *et al.*, 2005).

Conformément aux observations faites chez le saumon atlantique (Menoyo *et al.*, 2003), les résultats obtenus dans le cadre de l'approche « candidat » suggèrent une stimulation de la β -oxydation hépatique des acides gras par un apport plus important en lipides alimentaires, avec notamment une activité spécifique de l'HOAD plus élevée. De plus, nos données montrent un niveau de transcrite plus important pour l'ACO, enzyme clé de la β -oxydation péroxysomale des AGPLI, ainsi que pour les isoformes a et b de la CPTI, enzyme limitante de la β -oxydation mitochondriale, chez les individus nourris avec l'aliment plus riche en lipides. Cette étude est la première à avoir analysé l'expression des quatre isoformes de la CPTI connues à ce jour chez la truite arc-en-ciel. Elle montre notamment que ces différentes isoformes sont toutes exprimées dans le foie des truites, mais que, du moins au niveau transcriptionnel, celles-ci ne répondent pas de la même façon à un apport alimentaire plus riche en AG, et notamment en AGPLI n-3. Ainsi, contrairement aux isoformes a et b, l'expression de l'isoforme d ne semble pas affectée par l'apport en lipides alimentaires.

Chez les mammifères, il a été clairement démontré que la CPTI et l'ACO étaient exprimées sous le contrôle direct du facteur de transcription PPAR α au niveau du foie, notamment par l'utilisation d'agonistes/antagonistes synthétiques et spécifiques de PPAR α ou encore d'animaux invalidés pour ce gène (Gulick *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1995; Brandt *et al.*, 1998). En revanche, aucune étude comparable à celle menées chez les mammifères n'a encore été réalisée chez les poissons pour démontrer l'implication directe de PPAR α dans l'induction des principales enzymes de la β -oxydation. Dans notre étude, aucune différence d'expression des facteurs de transcription PPAR α et PPAR β n'a été observée en réponse à une alimentation à long terme plus riche en lipides. Cependant, il a été montré chez les mammifères que la modulation de la transcription des gènes cibles par les PPARs dépendait surtout de leur activation post-transcriptionnelle par les acides gras, en particulier les AGPI n-3 (Jump et Clarke, 1999). L'expression plus élevée de l'ACO et des CPTI a et b en réponse à un apport alimentaire plus riche en lipides, et notamment en AGPI n-3, a donc pu se faire via une activation plus importante de PPAR α , et peut-être de PPAR β , indépendamment du niveau d'expression de ces gènes.

L'analyse du transcriptome et du protéome hépatique a montré que trois protéines impliquées dans le transport intracellulaire des lipides étaient moins exprimées dans le foie en réponse à un apport alimentaire plus élevé en lipides : l'acétyl-CoA binding protein (ACBP) et deux protéines correspondant à la forme cardiaque de la protéine de liaison aux acides gras

(H-FABP). L'ACBP est une protéine intracellulaire qui se lie de façon très spécifique aux esters d'acyl-CoA à chaînes moyennes et longues (Rasmussen *et al.*, 1990). Chez les mammifères, l'expression de l'ACBP est particulièrement élevée dans les hépatocytes, dans les cellules stéroïdogéniques et dans les adipocytes. Des études menées chez la levure et la souris (Gaigg *et al.*, 2001; Sandberg *et al.*, 2005) suggèrent que l'ACBP pourrait jouer un rôle dans la synthèse et l'estérification des acides gras à très longue chaîne, et que son expression est régulée à la fois par PPAR α et par SREBP1-c, facteur de transcription essentiel à l'induction par l'insuline de l'expression des principales enzymes de la lipogénèse dans les hépatocytes (Sandberg *et al.*, 2005). L'ACBP partage notamment cette caractéristique avec d'autres enzymes telles que la Δ -5 désaturase et la Δ -6 désaturase (Matzuzaka *et al.*, 2002), du moins chez les mammifères.

Plus surprenante était *a priori* l'expression de l'H-FABP dans le foie des truites. Les FABPs constituent une famille de petites protéines, pour la plupart cytosoliques, impliquées dans le transport intracellulaire des AGL et du cholestérol. Chez les mammifères, l'H-FABP est abondamment exprimée dans des tissus oxydatifs comme le cœur, les muscles squelettiques oxydatifs et le rein (Heuckeroth *et al.*, 1987). Chez des souris transgéniques invalidées pour le gène de l'H-FABP, une diminution du captage et de l'oxydation mitochondriale des acides gras a été observée dans le cœur et le muscle squelettique strié (Binas *et al.*, 1999; Binas *et al.*, 2003), ce qui a conduit à lui attribuer un rôle dans le transport et l'orientation des AG vers les sites d'oxydation intracellulaire des acides gras. De nombreuses autres études menées chez les mammifères vont dans ce sens (Glatz et Vusse, 1996; Hertz et Bernlohr, 2000; Brandstetter *et al.*, 2002; Gondret *et al.*, 2004). Chez les poissons, un transcrite présentant une forte homologie de séquence avec l'H-FABP mammalienne a été cloné et séquencé pour la première fois dans le cœur de la truite arc-en-ciel (Ando *et al.*, 1998), puis dans le cœur de quatre espèces de poissons de l'océan Antarctique (*Chaenocephalus aceratus*, *Cryodraco antarcticus*, *Gobionothus gibberifrons* et *notothenia coriiceps*) (Vayda *et al.*, 1998). Le niveau de conservation élevé observé entre ces séquences et celle de l'H-FABP mammalienne suggère que cette protéine pourrait exercer les mêmes fonctions chez les poissons que chez les mammifères. Chez le saumon Atlantique, l'expression de l'H-FABP dans le muscle rouge, au métabolisme de type oxydatif, est plus élevée que dans le muscle blanc, au métabolisme de type glycolytique. Elle est également corrélée au taux de β -oxydation totale des acides gras au cours du cycle de vie (Jordal *et al.*, 2006). Cependant, et contrairement aux mammifères, une expression élevée de l'H-FABP a également été détectée au niveau de tissus fortement lipogéniques, comme le foie et les ovocytes, chez certaines espèces de poissons tels que le

poisson zèbre, la lamproie et le choquemort (*Fundulus heteroclitus*) (Baba *et al.*, 1999; Bain, 2002; Liu *et al.* 2003), suggérant que, chez ces espèces, l'H-FABP joue un rôle de transport des AGL vers les sites d'élongation, de désaturation et/ou d'estérification des lipides au niveau de ces tissus. Dans notre étude (publication n°2) deux isoformes d'H-FABP ont été détectées dans le foie de la truite arc-en-ciel tant au niveau du transcriptome qu'au niveau du protéome, les deux approches se confortant mutuellement. C'est la première fois que la présence d'H-FABP est détectée au niveau du foie chez la truite arc-en-ciel. C'est aussi la première fois que deux isoformes de l'H-FABP sont observés chez des vertébrés. Le niveau d'expression plus faible des deux isoformes de l'H-FABP observé au niveau du foie chez les truites nourries avec l'aliment riche en lipides coïncide avec une diminution de l'activité et de l'expression des principales enzymes de la lipogénèse, et avec une augmentation de l'activité et de l'expression des principales enzymes de la β -oxydation mitochondriale et péroxysonale des AG. Ceci conforte l'hypothèse émise par Liu *et al.* (2003) selon laquelle la H-FABP, en plus de participer à l'oxydation des acides gras dans des tissus comme le muscle ou le cœur, jouerait également un rôle dans la synthèse endogène des lipides dans les tissus lipogéniques chez les poissons. Ceci pourrait également expliquer la présence en quantité non négligeable de l'H-FABP au niveau de la glande mammaire des mammifères (Sprecht *et al.*, 1996). Une étude récente a d'ailleurs montré que l'expression de l'H-FABP était augmentée lors de la lactation chez le bovin, et que cet isotype exerçait un rôle prédominant dans l'estérification des AG par rapport à la forme adipocytaire de la protéine de liaison aux acides gras (A-FABP) (Bionaz et Loo, 2008).

La H-FABP pourrait donc jouer un rôle plus général dans le transport des lipides intracellulaires, dont l'orientation vers les voies oxydatives ou les voies d'estérification dépendrait du contexte cellulaire du tissu considéré.

L'étude combinée du transcriptome et du protéome hépatique nous a par ailleurs permis d'obtenir des informations complémentaires concernant l'effet de l'apport en lipides sur le métabolisme des protéines et des acides aminés dans le foie. En effet, d'après les résultats fournis par l'analyse du protéome, la GDH et l'alanine : glyoxylate aminotransférase (AGX, également connue sous la dénomination d'ALAT), deux enzymes impliquées dans la transdésamination des acides aminés, étaient moins abondantes dans le foie en réponse à un apport alimentaire plus élevé en lipides. Ces enzymes, et surtout la GDH, sont considérés comme des indicateurs majeurs de l'utilisation métabolique des acides aminés d'origine alimentaire. De plus, l'expression de certains transcrits codant pour des enzymes impliquées

dans la protéolyse par voie du protéasome était également plus faible chez les poissons nourris avec l'aliment HE, riche en lipides et en énergie, mais moins riche en protéines, a également été mis en évidence par l'analyse du transcriptome hépatique. Les poissons se distinguent de la plupart des vertébrés terrestres par une forte capacité à utiliser les protéines et les acides aminés comme substrat oxydatif pour la couverture de leur besoin énergétique (Van Waarde, 1983; Van den Thillart, 1986; Dabrowski et Guderley, 2002). Cependant, de nombreuses études ont montré qu'une augmentation de l'apport alimentaire en lipides permettait de diminuer l'utilisation des protéines alimentaires pour la fourniture d'énergie au profit de la croissance, l'oxydation des lipides servant alors de pourvoyeurs d'énergie préférentiels (Takeuchi *et al.*, 1978 ; Hillestad, 1994). Ces résultats sont en accord avec la meilleure efficacité protéique et les meilleures performances de croissances observées chez les poissons ayant reçu l'aliment HE. C'est, à notre connaissance, la première fois que ce phénomène est mis en évidence au niveau moléculaire, via la diminution de l'expression d'enzymes clé de l'oxydation des acides aminés, et probablement de la protéolyse, mais aussi l'augmentation de la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras dans le foie de ces poissons, comme le suggèrent les résultats de notre première approche.

Les résultats obtenus confirment qu'un apport alimentaire plus important en lipides, et notamment en AGPI n-3, diminue l'activité des principales enzymes de la lipogénèse, et diminue l'expression de la delta-6-désaturase dans le foie des truites arc-en-ciel. Ils suggèrent également qu'un apport alimentaire plus important en lipides augmente l'expression des principales enzymes impliquées dans la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras, et diminue l'expression des enzymes contrôlant le catabolisme des acides aminés au niveau du foie chez cette espèce.

IV-2.5 Effet de l'apport énergétique alimentaire sur le métabolisme musculaire

Dans ce tissu, peu de différences ont été mises en évidence entre régimes expérimentaux concernant l'activité et l'expression des principales enzymes du métabolisme testées dans notre approche «candidats». Cette observation est d'ailleurs confortée par les résultats obtenus par analyse du transcriptome musculaire, puisque, là encore, peu de gènes impliqués dans le métabolisme ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les deux régimes.

La LPL est généralement décrite comme étant l'enzyme limitante du captage des lipides par les tissus extra-hépatiques comme le muscle et les tissus adipeux. Cependant, aucune différence d'activité ou d'expression de la LPL n'a été mise en évidence dans cette étude au niveau du muscle entre les régimes expérimentaux, bien qu'une alimentation à forte teneur en

lipides pendant plusieurs mois ait conduit à une augmentation du stockage des lipides au niveau musculaire. Les mesures ayant été réalisées 24 heures après le dernier repas, une réponse de la LPL à plus court terme après la prise alimentaire ne peut être exclue. D'après Albalat *et al.*, (2006), aucune différence d'activité de la LPL n'est observée dans le muscle blanc au cours d'une période jeûne, au cours de la période postprandiale suivant la réalimentation ou en réponse à l'injection d'insuline. Par contre, dans le tissu adipeux périviscéral, l'activité de la LPL est diminuée pendant la période de jeûne, et augmentée dans les 4 à 6 heures suivant la prise alimentaire (Albalat *et al.*, 2006). Il semble que chez la truite arc-en-ciel, la régulation de l'activité de LPL par l'alimentation soit tissu-spécifique, et que cette activité exerce un rôle moins limitant dans le captage des acides gras au niveau du muscle blanc qu'au niveau du tissu adipeux périviscéral.

Par contre, l'analyse du transcriptome musculaire (publication n°3) nous a permis d'identifier deux candidats particulièrement intéressants impliqués dans le captage des lipides sanguins par les tissus extra-hépatiques et dont l'expression était significativement augmentée en réponse à un apport alimentaire enrichi en lipides: le récepteur aux VLDLs (VLDL-R) et la translocase des acides gras (fatty acid translocase [FAT/CD36]). Le récepteur aux VLDL (VLDL-R) se lie avec une forte affinité aux VLDL, aux IDL et aux chylomicrons, mais pas aux LDL (Takahashi *et al.*, 1992 ; Niemeier *et al.*, 1996). Des études assez récentes conduites sur des souris transgéniques invalidées pour le gène codant le VLDL-R ont démontré le rôle majeur joué par ce récepteur dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG (VLDLs et chylomicrons) (Tacken *et al.*, 2000, Goudriaan *et al.*, 2001, Yagyu *et al.*, 2002 ; Goudriaan *et al.*, 2006). Ce récepteur est exprimé de façon prédominante au niveau des tissus utilisant les acides gras comme source d'énergie (cœur et muscles squelettiques striés). En revanche, chez les animaux ovipares, comme le poulet, le xénope, ou différentes espèces de poissons dont la truite arc-en-ciel, l'homologue des VLDL-R des mammifères n'avait initialement été détecté par Northern Blot que dans les ovaires (Davail *et al.* 1998), où ce récepteur joue un rôle majeur dans le développement des ovocytes en conditionnant le captage de la vitellogénine, précurseur des principaux composants du vitellus chez ces espèces (Stifani *et al.*, 1990). Le VLDL-R a ainsi été renommé récepteur à la vitellogénine (VTG-R) chez les espèces ovipares. Cependant, avec la mise au point de la RT-PCR en temps réel, plus sensible que la méthode du Northern Blot, la présence d'un variant d'épissage du transcrit codant pour le VTG-R a été détecté au niveau de nombreux tissus somatiques, notamment dans le muscle, chez le poulet, le xénope et la truite arc-en-ciel (Bujo *et al.*, 1995 ; Okabayashi *et al.*, 1996; Prat *et al.*, 1998). Malgré cela, l'étude des fonctions et des propriétés de liaison du VLDL-R (/VTG-R) s'est

jusqu'à présent exclusivement cantonnée à l'étude de la vitellogénèse chez ces espèces, et le rôle joué par la forme somatique de ce récepteur n'a jamais été abordé dans la littérature. Grâce à l'analyse du transcriptome musculaire, nous avons pu détecter une expression différentielle de ce récepteur dans le muscle de truites immatures en réponse à une différence du contenu énergétique alimentaire, résultat qui est confirmé par l'analyse de ce transcrit en RT-PCR en temps réel.

La FAT/CD36 est une protéine membranaire impliquée dans le captage des acides gras libres (AGL) circulants. Elle lie avec une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire) les AGL, assurant ainsi un captage efficace des AGL même lorsque ceux-ci sont liés à l'albumine (Baillie et al., 1996). Elle est exprimée dans les tissus caractérisés par un métabolisme lipidique important tels que le tissu adipeux (Abumrad *et al.*, 1993), le muscle squelettique et le cœur (Luiken *et al.*, 1999; 2000). L'inactivation du gène FAT/CD36 chez la souris conduit à une diminution du captage des acides gras au niveau de ces tissus (Abumrad *et al.*, 1993; Coburn *et al.*, 2000). De même, il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la FAT/CD36 diminuait le transport des AG à longue chaîne dans des vésicules sarcolemniques (Luiken et al., 1999). En accord avec nos résultats, une expression plus élevée de la FAT/CD36 a été observée au niveau du muscle chez l'humain en réponse à un apport alimentaire plus élevé en lipides (Cameron-Smith *et al.*, 2003). Cependant, le rôle de la FAT/CD36 dans le muscle ne semble pas se limiter au captage des AGL plasmatiques, mais pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'oxydation mitochondriale des AG, notamment en se transloquant au niveau de la membrane externe mitochondriale (Benton et al., 2008). La FAT/CD36 est aussi un marqueur de la différenciation adipocytaire, et l'induction de son expression dans les préadipocytes s'accompagne d'une augmentation concomitante du transport des AG à l'intérieur de la cellule (Abumrad *et al.*, 1993). Chez les salmonidés, comme la truite arc-en-ciel ou le saumon atlantique, le muscle blanc est un site de stockage des réserves lipidiques dans l'organisme. Les lipides y sont essentiellement stockés au sein d'adipocytes localisés entre les fibres musculaires (Sheridan, 1994; Zhou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996) et on ne trouve quasiment pas d'inclusions lipidiques à l'intérieur des fibres dans ce tissu (Zhou *et al.*, 1996). L'activité et l'expression des différents acteurs métaboliques analysés au niveau du tissu musculaire ont été effectuées sur des homogénats de muscle blanc, incluant les fibres musculaires, le tissu conjonctif et les adipocytes associés. Il nous est donc impossible de savoir si l'expression plus élevée de la FAT/CD36 (et du VLDL-R) observée dans cette étude au niveau musculaire est due à l'augmentation de l'expression de ces gènes

au niveau des fibres musculaires, au niveau des adipocytes dispersés entre les fibres, ou bien au niveau de ces deux types cellulaires à la fois.

Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères (Miller *et al.*, 1984; Nemeth *et al.*, 1992; Iossa *et al.*, 2002; Cameron-Smith *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2007), un apport alimentaire plus élevé en lipides ne semble pas associé dans notre étude à une oxydation plus importante des AG au niveau du muscle. Chez le saumon Atlantique, Kennedy *et al.*, (2006) n'ont pas non plus observé de différence de β -oxydation (mesurée par suivi de l'utilisation de lipides radiomarqués) dans le muscle blanc en réponse à une augmentation de l'apport alimentaire en lipides.

L'expression plus élevée du VLDL-R et de la FAT/CD36 au niveau du muscle chez les truites nourries avec l'aliment riche en lipides pourrait donc expliquer, au moins en partie leur teneur en lipides musculaires plus élevée. Il reste à présent à déterminer si la différence d'expression observée pour ces deux transcrits en réponse à la teneur en lipides de l'aliment est maintenue à l'échelle des protéines. L'analyse du protéome musculaire offrirait peu de chance de répondre à cette question, étant donné la difficulté d'analyser les protéines membranaires par cette méthode (*voir la discussion sur l'intérêt et les limites de l'approche protéomique, chapitre IV-4.3.3*). En revanche, ceci pourrait être vérifié en réalisant par exemple des analyses Western blot sur des homogénats de muscle de truites nourries avec nos deux régimes expérimentaux.

IV-3 Effet de la sélection génétique basée sur l'indice d'adiposité musculaire

IV-3.1 Effet de la sélection génétique sur les performances de croissance

A la fin de l'essai d'alimentation, les poissons issus de la lignée L (lignée "muscle maigre") présentaient des valeurs de poids et de longueur significativement plus élevées que leurs homologues de la lignée F (lignée "muscle gras"). Ceci est particulièrement intéressant, puisque de meilleures performances de croissance sont généralement associées à un état d'engraissement plus important des poissons (Henderson et Tocher, 1987 ; Corraze *et al.*, 1994, Gjedrem, 1997). Or, dans le cas dans notre étude, les individus issus des deux lignées présentaient une teneur en lipides corporelle semblables. D'autre part, et contrairement à d'autres études ayant utilisé la croissance comme critère de sélection (Thodensen *et al.*, 1999 ; Mambrini *et al.*, 2004), les différences de croissance observées entre les deux lignées ne sont pas attribuables à une différence de la quantité d'aliment ingéré, mais plutôt à une meilleure efficacité alimentaire ainsi qu'une meilleure utilisation des protéines pour la croissance chez les individus de lignée L par rapport à ceux de lignée F.

IV-3.2 Effet de la sélection génétique sur la composition corporelle des truites

Conformément à l'objectif de la procédure de sélection, basée sur la mesure indirecte de teneur en lipides du muscle, et aux résultats obtenus dès la deuxième génération de sélection (Quillet *et al.*, 2005), la teneur en lipides musculaires est significativement plus élevée chez les poissons de la lignée F que chez ceux de la lignée L. En revanche, les truites de la lignée L se caractérisent par un indice viscéro-somatique plus élevé que celles de la lignée F, indice d'un stockage plus important des lipides au niveau périviscéral chez la lignée L, effet qui n'avait pas été mis en évidence à la deuxième génération de sélection (Quillet *et al.*, 2005 ; 2007). On peut donc supposer que la procédure de sélection divergente dont sont issues les deux lignées a engendré une relocalisation des lipides de réserve du muscle vers les viscères pour la lignée L, ou des viscères vers le muscle pour la lignée F. L'absence de «lignée témoin» (individus de la souche printanière à l'origine de la création des deux lignées) empêche de déterminer l'orientation du phénomène, qui a d'ailleurs pu diverger dans les deux sens. Quoi qu'il en soit, il en résulte que la procédure de sélection choisie (évaluation de la teneur en lipides musculaires avec le Torry fish Fatmeter à un an) a permis d'obtenir une différence de répartition des dépôts lipidiques entre les deux sites majeurs de stockage chez la truite arc-en-ciel, la lignée L stockant préférentiellement ses lipides au niveau du tissu

adipeux périviscéral par rapport à la lignée F, qui elle dépose davantage de lipides au niveau musculaire en comparaison avec la lignée L.

Ces lignées représentent donc un matériel biologique pertinent pour étudier les mécanismes moléculaires déterminant non seulement la teneur en lipides musculaires, mais également la répartition des dépôts lipidiques dans l'organisme, sans variation de l'adiposité totale.

En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la plupart des espèces terrestres d'élevage, comme les bovins ou le porc, la teneur en lipides musculaires est positivement corrélée à l'adiposité de la carcasse (Robelin et Casteilla, 1990; Sellier 1998 ; Cuvelier *et al.*, 2005). De même, chez les espèces de laboratoire comme la souris, aucun modèle génétique n'a permis jusqu'à présent de dissocier quantité de lipides musculaires et adiposité totale.

IV-3.3 Effet de la sélection génétique sur la concentration en lipides plasmatiques

La teneur en triglycérides (TG) plasmatiques était significativement plus élevée chez la lignée F que chez la lignée L, malgré un apport alimentaire en lipides équivalent entre lignées.

La quantité de TG plasmatiques dépend de la quantité de lipides alimentaires absorbés (et véhiculés dans le sang essentiellement sous forme de chylomicrons), de la quantité de lipides néosynthétisés dans le foie et sécrétés dans la circulation sous forme de VLDL, et du captage des TG plasmatiques par les différents tissus. L'apport en lipides alimentaires étant vraisemblablement similaire chez les deux lignées, on peut donc supposer que le taux de triglycérides plasmatique plus faible observé chez la lignée L soit lié à une diminution de la sécrétion hépatique de VLDL et/ou d'une augmentation de la clairance des lipides plasmatiques, via un captage accru des lipides sanguins par les tissus extra-hépatiques. Une diminution de la sécrétion de VLDL par le foie peut résulter d'une diminution de la synthèse de novo des lipides, d'une augmentation de l'oxydation des lipides à des fins énergétiques et/ou d'une diminution de l'incorporation des triglycérides dans les VLDLs. Ce dernier mécanisme favorise l'accumulation de lipides au niveau du foie, ce qui se traduit le plus souvent par une augmentation de l'indice hépato-somatique (IHS), ce qui n'est pas le cas dans notre expérience.

Les hypothèses les plus vraisemblables pour expliquer ces différences de teneur en lipides observées entre lignées étaient donc :

- une lipogénèse plus élevée dans le foie de la lignée F que dans celui de la lignée L.

- une oxydation hépatique des AG plus faible dans la lignée F que dans la lignée L.
- une clairance des TG circulants plus faible chez les individus de la lignée F que chez ceux de la lignée L.

Nous avons donc porté une attention particulière à ces voies lors de l'exploitation des résultats obtenus par les différentes analyses.

IV-3.4 Effet de la sélection sur le métabolisme hépatique

L'ensemble de nos résultats montre que le métabolisme hépatique est significativement affecté par la sélection génétique, bien que celle-ci ait été appliquée directement sur le muscle.

La teneur en lipides musculaires plus élevée des truites de la lignée F ne semble pas liée à une augmentation de la lipogénèse dans le foie, puisqu'aucune différence n'a été observée pour l'activité des principales enzymes de la lipogénèse que nous avons mesurée (AGS, G6PDH, EM), excepté pour l'ACC, première enzyme impliquée dans la synthèse, dont l'activité était plus élevée dans le foie des individus de la lignée F que chez ceux de la lignée L. Cependant, l'analyse du transcriptome a permis de mettre en évidence une expression plus élevée de 6-PGDH, enzyme génératrice de NADPH pour la lipogénèse chez la truite arc-en-ciel, ainsi que de la $\Delta 6$ -désaturase, impliquée dans la désaturation des acides gras, chez les poissons de la lignée F. D'après ces analyses, l'expression de la G6PDH est également plus élevée chez les truites de la lignée F que chez celles de la lignée L, mais seulement quand celles-ci sont nourries avec l'aliment à faible teneur en lipides, qui favorise la lipogénèse hépatique, alors que l'aliment riche en lipides inhibe la lipogénèse. D'autre part, d'après les résultats issus de l'analyse du protéome, la quantité de protéine correspondant à la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) est plus élevée dans le foie des truites de la lignée F que dans celui des truites de la lignée L. La G3PDH catalyse la réduction du 3-phosphodihydroxyacétone formé lors de la glycolyse en L-glycérol-3-phosphate, qui sert de substrat à la synthèse des triglycérides et des phospholipides. Enfin, l'analyse du protéome hépatique a révélé une quantité plus élevée des deux isoformes de l'H-FABP dans le foie des truites de la lignée F que dans celui des truites de la lignée L. Cet effet de la sélection sur les deux isoformes, révélé au niveau protéique, n'a pas été mis en évidence au niveau de leur transcrits par l'analyse du transcriptome. Ceci pourrait s'expliquer par une régulation de ces deux isoformes au niveau post-transcriptionnel, ou une plus grande stabilité de ces protéines dans les cellules hépatiques des truites de la lignée F que dans celles de la lignée L. Quoiqu'il en soit, il apparaît que l'abondance des deux isoformes de l'H-FABP semble davantage corrélée au potentiel de lipogénèse et d'estérification des AG au niveau hépatique plutôt qu'à

la capacité d'oxydation des acides gras dans ce tissu, contrairement à ce qui est généralement rapporté au niveau des tissus oxydatifs comme le muscle rouge ou le cœur, et ce, chez les poissons (Jordal *et al.*, 2006) comme chez les mammifères (Gondret *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que les truites de la lignée F possèdent un potentiel de synthèse et d'estérification des acides gras au niveau du foie plus important que ceux de la lignée L.

De plus, d'après les résultats obtenus avec l'approche candidat, les deux lignées semblent se distinguer par leur capacité à utiliser les lipides à des fins énergétiques, avec une activité de l'HOAD, et un niveau de transcrits codant pour la CPTIa, la CPTIb, l'ACO et PPAR α plus faibles dans le foie des truites de la lignée F que dans celui des truites de la lignée L.

En revanche, la lignée F semble avoir une meilleure capacité à utiliser le glucose comme substrat pour la production d'énergie que la lignée L au niveau du foie, avec une activité et une expression plus élevée de l'HK-I. Cependant, en l'absence de différence constatée pour la PK et pour le niveau de glucose plasmatique, ces résultats nécessitent d'être confirmés par suivi de l'utilisation métabolique du glucose après marquage radioactif par exemple.

D'autre part, une grande proportion des transcrits et des protéines différenciellement exprimées entre lignées que nous avons pu identifier par analyse du transcriptome et du protéome hépatique intervenait dans le catabolisme des acides aminés et des protéines. En particulier, l'aspartate aminotransferase (GOT), la GDH et l'AGX, les trois enzymes clé jouant un rôle majeur dans l'oxydation des acides aminés, étaient plus abondantes au niveau protéique (le niveau de transcrit de la GOT étant également plus élevé) chez les individus de lignée F que chez ceux de lignée L. De plus, l'abondance de transcrits et de protéines hépatiques impliquées dans la bioconversion des acides aminés (BADH, Betaine-homocysteine S-méthyltransferase [BHMT], 4-aminobutyrate aminotransferase [GABT], 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase [FTHFD] et dans la protéolyse par la voie du protéasome était également plus importante chez les individus de lignée F que dans celui de la lignée L. Ces résultats suggèrent une utilisation accrue des acides aminés et des protéines pour la fourniture d'énergie chez les truites de lignée F, ce qui serait en accord avec l'efficacité protéique et les performances de croissance plus faibles observées chez ces poissons. Fait intéressant, des études menées chez les rongeurs ont montré que le catabolisme hépatique des acides aminés pouvait être négativement contrôlé par le facteur de transcription PPAR α (Kersten *et al.*, 2001; Edvardsson *et al.*, 2003; Sheikh *et al.*, 2004). Or, comme indiqué précédemment, l'expression de PPAR α dans le foie était plus faible chez la lignée F par rapport à la lignée L. Il se pourrait donc que le catabolisme des acides aminés plus important au niveau du foie des truites de lignée F par rapport à celles de lignée L, fortement suggéré

par nos données, soit le résultat d'une inhibition plus faible par PPAR α des gènes impliqués. Ce phénomène n'a jusqu'à présent été décrit que chez le rat et la souris. Le fait qu'un tel mécanisme puisse exister chez des vertébrés inférieurs, comme les poissons, conforterait l'idée que le mécanisme de régulation du métabolisme des acides aminés par PPAR α se soit conservé au cours de l'évolution. L'existence d'une régulation opposée de la β -oxydation des acides gras et du catabolisme des acides aminés par un seul et même facteur de transcription pourrait également expliquer de façon simple le phénomène d'épargne protéique communément observé chez les poissons en réponse à une augmentation de l'apport en lipides alimentaires. Bien évidemment, ceci reste à confirmer chez le poisson par des expériences appropriées : par exemple, l'expression concomitante des enzymes clé de l'oxydation des acides aminés et de la β -oxydation des acides gras pourrait être mesurée à partir de culture d'hépatocytes en l'absence et présence d'agonistes (et éventuellement d'antagonistes) synthétiques de PPAR α , comme le KRP-101, le WY14643 (puissants agonistes spécifiques de PPAR α) ou le MK-886 (antagoniste spécifique de PPAR α).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc une différence d'utilisation métabolique des différents nutriments entre lignées au niveau du foie : les truites de la lignée F auraient une capacité plus faible que celles de la lignée L à utiliser les lipides à des fins énergétiques au niveau hépatique, mais en contrepartie une meilleure capacité à utiliser les protéines et les glucides pour pourvoir à leur besoins en énergie.

Cette différence dans l'utilisation des différents macronutriments pourrait être, du moins en partie, orchestrée par le facteur de transcription PPAR α . De façon générale, très peu de données sont disponibles sur la régulation de l'expression des facteurs de transcription PPARs chez les poissons. Chez les mammifères, PPAR α est régulé au niveau transcriptionnel par l'insuline, qui inhibe son expression, et les glucocorticoïdes (glucagon), qui la stimulent.

IV-3.5 Effet de la sélection sur le métabolisme musculaire

D'après nos résultats, et contrairement aux hypothèses formulées initialement, la teneur en lipides musculaire plus élevée observée chez les truites de la lignée F ne semble pas liée à une activité plus élevée de la lipoprotéine lipase (LPL) dans le muscle, puisqu'aucune différence significative de l'activité et de l'expression de cette enzyme n'a été observée entre lignées au niveau du muscle. Elle ne serait pas non plus la conséquence d'une diminution de l'utilisation des lipides à des fins énergétiques, puisque parmi les enzymes clés de la β -oxydation que nous avons testées, seule la CPTI b a une expression significativement modifiée entre les deux

lignées. De plus celle-ci est plus élevée dans le muscle des truites de la lignée F que dans celui des truites de la lignée L. En revanche, les truites de la lignée F auraient une meilleure capacité à utiliser le glucose comme source d'énergie, avec une expression et une activité musculaire de l'HK-I et de la PK plus élevée que chez les truites de la lignée L. D'après l'analyse du transcriptome musculaire, l'expression de l'ATP/ADP translocase et de la COX3, enzymes clé de la production d'ATP par la chaîne respiratoire, est plus élevée chez les truites de la lignée F. L'ensemble de ces résultats semble refléter une production d'ATP plus importante à partir du glucose chez les truites de la lignée F que chez celles de la lignée L.

L'analyse en RT-PCR en temps réel des transcrits codant pour la FAT/CD36 et le VLDL-R nous a par ailleurs révélé que ces deux transcrits sont plus fortement exprimés dans le muscle des truites de la lignée F que dans celles de la lignée L. Ceci est particulièrement intéressant, car l'expression plus élevée de ces deux transporteurs, induite à la fois par un apport énergétique alimentaire plus élevé et par la sélection génétique en faveur d'un indice d'adiposité musculaire plus important, suggère que ces deux transcrits sont des marqueurs moléculaires potentiels de l'engraissement musculaire, et ce, quel que soit le facteur qui est à l'origine de l'engraissement du muscle. Ceci devra être vérifié sur un grand nombre d'échantillons de muscle de diverses origines.

IV-4 Effets combinés du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique

La combinaison de la sélection génétique divergente pour l'indice d'adiposité musculaire et de l'apport énergétique alimentaire a permis d'obtenir des écarts importants de teneurs en lipides musculaires entre les différents groupes expérimentaux. Les valeurs les plus fortes (10% MS) ont été obtenues chez les truites de la lignée «muscle gras» nourries avec l'aliment additionné d'huile de poisson (F-HE), et les plus faibles (4,6% MS) chez les truites de la lignée «muscle maigre» nourries avec l'aliment sans huile de poisson (L-LE). Des valeurs équivalentes de teneur en lipides musculaires (6,4% MS) ont été obtenues entre les deux autres groupes (F-LE et L-HE), suggérant un poids équivalent de la sélection génétique et de l'alimentation sur ce caractère.

Relativement peu d'interactions significatives entre les effets du régime et de la sélection ont été mises en évidence que ce soit au niveau des performances de croissance, de l'utilisation de l'aliment, des métabolites plasmatiques ou encore du métabolisme hépatique et musculaire.

Sur l'ensemble des transcrits et des protéines hépatiques dont le niveau d'expression ou l'activité était modifié par le contenu énergétique de l'aliment ou par la sélection génétique, relativement peu étaient affectés par les deux facteurs à la fois. Il semblerait donc que les deux facteurs utilisés dans notre expérience pour augmenter la teneur en lipides du muscle (c'est-à-dire l'alimentation à long terme riche en énergie d'une part, et la sélection génétique en faveur d'un indice d'adiposité musculaire plus élevé d'autre part) induisent des effets qui s'exercent par des mécanismes moléculaires différents au niveau du foie.

D'autre part, lorsqu'on compare les effets de ces deux facteurs, on constate qu'ils induisent des effets opposés sur les principales voies métaboliques hépatiques.

En revanche, on observe que l'alimentation à long terme riche en énergie et la sélection génétique en faveur d'une teneur en lipides musculaires faible (lignée L) se traduisent toutes deux par un développement du tissu adipeux périviscéral, et induisent des effets similaires sur les voies métaboliques hépatiques. On sait à présent que les adipocytes expriment et secrètent un grand nombre de protéines et d'hormones (cytokines) qui peuvent influencer sur le statut physiologique de l'organisme et le métabolisme des autres organes, parmi lesquels le foie (Alessi *et al.*, 2000; Pantanetti *et al.*, 2004). De nombreuses études attribuent une spécificité fonctionnelle aux adipocytes en fonction de la localisation anatomique des tissus dont ils sont issus (Jensen, 1997; Lafontan et Berlan, 2003). En particulier, le tissu adipeux périviscéral

peut libérer des acides gras libres et des cytokines dans la veine porte, qui sont donc directement acheminés vers le foie (Bjorntop, 1990). Chez l'humain, l'obésité viscérale serait positivement corrélée à une augmentation de l'oxydation globale des acides gras, et inversement corrélée à l'oxydation globale du glucose, mais aussi de la protéolyse (Solini et al., 1997, Wajchenberg, 2000).

La régulation nutritionnelle et hormonale du métabolisme du tissu adipeux périviscéral n'a commencé à être étudié que très récemment chez les poissons (Planas *et al.*, 2000 ; Albalat *et al.*, 2005). Aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature concernant l'effet d'un stockage des lipides plus important au niveau du tissu adipeux périviscéral sur le statut physiologique des poissons et le métabolisme des autres organes. Ces lignées constituent un matériel biologique tout à fait pertinent pour y répondre. L'analyse des effets du contenu énergétique de l'aliment et de la sélection génétique sur ce tissu était initialement prévue dans le cadre de ma thèse. Malheureusement, du fait d'une dégradation de la qualité des échantillons au cours de la conservation, ces analyses n'ont pu être réalisées.

IV-5 Intérêts et limites des approches utilisées

IV-5.1 Intérêt et limites de l'approche «candidat»

Les mesures d'activité enzymatique et d'expression des gènes par RT-PCR en temps réel utilisée dans le cadre de notre approche «candidat» sont des moyens fiables et précis d'évaluer l'effet du contenu énergétique alimentaire et de la sélection génétique sur un acteur moléculaire donné.

La RT-PCR en temps réel est un outil très sensible qui permet une quantification relative précise de l'expression d'un gène. En effet, les conditions de mesure de l'expression des gènes sont optimisées en choisissant des couples d'amorces spécifiques et des températures d'hybridation adaptées. Cependant, ces analyses gène par gène sont coûteuses en temps et leur utilisation ne permet pas une étude aussi exhaustive que les approches de génomique. L'analyse des activités enzymatiques permet d'avoir accès au produit "final" de toute une série de régulations. Cependant, elle nécessite une quantité relativement importante de matériel biologique. Enfin, si ces analyses sont précises, l'approche «candidats» est basée sur des hypothèses émises *a priori* qui ne permettent pas de mettre en évidence des "acteurs moléculaires" inconnus. C'est en raison de ces limites que nous avons choisi de réaliser des analyses plus exhaustives qui nous paraissaient particulièrement adaptées pour explorer les différences entre lignées.

IV-5.2 Intérêts et limites de l'approche transcriptomique

L'analyse du transcriptome par approche des puces à ADN permet l'étude simultanée des profils d'expression de plusieurs milliers de gènes en une seule expérience. Elle permet d'obtenir une vision globale et sans *a priori* des changements d'expression induits dans un extrait cellulaire par un traitement donné, et de proposer de nouvelles hypothèses concernant des mécanismes jusqu'alors non soupçonnés. ***L'analyse du transcriptome du foie et du muscle blanc nous a ainsi permis d'identifier des gènes que nous n'aurions certainement pas pensé à analyser par approche «gènes candidats»,*** comme la forme cardiaque de la protéine de liaison aux acides gras (H-FABP) au niveau du foie, ou le récepteur aux VLDL au niveau du muscle. Cependant, cette technique n'est pas aussi sensible et reproductible que l'analyse des transcrits en RT-PCR en temps réel, comme nous l'avons vu pour la $\Delta 6$ -désaturase au niveau du foie, ou du VLDL-R et de la FAT/CD36 au niveau du muscle. Pour ces gènes, la mesure par RT-PCR en temps réel a permis de mettre en évidence des différences d'expression non identifiées par l'analyse du transcriptome.

La construction de banques d'ADNc, à partir d'un ou plusieurs tissus d'intérêt, fournit les outils essentiels à la réalisation d'analyses du transcriptome, notamment dans le cas d'études menées sur des espèces pour lesquelles peu de séquences sont disponibles, comme c'est le cas pour la truite arc-en-ciel. Cependant, un travail important d'annotation et de caractérisation reste à réaliser, étant donné le nombre relativement important de gènes représentés sur la puce pour lesquels l'identité est aujourd'hui encore inconnue (5626 sur les 9023, soit plus de 60% des sondes déposée sur la puce). A cela s'ajoute un certain nombre de gènes dont la fonction n'a pas encore été caractérisée. L'importance biologique de ces transcrits n'est pourtant pas à négliger, puisque certains clones dont l'identité est inconnue se sont révélés très significativement affectés dans le foie par un apport alimentaire plus élevé en lipides (clones tcag0001.a.09 et tcag0001.b.03, significatifs en ANOVA même après correction de Bonferroni). Enfin, l'analyse du transcriptome par l'approche des puces à ADN est également limitée par les gènes et la représentation des différentes fonctions biologiques qui sont représentées sur la puce. Ainsi, aucune enzyme impliquée dans la β -oxydation des acides gras n'a été identifiée parmi les transcrits et les protéines différentiellement exprimées dans le cadre de notre seconde étude (approche «haut-débit»). Ceci s'explique en partie par le fait que, parmi toutes les enzymes clés connues impliquées dans la β -oxydation, seule la CPT1a était représentée sur la puce. Un phénomène d'hybridation non spécifique, du fait de la présence d'autres isoformes ayant un degré d'homologie de séquence élevée avec la CPT1a mais des niveaux d'expression différents en réponse au contenu énergétique alimentaire, a pu masquer les différences d'expression de ce transcrit. Il est également possible que les différences d'expression induites par une alimentation à long terme avec nos aliments expérimentaux soient trop faibles pour pouvoir être révélées par cette approche.

Pour la voie de la β -oxydation des acides gras, il était donc important de disposer des données fournies par l'approche «candidats» en complément de l'approche transcriptome.

IV-5.3 Intérêts et limites de l'analyse du protéome

L'information sur les taux d'ARNm n'est pas toujours suffisante pour étudier et analyser la régulation de l'expression d'un gène dans la cellule. Les données sur l'expression des protéines (protéome) sont souvent plus informatives. Ce qui compte, en effet, dans une cellule, c'est le degré d'activité des protéines, sont fréquemment modulées et régulées par des modifications post-traductionnelles. L'analyse du protéome hépatique a ainsi permis d'identifier des modifications d'expression de protéines qui n'ont pas été identifiées par le biais de l'analyse du transcriptome, telles que les deux isoformes de l'H-FABP

Cependant, comparées aux analyses du transcriptome, les techniques basées sur l'électrophorèse 2D ne permettent pas une étude aussi exhaustive des différents acteurs moléculaires susceptibles d'intervenir dans le phénomène étudié. L'hétérogénéité chimique des protéines, dont les points isoélectriques peuvent varier d'une valeur de pH allant de 1 à 12, et les PM de moins de 5 kDa à plus de 300 kDa, pose un réel problème de résolution des gels 2D. Une autre limite réside dans les différences de solubilité des protéines. Ainsi, les protéines hydrophobes, telles que les protéines membranaires sont très difficilement analysables par les techniques classiques d'électrophorèse bidimensionnelle (Adessi *et al.*, 1997; Chevallet *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 1998; Garbis *et al.*, 2005), car elles ont fortement tendance à précipiter lors de l'étape d'électrofocalisation, alors que les protéines solubles sont facilement séparées par ces techniques. Ainsi, la probabilité d'isoler la CPTI, ou encore les différents systèmes de transporteurs membranaires, (par exemple FAT/CD36, FABPpm, ATP/ADP translocase..) est extrêmement faible par cette approche, alors que la sous-unité 5 de la cytochrome c réductase, protéine membranaire périphérique, a pu être isolée et identifiée avec succès dans cette étude.

Enfin, le dernier grand problème concerne la gamme d'expression très étendue des protéines au sein des cellules (Wilkins *et al.*, 1998). Seules les protéines les plus abondantes peuvent être analysées efficacement par les techniques classiques. Le recours à la coloration haute résolution à l'argent dans notre analyse du protéome hépatique nous a permis de détecter et d'analyser près de 900 spots différents sur nos gels. A l'issue de l'analyse statistique de l'ensemble de ces spots, 265 se sont révélés avoir un niveau d'expression significativement différent entre conditions expérimentales, tous effets confondus (ANOVA deux facteurs, $p < 0.05$). Cependant, malgré un tri préliminaire des spots visant à choisir ceux qui avaient le plus de chance d'être identifiés (sélection d'une centaine de spots), et le recours à de larges gamme de quantités de protéines introduites dans les gels destinés aux prélèvements (de 100 à 600 mg de protéines totales), seules 36 protéines ont pu être identifiées de façon fiable. Si certaines n'ont pu être identifiées en raison de l'absence de séquences correspondantes dans les banques de données, la plupart n'ont pu être identifiées en raison de la quantité insuffisante de matériel biologique. On peut donc légitimement se poser la question de la pertinence de la coloration haute résolution à l'argent pour l'analyse de nos données, les protéines faiblement exprimées, bien que visualisables, ayant peu de chance d'être identifiées en spectrométrie de masse. Etant donné le travail conséquent que représentent les étapes de nettoyage et de contrôle des données informatisées, l'utilisation d'une coloration moins résolutive, tel que le bleu de Coomassie, pour visualiser les spots destinés à l'analyse

informatisée des gels serait certainement préférable à l'avenir, permettant une économie de temps et de travail non négligeable. Depuis que j'ai réalisé ce travail d'analyse du protéome, d'autres méthodes telles que la DIGE (differential in gel-electrophoresis) ont été mises au point au laboratoire. Le principe repose sur le marquage covalent à l'aide de cyanines fluorescentes (Cy3 et Cy5) des protéines contenues dans deux extraits à analyser (Unlu *et al.*, 1997). Les deux extraits ainsi marqués sont mélangés à quantité égale et les protéines sont séparées ensemble sur le même gel 2D. Bien que relativement coûteuse la DIGE est une méthode séduisante, qui permet théoriquement de diminuer le nombre de gels 2D nécessaires à une analyse différentielle fiable.

Il semble donc illusoire de vouloir visualiser, et surtout caractériser, les protéines minoritaires au sein d'un extrait cellulaire total. Or le niveau d'expression n'est pas lié à l'importance de la protéine dans la cellule et de nombreuses protéines essentielles, comme les facteurs de transcription, sont faiblement exprimées.

L'association de ces deux approches de génomique fonctionnelle permet donc de tirer parti des avantages qu'offre chacune des techniques et d'en limiter les inconvénients. Dans le cas de notre étude, ces deux approches ont fourni des résultats cohérents et se sont confortés mutuellement. En effet, certaines protéines ont été identifiées par ces deux approches à la fois, telles que les deux isoformes de l'H-FABP, l'ACBP, la GOT... Nous n'avons pas rencontré de cas où les résultats de l'analyse du protéome contredisaient ceux issus de l'analyse du transcriptome. Au final, les trois approches que nous avons mises en œuvre ont chacune apportées des renseignements précieux pour répondre aux objectifs de la thèse.

Chapitre V

- Conclusions & Perspectives –

V-1 Principales conclusions

En combinant les effets d'une alimentation riche en lipides et de la sélection sur la base de la teneur en lipides musculaires, nous avons obtenu un modèle pertinent non seulement pour l'étude des mécanismes conditionnant la teneur en lipides musculaires, mais aussi la répartition des lipides dans les deux principaux compartiments corporels impliqués dans le stockage des lipides chez la truite, le tissu adipeux périviscéral et le muscle.

En utilisant ce modèle, et en combinant différentes approches d'analyse (approche «candidats», approche transcriptome et approche protéome), nous avons pu répondre aux objectifs fixés dans le cadre de ma thèse :

- Ces analyses nous ont fourni de nouvelles informations sur l'effet d'un apport alimentaire plus riche en lipides sur la régulation des principales voies métaboliques impliquées dans l'utilisation de l'énergie chez la truite arc-en-ciel. Nos résultats montrent en effet qu'un apport alimentaire plus important en lipides augmente la β -oxydation des acides gras et diminue le catabolisme des protéines et des acides aminés dans le foie, mettant en évidence au niveau moléculaire des mécanismes pouvant être à l'origine du phénomène d'épargne protéique par les lipides de l'aliment.
- Ces analyses nous ont permis de caractériser, pour la première fois, les différences métaboliques existant entre lignées, en mettant notamment en évidence une différence d'utilisation des nutriments au niveau du foie : la lignée F aurait une capacité plus importante à utiliser les protéines et les glucides pour la fourniture d'énergie que la lignée L, ce qui permettrait une plus grande disponibilité des lipides pour leur stockage au niveau musculaire
- Nous n'avons observé que très peu d'interactions entre les effets du régime et de la sélection au niveau du métabolisme aussi bien hépatique que musculaire. Il semble donc que l'alimentation et la sélection génétique exercent dans l'ensemble des effets indépendants sur le métabolisme. Toutefois, l'aliment riche en énergie semble perturber le métabolisme glucidique au niveau du foie chez la lignée L. Il serait intéressant d'analyser plus en détail ce phénomène par des analyses adaptées.
- Les deux processus utilisés pour augmenter la teneur en lipides musculaire, à savoir une alimentation à long terme riche en lipides et la sélection génétique en faveur d'une adiposité musculaire plus élevée, ne mettent pas enjeu les mêmes mécanismes pour

modifier la teneur en lipides musculaires. Tandis qu'un apport alimentaire riche en lipides diminue le catabolisme des protéines et augmente l'oxydation des lipides au niveau du foie, la sélection augmente la protéolyse ainsi que l'utilisation des glucides pour la fourniture d'énergie au niveau du foie et du muscle.

- Ces analyses nous ont permis d'identifier deux marqueurs potentiels de l'engraissement musculaire : le récepteur aux VLDL (VLDL-R) et la translocase des acides gras (FAT/CD36), dont l'expression est significativement augmentée dans le muscle à la fois par le contenu énergétique de l'aliment et par la sélection génétique en faveur de l'adiposité musculaire.

V-2 Perspectives

La combinaison de l'apport en lipides différent et de la sélection génétique divergente pour l'indice d'adiposité musculaire a permis d'obtenir des truites présentant des écarts importants de teneurs en lipides musculaires (de 4,2% pour la lignée M nourrie avec l'aliment à faible teneur en lipides à 10,1% pour la lignée G nourrie avec l'aliment riche en lipides). Ceci présente un intérêt certain pour les producteurs afin d'adapter les pratiques d'élevage en fonction de la destination finale des produits.

Dans cette étude, l'augmentation de la teneur en lipides musculaire induite par la sélection génétique sur l'indice d'adiposité musculaire est associée à une diminution du stockage des lipides au niveau viscéral. La possibilité de limiter le développement du tissu adipeux périviscéral tout en préservant les qualités de la chair et les performances de croissance des poissons permettrait d'améliorer la productivité de la filière piscicole. Or, cette maîtrise ne pourra être obtenue qu'avec une meilleure connaissance des mécanismes qui interviennent dans la dynamique du tissu adipeux. A l'heure actuelle, peu d'études ont été menées chez les poissons concernant la régulation nutritionnelle et hormonale du métabolisme du tissu adipeux périviscéral. Il apparaît donc important d'approfondir nos connaissances dans ce domaine. D'autre part, le tissu adipeux n'est aujourd'hui plus considéré comme un tissu inerte de stockage, mais plutôt comme une glande endocrine capable d'influencer de nombreux processus physiologiques comme le métabolisme et l'inflammation. Les lignées présentées dans le cadre de ce travail constituent un matériel pertinent, et pour le moment unique, pour étudier les effets engendrés par une différence de stockage au niveau du tissu adipeux périviscéral sur le statut physiologique des poissons et le métabolisme des autres organes.

Chapitre VI

- Références bibliographiques –

Bibliographie

-A-

1. **Aarsland, A., Lundquist, M., Berretsen, B., and Berge, R. K., 1990.** On the effect of peroxisomal β -oxidation and carnitine palmitoyltransferase activity by eicosapentaenoic acid in liver and heart from rats. *Lipids* 25, 546-548.
2. **Abumrad, N. A., El-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E., and Grimaldi, P. A., 1993.** Cloning of rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation: homology with human CD 36. *J. Biol. Chem.* 268, 17665-17668.
3. **Abumrad, N., Coburn, C., and Ibrahimi, A., 1999.** Membranes proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochem. Biophys. Acta* 1441, 4-13.
4. **Ackman, R.G., 1995.** Composition and nutritional value of fish and shellfish lipids. In: *Fish and Fisheries Products* (Ed: Ruiter, A.) Cab International, Wallingford, Oxon., UK., pp. 117-157.
5. **Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., and Venter C.J., 1991.** Complementary DNA sequencing : expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.
6. **Adessi, C., Miège, C., Albrieux, C., and Rabilloud, T., 1997.** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 127-135.
7. **Akiyama, T., Tachibana, I., Shirohara, H., Watanabe, N., and Otsuki, M., 1996.** High-fat hypercaloric diet induces obesity glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 31, 27-35.
8. **Aksnes, A., Hjertnes, T., and Opstvedt, J., 1996.** Effect of dietary protein level on growth and carcass composition in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 145, 225-233.
9. **Albalat, A., Gutiérrez, J., and Navarro, I., 2005.** Regulation of lipolysis in isolated adipocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The role of insulin and glucagon. *Comp. Biochem. Physiol.* 142(A), 347-354.
10. **Albalat, A., Sanchez-Gurmaches, J., Gutiérrez, J., and Navarro, I., 2006.** Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 226-235.
11. **Alessi, M.C., Bastelica, D., Morange, P., Berthet, B., Leduc, I., Verdier, M., Geel, O., and Juhan-Vague, I., 2000.** Plasminogen activator inhibitor I, transforming growth factor-beta I, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49, 1374-1380.

12. **Alsted, N., Due, T., Hjermsley, N., and Andreassen, A., 1995.** Practical experience with high energy diet, FCR, growth and quality, *J. Appl. Ichthyol.* 11, 329–335.
13. **Alvarez, M.J., Diez, A., Lopez-Bote, C., Gallego, M., and Bautista, J.M., 2000.** Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 84, 619-628
14. **Ando S., Mori Y., Nakamura K., and Sugawara A., 1993.** Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish. *Nip. Suis. Gak.* 59, 1559-1564.
15. **Ando, S., Xue, X.-H., Tibbits, G.F., and Haunerland, N.H., 1998.** Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart. *Comp. Biochem. Physiol.* 119(B), 213-217.
16. **Andrews, J.W., Murray, M.W., and Davis, J.M., 1978.** The influence of dietary fat levels and environmental temperature on the digestible energy and absorbability of animal fat in catfish diets. *J. Nutr.* 108, 749-752.
17. **Arantzamendi, L., 2002.** Effect of dietary lipids on production, composition and lipolytic activity in commercial fish. *Thèse de l'Université de Las Palmas de Gran Canaria, Espagne.*
18. **Arner P., 1995.** Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissue. *Ann. Med.* 27, 435– 438
19. **Arnesen, P., Krogdahl, Å., and Kristiansen, I.Ø., 1993.** Lipogenic enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Comp. Biochem. Physiol.* 105(B), 541-546.
20. **Arzel, J., Lopez, F.X.M., Métailler, R., Stéphan, G., Viau, M., Gandemer, G., and Guillaume, J., 1994.** Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. *Aquaculture* 123, 361-375.
21. **Axen, K.V., and Axen, K., 2006.** Very Low-Carbohydrate versus Isocaloric High-Carbohydrate Diet in Dietary Obese Rats. *Obesity* 14, 1344–1352

-B-

22. **Baba, K., Takahashi, Y., Aoyagi, Y., and Odani, S., 1999.** The amino acid sequence of a lamprey (*Entosphenus japonicus*) liver fatty acid-binding protein identified its close relationship to cardiac fatty acid-binding proteins of Mammalia. *Comp. Biochem. Phys.* 123(B), 223–228
23. **Babin, P.J., and Vernier, J.-M., 1989.** plasma lipoproteins in fish. *J. Lipid Res.* 30, 467-489.
24. **Baeza, E., De Carville, H., Salichon, M.R., Marché, G., and Leclercq, B., 1997.** Effects of selection, over three and four generations, on meat yield and fatness in Muscovy ducks. *Br. Poult. Sci.* 38, 359-365.

25. **Baeza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., Meteau, K., and Hermier, D., 2005.** Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l'engraissement. *INRA, Prod. Anim.* 18, 131-141.
26. **Baillie, A.G., Coburn, C.T., and Abumrad, N.A. 1996.** Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J. Membr. Biol.* **153**:75–81.
27. **Baillie, R.A., Takada, R., Nakamura, M., and Clarke, S.D., 1999.** Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 60, 351–56.
28. **Bain, L.J., 2002.** cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Mar. Environ. Res.* 54, 379-383
29. **Baker, N., Learn, D.B., and Bruckdorfer, K.R., 1978.** Re-evaluation of lipogenesis from dietary glucose carbon in liver and carcass of mice. *J. Lipid Res.* 19, 879-893.
30. **Baldwin, J., and Reed, K.C., 1976.** Cytoplasmic sources of NADPH for fat synthesis in rainbow trout liver: effect of thermal acclimation on enzyme activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 54(B), 527-529.
31. **Barish, G.D., Atkins, A.R., Downes, M., Olson, P., Chong, L.-W., Nelson, M., Zou, Y., Hwang, H., Kang, H., Curtiss, L., Evans, R.M., and Lee, C.H., 2008.** PPAR δ regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4271-4276.
32. **Barnola, I., Hocquette, J.F., Cassar-Malek, I., Jurie, C., Gentes, G., Cabaraux, J.F., Cuvelier, C., Istasse, L., and Dufrasne, I., 2005.** Adipocyte fatty acid-binding protein expression and mitochondrial activity as indicators of intramuscular fat content in young bulls. In: Indicators of Milk and Beef Quality (Eds: Hocquette J.F., and Gigli S.) EAAP Publ, Wageningen, pp. 419-424.
33. **Barrans, J.D., Stamatiou, D., and Liew, C. (2001).** Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 964-969.
34. **Barroso, J.B., Peragón, J., Contreras-Jurado, C., García-Salguero, L., Corpas, F.J., Esteban, F.J., Peinado, M.A., de la Higuera, M., and Lupiáñez, J.A., 1998.** Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *Am. J. Physiol.* 274, R1578-1587.
35. **Bautista, J.M., Garrido-Pertierra, A., and Soler, G., 1988.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 354-363.
36. **Batista-Pinto, C., Rodrigues, P., Rochac, E., and Lobo-da Cunha, A., 2005.** Identification and organ expression of peroxisome proliferator activated receptors in brown trout (*Salmo trutta*). *Biochim. Biophys. Acta* 1731, 88-94.

37. **Beamish F.W.H., 1978.** Swimming capacity. In: Fish Physiology (Eds: Hoar, S., and Randall, J.D.) Academic Press Inc., New York, pp. 101-187.
38. **Beamish, F.W.H., and Medland, T.E., 1986.** Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 55, 35-42
39. **Bell, M.V., Henderson, R.J., and Sargent, J.R., 1986.** The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 83(B), 711-719.
40. **Bengtsson-Olivecrona, G., and Olivecrona, T., 1992.** Assay of lipoprotein lipase and hepatic lipase. In: Converse, C., Skinner, E.R., (Eds), Lipoprotein analysis. Oxford University Press, pp. 169-185.
41. **Benjamini, Y., and Hochberg, Y., 1995.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc.* 57, 289-300.
42. **Beynen, A.C., and Katan, M.B., 1989.** Impact of dietary cholesterol and fatty acids on serum lipids and lipoproteins in man. In: The Role of Fats in Human Nutrition (Eds: Vergoesen, A.J., and Crawford, M.A.) London, Academic Press, pp. 237-286
43. **Binas, B., Danneberg, H., McWhir, J., Mullins, L., and Clark, A.J., 1999.** Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J.* 13, 805-812.
44. **Binas, B., Han, X.-X., Erol, E., Luiken, J.J.F.P., Glatz, J.F.C., Dyck, D.J., Motazavi, R., Adihetty, P.J., Hood, D.A., and Bonen, A., 2003.** A null mutation in H-FABP only partially inhibits skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E481-489.
45. **Bionaz, M., and Loor, J.J., 2008.** ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J. Nutr.* 138, 1019-1024.
46. **Bjorntop, P., 1990.** Portal adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10, 493-496.
47. **Black, D., and Skinner, E.R., 1986.** Features of the lipid transport system of fish as demonstrated by studies on starvation in the rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 156(B), 497-502.
48. **Black, D., Youssef, A.M., and Skinner, E.R., 1983.** The mechanism of lipid uptake by tissues in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 93-94.
49. **Bland, J.M., and Altman, D.G., 1995.** Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310, 170.
50. **Bone Q., 1978.** Locomotor muscle. In: Fish Physiology (Eds: Hoar, W.S., and Randall, D.J.) Academic Press, New York, London, pp. 361-424

51. **Bonen, A., Dyck, D.J., and Luiken, J.J., 1998.** Skeletal muscle fatty acid transport and transporters. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441, 193-205.
52. **Bonnet, M., Faulconnier, Y., Leroux, C., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Bauchart, D., Boulesteix, P., Pethick, D.W., Hocquette, J.F., and Chilliard, Y., 2005.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase and leptin are linked to marbling differences between Limousin and Angus or Japanese Black x Angus steers. In : Proceedings of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Wageningen Academic Publishers : Uppsala, 5-8 June 2005, 257.
53. **Borrebaek, B., and Christophersen, B., 2001.** Activities of glucose phosphorylation, glucose-6-phosphatase and lipogenic enzymes in the liver of perch, *Perca fluviatilis*, after different dietary treatments. *Aquacult. Res.* 32, 221-224.
54. **Boujard, T., Gélinau, A., Covès, D., Corraze, G., Dutto, G., Gasset, E., and Kaushik, S., 2004.** Regulation of feed intake, growth, nutrient and energy utilisation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high fat diets. *Aquaculture* 231, 529-545.
55. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
56. **Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., and Wahli, W., 1996.** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-366.
57. **Brandstetter, A.M., Sauerwein, H., Veerkamp, J.H., Geay, Y., and Hocquette, J.F., 2002.** Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. *Livest. Prod. Sci.* 75, 199-208.
58. **Brandt, J.M., Djouadi, F., and Kelly, D.P., 1998.** Fatty acid activated transcription of the muscle carnitine palmitoyl transferase I gene in cardiac myocytes via the PPAR α . *J. Biol. Chem.* 273, 23786-23792.
59. **Brauge, C., Corraze, G., and Médale, F., 1995a.** Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 111(A), 117-124.
60. **Brauge, C., Corraze, G., and Médale, F., 1995b.** Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, body composition, nitrogen excretion and plasma glucose levels in rainbow trout reared at 8 or 18°C. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 277-290.
61. **Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C. P., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., and Vingron, M., 2001.** Minimum information about a microarray experiment (MIAME) - toward standards for microarray data. *Nat.Genet.*

29, 365–371.

62. **Bremner, H.A., and Hallett, I.C., 1985.** Muscle fibre-connective tissue connections in the fish blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning electron microscope study. *J. Food Sci.* 50, 975-980.
63. **Brett, J.R., 1979.** Environmental factors and growth. In: Fish Physiology (Eds: Hoar, W.S., Randall, D.J., and Brett, J.R.) Academic Press, New York, USA, pp. 599-675.
64. **Brett, J.R., and Groves, T.D.D., 1979.** Physiological energetics. In: Bioenergetics and Growth (Eds: Hoar, W.S., Randall, D.J., and Brett, J.R.) Academic Press, New York. pp. 280-244
65. **Brown, N. F., and McGarry, J.D., 1997.** The carnitine palmitoyl-transferase system – From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1-14.
66. **Bureau, D.P., Kaushik, S.J., and Cho, C.Y., 2002.** Bioenergetics. In: Fish Nutrition (Eds: Halver, J.E, and Hardy, R.W) Academic Press, pp. 1–59.

-C-

67. **Cameron-Smith, D., Burke, L.M., Angus, D.J., Tunstall, R.J., Cox, G.R., Bonen, A., Hawley, J.A., and Hargreaves, M., 2003.** A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 313–318.
68. **Cantor, C.R., 2000.** Les stratégies de la génomique fonctionnelle. *Biofutur* 206, 58-61.
69. **Cathelin, R., Lopez, F., and Klopp, C., 2007.** AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ Library. *Bioinformatics* 23, 247-248.
70. **Cameron-Smith, D., Burke, L.M., Angus, D. J., Tunstall, R.J., Cox, G.R., Bonen, A., Hawley, J.A., and Hargreaves, M., 2003.** A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 313-318.
71. **Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G., 2004.** Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25,1327-1333.
72. **Chanseume, E., Malpuèche-Brugère, C., Patrac, V., Bielicki, G., Rousset, P., Couturier, K., Salles, J., Renou, J.P., Boirie, Y., and Morio, B., 2006.** Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J. Nutr.* 136, 2194-2200.
73. **Chapman, M.J., 1980.** Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J. Lipid Res.* 21, 789-853.

74. **Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E., 2006.** Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comp. Biochem. Physiol.* 145(A), 413-418.
75. **Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., and Rabilloud, T., 1998.** New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 1901-1909.
76. **Chevassus B., 1976.** Variabilité et héritabilité des performances de croissance chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii richardson*). *Ann. Génét. Sél. anim.* 8, 273-283.
77. **Chilliard, Y., 1993.** Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. *J. Dairy Sci.* 76, 3897-3931.
78. **Cho, C.Y., and Kaushik, S.J., 1985.** Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 95– 117.
79. **Cho, C.Y., and Kaushik, S.J., 1990.** Nutritional energetics in fish: protein and energy utilization in rainbow trout. In: Bourne, G.H. (Ed.), *Aspects of Food Production, Consumption and Energy Values*. *World Rev. Anim. Nutr.* 61, 132– 172.
80. **Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D., 1999.** Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian Δ -6 Desaturase. *J. Biol. Chem.* 274, 471-477.
81. **Cho, C.Y., and Bureau, D.P., 2001.** A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquacult. Res.* 32, 349-360.
82. **Choubert, G., and Storebakken, T., 1989.** Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture* 81, 69–77
83. **Clarke, S.D., 2001.** Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 131, 1129-1132.
84. **Clarke, S.D., Armstrong, M.K., and Jump, D.B., 1990.** Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance. *J. Nutr.* 120, 218-224.
85. **Clarke, S.D., and Hembree, J., 1990.** Inhibition of triiodothyronine's induction of rat liver lipogenic enzymes by dietary fat. *J. Nutr.* 120, 625-630.
86. **Clarke, S.D., Romsos, D.R., and Leveille, G.A., 1977.** Influence of dietary fatty acids on liver and adipose tissue lipogenesis and on liver metabolites in meal-fed rats. *J. Nutr.* 107, 1277-1287.

87. **Coburn, C.T., Knapp, F.F., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A., 2000.** Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissue of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 32523–32529.
88. **Coiffier, E., Roger, P., and Lecerf, J., 1987.** Effects of saturated and polyunsaturated fat on lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 88(B), 187-192
89. **Corraze G., and Kaushik S.J., 1999.** Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *OCL* 6, 111-115.
90. **Cowey, C.B., and Sargent, J.R., 1979.** Nutrition. In: Fish Physiology (Eds : Hoar, W.S., Randall, D.J. and Brett, D.R.) Academic press, New York, USA, pp. 1-69.
91. **Cowey, C.B., and Walton, M., 1989.** Intermediary metabolism. In: Intermediary metabolism (Eds: Cowey, C.B., and Walton, M.) Academic Press, pp. 259-329.
92. **Cowey, C. B., 1993.** Some effects of nutrition on flesh quality of cultured fish. In: Fish Nutrition in Practice (Eds: Kaushik, S.J., Luquet, P.) Proc. IV Int. Symp. Fish Nutrition and feeding, Les colloques INRA, n°61, Editions INRA, Paris, France, pp. 227-236.
93. **Craig, J.F., Kenley, M.J., and Talling, J.F., 1978.** Comparative estimations of the energy content of fish tissue from bomb calorimetry, wet oxidation and proximate analysis. *Freshw. Biol.* 8, 585–590.
94. **Crockett, E.L., and Sidell, B.D., 1993.** Peroxisomal β -Oxidation Is a Significant Pathway for Catabolism of Fatty Acids in a Marine Teleost. *Am. J. Physiol.* 264, R1004–R1009.
95. **Sellier, P., 1998.** Genetics of meat and carcass traits. In: The Genetics of the Pig (Eds: Rothschild, M. F., and Ruvinsky, A.) CAB International, Oxon, UK, pp. 463-510.

-D-

96. **Dabrowski, K., and Guderley, H., 2002.** Intermediary metabolism In: Fish nutrition (Eds : Halver, J.E., and Hardy, R.W.) Academic press, pp. 309-365.
97. **Damon, M., Louveau, I., Lefaucheur, L., Lebret, B., Vincent, A., Leroy, P., Sanchez, M.P., Herpin, P., and Gondret, F., 2006.** Number of intramuscular adipocytes and fatty acid binding protein-4 content are significant indicators of intramuscular fat level in crossbred Large White x Duroc pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 1083-1092.
98. **Davail B., Pakdel F., Bujo H., Perazzolo L. M., Waclawek M., Schneider W. J. et al., 1998.** Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. *J. Lipid. Res.* 39, 1929–1937
99. **De Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S.J., and Poli, B.M., 2004.** Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth

and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236, 413-429.

100. **Dentin, R., Pégorier, J.-P., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferré, P., Fouveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J., and Postic, C., 2004.** Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 20314-20326.
101. **Dentin, R., Benhamed, F., Pégorier, J.P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C., 2005.** Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin Invest.* 115, 2843-2854.
102. **Denton, J.E., and Yousef, M.K., 1976.** Body composition and organ weights of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 8, 489-499.
103. **Deshaies, Y., Arnold, J., Lalonde, J., and Richard, D., 1988.** Lipoprotein lipase in white and brown adipose tissues of exercised rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol.* 255, R226-231.
104. **Desvergne, B., and Walhi, W., 1999.** Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-688.
105. **Dias, J., Alvarez, M. J., Diezb, A., Arzelc, 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.
106. **Dias J., 1999.** Lipid deposition in rainbow trout (*O. mykiss*) and european seabass (*D. labrax*): nutritional regulation of hepatic lipogenesis. Thèse de l'Université de Porto, Portugal.
107. **Dobson, G.P., and Hochachka, P.W., 1987.** Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. *J. Exp. Biol.* 129, 125-140.
108. **Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A., and Mc Bride, J.R., 1979.** In: *Fish Physiology* (Eds: Hoar W.S., Randal D.J. and Brett J.R.) Academic Press, New York. pp. 334-338.
109. **Dos Santos J., Burkow I.C., and Jobling M., 1993.** Patterns of growth and lipid deposition in cod, *Gadus morhua* L., fed natural prey and fish-based feeds. *Aquaculture* 110, 173-189.
110. **Douirin, C., Haffray, P., Vallet, J.L., and Fauconneau, B., 1998.** Détermination de la teneur en lipides des filets de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* par le Torry Fat Meter®. *Sci. Alim.* 18, 527-535.
111. **Du, Z-Y., Clouet, P., Zheng, W-H., Degrace, P., Tian, L-X., and Liu, Y-J., 2006.** Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets. *Br. J. Nutr.* 95, 905-915.

-E-

112. **Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M., 1996.** Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320, 345-357.
113. **Eaton, S., 2002.** Control of mitochondrial β -oxydation. *Biochem. J.* 320, 345-357.
114. **Edvardsson, U., Von Löwenhielm B.H., Panfilov, O., Nyström, A.C., Nilsson, F., and Dahllöf, B., 2003.** Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with Peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics* 3, 468-478.
115. **Einen, O., and Roem, A.J., 1997.** Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquacult. Nutr.* 3, 115-126.
116. **Einen, O., and Skrede, G., 1998.** Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed high energy diets. *Aquacult. Nutr.* 4, 99-108.
117. **Elliott, J.M., 1982.** The effects of temperature and ration size on the growth and energetics of salmonids in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73(B), 81-91.
118. **Erskine, J.M., Jensen, D.R., and Eckel, R.H., 1994.** Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J. Nutr.* 124, 500-507.
119. **Esser, V., Britton, C. H., Weis, B. C., Krishnam, K., Foster, D. W., and McGarry, J. D., 1993.** Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding for rat liver carnitine palmitoyltransferase I: direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J. Biol. Chem.* 268, 5817-5822.
120. **Esser, V., Brown, N. F., Cowan, A. T., Foster, D. W., and McGarry, J. D., 1996.** Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I): M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 6972-6977.

-F-

121. **Fauconneau, B., Andre, S., Chmaitilly, H., Le Bail, P.-Y., Krieg, F., and Kaushik, S.J., 1997.** Control of skeletal muscle fibres and adipose cell size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50, 296-314.
122. **Faust, I.M., Johnson, P.R., Stern, J.S., and Hirsch, J., 1978.** Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of adiposity. *Am. J. Physiol.* 235, E275-E286.
123. **Faust, J.M., and Miller, W.H., 1981.** Hyperplastic growth of adipose tissue in obesity. In: *The Adipocyte and obesity: Cellular and Molecular Mechanism* (Eds: Angel, A., Wollenberg, C.H., and Roncari D.A.K.) Raven Press, New York, USA, pp. 41-51.

124. **Fielding, P.E., and Fielding, C.J., 1996.** Dynamics of lipoprotein transport in human circulatory system. In : Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. (Eds: Vance, D.E., and Vance, J.E.) Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 495-505.
125. **Figueiredo-Silva, A., Rocha, E., Dias, J., Silva, P., Rema, P., Gomes, E., and Valente, L.M.P., 2005.** Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquac. Nutr.* 11, 147-155.
126. **Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H.S., 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
127. **Foster, G.D., and Moon, T.W., 1985.** Enzyme activities in Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*: changes with capacity and food deprivation. *Can. J. Zool.* 64, 1080-1085.
128. **Fournier, A., Fairchild, T. J., Ferreira, L.D., and Bräu, L., 2004.** Post-exercise muscle glycogen repletion in the extreme effect of food absence and active recovery. *J. Sports Sci. Med.* 3, 139-146
129. **Frøyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, Ø., and Berge, R., 1998.** Carnitine Palmitoyltransferase I, Carnitine Palmitoyltransferase II, and Acyl-CoA Oxidase Activities in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 33, 923–930.
130. **Frøyland, L., Lie, Ø., and Berge, R., 2000.** Mitochondrial and Peroxisomal β -Oxidation Capacities in Various Tissues from Atlantic Salmon (*Salmo salar*), *Aquacult. Nutr.* 6, 85–89

-G-

131. **Gabillard, J.-C., Weil, C., Rescan, P.Y., Navarro, I., Gutierrez, J., and Le Bail, P.-Y., 2003.** Environmental temperature increases plasma GH levels independently of the nutritional status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 17-26.
132. **Gaigg, B., Neergaard, T.B.F., Schneiter, R., Hansen, J.K., Færgeman, N.J., Jensen, N.A., Andersen, J.R., Friis, J., Sandhoff, R., Schrøder, H.D., and Knudsen, J., 2001.** Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 1147–1160.
133. **Garbis, S., Lubec, G., and Fountoulakis, M., 2005.** Limitations of current proteomics technologies. *J. Chromatogr.* 1077(A),1-18.
134. **Garcia-Roves, P., Huss, J.M., Han, D.H., Hancock, C.R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M., and Holloszy, J.O., 2007.** Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10709-10713.

135. **Geay, Y., Bauchard, D., Hocquette, J.F., and Culioli, J., 2001.** Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 1-26.
136. **Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L., and Kaushik, S., 2001.** Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 487-503.
137. **Gevaert, K., and Vandekerckhove, J., 2000.** Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21, 1145-1154.
138. **Gilde, A.J., van der Lee, K.A.J.M., Willemsen, P.H.M., Chinetti, G., van der Leij, F.R., van der Vusse, G.J., Staels, B., and van Bilsen, M., 2003.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ. Res.* 92, 518-524.
139. **Gjedrem T., 1975.** Possibilities for genetic gain in salmonids. *Aquaculture* 6, 23-29.
140. **Gjedrem T., 1997.** Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquacult. Int.* 5, 197-206.
141. **Gjerde B., and Schaeffer L.R., 1989.** Body traits in rainbow trout. II. Estimates of heritabilities and phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25-44.
142. **Glatz, J.F., and Vusse, G.J., 1996.** Cellular fatty acid-binding proteins: Their function and physiological significance. *Prog. Lipid Res.* 35, 243-282.
143. **Goldberg, I.J., 1996.** Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 37, 693-707.
144. **Gondret, F., Mourot, J., and Bonneau, M., 1998.** Effects of dietary fatty acids on lipogenesis and lipid traits in muscle, adipose tissue and liver of growing rabbits. *Anim. Sci.* 66, 483-489.
145. **Gondret, F., and Hocquette, J.-F., 2006.** La teneur en lipides de la viande : une balance métabolique complexe. *INRA Prod. Anim.* 19, 327-338.
146. **Gondret, F., Hocquette, J.-F., and Herpin, P., 2004.** Age-related relationships between muscle fat content and metabolic traits in growing rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 1-16.
147. **Greene, D.H.S., and Selivonchick, D.P., 1987.** Lipid metabolism in fish. *Prog. Lip. Res.* 26, 53-85.
148. **Greer-Walker, M.G., 1970.** Growth and development of the skeletal muscle fibers of the cod (*Gadus morhua* L.). *J. Cons. Perm. Int. Pou. Mer.* 33, 228-244.

149. **Gillerm-Regost, C., Louveau, I., Sébert, S.P., Damon, M., Champ, M.M., and Gondret, F., 2006.** Cellular and Biochemical Features of Skeletal Muscle in Obese Yucatan Minipigs. *Obesity* 14, 1701-1707.
150. **Goudriaan, J.R., Tacke, P.J., Dahlmans, V.E., Gijbels, M.J., Van Dijk, K.W., Havekes, L. M., and Jong, M. C., 2001.** Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1488–1493.
151. **Govoroun, M., Le Gac, F., and Guiguen, Y., 2006.** Generation of a large-scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* 7, 196-203.
152. **Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D.D., and Kelly, D.P., 1994.** The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 11012–11016.
153. **Gurr, M.I., and Harwood, J.L., 1991.** Lipid biochemistry. An introduction. (Ed : Chapman-Hall), London, 406 pp.
154. **Gutierrez, S., Damon, M., Panserat, S., Kaushik, S., and Medale, F., 2003.** Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 35(B), 139- 151.
155. **Guzman, M., and Geelen, M.J.H., 1993.** Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1167, 227-241.

-H-

156. **Heinäniemi, M., Uski, J.O., Degenhardt, T., and Carlberg, C., 2007.** Meta-analysis of primary target genes of peroxisome proliferator-activated receptors. *Genome Biology* 8, R147.
157. **Harris, W.S., 1989.** Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* 30, 785-807.
158. **Havel, R.J., 1998.** Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis* 141, S1-S7.
159. **Hellerstein, M.K., 1996.** Regulation of hepatic de novo lipogenesis in human. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 523-557.
160. **Hemre, G.I., Lie, O., Lumbertsen, G.D., and Sundby, A., 1990.** Dietary carbohydrate utilization in cod (*G.morhua*). Hormonal response of insulin, glucagon and glucagon like-peptide to diet and starvation. *Comp. Biochem. Physiol.* 97(A), 41-44.
161. **Hemre, G.I., Lie, O., and Sundby, A., 1993.** Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): Metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 455-463.

162. **Hemre, G.I., and Sandnes, K., 1999.** Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult. Nutr.* 5, 9-16.
163. **Hemre, G.I., Mommsen, T.P., and Krogdahl, A., 2002.** Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutr.* 8, 175-194.
164. **Henderson, R.J., and Sargent, J.R., 1981.** Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. *Comp. Biochem. Physiol.* 69(C), 31-37.
165. **Henderson, R.J., Bell, M.V., and Sargent, J.R., 1985.** The conversion of polyunsaturated fatty acids to prostaglandins by tissue homogenates of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 85, 93-99.
166. **Henderson, L.J., and Tocher, D.R., 1987.** The lipid composition and biochemistry of freshwater fishes. *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347.
167. **Henderson, R.J., 1996.** Fatty Acid Metabolism in Freshwater Fish with Particular Reference to Polyunsaturated Fatty Acids. *Arch. Anim. Nutr.* 49, 5-22.
168. **Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.M., and Hoo-Paris, R., 2003.** Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp. Biochem. Physiol.* 135(B), 663-675.
169. **Hernández, P., Aliaga, S., Pla, M., and Blasco A., 2004.** Effect of selection for growth rate and slaughter age on carcass composition and meat quality traits in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 82, 3138-3143.
170. **Hertzel, A.V., and Bernlohr, D.A., 2000.** The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 175-180.
171. **Heuckeroth, R.O., Birkenmeier, E.H., Levin, M.S., and Gordon, J.I., 1987.** Analysis of the tissue specific expression, developmental regulation and linkage relationships of a rodent gene encoding heart fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.* 262, 9709-9717.
172. **Hide, W.A., Chan, L., and Li, W.H., 1992.** Structure and evolution of the lipase superfamily. *J. Lipid Res.* 33, 167-178.
173. **Hieter, P., and Boguski, M., 1997.** Functional genomics: it's all how you read it. *Science* 278, 601-602.
174. **Hillestad, M., and Johnsen, F., 1994.** High energy/ low protein diets for atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture* 124, 109-116.

175. **Hillestad, M., Johnsen, F., Austreng, E., and Asgard, E., 1998.** Long-term effects of dietary fat level and feeding rate on growth, feed utilization and carcass quality of atlantic salmon. *Aquac. Nutr.* 4, 89-97.
176. **Hillgartner, F.B., Salati, L.M. and Goodridge, A.G., 1995.** Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* 75, 47-76
177. **Hilton, J.W., and Atkinson, J.L., 1982.** Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Br. J. Nutr.* 47, 597-607.
178. **Hirsch, J., and Han, P. W., 1969.** Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J. Lipid Res.* 10, 77-82.
179. **Hocquette, J.F., Graulet, B., and Olivecrona, T., 1998.** Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 121(B), 85-96.
180. **Hocquette, J.F. Jurie, C., Ueda, Y., Boulesteix, P., Bauchart, D., and Pethick, D.W., 2003.** The relationship between muscle metabolic pathways and marbling of beef. In : Progress in research on energy and protein metabolism (Eds: Souffrant, W.B., Metges, C.C.) Wageningen Academic Publishers, pp. 513-516.
181. **Hodge, D. L., and Salati, S. A., 1997.** Nutritional regulation of glucose 6-phospahte dehydrogenase is mediated by a nuclear post-transcriptional mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 348, 303-312.
182. **Hood, R.L., Cook, L.J., Mills, S.C., and Scott, T.W., 1980.** Effect of feeding protected lipids on fatty acid synthesis in ovine tissues. *Lipids* 15, 644-650.
183. **Hooper, L., Summerbell, C.D., Higgins, J.P., Thompson, R.L., Capps, N.E., Smith, G.D., Riemersma, R.A., and Ebrahim, S., 2001.** Dietary fat intake and prevention of cardiovascular disease: systematic review. *BMJ* 322, 757-763.
184. **Hsu, R.Y., Butterworth, P.H.W., and Porter, J.W., 1969.** Pigeon liver fatty acid synthetase. In: Methods of enzymology, vol 14 (ed: Lowenstein, J.M.), Academic Press, New York, pp. 33-39.

-I-

185. **Ibabe, A., Grabenbauer, M., Baumgart, E., Fahimi, D.H., and Cajaraville, M. P., 2002.** Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Histochem. Cell Biol.* 118, 231-239.
186. **Ingle, D.L., Bauman, D.E., and Garrigus, U.S., 1972.** Lipogenesis in the ruminant: in vivo site of fatty acid synthesis in sheep. *J. Nutr.* 102, 617-623.
187. **Iossa, S., Mollica, M.P., Lionetti, L., Crescenzo, R., BottaandM., and Liverini, G., 2002.** Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int. J. Obesity* 26, 65-72.

188. **Iritani, N., Ikeda, Y., Fukuda, H., and Katsurada, A., 1984.** Comparative study of lipogenic enzymes in several vertebrates. *Lipids* 19, 828-835.
189. **Ishii, H., Fukumori, N., Horie, S., and Suga, T., 1980.** Effect of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 617, 1-11.
190. **Iwamoto, R.N., Myers, J.M., and Hershberger, W.K., 1990.** Heritability and genetic correlations for flesh coloration in pen-reared coho salmon. *Aquaculture* 86, 181-190.

-J-

191. **Jensen, M.D., 1997.** Lipolysis: contribution from regional fat. *Ann. Rev. Nutr.* 17, 127-139.
192. **Jobling, M., 1980.** Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.* 17, 325-334.
193. **Jobling, M., Knudsen, R., Pedersen, P.S., and Dos Santos, J., 1991.** Effects of dietary composition and energy content on the nutritional energetics of cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 92, 243- 257.
194. **Jobling, M., Koskela, J., Savolainen, R. , 1998.** Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.* 29, 601-607.
195. **Johansen, S.J.S., and Jobling, M., 1998.** The influence of feeding regime on growth and slaughter traits of cagereared Atlantic salmon. *Aquacult. Int.* 6, 1-17.
196. **Johansson, L., Kiessling, A., Kiessling, K.H. and Berglund, L., 2000.** Effects of altered ration levels on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Food Qual. Prefer.* 11, 247-254.
197. **Johnsen, R.I., Grahl-Nielsen, O., and Roem, A., 2000.** Relative absorption of fatty acids by Atlantic salmon *Salmo salar* from different diets, as evaluated by multivariable statistics. *Aquacult. Nutr.* 6, 255-261.
198. **Johnston, I.A., 1981.** Structure and function of fish muscles. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 48, 71-13.
199. **Johnston, I.A., 1999.** Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
200. **Jordal, A.E.O., Hordvik, I., Pelsers, M., Bernlohr, D.A., and Torstensen, B.E., 2006.** FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)- General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations. *Comp. Biochem. Physiol.* 145(B), 147-158.

201. **Josephson, D.B., 1991.** Seafoods. In: Volatil compounds in food and beverage (Ed: Maarse, H.) Marcel Dekker New York, pp. 179-202.
202. **Jump, D.B., and Clarke, S.D., 1999.** Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 63-90.
203. **Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., and Liimata, M., 1994.** Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 35, 1076-84.
204. **Jurie, C., Cassar-Malek, I., Bonnet, M., Leroux, C., Bauchart, D., Boulesteix, P., Pethick, D.W., and Hosquette, J.F., 2007.** Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 2660-2669.

-K-

205. **Kapoor, B.G., Smith, H., and Verighina, I.A., 1975.** The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. mar. Biol.* 13, 109-239.
206. **Katikou, P., Hughes, S.I., and Robb, D.H.F., 2001.** Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Aquaculture* 202, 89-99.
207. **Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Mäntysaari, E., and Eskelinen, U., 2002.** Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211, 65-79.
208. **Kaushik, S.J., 1986.** Environmental effects on feed utilization. *Fish Physiol. Biochem.* 2, 131-140.
209. **Kaushik, S., and Oliva-Teles, A., 1985.** Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50, 89-101.
210. **Kaushik, S.J., 1997.** Nutrition-alimentation et composition corporelle chez le poisson. *Cah. Nutr. Diet.* 32, 100-106.
211. **Kelley, D.S., Nelson, G.J., Serrato, C.M., and Schmidt, P.C., 1987.** Nutritional regulation of hepatic lipogenesis in the rat. *Nutr. Res.* 7, 509-517.
212. **Kelly, F.J., 1991.** The metabolic role of n-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to human disease. *Comp. Biochem. Physiol.* 98(A), 581-585.
213. **Kennedy, S. R., Leaver, M. J., Campbell, P. J., Zheng, X., Dick, J. R., and Tocher, D. R., 2006.** Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids* 41, 423-436.
214. **Kerner, J, and Hoppel, C., 1998.** Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Ann. Rev. Nutr.* 18, 179-206.

215. **Kersten, S., Mandard, S., Escher, P., Gonzalez, F.J., Tafuri, S., Desvergne, B., and Wahli, W., 2001.** The peroxisome proliferator receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB J.* 15, 1971-1978.
216. **Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Gad, P., and Lithell, H., 1987.** Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglyceride stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin. Physiol.* 7, 1-9.
217. **Kincaid H.L., Bridges W.R., and von Limbach B., 1977.** Three generations of selection for growth rate in fall-spawning rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 106, 621-628.
218. **Kobayashi, A., Jiang, L.L., and Hashimoto, T., 1996.** Two mitochondrial 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases in bovine liver. *J. Biochem.* 119, 775-782.
219. **Kouba, M., and Mouro, J., 1999.** Effect of a high linoleic acid diet on lipogenic enzyme activities and on the composition of the lipid fraction of fat and lean tissues in the pig. *Meat Sci.* 52, 39-45.
220. **Kovanen, P.T., 1987.** Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors. *Am. Heart J.* 113, 464-469.

-L-

221. **Lafontan, M., and Berlan, M., 2003.** Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 276-283.
222. **Larzul, C., Gondret, F., Combes, S., and De Rochambeau H., 2005.** Divergent selection on 63-day body weight in the rabbit: response on growth, carcass and muscle traits. *Genet. Sel. Evol.*, 37, 105-122.
223. **Lazarow, P.B., 1978.** Rat Liver Peroxisomes Catalyze the Beta Oxidation of Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 253, 1522-1528.
224. **Leaver, M. J., Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Diez, A., Favre-Krey, L., Ezaz, M. T., Bautista, J. M., Tocher, D. R., and Krey, G., 2005.** Three peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms from each of two species of marine fish. *Endocrinology* 146, 3150-3162.
225. **Leaver, M.J., Ezaz, M.T., Fontagné, S., Tocher, D.R., Boukouvala, E., and Krey, G., 2007.** Multiple peroxisome proliferator-activated receptor β subtypes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Mol. Endocr.* 38, 391-400.
226. **Le Bail, P.-Y., and Bœuf, G., 1997.** What hormones may regulate food intake in fish? *Aquat. Living Resour.* 10, 371-379.
227. **Lee, C.-H., Olson, P., and Evans, R.M., 2003.** Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144, 2201-2207.

228. **Lee, D.J., and Putnam, G.B., 1973.** The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *J. Nutr.* 103, 916–922.
229. **Lee, S.S.T., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D., Fernandez-Salguero, P., Westphal, A.H., and Gonzalez, F.J., 1995.** Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012–3022.
230. **Lefaucheur, L., Milan, D., Ecolan, P., and Le Callennec, C., 2004.** Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 1931-1941
231. **Lopez, F., Rougemont, J., Loriod, B., Bourgeois, A., Løi, L., Bertucci, F., Hingamp, P., Houlgatte, R., and Granjeaud, S., 2004.** Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics*, 5, 38–42.
232. **Leung, Y.F., and Cavalieri, D., 2003.** Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet.* 19, 649-659.
233. **Leveille, G.A., Romsos, D.R., Yeh, Y., and O'Hea, E.K., 1975.** Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* 54, 1075-1093.
234. **Levy, E., Thivaud, L., Turgeon, J., ROY, C.C., Gurbindo, C., Lepage, G., Godard, M., Rivard, G.-E., and Seidman, E., 1993.** Beneficial effects of fish-oil supplements on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase in patients with glycogen storage disease type I. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 922-929.
235. **Liang, X.F., Oku, H., and Ogata, H.Y., 2002.** The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131(A), 335-342.
236. **Lie, Ø., Sandvin, A., and Waagbø, R., 1993.** Influence of dietary fatty acids on the lipid composition of lipoproteins in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 12, 249-260.
237. **Lie, Ø., Waagbø, R., and Sandnes, K., 1988.** Growth and chemical composition of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed dry and silage-based diet. *Aquaculture* 69, 343-353.
238. **Liepa, G.U., Beitz, D.C., and Linder, J.R., 1978.** Fatty acid synthesis in ruminating and nonruminating goats. *J. Nutr.* 108, 1733-1739.
239. **Likimani, T.A., and Wilson, R.P., 1982.** Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J. Nutr.* 112, 112-117.
240. **Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., and Leveille, G.A., 1977a.** Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Nutr.* 107, 846-854.

241. **Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., and Leveille, G.A., 1977b.** Influence of diet on in vitro and in vivo rates of fatty acid synthesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Nutr.* 107, 1677-1682.
242. **Lin, C.S., and Hsu, C.W., 2005.** Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *J. Anim. Sci.* 83, 2075-2086.
243. **Lindberg, A., and Olivecrona, G., 1995.** Lipase evolution: trout, *Xenopus* and chicken have lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II-like activity but lack hepatic lipase-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 205-211.
244. **Lindsay, R.C., 1990.** Fish flavours. *Food Rev. Int.* 6, 437-455.
245. **Liu, R.Z., Denovan-Wright, E.M., and Wright, J.M., 2003.** Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid binding gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Biochem* 270, 3223-3234.
246. **Lockhart, D.J., and Winzler, E.A., 2000.** Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-836.
247. **Lowenstein, J.M., and Smith, S.R., 1962.** Intra e extramitochondrial isocitrate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta* 56, 385.
248. **Luiken, J.J.F.P., Arumugam, Y., Dyck, D.J., Bell, R.C., Pelters, M.M.L., Turcotte, L.P., Tandon, N.N., Glatz, J.F.C., and Bonen, A., 2001.** Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J. Biol. Chem.* 276, 40567-40573.
249. **Luiken, J.J.F.P., Turcotte, L.P., and Bonen, A., 1999.** Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J. Lipid Res.* 40, 1007-1016.
250. **Luong, A., Hannah, V.C., Brown, M.S., and Goldstein, J.L., 2000.** Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 26458-26466.

-M-

251. **Magana, M.M., Lin, S.S., Dooley, K.A., and Osborne, T.F., 1997.** Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *J. Lipid Res.* 38, 1630-1638
252. **Magana, M.M., and Osborne, T.F., 1996.** Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 271, 32689-32694
253. **Maglich, J.M., Caravella, J.A., Lambert, M.H., Willson, T.M., Moore, J.T., and Ramamurthy, L., 2003.** The first completed genome sequence from a

teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. *Nucleic Acids Res.* 31, 4051-4058

254. **Mannaerts, G.P., Debeer, L.J., and De Schepper, P.J., 1979.** Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in Liver Homogenates and Isolated Hepatocytes from Control and Clofibrate-Treated Rats, *J. Biol. Chem.* 254, 4585–4595.
255. **Martin, S.A.M., Cash, P., Blaney, S., and Houlihan, D.F., 2001.** Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 259-270.
256. **Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A.H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., Takahashi, A., Sone, H., Gotoda, T., Ishibashi, S., and Yamada, N., 2002.** Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J. Lipid Res.* 43, 107-114.
257. **Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C., and Le Gac, F., 2005.** Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 15, 143-154.
258. **McGarry, J. D., and Brown, N. F., 1997.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1-14.
259. **McNamara, J.P., and Martin, R.J., 1982.** Muscle and adipose tissue lipoprotein lipase in fetal and neonatal swine as affected by genetic selection for high or low backfat. *J. Anim. Sci.* 55, 1057-1061.
260. **Médale, F., Blanc, D., and Kaushik, S.J., 1991.** Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. 2. Utilization of dietary non-protein energy by sturgeon. *Aquaculture* 93, 143-154.
261. **Médale, F., Lefèvre, F., and Corraze, G., 2003.** Qualité nutritionnelle et diététique des poissons : constituants de la chair et facteurs de variations. *Cah. Nutr. Diét.* 38, 37-44.
262. **Menoyo, D., Lopez-Bote, C.J., Bautista, J.M., and Obach, A., 2003.** Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture* 225, 295-307.
263. **Menoyo, D., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Gines, R., Lopez-Bote, C.J. and Bautista, J.M., 2004.** Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *Br. J. Nutr.* 92, 41-52.
264. **Merril, C.R.R., Switzer, R.C., and Van Keuren, M.L., 1979.** Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4335-4339.

265. **Miller, W.C., Bryce, G.R., and Conlee, R.K., 1984.** Adaptation to a high-fat diet that increases exercise endurance in male rats. *J. Appl. Physiol.* 56, 78-83.
266. **Milligan, C.L., 1996.** Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 113(A), 51-60.
267. **Mohan, P. F., Phillips, F.C., Cleary, M.P. 1991.** Metabolic effects of coconut, safflower, or menhaden oil feeding in lean and obese Zucker rats. *Br. J. Nutr.*, 66 : 285-99.
268. **Mommsen, T.P., and Walsh, P.J., 1992.** Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. *Experientia* 48, 583-593.
269. **Moon T.W., Foster G.D., 1995.** Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol 4 (eds: Hochachka K. & Mommsen TP.) Elsevier. Pp. 65-100.
270. **Moore, S., 1968.** Amino acid analysis : aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.* 1243, 6281-6283.
271. **Morales, J., Pérez, J.F., Baucells, M.D., Mourot, J., and Gasa, J., 2002.** Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn- and corn-sorghum-acorn-based diets. *Livest. Prod. Sci.* 77, 195-205.
272. **Mori, T.A., and Beilin, L.J., 2001.** Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 11-17.
273. **Mourot, J., Kouba, M., and Bonneau, M., 1996.** Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing Meishan pig. Comparison with the Large White pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 115, 383-388.
274. **Müller, R., Rieck, M., and Müller-Brüsselbach, S., 2008.** Regulation of Cell Proliferation and Differentiation by PPAR β/δ . *PPAR res.* doi:10.1155/2008/614852.
275. **Muoio, D.M., MacLean, P.S., Lang, D.B., Li, S., Houmard, J.A., Way, J.M., Winegar, D.A., Corton, J.C., Dohm, G.L., and Kraus, W.E., 2002.** Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR β . *J. Biol. Chem.* 277, 26089–26097.
276. **Murphy, D., 2002.** Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Advan. Physiol. Educ.* 26, 256-270.
- N-
277. **Nanton, D.A., Lall, S.P., and McNiven, M.A., 2001.** Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquacult. Res.* 32, 225-234.

278. **Nanton, D.A., Lall, S.P., Ross, N.W., and McNiven, M.A., 2003.** Effect of dietary lipid level on fatty acid β -oxidation and lipid composition in various tissues of haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 135(B), 95-108.
279. **Nassour, I., and Léger, C.L., 1989.** Deposition and mobilisation of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquat. Living Resour.* 2, 153-159.
280. **Neat, C. E., Thomassen, M. S., and Osmondsen, H., 1980.** Induction of peroxisomal β -oxidation in rat liver by high fat diets. *Biochem. J.* 186, 369-371.
281. **Nees, N., Kiilerich, P., Sandberg, M.B., Helledie, T., Nielsen, R., and Mandrup, S., 2005.** ACBP – a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene. *Molecular and Cellular Biochemistry* 284, 149–157
282. **Nemeth, P.M., Rosser, B.W.C., Choksi, R.M., Norris, B.J., and Baker, K.M., 1992.** Metabolic response to a high-fat diet in neonatal and adult rat muscle. *Am. J. Physiol.* 262, C282 – C286.
283. **Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu CL, Wang Y, Pypaert, M., Petersen, K.F., and Shulman, G.I., 2002.** Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E395–401
284. **Nestel, P.J., Connor, W.E., Reardon, M.R., Connor, S., Wong, S., and Boston, R., 1984.** Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clin Invest* 74, 72-89.
285. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W., 1988.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* 9, 255-262.
286. **Niemeier, A., Gafvels, M., Heeren, J., Meyer, N., Angelin, B., and Beisiegel, U., 1996.** VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* 37, 1733–1742.
287. **Norberg, B. and Haux, C., 1985.** Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81(B), 869-876.

-O-

288. **O’Callaghan, B.L., Koo, S.H., Wu, Y., Freake, H.C., and Towle, H.C., 2001.** Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 16033–16039.
289. **Ochoa, S., 1955.** Malic enzyme. In: *Methods in Enzymology* (Eds : Colowick, S.P., and Kaplan, N.O.) Academic Press, New York, pp. 739-753.
290. **O’Farrell, P.H., 1975.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.

291. **O'Hea, E.K., and Leveille, G.A., 1969a.** Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 149-159.
292. **O'Hea, E.K., and Leveille, G.A., 1969b.** Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *J. Nutr.* 99, 338-344.
293. **Okabayashi, K., Shoji, H., Nakamura, T., Hashimoto, O., Asashima, M., and Sugino, H., 1996.** cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 406-413.
294. **Oliver, W.R., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznajdman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C., and Wilson, T.M., 2001.** A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5306-5311.
295. **Olsvik, P., Lie, K., Jordal, A., Nilsen, T., and Hordvik I., 2005.** Evaluation of potential reference genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.* 17, 6-21.
296. **Osmundsen, H., Bremer, J. and Pedersen, J. I., 1991.** Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1085, 141-158.

-P-

297. **Panserat, S., Perrin, A., and Kaushik, S., 2002.** High Dietary Lipids Induce Liver Glucose-6-Phosphatase Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 132, 137-141.
298. **Pantanetti, P., Garrapa, G.G., Mantero, F., Boscaro, M., Faloia, E., and Venarucci, D., 2004.** Adipose tissue as an endocrine organ? A review of recent data related to cardiovascular complications of endocrine dysfunctions. *Clin. Exp. Hypertens.* 26, 387-398.
299. **Parks, E. J., Krauss, R. M., Christiansen, M. P., Neese, R. A., and Hellerstein, M. K., 1999.** Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. *J. Clin. Invest.* 104, 1087-1096.
300. **Parks, E., and Hellerstein, M., 2000.** Effects of low-fat-high carbohydrate diets on serum lipids in humans : a review of the literature. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 413-433.
301. **Patsouris, D., Reddy, J.K., Muller, M., and Kersten, S., 2006.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology* 147, 1508-1516.
302. **Pégrier, J.P., Le May, C., and Girard, J., 2004.** Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* 134, 2444S-2449S.

303. **Pérusse, L., and Bouchard, C., 2000.** Gene-diet interactions in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1285S-1290S.
304. **Pfaffl, M.W., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-2007.
305. **Piles M., Blasco A., and Pla M., 2000.** The effect of selection for growth rate on carcass composition and meat characteristics of rabbits. *Meat Sci.*, 54, 347-355.
306. **Planas, J., Méndez, E., Baños, N., Capilla, E., Navarro, I., and Gutiérrez, J., 2000.** Insulin and IGF-I receptors in trout adipose tissue are physiologically regulated by circulating hormone levels. *J. Exp. Biol.* 203, 1153-1159
307. **Power, G.W., and Newsholme, E.A., 1997.** Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J.Nutr.* 127, 2142-2150.
308. **Pownall, H.J., and Hamilton, J.A., 2003.** Energy translocation across cell membranes and membrane models. *Acta Physiol. Scand.* 178, 357-365.
309. **Price, N.T., Van der Leij, F.R., Jackson, V.N., Corstophine, C.G., Thomson, R., Sorensen, A., and Zammit, V.A., 2002.** A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 80, 433-442.

-Q-

310. **Qiao, Y., Huang, Z.-G., Li, Q.-F., Liu, Z.-S., Dai, R., Pan, Z.-X., Xie, Z., and Liu, H.-L., 2008.** Developmental changes of the LPL mRNA expression and its effect on IMF content in sheep muscle. *Agric. Sci. China* 7, 104-111.
311. **Quillet, E., Le Guillou, S., Aubin, J., and Fauconneau, B., 2005.** Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245, 49-61.
312. **Quillet, E., Guillou, S., Aubin, J., Labbé, L., Fauconneau, B., and Médale F., 2007.** Response of a lean muscle and a fat muscle rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) line on growth, nutrient utilization, body composition and carcass traits when fed two different diets. *Aquaculture* 269, 220-231.

-R-

313. **Rabilloud, T., 2000.** Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem.* 72, 48A-55A.
314. **Rader, D.J., 2006.** Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J. Clin. Invest.* 116, 3090-100.
315. **Ramírez, J.A., Diaz, I., Pla, M., Gil, M., Blasco, A., and Oliver M.À., 2005.** Fatty acid composition of leg meat and perirenal fat of rabbits selected by growth rate. *Food Chem.*, 90, 251-256.

316. **Rasmussen, J.T., Borchers, T., and Knudsen, J., 1990:** Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters. *Biochem J*, 265:849-855.
317. **Rasmussen, J.T., Rosendal, J.R., and Knudsen, J., 1993.** Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem. J.* 292, 907-913.
318. **Rasmussen, R.S., and Ostefeld, T., 2000.** Influence of growth rate on white muscle dynamics in rainbow trout and brook trout. *J. Fish Biol.* 56, 1548-1552.
319. **Rasmussen, R.S., Ostefeld, T.H., and McLean, E., 2000.** Growth and feed utilisation of rainbow trout subjected to changes in feed lipid concentrations. *Aquac. Int.* 8, 531-542.
320. **Rasmussen, R.S., 2001.** Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. *Aquacult. Res.* 32, 767-786.
321. **Reddy, J.K., and Mannaerts, G.P., 1994.** Peroxisomal lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 343-70.
322. **Regost C., Arzel J., Cardinal M., Robin J., Laroche M., and Kaushik S.J., 2001.** Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 193, 291-309.
323. **Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., and Kaushik, S.J., 2003.** Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) - 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465-482.
324. **Reinitz, G., 1983.** Relative effect of age, diet and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35, 19-27.
325. **Renand, G., Larzul, C., Le Bihan-Duval, E., and Roy, P., 2003.** L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces: situation actuelle et perspectives à court et moyen terme. *INRA Prod. Anim.* 16, 159-173.
326. **Reyne, Y., Teyssier, J., Noughes, J., and Tebidel, S., 1985.** Longitudinal study of adipose cell size in the dorsocapular and perirenal depots of the growing rabbit. *J. Lipid Res.* 26, 1036-1046.
327. **Ricard F.H., and Touraille C., 1988.** Selection for leanness and carcass quality. In: Leanness in domestic birds (Eds: Leclercq, B., and Whitehead, C.C.) Butterworth, London, UK, pp. 377-386.
328. **Richard, M.J., Holck, J.T., and Beitz, D.C., 1989.** Lipogenesis in liver and adipose tissue of the domestic cat (*Felis domestica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 93(B), 561-564.

329. **Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S., and Corraze, G., 2006a.** Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 96, 200-309.
330. **Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S., and Corraze, G., 2006b.** Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261, 1077-1087
331. **Richards, J.G., Heigenhauser, G.J.F., and Wood, C.M., 2002.** Lipid oxidation fuels recovery from exhaustive exercise in white muscle of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 282, R89-R99.
332. **Richards, J.G., bonen, A., Heigenhauser, G.J.F., and Wood, C., 2004.** Palmitate movement across red and white muscle membranes of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R46-R53.
333. **Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warriss, P.D., and Nute, G.R., 2002.** Muscle lipid content determines the eating quality of smoked and cooked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 205, 345–358.
334. **Robelin J., 1981.** Cellularity of bovine adipose tissues: developmental changes from 15 to 65 percent mature weight. *J. Lipid Res.* 22, 452-457.
335. **Robelin J., and Casteilla, L., 1990.** Diff.renciation, croissance et développement du tissu adipeux. *INRA Prod. Anim.*, 3, 243-252.
336. **Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P.L., Zelus, D., Hughes, S., and Laudet, V., 2001.** Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Res.* 11, 781–788.
337. **Rollin, X., Médale, F., Gutierres, S., Blanc, D., and Sadasivam J. Kaushik, S. J., 2003.** Short- and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 89, 803–810.
338. **Rome L.C., Funke R.P., Alexander R. McN, Lutz G., Aldridge H., Scott F., and Freadman M., 1988.** Why animals have different muscle fibre types. *Nature* 335, 824-827.
339. **Rudd, S., 2003.** Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci.* 8,321-329.
340. **Rufo, C., Teran-Garcia, M., Nakamura, M.T., Koo, S.H., Towle, H.C., and Clarke, S.D., 2001.** Involvement of a unique carbohydrateresponsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 21969– 21975.
341. **Ruyter, B., Andersen, O., Dehli, A., Ostlund Farrants, A.-K., Gjoen, T., and Thomassen, M.S., 1997 .**Peroxisome Proliferator Activated Receptors in Atlantic

Salmon (*Salmo salar*): Effects on PPAR Transcription and Acyl-CoA Oxidase Activity in Hepatocytes by Peroxisome Proliferators and Fatty Acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 331–338.

342. **Rye, M., and Gjerde, B., 1996.** Phenotypic and genetic parameters of body composition traits and flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquac. Res.* 27, 121-133.

-S-

343. **Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., and Quackenbush, J. 2003.** TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34, 374-378.
344. **Sampath, H., Ntambi, J. M., 2005.** Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 317–340.
345. **Salans, L.B., Horton, E.S., and Sims, E.A.H., 1971.** Experimental obesity in man: Cellular character of the adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 50, 1005-1011.
346. **Sandberg, M.B., Bloksgaard, M., Duran-Sandoval, D., Duval, C., Staels, B., and Mandrup, S., 2005.** The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 5258-5266.
347. **Sargent, J.R., Henderson, R.J., and Tocher, DR., 1989.** The lipids. In: Fish Nutrition (Eds: Halver, J.E.) Academic Press, INC, pp. 153-218
348. **Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., and Estevez, A., 1999.** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199.
349. **Saxrud, K.M., Lambeth, D.O., and Anderson, P.M., 1996.** Isocitrate dehydrogenases from *Squalus acanthias* (Spiny Dogfish) and citrate formation by isolated mitochondria. *J. Exp. Zool.* 274, 334-345.
350. **Schneider, W.J., 1996.** Removal of lipoproteins from plasma. In Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. In : Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (Eds: Vance, D.E., and Vance, J.E.) Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 417-541.
351. **Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M., 1996.** Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 68, 850 – 858.
352. **Schwarz, J.M., Linfoot, P., Dare, D., and Aghajanian, K., 2003.** Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low- carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 43-50.

353. **Scow, R.O., and Blanchette-Mackie, E.J., 1985.** Why fatty acids flow in cell membranes. *Prog. Lipid Res.* 24, 197-241.
354. **Seiliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., and Bergot, P., 2001.** Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 130(B), 83-93.
355. **Seoane, J., Gomez-Foix, A. M., O'Doherty, R. M., Gomez-Ara, C., Newgard, C. B., and Guinovart, J. J., 1996.** Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 271, 23756-23760.
356. **Shearer, K.D., 1994.** Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119, 63-88.
357. **Shearer, K. D., Silverstein, J., and Dickhoff, W.W., 1997.** Control of growth and adiposity of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 157, 311-323.
358. **Sheikh, K., Camejo, G., Lanne, B., Halvarsson, T., Landergren, M.R., Oakes, N.D., 2004.** Beyond lipids, pharmacological PPAR α activation has important effects on amino-acid metabolism as studied in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 292, E1157-E1165.
359. **Sheridan, M.A., 1988.** Lipid dynamics in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilisation. *Comp Biochem Physiol* 90(B), 679-690.
360. **Sheridan, M.A., 1994.** Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 107(B), 495-508.
361. **Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M., 1996.** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
362. **Shillabeer, G., Hornford, J., Forden J.M., Wong, N.C.W., and Lau, D.C. W. 1990.** Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high fat diets in the rat. *J. Lip. Res.* 31, 623-631.
363. **Shimeno, S., Kheyyali, D., and Shikata, T., 1995.** Metabolic response to dietary lipid to protein ratios in common carp. *Fish. Sci.* 61, 977-980.
364. **Sigurgisladdottir, S., Lall, S.P., Parrish, C.C., and Ackman, R.G., 1992.** Cholestane as a digestibility marker in the absorption of polyunsaturated fatty acid ethyl esters in Atlantic salmon. *Lipids* 27, 418-424.
365. **Solini, A., Bonora, E., Bonadonna, R., Castellino, P., and DeFronzo, R.A. 1997.** Protein metabolism in human obesity: Relationship with glucose and lipid metabolism and with visceral adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2552-2558.

366. **Sparks, L.M., Xie, H., Koza, R.A., Mynatt, R., Hulver, M.W., Bray, G.A., and Smith, S.R., 2005.** A high-fat diet co-ordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54, 1926-1933.
367. **Sprecht, B., bartetzko, N., Hohoff, C., Kuhl, h., franke, R., Börchers, T., and Spener, F., 1996.** Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 19943-19949.
368. **Stabile, L.P., Klautky, S.A., Minor, S.M., and Salati, L.M., 1998.** Polyunsaturated fatty acids inhibit the expression of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in primary rat hepatocytes by a nuclear posttranscriptional mechanism. *J. Lipid Res.* 39, 1951-1963.
369. **Starling, R.D., Trappe, T.A., Parcell, A.C., Kerr, C.G., Fink, W.J., and Costill, D.L., 1997.** Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J. Appl. Physiol.* 82, 1185 – 1189
370. **Stickland, N.C., 1983.** Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J.Anat.* 7, 323-333.
371. **Stifani, S., Barber, D.L., Nimpf, J and Schneider, J.W., 1990.** A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1955-1959.
372. **Stubhaug, I., Lie, Ø., and Tortensen, B.E., 2007.** Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquaculture Nutr.* 13, 145-155.

-T-

373. **Tacken P.J., Teusink, B., Jong, M.C., harats, D., Havekes, L.M., Willems van Dijk, K., and Hofker, M.H., 2000.** LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knock out mice. *J. Lipid Res.* 41, 2055-2062.
374. **Takahashi, Y., Ide, T., and Fujita, H., 2000.** Dietary gamma-linolenic acid in the form of borage oil causes less body fat accumulation accompanying an increase in uncoupling protein 1 mRNA level in brown adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 127(B), 213-222.
375. **Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., and Yamamoto, T., 1992.** Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 89, 9252-9256.
376. **Takahashi, Y., and Ide, T., 2001.** Dietary fat-dependent changes of gene expression in rat adipose tissue. *Jpn. Agric. Res.* 35, 31-38.
377. **Takeuchi, H., Nakamoto, T., Mori, Y., Kawakami, M., Mabuchi, H., Ohishi, Y., Ichikawa, N., Koike, A., and Masuda, K., 2001.** Comparative effects of

dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1748-1754.

378. **Takeuchi, T., Watanabe, T., and Ogino, C., 1978.** Supplementary effects of lipids in a high protein diet for rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 44, 677-681.
379. **Takeuchi, T., Watanabe, T., and Ogino, C., 1979.** Digestibility of hydrogenated fish oils in carp and rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 45, 1517-1519.
380. **Takeuchi, T., and Watanabe, T., 1982.** The effects of starvation and environmental temperature on proximate and fatty acid composition of carp and rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 48, 1307-1316.
381. **Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J., 2003.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15924-15929.
382. **Thebault, S., Machour, N., Perrot, F., Jouenne, T., Lange, C., Hubert, M., Fontaine, M., Tron, F. and Charlionet, R., 2001.** Objet et évolution méthodologique de l'analyse protéomique. *Méd. Sci.* 17, 609-618.
383. **Thivend, P., Mercier, C., and Guilbot, A., 1972.** Determination of starch with glucoamylase. In : *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol.6 (eds : Whistler, R.L., Bemiller, J.N.). Academic Press, pp. 100-105.
384. **Thomassen, M. S., Christiansen, E. N., and Norum, K. R., 1982.** Characterization of the stimulatory effect of high fat diets on peroxisomal β -oxidation in rat liver. *Biochem. J.* 206, 195-202.
385. **Thompson, P. D., Cullinane, E. M., Eshleman, R., Kantor, M. A., and Herbert, P.N., 1984.** The effects of high-carbohydrate and high-fat diets on the serum lipid and lipoprotein concentrations of endurance athletes. *Metabolism* 33, 1003-1010.
386. **Thumelin, S., Esser, V., Charvy, D., Kolodziej, M., Zammit, V.A., McGarry, D., Girard, J., and Pégrier, J.P., 1994.** Expression of livercarnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat. *Biochem. J.* 300, 583-587.
387. **Tocher, D.R., 2003.** Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107-184.
388. **Torstensen, B.E., Lie, Ø., and Frøyland, L., 2000.** Lipid Metabolism and Tissue Composition in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)—Effects of Capelin Oil, Palm Oil, and Oleic Acid-Enriched Sunflower Oil as Dietary Lipid Sources. *Lipids* 35, 653-664.

389. **Torstensen, B.E., Lie, Ø., and Hamre, K., 2001.** A factorial experimental design for investigation of effects of dietary lipid content and pro- and antioxidants on lipid composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues and lipoproteins. *Aquacult. Nutr.* 7, 265-276.
390. **Torstensen, B.E., Frøyland, L. and Lie, Ø., 2004.** Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil - effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquacult. Nutr.* 10, 175-192.
391. **Totland, G. K., Madsen, L., Klementsén, B., Vaagenes, H., Kryvi, H., Frøyland, L., Hexeberg, S., and Berge, R. K., 2000.** Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. *Biol. Cell* 92, 1-13.
392. **Tranulis, M.A., Dregni, O., Christophersen, B., Krgdahl, A., and Borrebaek, B., 1996.** A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol.* 114(B), 35-39.
393. **Trudeau, V.L., Metcalfe, C.D., Mimeault, C., and Moon, T.W., 2005.** Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? In: T.P. Mommsen and T.W. Moon, Editors, *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* vol. 6, Elsevier, pp. 475–493.
394. **Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G., 2001.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 5116-5121.
395. **Turner, N., Bruce, C.R., Beale, S.M., Hoehn, K.L., So, T., Rolph, M.S., and Cooney, G.J., 2007.** Excess Lipid Availability Increases Mitochondrial Fatty Acid Oxidative Capacity in Muscle. *Diabetes* 56, 2085–2092.

-U-

396. **Uchida, Y., Kondo, N., Orii, T., and Hashimoto, T., 1996.** Purification and properties of rat liver peroxisomal very-long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biochem.* 119, 565-571.
397. **Unlu, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S., 1997.** Difference gel electrophoresis :a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077

-V-

398. **Van den Thillart, G., 1986.** Energy metabolism of swimming trout (*S. gairdneri*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate. *J. Comp. Physiol.* 156(B), 511-520.
399. **Van Waarde, A., 1983.** Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74(B), 675-684.

400. **Varanasi, U., Chu, R., Huang, Q., Castellon, R., Yeldandi, A. V., and Reddy, J.K., 1996.** Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human Peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase Gene. *J. Biol. Chem.* 271, 2147-2155.
401. **Vayda, M.E., Londraville, R.L., Cashon, R.E., Costello, L., and Sidell, B.D., 1998.** Two distinct types of fatty acid-binding protein are expressed in heart ventricle of Antarctic teleost fishes. *Biochem. J.* 330, 375–382.
402. **Vernier, J.M., Sire, M.F., 1983.** L'absorption intestinale des lipides chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier. IFREMER. Actes de Colloques 1, 393-428.
403. **Vernon, R.G., 1986.** The growth and metabolism of Adipocytes. In: Control and manipulation of animal growth (Eds: Buttery, P.J., Haynes, N.B., and Lindsay, D.B.) Butterworths, London pp. 67-83.
404. **Volek, J.S., Gómez, A.L., and Kraemer, W.J., 2000.** Fasting Lipoprotein and Postprandial Triacylglycerol Responses to a Low-Carbohydrate Diet Supplemented with n-3 Fatty Acids. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 383–391.

-W-

405. **Wajchenberg, B.L., 2000.** Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews* 21, 697–738.
406. **Wallaert, C., and Babin, P.J., 1992.** Effects of 17 beta -estradiol and starvation on trout plasma lipoprotein. *Lipids* 27, 1032-1041.
407. **Walton, M.J., and Cowey, C.B., 1982.** Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 71(B), 59–79.
408. **Wang, Y., Heigenhauser, G.J.F., and Wood, C.M., 1994.** Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *J. Exp. Biol.* 195, 227-258.
409. **Wang, Y.-H., Byrne, K.A., Reverter, A., Harper, G.S., Taniguchi, M., McWilliam, S.M., Mannen, H., Oyama, K., and Lehnert, S.A., 2005.** Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mammalian Genome* 16, 201–210
410. **Watanabe, T., 1982.** Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73(B), 3-15.
411. **Watkins, P.A., 1997.** Fatty acid activation. *Prog. Lipid. Res.* 36, 55-83.
412. **Weatherley, A.H., and Gill, H.S., 1983.** Relative growth of tissues at different somatic growth rates in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 23, 43-60.

413. **Weatherley, A.H., and Gill, H.S., 1987.** The biology of fish growth. London: Academic Press.
414. **Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.C., Bairoch, A., and Hochstrasser, D.F., 1998.** Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19, 1501-1505.
415. **Wilson, R., 1994.** Utilisation of dietary carbohydrates by fish. *Aquaculture* 124, 67–80.
416. **Wilson, J. E., 1995.** Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 126, 65–198.
417. **Wilson, J. E., 2003.** Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049 –2057.
418. **Wilson, R.P., 1994.** Utilization of dietary carbohydrate in fish. *Aquaculture* 124, 67-80.
419. **Wilson, R.P., 2002.** Amino-acids and proteins. In: Fish nutrition, vol 3 (eds: Halver J.E., and Hardy R.W.). Academic Press, pp143-179.
420. **Wood, C.M., 1991.** Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *J. Exp. Biol.* 160, 285-308.
421. **Wood, J.D., and Warris, P.D., 1992.** The influence of the manipulation of carcass composition on meat quality. In: The control of fat and lean deposition (Eds: Buttery, P.J., Boorman, K.N., and Lindsay, D.B.) Butterworths Heinmann Ltd, Oxford, pp. 331-334.
422. **Wright, P.A., 1995.** Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 198, 273-281.

-X-

423. **Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D., 2001.** Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J. Biol. Chem.* 276, 9800–9807.

-Y-

424. **Yagyu, H., Lutz, E.P., Kako, Y., Marks, S., Hu, Y., Choi, S.Y., Bensadoun, A., and Goldberg, I.J., 2002.** Very Low Density Lipoprotein (VLDL) Receptor-deficient Mice Have Reduced Lipoprotein Lipase Activity. *J. Biol. Chem.* 277, 10037–10043
425. **Yaqoob, P., Sherrington, E.J., Jeffery, N.M., Sanderson, P., Harvey, D.J., Newsholme, E.A., and Calder, P.C., 1995.** Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Znt. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 297-310.

-Z-

426. **Zakim, D. 1996.** Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212, 5–14.
427. **Zammit, V.A., 1999.** The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem. J.* 343, 505-515.
428. **Zampelas, A., Murphy, M., Morgan, L.M. and Williams, C.M., 1994.** Postprandial lipoprotein lipase, insulin and gastric inhibitory polypeptide responses to test meals of different fatty acid composition: comparison of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty-acids. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48, 849-858.
429. **Zanusso, J., Rémignon, H., Guy, G., Manse, H., and Babilé, R., 2003.** The effects of overfeeding on myofibre characteristics and metabolic traits of the breast muscle in Muscovy ducks (*Caïrina moschata*). *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 105–115.
430. **Zheng, X.Z., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Bell, J.G., Teale, A.J., 2004.** Effects of diets containing vegetable oils on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 236, 467-483.
431. **Zhou, S., Ackman, R.G., and Morrison, C., 1995.** Storage of lipids in the myosepta of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 171-178.
432. **Zhou S., Ackman R.G., Morrison C., 1996.** Adipocytes and Lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53, 326-332.

- Annexes –

Table S1: complete list of transcripts exhibiting differential expression between the two dietary treatments (HE vs LE) derived from each statistical method used (ANOVA, p<0.01 and SAM, FDR cut-off=0,15)

transcripts listed in black: found to be significantly changed according to one statistical approach only, and not further retained for consideration in the study

transcripts in red: found to be significantly changed by both statistical approaches, and further retained for consideration in the study

p<0,01	FDR < 0,15
p>0,01	FDR > 0,15
	FDR>0,25

genes up-regulated in fish fed the high energy diet (HE) compared to those fed the low energy diet (LE)			ANOVA	SAM	
Biological function	clone_names	contig	swissprot_hit_description	P-value	FDR cut-off
Metabolism					
Lipid					
	1RT162H02_D_D01	CA343403.1	APA11_ONCMY (O57523) Apolipoprotein A-I-1 precursor (Apo-AI-1) (ApoA-I-1)	0,0073	25
	tcba0005.n.01	CA372618.1	FABG_SHIFL (P0AEK3) 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (EC 1.1.1.100)	0,0088	25
Protein folding/synthesis/breakdown					
	tcba0034.e.20	CA352237.1	UBP47_HUMAN (Q96K76) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thioesterase 47)	0,0069	
	1RT155H19_B_D10	CA352228.1	IBRD2_HUMAN (Q7Z419) E3 ubiquitin ligase IBRDC2 (EC 6.3.2.-)	0,0085	
	tcay0023.k.09	BX299801.1	MEPD_PIG (P47788) Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) (Endopeptidase 24.15)	0,0093	25
Xenobiotic and anti-oxidant					
	tcay0039.p.23	CA344701.1	CP2J2_HUMAN (P51589) Cytochrome P450 2J2 (EC 1.14.14.1) (CYPII2) (Arachidonic acid epoxygenase)	0,0032	10
	tcac0001.p.19	BX081745.1	MMP16_HUMAN (P51512) Matrix metalloproteinase-16 precursor (EC 3.4.24.-) (MMP-16)	0,0032	15
Purine and pyrimidine					
	tcba0001.l.20	CA346464.1	RIR1_BRARE (P79732) Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (EC 1.17.4.1)	0,0014	5
Transcription/translation					
	tcba0001.d.13	CA371016.1	SFRS1_BRARE (Q6NYA0) Splicing factor, arginine/serine-rich 1	0,0009	25
	tcba0053.n.03	BX880067.1	RM01_MOUSE (Q99N96) 39S ribosomal protein L1, mitochondrial precursor (L1mt) (MRP-L1)	0,0073	
	tcba0031.f.11	BX886388.1	MLL3_HUMAN (Q8NEZ4) Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3 homolog (EC 2.1.1.43)	0,0085	
	1RT72G15_A_D08	CA364106.1	RARA_FUGRU (Q9W5Z3) Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha)	0,0099	
Signal transduction					
	tcba0005.c.08	BX858021.1	MAPK5_MOUSE (O54992) MAP kinase-activated protein kinase 5 (EC 2.7.11.1) (MAPK-activated protein kinase 5)	0,0017	10
	tcba0059.f.09	BX302662.1	IBP2_BRARE (Q9PTH3) Insulin-like growth factor-binding protein 2 precursor (IGFBP-2) (IBP-2)	0,0022	25
Trafficking					
	tcba0059.g.18	BX881771.1	AP2M1_RAT (P84092) AP-2 complex subunit mu-1 (Adaptin mu-1) (AP-2 mu-2 chain)	0,0071	25
Cell cycle					
	tcba0014.j.04	CA351409.1	RBM5_MOUSE (Q91YE7) RNA-binding protein 5 (RNA-binding motif protein 5) (Tumor suppressor LUCA15)	5,8E-05	5
	tcay0023.l.08	BX310686.1	ATM_MOUSE (Q62388) Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia mutated homolog)	0,0041	25
	tcba0015.e.13	BX871087.1	RERE_HUMAN (Q9P2R6) Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein (Atrophin-1-like protein)	0,0058	25
	tcba0048.k.23	BX320807.1	ZFYV9_HUMAN (O95405) Zinc finger FYVE domain-containing protein 9	0,0065	
	1RT87115_A_E08	CA345209.1	FAIM2_HUMAN (Q9BWQ8) Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Lifeguard protein)	0,007	
Immune and stress response					
	tcba0035.j.19	BX301945.1	HA1B_BOVIN (P13753) BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7 precursor	6,5E-04	10
	tcba0021.p.13	CA345685.1	C1R_HUMAN (P00736) Complement C1r subcomponent precursor (EC 3.4.21.41) (0,0038	25
Extracellular matrix and structural components					
	tcay0001.j.14	CA343393.1	ITI2_HUMAN (P19823) Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor (ITI heavy chain H2)	0,0052	25
Miscellaneous					
	tcay0039.l.20	BX856305.1	DYH1B_CHLRE (Q9MBF8) Dynein-1-beta heavy chain, flagellar inner arm I1 complex (1-beta DHC)	1,2E-05	0
	tcba0006.m.24	BX860408.1	NEURL_MOUSE (Q923S6) Neuralized-like protein 1 (m-neuralized 1) (m-neu1)	0,0017	25
	1RT107M11_A_G06	CA365914.1	B3AT_ONCMY (P32847) Band 3 anion exchange protein (Solute carrier family 4 member 1)	0,0039	25
	tcba0017.l.08	BX876210.1	PP2CA_RAT (P20650) Protein phosphatase 2C isoform alpha (EC 3.1.3.16) (PP2C-alpha) (IA)	0,0049	25
	tcba0006.c.15	CA347487.1	PIR_ARATH (Q5S2C3) Protein PIR (PIR of plants) (Protein PIROGI) (Protein KLUNKER) (AtSRA1)	0,0049	25
	1RT104J04_D_E02	CA347372.1	CALR_MOUSE (P14211) Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60)	0,0065	25
	tcay0026.b.17	BX313138.1	INVS_BRARE (Q8UVC1) Inversin	0,0074	25
	1RT39E20_C_C10	CA375167.1	DLLC_BRARE (Q9IAT6) Delta-like protein C precursor (DeltaC protein) (deIC)	0,0086	25
Unknown					
	tcba0023.d.09	BX865794.1	UNKNOWN	9,0E-04	
	tcav0001.a.16	BX085424.1	FA40B_MOUSE (Q8C9H6) Protein FAM40B	0,0013	25
	tcba0029.n.22	CA353332.1	AL2S4_HUMAN (Q96Q45) Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 4 protein	0,003	25
	tcba0062.k.12	CA342607.1	UNKNOWN	0,0054	25
	tcba0034.n.16	NO CONTIG	UNKNOWN	0,0077	15
total				36	8

genes down-regulated in fish fed the high energy diet (HE) compared to those fed the low energy diet (LE)

clone_names	contig	swissprot_hit_description		
Metabolism				
Lipid				
tcbk0026.a.17	CA342741.1	ERG28_PONPY (Q5R589) Probable ergosterol biosynthetic protein 28	1,9E-06	0
1RT36105_A_E03	CA358732.1	ACBP_CHAVI (P82934) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) (EP)	1,3E-05	0
1RT85A15_A_A08	CA344881.1	ECHA_HUMAN (P40939) Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor (TP-alpha)	1,2E-04	0
tcav0002.b.06	CA342547.1	FABPH_ONCMY (O13008) Fatty acid-binding protein, heart (H-FABP) (Heart-type fatty acid-binding protein)	1,5E-04	0
tcay0009.m.15	CA369435.1	DHC24_HUMAN (Q15392) 24-dehydrocholesterol reductase precursor (EC 1.3.1.-)	4,5E-04	0
tcbk0049.e.13	BX299335.1	THIC_MOUSE (Q8CAY6) Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (EC 2.3.1.9) (Cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase)	5,2E-04	0
tcad0008.a.12	BX077802.1	VIT_ONCMY (Q92093) Vitellogenin precursor (VTG) [Contains: Lipovitellin I (LVI); Phosvitin (PV); Lipovitellin II (LVII)]	9,2E-04	5
1RT85C09_A_B05	CA344888.1	RDH12_HUMAN (Q96NR8) Retinol dehydrogenase 12 (EC 1.1.1.-) (All-trans and 9-cis retinol dehydrogenase)	0,0028	5
tcba0011.i.05	CA343173.1	PIGF_HUMAN (Q07326) Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein (PIG-F) (GPI11 homolog)	0,0031	10
1RT102112_C_E06	CA345121.1	EBP_HUMAN (Q15125) 3-beta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomerase (EC 5.3.3.5)	0,0035	20
tcab0001.k.17	BX080468.1	ENPP7_HUMAN (Q6UWV6) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7 precursor (EC 3.1.4.12)	0,0037	15
1RT152H15_B_D08	CA345664.1	NR1D2_HUMAN (Q14995) Orphan nuclear receptor NR1D2 (Rev-erb-beta) (EAR-1R)	0,0039	15
tcay0002.n.16	CA365295.1	FABPH_ONCMY (O13008) Fatty acid-binding protein, heart (H-FABP) (Heart-type fatty acid-binding protein)	0,0043	5
1RT28E12_C_C06	CA343707.1	FADS_BRARE (Q9DEX7) Delta-5/delta-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.19.-)	0,0051	5
1RT39G22_C_D11	CA377380.1	ERG25_BRARE (Q7ZW77) C-4 methylsterol oxidase (EC 1.14.13.72) (Methylsterol monooxygenase)	0,0055	10
tcay0005.g.05	BX298956.1	CETP_HUMAN (P11597) Cholesteryl ester transfer protein precursor (Lipid transfer protein I)	0,0058	15
tcad0005.c.16	CA345956.1	ACS2L_MOUSE (Q99NB1) Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precursor (EC 6.2.1.1)	0,0096	
Generation of precursors and energy				
tcab0003.a.03	CA378390.1	UCRQ_MOUSE (Q9CQ69) Ubiquinol-cytochrome c reductase complex ubiquinone-binding protein (EC 1.10.2.2)	1,3E-04	0
tcac0006.o.18	CA342644.1	PGD_HUMAN (P52209) 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	2,4E-04	0
tcbk0048.k.20	CA341797.1	ATPA_RAT (P15999) ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	0,0014	10
1RT4014_C_E07	CA377924.1	VAD_MOUSE (P51863) Vacuolar ATP synthase subunit d (EC 3.6.3.14) (V-ATPase d subunit)	0,0015	5
tcad0004.f.19	CA344174.1	NIFUN_HUMAN (Q9H1K1) NifU-like N-terminal domain-containing protein, mitochondrial precursor (NifU-like protein)	0,0074	20
1RT75M17_A_G09	CA344796.1	PYC_HUMAN (P11498) Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor (EC 6.4.1.1) (Pyruvic carboxylase) (PCB)	0,008	15
tcbk0029.g.03	CA359102.1	ATPG_BOVIN (P05631) ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	0,0095	20
Carbohydrate				
1RT123L16_D_F08	CA383037.1	GTR11_HUMAN (Q9BYW1) Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11	6,9E-05	0
Amino acid and derivative				
tcad0008.b.16	BX077855.1	ACES_BUNFA (Q92035) Acetylcholinesterase precursor (EC 3.1.1.7) (AChE)	1,5E-04	0
tcav0002.a.07	BX085755.1	SERA_BOVIN (Q5EAD2) D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95) (3-PGDH)	0,0021	5
1RT101A07_A_A04	CA346244.1	CGL_BOVIN (Q58DW2) Cystathionine gamma-lyase (EC 4.4.1.1) (Gamma-cystathionase)	0,008	15
1RT38G10_C_D05	CA345122.1	GABT_PIG (P80147) 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.19)	0,008	20
1RT63I02_C_E01	CA343008.1	BHMT_BOVIN (Q51597) Betaine--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.5)	0,008	
Protein folding/synthesis/breakdown				
tcbk0023.g.05	BX870092.1	TPP2_HUMAN (P29144) Tripeptidyl-peptidase 2 (EC 3.4.14.10) (Tripeptidyl-peptidase II) (TPP-II)	5,2E-05	0
1RT119E07_A_C04	CA362332.1	UB2E1_HUMAN (P51965) Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase E1)	0,0023	15
tcay0013.g.06	CA347321.1	STUB1_CHICK (Q5ZHY5) STIP1 homology and U box-containing protein 1 (EC 6.3.2.-)	0,0025	5
tcay0010.b.01	CA342354.1	FBXW2_HUMAN (Q9UKT8) F-box/WD repeat protein 2 (F-box and WD-40 domain protein 2) (MD6 protein)	0,0027	10
1RT83D09_B_B05	CA343400.1	PSB7_MOUSE (P70195) Proteasome subunit beta type 7 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome subunit Z)	0,0031	20
tcay0016.n.10	BX307921.1	MKKS_HUMAN (Q9NPJ1) McKusick-Kaufman/Bardet-Biedl syndromes putative chaperonin	0,0048	15
tcbk0009.b.22	CA359994.1	UBE2B_RAT (P63149) Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase B)	0,0094	
1RT61L10_D_F05	CA342952.1	PSB7_RAT (Q9JHW0) Proteasome subunit beta type 7 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome subunit Z)	0,0099	15
Xenobiotic and anti-oxidant				
1RT156C12_C_B06	CA342882.1	MSRA_BOVIN (P54149) Peptide methionine sulfoxide reductase (EC 1.8.4.6) (Protein-methionine-S-oxide reductase)	0,0012	5
1RT121O16_C_H08	CA355697.1	MRP4_HUMAN (O15439) Multidrug resistance-associated protein 4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4)	0,006	25
tcay0019.k.08	CA387417.1	MK12_BRARE (O42376) Mitogen-activated protein kinase 12 (EC 2.7.11.24) (Stress-activated protein kinase 3)	0,008	15
Purine and pyrimidine				
1RT118A22_C_A11	CA345307.1	KAD2_BOVIN (P08166) Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase)	4,9E-05	5
tcbk0023.i.16	CA358107.1	ENP1_HUMAN (P49961) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (EC 3.6.1.5) (NTPDase 1)	5,9E-04	5
tcay0036.c.10	CA360911.1	NUDT5_HUMAN (Q9UKK9) ADP-sugar pyrophosphatase (EC 3.6.1.13) (EC 3.6.1.-)	0,003	20
tcad0008.p.16	CA358383.1	IUNH_CRIFA (Q27546) Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.1) (IU-nucleoside hydrolase)		15
Signal transduction				
tcad0009.p.23	BX079886.1	COMD6_HUMAN (Q7Z4G1) COMM domain-containing protein 6	1,6E-06	0
1RT43B03_B_A02	CA378449.1	PI52B_RAT (O88377) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-2 beta (EC 2.7.1.68)	6,4E-06	0
1RT36I20_C_E10	CA347085.1	GMEB2_RAT (O88873) Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2 (GMEB-2)	4,8E-05	0
1RT36J07_B_E04	CA376507.1	GPR4_PIG (P50132) Probable G-protein coupled receptor 4 (G-protein coupled receptor 19)	0,0013	0

tcaa0002.g.18	BX073047.1GDF8_BRARE (O42222) Growth/differentiation factor 8 precursor (GDF-8) (Myostatin)	0,0027	0
1RT28G13_A_D07	CA353225.1TMM11_HUMAN (P17152) Transmembrane protein 11 (Protein PM1)	0,003	0
Trafficking			
1RT40H24_D_D12	CA373165.1KIF2A_HUMAN (O00139) Kinesin-like protein KIF2A (Kinesin-2) (HK2)	1,5E-05	0
tcad0008.b.13	BX077849.1LMAN1_RAT (Q62902) ERGIC-53 protein precursor (ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein)	3,0E-04	0
tcbk0030.j.09	CA341577.1RAB32_HUMAN (Q13637) Ras-related protein Rab-32	0,0028	5
tcbk0016.j.22	BX877030.1GOGA2_RAT (Q62839) Golgin subfamily A member 2 (Cis-Golgi matrix protein GM130)	0,0038	
1RT129H23_B_D12	CA353060.1RAB3A_RAT (P63012) Ras-related protein Rab-3A	0,004	10
1RT60D16_D_B08	CA342832.1ARFG3_HUMAN (Q9NP61) ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3 (ARF GAP 3)	0,0041	15
1RT152J01_B_E01	CA382530.1SNX7_MACFA (Q4R5U9) Sorting nexin-7	0,0076	15
tcad0003.k.23	CA372583.1AP3S1_MOUSE (Q9DCR2) AP-3 complex subunit sigma-1 (Adapter-related protein complex 3 sigma-1 subunit)	0,0078	
Transcription/translation			
1RT86C11_A_B06	CA364165.1NUP53_BRARE (Q6P6X9) Nucleoporin NUP53 (Nuclear pore complex protein Nup53) (Nucleoporin Nup35)	3,5E-06	0
tcad0002.k.24	CA344182.1RM40_MOUSE (Q9Z2Q5) 39S ribosomal protein L40, mitochondrial precursor (L40mt) (MRP-40)	8,5E-06	0
1RT85C01_A_B01	CA341864.1MYCBP_BOVIN (Q2TBP7) C-Myc-binding protein (Associate of Myc 1) (AMY-1)	2,3E-05	0
1RT32E06_C_C03	CA375747.1PKHA5_HUMAN (Q9HAU0) Pleckstrin homology domain-containing family A member 5 (PEPP-2)	4,6E-05	0
tcbk0026.c.17	BX857123.1EPAB_XENTR (Q6DEY7) Embryonic polyadenylate-binding protein (Embryonic poly(A)-binding protein) (ePABP)	3,2E-04	5
tcay0016.i.04	2 contigs/C/ CUGB1_MOUSE (P28659) CUG triplet repeat RNA-binding protein 1 (CUG-BP1) (RNA-binding protein BRUNOL-2)	0,0016	0
1RT32G10_C_D05	CA375756.1BOP1_MOUSE (P97452) Ribosome biogenesis protein BOP1 (Block of proliferation 1 protein)	0,0026	10
tcaa0002.h.09	2 contigs/CE SYK_MOUSE (Q99MN1) Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6) (Lysine--tRNA ligase) (LysRS)	0,0028	10
tcay0003.e.08	CA346783.1SMYD1_MOUSE (P97443) SET and MYND domain-containing protein 1 (Zinc-finger protein BOP) (m-BOP)	0,0029	25
tcbk0030.o.18	CA345630.1RNPS1_RAT (Q6AYK1) RNA-binding protein with serine-rich domain 1	0,0036	
tcac0004.e.16	BX083721.1KLF9_RAT (Q01713) Krueppel-like factor 9 (Transcription factor BTEB1) (Basic transcription element-binding protein 1)	0,0044	15
1RT26A18_C_A09	CA342095.1RLA2_HORSE (Q6X9Z5) 60S acidic ribosomal protein P2	0,0053	10
1RT36H24_D_D12	CA376656.1THOC1_HUMAN (Q96FV9) THO complex subunit 1 (Tho1) (Nuclear matrix protein p84)	0,0055	10
1RT32K24_C_F12	CA375780.1COE1_RAT (Q63398) Transcription factor COE1 (OE-1) (O/E-1) (Early B-cell factor) (Olf-1)	0,0067	10
tcbk0050.n.13	CA364131.1NONO_PONPY (Q5RFL9) Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO protein)	0,0067	20
tcac0006.n.11	CA363870.1TXN4_MOUSE (P83877) Thioredoxin-like protein 4A (Spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kDa protein)	0,0077	25
tcay0019.k.18	2 contigs/B/ LHX3_BRARE (Q90421) LIM/homeobox protein Lhx3 (Homeobox protein LIM-3)	0,0099	20
tcay0005.i.24	BX299685.1PRI1_HUMAN (P49642) DNA primase small subunit (EC 2.7.7.-) (DNA primase 49 kDa subunit) (p49)		15
Cell cycle			
1RT110N19_B_G10	CA365553.1PERF_RAT (P35763) Perforin-1 precursor (P1) (Lymphocyte pore-forming protein) (Cytolysin)	5,9E-06	0
tcbk0023.g.12	BX865651.1RFC2_CHICK (P53033) Replication factor C subunit 2 (Replication factor C 40 kDa subunit) (RF-C 40 kDa subunit)	1,1E-04	0
tcab0003.b.18	BX080879.1CENPA_BRARE (Q803H4) Histone H3-like centromeric protein A (Centromere protein A) (CENP-A)	0,0017	10
tcad0007.c.15	BX078354.1PAR10_HUMAN (Q53GL7) Poly [ADP-ribose] polymerase 10 (EC 2.4.2.30) (PARP-10)	0,0024	25
tcab0001.i.20	BX080425.1MCM6Z_XENTR (Q6P1V8) Zygotic DNA replication licensing factor mcm6 (zMCM6)	0,0041	10
1RT75K17_A_F09	CA341909.1TTIN_HUMAN (Q8WZ42) Titin (EC 2.7.11.1) (Connectin) (Rhabdomyosarcoma antigen MU-RMS-40.14)	0,0049	15
tcad0009.o.15	BX079825.1DACH2_MOUSE (Q925Q8) Dachshund homolog 2 (Dach2)	0,0053	20
Extracellular matrix and structural components			
1RT40C13_A_B07	CA377673.1ERMAP_MOUSE (Q9JLN5) Erythroid membrane-associated protein precursor	1,0E-05	0
1RT110O08_C_H04	CA366639.1TEN_A_HUMAN (P24821) Tenascin precursor (TN) (Tenascin-C) (TN-C) (Hexabrachion) (Cytotactin)	5,9E-04	10
1RT86B07_B_A04	CA354518.1PTPRK_HUMAN (Q15262) Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (EC 3.1.3.48)	0,0032	15
1RT43K12_C_F06	CA378387.1TEN_A_CHICK (P10039) Tenascin precursor (TN) (Tenascin-C) (TN-C) (Hexabrachion) (Cytotactin)	0,0057	10
1RT77K24_C_F12	CA354409.1LECT2_MOUSE (O88803) Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 precursor (Chondromodulin II) (ChM-II)	0,0075	10
Immune and stress response			
tcad0004.b.04	CA342458.1CEBPD_MOUSE (Q00322) CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBP delta) (C/EBP-related protein 3)	0,0018	10
tcay0010.a.16	BX302846.1IL17D_HUMAN (Q8TAD2) Interleukin-17D precursor (IL-17D) (Interleukin-27) (IL-27)	0,0039	10
tcba0002.l.12	BX857300.1CO3_ONCMY (P98093) Complement C3-1	0,0068	10
1RT51K07_A_F04	CA342696.1SH21B_HUMAN (O14796) SH2 domain protein 1B (EWS/FLI1-activated transcript 2) (EAT-2)	0,0092	20
tcay0002.n.01	2 contigs/B/ CATL_SARPE (Q26636) Cathepsin L precursor (EC 3.4.22.15) [Contains: Cathepsin L heavy chain]		15
Miscellaneous			
tcav0002.f.22	BX311740.1ADIP_HUMAN (Q9Y2D8) Afadin- and alpha-actinin-binding protein (ADIP) (Afadin DIL domain-interacting protein)	0,0012	25
1RT152H24_D_D12	CA355542.1PRVA_ESOLU (P02628) Parvalbumin alpha	0,0013	5
1RT77F09_B_C05	CA354296.1LRTM1_PONPY (Q5R6B1) Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 1 precursor	0,0021	15
tcbk0034.l.09	CB495191.1UNG_HUMAN (P13051) Uracil-DNA glycosylase (EC 3.2.2.-) (UDG)	0,0027	20
1RT42H20_D_D10	CA378152.1S6A11_RAT (P31647) Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 3	0,0027	10
tcba0024.d.13	BX084843.1PTTG_PONPY (Q5NVI6) Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein precursor	0,0041	15
tcay0002.o.01	2 contigs/B/ NGF_BRARE (Q6YBR5) Nerve growth factor precursor (NGF) (zNGF)	0,0042	10
1RT90K07_A_F04	CA345986.1XNIF_XENLA (P35617) Low molecular weight neuronal intermediate filament (XNIF)	0,0065	25
1RT26L10_D_F05	CA342149.1EPD_CYPKA (P38528) Ependymin precursor (EPD)	0,0081	10
tcac0005.c.14	2 contigs/B/ ZP3_MACRA (P53785) Zona pellucida sperm-binding protein 3 precursor (Zona pellucida glycoprotein ZP3)	0,009	25

1RT129K20_C_F10	CA342967.1APMAP_HUMAN (Q9HDC9) Adipocyte plasma membrane-associated protein (BSCv protein)		15
Unknown			
tcag0001.a.09	NO CONTIG UNKNOWN	6,5E-08	0
tcag0001.b.03	NO CONTIG UNKNOWN	3,3E-06	0
tcbk0026.b.02	BX302134.1EBPL_MOUSE (Q9D0P0) Emopamil-binding protein-like (Emopamil-binding-related protein)	1,3E-05	0
tcad0004.d.22	CA370503.1K0831_HUMAN (Q6ZNE5) Protein KIAA0831	1,6E-05	0
1RT117O05_A_H03	NO CONTIG UNKNOWN	2,3E-05	0
1RT84M12_C_G06	CA344778.1FA32A_BRARE (Q6GQN4) Protein FAM32A-like	6,7E-05	0
1RT40C18_C_B09	CA344571.1GDPD5_HUMAN (Q8WTR4) Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 5 (EC 3.1.-.-)	8,9E-05	0
1RT32D09_B_B05	CA375668.1UNKNOWN	9,9E-05	
tcad0002.l.11	CA354291.1UNKNOWN	2,5E-04	0
1RT43B11_B_A06	CA378453.1PSL2_HUMAN (Q8TCT8) Signal peptide peptidase-like 2A (EC 3.4.23.-) (Protein SPP-like 2A) (Protein SPPL2a)	3,9E-04	0
tcag0004.m.01	NO CONTIG UNKNOWN	4,6E-04	0
tcay0013.e.19	2 contigs/C/ Y041_METJA (Q60346) Hypothetical protein MJ0041	6,2E-04	0
1RT56C05_A_B03	CA351141.1ZN452_HUMAN (Q6R2W3) Protein ZNF452	1,0E-03	15
tcag0001.a.06	NO CONTIG UNKNOWN	0,0017	0
1RT86D16_D_B08	CA364246.1TCTA_HUMAN (P57738) T-cell leukemia translocation-associated gene protein	0,0017	20
tcay0002.o.20	BX297204.1UNKNOWN	0,002	5
tcay0003.a.08	CA377985.1UNKNOWN	0,0028	5
tcag0001.c.08	NO CONTIG UNKNOWN	0,0029	5
1RT64E05_A_C03	CA357957.1UNKNOWN	0,0036	15
1RT153D16_D_B08	CA346765.1SHLB2_HUMAN (Q9NR46) SH3 domain GRB2-like protein B2 (Endophilin-B2)	0,0038	10
tcbk0020.f.01	BX870194.1UNKNOWN	0,0038	25
tcad0008.e.04	BX076030.1UNKNOWN	0,0044	25
tcad0005.d.15	BX076524.1RHBD2_HUMAN (Q9NX52) Rhomboid-related protein 2 (EC 3.4.21.105) (RRP2) (Rhomboid-like protein 2)	0,0051	15
tcay0008.i.15	BX300543.1CTDS1_MOUSE (P58466) Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A phosphatase 1 (EC 3.1.3.16)	0,0055	10
tcay0005.f.19	BX298938.1TRI39_RAT (Q6MFZ5) Tripartite motif-containing protein 39 (RING finger protein 23)	0,0055	10
tcbk0020.j.22	BX870141.1UNKNOWN	0,0055	20
tcav0004.l.07	2 contigs/B/ LRC59_BRARE (Q6NWX1) Leucine-rich repeat-containing protein 59	0,0059	
1RT45K16_C_F08	CA379312.1UNKNOWN	0,0099	
tcag0001.g.24	NO CONTIG UNKNOWN		10
total		129	103

Table S2: complete list of transcripts exhibiting differential expression between the two lines (F vs L) derived from each statistical method used (ANOVA, p<0.01 and SAM, FDR cut-off=0,15)

transcripts listed in black: found to be significantly changed according to one statistical approach only,

and not further retained for consideration in the study

transcripts in red: found to be significantly changed by both statistical approaches, and further retained for consideration in the study

p<0,01	FDR < 0,15
p>0,01	FDR > 0,15
	FDR > 0,25

genes up-regulated in the fatty muscle (F) line compared to the lean muscle (L) line

ANOVA SAM

Biological function			P-value	FDR cut-off
clone_names	contig	swissprot_hit_description		
Metabolism				
Lipid				
1RT34F04_D_C02	CA376046.1	NLTP_CHICK (Q07598) Nonspecific lipid-transfer protein (EC 2.3.1.176)	0,001	10
tcbk0030.c.13	CA350156.1	ACBP_HUMAN (P07108) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) (Diazepam-binding inhibitor)	0,0093	20
tcad0001.d.13	CA369158.1	FABD_HUMAN (Q8IVS2) Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial precursor (EC 2.3.1.39)	0,0095	
Generation of precursor and energy				
1RT110O02_C_H01	CA366638.1	FTHFD_PONPY (Q5RFM9) 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (EC 1.5.1.6) (10-FTHFDH)	1,8E-04	0
tcac0006.o.18	CA342644.1	6PGD_HUMAN (P52209) 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	0,0022	15
tcbk0009.o.05	BX860760.1	FTHFD_MOUSE (Q8R0Y6) 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (EC 1.5.1.6) (10-FTHFDH)	0,0025	0
1RT158K12_C_F06	CA351158.1	MDHC_CHICK (Q5ZME2) Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)	0,0032	10
tcay0009.p.07	2 contigs/CA	UCRI_MOUSE (Q9CR68) Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.10.2.2)	0,0055	10
1RT48D22_D_B11	CA362628.1	OXAL2_MOUSE (Q8VC74) Probable inner membrane protein OXA1L2, mitochondrial precursor	0,0097	20
1RT69N06_D_G0:	CA353549	ATPG_BOVIN (P05631) ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)		15
Carbohydrate				
tcay0015.a.15	BX306300.1	PPR3D_HUMAN (O95685) Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D (Protein phosphatase 1, regulatory subunit 6)	0,0082	15
Amino acid and derivative				
1RT63I02_C_E01	CA343008.1	BHMT_BOVIN (Q5I597) Betaine--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.5)	1,4E-04	0
tcad0005.c.22	BX076291.1	AATM_PIG (P00506) Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.1) (Transaminase A)	0,001	10
1RT38G10_C_D05	CA345122.1	GABT_PIG (P80147) 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.19)	0,0031	15
1RT69F18_D_C09	CA353510.1	AATM_MOUSE (P05202) Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.1)	0,0037	15
1RT87E10_C_C05	CA345343.1	DDAH1_HUMAN (O94760) NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (EC 3.5.3.18)	0,0045	25
1RT116P04_D_H02	CA365793.1	SETB1_MOUSE (O88974) Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 4 (EC 2.1.1.43)	0,0055	15
1RT80A15_A_A08	CA355422.1	GATB_HUMAN (O75879) glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial precursor (EC 6.3.5.-)	0,0083	25
tcbk0010.a.13	CB497735.1	AADAT_BOVIN (Q5E9N4) Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase mitochondrial precursor	0,0086	20
1RT66B21_B_A11	CA358344	BTD_FUGRU (Q8AV84) Biotinidase precursor (EC 3.5.1.12)		15
Protein folding/synthesis/breakdown				
tcac0003.d.03	CA345680.1	CAN9_HUMAN (O14815) Calpain-9 (EC 3.4.22.-) (Digestive tract-specific calpain) (nCL-4) (CG36 protein)	4,0E-04	15
1RT119E07_A_C04	CA362332.1	UB2E1_HUMAN (P51965) Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase E1)	9,2E-04	10
1RT54M13_A_G07	CA351453.1	MGAT1_RABIT (P27115) Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (EC 2.4.1.101)	9,9E-04	10
1RT61L10_D_F05	CA342952.1	PSB7_RAT (Q9JHW0) Proteasome subunit beta type 7 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome subunit Z)	0,002	10
tcay0010.a.20	2 contigs/CA	ECM29_PONPY (Q5R6J0) Proteasome-associated protein ECM29 homolog (Ecm29) (Fragment)	0,0027	10
1RT151B20_D_A10	CA383174.1	TS101_HUMAN (Q99816) Tumor susceptibility gene 101 protein	0,0097	
1RT116D09_B_BC	CA366166	LONM_HUMAN (P36776) Lon protease homolog, mitochondrial precursor (EC 3.4.21.-)		15
xenobiotic and oxidant				
1RT126G07_A_D04	CA359966.1	UDA1_HUMAN (Q9Y4X1) UDP-glucuronosyltransferase 2A1 precursor (EC 2.4.1.17)	1,1E-04	0
tcay0010.c.03	BX302905.1	MTF1_MOUSE (Q07243) Metal-regulatory transcription factor 1 (Transcription factor MTF-1)	0,0029	10
tcad0009.d.22	BX078145.1	8ODP_HUMAN (P36639) 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase (EC 3.1.6.-) (8-oxo-dGTPase)	0,0038	15
tcay0019.k.08	CA387417.1	MK12_BRARE (O42376) Mitogen-activated protein kinase 12 (EC 2.7.11.24)	0,0041	15
tcay0004.g.21	BX299516.1	CP2K4_ONCMY (O93297) Cytochrome P450 2K4 (EC 1.14.14.1) (CYP11K4)	0,0069	15
tcay0015.e.08	BX305962.1	ABCG2_MOUSE (Q7TMS5) ATP-binding cassette sub-family G member 2	0,0073	10
Signal transduction				
1RT58C17_A_B09	CA351258.1	DYR1A_RAT (Q63470) Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (EC 2.7.12.2)	0,0019	15
tcay0017.c.21	2 contigs/BX	GBG7_HUMAN (O60262) Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) gamma-7 subunit precursor	0,0029	10
tcay0028.m.05	CA344850.1	PLK4_HUMAN (O00444) Serine/threonine-protein kinase PLK4 (EC 2.7.11.21)	0,0075	15
Trafficking				
1RT80P10_D_H05	CA355410.1	COPG2_MOUSE (Q9QXK3) Coatomer subunit gamma-2 (Gamma-2 coat protein) (Gamma-2 COP)	8,4E-04	10
1RT98H07_B_D04	CA357062.1	CAV2_PANTR (Q2QLF3) Caveolin-2	0,002	10
tcay0022.k.12	BX310943.1	DOC2B_RAT (P70610) Double C2-like domain-containing protein beta (Doc2-beta)	0,0035	15
tcay0014.l.11	CB492295.1	DLC2B_MOUSE (Q9DAJ5) Dynein light chain 2B, cytoplasmic	0,0048	10
1RT79O17_A_H09	CA354919.1	COG5_HUMAN (Q9UP83) Conserved oligomeric Golgi complex component 5 (GTC-90)	0,0052	20
1RT46G03_A_D02	CA366987.1	UN13D_HUMAN (Q70J99) Unc-13 homolog D (Munc13-4)	0,0061	15
1RT57N01_B_G01	CA381614.1	VAMP2_RAT (P63045) Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2) (Synaptobrevin-2)	0,0065	20

tcbk0023.a.07	BX868924 RABE1_MOUSE (O35551) Rab GTPase-binding effector protein 1 (Rabaptin-5)		15
Transcription/translation			
1RT69M19_A_G10	CA353297.1 SAM68_CHICK (Q8UUW7) KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	5,7E-04	10
1RT162D06_D_B03	CA382825.1 ATRX_PONPY (Q7YQM3) Transcriptional regulator ATRX (EC 3.6.1.-)	0,0024	20
tcay0003.e.08	CA346783.1 SMYD1_MOUSE (P97443) SET and MYND domain-containing protein 1 (Zinc-finger protein BOP) (m-BOP)	0,0024	20
1RT164C14_C_B07	CA372664.1 DKC1_CHICK (Q5ZJH9) H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (EC 5.4.99.-) (Dyskerin)	0,0032	20
1RT104P01_B_H01	CA342462.1 PP4C_MOUSE (P97470) Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit (EC 3.1.3.16)	0,0037	20
tcba0028.j.21	CB487684.1 EF1A1_XENLA (P17506) Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) (42Sp50) (Thesaurin A)	0,0044	10
1RT48L14_D_F07	CA379775.1 CPSF3_MOUSE (Q9QXK7) Cleavage and polyadenylation specificity factor 73 kDa subunit	0,0049	20
1RT51J12_D_E06	CA380798.1 HNRL_MOUSE (Q921F4) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	0,0068	25
1RT160E08_C_C04	CA370470.1 SOF1_YEAST (P33750) Protein SOF1	0,0083	
1RT137M06_C_G03	CA386467.1 ZIMP7_HUMAN (Q8NF64) PIAS-like protein Zimp7	0,0089	
1RT165C23_A_B12	CA382216.1 IREB1_MOUSE (P28271) Iron-responsive element-binding protein 1 (IRE-BP 1)	0,009	20
tcac0005.o.08	CA368087.1 RU1C_XENLA (Q03369) U1 small nuclear ribonucleoprotein C (U1 snRNP protein C) (U1C protein)	0,0099	
1RT116B12_D_AC	CA365731 SAM68_RAT (Q91V33) KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1		15
Cell cycle			
1RT110N19_B_G10	CA365553.1 PERF_RAT (P35763) Perforin-1 precursor (P1) (Lymphocyte pore-forming protein) (Cytolysin)	2,4E-06	10
tcay0033.a.13	BX317014.1 HGFA_MOUSE (Q9R098) Hepatocyte growth factor activator precursor (EC 3.4.21.-)	0,0013	10
tcad0007.c.15	BX078354.1 PAR10_HUMAN (Q53GL7) Poly [ADP-ribose] polymerase 10 (EC 2.4.2.30) (PARP-10)	0,0015	20
1RT83M06_C_G03	CA365101.1 DCBD2_RAT (Q91ZV2) Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 precursor	0,0043	20
1RT83K03_A_F02	CA344600.1 CDC73_MOUSE (Q8JZM7) Parafibromin (Cell division cycle protein 73 homolog)	0,0052	15
1RT68H15_B_D08	CA343224.1 PA2G4_MOUSE (P50580) Proliferation-associated protein 2G4 (Proliferation-associated protein 1)	0,0052	25
tcay0007.c.21	BX300760.1 SMBP2_MESAU (Q60560) DNA-binding protein SMUBP-2 (EC 3.6.1.-) (ATP-dependent helicase IGHMBP2)	0,0063	10
tcay0031.m.11	BX315876 CARD4_HUMAN (Q9Y239) Caspase recruitment domain-containing protein 4 (Protein Nod1)		15
Extracellular matrix and structural components			
tcav0002.f.22	BX311740.1 ADIP_HUMAN (Q9Y2D8) Afadin- and alpha-actinin-binding protein (ADIP)	4,0E-05	10
1RT110O08_C_H04	CA366639.1 TENA_HUMAN (P24821) Tenascin precursor (TN) (Tenascin-C) (TN-C) (Hexabrachion)	2,7E-04	10
tcba0009.f.13	BX860880.1 MUC5A_HUMAN (P98088) Mucin-5AC (Mucin-5 subtype AC, tracheobronchial)	0,0073	20
tcac0002.d.03	CA382524.1 K2C8_BRARE (Q6NWF6) Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)	0,0082	20
1RT86B07_B_A04	CA354518.1 PTPRK_HUMAN (Q15262) Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (EC 3.1.3.48)	0,0093	
Immune and stress response			
tcay0022.e.15	CA344816.1 LY75_HUMAN (O60449) Lymphocyte antigen 75 precursor (DEC-205) (gp200-MR6) (CD205 antigen)	3,6E-04	0
tcay0010.a.16	BX302846.1 IL17D_HUMAN (Q8TAD2) Interleukin-17D precursor (IL-17D) (Interleukin-27) (IL-27)	0,0025	10
1RT51K07_A_F04	CA342696.1 SH21B_HUMAN (O14796) SH2 domain protein 1B (EWS/FLI1-activated transcript 2) (EAT-2)	0,0059	15
Miscellaneous			
tcav0005.o.16	BX316675.1 NARG1_MOUSE (Q80UM3) NMDA receptor-regulated protein 1 (N-terminal acetyltransferase 1)	7,8E-04	10
1RT73N01_B_G01	CA343988.1 ZN403_CHICK (Q6GVH4) Protein ZNF403 (Gametogenetin-binding protein 2)	0,002	0
1RT48L10_D_F05	CA379773.1 HXA3_HETFR (Q9IA21) Homeobox protein Hox-A3	0,0024	10
tcay0007.g.18	CA388300.1 CALCA_CHICK (P10286) Calcitonin gene-related peptide precursor (CGRP)	0,0045	10
tcac0001.a.22	BX073087.1 PRL_ONCMY (P21993) Prolactin precursor (PRL)	0,005	20
1RT55B09_B_A05	CA365952.1 OS9_HUMAN (Q13438) Protein OS-9 precursor (Amplified in osteosarcoma 9)	0,0054	
1RT128F06_D_C03	CA359542.1 AMNLS_MOUSE (Q99JB7) Amnionless protein precursor	0,006	15
1RT83H14_D_D07	CA344496.1 TKN1_RABBIT (P41540) Protachykinin 1 precursor (PPT)	0,0076	
Unknown			
1RT56C05_A_B03	CA351141.1 ZN452_HUMAN (Q6R2W3) Protein ZNF452	1,1E-04	0
1RT104P11_B_H06	CA347479.1 K1219_MOUSE (Q8BQZ4) Protein KIAA1219	1,3E-04	0
1RT86D16_D_B08	CA364246.1 TCTA_HUMAN (P57738) T-cell leukemia translocation-associated gene protein	1,5E-04	0
tcad0004.d.22	CA370503.1 K0831_HUMAN (Q6ZNE5) Protein KIAA0831	0,0013	
1RT104M18_C_G09	CA347317.1 FARP1_PONPY (Q5RAB8) FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	0,0014	15
tcba0005.o.16	CA356997.1 HUCE1_MOUSE (Q9DB85) Cerebral protein 1 homolog	0,0017	10
tcay0016.m.18	BX307892.1 UNKNOWN	0,0018	15
tcad0003.o.06	BX075110.1 NUDC3_MOUSE (Q8R1N4) NudC domain-containing protein 3	0,0021	10
tcac0001.i.22	2 contigs/BX UNKNOWN	0,0029	15
1RT71J05_B_E03	CA343481.1 CPLX1_MACFA (Q4R4N1) Complexin-1	0,0035	20
tcay0039.h.03	BX859100.1 FMO6_HUMAN (Q60774) Putative dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 6 (EC 1.14.13.8)	0,0036	15
tcad0005.a.06	CA372169.1 TEX10_BRARE (Q803M3) Testis-expressed sequence 10 protein homolog	0,0041	15
tcay0010.a.02	BX301912.1 UNKNOWN	0,0044	10
1RT73N08_D_G04	CA364863.1 STK19_HUMAN (P49842) Serine/threonine-protein kinase 19 (EC 2.7.11.1) (Protein RP1) (Protein G11)	0,005	20
tcag0001.c.01	NO CONTIG UNKNOWN	0,0081	20
tcay0010.h.11	CA349131 GRWD1_HUMAN (Q9BQ67) Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	FDR15	15

genes down-regulated in the fatty muscle (F) line compared to the lean muscle (L) line
P-value SAM FDR

clone_names	contig_name	swissprot_hit_description	P-value	SAM	FDR
Metabolism					
Lipid					
tcba0003.a.22	BX857103.1	CERK1_HUMAN (Q8TCT0) Ceramide kinase (EC 2.7.1.138) (hCERK) (Lipid kinase 4)	6,3E-04		10
1RT96B15_B_A08	CA356381.1	ABCAC_HUMAN (Q86UK0) ATP-binding cassette sub-family A member 12 (ATP-binding cassette transporter 12)	6,6E-04		20
1RT102112_C_E06	CA345121.1	EBP_HUMAN (Q15125) 3-beta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomerase (EC 5.3.3.5)	0,0013		25
Generation of precursor and energy					
tcbk0048.e.13	BX872700.1	NADC_MOUSE (Q91X91) Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] (EC 2.4.2.19)	0,0029		25
Carbohydrate					
tcaa0001.g.03	CA354706.1	G3P_PIG (P00355) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (GAPDH)	0,0028		20
Amino acid and derivative					
tcbk0057.c.08	BX879261.1	DCE1_FELCA (P14748) Glutamate decarboxylase 1 (EC 4.1.1.15)	6,3E-04		25
Protein folding/synthesis/breakdown					
tcba0022.j.10	CA341851.1	PSB11_CARAU (Q9IB84) Proteasome subunit beta type 1-A (EC 3.4.25.1)	3,1E-04		25
tcba0026.g.11	BX866892.1	UBP10_HUMAN (Q14694) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 (EC 3.1.2.15)	0,0016		20
tcbk0029.b.12	CA342457.1	PTH2_BOVIN (Q3ZBL5) Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial precursor (EC 3.1.1.29) (PTH 2)	0,002		25
tcbk0019.a.22	BX862934.1	BIRC6_HUMAN (Q9NR09) Baculoviral IAP repeat-containing protein 6	0,0062		25
tcbk0044.p.23	CA343869.1	PSB6_BOVIN (Q3MHN0) Proteasome subunit beta type 6 precursor (EC 3.4.25.1)	0,0089		25
xenobiotic and oxidant					
tcbi0010.o.03	BX856568.1	GSHB_BOVIN (Q5EAC2) Glutathione synthetase (EC 6.3.2.3)	0,0013		
Purine and pyrimidine					
tcbk0029.i.12	BX295336.1	NDKA_RAT (Q05982) Nucleoside diphosphate kinase A (EC 2.7.4.6)	1,2E-04		15
1RT55H09_B_D05	CA381176.1	S29A1_HUMAN (Q99808) Equilibrative nucleoside transporter 1 I	8,1E-04		15
tcad0006.h.09	BX076400.1	URIC_BACSB (Q45697) Uricase (EC 1.7.3.3) (Urate oxidase)	0,0042		
Iron					
tcba0012.p.09	BX866125.1	ISAM2_ARATH (Q8LCY2) Iron-sulfur assembly protein IscA-like 2, mitochondrial precursor	0,0015		25
tcba0006.l.19	BX909008.1	TFR1_CRIGR (Q07891) Transferrin receptor protein 1 (TfR1) (TR) (TfR) (Trfr) (CD71 antigen)	0,0048		15
Signal transduction					
tcay0024.j.09	BX321614.1	OPN3_HUMAN (Q9H1Y3) Opsin-3 (Encephalopsin) (Panopsin)	0,0028		20
1RT23P08_D_H04	CA370878.1	GNA11_RAT (Q9JID2) Guanine nucleotide-binding protein alpha-11 subunit	0,0058		
tcbk0044.p.07	BX081895.1	SHLB1_HUMAN (Q9Y371) SH3 domain GRB2-like protein B1 (EC 2.3.1.-)	0,0076		25
tcbk0044.i.07	CA363221.1	TBCD4_MOUSE (Q8BYJ6) TBC1 domain family member 4 (Akt substrate of 160 kDa) (AS160)	0,0079		
Trafficking					
1RT96L04_D_F02	CA356581.1	KIF5C_MOUSE (P28738) Kinesin heavy chain isoform 5C (Kinesin heavy chain neuron-specific 2)	0,0049		20
tcad0004.m.03	BX077502.1	MYO1F_MOUSE (P70248) Myosin If	0,0053		
tcbk0034.g.05	BX878436.1	MYO1E_RAT (Q63356) Myosin Ie (Myosin heavy chain myr 3)	0,0082		
tcba0027.b.15	CA353370.1	BET1_HUMAN (O15155) BET1 homolog (Golgi vesicular membrane-trafficking protein p18) (hBET1)	0,0099		
Transcription/translation					
tcba0013.p.09	BX862970.1	DDX31_HUMAN (Q9H8H2) Probable ATP-dependent RNA helicase DDX31 (EC 3.6.1.-)	0,005		25
tcbk0025.o.04	BX874230.1	DDX41_MOUSE (Q91VN6) Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 (EC 3.6.1.-)	0,0091		
1RT153E19_A_C10	CA349236.1	TRM1_METTH (O27258) N(2),N(2)-dimethylguanosine tRNA methyltransferase (EC 2.1.1.32)	0,0058		20
tcbk0058.n.07	BX881256.1	ZN180_HUMAN (Q9UJW8) Zinc finger protein 180 (HHZ168)	0,007		25
tcay0005.p.22	BX300186.1	EXOS4_HUMAN (Q9NPD3) Exosome complex exonuclease RRP41 (EC 3.1.13.-)	0,0055		
tcbk0053.n.10	BX882560.1	SMRC1_MOUSE (P97496) SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C memb	0,0038		
tcbk0053.b.14	BX880884.1	TF2H2_HUMAN (Q13888) TFIIF basal transcription factor complex p44 subunit	0,0092		
Cell cycle					
tcbk0025.g.08	CB489954.1	MCM5_XENTR (Q561P5) DNA replication licensing factor mcm5 (Minichromosome maintenance protein 5)	0,0028		25
tcay0031.k.23	BX315607.1	LYAR_RAT (Q6AYK5) Cell growth-regulating nucleolar protein	0,0038		
Immune and stress response					
tcay0012.o.24	BX304682.1	PGRP2_PIG (Q866Y3) N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase precursor (EC 3.5.1.28)	4,1E-04		15
tcbk0002.d.24	CA357149.1	CFAH_MOUSE (P06909) Complement factor H precursor (Protein beta-1-H)	0,004		25
tcay0040.g.14	CA357087.1	FUCL6_ANGJA (Q9I926) Fucosyltransferase 6 precursor	0,005		15
tcay0035.b.07	CA353988.1	PP2C1_SCHPO (P40371) Protein phosphatase 2C homolog 1 (EC 3.1.3.16) (PP2C-1)	0,0076		
Extracellular matrix and structural components					
tcav0004.k.11	CA370439.1	SYMPK_HUMAN (Q92797) Symplekin	0,0024		25
tcba0014.a.04	CA343393.1	ITI2_HUMAN (P19823) Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor (ITI heavy chain H2)	0,0064		25

1RT106O05_A_H03	CA363152.1 ITIH3_MESAU (P97280) Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor (ITI heavy chain H3)	0,0075	25
tcbk0042.p.11	BX878981.1 TJAP1_HUMAN (Q5JTD0) Tight junction-associated protein 1 (Tight junction protein 4)	0,0083	

Miscellaneous

tcav0001.h.15	CA349955.1 RHAG_HUMAN (Q02094) Rhesus blood group-associated glycoprotein	6,3E-04	15
tcbk0035.a.03	CA366128.1 XPA_XENLA (P27088) DNA-repair protein complementing XP-A cells homolog	8,2E-04	15
1RT157K11_A_F06	CA342006.1 TSNAX_PONPY (Q5RC21) Translin-associated protein X (Translin-associated factor X)	9,5E-04	15
1RT35F24_D_C12	CA351487.1 PLMN_MOUSE (P20918) Plasminogen precursor (EC 3.4.21.7)	0,001	20
tcbk0013.l.11	BX303975.1 MYOD2_ONCMY (Q91206) Myoblast determination protein 1 homolog 2 (Myogenic factor 1-2)	0,0019	25
tcbk0040.b.04	CA356157.1 A2MG_PONPY (Q5R4N8) Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	0,0019	15
tcbk0045.j.21	CA342543.1 CSN7B_MOUSE (Q8BV13) COP9 signalosome complex subunit 7b (Signalosome subunit 7b)	0,002	25
tcbk0041.c.21	CA369830.1 TTHY_CROPO (O55245) Transthyretin precursor (Prealbumin)	0,002	15
tcbk0059.h.10	BX881269.1 FGF12_RAT (P61150) Fibroblast growth factor 12 (FGF-12)	0,0051	
tcbk0057.a.03	BX879767.1 FA5_BOVIN (Q28107) Coagulation factor V precursor (Activated protein C cofactor)	0,0099	

Unknown

tcbk0047.j.15	BX885098.1 UNKNOWN	1,7E-04	25
tcbk0026.j.06	CA344265.1 UNKNOWN	6,8E-04	15
tcbk0057.a.11	BX316263.1 UNKNOWN	0,0019	25
tcbk0051.a.08	CA343231.1 DENR_BRARE (Q6DH65) Density-regulated protein (DRP)	0,002	25
tcbk0044.p.24	BX883196.1 FKBP8_HUMAN (Q14318) 38 kDa FK506-binding protein homolog (FKBPR38) (FK506-binding protein 8)	0,0023	25
tcbk0053.n.15	BX881725.1 LAP4B_MACFA (Q4R6E8) Lysosomal-associated transmembrane protein 4B	0,0065	
tcbk0020.m.17	CA366724.1 UNKNOWN	0,0071	
tcbk0059.i.01	BX882076.1 FYCO1_HUMAN (Q9BQS8) FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	0,0078	
tcbk0014.a.23	CA354968.1 YB85_YEAST (P38329) Uncharacterized membrane protein YBR235W	0,0088	
tcbk0045.j.08	CA352419.1 UNKNOWN	0,009	
tcad0006.c.11	NO CONTIG UNKNOWN	0,0095	25
1RT74116_C_E08	CA353838.1 LIN1_HUMAN (P08547) LINE-1 reverse transcriptase homolog	0,0097	25

Total

64

12

Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets

Stéphane Panserat^{1*}, Cathy Kolditz¹, Nadège Richard¹, Elisabeth Plagnes-Juan¹, Francois Piumi², Diane Esquerré^{2,3}, Françoise Médale¹, Genevieve Corraze¹ and Sadavisam Kaushik¹

¹INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture and Genomics, Pôle d'Hydrobiologie, CD 918, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

²INRA, DGA, UMR 314, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, CRB GADIE, F-78350 Jouy-en-Josas, France

³CEA, DSV, IRCM, SREIT, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, F-78352 Jouy-en-Josas, France

(Received 30 November 2007 – Revised 25 February 2008 – Accepted 25 February 2008 – First published online 28 April 2008)

Reducing the reliance on fishery by-products as amino acid and fatty acid sources in feeds for farmed fish is a major objective today. We evaluated the effect of dietary fish oil or dietary fishmeal replacement by vegetable oils and plant proteins respectively through analysis of hepatic transcripts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish were fed right from first feeding with diets based on plant by-products before being killed. We analysed the hepatic gene profile using trout cDNA microarrays (9K). Our data showed that seventy-one and seventy-five genes were affected after fish oil and fishmeal replacement respectively. The major part of modified gene expression coding for proteins of the metabolic pathways was as follows: (i) a lower level of expression for genes of energy metabolism found in fish after fishmeal and fish oil replacement; (ii) a lower level of gene expression for fatty acid metabolism (biosynthesis) in fish fed with vegetable oils; (iii) a differential expression of actors of detoxification metabolism in trout fed with vegetable oils; (iv) a lower level of expression of genes involved in protein metabolism in fish fed with plant proteins. Overall, our data suggest that dietary fish oil replacement is linked to a decreased capacity of fatty acid biosynthesis (fatty acid synthase) and variation of detoxification metabolism (cytochrome P450s) whereas dietary fishmeal replacement may depress protein metabolism in the liver as reflected by glutamine synthetase.

Fish nutrition: Plant products: Fish oil: Fishmeal: Liver: Transcriptomics: Rainbow trout

Feed for intensively farmed fish still relies heavily on feedstuffs of marine origin, fishmeal and fish oil. This impairs the sustainability of fish production, while aquaculture should be a solution to the generally observed decline in fishery resources⁽¹⁾. Research is intense for finding ways to replace marine feedstuffs (fishmeal and fish oil) by plant feedstuffs⁽²⁾. In the past 20 years, fish feeds have included large amounts of fish oil, given the beneficial effects on N utilisation and environmental load^(3,4). Partial and total replacement of fishmeal by vegetable protein sources is similarly the object of several studies in almost all species^(2,5).

Efforts towards replacement of fishmeal by other alternative protein sources have been undertaken for more than two decades and there is a vast amount of literature on partial replacement of fishmeal by plant feedstuffs⁽⁶⁾. A number of disadvantages have been ascribed to the use of plant protein sources: relatively low protein content, amino acid imbalance, low palatability, presence of endogenous anti-nutritional factors and large amounts of carbohydrates^(2,7,8). Attempts have been made to develop fishmeal-free diets for different species including salmonids either with single ingredients duly supplemented with amino acids⁽⁹⁾ or using a

mixture of different protein sources^(10–13). It is clear that a substantial reduction in the dietary levels of fishmeal can be achieved although total replacement of fishmeal by plant ingredients is still not common in salmonids. Some earlier studies have shown that total replacement of fishmeal by plant proteins leads to decreased growth of rainbow trout possibly linked to a modification of a number of hepatic metabolic pathways⁽¹⁴⁾.

Several studies with salmonids (rainbow trout, brown trout, Atlantic salmon, Pacific salmon) have shown that it is possible to replace fish oil by a single vegetable oil or mixture of vegetable oils without affecting growth or feed efficiencies^(4,15). Since the flesh fatty acid composition is known to be affected by the dietary fatty acid profiles, it is also known that once the fish are grown with vegetable oils over the major part of the life cycle, a finishing diet based on fish oil as the major lipid source can be used to tailor the final flesh fatty acid composition with the levels of *n*-3 PUFA (EPA and DHA) ideally suited for human nutrition and health^(15–17). The metabolic consequences are also numerous, mediated by a number of interacting pathways.

Abbreviations: FAS, fatty acid synthase; INRA, French National Institute for Agricultural Research; REST, Relative Expression Software tool; TMEV, TIGR Multiple Experiment Viewer.

* **Corresponding author:** Dr Stéphane Panserat, fax +33 5 59 54 51 52, email panserat@st-pee.inra.fr

The objective of the present study was to analyse the hepatic gene expression profile in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed over a long period diets with or without either fish oil or fishmeal, replaced respectively by a mixture of plant oils or plant proteins. We analysed specifically the liver since this is the main organ involved in nutrient utilisation as the centre of intermediary metabolism in animals. After transcriptomic analysis, differentially expressed genes were identified and some were specifically studied in rainbow trout liver following the plant-based diet intake.

Experimental methods

Feeds, fish rearing and sampling

Triploid rainbow trout were reared in the French National Institute for Agricultural Research (INRA) experimental fish farm at constant water temperature ($17 \pm 1^\circ\text{C}$) and under natural photoperiod conditions (Donzacq, Landes, France). To test the effect of fish oil replacement, fish were fed from first feeding to commercial size during 62 weeks with two isoproteic (51 % crude protein), isolipidic (30 % crude fat) and isoenergetic (26 kJ/g) diets, differing only by the lipid source, i.e. either fish oil or a mixture of vegetable oils (30 % palm, 15 % linseed, 55 % rapeseed) as previously described⁽¹⁸⁾ (Table 1).

To test the effect of fishmeal replacement, fish were fed from first feeding to commercial size during 52 weeks with two isonitrogenous, isolipidic and isoenergetic diets, differing only by the protein source, i.e. either fishmeal or a mixture of plant proteins (Table 2). These diets were produced by feed manufacturers (Nutreco, Stavanger, Norway and Le Gouessant Aquaculture, Lamballe, France, respectively).

Fish were randomly distributed into triplicate tanks per dietary treatment. Each diet was distributed by hand to visual satiation 6 d over 7 d and feed consumption was recorded every week. At the end of the growth trial, six fish from each group (two per tank) were randomly sampled 24 h after the last meal in order to have data following the long-term plant-diet adaptation. Fish were killed by a sharp blow to the head. Livers were weighed and immediately frozen in liquid N₂ and kept at -80°C pending analyses.

Chemical composition of the diets

The experimental diets were analysed using the following procedures. DM was determined after drying at 105°C for 24 h. Gross energy was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA; Heitersheim Gribheimer, Germany). Protein content ($\text{N} \times 6.25$) was determined by the Kjeldahl method after acid digestion. Total lipid content was determined by the method of Folch *et al.*⁽¹⁹⁾, after extraction by dichloromethane rather than chloroform. Fatty acid composition of the diets (and the whole body of fish fed with or without fish oil) was determined in the total lipid extract after acid-catalysed transmethylation as previously described⁽¹⁸⁾. Amino acid composition was determined after acid hydrolysis: amino acids were separated by ion-exchange chromatography using pH gradient elution followed by

Table 1. Composition of the diets used in the fish oil replacement studies*

	FO diet	VO diet
Ingredients (g/kg feed)		
Fishmeal (Scandinavian LT-fish meal; Norsildmel, Norway)	466.9	466.9
Maize gluten meal (Cargill, Staley, NC, USA)	135.2	135.2
Soyabean meal (Denofa, Fredrikstad, Norway)	100.0	100.0
Whole wheat (Statkorn, Oslo, Norway)	46.1	46.1
Capelin oil (Nordsildmel, Norway)	226.8	–
Rapeseed oil (Oelmühle, Hamburg, Germany)	–	124.7
Palm oil (Denofa, Fredrikstad, Norway)	–	68.1
Linseed oil (Oliefabriek, Lictervelde, Belgium)	–	34.0
Vitamin and mineral premixes†	25.0	25.0
Analytical composition		
DM (%)	92.2	92.5
CP (% DM)	50.9	51.3
Crude fat (% DM)	29.7	29.5
Gross energy (kJ/g DM)	26.4	26.1
Fatty acid composition (g/100 g total fatty acids)		
14:0	9.9	2.0
16:0	13.4	19.5
18:0	1.5	2.7
Total saturates	26.0	25.4
16:1	10.0	1.6
18:1	14.4	39.9
20:1	16.6	2.0
22:1	10.9	1.6
Total monounsaturates	52.5	45.2
18:2n-6	3.6	13.7
20:2n-6	0.2	0.06
20:4n-6	0.2	0.06
Total n-6 PUFA	6.5	14.4
18:3n-3	0.8	10.0
18:4n-3	2.3	0.7
20:4n-3	0.3	0.1
20:5n-3	4.5	1.5
22:5n-3	0.3	0.1
22:6n-3	3.9	1.6
Total n-3 PUFA	12.2	14.0

FO diet, fish oil diet; VO, vegetable oil diet; CP, crude protein.

*For further details, see Richard *et al.*⁽¹⁸⁾. Diets were produced at Nutreco Technology Centre, Norway as extruded pellets.

†Mineral and vitamin premix according to National Research Council recommendations.

post-column derivatisation ninhydrin according to the method of Moore & Stein⁽²⁰⁾.

cDNA microarrays

Nylon microarrays were obtained from INRA-GADIE biological resources centre (Jouy-en-Josas, France; <http://www-crb.jouy.inra.fr/>). A total of 9023 rainbow trout cDNA originating from a pooled-tissue library⁽²¹⁾ plus 193 controls were spotted after PCR amplification. PCR products were spotted onto Hybond N+ membranes as described by Nguyen *et al.*⁽²²⁾. Positive (plant luciferase cDNA depot) and negative (water depot) controls were also spotted on each microarray.

Hybridisation, scanning and quantification of microarrays

Total RNA were extracted from rainbow trout liver using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Four hepatic RNA samples corresponding to four individuals per

Table 2. Composition of the diets used in the fishmeal replacement studies*

	FM diet	PP diet
Ingredients (g/kg feed)		
Fishmeal (LT 94, Norway, CP 70%)	472.20	–
White lupin (Cana, France, CP 41%)	–	100.00
Maize gluten meal (CP 60%)	–	150.00
Wheat gluten (CP 81%)	–	250.40
Extruded whole wheat	361.00	94.00
Dehulled peas (Aquatex, France, CP 22%)	–	25.00
Soyabean meal (CP 46%)	–	120.00
L-Lysine (liquid form, Eurolysine, France)	–	17.20
Calcium monophosphate	–	35.70
Fish oil (Feedoil, Sopropêche, France)	159.50	200.50
Astaxanthin (Carophyll pink, DSM, France)	0.25	0.25
Vitamin and mineral premix (INRA, France)†	6.55	6.55
Betaine HCl	0.50	0.50
Analytical composition		
DM(%)	94.4	95.9
CP (% DM)	39.1	41.9
Crude fat (% DM)	26.5	28.4
Gross energy (kJ/g DM)	22.8	24.5
Amino acid composition (g/16 g N)		
Arginine	7.1	5.4
Histidine	2.6	2.3
Isoleucine	3.8	4.1
Leucine	7.3	9.1
Lysine	6.9	5.3
Methionine + cystine	3.8	3.7
Phenylalanine + tyrosine	7.3	8.6
Threonine	4.0	3.4
Tryptophan	1.1	0.9
Valine	4.7	4.5

FM diet, fishmeal diet; PP diet, plant-protein diet; CP, crude protein.

*Diets were produced at Le Gouessant Aquaculture, France as extruded pellets.

†Mineral and vitamin premix according to National Research Council recommendations.

dietary group were used for microarray hybridisation at INRA UMR1067 transcriptomic facility (St-Pée-sur-Nivelle, France) according to the following procedure. RNA quality was determined using an Agilent bioanalyser. A first hybridisation was performed at 42°C for 48 h using $\gamma^{33}\text{P}$ -labelled T7 promoter oligonucleotide (5'-CACTATAGGGAATTTGGCC-3') to estimate the amount of cDNA in each spot. After stripping (3 h at 68°C, 0.1X SSC, 0.2% SDS), hybridisations with hepatic cDNA were performed. Microarrays were prehybridised for 1 h at 65°C in hybridisation buffer (5X Denhardt, 5X SSC, 0.5% SDS). Labelled cDNA were prepared from 5 μg RNA by simultaneous reverse transcription and labelling for 1 h at 42°C in the presence of 1.85 MBq (50 μCi) [α - ^{33}P] dCTP, 5 μM -cold dCTP and 800 μM each of dATP, dGTP and dTTP and 200 units SuperScript™ III RT (Invitrogen) in 30 μl final volume. A positive control corresponding to the luciferase mRNA (20 ng) (Promega, Madison, WI, USA) was simultaneously prepared. RNA was degraded by treatment at 68°C for 30 min with 10% SDS (1 μl), 0.5 M-EDTA (1 μl) and 3 M-NaOH (3 μl) and then equilibrated at room temperature for 15 min. Neutralisation was done by adding 1 M-2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol-HCl (10 μl) and 2 M-HCl (3 μl). Microarrays were then incubated with the corresponding denatured labelled cDNA for 48 h at 65°C in hybridisation solution. After three washes (1 h at 68°C with 0.1X SSC, 0.2% SDS), microarrays were exposed for

65 h to phosphor-imaging plates that were scanned using a Fuji BAS-5000 (Fuji, Tokyo, Japan). Signal intensities were quantified using AGScan software (bioinformatic platform Sigenae; INRA; <http://www.sigenae.org/>)^(23,24).

Microarray data analysis

Data microarrays were deposited in BioArray Software Environment (BASE) database⁽²⁵⁾, a 'minimum information about a microarray experiment' (MIAME) supportive customisable database available at the bioinformatic platform Sigenae. Signal processing was performed using vector oligonucleotide data to correct the relative amount of DNA present in each spot. At this step, low nucleotide signals (less than three times the background level) were excluded from the analysis. After correction, the signal was normalised by dividing each gene expression by the median value of the array before log transformation. Data were subsequently analysed using statistical TIGR Multiple Experiment Viewer software (TMEV; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA), which is a suite of microarray data analysis applications. Variation of gene expressions between two dietary treatments was termed significant when the *P* value was <0.01 using the two-sample *t* test for microarrays⁽²⁶⁾ and followed by supervised hierarchical clustering for significant genes only. Organisation of genes for biological interpretation in the context of gene ontology was performed using GoMiner software (Genomics and Bioinformatics Group, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>)⁽²⁷⁾.

Data mining

Rainbow trout sequences originating from INRA Agenae⁽²¹⁾ and the US Department of Agriculture⁽²⁸⁾ and expressed sequence tag (EST) sequencing programs were used to generate publicly available contigs (<http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/index.html>). The 4th version (om.4) was used for BlastX (version 4 (om.4); Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) comparison. The score of each alignment was retrieved after performing a BlastX comparison.

Real-time RT-PCR

Gene expression levels were determined by real-time RT-PCR using six RNA including those used for microarray analysis. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed to cDNA with the Superscript™ III RNase H RT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using oligo dT primers. Real-time PCR was performed in the iCycler iQ™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Quantitative PCR analyses for gene expressions were performed on 10 μl of the RT reaction mixture using the iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). The total volume of the PCR reaction was 25 μl containing 200 nM of each primer. Primers were designed so that they were overlapping an intron when it was possible (Primer3 software; http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) using known sequences in nucleotide databases (Table 3).

Table 3. Primer pairs for analysis by real-time PCR of selected genes*

Gene	Name	5'–3' forward primer	Name	5'–3' reverse primer
Elongation factor 1 α	EF17/8	5'-TCCTCTGGTCCGTTCCGCTG-3'	EF19	5'-ACCCGAGGGACATCCTCTGTG-3'
Experiment with fish oil replacement				
Cathepsin B	CATB-3	5'-TGGCCCTGTAGAGGGTGCTT-3'	CATB-4	5'-CCACCATCTCCGACTCGATG-3'
Fatty acid synthase	FAS-1	5'-TGATCTGAAGCCCGTGTC-3'	FAS-2	5'-GGGTGACGTTGCCGTGGTAT-3'
Ubiquinol cytochrome c-reductase protein 2†	UCR-2	5'-TGGCCCTGTAGAGGGTGCTT-3'	UCR-2	5'-AGGGGATTCCCGAATAAGT-3'
CYP1A3/A1	1A3-3	5'-TTTGTGCATGGGCTGTTGTG-3'	1A3-4	5'-CGAAGATCTCCAGGATGAA-3'
CYP3A27	3A27-3	5'-ATCTTCCGGCTACGAGAC-3'	3A27-4	5'-CGTCTTCTGGCGACCCCTCT-3'
Experiment with fishmeal replacement				
Ribosomal protein 60S L27	RL27-1	5'-CACAAACCATGGGCAAGAAGA-3'	RL27-2	5'-TCAGGGCAGGGTCTCTGAAG-3'
Ribosomal protein 40S L35	RL35-1	5'-TCGCAAGTTCGGTGTCAAAG-3'	RL35-2	5'-ACGGTGTACCCGGTCCCAAT-3'
Ribosomal protein 40S S6	RS16-3	5'-TTTCAGGTGGCAACACATGC-3'	RS16-4	5'-GGGGTCTGCCATTCACCTTG-3'
Ribosomal protein 40S S7	RPS-1	5'-GCGAAAGCCAGATGAGTTC-3'	RPS-3	5'-CCGTGAACCTCTTTTCCAG-3'
Glutamine synthetase	GLNA-5	5'-AACGCAAGCCCTGCAGAAC-3'	GLNA-6	5'-GGACCCAGGGGAGCCGTTAG-3'
Glutamine synthetase GS01 (AF390021)	GS01-1	5'-CTGCAGTCTGTGTTCAGGGTAGA-3'	GS01-2	5'-CATCTGTCTGGAATTGTTAAGTCCATA-3'
Glutamine synthetase GS02 (AF390022)	GS02-1	5'-GGCAGTGTCTTAAATGGCAACA-3'	GS02-2	5'-ACGCTACAATTGGCAAGACTGA-3'
Glutamine synthetase GS03 (AF390023)	GS03-1	5'-GTGTATCAATTTGCTACTCATGTTTAAACAT-3'	GS03-2	5'-AAATGGGTTCTTGATACAACCTTCTACTAA-3'

*Nucleotide sequences were extracted from the Sigenae database (<http://www.sigenae.org>) except for GS01, GS02 and GS03 from Genbank⁽⁴⁵⁾.

† Reverse transcription with random primers.

Thermal cycling was initiated with the incubation at 95°C for 90 s for hot-start iTaq™ DNA polymerase activation. Thirty-five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95°C for 20 s for denaturing, and at 59°C for 30 s for annealing and extension. Following the final cycle of the PCR, melting curves were systematically monitored (with a gradient of 0.5°C per 10 s from 55 to 94°C) to ensure that only one fragment was amplified. Samples without RT and samples without RNA were run for each reaction as negative controls.

Data analysis

Data are presented as mean values and standard deviations. We analysed the effects of the different diets with an unpaired two-tailed Student's *t* test (Systat 9 software products; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), except for microarray data (see before) and quantitative RT-PCR data. For the latter, significant differences were considered at *P*<0.05. Relative quantification of the target gene transcript with the *efl α* reference gene transcript⁽²⁹⁾ was made following the Pfaffl method with the Relative Expression Software tool (REST©)^(30,31). This mathematical algorithm computes an expression ratio, based on real-time PCR efficiency and the crossing point deviation of the unknown sample *v.* a control group:

$$R = ((E_{\text{target gene}})^{\Delta\text{CT}(\text{mean control} - \text{mean unknown sample})}) / ((E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta\text{CT}(\text{mean control} - \text{mean unknown sample})})$$

where *E* is PCR efficiency determined by standard curves using serial dilution of cDNA (cDNA dilutions from 1/16 up to 1/512), ΔCT being the crossing point deviation of an unknown sample *v.* a control. Statistical differences in gene expression between control and sample were evaluated in group means by randomisation tests⁽³¹⁾ using REST© software. A total of 2000 random allocations were performed and significant differences were considered at *P*<0.05.

Results

Fish rearing and endpoint analysis: growth rate, feed efficiencies and whole-body composition

In the fish fed with fish oil and vegetable oils, growth performance was similar throughout the long-term study irrespective of dietary treatment; at the end of the growth study the two groups reached a final body weight of about 1 kg (see Richard *et al.*⁽¹⁸⁾ for further details). No differences were found in feed efficiency, protein feed efficiency and feed intake (Table 4). As it is well known that replacement of fish oil by vegetable oils may produce major changes in fatty acid composition of fish, we also analysed the whole-body fatty acid composition for the fish oil- and vegetable oil-fed fishes (Table 5); the whole-body fatty acid composition reflected largely the composition of the diet (Table 1). The fish fed vegetable oils exhibited the highest levels of 18:1, 18:2*n*-6 and 18:3*n*-3, whereas the fish fed the fish oil diet had a very high percentage of long-chain MUFA (14.1% for 20:1 and 6.9% for 22:1) and also the highest proportion of EPA and DHA (2.4 and 5.2% respectively). In contrast to the fish fed with vegetable oils, trout fed with plant proteins had

Table 4. Effects of fish oil replacement on growth performance and feed efficiency in juvenile rainbow trout over 62 weeks (initial body weight (IBW) 0-120 g)*

(Mean values and standard deviations for three tanks)

	FO diet		VO diet	
	Mean	SD	Mean	SD
FBW (g)	1011	40	1019	63
Daily growth index†	1.85	0.08	1.85	0.15
Feed efficiency‡	0.95	0.04	0.95	0.08
Protein efficiency ratio§	1.86	0.07	1.86	0.15

FO diet, fish oil diet; VO, vegetable oil diet; FBW, final body weight.

* There was no significant difference between the groups ($P > 0.05$; Student's t test).† Daily growth index = $100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3})/\text{duration}$ (49 d).

‡ Feed efficiency = wet weight gain (g)/dry feed intake (g).

§ Protein efficiency ratio = wet weight gain (g)/crude protein intake (g).

significantly lower growth rates, lower feed efficiency and lower protein feed efficiency than fish fed with fishmeal ($P < 0.05$; Student's t test) (Table 6), even though the feed intake was higher in the fish fed vegetable proteins. These data suggest a low capacity of metabolic adaptation of the fish fed with plant proteins from first feeding.

Differentially expressed genes in the liver of rainbow trout linked to diet composition

Analysis of microarray data showed that almost 0.8 % of genes were differentially expressed in our two experimental comparisons: (i) between the fish fed fish oil and vegetable oils, and (ii) between the fish fed fishmeal and plant proteins (Tables 7–10) ($P < 0.01$, t test; TMEV). Among the seventy-one genes differentially expressed between the fish

Table 5. Effect of fish oil replacement on mean fatty acid composition of whole-body lipids after feeding the experimental diets for 62 weeks

Fatty acid composition (g/100 g total fatty acids)	FO diet (n 3)	VO diet (n 3)
14:0	7.93	1.80*
16:0	16.03	17.26
18:0	2.08	2.91
Total saturates	26.97	22.70*
16:1	9.45	2.41*
18:1	21.56	41.41*
20:1	14.11	3.39*
22:1	6.85	1.63*
Total monounsaturates	52.26	48.93*
18:2n-6	4.48	12.78*
20:2n-6	0.29	0.60
20:4n-6	0.16	0.16
Total n-6 PUFA	5.04	13.72*
18:3n-3	1.03	6.97*
18:4n-3	1.12	0.75
20:4n-3	0.70	0.54
20:5n-3	2.38	0.97*
22:5n-3	0.64	0.36
22:6n-3	5.16	3.43*
Total n-3 PUFA	11.20	13.57*

FO diet, fish oil diet; VO, vegetable oil diet.

* Mean value was significantly different from that of the fish fed the FO diet ($P < 0.05$).**Table 6.** Effects of fishmeal replacement on growth performance and feed efficiency in juvenile rainbow trout over 52 weeks (initial body weight (IBW) 0-215 g)

(Mean values and standard deviations for three tanks)

	FM diet		PP diet		P^*
	Mean	SD	Mean	SD	
FBW (g)	775	26	659	24	0.005
Daily growth index†	2.35	0.02	2.22	0.03	0.003
Feed efficiency‡	1.06	0.02	0.95	0.03	0.01
Protein efficiency ratio§	2.71	0.06	2.28	0.07	0.002

FM diet, fishmeal diet; PP diet, plant-protein diet; FBW, final body weight.

* By Student's t test.† Daily growth index = $100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3})/\text{duration}$ (49 d).

‡ Feed efficiency = wet weight gain (g)/dry feed intake (g).

§ Protein efficiency ratio = wet weight gain (g)/crude protein intake (g).

fed with fish oil and those fed with vegetable oils, sixteen and fifty-five hepatic transcripts exhibited, in the fish fed with vegetable oils, higher and lower abundance respectively (Tables 7 and 8). Moreover, among the seventy-five genes differentially expressed between the fish fed with fishmeal and those fed with plant protein, fifteen and sixty hepatic transcripts exhibited respectively higher or lower abundance in the fish fed with plant proteins (Tables 9 and 10).

Biological significance of the results: data clustering and gene ontology

We researched the significance of our data analysing some genes expressed in the clusters linked to specific biological process (Figs. 1 and 2). First, for the fish fed with or without fish oil, we observed three main clusters after analysing gene expression (Fig. 1 (a)). Cluster I was composed of numerous genes playing key roles in lysosomal and proteasomal proteolysis (cathepsins B and D, subunit of proteasomes) which were more expressed in the fish fed with vegetable oils ($P < 0.01$, t test; TMEV). We found also in this cluster one gene, CYP1A3, involved in xenobiotic metabolism. Cluster II was found to be mainly composed of genes involved in intermediary metabolism especially energy metabolism (succinate dehydrogenase, ubiquinol dehydrogenase) and lipid metabolism (fatty acid synthase (FAS) and long-chain fatty acid elongase). In this cluster, some genes also play roles in mRNA processing (splicing, maturation) (for details see Fig. 1 (b)). All the genes in cluster II were expressed at a lower level in the fish fed with vegetable oils ($P < 0.01$, t test; TMEV). Finally, cluster III was mainly composed of genes involved in cell growth and maintenance (keratin, kindlin, actin): they were expressed at a higher level in the fish fed with vegetable oils than in those fed the fish oil-based diet ($P < 0.01$, t test; TMEV). Overall, after dietary fish oil replacement by a blend of vegetable oils, a number of genes involved in lipid metabolism (lipogenesis, steroid synthesis, xenobiotic detoxification), protein catabolism, and transcription regulation were detected by gene ontology analysis (Table 11).

Second, for the fish fed with plant proteins and fishmeal, four clusters were detected (Fig. 2 (a)). Whereas cluster I was composed of miscellaneous genes, cluster III was linked

Table 7. Hepatic transcripts exhibiting higher abundance in fish fed with vegetable oils after microarray analysis*

Clone name	Sigenae contig†	Swissprot-hit description	P
tcay0031b.c.17	tcay0025b.p.18_3.1.om.4	FXN2_HUMAN Human T-cell leukemia virus enhancer factor	6.9 × 10 ⁻⁴
tcba0021c.m.22	tcay0011b.k.02_5.1.om.4	ZN41_HUMAN Zinc finger protein 41	0.001
1RT149O15_A_H08	15021467.1.om.4	SNXN_HUMAN Sorting nexin 23	0.002
tcay0011b.d.05	15029633.1.om.4	AR1A_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	0.004
tcak0001a.e.11	tcad0004a.b.23_3.1.om.4	IF39_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9	0.006
tcbk0041c.m.02	tcbk0041c.m.02_5.1.om.4	DLX6_BRARE Homeobox protein DLX-6	0.006
tcac0002c.h.01	AF267126.1.om.4	CP3R_ONCMY Cytochrome P450 3A27 (<i>EC</i> 1.14.14.1)	0.007
tcay0038b.c.08	tcay0036b.l.02_3.1.om.4	CSP7_HUMAN Cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 7	0.007
1RT88C17_A_B09	15026549.1.om.4	MPP5_HUMAN MAGUK p55 subfamily member 5	0.007
tcbk0019c.d.07	tcbk0019c.d.07_5.1.om.4	UNKNOWN	0.007
tcbk0036c.i.08	tcay0036b.p.22_5.1.om.4	LPB1_HUMAN Liprin-beta 1	0.007
tcad0001a.b.13	tcad0001a.b.13_5.1.om.4	CRBA_DROME Cyclic-AMP response element binding protein A	0.008
tcbk0026c.f.15	tcay0015b.j.03_3.1.om.4	K1CR_XENLA Keratin	0.008
tcbk0003c.k.15	tcbk0003c.k.15_5.1.om.4	YB85_YEAST Hypothetical 124.0 kDa protein in PBP2-ABD1 intergenic region	0.009
tcay0031b.d.23	tcay0031b.d.23_3.1.om.4	URP1_MOUSE Unc-112 related protein 1 (Kindlin-1) (Fragment)	0.009
tcbk0026c.d.10	17236272.2.om.4	MUSC_HUMAN Musculin	0.009

*Where $P < 0.01$ by *t* test (TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). The sixteen genes are classified following the *P* values.

† <http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/index.html>

to intermediary metabolism, especially energy metabolism (quinone oxidoreductase, ubiquinol reductase), amino acid metabolism (arginase) and amino acid transport. Cluster II and cluster IV, even though also associated with metabolism, were focused on protein metabolism respectively with proteolytic (cathepsin, proteasome) and proteosynthetic (eight ribosomal proteins) pathways (for details, see Fig. 2 (b)). Clusters II, III and IV were composed of genes that were expressed much less in the fish fed with plant proteins ($P < 0.01$, *t* test; TMEV). Globally, the replacement of fishmeal by the plant protein sources indeed leads to a large number of genes involved in protein and amino acid metabolism being revealed by the gene ontology analysis (Table 12).

Focus on specific differentially expressed genes

We focused the present study on specific genes that can illustrate the major pathways modified by the diet variation on rainbow trout liver. In the context of dietary fish oil replacement, five genes involved in proteolysis (cathepsin), energy metabolism in mitochondria (ubiquinol cytochrome c reductase), lipid metabolism (FAS and long-chain fatty acid CoA ligase) and detoxification metabolism (cytochromes P450) have been selected (Table 13). Using six individuals per dietary group and the quantitative RT-PCR, except for the cathepsin D, we confirmed that cathepsin B, ubiquinol cytochrome c reductase, FAS and cytochrome P4501A3 were expressed less in the fish fed with vegetable oils ($P < 0.05$; REST test). Moreover, we also checked that the cytochrome P4503A4 was more highly expressed in the liver of the fish fed with vegetable oils ($P < 0.05$; REST test). Also, in the context of dietary fishmeal replacement, genes involved in proteosynthesis (ribosomal proteins) and amino acid metabolism (glutamine synthetase) were selected to be analysed by quantitative RT-PCR (Table 14). We confirmed by quantitative RT-PCR that the expression of the glutamine synthetase gene was lower in the livers of the fish fed with plant proteins than in those fed fishmeal ($P < 0.05$; REST test); we analysed more precisely three glutamine synthase paralogous genes by specific amplification of

the isoforms and we confirmed that GS01 and GS03 gene expressions were depressed by almost 7-fold in these fish. However, all the analysed genes coding for ribosomal proteins (four genes coding for ribosomal proteins of the 40S (6S and 7S) and 60S (L27 and L35) subunits) were not differentially expressed ($P > 0.05$; REST test): these latter results did not confirm the microarray data.

Discussion

Overview

In the present study, the substitution of dietary fishmeal by vegetable proteins seems to have some adverse consequences on fish growth whereas no differences were found in fish fed vegetable oils as previously observed^(13,14,18). This is the first ever set of nutrigenomics data in fish fed diets devoid of either fish oil or fishmeal. Analysis of the hepatic transcriptomes revealed that less than 100 genes were differentially expressed between all the nutritional conditions (<1%), which is a relatively low number of differentially expressed genes. Two possible explanations are (i) that the cDNA microarray used in the present study is a generic rainbow trout cDNA tool (issue from 9023 cDNA extracted from different tissues at different developmental stages⁽²¹⁾), and not a specific rainbow trout liver cDNA microarray; and (ii) that although the diets differed in terms of ingredients (marine *v.* plant origins), they were not drastically different in terms of proximate composition (Tables 1–3). It is also interesting to note that when we analysed globally the data about differentially expressed genes, we observed no common genes between the two sets of experiments, with enrichment of differentially expressed genes in lipid metabolism and protein metabolism after fish oil and fishmeal replacements respectively. This suggests that the modification of liver transcriptomes was highly dependent of the origin of the ingredient, *i.e.* vegetable oil and plant proteins. Thus, in the following discussion, we will analyse separately the data from the two nutritional experiments by focusing on specific molecular actors.

Table 8. Hepatic transcripts exhibiting lower abundance in fish fed with vegetable oils after microarray analysis*

Clone name	Signae contig†	Swissprot-hit description	P
1RT121N04_D_G02	15060218.1.om.4	MAFK_MOUSE Transcription factor MafK	1.36 × 10 ⁻⁴
1RT156K02_C_F01	15078821.1.om.4	ROAA_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	2.07 × 10 ⁻⁴
1RT67M18_C_G09	tcad0003a.n.17_3.1.om.4	DHSB_HUMAN Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	3.26 × 10 ⁻⁴
tcba0008c.g.18	tcba0008c.g.18_5.1.om.4	SYN_HUMAN Asparaginyl-tRNA synthetase	3.84 × 10 ⁻⁴
tcba0003c.g.01	tcba0003c.g.01_5.1.om.4	TERA_RAT Transitional endoplasmic reticulum ATPase	4.03 × 10 ⁻⁴
1RT77M23_A_G12	15025059.1.om.4	SGK3_HUMAN Serine/threonine-protein kinase Sgk3 (EC 2.7.1.37)	6.54 × 10 ⁻⁴
1RT80C06_C_B03	15026055.1.om.4	ANXD_HUMAN Annexin A13	0.001
tcag0002b.n.03	AF059711.1.om.4	CP13_ONCMY Cytochrome P450 1A3 (EC 1.14.14.1)	0.001
tcad0006a.f.22	tcad0006a.f.22_3.1.om.4	PRSX_HUMAN 26S protease regulatory subunit S10B (Proteasome subunit p42)	0.002
tcba0014c.h.05	tcay0018b.k.17_3.1.om.4	HS47_CHICK 47 kDa heat shock protein precursor (Collagen-binding protein 1)	0.002
tcab0001c.e.06	tcab0001c.e.06_5.1.om.4	FAS_CHICK Fatty acid synthase (EC 2.3.1.85)	0.002
1RT121J10_D_E05	15018967.1.om.4	UNKNOWN	0.003
1RT122N23_B_G12	15017668.1.om.4	LCF4_RAT Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4 (EC 6.2.1.3)	0.003
tcba0018c.g.23	tcba0018c.g.23_5.1.om.4	UNKNOWN	0.003
1RT108I09_A_E05	15061441.1.om.4	EGL1_HUMAN Egl nine homolog 1 (EC 1.14.11.-)	0.003
1RT34K04_C_F02	15076953.1.om.4	ELK3_MOUSE ETS-domain protein Elk-3	0.003
1RT114N22_D_G11	15066941.1.om.4	SARA_HUMAN GTP-binding protein SAR1a	0.004
1RT54E07_A_C04	15022193.1.om.4	UNKNOWN	0.004
1RT65M18_C_G09	15023915.1.om.4	T9S3_HUMAN Transmembrane 9 superfamily protein member 3 precursor	0.004
1RT106E04_C_C02	tcad0002a.a.16_3.1.om.4	PR39_YEAST Pre-mRNA processing protein PRP39	0.004
1RT158E21_A_C11	15089300.1.om.4	PUB1_SCHPO Ubiquitin-protein ligase pub1 (EC 6.3.2.-)	0.004
tcay0009b.b.09	tcay0023b.g.13_3.1.om.4	YCD1_HUMAN Hypothetical protein CGI-131	0.005
1RT160F10_D_C05	tcad0003a.l.14_5.1.om.4	KCY_PIG UMP-CMP kinase (EC 2.7.4.14)	0.005
1RT49M06_C_G03	15080981.1.om.4	YMN0_YEAST Hypothetical 65.0 kDa protein in COX14-COS3 intergenic region precursor	0.005
1RT77N13_B_G07	15025133.1.om.4	PGS2_HORSE Decorin precursor	0.005
1RT78F08_D_C04	15025579.1.om.4	UNKNOWN	0.005
1RT85P10_D_H05	15015655.1.om.4	TBA_ONCKE Tubulin alpha chain	0.005
1RT121P18_D_H09	tcad0002a.f.16_3.1.om.4	NFX1_HUMAN Transcriptional repressor NF-X1 (EC 6.3.2.-)	0.005
1RT121E14_C_C07	15063507.1.om.4	THA1_MOUSE THAP domain protein 1	0.006
1RT146D15_B_B08	tcay0029b.b.09_5.1.om.4	HS47_CHICK 47 kDa heat shock protein precursor	0.006
1RT116G12_C_D06	15026944.1.om.4	SMD2_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	0.006
1RT95I04_C_E02	tcad0007a.c.03_3.1.om.4	VATL_HUMAN Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit (EC 3.6.3.14)	0.006
tcbk0025c.b.12	tcbk0004c.f.11_5.1.om.4	FAS_ANSAN Fatty acid synthase (EC 2.3.1.85)	0.006
1RT130F18_D_C09	6187098.1.om.4	TCPB_HUMAN T-complex protein 1	0.006
tcay0001b.e.11	tcay0028b.l.18_3.1.om.4	DD15_MOUSE Putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase	0.006
1RT80E07_A_C04	tcav0003c.j.08_3.1.om.4	YE6A_SCHPO Hypothetical protein C6G10.10c in chromosome I	0.006
1RT135H16_D_D08	15029400.1.om.4	PNPO_MOUSE Pyridoxine-5'-phosphate oxidase (EC 1.4.3.5)	0.006
tcad0001a.i.06	tcad0001a.i.06_3.1.om.4	RSP6_CHLRE Flagellar radial spoke protein 6	0.007
tcad0006a.g.21	tcad0006a.g.21_3.1.om.4	GCSP_MOUSE Glycine dehydrogenase	0.007
1RT101L17_B_F09	tcay0032b.m.12_3.1.om.4	NEK1_HUMAN Serine/threonine-protein kinase Nek1 (EC 2.7.1.37)	0.007
1RT138J19_B_E10	15064382.1.om.4	HP28_RAT 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	0.007
1RT103A16_C_A08	tcad0003a.m.01_3.1.om.4	CATD_CLUHA Cathepsin D precursor (EC 3.4.23.5)	0.007
1RT126E19_A_C10	15019695.1.om.4	KLF4_MOUSE Kruppel-like factor 4	0.008
1RT148G07_A_D04	15015121.1.om.4	SYQ_HUMAN Glutaminyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18)	0.008
1RT151H09_B_D05	15021715.1.om.4	ACS1_RHIME Acetyl-coenzyme A synthetase 1 (EC 6.2.1.1)	0.008
1RT132N07_B_G04	tcay0027b.l.03_3.1.om.4	PGBM_HUMAN Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	0.008
1RT140L18_D_F09	15020168.1.om.4	SHO2_HUMAN Leucine-rich repeat protein SHOC-2	0.008
1RT75D05_B_B03	15024751.1.om.4	G2A_MOUSE Lysophosphatidylcholine receptor G2A	0.009
tcbk0032c.i.16	tcav0001c.d.12_5.1.om.4	UCR2_HUMAN Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein 2	0.009
1RT108E12_C_C06	15020717.1.om.4	UNKNOWN	0.009
1RT116C04_C_B02	tcad0001a.p.06_3.1.om.4	CATB_CHICK Cathepsin B precursor (EC 3.4.22.1)	0.009
tcay0027b.m.22	tcay0020b.d.06_3.1.om.4	ACTT_FUGRU Actin	0.01
1RT62D24_D_B12	15023633.1.om.4	UNKNOWN	0.01
1RT41M15_A_G08	15077566.1.om.4	PUM1_MOUSE Pumilio homolog 1	0.01
tcac0002c.p.03	15014607.1.om.4	LCB1_HUMAN Serine palmitoyltransferase 1 (EC 2.3.1.50)	0.01

* Where $P < 0.01$ by t test (TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). The fifty-five genes are classified following the P values.† <http://public-contigbrowser.signae.org:9090/index.html>

Table 9. Hepatic transcripts exhibiting higher abundance in fish fed with vegetable proteins after microarray analysis*

Clone name	Signae contig†	Swissprot-hit description	P
tcay0001b.g.18	AF281350.1.om.4	UNKNOWN	0-001
1RT120N05_B_G03	15062971.1.om.4	DTD_HUMAN Sulfate transporter	0-002
tcbk0031c.h.14	15015934.1.om.4	BRD2_HUMAN Bromodomain-containing protein 2	0-002
1RT120C23_A_B12	15062875.1.om.4	YQIK_BACSU Hypothetical protein yqik	0-002
tcba0020c.o.23	tcba0020c.o.23_5.1.om.4	UNKNOWN	0-003
tcbk0052c.c.07	tcbk0052c.c.07_5.1.om.4	SMF1_HUMAN SWI/SNF-related	0-004
1RT151D10_D_B05	tcay0015b.p.08_3.1.om.4	PTPA_RABIT Protein phosphatase 2A	0-007
1RT90J08_D_E04	15016677.1.om.4	RBB5_HUMAN Retinoblastoma-binding protein 5	0-007
1RT42N11_B_G06	15079057.1.om.4	AGM1_HUMAN Phosphoacetylglucosamine mutase (EC 5.4.2.3)	0-009
1RT162N09_B_G05	15083591.1.om.4	LAT2_RAT Large neutral amino acids transporter small subunit 2	0-009
1RT35110_C_E05	15077084.1.om.4	DYN1_HUMAN Dynamin-1 (EC 3.6.5.5)	0-009
tcba0023c.h.11	tcba0023c.h.11_5.1.om.4	UNKNOWN	0-009
tcbk0016c.a.07	tcbk0016c.a.07_5.1.om.4	ACTM_APLCA Actin	0-009
tcbk0021c.h.05	tcbk0021c.h.05_5.1.om.4	KELC_DROME Ring canal kelch protein	0-009
tcac0003c.h.09	tcac0003c.h.09_3.1.om.4	PAB5_ARATH Polyadenylate-binding protein 5	0-009

* Where $P < 0.01$ by *t* test (TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). The fifteen genes are classified following the *P* values.

† <http://public-contigbrowser.siginae.org:9090/index.html>

Gene profiling after fish oil replacement by vegetable oil mixture: focus on specific genes

We found that replacement of fish oil by vegetable oils has a major impact on lipid, energy and xenobiotic metabolism.

As regards key actors involved in intermediary metabolism, we analysed FAS, which is the key enzyme of fatty acid biosynthesis *in vivo*; this metabolic pathway is highly active in rainbow trout liver⁽³²⁾. Two FAS cDNA were spotted on the microarrays and both of them were detected (and clustered) to be down-regulated in the fish fed with vegetable oils and confirmed by quantitative RT-PCR. FAS gene expression was 10-fold lower in the fish fed with vegetable oils. The lower level of hepatic FAS gene expression in the trout fed with vegetable oils could be explained by the diets based on vegetable oils having higher levels of linoleic (18:2*n*-6) and linolenic (18:3*n*-3) acids than the fish oil⁽¹⁸⁾ and by linolenic acid known to decrease FAS mRNA levels⁽³³⁾. The unambiguous finding in the present study of a significantly lower (10-fold) FAS gene expression in the fish fed with vegetable oils was not linked with a decrease of liver FAS activity in the same fish. This was even though FAS activity (IU/g liver) tended to be lower ($P=0.051$) for the fish fed vegetable oils (4.0 (SD 0.9)) compared with fish fed fish oil (6.1 (SD 1.8)) (see Richard *et al.*⁽¹⁸⁾). It cannot also explain the modification of whole-body fatty acid composition which reflected mainly the composition of the diets (Tables 1 and 5). Our data about FAS mRNA levels suggest once more that molecular data (measures of gene expression level) are not always associated with significant effects at the protein-metabolic pathway level.

The second actor is one involved in lysosomal proteolysis, which includes proteases such as cathepsin B⁽³⁴⁾. Cell proteins are always in a dynamic equilibrium between synthesis and degradation depending on nutritional status⁽³⁵⁾. Lower expression of the CATB gene in the trout fed with vegetable oils cannot be presently explained and it is difficult to provide any putative biological consequence of this observation. The third gene is the ubiquinol cytochrome *c* reductase (UCR) which is involved in mitochondrial metabolism, i.e. oxidative

phosphorylation. We found that the expression of UCR was down-regulated in the fish fed with vegetable oils. This is in agreement with the data of Barzanti *et al.*⁽³⁶⁾ in rats, which showed a putative modification of UCR gene expression by dietary lipids.

Part of our analysis in the fish fed with vegetable oils dealt with the hepatic detoxification metabolism which is catalysed by a multi-enzyme family, namely the cytochromes P450s in rainbow trout⁽³⁷⁾. These enzymes have generally a large spectrum of endogenous as well as exogenous substrates, and CYP1A members catalyse the biotransformation of environmental disruptors or pollutants such as polychlorinated biphenyls in the liver before their elimination. Because CYP1A genes are induced by the presence of their substrates⁽³⁷⁾, the lower expression of the CYP1A3 gene in the liver of the trout fed diets with vegetable oils could be due to the lower levels of pollutants such as dioxins in these diets. This result is not surprising given that the fish oil is susceptible to contamination with lipophilic organic chemicals that are now ubiquitous in the marine ecosystems and consequently in aquaculture systems^(38,39). Our own results (G Corraze, unpublished results) show that the muscle levels of dioxins and polychlorinated biphenyls are reduced in trout fed vegetable oils compared with those fed fish oils (WHO toxic equivalent: 1.96 pg/g and 1.08 pg/g for fish oil and vegetable oil groups, respectively). The CYP3A27 in rainbow trout which metabolises testosterone can be reduced by phyto-oestrogen; however, this cannot presently explain the higher CYP3A27 gene expression in the fish fed vegetable oils. Moreover, CYP3A27 also has some similarities with the human CYP3A4⁽⁴⁰⁾ which can convert cholesterol to 4- β -hydroxycholesterol before its elimination in bile salts⁽⁴¹⁾. Thus, the higher expression of the CYP3A27 gene in the rainbow trout fed with vegetable oils can be related to the lower level of plasma cholesterol observed in these fish (6.45 (SD 1.07) v. 3.97 (SD 0.23) g/l for fish fed fish oil and vegetable oils respectively; see Richard *et al.*⁽¹⁸⁾), suggesting that higher CYP3A27 activities can be the cause of the lower level of cholesterol in plasma. This needs further study to confirm and understand the link between fish oil replacement and the higher level of the CYP3A27 gene. Overall, the two hepatic

Table 10. Hepatic transcripts exhibiting lower abundance in fish fed with vegetable proteins after microarray analysis*

Clone name	Signaenae contig†	Swissprot-hit description	P
tcba0020c.j.10	tcav0004c.f.03_5.1.om.4	MTL2_MOUSE Methyltransferase-like protein 2 (<i>EC</i> 2.1.1.-)	9.7 × 10 ⁻⁴
tcad0009a.k.02	tcad0009a.k.02_3.1.om.4	CRB1_CHICK Beta crystallin B1	3.2 × 10 ⁻⁴
tcay0021b.b.07	tcay0021b.b.07_3.1.om.4	CPM1_ONCMY Cytochrome P450 2M1 (<i>EC</i> 1.14.14.1)	3.4 × 10 ⁻⁴
tcay0011b.k.04	tcay0011b.k.04_5.1.om.4	CAO3_HUMAN Acyl-coenzyme A oxidase 3	3.4 × 10 ⁻⁴
tcbi0009d.l.22	tcbi0009d.l.22_5.1.om.4	RL13_BRARE 60S ribosomal protein L13	0.001
tcay0023b.k.09	tcay0023b.k.09_3.1.om.4	MEPD_PIG Thimet oligopeptidase (<i>EC</i> 3.4.24.15) (Endopeptidase 24.15)	0.001
1RT148H10_D_D05	tcay0038b.p.14_5.1.om.4	SN24_HUMAN Possible global transcription activator SNF2L4	0.001
tcbk0002c.e.02	15012882.1.om.4	RL35_HUMAN 60S ribosomal protein L35	0.002
tcad0004a.f.19	tcad0004a.f.19_3.1.om.4	NIFU_RICPR NifU-like protein	0.002
1RT165A11_A_A06	tcaj0001a.a.12_5.1.om.4	U520_HUMAN U5 small nuclear ribonucleo protein 200 kDa helicase (<i>EC</i> 3.6.1.-)	0.002
tcba0008c.m.21	tcay0022b.h.16_3.1.om.4	SEP8_HUMAN Septin 8	0.003
tcac0003c.f.09	15077731.1.om.4	SFR2_MOUSE Splicing factor	0.003
tcba0011c.d.17	tcba0011c.d.17_5.1.om.4	KAP2_BOVIN cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory chain	0.003
tcac0002c.a.04	AF390023.1.om.4	GLNA_SQUAC Glutamine synthetase	0.003
tcba0018c.b.23	tcay0014b.h.22_3.1.om.4	UCR1_MOUSE Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein I	0.003
tcab0002c.l.09	tcab0002c.l.09_5.1.om.4	RL27_HUMAN 60S ribosomal protein L27	0.004
tcbk0020c.f.18	tcay0014b.i.10_3.1.om.4	CN7B_SCHPO COP9/signalosome complex subunit 7B	0.004
tcal0001a.o.19	15029915.1.om.4	CCR4_RAT C-X-C chemokine receptor type 4	0.004
tcbk0058c.g.14	15060181.1.om.4	CWFF_SCHPO Cell cycle control protein cwf15	0.004
tcba0006c.l.19	tcay0018b.i.17_5.1.om.4	TFR1_CRIGR Transferrin receptor protein 1	0.004
tcbk0044c.l.01	15025792.1.om.4	RLA2_BRAFL 60S acidic ribosomal protein P2	0.005
tcab0002c.e.12	tcab0002c.e.12_5.1.om.4	YFW7_SCHPO Hypothetical protein PB2B4.07 in chromosome I	0.005
tcbk0051c.f.12	tcbk0005c.o.13_5.1.om.4	RS16_HUMAN 40S ribosomal protein S16	0.005
1RT119C21_A_B11	tcad0001a.m.03_3.1.om.4	CIA1_HUMAN WD-repeat containing protein Ciao 1	0.005
tcaa0002c.f.02	tcaa0002c.f.02_5.1.om.4	VATB_CHICK Vacuolar ATP synthase subunit B (<i>EC</i> 3.6.3.14)	0.005
tcay0012b.b.15	tcay0030b.e.18_3.1.om.4	CWFO_SCHPO Cell cycle control protein cwf24	0.005
tcam0002b.e.05	tcad0009a.e.24_3.1.om.4	SPRC_RAT SPARC precursor	0.005
tcad0008a.p.16	tcad0003a.i.20_5.1.om.4	IUNH_CRIFA Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (<i>EC</i> 3.2.2.1)	0.005
tcbk0018c.n.07	tcay0017b.j.17_3.1.om.4	ACPM_MOUSE Acyl carrier protein	0.005
tcba0009c.f.23	tcba0009c.f.23_5.1.om.4	ABC1_HUMAN ATP-binding cassette repeat-containing protein B	0.006
tcay0013b.g.06	15068153.1.om.4	SGTB_HUMAN Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein B	0.006
tcay0031b.j.13	tcay0018b.l.03_3.1.om.4	TPM4_HORSE Tropomyosin alpha 4 chain	0.006
tcay0008b.h.15	15073662.1.om.4	ARG1_HUMAN Arginase 1 (<i>EC</i> 3.5.3.1)	0.006
tcbk0053c.i.13	tcba0028c.p.14_5.1.om.4	INPP_MOUSE Inositol polyphosphate 1-phosphatase (<i>EC</i> 3.1.3.57)	0.006
tcad0002a.k.18	tcad0002a.k.18_5.1.om.4	RGS5_MOUSE Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)	0.006
tcbk0002c.l.10	tcay0025b.o.12_3.1.om.4	PSB7_RAT Proteasome subunit beta type 7 precursor (<i>EC</i> 3.4.25.1)	0.006
tcbk0036c.m.09	tcay0016b.p.23_3.1.om.4	M2OM_MOUSE Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (OGCP)	0.006
tcbk0018c.b.15	15019342.1.om.4	SHP_MOUSE Orphan nuclear receptor SHP	0.007
tcay0028b.g.04	tcay0028b.g.04_3.1.om.4	IF2A_RAT Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (eIF-2-alpha)	0.007
tcay0003b.g.15	15073721.1.om.4	QOR_HUMAN Quinone oxidoreductase (<i>EC</i> 1.6.5.5)	0.007
tcay0020b.j.18	tcay0020b.j.18_3.1.om.4	ICMT_XENLA Protein-S isoprenylcysteine O-methyltransferase (<i>EC</i> 2.1.1.100)	0.007
tcbk0024c.f.12	17239246.2.om.4	RL28_MOUSE 60S ribosomal protein L28	0.008
tcac0001c.i.22	tcac0001c.i.22_3.1.om.4	UNKNOWN	0.008
tcac0006c.n.11	15064666.1.om.4	DIM1_HUMAN Spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kDa protein	0.008
tcbk0005c.c.21	tcbk0005c.c.21_3.1.om.4	CT20_HUMAN Protein C20orf20	0.008
tcbk0033c.o.02	tcbk0033c.o.02_5.1.om.4	PRTP_HUMAN Lysosomal protective protein precursor (<i>EC</i> 3.4.16.5) (Cathepsin A)	0.008
1RT102K01_A_F01	15017476.1.om.4	UNKNOWN	0.008
tcav0003c.h.07	tcav0003c.h.07_3.1.om.4	ARH7_HUMAN Rho guanine nucleotide exchange factor 7	0.008
tcba0001c.m.17	tcba0001c.m.17_5.1.om.4	KBTA_RAT Kelch repeat and BTB domain containing protein 10	0.009
tcac0006c.p.12	AF115536.1.om.4	TAP1_HUMAN Antigen peptide transporter 1 (APT1)	0.009
tcbk0022c.f.06	tcay0028b.c.20_3.1.om.4	P44_PANTR Non-A non-B hepatitis-associated microtubular aggregates protein (Antigen p44)	0.009
tcad0006a.e.03	tcad0002a.o.04_3.1.om.4	ARLL_HUMAN ADP-ribosylation factor-like protein 4L	0.009
tcba0002c.p.17	17244760.2.om.4	COXO_MOUSE Cytochrome c oxidase polypeptide VIc	0.009
tcay0001b.i.04	tcay0016b.j.19_3.1.om.4	AR34_HUMAN ARP2/3 complex 34 kDa subunit (P34-ARC)	0.009
tcad0005a.c.22	tcad0005a.c.22_5.1.om.4	AATM_RAT Aspartate aminotransferase	0.009
tcbk0050c.m.05	tcay0018b.g.16_3.1.om.4	ASAH_HUMAN Acid ceramidase precursor (<i>EC</i> 3.5.1.23)	0.01
tcad0006a.d.14	tcad0006a.d.14_3.1.om.4	CB45_RAT 45 kDa calcium-binding protein precursor	0.01
tcbk0057c.p.24	tcay0027b.m.18_3.1.om.4	TAM2_HUMAN Translocation associated membrane protein 2	0.01
tcac0003c.k.15	15014990.1.om.4	PSA1_HUMAN Proteasome subunit alpha type 1 (<i>EC</i> 3.4.25.1)	0.01
tcay0039b.h.02	tcay0033b.m.11_5.1.om.4	RL2_GEOSL 50S ribosomal protein L2	0.01

* Where $P < 0.01$ by *t* test (TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). The sixty genes are classified following the *P* values.† <http://public-contigbrowser.signaenae.org:9090/index.html>

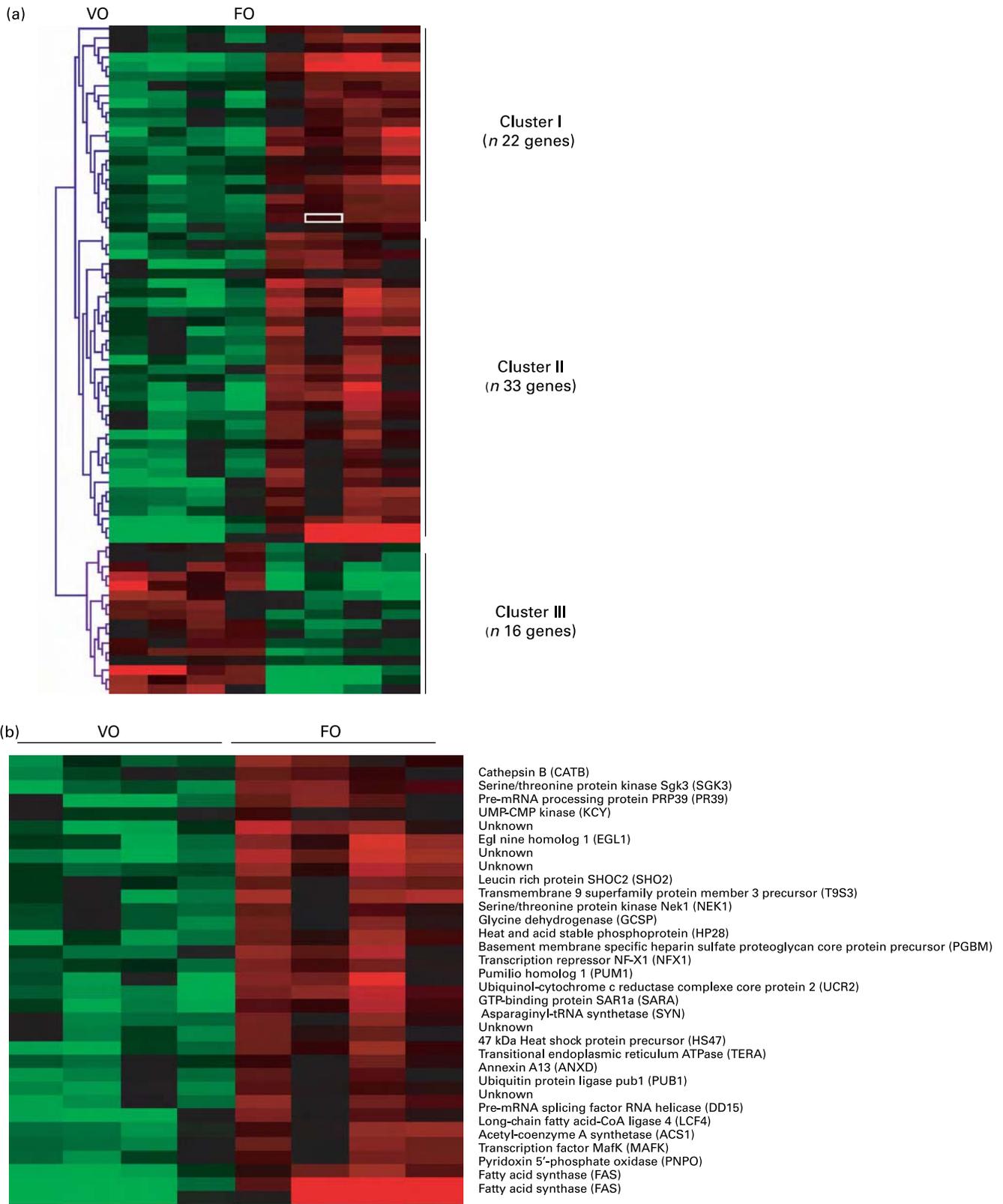


Fig. 1. (a) Hierarchical classification of differentially expressed genes between fish fed with or without fish oil (FO) ($P < 0.01$, t test, TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). Seventy-one hepatic genes were differentially expressed between the two dietary groups: sixteen were over-expressed (in red) and fifty-five were under-expressed (in green) in fish fed with vegetable oils (VO). (b) Detailed description of cluster II.

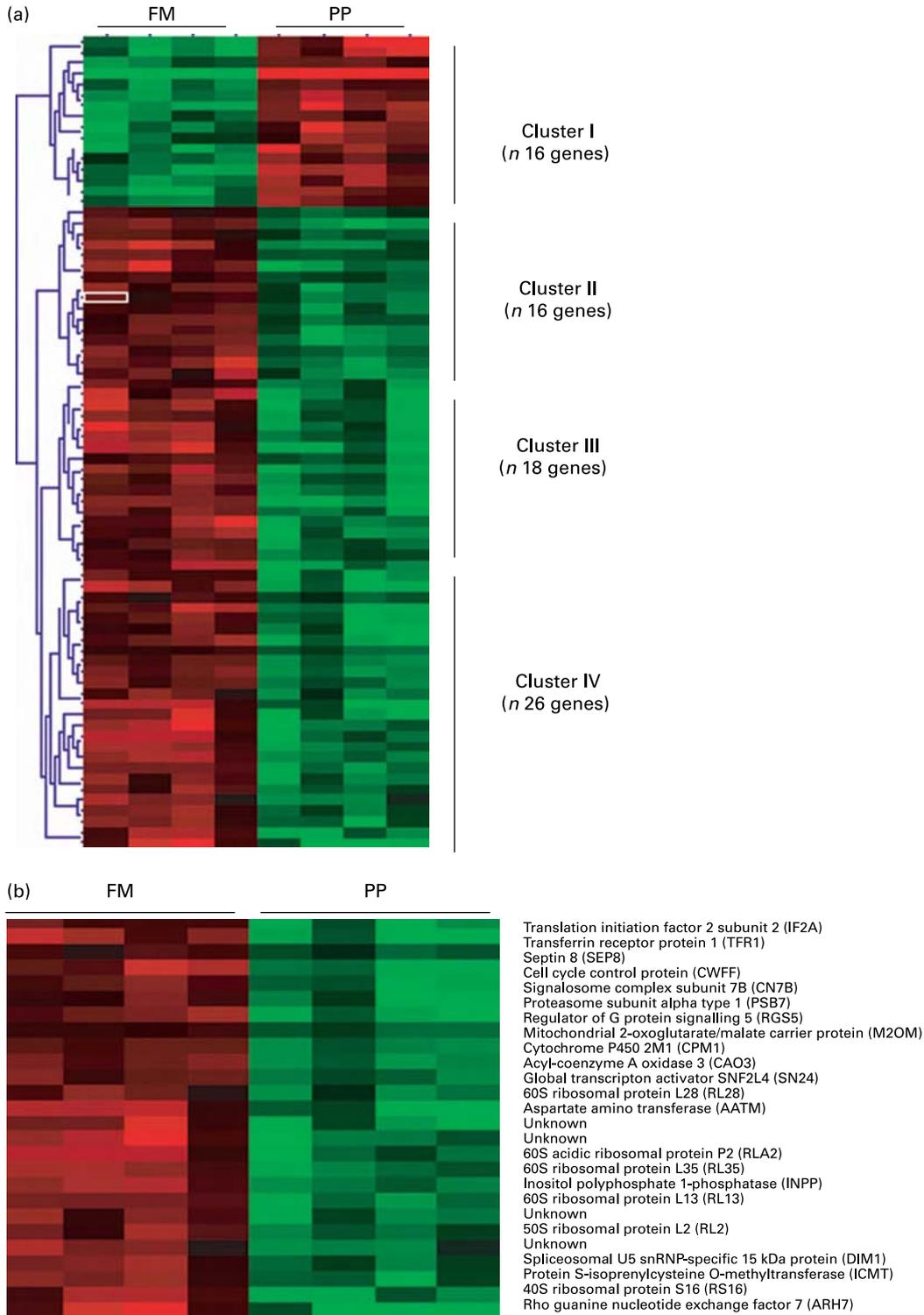


Fig. 2. (a) Hierarchical classification of differentially expressed genes between fish fed with or without fishmeal (FM) ($P < 0.01$, t test, TIGR Multiple Experiment Viewer software; The Institute for Genomic Research, J. Craig Venter Institute, Rockville, MD, USA). Seventy-five hepatic genes were differentially expressed between the two dietary groups: fifteen were over-expressed (in red) and sixty were under-expressed (in green) in fish fed with plant proteins (PP). (b) Detailed description of cluster IV.

Table 11. Major functional groups of hepatic transcripts exhibiting lower abundance in fish fed with vegetable oils after gene ontology analysis (GoMiner)*

Biological process	Function	best_swissprot_hit_accession number
Lipid metabolism	Fatty acid biosynthesis	FAS_CHICK
	Fatty acid biosynthesis	FAS_ANSAN
	Fatty acid metabolism	LCF4_RAT
	Sphingolipid metabolism	LCB1_HUMAN
	Fatty acid, steroid and xenobiotic oxidation	CP13_ONCMY
	Lipid biosynthesis (isoprenoid biosynthesis)	ACS1_RHIME
Protein catabolism	Protein metabolism	EGL1_HUMAN
	Protein repair	YCD1_HUMAN
	Proteolysis	CATD_CLUHA
	Proteolysis	UCR2_HUMAN
	Proteolysis	CATB_CHICK
	Proteolysis (ubiquitin mediated)	PUB1_SCHPO
	Protein catabolism	PRSX_HUMAN
	Amino acid metabolism (glycine, serine and threonine metabolism)	GCSP_MOUSE
	Protein amino acid phosphorylation; mitosis	NEK1_HUMAN
	Protein amino acid phosphorylation	SGK3_HUMAN
Protein modification	Protein biosynthesis	SYQ_HUMAN
	Protein folding	TCPB_HUMAN
	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	SYN_HUMAN
Transcription regulation	mRNA splicing	SMD2_HUMAN
	mRNA splicing	PR39_YEAST
	mRNA splicing	DD15_MOUSE

* GoMiner software (Genomics and Bioinformatics Group, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>).

cytochrome P450s described here can be proposed as molecular markers of dietary fish oil replacement by vegetable oils even though measures of enzymic activities will be necessary to confirm this status.

Gene profiling after fishmeal replacement by plant proteins: focus on specific genes

As the trout fed with plant proteins had significantly lower growth than the fish fed fishmeal, it was worth searching potential molecular actors to explain this phenotype, such as ribosomal proteins and glutamine synthetase.

A relatively high number of genes ($n = 8$) coding for ribosomal proteins were detected in microarrays to be down-regulated in these fish. Moreover, we could classify them in the same cluster (IV) and considered that this set to be related to the lower growth of fish (for example, lower protein synthesis). Unfortunately, it was not possible to confirm these data by quantitative RT-PCR. We have no explanation to understand the discrepancy between the microarray and quantitative RT-PCR data. It is possible that these genes are false positive even though the data of microarrays seem unequivocal in humans (eight ribosomal genes with differential expression). An another explanation may be found in the specificity of the ribosomal genes: (i) there are more than seventy-nine ribosomal genes and, in trout, these are potentially in higher number due to pseudotetraploidy of the salmonids linked to a recent duplication of the genome^(42,43) and (ii) all these genes are not under the same control of their expression⁽⁴⁴⁾. Thus, it is possible that we have not analysed the most appropriate ribosomal protein genes by quantitative RT-PCR. Overall, we prefer to take these data about ribosomal proteins with caution even though the growth rate and feed efficiency (which are major endpoints of the present nutritional experiments linked to the proteosynthesis potential)

were unambiguously lower in the fish fed plant proteins than the fish fed fishmeal ($P < 0.01$).

We found that the glutamine synthetase mRNA levels were lower in the fish fed with plant proteins. Indeed, the lower glutamine synthetase gene expression (8-fold) observed in microarrays seems to be due to the lower levels of the two isoforms of the glutamine synthetase, i.e. GS01 (7-fold) and GS03 (6.9-fold), two genes highly correlated with rising levels of ammonia in rainbow trout⁽⁴⁵⁾. Glutamine synthetase catalyses the transformation of glutamic acid into glutamine, leading to the elimination of ammonia⁽⁴⁶⁾. Rainbow trout do have an active ammonia detoxification system, and glutamine synthetase activity increases after a meal naturally rich in proteins⁽⁴⁷⁾ not only in the brain but also in the liver⁽⁴⁵⁾. In the present study, the fishmeal replacement by plant proteins was associated with lower hepatic glutamine synthetase gene expression, thus potentially lowering the capacity of ammonia detoxification, possibly explaining the lower growth of these fish. However, the link between fishmeal replacement by plant proteins (naturally rich in glutamate) and lower glutamine synthetase gene expression is not clear and needs further study, especially at the level of enzyme activities.

Comparison with others nutrigenomic studies in fish

Very few studies have used nutrigenomics as a tool for the analysis of dietary fatty acids–gene interactions in aquaculture nutrition. Jordal *et al.*⁽⁴⁸⁾ found regulation of several individual genes (for example, $\Delta 6$ -desaturase, peroxysome proliferator-activated receptor, mitochondrial genes) after replacement of fish oil by 75% rapeseed oil in Atlantic salmon. We do not find any common differentially expressed genes between the two studies. Indeed, we do not observe any change in $\Delta 6$ -desaturase gene expression following the microarray analysis (data not shown) in contrast to Jordal *et al.*⁽⁴⁸⁾, suggesting that the effects on gene profiling by vegetable oil replacement

Table 12. Major functional groups of hepatic transcripts exhibiting lower abundance in fish fed with vegetable proteins after gene ontology analysis (GoMiner)*

Biological process	Function	best_swissprot_hit_accession number
Lipid metabolism	Fatty acid biosynthesis; oxidative phosphorylation	ACPM_MOUSE
	Fatty acid metabolism (sphingolipid metabolism)	ASAH_HUMAN
	Fatty acid oxidation	CAO3_HUMAN
Amino acid metabolism	Cholesterol metabolism	ABC1_HUMAN
	Amino acid catabolism	AATM_RAT
	Amino acid metabolism	GLNA_SQUAC
	Amino acid metabolism	MTL2_MOUSE
Protein biosynthesis	Amino acid metabolism	ARG1_HUMAN
	Ribosome assembly	RLA2_BRAFL
	Ribosome assembly	RL27_HUMAN
	Ribosome assembly	CB45_RAT
	Ribosome assembly	RL28_MOUSE
	Ribosome assembly	RL35_HUMAN
	Ribosome assembly	RL13_BRARE
	Ribosome assembly	RL2_GEOSL
	Ribosome assembly	RS16_HUMAN
	Protein biosynthesis	PAB5_ARATH
Protein transport	Translation initiation	IF2A_RAT
	Intracellular protein transport	TAM2_HUMAN
	Intracellular protein transport	PRTP_HUMAN
Transcription regulation	Intracellular protein transport	ICMT_XENLA
	mRNA splicing	DIM1_HUMAN
	mRNA splicing	CWFO_SCHPO
	mRNA splicing	CWFF_SCHPO
	mRNA splicing	U520_HUMAN
	mRNA splicing	SFR2_MOUSE
	Transcription regulation	CT20_HUMAN
Generation of metabolite precursors and energy	Transcription regulation	SN24_HUMAN
	ATP biosynthesis	VATB_CHICK
Signal transduction	Oxidative phosphorylation (electron transport)	CPM1_ONCMY
	Oxidative phosphorylation (electron transport)	UCR1_MOUSE
	Oxidative phosphorylation, electron transport	COXO_MOUSE
	Protein catabolism (proteasome)	PSB7_RAT
	Protein catabolism (proteasome)	PSA1_HUMAN
	Purine salvage	IUNH_CRIFA
	Repair iron-sulfur proteins	NIFU_RICPR
	Signal transduction	KAP2_BOVIN
	Signal transduction	INPP_MOUSE
	Signal transduction	RGS5_MOUSE
Signal transduction	ARLL_HUMAN	

* GoMiner software (Genomics and Bioinformatics Group, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>).

in fish may possibly vary with vegetable oil source and/or with fish species.

Concerning the analysis of dietary protein–gene interaction at the integrative level, an earlier study analysed the effect of dietary plant-protein substitution on hepatic metabolism using

a proteomic approach⁽¹⁴⁾. The majority of the up-regulated proteins affected by the plant-protein diets were involved in energy production (NADPH, electron transferring flavoproteins). This is in contrast to data from the present study, in which lower expression levels of genes involved in energy

Table 13. Selected genes analysed by real-time PCR: effect of dietary fish oil (FO) replacement by vegetable oils (VO)*

Gene	Fold-regulation (in VO fish)†	P	CV (%) FO	CV (%) VO
Fatty acid synthase	– 10.1	< 0.02	2.5	18.4
Ubiquinol-cytochrome c reductase	– 3.1	0.001	1.1	1.3
Cathepsin B	– 2.3	< 0.05	1.7	1.1
CYP1A (3A/A1)	– 2.7	< 0.02	4.2	2.5
CYP3A (A27)	+ 2.7	< 0.005	2.9	2.3

* Statistical differences in gene expression were evaluated between group means (six samples per group) by randomisation tests using the Relative Expression Software tool (REST®)⁽²³⁾. The transcript level of target genes was normalised with EF1 α -expressed transcripts.

† Positive and negative regulation means that the target gene is expressed at a higher or lower level, respectively.

Table 14. Selected genes analysed by real-time PCR: effect of dietary fishmeal (FM) replacement by plant proteins (PP)*

Gene	Fold-regulation (in PP fish)†	P	CV (%) FM	CV (%) PP
Glutamine synthetase	- 8.0	0.001	0.5	0.2
Glutamine synthetase GS03	- 7.1	0.007	1.22	9.06
Glutamine synthetase GS02	+ 2.1	0.26	11.73	13.03
Glutamine synthetase GS01	- 6.9	< 0.02	3.85	5.14
Ribosomal protein L35	+ 1.4	0.42	1.9	4.4
Ribosomal protein L27	- 1.1	0.48	1.0	1.0
Ribosomal protein S6	- 1.4	0.08	0.2	0.9
Ribosomal protein S7	+ 1.4	0.08	1.0	1.6

* Statistical differences in gene expression were evaluated between group means (six samples per group) by randomisation tests using the Relative Expression Software tool (REST®)⁽²³⁾. The transcript level of target genes was normalised with EF1 α -expressed transcripts.

† Positive and negative regulation means that the target gene is expressed at a higher or lower level, respectively.

metabolism were found. However, we should recognise that comparison between transcriptomic and proteomic data is difficult. A recent study by Salem *et al.*⁽⁴⁹⁾ on the hepatic gene expression profiles between fasted and fed rainbow trout showed an inhibition of protein synthesis gene expression (ribosomal protein) in fasted fish; these data can be related to ours on trout fed with plant-protein diets having reduced growth.

Conclusion

Our data based on a transcriptomic approach and confirmed by quantitative RT-PCR enable us to identify modifications of hepatic gene expression after intake of a plant-based diet by rainbow trout. This non-exhaustive list of genes could be useful and used in the future as powerful tools to more closely monitor the effects of the evolution of feeds used for farmed fish⁽⁵⁰⁾.

Acknowledgements

We acknowledge M. J. Borthaire and C. Nunez for their excellent technical assistance. We thank F. Terrier, Y. Hontang and F. Sandres for rearing fish in the INRA experimental farm (Donzacq, Landes, France).

The present study was financed by the AGENAE French programme (Analyse du GENome des Animaux d'Élevage), CIPA (Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture), OFIMER (Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture), Aquitaine Region (no. CRRDT-20051303004AB), 5th European projects (FAIR no. QLK5-2000-30068, 'Perspectives of Plant Protein use in Aquaculture' (PEPPA) and FAIR no. Q5RS-2000-30058, 'Researching Alternatives to Fish Oils in Aquaculture' (RAFOA)) and a 6th PCRD European project (contract no. 016249-2, 'Sustainable Aquafeeds to Maximise the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers' (AQUAMAX)).

F. P. and D. E. were responsible for generating the trout microarrays. C. K. was co-responsible for generating statistical analysis of the microarray data. E. P.-J. generated the quantitative RT-PCR data. N. R., G. C., F. M. and S. K. conducted the nutritional experiments in fish. S. P. was responsible for project development, drafted the manuscript and is the corresponding author.

There are no conflicts of interest.

References

1. Food and Agriculture Organization (2006) State of world aquaculture. <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0874e/a0874e00.pdf>
2. Gatlin DM III, Barrows FT, Brown P, *et al.* (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Res* **38**, 551–579.
3. Cho C & Kaushik SJ (1990) Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev Nutr Diet* **61**, 132–172.
4. Sargent JR & Tacon AGJ (1999) Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc Nutr Soc* **58**, 377–383.
5. Webster CD & Lim C (2002) *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
6. Webster C, Lim C & Lee S-C (2007) *Use of Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets*. Binghamton, NY: The Haworth Press.
7. Francis G, Makkar H & Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**, 197–227.
8. Kaushik SJ (1990) Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. In *Mediterranean Aquaculture*, pp. 125–138 [R Flos, L Tort and P Torres, editors]. Chichester, UK: Ellis Horwood.
9. Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B & Laroche M (1995) Partial or total replacement of fish meal by soybean proteins on growth, protein utilization, potential oestrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout. *Aquaculture* **133**, 257–274.
10. Watanabe T, Aoki H, Shimamoto K, Hadzuma M, Maita M, Yamagata Y, Viswanath K & Satoh S (1999) A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fisheries Sci* **64**, 505–512.
11. Watanabe T, Verakunpiriya V, Watanabe K, Viswanath K & Satoh S (1998) Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fisheries Sci* **63**, 258–266.
12. Kaushik SJ, Coves D, Dutto G & Blanc D (2004) Almost total replacement of fishmeal by plant protein sources in the diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **230**, 391–404.
13. Gomez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, Medale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S & Perez-Sanchez J (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **232**, 493–510.
14. Vilhelmsson OT, Martin SAM, Medale F, Kaushik SJ & Houlihan DF (2004) Dietary plant protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout. *Br J Nutr* **92**, 71–80.

15. Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, Dick JR & Crampton VO (2003) Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J Nutr* **133**, 2793–2801.
16. Glencross BD, Hawkins WE & Curnow JG (2003) Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after growth-out on plant based diet. *Aquaculture Nutr* **9**, 409–418.
17. Regost C, Arzel J, Robin G, Rosenlund G & Kaushik SJ (2003) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* **220**, 737–747.
18. Richard N, Kaushik S, Larroquet L, Panserat S & Corraze G (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* **96**, 299–309.
19. Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.
20. Moore S & Stein WH (1951) Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resin. *J Biol Chem* **192**, 663–681.
21. Govoroun M, Le Gac F & Guiguen Y (2006) Generation of a large scale repertoire of expressed sequences tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* **7**, 196–203.
22. Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldif M, Bernard K, Naquet P & Jordan B (1995) Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* **29**, 207–216.
23. Lopez F, Rougemont J, Loriod B, Bourgeois A, Loi L, Bertucci F, Hingamp P, Houlgatte R & Granjeaud S (2004) Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics* **5**, 38.
24. Cathelin R, Lopez F & Klopp C (2007) AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ library. *Bioinformatics* **23**, 247–248.
25. Saal LH, Troein C, Vallon-Christersson J, Gruvberger S, Borg A & Peterson C (2002) Bioarray software environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol* **3**, software0003.1–software0003.6 (publication 15 July 2002).
26. Pan W (2002) A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicate microarray experiments. *Bioinformatics* **21**, 546–554.
27. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, *et al.* (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* **4**, R28.
28. Rexroad CE III, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B, Gahr SA, Palti Y & Quackenbush J (2003) Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index. *Cytogenet Genome Res* **102**, 347–354.
29. Olsvik P, Lie K, Jordal A, Nilsen T & Hordvik I (2005) Evaluation of potential reference genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* **17**, 6–21.
30. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, 2002–2007.
31. Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, 9–36.
32. Sargent JR, Tocher DR & Bell JG (2002) The lipids. In *Fish Nutrition*, 3rd ed., pp. 181–258 [JE Halver and RW Hardy, editors]. San Diego: Academic Press.
33. Jump DB, Clarke SD, Thelen A & Liimatta M (1994) Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **35**, 1076–1084.
34. McGrath ME (1999) The lysosomal cysteine protease. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 181–204.
35. Mortimore GE & Kadowaki M (2001) Regulation of protein metabolism in liver. In *Handbook of Physiology. Section 7 – The Endocrine System. Volume II – The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*, pp. 553–577 [LS Jefferson and AD Cherrington, editors]. New York: Oxford University Press.
36. Barzanti V, Battino M, Baracca A, Cavazzoni M, Cocchi M, Noble R, Maranesi M, Turchetto E & Lenaz G (1994) The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br J Nutr* **71**, 193–202.
37. Buhler DR & Wang-Buhler JL (1998) Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp Biochem Physiol* **121**, 107–137.
38. Jacobs MN, Covaci A, Gheorghe A & Schepens P (2004) Time trend investigation of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides in selected *n-3* polyunsaturated fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential *n-3* fatty acid requirements. *J Agric Food Chem* **52**, 1780–1788.
39. Jacobs MN, Covaci A & Schepens P (2002) Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environ Sci Technol* **36**, 2797–2805.
40. Lee SJ & Buhler DR (2002) Functional properties of a rainbow trout CYP3A27 expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Drug Metab Dispos* **30**, 1406–1412.
41. Pikuleva IA (2006) Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* **112**, 761–773.
42. Wool IG, Chan Y & Gluck A (1994) Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol* **73**, 933–947.
43. Meyer A & Van de Peer Y (2005) From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* **27**, 937–945.
44. Ishii K, Washio T, Uechi T, Yoshihama M, Kenmochi N & Tomita M (2006) Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes. *BMC Genomics* **7**, 37.
45. Essex-Fraser PA, Steele SL, Bernier NJ, Murray BW, Stevens ED & Wright PA (2005) Expression of four glutamine synthetase genes in the early stages of development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relationship to nitrogen excretion. *J Biol Chem* **280**, 20268–20273.
46. Labow BI, Souba WW & Abcouwer SF (2001) Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr* **131**, Suppl. 9, 2467S–2474S.
47. Wicks DJ & Randall BJ (2002) The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comp Biochem Physiol* **132B**, 275–285.
48. Jordal AE, Torstensen BE, Tsoi S, Tocher DR, Lall SP & Douglas SE (2005) Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Nutr* **135**, 2355–2361.
49. Salem M, Silverstein J, Rexroad CE III & Yao J (2007) Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* **8**, 328.
50. Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Libchenko J, Mooney H & Troell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**, 1017–1024.

Dietary fat level modifies the expression of hepatic genes in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by microarray analysis

S. Panserat ^{a,*}, S. Ducasse-Cabanot ^a, E. Plagnes-Juan ^a, P.P. Srivastava ^d, C. Kolditz ^a, F. Piumi ^{b,c},
D. Esquerré ^{b,c}, S. Kaushik ^a

^a INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture & Genomics, Pôle d'Hydrobiologie, CD 918, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

^b INRA, DGA, UMR 314, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, CRB GADIE, Jouy en Josas, F-78350, France

^c CEA, DSV, IRCM, SREIT, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, Jouy-en-Josas, F-78352, France

^d Fish Nutrition and Biochemistry Division, Central Institute of Fisheries Education, Fisheries University Road, Seven Bungalows, Versova, Andheri, Mumbai – 400 061, India

Received 14 November 2007; received in revised form 25 December 2007; accepted 30 December 2007

Abstract

The objective of the present study was to identify postprandial molecular events associated with dietary fish oil level in rainbow trout using trout cDNA microarray tools (9 K). Our genomics data showed that relatively few hepatic genes ($n=41$) are differentially expressed between fish fed a high fat diet compared to those fed a diet without added fish oil. We then focus our analysis of specific events involved in intermediary metabolism by analysing them using qRT-PCR. Removal of fish oil was associated with higher lipid biosynthesis (reflected by the fatty acid synthase gene) and lower lipid catabolism (reflected by the acyl-CoA oxidase gene). More interestingly, some genes involved in proteasomal-dependant proteolysis (proteasome and ubiquitin ligase genes) were down regulated in fish fed without fish oil, suggesting a relationship between dietary lipid intake and regulation of hepatic protein metabolism in rainbow trout.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fish nutrition; Liver; Intermediary metabolism; Genomics; Transcriptome; Rainbow trout

1. Introduction

Current feeds for salmonids depend heavily on fish meal and fish oil which are finite resources and the volume of these ingredients needed to meet the projected growth of global aquaculture is bound to exceed the supply (Naylor et al., 2000; New and Wijkstroem, 2002). Both science and industry recognise the need for development of feeds based on viable alternatives to these limited ingredients. Besides issues on the sustainability of wild-fishery resources for use in feeds for farmed fish, the potential presence of organic and inorganic contaminants also lead to concerns with regard to food safety. Efforts have been under way in recent years to develop fish meal free (Kaushik et al., 1995; Watanabe et al., 1998) or very

low fish meal (Kaushik et al., 2004; Sitja-Bobadilla et al., 2005) diets mainly based on plant protein sources.

Increasing dietary fish oil has a positive nitrogen sparing effect and improves the quality of fish flesh for human consumption (Sargent et al., 2002), especially in supplying eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), known to play essential roles in protection against a number of diseases such as cardio-vascular risk, diabetes type 2 or neurodegenerative disorders (Bourre, 2005; Ismail, 2005; Nettleton and Katz, 2005). The implications of replacing dietary fish oil by a mix of vegetable oils in feeds for farmed fish have also been studied intensely in recent years. It does not have marked effects on growth but liver fatty acid metabolism as well as muscle n-3 PUFA contents are largely affected in Atlantic salmon (Torstensen et al., 2000; Bell et al., 2001, 2002; Stubhaug et al., 2005; Richard et al., 2006). Although the fatty acid profiles of fish flesh are modified reflecting the fatty acid

* Corresponding author. Tel.: +33 5 59 51 59 60; fax: +33 5 59 54 51 52.

E-mail address: panserat@st-pee.inra.fr (S. Panserat).

Table 1
Analytical composition of the experimental diets and calculation of feed intake after pair-feeding (for more details, see [Ducasse-Cabanot et al., 2007](#))

	HL diet	LL diet
<i>Analytical composition</i>		
Dry matter (DM, %)	90	84
Crude protein (CP), %DM	50	61
Crude fat, %DM	25	10
Gross energy, kJ/gDM	24	21
Starch, %DM	14	17
<i>Feed intake (g/day per 100 g fish)</i>		
Protein (g)	0.75	0.77
Lipid (g)	0.37	0.13
Carbohydrate (g)	0.21	0.22

composition of the diet in fish fed diets containing vegetable oil, using a fish oil finishing diet before slaughter can restore the EPA and DHA levels in fish flesh ([Bell et al., 2003, 2004; Torstensen et al., 2005](#)).

Changes in dietary protein or fat source can have variable metabolic consequences. To thoroughly evaluate such effects on intermediary metabolism, an integrative approach is needed. Data on growth performance, biochemical criteria, enzyme activities and gene expression of rainbow trout fed with or without fish oils (HL or LL fish) over 7 weeks have already been reported ([Ducasse-Cabanot et al., 2007](#)). While unequivocal characteristics have been detected for each dietary group at the intestinal and plasma levels, no major changes were detected in the liver. The analysis by a transcriptomic approach should be able to answer the following question: is there really 'weak or absence of liver response to dietary fish oil removal or is it due to the restrictive candidate gene approach?'. Here, we undertake an analysis of the effects of diets with or without added fish oil to have an overview of the effect *per se* of this highly used ingredient on hepatic transcriptome using homologous rainbow trout cDNA microarray tools.

2. Materials and methods

2.1. Feeds, fish rearing and samplings

Duplicate groups of juvenile immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (100 fish per tank; initial body weight 139 g) were reared in our experimental fish farm (INRA, Donzacq, France) at 18 °C under natural photoperiod in spring. Two experimental diets were formulated and manufactured in our experimental unit as previously described ([Ducasse-Cabanot et al., 2007; Table 1](#)). The diet HL

contained 15.5% fish oil. In the diet LL, no fish oil was added. It was mostly replaced by fish meal. Fish were hand-fed twice a day at 1.5 and 1.3% of body weight per day for groups HL and LL, respectively, in order to maintain similar carbohydrate and protein intake as previously described ([Ducasse-Cabanot et al., 2007; Table 1](#)). Fish were group-weighted each week, to adjust the rations. The growth trial lasted for 7 weeks. At the end of the growth trial, 12 fish from each group were randomly sampled and killed by a sharp blow on the head 8 h after feeding which corresponds to the peak of postprandial nutrient absorption at 18 °C as previously shown ([Panserat et al., 2002](#)).

2.2. Selection of individuals highly representative of nutritional groups

Before beginning the hepatic transcriptomic analysis, we selected individuals which were truly representative of the specific dietary treatment (HL or LL) to avoid possible inter-individual variability in feed intake between individuals ([Kause et al., 2006a,b](#)). In this context, we selected individuals using the following procedure: firstly, we used data available for each fish ([Ducasse-Cabanot et al., 2007](#)) which would characterize each dietary group *i.e.* fish liver weight, plasma triacylglycerol and free fatty acid levels ([Table 2](#)); secondly, we selected those individuals when they possessed both tested parameters including inside the mean \pm SEM for each variable. Among the 12 sampled fish, we selected 6 fish per diet. Total hepatic RNAs were extracted from these rainbow trout using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.3. cDNA microarrays

Nylon microarrays were obtained from INRA-GADIE biological resources centre (<http://www-crb.jouy.inra.fr/>) (Jouy-en-Josas, France) containing 9023 rainbow trout cDNAs originating from a pooled-tissue library ([Govoroun et al., 2006](#)) spotted after PCR amplification. PCR products were spotted onto Hybond N+ membranes as previously described ([Nguyen et al., 1995](#)). One hundred twenty eight positive (luciferase) and 64 negative (water) controls were also spotted on each microarray.

2.4. Hybridisation, scanning and quantifications of microarrays

Restricted to the trout cDNA microarray availability, only 3 hepatic RNA samples originating from the two dietary groups were used for hybridisation at INRA UMR1067 transcriptomic facility (St-Pée-sur-Nivelle, France) according to the following procedure. RNA quality was determined using an Agilent bioanalyser. The first hybridisation was performed at 42 °C for 48 h using γ -³³P-labelled T7 promoter oligonucleotide (5'-CACTATAGGGAATTTGGCC-3') to estimate the amount of cDNA in each spot. After stripping (3 h 68 °C, 0.1 \times SSC, 0.2% SDS), hybridisations with hepatic cDNAs were performed. Microarrays were prehybridised for 1 h at 65 °C in hybridisation buffer (5 \times Denhardt, 5 \times SSC, 0.5% SDS). Labelled cDNAs were prepared from 5 μ g of RNA by simultaneous reverse transcription and labelling for 1 h at 42 °C in the presence of 50 μ Ci [α -³³P] dCTP, 5 μ M dCTP and 800 μ M each dATP, dGTP and dTTP and 200 units SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 30 μ l final volume. RNA was degraded by treatment at 68 °C for 30 min with 1 μ l 10% SDS, 1 μ l 0.5 M EDTA and 3 μ l 3 M NaOH and then equilibrated at room temperature for 15 min. Neutralization was done by adding 1 μ l 1 M Tris-HCl plus 3 μ l 2 N HCl. Microarrays were then incubated

Table 2
Parameters measured on fish fed with or without fish oil as previously described by [Ducasse-Cabanot et al. \(2007\)](#)

Parameters	HL: Mean \pm SEM (n=12 fish)	A selected HL fish (example)	LL: Mean \pm SEM (n=12 fish)	A selected LL fish (example)
Fish liver weight (g)	4.19 \pm 0.81	4.36	3.30 \pm 1.05 *	2.73
Hepatic-somatic index (liver weight/body weight)*100	1.99 \pm 0.62	1.93	1.63 \pm 0.28 *	1.56
Plasma triacylglycerol (mEq/l)	9.77 \pm 5.9	15.04	4.44 \pm 1.68 *	4.49
Plasma free fatty acids (g/l)	0.14 \pm 0.05	0.13	0.07 \pm 0.02 *	0.07

These data were used for selection of representative individuals for each nutritional group before transcriptomics analysis.

* LL is significantly different from HL ($P < 0.05$, *t* test Student).

Table 3
Primer sequences for analysis by real time RT-PCR of selected genes

Gene	Name	5'–3' forward primer	Name	5'–3' reverse primer
Fatty acid synthase	FAS-1	5'-TGATCTGAAGGCCCGTGTCA -3'	FAS-2	5'-GGGTGACGTTGCCGTGGTAT -3'
Elongation of very long fatty acid protein	ELO-1	5'-TACAACGGGCCTGTGACGAA -3'	ELO-2	5'-GCCAGCCACCATGTCCTTGT -3'
Long-chain fatty acid-CoA ligase	LCF4-1	5'-GCTGGGAGGGAACATCAGGA-3'	LCF4-2	5'-CCACCCTCAACCCAGTCTCG -3'
Acyl-CoA oxidase	CAO3-1	5'-GCGCCAAGTACTTCCTCAAC -3'	CAO3-2	5'-TCACAAACTCCTGTGTGCTG -3'
Fatty acid-binding protein	FABL1	5'-CAAGGGTGTCAAGCCAACGA -3'	FABL2	5'-CGCAGATGAGCTTCCCATCC -3'
Cytochrome <i>c</i> oxidase polypeptide II	COX2-5	5'-CACTCCTGAGCCGTTCTTC -3'	COX2-6	5'-GGGTACCCTTCAACAACGA -3'
Ubiquitin-E2-protein ligase	UBCE-1	5'-CCATCGAGGGACCAGAAGGA-3'	UBCE-2	5'-TGCCCTCCAGTCCCTTTTCA -3'
Proteasome-subunit α 3	PS3-2	5'-CCACCTTTTCCCTGATGGA -3'	PS3-4	5'-GGGATCGAGCATCAGCCAGT -3'
Elongation factor 1 α	EF17/8	5'-TCCTCTTGTCGTTTCGCTG -3'	EF19	5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG -3'

with the corresponding denatured labelled cDNA for 18 h at 65 °C in hybridisation solution. After 3 washes (1 h 68 °C with 0.1× SSC, 0.2% SDS), microarrays were exposed 65 h to phosphor-imaging plates that were scanned using a FUJI BASS 5000. Signal intensities were quantified using ImaGene – Microarray Analysis Software (BioDiscovery, Inc, El Segundo, CA, USA).

2.5. Microarrays data analysis

Signal processing was performed using vector oligonucleotide data to correct the relative amount of DNA present in each spot. At this step, low nucleotide signals (lower than 3 times the background level) were excluded from the analysis. After correction, signals were normalized by dividing each gene expression by the median value of the array. Data were subsequently analysed using statistical GeneANOVA software (Didier et al., 2002) and gene expression was significantly different when $P < 0.01$.

2.6. Data mining

Rainbow trout sequences originating from INRA Agenae (Govoroun et al., 2006) and USDA (Rexroad et al., 2003) and EST sequencing programs were used to generate publicly available contigs (<http://public-contigbrowser.sigeneae.org>).

The 4th version (om.4) was used for BlastX (Basic Local Alignment Search Tool) comparison (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). The score of each alignment was retrieved after performing a Blast X comparison. Biological signification of data (biochemical pathways, cellular processes...) was illustrated using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) as bioinformatics resource (<http://www.genome.jp/kegg/>).

2.7. Real time RT-PCR

Real time RT-PCR was performed using 6 RNAs from the selected individuals. One μ g of total RNA was reverse transcribed to cDNA with the Superscript™ III RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using oligo dT primers. Gene expression levels were determined by real time RT-PCR. Real time PCR was performed in the iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Quantitative PCR (Q-PCR) analyses for gene expressions were performed on 10 μ l of the RT reaction mixture using the iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). The total volume of the PCR reaction was 25 μ l, containing 200 nM of each primer. Primers were designed so that they were overlapping an intron when it was possible (Primer3 software) using known sequences in nucleotide databases (Table 3). Relative quantification of the target gene transcript was done using *eIf α* gene expression as reference (Olsvik et al., 2005). Thermal cycling was initiated with the

Table 4
Hepatic transcripts exhibiting a higher abundance in fish fed without fish oil after microarray analysis ($n=23$)

Clone name	Signae contig	Swissprot-hit-description	Fold changes
tcay0015b.b.07	tcay0015b.b.07_3.1.om.4	GTR2_CHICK Solute carrier family 2	+3
tcba0008c.k.14	tcay0024b.i.20_3.1.om.4	AUHM_MOUSE Methylglutaconyl-CoA hydratase	+2
tcba0008c.g.18	tcba0008c.g.18_5.1.om.4	SYN_HUMAN Asparaginyl-tRNA synthetase	+3
IRT38N07_B_G04	15077877.1.om.4	UNKNOWN	+2
IRT31J20_D_E10	15076197.1.om.4	YG4Q_YEAST Hypothetical 51.2 kDa protein in PET54-DIE2 intergenic region.	on
tcad0002a.j.15	tcad0002a.j.15_3.1.om.4	UNKNOWN	+2
IRT103J21_B_E11	15017915.1.om.4	NU54_HUMAN Nucleoporin p54	on
tcay0006b.i.17	tcay0020b.a.03_3.1.om.4	CD36_MESAU Platelet glycoprotein IV (GPIV)	on
tcbk0022c.f.06	tcay0028b.c.20_3.1.om.4	P44_PANTR Non-A non-B hepatitis-associated microtubular aggregates protein (Antigen p44)	on
IRT91H22_D_D11	tcad0005a.o.03_3.1.om.4	YQOC_CAEEL Hypothetical RNA-binding protein EEED8.12 in chromosome II	on
<i>IRT143E02_C_C01</i>	<i>15020504.1.om.4</i>	<i>RS7_FUGRU 40S ribosomal protein S7</i>	+2
tcbk0047c.h.22	tcbk0047c.h.22_5.1.om.4	GBI1_ORYLA Guanine nucleotide-binding protein G(i)	+3
tcbk0053c.j.11	tcbk0053c.j.11_5.1.om.4	RHG4_HUMAN Rho-GTPase-activating protein 4 (Rho-GAP hematopoietic protein C1)	on
IRT146G11_A_D06	15013726.1.om.4	YNH6_CAEEL Hypothetical protein R107.6 in chromosome III	+2
IRT58G03_A_D02	15022055.1.om.4	LCB2_HUMAN Serine palmitoyltransferase 2 (EC 2.3.1.50).	on
tcav0005c.d.06	Tcav0005c.d.06_3.1.om.4	CLK4_HUMAN Dual specificity protein kinase CLK4 (EC 2.7.1.37) (EC 2.7.1.112)	+2
tcay0011b.h.13	15085131.1.om.4	S25B_RAT SNARE-associated protein Snapin	+3
<i>tcab0001c.e.06</i>	<i>tcab0001c.e.06_5.1.om.4</i>	<i>FAS_CHICK Fatty acid synthase (EC 2.3.1.85)</i>	+4
IRT61G21_A_D11	15023363.1.om.4	RMP3_HUMAN Receptor activity-modifying protein 3 precursor	+3
tcbk0041c.b.18	tcbk0041c.b.18_5.1.om.4	STL3_MOUSE Synaptotagmin-like protein 3	on
tcay0035b.c.13	tcay0019b.a.14_3.1.om.4	MAE1_HUMAN Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	+3
<i>IRT52B16_D_A08</i>	<i>15081800.1.om.4</i>	<i>LCF4_HUMAN Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4 (EC 6.2.1.3)</i>	on
<i>tcbk0022c.o.10</i>	<i>tcbk0022c.o.10_5.1.om.4</i>	<i>ELO3_HUMAN Elongation of very long-chain fatty acids protein 3</i>	+4

Fold changes in fish fed LL diet, relative to the standard diet (HL diet) are indicated. on: detectable gene expression only in fish fed LL diet. Letters in *italics*: genes analysed by qRT-PCR.

Table 5
Hepatic transcripts exhibiting a lower abundance in fish fed without fish oil after microarray analysis ($n=18$)

Clone name	Sigenae contig	Swissprot-hit-description	Fold changes
1RT155O11_A_H06	15069701.1.om.4	T4AP_HUMAN Trpc4-associated protein	-7
tcaa0001c.i.21	15015750.1.om.4	YLA1_HUMAN Y+L amino acid transporter 1	off
tcac0006c.c.07	tcay0020b.1.11_5.1.om.4	TTK_HUMAN Dual specificity protein kinase TTK (EC 2.7.1.-)	-4
tcad0007a.k.03	tcad0007a.g.23_3.1.om.4	UNKNOWN	-5
tcbk0004c.n.04	tcbk0004c.n.04_5.1.om.4	UCP5_MOUSE Brain mitochondrial carrier protein-1	off
<i>tcbk0017c.n.11</i>	<i>tcay0029b.d.04_3.1.om.4</i>	<i>PSA3_HUMAN Proteasome-subunit alpha type 3 (EC 3.4.25.1)</i>	-8
tcbk0060c.d.21	tcbk0060c.d.21_5.1.om.4	EDD_HUMAN Ubiquitin-protein ligase EDD (EC 6.3.2.-)	-3
1RT128F06_D_C03	15060338.1.om.4	AMNL_MOUSE Amnionless protein precursor.	off
tcay0014b.g.04	tcay0014b.g.04_3.1.om.4	UNKNOWN	off
tcbk0019c.a.22	tba0011c.d.20_5.1.om.4	BIR6_HUMAN Baculoviral IAP repeat-containing protein 6.	off
tcay0021b.o.01	tcay0021b.o.01_3.1.om.4	SM4B_HUMAN Semaphorin 4B precursor.	off
<i>1RT88G12_C_D06</i>	<i>15026719.1.om.4</i>	<i>CAO3_HUMAN Acyl-coenzyme A oxidase 3</i>	<i>off</i>
tba0013c.e.10	tcay0029b.h.21_3.1.om.4	ZN41_HUMAN Zinc finger protein 41.	-2
1RT153B07_B_A04	15084113.1.om.4	RPB3_HUMAN DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide (EC 2.7.7.6)	off
tcac0003c.j.22	15070552.1.om.4	UNKNOWN	-3
<i>tcbk0010c.k.20</i>	<i>15021585.1.om.4</i>	<i>FABL_RHASA Fatty acid-binding protein</i>	-2
<i>tcaa0001c.f.18</i>	<i>tcay0015b.i.24_5.1.om.4</i>	<i>COX2_ONCMY Cytochrome c oxidase polypeptide II (EC 1.9.3.1)</i>	-2
<i>tba0025c.c.23</i>	<i>tba0025c.c.23_5.1.om.4</i>	<i>UBCE_HUMAN Ubiquitin-conjugating enzyme E2-24 kDa (EC 6.3.2.19)</i>	-4

Fold changes in fish fed LL diet, relative to the standard diet (HL diet) are indicated. off: no detectable gene expression in fish fed LL diet. Letters in *italics*: genes analysed by qRT-PCR.

incubation at 95 °C for 90 s for hot-start iTaq™ DNA polymerase activation. Thirty five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95 °C for 20 s for denaturing, and at 59 °C for 30 s for annealing and extension, except

for *gdh2*, for which the temperature was set at 60 °C. Following the final cycle of the PCR, melting curves were systematically monitored (55 °C temperature gradient at 0.5 °C/s from 55 to 94 °C) to ensure that only one fragment was

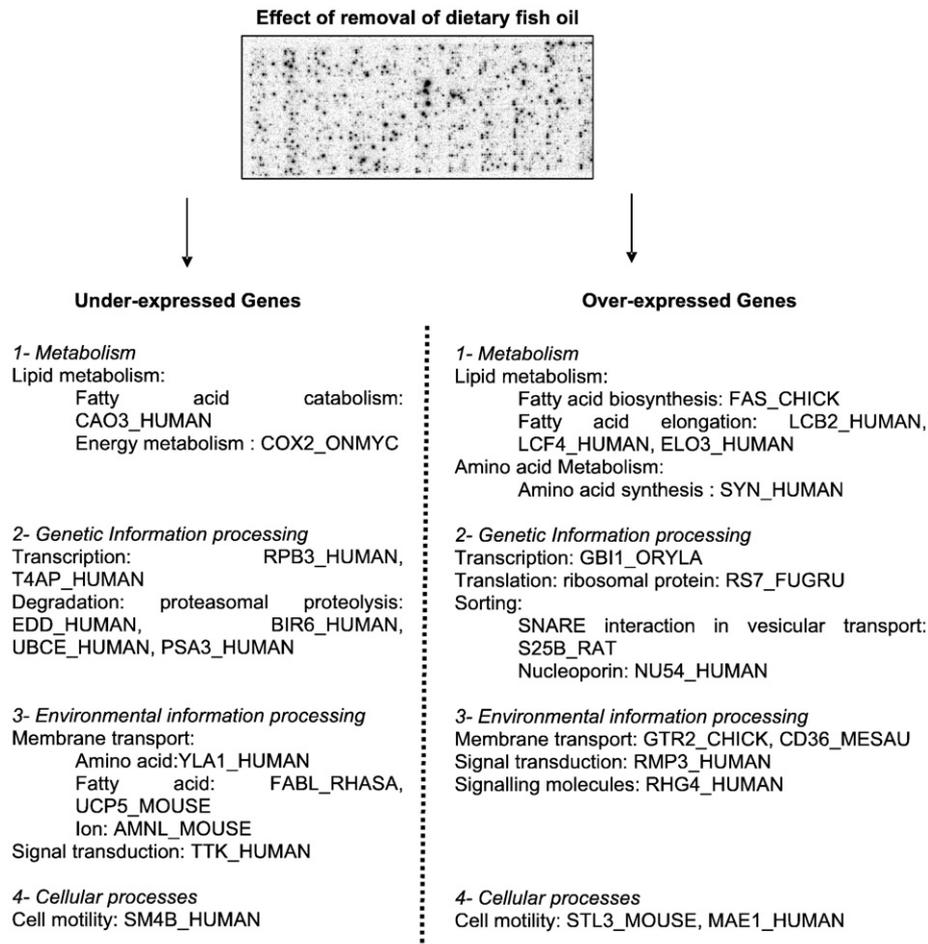


Fig. 1. Classification of hepatic differentially expressed genes between fish fed with or without fish oil following the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) nomenclature (<http://www.genome.jp/kegg/>). Nomenclature of genes corresponds to the swissprot-hit identification in Tables 3 and 4.

amplified. Samples without reverse transcriptase and samples without RNAs were run for each reaction as negative controls.

Relative quantification of the target gene transcript with *ef1 α* reference gene transcript was made following the Pfaffl method with the Relative Expression Software tool (REST[©]) (Pfaffl et al., 2002; Pfaffl, 2001). This mathematical algorithm computes an expression ratio, based on real time PCR efficiency and the crossing point deviation of the unknown sample versus a control group: $R = \frac{[(E_{\text{target gene}})^{\Delta CT_{\text{Target gene}}}] / [(E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta CT_{\text{EF1}\alpha}}]}{[(E_{\text{target gene}})^{\Delta CT_{\text{Target gene}}}] / [(E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta CT_{\text{EF1}\alpha}}]}$ where E is PCR efficiency determined by standard curve using serial dilution of cDNA (cDNA dilutions from 1/16 up to 1/512); ΔCT the crossing point deviation of an unknown sample versus a control. Statistical differences in gene expression between control and sample were evaluated in group means by randomisation tests (Pfaffl et al., 2002) using REST[©] software. Two thousand random allocations were performed and significant differences were considered at $P < 0.05$.

3. Results

After doing image and statistical analysis of hepatic transcriptomes from 3 fish fed fish oil and 3 fish fed without fish oil, we found 41 genes differentially expressed between fish fed with and without fish oil (GeneANOVA, $P < 0.01$) i.e. $< 0.5\%$ of the genes spotted on the trout microarray. The differences between the level of gene expression in dietary groups were at least 2-fold. Among them, 23 genes were up-regulated and 18 down regulated in livers of fish fed without fish oil supplementation compared to fish fed HL diet (GeneANOVA, $P < 0.01$) (Tables 4 and 5). We confirmed the identification of each gene using Blast X (Tables 4 and 5).

We analysed globally the gene expression profiling by researching the biological signification of the transcriptomics data. In this context, we clustered the different genes (except the 5 “unknown” genes) using KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – nomenclature. As shown in Fig. 1, the majority of the differential genes coded for proteins involved in hepatic intermediary metabolism especially in lipid, protein and energy metabolism.

Table 6

Selected genes analysed by real time PCR: effect of dietary fish oil removal. Statistical differences in gene expression between samples were evaluated in group means by randomisation tests (Pfaffl et al., 2002) using REST[©] software: down and up regulation means that the target gene is expressed at a lower or higher level, respectively

Gene	Fold-regulation	P-values	CV HL (%)	CV LL (%)
<i>Up-expressed genes in microarrays</i>				
Fatty acid synthase	+3.8	$P=0.001$	1.4	0.7
Elongation of very long fatty acid protein	+2.0	$P=0.001$	1.0	1.1
Long-chain fatty acid-CoA ligase	+1.8	$P=0.005$	1.9	0.2
<i>Down-expressed genes in microarrays</i>				
Acyl-CoA oxidase	-1.7	$P=0.003$	0.2	0.3
Fatty acid-binding protein	-1.3	$P=0.03$	0.7	0.7
Cytochrome <i>c</i> oxidase polypeptide II	-1.3	$P=0.006$	0.9	1.2
Ubiquitin-E2-protein ligase	-1.5	$P=0.004$	1.2	0.7
Proteasome-subunit $\alpha 3$	-1.5	$P=0.02$	1.5	1.9

Transcript level of target genes normalised with EF1 α expressed transcripts.

Following the transcriptomics analysis and to confirm our data using higher number of individuals per group ($n=6$) than with microarray studies, we performed highly specific and sensitive real time RT-PCR (Rajeevan et al., 2001). We focused our study specifically on genes involved in hepatic metabolism because it is the main expected target to nutritional status (Table 6). As expected, analysis of gene expression by real time PCR showed that the removal of dietary fish oil is associated with (i) induction of metabolic steps involved in lipid biosynthesis (fatty acid synthase) and lipid metabolism – biosynthesis of polyunsaturated fatty acids (elongation of very long fatty acid, long-chain fatty acid-CoA ligase, desaturase) ($P < 0.05$, REST analysis); (ii) inhibition of lipid catabolism (acyl-CoA oxidase, fatty acid-binding protein) ($P < 0.05$, REST analysis). We observed also an inhibition of gene expression for energy metabolism (cytochrome *c* oxidase) and for proteasomal-dependant proteolysis (ubiquitin ligase enzyme and proteasome subunit) in fish fed without fish oil ($P < 0.05$, REST analysis).

4. Discussion

Given the global context of a scarcity of fish oil (New and Wijkstroem, 2002) there is currently much focus on dietary fish oil levels as well as on alternatives to fish oil. In this study, we initiated a nutrigenomic approach to obtain an overview of the consequences on rainbow trout liver of dietary changes using a specific rainbow trout cDNA microarray spotted with 9023 annotated cDNAs. Irrespective of the diets, hybridisation of hepatic RNAs with microarrays showed highly expressed genes such as serum albumin, serotransferin and cytochrome *c* oxidase (data not shown). Only 41 genes were found to be statistically differentially expressed between livers of fish fed with or without fish oils. The relatively low number of variable genes may be explained by two non exclusive reasons. Firstly, we used a generic multi tissue microarray spotted with numerous genes which are not specific to the hepatic tissue alone. Secondly, the dietary treatments did not lead to major effects in fish liver: indeed, in our previous analysis using a candidate gene approach we observed only relatively few genes which were differentially expressed in liver between fish fed with or without added fish oil (Ducasse-Cabanot et al., 2007).

Among the 41 differentially expressed genes, some were involved in genetic information and environmental processing (mainly for membrane transporters of nutrients), the others having active roles in intermediary metabolism. The decrease lipid intake in trout fed diet LL was associated with apparent lower capacity of fatty acid transport as confirmed by real time RT-PCR analysis with the FABL gene expression. Original data obtained here on other differentially expressed genes involved in amino acid/ion transport, cell motility, transcription, signal transduction suggest for example an increased apoptosis and a decreased hepatic cell proliferation: further studies are needed to explain these observations.

The post-transcriptomic analysis on hepatic intermediary metabolism shows that the major part of the differentially expressed genes between HL and LL fish are involved in intermediary metabolism: fatty acid metabolism, protein metabolism and energy metabolism. We confirmed some of these data using specific real time PCR with a higher number of individuals per dietary groups. Decreased gene expression for proteins involved

in energy metabolism such as cytochrome *c* oxidase polypeptide II in fish fed without fish oil is in agreement with data by Salem et al. (2007) who showed this protein to be highly dependent on nutritional status, being induced in refed rainbow trout compared to fasted trout.

Removal of dietary fish oil was associated with either higher mRNA levels of fatty acid synthase and long-chain fatty acid-CoA ligase or with lower mRNA level of acyl-CoA oxidase. These data suggest that lower lipid intake induced higher capacity of fatty acid biosynthesis and lower capacity of fatty acid catabolism in the liver. This is very similar to what is known both in mammals and fish that an increased dietary fat level represses hepatic lipogenesis, PUFA biosynthesis and increases lipid oxidation (Sargent et al., 2002). This has been confirmed also through transcriptomic analysis in fish and mammals (Jordal et al., 2005; Berger et al., 2006). Intriguingly, previous FAS gene expression analysed by qRT-PCR with the same samples was not differentially expressed between HL and LL diet fed fish (Ducasse-Cabanot et al., 2007). However, the new primer pair used to amplify FAS gene was chosen inside the sequence of the FAS cDNA clone spotted on the microarrays (tcab0001c.e.06_5.1.om.4.: <http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/index.html>): it corresponds to the 3' sequence of the gene which does not overlap the FAS partial cDNA (tcaa0001c.m.06_5.1.om.4; <http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/index.html>) previously used by Richard et al. (2006). Thus, these data suggest the existence of a second FAS gene with different nutritional regulation in rainbow trout liver. This existence of a FAS paralogous gene in rainbow trout is not surprising due to the recent duplication of the salmonid genome (Taylor et al., 2003).

Reduced fish oil intake was also linked with decreased expression of factors involved in hepatic proteasomal dependent proteolysis (proteasome-subunit alpha3 and ubiquitin protein ligase genes). This is indeed novel information providing support to the usefulness of the transcriptomic approach. Since the protein and carbohydrate intakes were similar, hepatic protein degradation can be ascribed only to the change in fat intake, leading to a reduced digestible energy. This consequently increases the use of amino acids as an energy source, a phenomenon well described in most teleosts (Dabrowsi and Guderley, 2002). Such a regulation of one nutrient metabolism by another has also been suggested in another study with trout showing that gluconeogenesis seems to be more efficiently regulated by dietary protein than by dietary carbohydrate (Kirchner et al., 2003). Given the high protein requirement of fish, there is definitely more need for understanding the role played by dietary amino acids in different metabolic pathways.

5. Conclusion

The nutrigenomic approach used here has disclosed several new factors involved in the relationship between nutrients and gene expression. In the context of developing novel diets in aquaculture, this molecular approach indeed offers further opportunities to discover new potentially useful molecular markers for identifying nutrient-gene interactions.

Acknowledgements

S.D-C. was supported by a post-doctoral INRA grant (2003–2005). The financial assistance to one of the Authors (PPS) from Department of Biotechnology (DBT), New Delhi, India for Overseas Associateship – 2004 – 05 (Short term) is gratefully acknowledged. This work was financed by AGENAE French programme (Analyse du GENome des Animaux d'Élevage), CIPA (Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture), OFIMER (Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture), and Aquitaine Region (n°CCRRDT-20051303004AB). We acknowledge M. Nocol, C Vachot, and MJ Borthaire for their excellent technical assistance. We thank F. Terrier, Y. Hontang and F. Sandres for preparation of diets and rearing fish in INRA experimental farm (Donzacq, Landes, France).

References

- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131, 1535–1543.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 132, 222–230.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Henderson, R.J., Dick, J.R., Crampton, V.O., 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J. Nutr.* 133, 2793–2801.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2004. Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: tailoring flesh fatty acid composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids* 39, 223–232.
- Berger, A., Roberts, M.A., Hoff, B., 2006. How dietary arachidonic- and docosahexaenoic-acid rich oils differentially affect the murine hepatic transcriptome. *BMC Lipids Health Dis.* 5, 1–26.
- Bourre, J.M., 2005. Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health. Aging* 9, 31–38.
- Dabrowsi, K., Guderley, H., 2002. Intermediary metabolism. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, Third edition. Academic Press, San Diego, pp. 309–365.
- Didier, G., Brezellec, P., Remy, E., Henaut, A., 2002. GeneANOVA – gene expression analysis of variance. *Bioinformatics* 18, 490–491.
- Ducasse-Cabanot, S., Zambonino-Infante, J., Richard, N., Medale, F., Corraze, G., Mambriani, M., Robin, J., Cahu, C., Kaushik, S., Panserat, S., 2007. Reduced lipid intake leads to changes in lipid digestive enzymes in the intestine but has minor effects on key enzymes of hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal* 1, 1272–1282.
- Govoroun, M., Le Gac, F., Guiguen, Y., 2006. Generation of a large scale repertoire of expressed sequences tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* 7, 196–203.
- Ismail, H.M., 2005. The role of omega-3 fatty acids in cardiac protection: an overview. *Front. Biosci.* 10, 1079–1088.
- Jordal, A.O., Torstensen, B.E., Tsoi, S., Tocher, D.R., Lall, S.P., Douglas, S.E., 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Nutr.* 135, 2355–2361.
- Kause, A., Tobin, D., Houlihan, D.F., Martin, S.A., Mäntysaari, E.A., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006a. Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection: different genetic potential on alternative diets. *J. Anim. Sci.* 84, 807–817.

- Kause, A., Tobin, D., Dobby, A., Houlihan, D., Martin, S., Mäntysaari, E.A., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006b. Recording strategies and selection potential of feed intake measured using the X-ray method in rainbow trout. *Genet. Sel. Evol.* 38, 389–409.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274.
- Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391–404.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 133, 2561–2564.
- Olsvik, P., Lie, K., Jordal, A., Nilsen, T., Hordvik, I., 2005. Evaluation of potential reference genes in real time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.* 17, 6–21.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Libchenko, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Nettleton, J., Katz, R., 2005. n-3 polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *Am. Diet. Ass.* 105, 428–440.
- New, M.B., Wijkstroem, U.N., 2002. Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds. Further thoughts on the fishmeal trap. *FAO Fish. Circ.* 975 61 pp.
- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldif, M., Bernard, K., Naquet, P., Jordan, B., 1995. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 29, 207–216.
- Panserat, S., Perrin, A., Kaushik, S., 2002. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout. *J. Nutr.* 132, 137–141.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 9–36.
- Rajeevan, M.S., Ranamukhaarachchi, Vernon, S.D., Unger, E.R., 2001. Use of real-time PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 25, 443–451.
- Rexroad, C.E., Lee, Y., Keele, J.W., Karamycheva, S., Brown, G., Koop, B., Harg, S.A., Palti, Y., Quackenbush, J., 2003. Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index. *Cytogenet. Genome Res.* 102, 347–354.
- Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S., Corraze, G., 2006. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effects on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout. *Br. J. Nutr.* 96, 299–309.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad III, C.E., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8, 328.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, Third edition. Academic Press, San Diego, pp. 181–258.
- Sitja-Bobadilla, A., Pena-Llopis, S., Gomez-Requeni, P., Medale, F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400.
- Stubhaug, I., Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Torstensen, B.E., 2005. Fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocytes and influence of vegetable oil. *Biochim. Biophys. Acta* 173, 277–288.
- Taylor, J.S., Braash, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2003. Genome duplication, a trait shared by 22 000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* 13, 382–390.
- Torstensen, B.E., Lie, O., Froyland, L., 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35, 653–664.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, O., Sargent, J.R., 2005. Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar*) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10166–10178.
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish. Sci.* 63, 258–266.

Résumé : Déterminisme nutritionnel et génétique de la teneur en lipides musculaires chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) : étude par analyse de l'expression de gènes candidats, du protéome et du transcriptome du foie et du muscle

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'identifier les mécanismes majeurs intervenant dans la régulation de l'adiposité musculaire chez la truite arc-en-ciel. Pour cela, nous avons analysé les effets combinés de la sélection génétique et de l'alimentation, facteurs prépondérants de variation de l'adiposité. Deux lignées de truites arc-en-ciel sélectionnées sur la teneur en lipides du muscle dorsal ("muscle gras" et "muscle maigre"), ont été nourries pendant 6 mois avec un régime contenant 10 ou 23% de lipides (% de la matière sèche). Nous avons mesuré l'activité et/ou l'expression d'enzymes clé des principales voies métaboliques intervenant dans l'utilisation de l'énergie, puis développé une analyse différentielle globale à l'échelle du transcriptome (microarray nylon) et du protéome (électrophorèse bidimensionnelle). Ces analyses portent sur le muscle blanc, tissu cible de la sélection, et le foie, carrefour métabolique et site majeur de la lipogenèse chez les poissons. Les résultats obtenus confirment l'effet inhibiteur d'un apport alimentaire riche en lipides sur la lipogénèse et la désaturation des acides gras dans le foie, déjà observé chez des individus de plus grande taille, et fournissent de nouvelles connaissances sur l'effet exercé sur les autres voies, en particulier la protéolyse. Ces analyses ont également permis de mettre en évidence des différences métaboliques existant entre lignées, qui concernent non seulement le métabolisme des lipides mais aussi celui des autres substrats énergétiques. Il apparaît que les deux moyens utilisés pour augmenter la teneur en lipides du muscle mettent en jeu des mécanismes moléculaires différents. Nos travaux ont permis d'identifier deux gènes dont l'expression est augmentée dans le muscle en réponse à un apport alimentaire riche en lipides et par la sélection génétique en faveur d'un indice d'adiposité musculaire élevé, et qui pourraient être des marqueurs moléculaires de l'adiposité musculaire.

Mots clé : truite arc-en-ciel, apport énergétique alimentaire, sélection génétique, transcriptome, protéome.

Abstract : Nutritional and genetic determinism of muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : gene candidates, proteome and transcriptome analysis of liver and muscle

The objective of the study was to identify genes and proteins that are involved in the control of muscle fat deposition in rainbow trout. We analyzed the combined effects exerted by genetic selection and dietary treatment, which are the two main factors that can be used to manage body fat content. Two lines of rainbow trout, obtained after 3 generations of divergent selection for high or low muscle fat content, were fed diets containing either 10% or 23% lipids (% dry matter), for six months. We analyzed the activity and gene expression of key enzymes involved in energy utilization, and performed a more global approach through transcriptome (nylon microarray) and proteome (two-dimensional electrophoresis) analysis. We analyzed the liver, which is the centre of intermediary metabolism and the main site of lipogenesis in fish, and the muscle, the target tissue of the selection procedure. The results confirmed the depressing effect exerted by a lipid rich diet on lipogenesis and fatty acid desaturation, already described in larger size fish, and provided new insight about the effect exerted on the other metabolic pathways, in particular the proteolysis. These analyses pointed out metabolic differences existing between lines. They involved not only lipid metabolism, but also the other pathways of nutrient utilization. With regard to their muscle-fattening effect, the dietary treatment and the genetic selection appear to act through different molecular mechanisms. These analyses allowed the identification of two genes that are over-expressed in muscle upon both high dietary lipid supply and upward selection for muscle fat content, suggesting that these two genes could be relevant molecular markers of muscle fattening.

Key words: Rainbow trout, dietary energy, selective breeding, transcriptomics, proteomics