

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE-BREST

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Discipline : Biologie marine

Marie VAGNER

Soutenue le 7 juillet 2008

**Orientation des processus métaboliques du bar européen
(*Dicentrarchus labrax*) par un conditionnement nutritionnel au
stade larvaire**

JURY

Jacques DELARUE	Professeur, Université de Bretagne occidentale	Rapporteur
Michel MATHIEU	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Jean LAROCHE	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Douglas TOCHER	Directeur de recherche, Université de Stirling	Examineur
Chantal CAHU	Directeur de recherche, Ifremer-Brest	Examineur
Jeannine PERSON	Directeur de recherche, Ifremer-Brest	Directrice de thèse

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE-BREST

Ecole doctorale des sciences de la mer

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Discipline : Biologie marine

Marie VAGNER

Soutenue le 7 juillet 2008

**Orientation des processus métaboliques du bar européen
(*Dicentrarchus labrax*) par un conditionnement nutritionnel au
stade larvaire**

JURY

Jacques DELARUE	Professeur, Université de Bretagne occidentale	Rapporteur
Michel MATHIEU	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Jean LAROCHE	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Douglas TOCHER	Directeur de recherche, Université de Stirling	Examineur
Chantal CAHU	Directeur de recherche, Ifremer-Brest	Examineur
Jeannine PERSON	Directeur de recherche, Ifremer-Brest	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens en tout premier lieu à remercier l'INRA et l'Ifremer d'avoir financée cette thèse.

Je remercie également vivement Chantal Cahu et Vincent Buchet pour leur accueil dans la laboratoire.

Je remercie chaleureusement et exprime ma très vive reconnaissance à ma directrice de thèse, Jeannine Person-Le Ruyet, pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Sans toi, tout ceci aurait été impossible. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire et de mener à bien ce sujet de thèse. Merci aussi pour ta grande qualité d'encadrement au quotidien, ton amour de la recherche qui n'a fait qu'accroître le mien. Merci aussi pour ta gentillesse et ta générosité.

Je remercie également mes co-encadrants, José Zambonino et Jean Robin qui m'ont été tous les deux d'une grande aide pour la bio mol et l'analyse des lipides. J'étais novice en arrivant au laboratoire et vous m'avez appris beaucoup (je peux même dire tout). Merci pour votre patience.

Je tiens également à remercier tous les techniciens du laboratoire ARN qui m'ont beaucoup soutenue et appris pendant ces années. Marie Mad, merci pour ton aide précieuse en enzymo et bio mol, tu m'as tout appris !! Patrick et Nicolas, merci pour m'avoir tant aidé pendant les élevages, Hervé merci de m'avoir aidé au dosage des lipides. Cricri et Babeth, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci aussi à tous pour l'aide aux astreintes ! Et Jacques, je ne t'oublie pas, tu as été mon assistance informatique pendant mes premières années (posters, photos), j'espère que l'on se recroisera un jour ! Merci aussi à Magalie Hervy, elle comprendra ...

Je souhaite exprimer mes remerciements les plus sincères et mon amitié à Armelle Sévère pour son aide plus que précieuse sur les dosages physiologiques, celui de la si fameuse delta-6 désaturase. Je te remercie également pour tous les services que tu as pu me rendre et pour tous les bons moments partagés au labo et en dehors !

Merci aussi à Joel, Marc, Marie-Françoise et Marie-Hélène pour leurs coups de pouce. Merci également à Yvette qui sait toujours dépanner les gens quand il le faut et qui en plus le fait

avec un énorme sourire !! Merci aussi à David qui m'a tant aidée en bio mol, pour mon manuscrit, ma soutenance, et Marie Curie !!!! Merci à tous les stagiaires, post-docs et thésards que j'ai pu croiser dans le laboratoire ARN et avec qui j'ai toujours partagé de bons moments : Yann, Laure, Stéphanie, Nacho, Florian, Dora, Emeline, Roseline, Marie, Julien, Olivier, Flavia, Maria, Ester, Gabriella, Francesco...

Je remercie aussi très chaleureusement mes voisins de palier, les gens du laboratoire LPI qui m'ont beaucoup soutenue et aidée pendant ces années : Elo, Arnaud et Caro, Jean-Yves, Virgile, Olivier (je te mets chez les mollusques, tu m'en voudras pas ?), Jeanne, Catherine, Jean-Louis, Véronique, Fathia, JF, Matthieu, Afi, Pierre et JR le jeune retraité. Je remercie tout particulièrement Arnaud, Jeanne et Charlotte de m'avoir aidée dans la préparation de ma soutenance. Merci aussi Charlotte de m'avoir si bien conseillée pour mon manuscrit alors que nous nous connaissions à peine ! Merci aussi à Claudie et Philippe pour leur gentillesse. Je n'oublie pas non plus ceux qui sont partis mais qui sont maintenant devenus des amis : merci Hélène et Yannick, j'espère que nos chemins se recroiseront un jour... Bonne chance à vous pour la suite !! Je pense aussi à tous les gens de passage dans ce « labo du haut » : Renée, Rozen, Gaspard, Marie, Olivier, Romain et bien sur sans oublier ma petite Jeannette !

Je remercie très profondément tous mes voisins de couloir ou de café qui sont devenus si chers : Hélène, tu es la première concernée, et je parle au sens propre !!! Tu nous manques terriblement et j'espère que l'on se retrouvera un jour quelque part... ma petite Clairette, ma copine de cantine et de pause café « d'en bas avec du coca », Clem mon « covoitureur » et mon compagnon de bus maintenant (vive la baisse du pouvoir d'achat !), mon nicokolo, ah il s'en est passé des choses en trois ans et demi !!! Merci aussi à Vincent Bernard number one, le premier que j'ai connu ici, mon fil rouge, qui disparaît de temps à autre mais qui est finalement toujours présent... Ma petite Elo, ma compagne de pause, ma petite huitre fragile, je te souhaite une bonne fin de thèse et plein de bonnes choses pour la suite !!!!

Je remercie aussi tout ceux que j'ai rencontré ici, à l'Ifremer, et avec qui j'ai partagé de supers moments au labo mais aussi en dehors. Mes années de thèse auraient été beaucoup plus tristes sans vous : Jeffoune (vivent tes Jeffoune jokes!!), Xav, Cam & O les rois de la pétanque, Manu, Cécile la Grande et Cécile la Ptite, Fabien, Haza, Vincent Bernard number two, Marie la rouge, Gael, Emilaye, Hélo, Vaness, Karine, Armel, Les Claire's, Guillaume, Nico Job, Erwan, Anthony, mais aussi Christophe et Xav Mopperec..... Merci aussi à tous les autres membres du clan brestois, et pas des moindres: Romain et Charlotte, Emilie et Arnaud,

Guillaume, Sarah, mais aussi Steeve le roi des lions, Cedric avec un C, j'espère qu'on se paiera encore de bonnes tranches de rigolade !!

Mon parcours n'aurait jamais été celui qu'il a été sans mon DEA, et surtout sans les gens avec qui je l'ai partagé : D'abord Christel Lefrançois et l'ensemble du labo de Sardaigne qui m'ont soutenue pour faire cette thèse et qui me soutiennent encore !! Et bien sur, je remercie aussi les bras cassés du DEA EDEL, les meilleurs scientifiques du monde!! Je remercie très chaleureusement les fondateurs de ce DEA de nous avoir donné la chance de nous rencontrer et d'avoir puisé si loin dans la liste d'attente !! Merci aux bras cassés de m'avoir entourée, soutenue, nos liens se renforcent d'années en années, et c'est trop bon !!! Merci Thomas de m'avoir présenté Hélène, Merci Pierre-Yves de tous nous réunir si régulièrement, tu vas nous manquer ! Merci Yo et Aline d'être si présents alors que vous êtes si loin, Merci ma ptite Sof de ta bonne humeur et de ta présence si chère, Merci aussi à Montep d'assurer notre descendance, heureusement que t'es là ! Merci à Gael d'être si accueillant malgré la distance et à bientôt sur ton caillou !! on a qu'une envie, c'est de revenir !!! Merci à Hélène et Yann les martiniquais, à Laure la kanak (je crois que depuis le temps que t'y es, on peut extrapoler..hiihihi), et Au, on ne t'oublie pas non plus !!!!

Je remercie également très chaleureusement mes amis de toujours qui me suivent et me supportent sans faillir depuis des années: Stephou, Charlo et Pierrot, sans oublier ma Delphinette, celle qui est toujours là depuis...disons.....25 ans !!!! J'espère que ça continuera encore !!!!

Bien sur, je remercie très vivement mes parents, mon frère mais aussi tout le reste de ma famille qui reste toujours unie et qui me soutient depuis toujours...

Enfin, l'incoutournable, Monmatthieu, celui qui a et me donne toujours confiance en moi.

« *Jette le chanceux dans la rivière et il en ressortira avec un poisson dans la bouche* »

Proverbe arabe

SOMMAIRE

Avant-propos	1
Introduction générale et objectifs.....	3
I. Le contexte de la thèse	4
I.1. L'aquaculture	4
I.1.1. Le développement de l'aquaculture	4
I.1.2. L'aquaculture du bar européen.....	4
I.1.3. La problématique aquacole : la substitution des produits d'origine marine.....	5
I.2. Les écloseries	7
I.2.1. Le développement des larves de bar.....	7
I.2.2. La nutrition des larves	9
I.2.3. La température d'élevage	11
II. Le métabolisme lipidique.....	12
II.1. La définition des lipides	12
II.2. Le rôle des lipides dans l'organisme	13
II.3. L'importance des HUFA n-3 et HUFA n-6.....	14
II.3.1. L'acide docosahexaénoïque DHA (22 :6n-3)	15
II.3.2. L'acide écosapentaénoïque EPA (20 :5n-3).....	15
II.3.3. L'acide arachidonique AA (20 :4n-6).....	16
II.3.4. L'expression des besoins en HUFA n-3 et n-6	16
II.4. La synthèse des HUFA : le rôle de la delta-6 désaturase	17
II.5. La régulation de la synthèse des HUFA	19
II.5.1 Régulation de la synthèse des HUFA par la $\Delta 6D$	19
II.5.2. Régulation de la synthèse des HUFA par rétrocontrôle.....	21
II.5.3. Régulation de la synthèse des HUFA par la température	21
III. Le concept de programmation métabolique : une solution possible.....	23
III.1. Définition de la programmation métabolique	23
III.2. Application du concept chez les poissons marins	24
IV. Les objectifs de la thèse	24

Chapitre I : Impact d'un conditionnement nutritionnel et thermique des larves sur le développement larvaire et sur les capacités d'adaptation des juvéniles à un aliment carencé en HUFA n-3.....	27
--	-----------

Objectifs.....	28
-----------------------	-----------

Partie 1 : Effets de la teneur en HUFA n-3 de l'aliment sur le développement larvaire selon la température d'élevage.....	29
--	-----------

Résumé.....	30
-------------	----

 Article 1 : Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass

(<i>Dicentrarchus labrax</i>) larvae development.....	32
---	----

Partie 2 : Capacité d'adaptation des juvéniles à un aliment carencé en HUFA n-3 selon le conditionnement nutritionnel et thermique des larves.....	45
---	-----------

Résumé.....	46
-------------	----

 Article 2 : Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage ?.....	48
--	----

Chapitre II : Essai d'amplification des mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles de bar par un challenge expérimental sévère.....	59
---	-----------

Objectifs.....	60
-----------------------	-----------

Partie 1. Effets d'un challenge expérimental sévère sur l'amplification des mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles.....	61
---	-----------

Résumé.....	62
-------------	----

 Article 3 : Life-lasting effects of early feeding of sea bass (*D. labrax*) larvae with a range of dietary n-3 HUFA levels on the functioning of PUFA desaturation pathways

.....	64
-------	----

Partie 2. Dosage enzymatique de la delta-6 désaturase.....	95
---	-----------

1. Introduction	96
------------------------------	-----------

2. Matériels et méthodes	96
2.1. Animaux et conditions d'élevage.....	96
2.2. Prélèvements	97
2.3. Dosage de l'activité de la $\Delta 6D$	97
2.3.1. Préparation des microsomes	97
2.3.2. Dosage de la $\Delta 6D$	98
Préparation des esters méthylés d'acides gras (FAME).....	98
Autoradiographie.....	99
2.4. Quantification des protéines.....	100
2.5. Analyse des résultats	100
3. Résultats-Discussion	101

Chapitre III - -Discussion générale	105
--	-----

I. L'effet du conditionnement sur le métabolisme lipidique des larves	108
II. Effet du conditionnement nutritionnel larvaire sur le métabolisme lipidique des juvéniles	117
III. Régulation du métabolisme lipidique des larves et des juvéniles de bar	123
IV. Contribution supplémentaire à l'étude des besoins en HUFA n-3 du bar	132
IV.1. Estimation des besoins en HUFA n-3 des larves de bar	132
IV.2. Les besoins des juvéniles	136

Conclusions-Perspectives	141
---------------------------------------	-----

Références bibliographiques	145
--	-----

Annexes	165
----------------------	-----

Annexe 1 : Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	166
Annexe 2 : Protocole de préparation du substrat radioactif FAF-BSA.....	167
Annexe 3 : Protocole de préparation du milieu d'incubation.....	168
Annexe 4 : Méthodologie.....	169

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA arachidonic acid
ADN acide désoxyribonucléique
ADNc acide désoxyribonucléique complémentaire
AG acide gras
AGLPI acide gras polyinsaturés
AL acide linoléïque
ALN acide linoléinique
ANOVA variance analysis
AOAC Association of official analytical chemists
ARNm acide ribonucléique messenger
ARNtot acide ribonucléique messenger totaux
BHT butylated hydroxytoluene
BSA bovine serum albumine
C control
C1 premier conditionnement larvaire testé
C18 18 carbon-chain
C2 second conditionnement larvaire testé
C20 20 carbon-chain
C22 22 carbon-chain
cDNA complementary desoxyribonucleic acid
CPM coups par minute
CPSP fish protein hydrolysate
CT cycle threshold
D day
DGI daily growth index
DHA docosahexaenoic acid
DM dry matter
DO densité optique
DPM désintégrations par minute
DR-1 direct repeat-1 element
E efficiency/ efficacité
E1 experience 1

E2 experience 2

EDTA acide éthylène-diamine-tétraacétique

EF1 elongation factor 1

EPA ecosapentaenoic acid

FA fatty acid

FAF free fatty acid

FAME fatty acid methyl ester

FAO Food and Aquaculture Organisation

FCR food conversion rate

FI feed intake

Fig. figure

FW fresh weight

GLC gas liquid chromatography

H hour

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HH high HUFA n-3

HH_I larval groups fed the HH diet

HH_{2C} pre-conditionned juveniles with the HH diet during the larval stage, and then fed the control diet during the juvenile period

HH_{2R} pre-conditionned juveniles with the HH diet during the larval stage, and then fed the HUFA-restricted diet during the juvenile period

HNF hepatocyte nuclear factor

HPLC high performance liquid chromatography

HUFA highly unsaturated fatty acid

J jour

L:D light:dark

LAP leucine-amino peptidase

Leu-ala Leucine-alanine

LH low HUFA n-3

LH_I larval groups fed the LH diet

LH_{2C} pre-conditionned juveniles with the LH diet during the larval stage, and then fed the control diet during the juvenile period

LH_{2R} pre-conditionned juveniles with the LH diet during the larval stage, and then fed the HUFA-restricted diet during the juvenile period

LN lipides neutres
LT lipides totaux
LXR liver X factor
mRNA messenger ribonucleic acid
MS matière sèche
MUFA mono-unsaturated fatty acid
NL neutral lipid
NRC national research council
NS non significatif statistiquement
OFIMER Office National Interprofessionnel des produits de la MER
PA phosphatase alcaline
PCR polymérase chain reaction
PL polar lipid or phospholipid
PLA2 phospholipase A2
PPAR peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE peroxisome-proliferator-response element
PUFA poly-unsaturated fatty acid
QR qualitative reference
R restricted
R1 challenge des juvéniles issus du premier conditionnement testé (C1)
R2 challenge des juvéniles issus du second conditionnement testé (C2)
RE reticulum endoplasmique
RP-HPLC reverse phase-ion high performance liquid chromatography
rpm rotation par minute
RT-PCR real-time polymérase chain reaction
RXR retinoid X receptor
SE standard error
SFAM Syndicat Français de l'Aquaculture Marine
SGR specific growth rate
SRE sterol regulatory element
SREBP sterol regulatory element binding protein
SREBP M protéine sterol regulatory element binding protein mature
SREBP P protéine sterol regulatory element binding protein précurseur
TL total lipid

TLC thin-layer chromatography

UK United Kingdom

v/v volume/volume

W weight

WW wet weight

XH extremely high HUFA n-3

XH_I larval groups fed the XH diet

XH_{2C} pre-conditioned juveniles with the XH diet during the larval stage, and then fed the control diet during the juvenile period

XH_{2R} pre-conditioned juveniles with the XH diet during the larval stage, and then fed the HUFA-restricted diet during the juvenile period

XLH extremely low HUFA n-3

XLH_I larval group fed the XLH diet during the larval stage

XLH_{2C} pre-conditioned juveniles with the XLH diet during the larval stage, and then fed the control diet during the juvenile period

XLH_{2R} pre-conditioned juveniles with the XLH diet during the larval stage, and then fed the HUFA-restricted diet during the juvenile period

Δ 5D delta-5 désaturase

Δ 6D delta-6 désaturase

AVANT-PROPOS

En aquaculture, l'alimentation des poissons carnivores est actuellement assurée par des aliments incorporant majoritairement des farines et huiles de poisson, issues de la pêche minière. Le fort développement de la pisciculture aux niveaux européen et mondial en même temps que la stagnation, voire la raréfaction des stocks naturels de poissons rendent indispensable la recherche de substituts aux farines et huiles de poisson. L'utilisation de protéines animales terrestres n'étant plus autorisée depuis 2000 (Arrêtés des 14 novembre 2000 et 13 février 2001), les produits d'origine végétale (protéines et huiles) constituent actuellement la meilleure alternative en Europe, même s'ils ne permettent pas de couvrir tous les besoins des poissons marins, notamment en acides gras polyinsaturés ou HUFA n-3 (Highly Unsaturated Fatty Acids n-3 : EPA et DHA). Par ailleurs, essentiellement pour des raisons économiques, les larves sont élevées en éclosérie à des températures plus élevées que celles rencontrées dans le milieu naturel. Ceci accélère la croissance mais peut avoir pour conséquence d'affecter les capacités d'adaptation du poisson à des aliments élaborés à partir de matières premières végétales. Il serait intéressant d'un point de vue économique et écologique de pouvoir disposer de poissons marins pouvant mieux utiliser des aliments intégrant majoritairement des matières premières d'origine végétale. Une solution envisageable serait d'orienter de façon durable les processus métaboliques des adultes par un conditionnement spécifique dès les stades précoces, décrit sous le terme de « programmation métabolique » chez les mammifères. Ce concept se définit comme un processus adaptatif au niveau cellulaire, moléculaire et biochimique, intervenant à une période critique du développement de l'organisme. De nombreuses études ont déjà montré que les conditions d'élevage déterminent chez les larves la vitesse de développement et d'acquisition des fonctions physiologiques, les performances de croissance mais aussi leurs caractéristiques morphologiques et leur « qualité ». Chez le poisson, il existe très peu d'études concernant l'influence des conditions de vie des larves sur l'appétit des juvéniles à croître et à s'adapter aux conditions d'élevage. L'acquisition des mécanismes adaptatifs se faisant en début d'ontogenèse, il est vraisemblable que l'adaptabilité des juvéniles ou adultes soit modulée par « l'histoire » des larves.

L'objectif de cette thèse est de voir si, par le concept de programmation métabolique, il est possible de produire des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) pouvant mieux utiliser les matières premières végétales en orientant leurs processus physiologiques par un conditionnement larvaire caractérisé par un régime pauvre en HUFA n-3, élaboré à partir de matières premières végétales.

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

I. Le contexte de la thèse

I.1. L'aquaculture

I.1.1. Le développement de l'aquaculture (données FAO, OFIMER, SFAM)

Face à l'augmentation de la demande en produits de la mer et à la stagnation, voire diminution des ressources issues de la pêche, l'aquaculture s'est fortement développée et intensifiée dans presque toutes les régions du monde. En 2004, 43% des 106 millions de tonnes de poissons destinés à la consommation humaine provenaient de l'aquaculture. La contribution de l'aquaculture à l'approvisionnement mondial de poissons, de crustacés, de mollusques et autres animaux aquatiques continue de progresser (de 4% en 1970 à près de 50% actuellement) à un rythme plus rapide que celui des autres secteurs de production animale avec un taux annuel moyen de 8,8% depuis 1970 (2,8% pour les productions de viande d'animaux terrestres). L'augmentation de la production est assurée principalement par l'Asie, et en particulier par la Chine qui couvre plus de 70% de la production mondiale (poissons d'eau douce essentiellement : carpe, tilapia, poissons chats). L'offre mondiale de produits issus de l'aquaculture est passée de 0,7 kg par habitant en 1970 à 7,1 kg en 2004, soit un taux de croissance annuel moyen de 7,1%. En France, la consommation annuelle de poissons était de 24 kg en 2007, dont 11.6 % de poissons d'élevage contre 77% en Chine.

La production mondiale de poissons marins (salmonidés inclus) est passée de 638 000 tonnes en 1950 à 62 millions de tonnes en 2005, soit presque cent fois plus. Les premières productions européennes significatives de poissons marins datent seulement du début des années 80. Les principales espèces élevées sont le saumon atlantique (Norvège, Ecosse, Irlande), le bar et la daurade (Grèce, Turquie, Espagne). En France, la production de poissons marins en 2004 était de 7229 tonnes (47% de bar, 20% de daurade, 13% de turbot et 12% de salmonidés).

I.1.2. L'aquaculture du bar européen

Le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) a été le premier poisson marin à être élevé en Europe en conditions intensives (Barnabé et al., 1976 ; Girin, 1979) et sa production a eu un développement très rapide à partir des années 80, essentiellement sur l'ensemble des côtes

méditerranéennes. En Europe, le cap des 50 000 tonnes a été franchi dès 2000 et 55% des bars consommés proviennent actuellement de l'aquaculture. En France, la production actuelle de bar est de 4 200 tonnes par an, l'essentiel du grossissement se faisant en cages ou en bassins à terre. Cette production est répartie entre une cinquantaine d'entreprises. Une dizaine de ces entreprises est spécialisée en éclosion, 10% d'entre elles générant 80% du chiffre d'affaire annuel (6 millions d'euro). Bien que la France ait mis au point les techniques d'élevage intensif, elle garde une place modeste dans la production de poissons de taille commerciale. Elle est en revanche très bien positionnée sur le marché des juvéniles d'éclosion avec une production d'environ 60 millions d'alevins de bar et daurade par an (27 millions de bar en 2004) dont plus de 60% sont exportés. La production française d'alevins de bar a doublé entre 1996 et 2000 et a presque triplé entre 1996 et 2004, ce qui suit la progression européenne (650 millions d'alevins de bar et de daurade en 2004). Les travaux actuels de recherche en nutrition, mais aussi en génétique et pathologie, s'inscrivent dans un contexte de domestication, de qualité des produits et de durabilité.

Le choix de porter notre étude sur le bar s'explique (i) par l'intérêt économique de cette espèce dans chacune de ses aires de répartition géographique (Méditerranée, Atlantique Nord du Maroc à l'Irlande, Mer du Nord et Mer Baltique), (ii) par la maîtrise de son élevage par rapport à d'autres espèces de poissons marins comme le turbot et (iii) par les connaissances acquises sur la physiologie et la nutrition des larves et des juvéniles par le laboratoire d'accueil (Person-Le Ruyet et al., 1993, Zambonino et Cahu, 1999 ; Cahu et Zambonino, 2001 ; Cahu et al., 2003a, 2003b ; Person-Le Ruyet et al., 2004 ; Skalli et Robin, 2004).

1.1.3. La problématique aquacole : la substitution des produits d'origine marine

Les aliments composés élaborés pour les poissons marins carnivores (poissons d'élevage majoritaires dans les pays occidentaux) sont fabriqués principalement à partir de farines et d'huiles de poisson issus de la pêche minotière (sardines, anchois, etc...). Les stocks naturels de poissons débarqués sont stabilisés autour de 90-93 millions de tonnes par an depuis une vingtaine d'années, dont 60 millions sont utilisés directement pour l'alimentation humaine. Le reste est destiné à l'alimentation animale, dont celle des poissons.

Ainsi, l'aquaculture repose encore essentiellement sur l'utilisation de matières premières d'origine marine. Par exemple, la production d'un kilo de bar d'élevage correspond actuellement à l'utilisation de sept kilos de poissons sauvages (source FAO 2007). De plus, 87% des huiles de poisson sont actuellement utilisées pour l'aquaculture. Cependant, selon certaines prévisions, 90% des huiles de poisson disponibles dans le monde seraient utilisées pour l'aquaculture d'ici 2010 (Barlow, 2000). Ceci conduit inexorablement à utiliser des substituts végétaux qui se différencient des matières premières d'origine marine par leur apport en acides aminés et en acides gras, et notamment par leur teneur en acides gras polyinsaturés à longue chaîne AGLPI ou highly unsaturated fatty acids HUFA (Burel et al., 2000 ; Lodemel et al., 2001, Ringo et al., 2002).

Depuis les vingt dernières années, la substitution totale ou partielle des produits issus de la pêche par des produits végétaux a fait l'objet de nombreuses études chez les poissons (Bell et al., 1985, 1995 ; Parpoura et Alexis, 2001 ; Refstie et Storrebaken, 2001 ; Bell et al., 2001 ; Caballero et al., 2002 ; Regost et al., 2003 ; Skalli et al., 2006).

Alors que les aliments commerciaux incorporent actuellement environ 20% de substituts végétaux (huiles et farines), la recherche a montré que pour la plupart des espèces, une substitution de 75 à 90% des protéines peut être réalisée sans réduire leurs performances d'élevage, sous réserve d'un traitement approprié des matières premières (élimination des facteurs antinutritionnels endogènes), et de l'utilisation de mélanges permettant d'équilibrer les apports en acides aminés (Sitjà-Bobadilla et al., 2005).

L'utilisation des huiles végétales est plus problématique que celle des protéines végétales car les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGLPI ou HUFA) ne se retrouvent qu'à l'état de traces dans les huiles végétales. De plus, les poissons marins ont une faible capacité à convertir en HUFA les acides gras précurseurs à 18 carbones (C18) apportés en grande quantité par les huiles végétales (Sargent et al., 2002). Chez certaines espèces de poisson, l'incorporation d'huile de poisson dans les aliments aquacoles peut être limitée, voire totalement supprimée si l'apport protéique principal est la farine de poisson (dont la fraction lipidique suffit à l'apport en HUFA). Contrairement aux salmonidés, chez le bar juvénile (75g), une substitution partielle (60%) des huiles de poisson par de l'huile de colza induit une diminution significative de la croissance de 6% après 142 jours de substitution, par rapport aux individus nourris à partir d'huiles de poisson (Montero et al., 2005). La composition en acides gras de la chair reflète de façon assez fidèle celle de l'aliment. Comme montré chez le bar (Montero et al., 2005 ; Skalli et al., 2006), le turbot (Regost et al., 2003), la sole

sénégalaise (Morais et al., 2006) et le saumon atlantique *Salmo salar* (Kjaer et al., 2008), l'incorporation d'huiles végétales dans l'aliment entraîne une diminution significative du contenu de la chair en HUFA n-3 chez les poissons. La qualité en HUFA de la chair doit pourtant être sauvegardée pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, notamment pour la protection contre les maladies cardio-vasculaires, le système nerveux et le diabète (Simopolous, 1991 ; Lauritzen et al., 2001 ; Delarue et al., 2003 ; 2004). Chez des bars juvénile (95-200g) nourris avec des aliments élaborés uniquement à partir d'huiles végétales (soja, olive), des symptômes pathologiques tels que des hémorragies et dégénérescences hépatiques et branchiales ont été observés (Parpoura et Alexis, 2001). Chez plusieurs espèces de poissons comme le saumon atlantique et la daurade (*Sparus aurata*), une déficience en HUFA dans l'aliment peut affecter les fonctions immunitaires (Bell et al., 1996a ; Montero et al., 2003 ; Ganga et al., 2005). Les huiles végétales constituent cependant une bonne source d'énergie et permettent, dans certaines limites, de diminuer l'apport en protéines dans l'aliment, contribuant ainsi à diminuer les rejets azotés et phosphorés et à protéger l'environnement.

1.2. Les écloséries

1.2.1. Le développement des larves de bar

Le développement larvaire constitue la phase la plus délicate de l'élevage et c'est au cours de ce stade que le taux de survie est le plus bas (entre 30 et 50% en éclosérie de production). C'est également au cours de ce stade que s'opèrent des changements structuraux, physiologiques, et morphologiques susceptibles de modifier la capacité de l'individu à survivre (Fuiman, 1997). Le développement embryonnaire et larvaire du bar a été décrit pour la première fois en 1976 par Barnabé et al., puis a été complété au fur et à mesure de l'acquisition de nouvelles connaissances sur la mise en place des principales fonctions durant l'ontogenèse (Fig.1) :

- L'œuf éclot environ 4 jours après la fécondation (14-15°C). La larve vit exclusivement de ses réserves vitellines, et le tractus digestif est indifférencié.
- De J0 à J5, la larve continue à vivre exclusivement sur ses réserves vitellines.
- A J5, la bouche s'ouvre, l'alimentation devient mixte (endogène et exogène) et le tube digestif commence à se différencier.

- A J10, la vessie natatoire devient fonctionnelle, ce caractère est utilisé pour évaluer la qualité de la larve.
- A J15, les réserves endogènes sont totalement épuisées et l'alimentation est exclusivement exogène.
- A J25, le pancréas est fonctionnel (activités enzymatiques de la trypsine et de l'amylase stabilisées) et les enzymes digestives spécifiques de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin acquièrent progressivement leur fonctionnalité (niveau de maturité évalué par le ratio phosphatase alcaline/ leucine-aminopeptidase).
- A J43, toutes les fonctions digestives sont matures, toutes les nageoires sont formées à l'exception de la dorsale antérieure, la larve ressemble à un petit adulte qui deviendra progressivement démersal. La métamorphose (physiologique, morphologique et comportementale) est achevée. Cependant, les écailles ne seront visibles qu'autour du 80^{ème} jour.

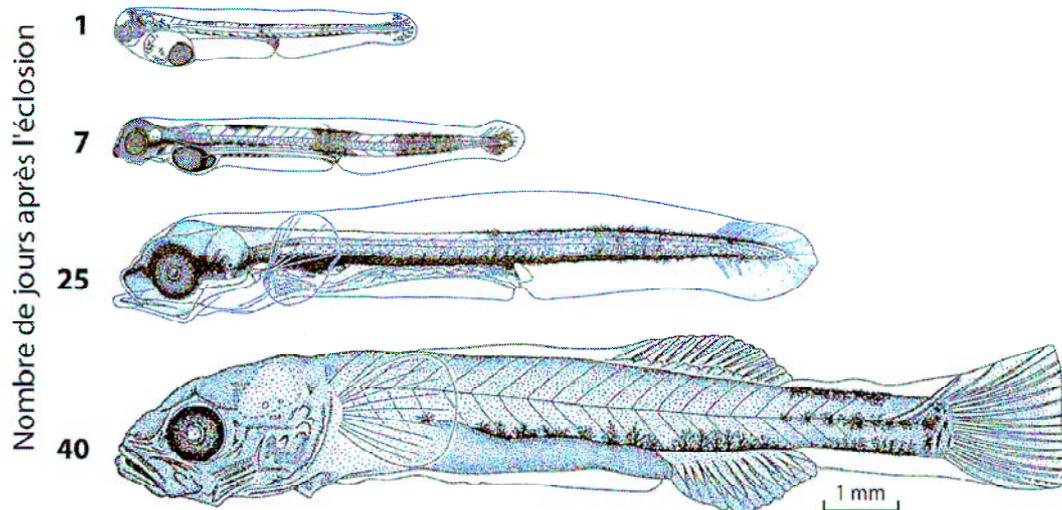


Fig. 1. Larves de bar, *Dicentrarchus labrax*, âgées de 1, 7, 25 et 40 jours (Barnabé et al., 1976).

1.2.2. La nutrition des larves

La mise en place des évènements ontogénétiques est modulée par la qualité et la quantité de l'aliment. Les processus de maturation des enzymes digestives peuvent être stimulés, inhibés ou retardés par la composition du régime alimentaire (Krogdahl et Sundby, 1999 ; Cahu et Zambonino, 1994). L'influence de la composition de l'aliment sur les activités enzymatiques de l'amylase, de la trypsine et de la lipase, ainsi que des enzymes de l'intestin a été montrée chez la larve de bar (Zambonino et Cahu, 1994 ; Cahu et al., 1994 ; Morais et al., 2004). La maturation des entérocytes est par exemple plus précoce avec un régime contenant un taux de lipides supérieur à 20% MS (dont plus de 2.7% d'HUFA n-3) ou des niveaux élevés de di- et tri-peptides.

En raison de leur croissance rapide, les larves ont des besoins très élevés en énergie, apportée en partie par les lipides de l'aliment. Chez les larves de bar, les meilleurs résultats de croissance et de survie ont été obtenus avec un aliment contenant 30% de lipides apportés par de l'huile de foie de morue et de la lécithine de soja (Zambonino et Cahu, 1999). Chez les larves de daurade, le même résultat est obtenu avec seulement 18% de lipides (Sahli et al., 1999). Plusieurs études ont montré que les larves de poissons marins possèdent une meilleure capacité d'assimilation des phospholipides que des lipides neutres (Sahli et al., 1999 ; Izquierdo et al., 2001 ; Cahu et al., 2003b). Chez les larves de morues et de bar, une meilleure croissance ainsi qu'une accélération de la maturation des entérocytes ont été obtenues lorsque les HUFA n-3 étaient apportés à raison de ~2% par la fraction phospholipidique de l'aliment (Cahu et al., 2003b ; Wold et al., 2007). Ces résultats ont permis d'estimer les besoins en phospholipides des larves de poissons marins à environ 10% du poids sec de l'aliment (Sargent et al., 2002 ; Cahu et al., 2003b).

Pendant de nombreuses années, les proies vivantes (rotifères, artémies, copépodes) étaient utilisées pour l'alimentation des larves, mais leur coût élevé et leur difficulté de stockage ont conduit à l'utilisation progressive des aliments inertes (Fig. 2). En laboratoire, l'introduction des aliments inertes dans l'alimentation larvaire s'est faite de plus en plus tôt au cours du développement : J30, J20 (Person Le Ruyet et al 1993), et enfin dès la première alimentation depuis la fin des années 1990 grâce à la mise au point d'un aliment adapté aux capacités digestives des larves (aliment breveté commercialisé sous l'appellation Gemamicro®, Zambonino et Cahu., 1999). Ce progrès en alimentation larvaire rend plus efficace

l'étude des besoins nutritionnels de la larve de bar et d'autres espèces. Contrairement aux proies vivantes, les aliments inertes permettent de formuler des aliments très concentrés et riches en lipides et en protéines. Ils facilitent également l'étude des besoins en certains nutriments en permettant l'incorporation de teneurs différentes en ces nutriments pour étudier leur effet précis sur la physiologie des animaux (effet de la teneur en HUFA, ou des vitamines sur les malformations par exemple ; Villeneuve et al., 2005).

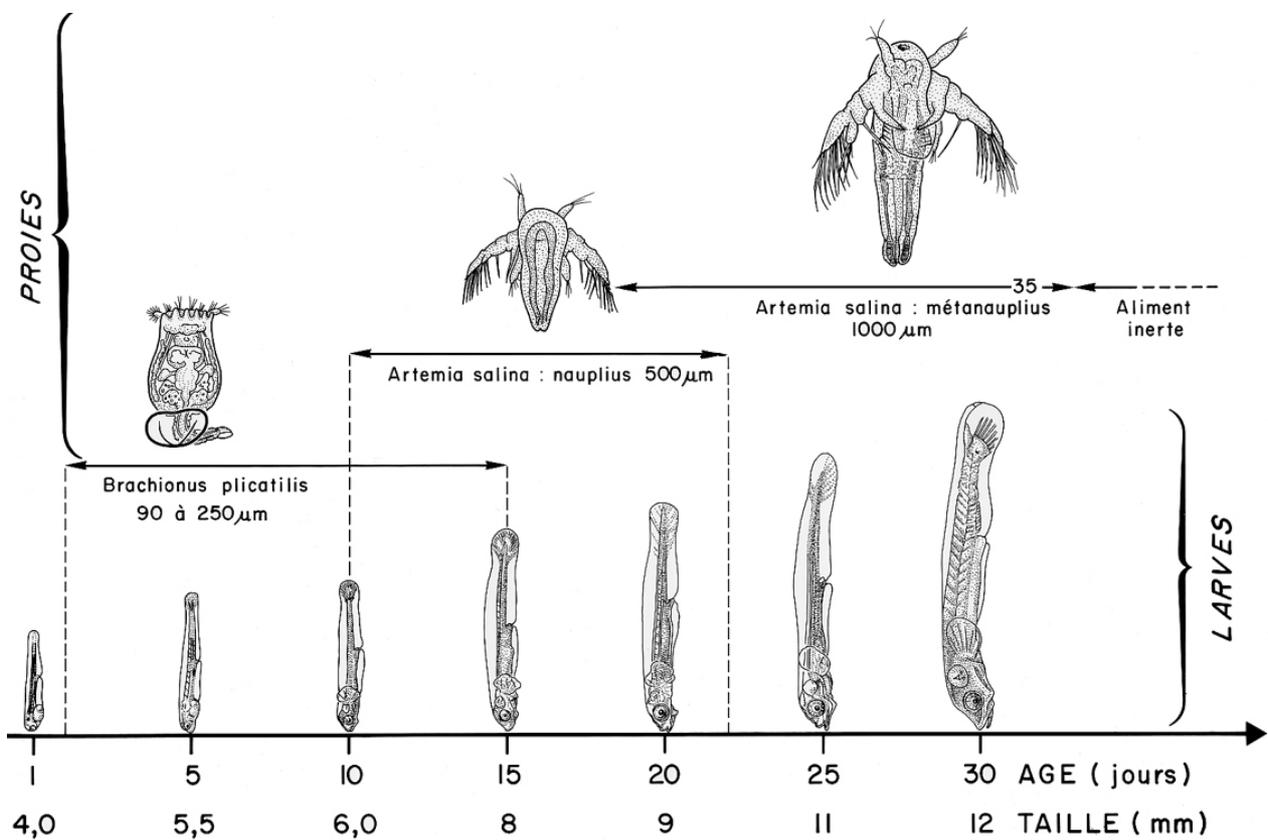


Fig.2. Schéma d'alimentation des larves à partir de proies vivantes

1.2.3. La température d'élevage

La mise en place des évènements ontogénétiques est aussi modulée par la température d'élevage. Afin de favoriser la survie et la croissance, des températures élevées (19-22°C) sont habituellement utilisées en éclosion. La température est le facteur écologique le plus important qui détermine le niveau d'activité métabolique et la vitesse de développement des larves. Par exemple, une hausse de la température accélère sensiblement le développement morpho-anatomique (de 13 à 20°C, Koumoundouros et al., 2001) et musculaire (de 15 à 19°C, Ayala et al., 2003) de la larve de bar.

A notre connaissance, l'effet de la température sur la capacité d'utilisation des aliments composés n'a fait l'objet d'aucune étude chez les larves de bar. Chez les juvéniles de cette même espèce (60g), dont la température de croissance maximale est de 25°C, les capacités d'adaptation à des températures élevées (29°C) ne sont pas altérées par un régime sub-carencé en HUFA n-3, au moins pendant trois mois (Person-Le Ruyet et al. ; 2004). Cependant, cette température élevée de 29°C a induit une diminution de la composition corporelle en HUFA n-3, mais seulement chez les poissons ayant reçu l'aliment carencé. Les influences relatives de la température et de l'apport en HUFA n-3 par le régime dépendent du tissu considéré (Skalli et al., 2006).

Malgré l'intérêt économique et écologique (protection de la ressource) de la substitution des produits issus de la pêche par des produits végétaux dans l'alimentation des poissons marins, deux problèmes se posent :

- **Les produits végétaux (pauvres en HUFA et riches en acides gras à 18 carbones C18) ne sont pas capables de couvrir les besoins en HUFA des poissons marins carnivores qui ont une faible capacité de bioconversion des C18 en HUFA.**
- **La température d'élevage est susceptible d'influencer les capacités d'adaptation des larves à un aliment carencé en HUFA comme il a été montré chez les juvéniles.**

La connaissance du métabolisme des lipides chez la larve de bar, et en particulier des HUFA, est essentielle pour répondre à la problématique aquacole de substitution d'huiles de poisson par des huiles végétales.

II. Le métabolisme lipidique

II.1. La définition des lipides

Les lipides peuvent être séparés en différentes classes selon la structure de leur squelette carboné (atomes de carbone chaînés, cycliques, présence d'insaturations, etc., Fahy et al., 2005) :

- triacylglycérols (ou glycérides)
- phosphoacylglycérols (ou phosphoglycérides)
- sphingolipides
- stérols
- saccharolipides (ou glycolipides)

Les acides gras se retrouvent dans ces différentes classes de lipides et peuvent en être extraits par saponification. L'intérêt exclusif pour les acides gras dans cette étude s'explique par leur dépendance à l'apport alimentaire. Ils sont typiquement composés d'une longue chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone (généralement un nombre pair), se terminant par une fonction acide. On parle d'acide gras à longue chaîne pour une longueur de 14 à 22 carbones et à très longue chaîne s'il y a plus de 22 carbones. Nous utiliserons la nomenclature des acides gras des nutritionnistes exprimée en C :X n-Y où :

C indique le nombre d'atomes de carbone;

X indique le nombre de doubles liaisons ou insaturations;

n-Y indique la position du premier carbone portant la première insaturation en partant du CH₃ terminal.

Les acides gras sont divisés en 2 groupes selon qu'ils possèdent ou non des doubles liaisons entre leurs atomes de carbone:

- Un acide gras saturé est un acide gras dont chaque atome de carbone porte le maximum d'atomes d'hydrogène possible : la molécule est saturée. Toutes les liaisons entre

les carbones sont simples. C'est le cas de l'acide palmitique (16:0 ; $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$) et de l'acide stéarique (18:0 ; $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$) par exemple.

- Un acide gras insaturé est un acide gras qui comporte une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone. On parle d'acide gras mono-insaturé (monounsaturated fatty acids : MUFA) lorsqu'il n'y a qu'une seule double liaison, et d'acide gras polyinsaturé (polyunsaturated fatty acids : PUFA) lorsqu'il y en a plusieurs.

Les MUFA sont linéaires, avec deux chaînes de n et p CH_2 de part et d'autre de la double liaison $\text{C}=\text{C}$; ils sont de la forme : $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$, où n et p sont des nombres entiers positifs ou nuls et $Y=n+1$. Le plus abondant est l'acide oléique 18 :1n-9.

Les PUFA sont également typiquement linéaires puisque chaque double liaison est séparée par une liaison méthylène ; ils sont de la forme : $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-(\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2)_x-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$. Les PUFA les plus abondants sont l'acide linoléique (18 :2n-6) ou alpha-linoléique (18 :3n-3).

Les PUFA comprenant au moins 4 doubles liaisons et 20-22 atomes de carbone sont appelés Acides Gras à Longue chaîne Poly-Insaturés (AGLPI) ou HUFA (Highly Unsaturated Fatty Acids). De la même façon que tous les acides gras insaturés, les HUFA peuvent être classés selon la position de leur double liaison : n-9 ; n-6 ou n-3. Ces classes correspondent aux biotransformations qui ne sont possibles qu'à l'intérieur d'une même série chez les animaux (Fig.3 page 20). Les HUFA n-9 peuvent être synthétisés, essentiellement dans le foie, à partir d'acides gras précurseurs présents dans l'aliment ou bien *de novo* (lipogénèse) à partir d'acides aminés et de glucides (Walton et Cowey, 1982 ; Wilson, 1994 ; Sargent et al., 2002) ; ceci a été décrit chez les poissons (Sargent et al., 1989). Toutefois, les HUFA n-3 et n-6 ne peuvent être synthétisés qu'à partir d'acides gras précurseurs apportés par la voie alimentaire.

- Il existe beaucoup d'autres acides gras mais ils n'entrent pas significativement dans la composition des organismes supérieurs (acides gras branchés, acides gras conjugués,).

II.2. Le rôle des lipides dans l'organisme

Parmi les macronutriments, les lipides constituent la source d'énergie la plus efficace puisqu'ils apportent $39,5 \text{ kJ.g}^{-1}$ alors que les protéines et les glucides n'apportent respectivement que $23,7$ et $17,2 \text{ kJ.g}^{-1}$ (NRC, 1993). Ce rôle énergétique des lipides est d'autant plus important chez les poissons carnivores car ils ont une faible capacité à digérer les glucides (Wilson, 1994). L'apport énergétique des lipides est essentiels à la croissance de l'œuf à l'adulte (Tocher et al., 1985), mais aussi à la reproduction (Henderson et al., 1984), la survie et la métamorphose (pour revue, voir Sargent et al., 2002). L'énergie est produite sous la forme d'ATP via la β -oxydation qui a lieu dans les mitochondries. Ce processus a été très bien décrit chez les poissons (Sargent et al., 1989). Par ailleurs, les excédents d'énergie provenant des glucides et des protéines peuvent être transformés par la voie de la lipogénèse en acides gras saturés ou monoinsaturés (Sargent et al., 1989). Ce sont les triglycérides, appartenant à la classe des lipides neutres (LN), qui constituent la réserve énergétique de l'animal. Selon les espèces de poissons, cette réserve d'énergie est stockée dans le foie, le tissu adipeux péri-viscéral ou sous-cutané ou encore le muscle (Fauconneau et al., 1990).

Les lipides assurent également le maintien de la structure et le bon fonctionnement de toutes les membranes cellulaires des animaux, de la bactérie à l'humain. Les membranes cellulaires contiennent principalement des lipides polaires (ou phospholipides ; PL) entre lesquels s'intercalent des molécules de cholestérol. Les PL sont constitués principalement d'HUFA.

II.3. L'importance des HUFA n-3 et HUFA n-6

Le rôle fonctionnel des HUFA est lié à leur incorporation préférentielle dans les phospholipides (Linares et Henderson, 1991 ; Sargent et al., 1995, 2002 ; Skalli et Robin, 2004). La composition en HUFA des phospholipides des membranes influence fortement leurs propriétés structurales dont dépendent leur fluidité et leur perméabilité (Valentine et Valentine, 2004 ; Champeil-Potokar et al., 2006). Chez les poissons, les HUFA jouent également un rôle essentiel dans l'ontogénèse, la survie et la croissance larvaire, le développement de la vision et du cerveau, la résistance au stress et aux maladies (pour revue, voir Sargent et al., 2002). Chez les poissons, les HUFA des phospholipides sont majoritairement l'acide docosahexaénoïque $22:6n-3$ (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque $20:5 n-3$ (EPA).

Chez les poissons d'eau douce, le taux de conversion des acides précurseurs (acides linoléique :AL ; 18 :2n-6 et linoléique : ALN ; 18 :3n-3) en HUFA est assez élevé ; de ce fait, ces précurseurs sont essentiels car indispensables pour la synthèse d'HUFA. En revanche, ces conversions sont très faibles chez les poissons marins (Bell et al., 2003) et se révèlent insuffisantes pour couvrir les besoins en HUFA. En conséquence, ces HUFA sont eux-mêmes essentiels et doivent être impérativement apportés par l'aliment.

II.3.1. L'acide docosahexaénoïque DHA (22 :6n-3)

Chez les poissons, la quantité de DHA des membranes cellulaires est généralement deux fois plus importante que la quantité d'EPA, même si ce ratio dépend du type de tissu considéré (Sargent et al., 2002). Chez les animaux en général, le DHA est surtout présent dans les cellules du système nerveux et la rétine (Champeil-Potokar et al., 2006), alors que chez les poissons, il est réparti dans tous les tissus (Skalli et al., 2006). Chez les poissons, il intervient dans les échanges calciques du cœur et du muscle squelettique en modulant l'activité de la Ca²⁺-ATPase (Ushio et al., 1997). Chez les larves de poissons marins, il joue un rôle dans l'acquisition de la pigmentation et de la vision (Reitan et al., 1994 ; Furuita et al., 1998).

II.3.2. L'acide écosapentaénoïque EPA (20 :5n-3)

L'estimation des besoins en HUFA n-3 doit tenir compte du ratio DHA/EPA (Rodriguez et al., 1998). Chez les larves de bar, le ratio DHA/EPA le plus adapté à une bonne croissance est de 1,5-2 (Kjørsvik et al., 2004), du moins si ces deux acides gras sont apportés par la fraction phospholipidique de l'aliment à raison de 2,3% de la matière sèche MS de l'aliment (Cahu et al., 2003b). Une grande variabilité dans l'estimation des besoins en HUFA n-3 (EPA+DHA) est cependant observée. Chez les larves de dorade, il a été estimé à 0.5% MS par Koven et al. (1990) et à 1,5% MS par Sahli et al. (1999).

Chez les poissons, comme chez les mammifères, l'EPA tient un rôle important dans la modulation de la production d'eicosanoïdes : prostaglandines, leucotriènes et thromboxanes. Les eicosanoïdes sont des médiateurs cellulaires agissant entre autre sur le système nerveux, l'excrétion rénale et branchiale et l'osmorégulation (Bell et al., 1996b). La production majeure des eicosanoïdes se fait à partir de l'acide arachidonique (20 :4n-6 ; AA) et est régulée par les eicosanoïdes synthétisés à partir d'EPA (Henderson et al., 1985). Le ratio

AA/EPA optimal des larves de bar a été estimé à 1 :1 (Sargent et al., 1999). Toutefois, les aliments habituellement utilisés pour les larves et juvéniles de poissons contiennent des ratios AA/EPA beaucoup plus faibles.

II.3.3. L'acide arachidonique AA (20 :4n-6)

Chez les poissons marins, la teneur corporelle en HUFA n-6 est inférieure à celle des HUFA n-3 : selon les espèces, le ratio HUFA n-3/n-6 se situe entre 10 :1 à 15 :1 (Ackman, 1980). De fortes quantités de AA sont observées dans les phosphatidylinositols, (phospholipides impliqués dans la production des eicosanoïdes) chez les poissons (Bell et al., 1985 ; 1992 ; Lie et al., 1992). Il a été montré que l'AA contribue à la survie des larves de daurade (Bessonart et al., 1999) et à la croissance des juvéniles de turbot (Castell et al., 1994). Il joue aussi un rôle dans la pigmentation des poissons plats (McEvoy et al., 1998) et dans la régulation de la multiplication cellulaire (Corraze, 1999). Les besoins en AA des larves et juvéniles de poissons marins restent cependant encore mal connus.

II.3.4. L'expression des besoins en HUFA n-3 et n-6

L'étude des besoins en HUFA des poissons marins à différents stades de développement remonte à la fin des années 70 (pour revue, voir Watanabe et Kiron, 1994 ; Sargent et al., 1999). Chez les larves, ils ont été initialement étudiés en utilisant des proies vivantes de nature et de composition variées, et étaient exprimés en % matière sèche (MS) de l'aliment. Depuis ces travaux, ce mode d'expression des besoins en HUFA a été conservé, sans prendre en compte le profil et l'équilibre des différents acides gras. Bien que ce mode d'expression soit remis en cause (Sargent et al., 2002), nous l'utiliserons dans cette étude.

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux HUFA n-3 (EPA et DHA) en raison de leur rôle essentiel dans la qualité de la chair des poissons (teneur 10 à 15 fois supérieure à celle de AA dans les membranes cellulaires). Malgré les progrès des connaissances, les besoins en HUFA n-3 des larves de poissons marins sont encore mal connus par rapport à ceux des juvéniles. Lors de la substitution des proies vivantes par les aliments composés, les besoins en EPA+DHA des larves de poissons marins ont été estimés à environ 3% MS (Cahu et Zambonino, 2001). Concernant le bar, Skalli et Robin (2004) ont

estimé les besoins en HUFA n-3 des juvéniles (poids initial 14g) à 0,7% HUFA n-3 %MS pour assurer une croissance optimale. La teneur en DHA des phospholipides (PL) des animaux était de l'ordre de 20%. Cette estimation de 0,7% HUFA n-3 (%MS) servira de valeur de référence à l'élaboration des régimes alimentaires dans cette étude.

II.4. La synthèse des HUFA : le rôle de la delta-6 désaturase

Tous les organismes, y compris les poissons, sont capables de désaturer (ajout d'une double liaison) les 16 :0 et 18 :0 en 16 :1n-7 (acide palmitique) et 18 :1n-9 (acide oléique) grâce à la delta-9 désaturase. Les mécanismes de synthèse (Fig.3) des C20 et C22 à partir de leurs précurseurs C18 sont bien connus chez les poissons (Buzzi et al., 1996 ; 1997). Les enzymes permettant la désaturation et l'élongation des acides gras (ajout de deux CH₂) sont les mêmes pour les séries n-9, n-6 et n-3.

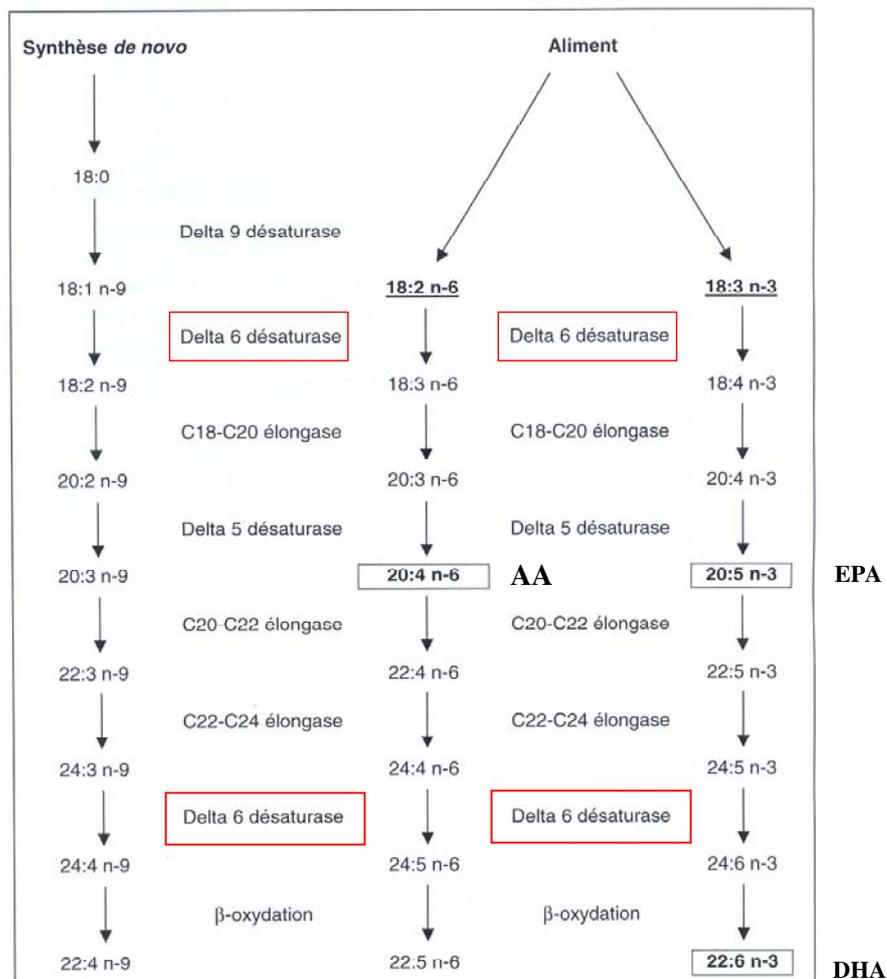


Fig. 3 : Mécanismes anaboliques des acides gras essentiels

Les enzymes de la superfamille des désaturases, dont la delta-6 ($\Delta 6D$) et la delta-5 ($\Delta 5D$), sont capables d'activer une molécule d'oxygène et de l'utiliser pour modifier la liaison carbone-hydrogène sur plusieurs substrats (Sperling et al., 2003). Contrairement aux poissons d'eau douce, ces désaturases sont faiblement actives, voire inactives chez les poissons marins (Yamada et al., 1980 ; Bell et al., 2003 ; Alimuddin et al., 2007), altérant la conversion en HUFA des acides gras précurseurs apportés par l'aliment. Par analogie avec les carnivores terrestres, la faible activité des désaturases chez les poissons marins pourrait s'expliquer par une perte d'expression du gène en raison de la richesse en HUFA n-3 de leurs proies naturelles (Sargent et al., 1995).

La $\Delta 6D$ a été très étudiée chez différentes espèces de poissons car elle est responsable de la première étape, donc étape limitante, de la réaction de synthèse des HUFA n-3 et n-6, EPA, DHA et AA (Fig.3). La $\Delta 6D$ convertit respectivement les acides linoléique (AL ; 18 :2n-6) et linoléique (ALN ; 18 :3n-3) en 18 :3n-6 et 18 :4n-3. Elle intervient aussi dans la transformation de l'EPA en DHA (anciennement attribué à une delta-4 désaturase). La présence d'une $\Delta 6D$ unique pour les deux réactions ou de deux isoenzymes n'est pas claire chez les poissons (Sargent et al., 2002). L'affinité des enzymes, et en particulier des désaturases, décroît des n-3 aux n-6, et est très faible pour les n-9 (Zheng et al., 2004). Ces auteurs ont montré que, dans une levure clonée avec la $\Delta 6D$ de turbot, le taux de transformation du 18 :3n-3 en 18 :4n-3 était de 59,5%, contre 31,2% pour la conversion du 18 :2n-6 en 18 :3n-6. De même, dans le cas d'une levure clonée avec la $\Delta 6D$ de daurade, le taux de conversion du 18 :3n-3 en 18 :4n-3 était de 23,1%, contre 3,6% pour le 18 :2n-6 en 18 :3n-6. Pour la truite et la carpe, les rendements étaient respectivement de 31 et 7% pour la transformation du 18 :3n-3 en 18 :4n-3, et de 12 et 1,5% pour la transformation du 18 :2n-6 en 18 :3n-6.

Depuis plusieurs années, la caractérisation des désaturases a beaucoup progressé. La séquence ADN complète de l'enzyme $\Delta 6D$ a été décrite chez une espèce de champignon filamenteux *Mortierella alpina* (Huang et al., 1999), un nématode *Caenorhabditis elegans* (Napier et al., 1998), le rat (Aki et al., 1999), la souris et l'humain (Cho et al., 1999). Le gène de la $\Delta 6D$ a également été cloné chez plusieurs espèces de poisson d'eau douce : le zebrafish *Danio rerio* (AF309556 ; Hastings et al., 2001), la carpe *Cyprinus carpio* (AF309557 ; Hastings et al., 2001) et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (AF301910 ; Seiliez et al., 2001). Plus récemment, la $\Delta 6D$ a été clonée chez deux espèces de poissons marins : la daurade *Sparus aurata* (AY055749 ; Seiliez et al., 2003) et le turbot *Scophthalmus maximus*

(AY546094 ; Zheng et al., 2004). Le transfert du gène de la $\Delta 6D$ du saumon masou (*Oncorhynchus masou*) dans le zebrafish a eu pour conséquence d'augmenter la composition corporelle du zebrafish en EPA (x 1,4) et DHA (x 2,1), et ceci sans modifier le taux de lipides corporel (Alimuddin et al., 2005).

II.5. La régulation de la synthèse des HUFA

Plusieurs mécanismes de régulation de la synthèse des HUFA ont été décrits chez les mammifères, mais peu d'entre eux ont été décrits chez les poissons.

II.5.1 Régulation de la synthèse des HUFA par la $\Delta 6D$

La modulation de l'expression de la $\Delta 6D$ par le taux de HUFA n-3 et n-6 de l'aliment contribue à assurer le maintien du taux de HUFA tissulaire. Chez les mammifères, un aliment carencé en HUFA n-3 stimule la transcription du gène, alors qu'un aliment riche en HUFA l'inhibe (Cho et al., 1999). Chez les poissons, cette modulation nutritionnelle a été mise en évidence successivement chez la truite arc-en-ciel et la daurade (Seiliez et al., 2001 ; 2003). Le gène de la $\Delta 6D$ cloné chez la daurade était plus exprimé dans les viscères et les muscles des individus nourris avec un aliment dépourvu d'HUFA (huile d'olive comme seule source lipidique) que chez ceux recevant un aliment riche en HUFA (huile de poisson) ; une production très élevée de 18 :2n-9 et 20 :2n-9, produits de désaturation de la $\Delta 6D$ a été mise en évidence. Cependant, des niveaux d'expression de la $\Delta 6D$ peu différents ont été mesurés dans le foie et l'intestin de morues adultes nourries avec un aliment à base d'huiles végétales, ou d'huiles de poisson, ce qui suggère que la régulation nutritionnelle de la $\Delta 6D$ peut varier selon l'espèce ou le stade de développement (Tocher et al., 2006).

Des études menées chez les mammifères, notamment dans les hépatocytes de rat et d'humain, ont mis en évidence que l'expression génétique de la $\Delta 6D$ était sous le contrôle de deux facteurs de transcription : le SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) et les PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) (pour revue, voir Nakamura et Nara, 2002 ; 2003).

Le SREBP-1 présente deux sous formes : SREBP-1a présent dans les cellules en cours de différenciation, et SREBP-1c, présent dans les cellules différenciées. Chez l'homme, le

SREBP-1c induirait la transcription du gène de la $\Delta 6D$ en se liant à une région SRE (Sterol regulatory element) présente sur le gène de la $\Delta 6D$ (Horton et al., 2002 ; Matsuzaka et al., 2002). Nara et al. (2002) ont montré que ce même promoteur serait également responsable de l'inhibition de l'expression de la $\Delta 6D$ par les HUFA.

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui, chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens, peuvent être présents sous trois isoformes: α , β et γ . Le PPAR α contrôle les gènes intervenant dans l'absorption intestinale des HUFA et dans la β -oxydation ayant lieu dans les mitochondries et les péroxisomes du foie. Il est également impliqué dans la synthèse hépatique des acides gras. L'isoforme β intervient dans la différenciation des kératinocytes dans lesquels le métabolisme lipidique est très actif (Tan et al., 2002). Le PPAR γ est surtout impliqué dans l'adipogénèse en stimulant la différenciation des adipocytes et l'induction des enzymes lipogéniques (Zhang et al., 2006). Les ligands des PPARs sont les HUFA (EPA, DHA, AA), les eicosanoïdes, les prostaglandines et les leucotriènes. Une fois formé, le complexe ligand-PPAR va former un hétérodimère en allant se fixer sur le récepteur de l'acide rétinoïque (Retinoid X Receptor, RXR). Cet hétérodimère va ensuite se fixer sur la zone de régulation des gènes cibles, appelée PPRE ou zone de réponse des PPAR (Peroxisome Proliferator Response Element) pour moduler leur transcription. Les gènes cibles seraient les gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras. Cette oxydation des acides gras créerait alors un besoin en HUFA de la cellule, activant alors la transcription du gène de la $\Delta 6D$. Cette induction de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ est donc indirecte. Cependant, Tang et al. (2003) ont mis en évidence une séquence similaire à celle des PPRE, le direct repeat-1 element (DR-1) sur le gène de la $\Delta 6D$ dans les hépatocytes humains. Ainsi, les PPAR auraient également une action directe sur la transcription du gène de la $\Delta 6D$. Mais le retard d'activation des désaturases par rapport à l'activation des enzymes de la β -oxydation observé dans les hépatocytes de mammifères indiquerait que la transcription du gène de la $\Delta 6D$ est majoritairement contrôlée par l'action indirecte des PPAR. Les mécanismes précis de cette régulation restent encore mal connus.

Chez le bar, les trois isoformes α , β et γ ont été clonés et caractérisés par Boukouvala et al. (2004). Ces auteurs ont mis en évidence une homologie de structure des PPAR des mammifères et des poissons ainsi qu'une localisation de leur expression dans les mêmes tissus. Ainsi, le PPAR γ est principalement exprimés dans les tissus adipeux, et les PPAR α et β dans le foie. Le PPAR β est toutefois présents dans tous les tissus. Comme chez les mammifères, les PPAR caractérisés chez les poissons se lient à un PPRE. Par ailleurs, les

récepteurs rétinoïques RXR α et γ ont été caractérisés chez les larves de bar par Villeneuve et al. (2004). Ces résultats suggèrent que les acides gras peuvent jouer le rôle de ligand des PPAR chez le bar et ainsi intervenir dans la régulation du métabolisme lipidique de cette espèce, comme chez les mammifères.

A notre connaissance, chez les mammifères, les gènes codant pour les désaturases ($\Delta 6D$, $\Delta 5D$) sont les seuls dont la transcription est régulée à la fois par les PPAR et par les SREBP-1 (Fig.4).

II.5.2. Régulation de la synthèse des HUFA par rétrocontrôle

Chez les poissons, de fortes proportions d'HUFA n-3 dans l'aliment tendent à inhiber les enzymes de la lipogénèse (Shikata et Shimeno, 1994 ; Dias et al., 1998). Toutefois, chez le bar, la régulation de la lipogénèse n'a été observée que pour de fortes variations de la teneur en lipides de l'aliment (Dias et al., 1998). Des travaux antérieurs ont montré que chez la truite arc-en-ciel, plusieurs semaines seraient nécessaires pour que cette régulation se mette en place (Lin et al., 1977).

II.5.3. Régulation de la synthèse des HUFA par la température

La modulation des mécanismes de désaturation/élongation chez les poissons par la température est connue depuis longtemps (Ninno et al., 1974 ; De Torrenco et Brenner, 1976). Chez de nombreuses espèces d'eau douce, dont la truite arc-en-ciel et la carpe, il a été mis en évidence qu'une élévation de température de quelques degrés entraîne une diminution du taux de désaturation des acides gras et de l'activité de la $\Delta 6D$ (Schünke et Wodtke, 1983 ; Hagar et Hazel, 1985 ; Tocher et al., 2004). Chez le poisson-chat (*Pimelodus maculatus*), une variation de l'activité de la $\Delta 6D$ a été observée pour une variation de température de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Lors d'une baisse de température, le délai de réponse était d'une semaine, alors qu'il n'était que d'un jour seulement lors d'une hausse. D'après De Torrenco et Brenner (1976), le délai d'induction de la transcription du gène pourrait dépendre de la température. Dans cette même étude, l'augmentation du taux de désaturation à basse température était associée à une diminution du rendement de la réaction de désaturation, probablement dans le but de ne pas modifier la composition lipidique corporelle des poissons. La fonctionnalité des membranes est maintenue quelque soit la température par des mécanismes adaptatifs très complexes (pour

revue voir Robertson et Hazel, 1996). Le taux d'insaturation des phospholipides membranaires augmente à basse température afin de maintenir la fluidité membranaire. Cependant, cette notion a été remise en question chez les poissons par Sargent et al. (2002), qui ont considéré que la structure intrinsèque du DHA était résistante aux variations de température, son abondance dans les phospholipides assurant la fluidité membranaire, quelque soit la température. Skalli et al. (2006) ont mis en évidence que l'influence de la température sur la composition lipidique des poissons dépendait du tissu considéré. Ainsi, les teneurs en PL dans le cerveau, les branchies et les muscles étaient significativement plus affectées par la température que dans le foie et les yeux.

La Fig.4. illustre les différents mécanismes de régulation des HUFA décrits ci-dessus.

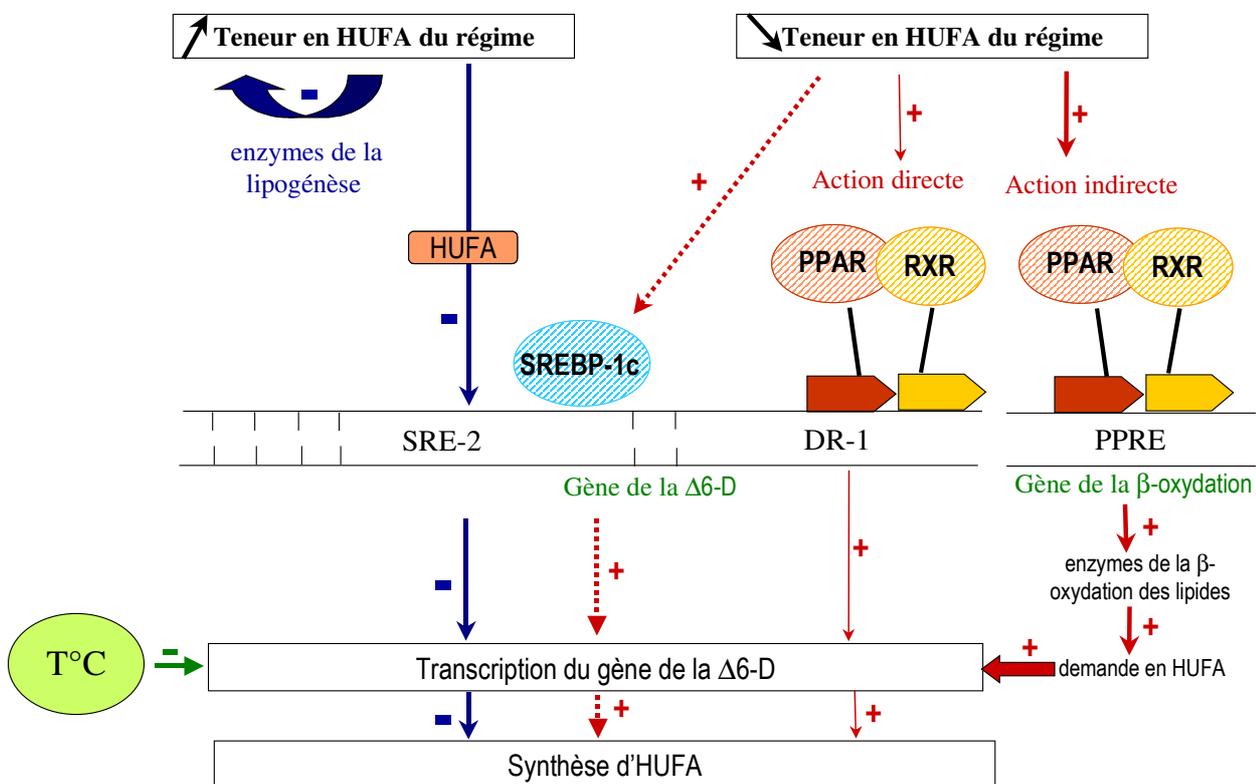


Fig. 4. Mécanismes de régulation des HUFA. Les traits pleins indiquent les mécanismes mis en évidence ou suggérés chez les poissons marins (Boukavala et al., 2004 ; Tocher et al., 2004) et les traits en pointillés indiquent les mécanismes mis en évidence uniquement chez les mammifères (Nakamura et Nara, 2003 ; Tan et al., 2003). L'action indirecte des PPAR semble avoir un rôle dans la transcription du gène de la $\Delta 6$ -D plus important que l'action directe, elle est représentée en traits plus épais (Tan et al., 2003).

III. Le concept de programmation métabolique : une solution possible

Comme mentionné précédemment, il serait économiquement et écologiquement intéressant de produire des poissons marins capables d'utiliser de façon optimale les produits végétaux incorporés dans leur aliment, en transformant efficacement les C18 apportés par les huiles végétales en HUFA n-3. Cette bioconversion est limitée chez les poissons marins en raison de la faible activité des enzymes impliquées dans la désaturation des acides gras précurseurs des HUFA. Une solution envisageable serait d'orienter de façon durable ces capacités de désaturation des acides gras précurseurs des HUFA en utilisant un conditionnement spécifique dès les stades précoces. Cette méthode a été décrite sous le terme de « programmation métabolique » chez les mammifères.

III.1. Définition de la programmation métabolique

La programmation métabolique est définie chez les mammifères comme une induction ou inhibition à long terme du développement de structures somatiques, suite à l'application d'un stimulus au cours d'une période critique du développement. C'est un processus adaptatif au niveau cellulaire, moléculaire et biochimique intervenant à un stade précoce du développement, puis maintenue aux stades ultérieurs et potentiellement transmissible à la descendance (Lucas, 1991 ; 1998). Plusieurs mécanismes biologiques pourraient expliquer les effets à long terme de la programmation métabolique. Des modifications épigénétiques (modifications chimiques de l'ADN ou des histones) sont par exemple susceptibles d'entraîner une reprogrammation de la cellule en régulant l'accessibilité du génome à la machinerie responsable de sa traduction en protéines. Bien que non codés dans les gènes, les phénomènes épigénétiques sont transmis de façon héréditaire (Jaenish et Bird, 2003). Dans un tissu « programmé », une prolifération différentielle ou une sélection des cellules « réorientées » pourraient aussi expliquer la mise en place de la programmation métabolique (Lucas et al., 1998 ; Waterland et Jirtle, 2004).

McCance (1962) fut le premier à identifier chez les mammifères l'existence d'une fenêtre critique délimitant la période possible d'intervention pour la programmation métabolique nutritionnelle. Des rats nouveau-nés ont été rationnés ou nourris à satiété avec du lait maternel pendant 21 jours, ce qui a induit un retard en croissance du lot rationné. Lorsque

les deux lots initiaux ont ensuite reçu la même quantité de lait maternel, le retard de croissance du lot carencé n'a pas été compensé. Cet effet de la nutrition précoce n'a pas été retrouvé lorsque le conditionnement nutritionnel a été appliqué quelques jours plus tard : le retard en croissance du lot carencé a été rattrapé, la fenêtre d'application du conditionnement précoce étant dépassée (fenêtre critique). Hahn (1984) a montré que des taux élevés d'insuline et de cholestérol se retrouvaient chez des rats adultes ayant été sur-alimentés pendant la période de sevrage. De plus, une carence en protéines pendant la gestation ou l'allaitement des rats nouveau-nés entraînerait une modification de l'activité cardiaque (diminution de la pression systolique) qui serait transmise à la descendance. Chez l'homme, le développement neurologique et le quotient intellectuel de l'enfant pourraient être favorisés par l'allaitement maternel, dont les apports en hormones et HUFA sont élevés (pour revue, voir Goldman et al., 2007).

III.2. Application du concept chez les poissons marins

Chez les poissons, la mise en place des processus adaptatifs durant l'ontogénèse est sous le contrôle des facteurs nutritionnels et environnementaux. Cette plasticité des larves laisse penser que le métabolisme des juvéniles peut être modulé par « l'histoire » des larves. Le concept de programmation nutritionnelle a été appliqué pour la première fois chez les poissons par Geurden et al. (2007). Ces auteurs ont mis en évidence chez la truite arc-en-ciel qu'un stimulus hyperglucidique aigu appliqué dès la première alimentation (J3) et pendant une courte période (24h) induisait une stimulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique (maltase, amylase et glucokinase). Bien qu'aucune réponse de ce conditionnement sur les performances de croissance des juvéniles n'ait été observée, ces résultats montrent que le concept de programmation métabolique décrit chez les mammifères est applicable chez les poissons en utilisant un conditionnement nutritionnel dès la première alimentation des larves.

IV. Les objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est de voir si, par le concept de programmation métabolique, il est possible de produire des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) pouvant mieux utiliser les substituts végétaux (et plus spécifiquement les huiles) en transformant en HUFA n-

3 les C18 apportés par les huiles végétales. Ceci a été testé par l'utilisation d'un conditionnement nutritionnel larvaire pauvre en HUFA n-3, caractérisé par un régime élaboré à partir de matières premières végétales, appliqué dès la première alimentation des larves.

Le conditionnement est défini dans cette étude comme un forçage du métabolisme des larves par des facteurs extrinsèques pour influencer durablement celui des juvéniles.

- Les questions initiales posées étaient :

- Dans quelle mesure un conditionnement nutritionnel spécifique (carence en HUFA) appliqué dès la première alimentation influence-t-il le développement des larves de bar européen, et en particulier leurs capacités de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n-3 ?
- Quel est l'impact de ce conditionnement précoce sur l'adaptabilité des juvéniles à un régime alimentaire sub-carencé en HUFA, et notamment sur leur capacités de désaturation des acides gras ?

- Le premier chapitre présente les effets d'une première méthode de conditionnement C1 (nutritionnel et thermique), utilisée dès l'ouverture de la bouche et jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45), sur le développement des larves et sur l'adaptabilité des stades ultérieurs (juvéniles) à un régime alimentaire modérément carencé en HUFA n-3.

- Au regard des résultats obtenus (effet faible et transitoire du conditionnement précoce), une seconde méthode de conditionnement C2 a été testée (chapitre II) : utilisation d'une gamme de teneur en HUFA n-3 du régime larvaire élargie et d'une mise à l'épreuve plus précoce des juvéniles à partir d'un aliment dont la carence en HUFA n-3 a été renforcée. Puis, afin de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs des juvéniles pré-conditionnés, il a paru intéressant d'adapter une technique de dosage enzymatique de la Δ^6D au laboratoire.

- Le troisième chapitre discute l'ensemble des résultats obtenus et en dégage les limites et les perspectives de recherche.

La méthodologie générale utilisée au cours de cette thèse est présentée en ANNEXE 4 (page 169) et la méthodologie utilisée pour chaque expérience est présentée dans les chapitres correspondants.

CHAPITRE I

Impact d'un conditionnement nutritionnel et thermique des larves sur le développement larvaire et sur les capacités d'adaptation des juvéniles à un aliment carencé en HUFA n-3

Objectifs

L'objectif de la première expérience était de conditionner pendant 45 jours des larves à deux régimes alimentaires se différenciant par l'apport en HUFA n-3 et à deux températures. Les effets de ce conditionnement précoce sur le développement larvaire ont été mesurés (performance de croissance, maturation des fonctions digestives et métabolisme lipidique). Les résultats sont présentés dans le premier article (Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development) précédé d'un résumé en français (Partie 1).

Après une période intermédiaire de trois mois, l'adaptabilité des juvéniles issus de ce conditionnement précoce (HUFA x température) à un aliment sub-carencé en HUFA n-3 a été éprouvée pendant 60 jours. Les résultats sont présentés dans le deuxième article (Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage ?) précédé d'un résumé en français (Partie 2).

PARTIE 1

Effets de la teneur en HUFA n-3 de l'aliment sur le développement larvaire selon la température d'élevage.

Résumé

Effets de la teneur en HUFA n-3 de l'aliment sur le développement larvaire selon la température d'élevage.

Quatre groupes de larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) ont été élevés à 16 ou 22°C et nourris de l'ouverture de la bouche (Jour J-6) jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45) avec un aliment composé de faible ou forte teneur en HUFA, LH (Low HUFA) ou HH (High HUFA) distribué en excès 18h/24h. Ces aliments étaient isolipidiques et isoprotéiques et différaient uniquement par leur teneur en HUFA n-3 (EPA+DHA % MS): soit 0,8% pour LH et 2,2% pour HH. Ces teneurs en HUFA n-3 ont été définies par rapport aux besoins des juvéniles de bar, 0,7% MS (Skalli et Robin, 2004). Les quatre conditions expérimentales étaient : LH16, HH16, LH22 et HH22. La teneur en EPA+DHA du régime LH a été obtenue par l'incorporation de 20% de lécithine de soja (source de phospholipides) et 2% d'huile de soja vs. 15% de lécithine de soja et 5% de lécithine marine pour le régime HH.

A l'issue de l'expérience (J-45), la croissance pondérale était fortement affectée par la température et le régime alimentaire ($P < 0.001$), alors que la croissance métrique n'était affectée que par la température ($P < 0.001$). La biomasse disponible à J-45, qui intègre la survie, était très fortement affectée par la température (plus élevée à 22°C qu'à 16°C) et plus faiblement par le régime ($P < 0.05$). Ces résultats zootechniques ont toujours conduit au même classement des conditions expérimentales : HH22 > LH22 > HH16 > LH16. Le développement squelettique était plus avancé à 22°C qu'à 16°C ($P < 0.001$), sans effet du régime alimentaire.

La maturation pancréatique était achevée dès J-25, les sécrétions de la trypsine et de l'amylase pancréatiques étant stabilisées entre J-25 et J-45. La maturation intestinale a été retardée ($P < 0.001$) par l'effet combiné de la basse température (16°C) et de la faible teneur en HUFA de l'aliment (LH). A la même température, le même retard de maturation intestinale a été retrouvé à J-25 chez les larves nourries avec l'aliment HH, mais il a été compensé à J-45. De plus faibles niveaux d'ARN de la lipase étaient mesurés dans les groupes HH16 à J-25 ($P < 0.05$) et à J-45 dans tous les groupes élevés à 16°C ($P < 0.001$). Cependant, l'activité

enzymatique de la lipase était équivalente dans tous les groupes (NS), ce qui pourrait s'expliquer par une régulation post-transcriptionnelle du gène de la lipase.

Les niveaux d'ARN des gènes PPAR α et PPAR β n'ont été significativement affectés ni par la température, ni par le taux d'HUFA de l'aliment. Ceci suggère que le métabolisme lipidique n'est pas significativement affecté par une diminution modérée du taux de HUFA n-3 de l'aliment.

La composition corporelle des larves à J-45 a montré une teneur en DHA plus élevée que dans les aliments (x 2 pour LH ; x 1,5 pour HH). Par ailleurs, au même âge, le taux de DHA des PL était plus faible dans les groupes LH que dans les groupes HH, indiquant une déficience en HUFA n-3 des groupes LH. Le niveau d'ARN de la delta-6 désaturase ($\Delta 6D$) était significativement plus élevé chez les groupes nourris avec l'aliment LH, quelque soit la température d'élevage ($P < 0.005$). Ceci est en accord avec l'augmentation du 18:3n-6 mesuré chez les larves LH à J-45 ($P < 0.001$), et met en évidence une désaturation du 18:2n-6 par la $\Delta 6D$.

Cette étude a montré que les larves ont réagi à un régime carencé en EPA+DHA par la stimulation de mécanismes enzymatiques impliqués dans la désaturation d'acides gras précurseurs dans la synthèse d'HUFA, et ceci indépendamment de la température. Cependant, cette stimulation n'a pas été suffisante pour éviter une déficience en HUFA des PL des larves recevant un aliment modérément carencé en HUFA. Il paraissait intéressant de vérifier si cette modulation du niveau d'ARN de la $\Delta 6D$ observée chez les larves pouvait faciliter l'adaptation des juvéniles à un aliment plus fortement carencé en HUFA n-3 (0,5% EPA+DHA).



Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development

M. Vagner ^{*}, J.H. Robin, J.L. Zambonino Infante, J. Person-Le Ruyet

UMR 1067 INRA-IFREMER-Bordeaux 1, IFREMER Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

Received 17 November 2006; received in revised form 23 February 2007; accepted 25 February 2007

Abstract

The purpose of this study was to investigate the combined effect of the incorporation of vegetable products in diet and temperature on enzymatic pathways for high unsaturated fatty acids (HUFA) desaturation in sea bass larvae. Four replicated groups were fed a low (LH; 0.8% EPA+DHA) or a high (HH; 2.2% EPA+DHA) n-3 HUFA microparticulated diet from mouth opening, six days post-hatching and were reared at 16 or 22 °C. The four experimental conditions (LH16, HH16, LH22 and HH22) were tested for 45 days. At the end of the experiment, body weight, total length and biomass were affected by temperature ($P < 0.001$), while biomass as well as fresh body weight was also influenced by diet ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively). This always lead to the same ranking of experimental conditions: HH22 > LH22 > HH16 > LH16. The larval skeletal development was more advanced in 22 °C-groups than in 16 °C-ones ($P < 0.001$), while it was not affected by diet. Amylase and trypsin pancreatic secretions did not vary between d-25 and d-45, indicating that pancreatic maturation was achieved at d-25. Low temperature combined with low dietary HUFA delayed intestinal maturation ($P < 0.001$), while low temperature combined with high HUFA diet allowed larvae compensating for the initial intestinal maturation retardation. Lipase gene expression was down-regulated in HH16 group at d-25 ($P < 0.05$) and in the two 16 °C-groups at d-45 ($P < 0.001$), while lipase enzymatic activity was similar in all groups. This suggested the presence of a post-transcriptional regulation of this gene. PPAR α and PPAR β were not affected neither by temperature, nor by diet, suggesting that lipid metabolism was not significantly affected by a lowering in dietary n-3 HUFA when isolipidic diets were used. A higher DHA content was found in larvae than in their diets ($\times 2$ for LH; $\times 1.5$ for HH) but the DHA content in PL of d-45 LH larvae was lower than the initial one, which revealed a HUFA deficiency in this group. Delta 6-desaturase ($\Delta 6D$) gene expression was significantly up-regulated by HUFA deprived diet ($P < 0.05$) whatever the temperature was. This was supported by the increase in 18:3n-6 in LH larvae ($P < 0.001$), which indicated a desaturation from 18:2n-6 by the $\Delta 6D$. This study clearly showed that larvae were able to adapt to an n-3 deprived diet by a stimulation of enzymatic pathways for HUFA desaturation, and that this adaptation was not affected by temperature.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aquaculture; Delta-6 desaturase; *Dicentrarchus labrax*; HUFA; Desaturation

1. Introduction

In marine fish, larval stage represents a transitional ontogenetic period of simultaneous growth and development, which causes substantial changes in structure, physiology and morphology, all of which modify the

* Corresponding author. Tel.: +33 298 224 400; fax: +33 298 224 653.

E-mail address: mvgagner@ifremer.fr (M. Vagner).

physiological and behavioural capabilities and subsequently the ability of the fish to deal with challenges to its survival (Fuiman, 1997). Larval development strongly depends on environmental parameters, such as temperatures, and on diet (Koumoundouros et al., 1999; Sargent et al., 1999). In particular, the importance of dietary n-3 high unsaturated fatty acids (HUFA, eicosapentaenoic EPA 20:5n-3, docosahexaenoic DHA 22:6n-3 and arachidonic ArA 20:4n-6 acids) influence on larvae has been demonstrated by several studies (Kanazawa, 1993; Koven et al., 2001) as they function as critical structural and physiological components of the cell membranes of most tissues and are essential for growth, development and survival (for review, see Sargent et al., 1999). A dietary deficiency in DHA in larvae of farmed marine teleosts has been correlated with poor growth, high mortality and susceptibility to stress and disease (Cahu et al., 2003; Robin and Peron, 2004).

In contrast to freshwater fish, marine fish require the presence of preformed HUFA in their diet as they have a low capacity to bioconvert 18 carbon atom fatty acids (linoleic 18:2n-6 and alpha-linolenic 18:3n-3) into HUFA with 20 or 22 carbon atoms (arachidonic 20:4n-6, EPA and DHA; Mourente and Tocher, 1994). The first step of this bioconversion pathway requires the presence of the delta 6-desaturase gene ($\Delta 6D$). This gene has been cloned in several freshwater species such as zebrafish (*Danio rerio* AF309556), common carp (*Cyprinus carpio* AF309557), rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*; Seiliez et al., 2001). $\Delta 6D$ gene has also been cloned in two marine fish species: gilthead seabream and turbot (Seiliez et al., 2003; Zheng et al., 2004). In gilthead seabream, an enhanced expression of the gene was obtained by feeding juveniles a HUFA-free diet. Cho et al. (1999) and Seiliez et al. (2001) previously showed that dietary HUFA inhibits the $\Delta 6D$ gene expression in mammals and in rainbow trout. The deficiency in $\Delta 6D$ activity usually observed in marine fish can be related to the abundance of HUFA n-3 in marine food chain, which has induced an adaptation (Sargent et al., 1995) or a repression of the $\Delta 6D$ activity (Olsen et al., 1990).

As long as fish oil and meals represent primarily ingredients of aquafeeds, larvae n-3 HUFA requirements are easily covered. However, the high increase in farmed fish production in addition to the stagnation or rarefaction of natural stocks leads to look at substitutes for fish products commonly used in aquaculture (Lodemel et al., 2001; Ringo et al., 2002). Incorporation of vegetable compounds in fish feeds constitutes at the present time the only solution in Europe, although it do not bring n-3 HUFA to cover marine fish requirement

but PUFAs with 18 carbons (C18), which may disturb fish physiology (Parpoura and Alexis, 2001). So it should be interesting to obtain fish able to adapt their metabolism developing enzymatic pathways in order to bioconvert C18 fatty acids supplied by vegetable products into HUFA. However, in larval stages this capacity could be affected by environmental factors, specially by temperature, which is one of the greatest factors acting on fish ontogeny (Koumoundouros et al., 1999). Interaction between temperature and dietary n-3 HUFA has been investigated in European sea bass juveniles (Person-Le Ruyet et al., 2004) and showed that a 3-month deficiency in dietary n-3 HUFA did not drastically impair fish capacity to adapt to a high temperature (29 °C).

The aim of this study was to examine the effect of specific dietary n-3 HUFA combined with water temperature on the development of some metabolic functions, particularly on the enzymatic pathways for HUFA desaturation during sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. The expression of $\Delta 6D$ in response to these experimental conditions was specially studied.

2. Materials and methods

2.1. Rearing conditions and experimental design

Three days post-hatching sea bass larvae were obtained from the commercial fish farm Aquanord (Gravelines, France) and experiments were conducted at the IFREMER-Brest. Larvae were dispatched in 20 conical fiberglass tanks (35 l; initial shocking density: 60 larvae l^{-1} , i.e. 2500 larvae $tank^{-1}$), and temperature was progressively increased from 14 °C to 16 °C within 2 days. After an acclimation period of 2 days, temperature was progressively increased to 22 °C in 8 tanks while other tanks remained at 16 °C. All groups were fed microparticulated diets from mouth opening at day 6 (d-6) to d-45. Larvae weighted 0.36 ± 0.01 mg at d-6. Two isolipidic diets (Table 1) differed by a low (LH) or high (HH) HUFA content were tested: 0.8 and 2.2% EPA + DHA on dry matter basis, respectively. The four experimental conditions were LH16, HH16, LH22 and HH22, with 6 tanks per conditions at 16 °C and 4 at 22 °C. Diets were automatically distributed in excess 18 h/24 h and the daily ration was progressively increased from 1 g per day per tank at d-6 to 10 g at d-45.

Tanks were supplied with running sea water (34.5‰) filtered through a sand filter, then passed successively through a tungsten heater and degassing column packed with plastic rings. The water renewing was progressively

Table 1

Formulation (g 100 g⁻¹), chemical composition (% DM) and fatty acid composition in TL (% FAME) of the two experimental diets (HH and LH)

	HH diet	LH diet
<i>Ingredients^a</i>		
Fish meal LT 94	55	26
Defatted fish meal	0	28
CPSP 90	12	12
Soy oil	0	2
Soy lecithin	15	20
Marine lecithin LC 60	5	0
Vitamin mixture ^b	7.5	7.5
Mineral mixture ^c	3.5	3.5
Betaine	1	1
Cellulose	1	0
<i>Chemical composition</i>		
Dry matter (%)	91.9	91.1
Crude protein (% DM)	55.2	58.5
Crude fat (% DM)	22.1	21
Ash (% DM)	14.1	14.7
HUFA n-3 (% DM)	2.9	1.1
<i>Fatty acids composition in TL</i>		
18:2n-6	31.0±0.1	44.1±0.1
18:3n-6	0.1±0.0	0.1±0.0
20:4n-6	0.6±0.0	0.3±0.0
18:3n-3	3.0±0.0	4.2±0.0
20:5n-3	5.5±0.0	2.3±0.0
22:6n-3	9.7±0.1	3.7±0.0
Σ saturated	24.8±0.2	23.6±0.2
Σ mono-unsaturated	23.5±0.1	21.0±0.2
Σ n-6	31.9±0.1	44.5±0.1
Σ n-3	19.8±0.2	10.9±0.2

^a Sources: fish meal LT 94: Norse (Fyllingsdalen, Norway); hydrolysed fish meal: Archimex (Vannes, France); fish protein hydrolysate CPSP 90: Sopropêche (Boulogne sur mer, France); soy oil: Système U (Créteil, France); soy lecithin: Louis François (Saint-Maur, France); marine lecithin LC 60: Phosphotech (Saint-Herblain, France).

^b Vitamin mixture (g kg⁻¹ vitamin mix): retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 2.5; DL- α -tocopheryl acetate, 5; menadione, 1; thiamine-HCL, 0.1; riboflavin, 0.4; D-calcium panthenate, 2; pyridoxine-HCL, 0.3; cyanocobalamin, 1; niacin, 1; choline, 200; ascorbic acid (ascorbyl polyphosphate), 5; folic acid, 0.1; D-biotin, 1; meso-inositol, 30.

^c Mineral mixture (g kg⁻¹ mineral mix): KCL, 90; KI, 0.04; CaHPO₄ 2H₂O, 500; NaCl, 40; CuSO₄ 5H₂O, 3; ZnSO₄ 7H₂O, 4; CoSO₄, 0.02; FeSO₄ 7H₂O, 20; MnSO₄ H₂O, 3; CaCO₃, 215; MgOH, 124; Na₂SeO₃, 0.03; NaF, 1.

increased from 50% h⁻¹ at d-6 to 200% h⁻¹ at d-45, which allowed stabilizing oxygen saturation around 95 ± 2% and preventing of ammonia accumulation. Larvae were exposed to full darkness until d-7 and then light cycle was 24L:0D until d-45: light intensity was progressively increased from 1 to 500 lx, during this period.

2.2. Sampling procedures

Fish were fasted for 12 h and the water volume was lowered prior to random sampling at d-25 and at d-45 using an appropriate net. These two sampling periods were selected as they correspond to the beginning of the development of digestive enzymes specific to the brush border membrane (BBM, d-25) and to the end of the larval period, when all enzymatic and molecular functions are established (d-45).

Growth performances were monitored by sampling 30 larvae in four tanks per condition ($n=120$). Fish were then fixed in 4% seawater formalin. After a minimum preservation period of three weeks, larvae were individually weighed ($\pm 10^{-2}$ mg) and then pooled and dried for 24 h at 105 °C to estimate the dry weight of each group ($n=4$). Final biomass expressed in mg l⁻¹ was the larvae fresh mean weight per final number at d-45. The apparent survival rate was estimated for each experimental group using the ratio initial/final number of larvae in each tank ($n=6$ for 16 °C conditions and $n=4$ for 22 °C groups).

To monitor growth in length and determine the different developmental stages, 10 additional larvae were taken from each tank ($n=40$ per experimental condition) and fixed in 4% seawater formalin. For less than 13 mm total length larvae a TNPC® 3.2 software connected to a binocular microscope was used, while a calliper square for bigger larvae (Codiam-Scientific®). Developmental stages were determined after using the coloration with alcian blue and alzarin red described by Taylor and Van Dyke (1985). Morphological criteria described by Sfakianakis et al. (2004) for common pandora *Pagellus erythrinus* and adapted to sea bass were used.

Enzymatic analyses were performed on 50 pooled larvae sampled in four tanks per condition ($n=4$) and stored at -20 °C before dissection. Dissections under a binocular microscope were conducted on a glass maintained at 0 °C. Pancreatic and intestinal segments (PS and IS) were extracted in each larvae as described by Cahu and Zambonino Infante (1994) in order to limit the assay of enzymes to specific segments, and were then stored at -20 °C pending analysis.

Measurement of relative expression of genes involved in digestive functions and lipid metabolism was performed on 150 mg of larvae in three tanks per condition ($n=3$) conserved in trizol at -80 °C pending analysis: delta-6 desaturase ($\Delta 6D$), lipase, phospholipase A2 (PLA₂), peroxisome proliferator activated receptors alpha (PPAR α) and beta (PPAR β).

For body composition and lipid analysis, 50 pooled larvae were sampled and weighted in four tanks per

Table 2

Primer used for each gene expression analysis by RT-PCR

Gene	Forward primers (5-3')	Reverse primers (3'-5')
$\Delta 6D$	GCCCTATCATCACCAACACC	ACAGCACAGGTAGCGAAGGT
Lipase	TGGATGGCATGATGGAGA	CTGCAGCAGGTGGGCTAT
PLA ₂	TCCTGTGTGTGATGCTGAT	TCTCGTCGCAGTTGTAGTCG
PPAR α	ACCTCAGCGATCAGGTGACT	AACTTCGGCTCCATCATGTC
PPAR β	GCTCGGATCTGAAGACCTTG	TGGTCCATACCAAACCACT

condition ($n=4$) and conserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pending analysis.

2.3. Analytical methods

2.3.1. Digestive enzyme assays

Pooled pancreatic segments (PS) of the same tank were homogenised in five volumes of ice-cold distilled water and pooled intestinal segments (IS) in 30 volumes Tris–Mannitol buffer. One ml was taken in order to assay secreted pancreatic enzymes (trypsin and amylase) and a cytosolic peptidase of the enterocyte (leucine–alanine peptidase, leu-ala). The remaining homogenate was processed in order to assess enzymes of the brush border membrane BBM (leucine aminopeptidase LAP and alkaline phosphatase AP) after a purification according to a method developed for intestinal scraping (Crane et al., 1979).

Pancreatic enzymes were assayed according to Holm et al. (1988) and Metais and Bieth (1968), respectively in PS and IS. Lipase was assayed according to the non-specific method of Iijima et al. (1998). BBM enzymes were assayed according to Maroux et al. (1973) and Bessey et al. (1946) respectively. Assay of leu-ala, was performed using the method of Nicholson and Kim (1975).

Enzyme activities were expressed as specific activities (U mg protein^{-1}), *i.e.*, the total activity of each enzyme per larvae in the segment. Protein was determined by the procedure of Bradford (1976). Secretion (%) of pancreatic enzymes (1) and the digestive tract maturation (2) were calculated as Zambonino Infante and Cahu (2001):

$$S = I / (I + P) \quad (1)$$

I Enzyme activity assayed in the intestinal segment (U segment^{-1})

P Enzyme activity assayed in pancreatic plus intestinal segments (U segment^{-1}).

$$\begin{aligned} & \text{Enzyme activity in BBM (U segment}^{-1}\text{)} \\ & / \text{leu-ala activity in IS (U segment}^{-1}\text{)} \end{aligned} \quad (2)$$

2.3.2. Gene expression

cDNA were obtained in duplicate from total RNA by using Quantitect Reverse Transcription kit with integrated removal of genomic DNA contamination (QIAGEN® GmbH, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using the iCycler iQTM (Bio-Rad® Laboratories Inc.). Quantitative PCR analyses for each gene were performed in triplicate for each cDNA duplicate (6 assays for each studied gene per experimental group), in a total volume of $15\text{ }\mu\text{l}$ containing $5\text{ }\mu\text{l}$ cDNA (dilution: 10-2), $0.5\text{ }\mu\text{l}$ primers ($10\text{ }\mu\text{mol/l}$), $7.5\text{ }\mu\text{l}$ 2X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA). The specificity of forward and reverse primers of each gene was checked by sequencing the amplicon (Table 2; Eurogentec, Labège, France). Thermal cycling was initiated with incubation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 13.5 min for activation of the hot-start enzyme, iTaq™ DNA Polymerase. After this initial step, 45 cycles of PCR were performed. Each PCR cycle consisted in heating at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s for denaturing, at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min for annealing and extension. Cycle threshold values (CT) corresponded to the number of cycles at which the fluorescence emission monitored in real time exceeded the threshold limit. Standard curves were established for each gene by plotting the CT values against the \log_{10} of 5 different dilutions (in triplicate) of cDNA sample solutions. Real-time PCR efficiency E was determined for each gene from the given slopes in Bio-Rad® software, according to the Eq. (3):

$$E = 10[-1/\text{slope}] \quad (3)$$

The relative expression ratio of each gene was calculated using REST® software (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>) and is based on the PCR efficiency (E) and the CT of a sample *versus* the control (standard group), and expressed in comparison to the reference gene (elongation factor EF1), according to Pfaffl's mathematical model (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{[(E_{\text{gene}})^{\text{CT}_{\text{gene}}(\text{control}-\text{sample})}]}{[(E_{\text{EF1}})^{\text{CT}_{\text{EF1}}(\text{control}-\text{sample})}]} \quad (4)$$

In this study, HH22 was used as the standard group because it is close to the rearing condition in fish

farming. Normalization relative to EF1 provided a widely applicable value for comparative studies of gene expression at the mRNA level seeing that its expression is constant during activation and proliferation of cells (Gause and Adamovicz, 1994).

2.3.3. Fatty acid composition

Whole frozen fish were rapidly homogenised at 0 °C using a Polytron® (PT 2100 Bioblock®). A representative portion (~1 g) was taken for analysis and ~3 g were taken for dry weight measurement (105 °C; 24 h). For lipid analyses of larvae, an internal standard (tricosanoic acid 23:0) was added, on a weighted known quantity of larvae, then extraction of total lipid (TL) was done according to Folch et al. (1957) with chloroform replaced by dichloromethane. Lipids sub sample (around 3 mg in 50 µl) were deposited at the top of a sepack light silica micro-column, neutral lipids (NL) and free fatty acids (FA) were eluted with 6 ml CHCl₃-MeOH (98:2 v/v), then phospholipids (PL) were eluted with 8 ml MeOH (Marty et al., 1992). These fractions as well as a TL sub sample were transmethylated in 2 ml 1% H₂SO₄ in MeOH and 1 ml of toluene was added in NL. Fractions were stored overnight at 50 °C. Fatty acid methyl esters (FAME) neutralized with 2% KHCO₃ were extracted twice with 5 ml hexane-diethyl ether (1:1). All FAME were separated by gas-liquid chromatography (GLC; Auto-system Perkin-Elmer® with a flame ionisation detector, BPX 70 capillary column: 25 m×0.22 mm i.d.×0.25 µm film thickness; split-splitless injector, with helium as carrier gas). The injector and detector temperatures were, 220 and 260 °C respectively. Data acquisition and handling were carried out by connecting the GLC to a PE Nelson computer. Internal standard let to quantify FAME by internal standardisation in TL and NL on larvae fresh matter basis. The results of individual FA composition were expressed as percent of total identified FAME.

Chemical analyses of feed were performed in duplicates for each sample according to AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1984) methods: ash (7 h at 550 °C), crude fat (Folch et al.,

1957), crude protein (Dumas method with an Elementary NA 2000®, N×6.25).

2.4. Statistical analysis

The data are presented as mean±S.E. of the replicate groups. Effects of temperature and diet on growth performances, enzymatic activities and fatty acid composition were tested using two-way ANOVA (Statistica®). When significant interactions occurred, differences between means were compared by Newman-Keuls test. Differences were considered significant at $P<0.05$. Data on survival, body weight and fatty acid percentages were transformed by arcsine square root before applying ANOVA. Statistical differences in gene expression between control and samples 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

3.1. Growth performances at d-45

Growth performances at d-45 are reported in Table 3. Temperature and diet had a significant effect on fresh body weight, which was almost 6-fold higher at 22 °C than at 16 °C and 5-fold higher in HH groups than in LH ones. Final biomass was significantly affected by both temperature and diet, it was 3-fold higher in HH22 than in LH16 groups. Total length was more significantly affected by temperature than by diet. Apparent larvae survival rate was significantly affected by temperature and was more than twofold higher in 16 °C groups than in 22 °C ones.

3.2. Skeletal developmental stage

The skeletal development was significantly less advanced at 16 °C than at 22 °C at d-25 and d-45 (Fig. 1). At d-25, about 95% of larvae at 16 °C belong to B stage, while at 22 °C they are quite evenly distributed

Table 3
d-45 survival rate ($n=5$ for 22 °C- and $n=7$ for 16 °C-groups), fresh ($n=120$) and dry ($n=4$) body weight, biomass ($n=4$) and total length ($n=40$) for each experimental condition

Zootechnical values at d-45	LH16	HH16	LH22	HH22	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>i</i>
Survival rate (%)	50±6	54±5	22±1	25±2	***		
Fresh body weight (mg)	15.0±1.7	18.1±0.4	84.4±4.4	94.8±0.7	***	***	
Final biomass (mg l ⁻¹)	369.9±5.3	512±1.1	952.5±2.8	1229.7±14.1	***	*	
Total length (mm)	15.0±0.1	15.9±0.2	23.0±0.4	23.0±0.4	***		

Values are mean±SE and significant effects of temperature (*t*), diet (*d*) and interaction (*i*) are represented (* $P<0.05$; *** $P<0.001$).

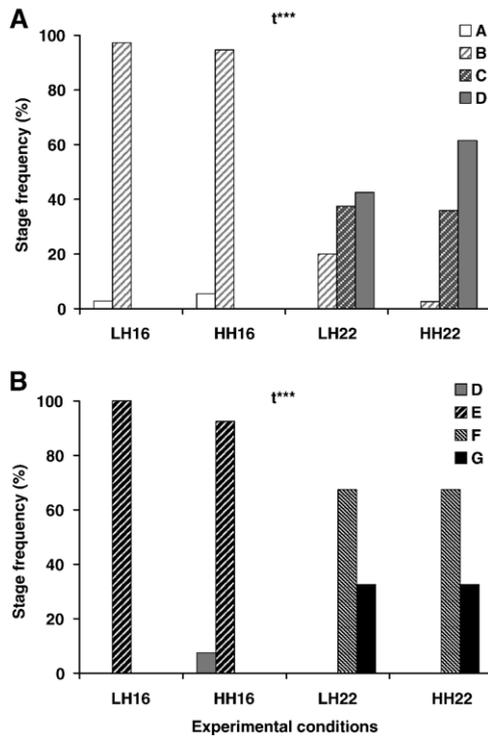


Fig. 1. Larvae developmental stage frequency for each experimental conditions at d-25 (A) and at d-45 (B), $n=10$ for each experimental condition. Significant effect of temperature (t) for each sampling day is indicated ($***P<0.001$).

in stages C and D. At d-45, the dominant class was stage E at 16 °C and stage F at 22 °C. Fig. 2 showed the mean length per each developmental stage and extreme values. This relationship was not regular and mean total length of one developmental stage was significantly different from the mean total length of the successive stage (T -test: $P<0.05$ between C and D; $P<0.01$ between B and C and $P<0.001$ between A and B, D and E, E and F and F and G).

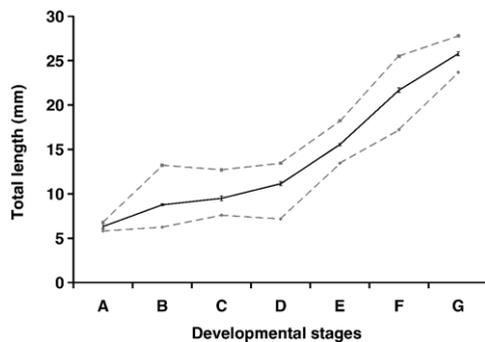


Fig. 2. Minimal, maximal (grey dotted lines) and mean \pm SE (black line) length of larvae according to developmental stage.

3.3. Enzymatic activities

Amylase pancreatic secretion was steady between d-25 and d-45 (NS) and varied from $59.0\pm 7.3\%$ for LH16 group to $70.0\pm 3.4\%$ for HH16 one at d-25 and from $52.8\pm 11.1\%$ for LH22 group to $65.9\pm 2.4\%$ for LH16 one at d-45 (Fig. 3A). The same result was observed concerning trypsin secretion in pancreas.

At d-25, AP/leu-ala maturation ratio, indicative of intestinal maturation, was significantly influenced by temperature (Fig. 3B; $P<0.001$), diet ($P<0.05$), and interactions occurred between these two parameters ($P<0.001$). Maturation ratio measured in each group was significantly different each from each other. Larvae conditioned at 16 °C showed the lowest maturation ratio (1.3 ± 0.1 for LH-groups and 2.1 ± 0.2 for HH-ones),

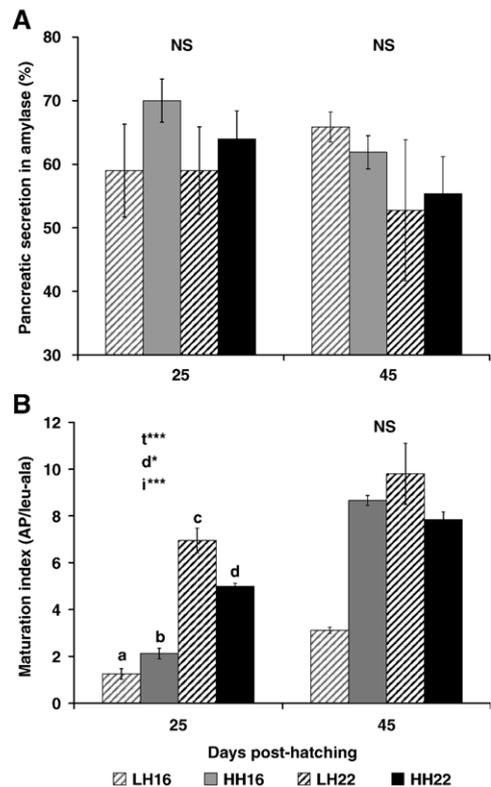


Fig. 3. (A) Mean level of pancreatic amylase secretion in d-25 and d-45 larvae, expressed as percent of segmental activity of amylase in the intestinal segment (IS) related to total activity in larvae for each experimental condition. (B) Alkaline phosphatase (AP) maturation index in d-25 and d-45 larvae, expressed as AP activity in brush border membrane (BBM) related to leu-ala activity in IS for each experimental condition. Mean \pm SE ($n=4$), statistical effect of temperature (t), diet (d) and interaction (i) are indicated for each sampling day ($*P<0.05$, $***P<0.001$, NS non significant) and different superscript letters mean significantly different maturation ratio.

while the highest was observed in 22 groups (7.0 ± 0.5 and 5 ± 0.1 for LH and HH groups respectively). At d-45, no significant differences were observed but HH16 groups reached the same maturation level as LH22 (around 9), conversely to groups LH16 with the lowest maturation level (3.1 ± 0.3). L-amino-peptidase (LAP)/leu-ala ratio is also an indicator of intestinal maturation and the same results as for AP/leu-ala were observed for this enzyme.

3.4. Gene expression

At d-25, the lipase gene expression ratio relative to HH22 group (Fig. 4A) was significantly 4.6 times down-regulated in HH16 groups ($P < 0.05$). At d-45, it was also 2.5 and 2.8 times significantly down-regulated in HH16 and in LH16 groups respectively ($P < 0.001$). Non-specific lipase enzymatic activity was not significantly influenced by temperature and diet (Fig. 4B) neither at d-25 nor at d-45.

At d-25, the $\Delta 6D$ gene relative expression significantly increased in groups fed LH diet with a factor of 3.2 in both LH16 and LH22 groups (Fig. 5; $P < 0.05$). At

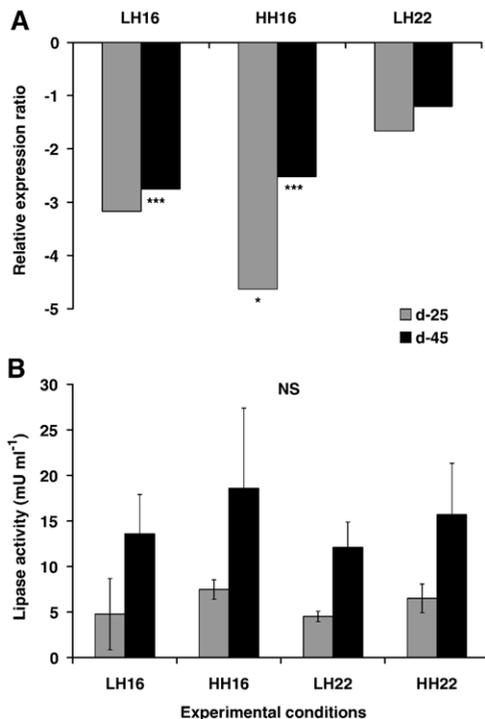


Fig. 4. (A) Lipase gene relative expression ratio in d-25 and d-45 larvae for each experimental condition ($n=3$), with HH22 as the reference. $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ and (B) lipase enzymatic activity (mean \pm SE) in d-25 and d-45 larvae for each experimental condition ($n=4$) NS non significant.

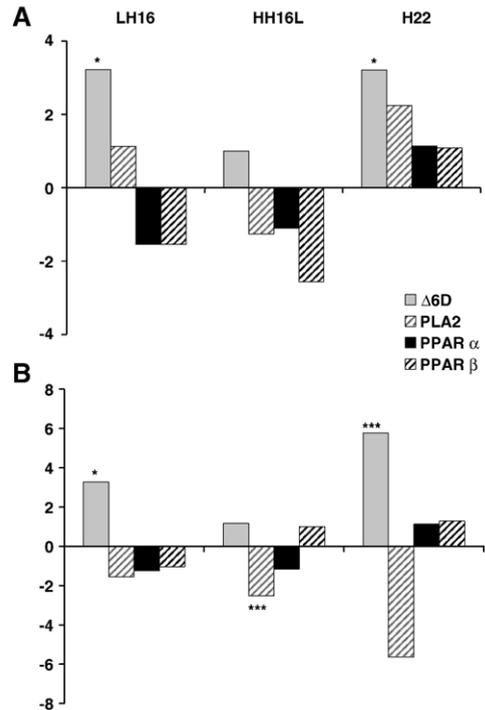


Fig. 5. $\Delta 6D$, PLA₂, PPAR α and PPAR β gene relative expression ratio in d-25 (A) and d-45 (B) larvae for each experimental condition ($n=3$). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ indicated significant differences with respect to HH22 reference group.

d-45, $\Delta 6D$ expression was 3.3 and 5.8 times significantly up-regulated in LH16 ($P < 0.05$) and LH22 ($P < 0.001$) groups respectively. PLA₂ was 2.5 times significantly down-regulated ($P < 0.001$) in HH16 group. PPAR α and PPAR β gene expressions were not significantly affected by temperature nor diet at d-25 or at d-45 ($P > 0.05$).

3.5. Fatty acid composition

Total FAME content in d-45 larvae in fresh weight basis was not significantly affected by treatments (Table 4). However, neutral lipid (NL) content was higher in 22 °C groups than in 16 °C ones ($P < 0.05$). FAME in NL represented from 50% (LH16) to 64% (LH22) of total FAME. NL composition in d-45 larvae closely reflected that of diets (Tables 1 and 4). HUFA (ArA, EPA and mainly DHA) were selectively incorporated in polar lipids (PL) and a quantitative estimation (Fig. 6) let to calculate that DHA in PL represented 85% in LH16; 80% in LH22, 75% in HH16, 72% in HH22 of DHA in total lipids (TL). In total FAME content (not detailed here) a higher DHA content was measured in larvae than in their diet (7.6 and 15.2% of total FAME in

Table 4

Total quantity of fatty acids methyl esters (FAME) in total lipids TL and neutral lipids NL (mg g^{-1} Fresh Weight) in d-45 larvae according to rearing conditions; FA profiles (in % FAME) of polar lipids (PL) and NL

	Larval composition				Statistical analysis		
	LH16	HH16	LH22	HH22	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>i</i>
FAME TL mg g^{-1}	25.4±1.0	26.5±1.9	30.1±2.0	30.5±5.3			
FAME NL mg g^{-1}	12.6±0.5	14.4±1.3	19.2±1.1	18.5±4.2	*		
NL							
18:2n-6	42.2±0.3	30.8±0.1	42.2±0.2	30.8±0.1		***	
18:3n-6	0.3±0.0 ^a	0.2±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.1±0.0 ^c	***	***	***
20:4n-6	0.2±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	0.5±0.0		***	
18:3n-3	3.8±0.0	3.0±0.0	3.6±0.0	2.8±0.0	***	***	
20:5n-3	1.5±0.0	3.8±0.1	1.8±0.0	4.2±0.0	***	***	
22:6n-3	2.3±0.1	6.9±0.2	2.4±0.1	7.1±0.2		***	
Σ saturated	23.9±0.3	25.2±0.3	23.4±0.4	25.4±0.2		***	
Σ mono-unsaturated	23.3±0.2	26.3±0.2	23.6±0.1	26.3±0.2	*	***	
Σ n-6	44.4±0.2	34.3±0.1	44.3±0.3	35.6±0.1	*	***	
Σ n-3	8.6±0.1	15.5±0.3	8.7±0.1	15.7±0.2		***	
PL							
18:2n-6	36.3±0.3	21.9±0.3	32.5±0.3	19.3±0.3	***	***	
18:3n-6	0.3±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0		***	
20:4n-6	0.8±0.0	1.5±0.0	0.9±0.0	1.6±0.0	**	***	
18:3n-3	1.9±0.0	1.2±0.0	1.5±0.0	1.0±0.0	***	***	
20:5n-3	5.0±0.1 ^c	9.1±0.1 ^a	5.1±0.1 ^c	8.5±0.1 ^b	*	***	**
22:6n-3	13.2±0.4	24.1±0.7	15.3±0.5	24.2±0.5		***	
Σ saturated	27.2±0.5	26.8±0.6	28.4±1.3	27.0±0.8	**		
Σ mono-unsaturated	12.4±0.1	12.2±0.1	13.2±0.1	12.9±0.2	***	*	
Σ n-6	36.7±0.4	25.5±0.3	35.6±0.3	22.2±0.3	***	***	
Σ n-3	21.0±0.5	35.5±0.7	22.7±0.8	34.6±0.5		***	

Values are mean±SE ($n=4$). Statistical significance of temperature (*t*), diet (*d*) and interaction (*i*) are indicated (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$) and values having different letters indicate that treatments are significantly different.

LH and HH d-45 larvae *versus* 3.7 and 9.7% FAME in LH and HH diets respectively). Moreover, HH groups contained a higher HUFA content than LH ones in PL as well as in NL. All fatty acid levels in larvae were significantly affected by diet ($P<0.001$). Several significant influences of temperature were also observed on 18:3n-6, 18:3n-3 and 20:5n-3 contents in NL, and on 18:2n-6, 20:4n-6, 18:3n-3 and 20:5n-3 contents in PL, inducing less dramatic differences than diets. Significant interactions also occurred on 20:5n-3 in PL (lower in HH larvae at 22 °C than at 16 °C), and on 18:3n-6 in NL content (higher in LH larvae and lower in HH larvae at 22 °C than at 16 °C). The 18:3n-6 content was higher in LH larvae than in HH ones ($P<0.001$; in NL as well in PL) and than in their diet (0.1% FAME).

4. Discussion

The main objective of this study was to assess whether it was possible to enhance $\Delta 6D$ expression in sea bass larvae through different rearing strategies based on a lowering in dietary HUFA supply and rearing temperature.

As expected, high temperatures lead to major increase in mass gain as well as growth in length and, to a less extend, to final biomass. Positive effect of temperature on larval growth performances has already been described in several studies (Fuiman et al., 1998; Koumoundouros et al., 2001) and could be due to an increase of feed intake with temperature as demonstrated by Person-Le Ruyet et al. (2004) in sea bass juveniles. Growth was also influenced by diet and we observed the same ranking of experimental conditions: HH22>LH22>HH16>LH16. As HH and LH diets were isoproteic and isolipidic, significant effect of diet on fresh body weight could only be attributed to their n-3 HUFA content. Our results are in concordance with Zambonino Infante and Cahu (1999), who found that d-38 sea bass larvae fed with a similar diet to HH one, and reared at 19 °C, had a mean fresh body weight of about 20 mg. Le Milinaire (1984) suggested that a significant effect of dietary HUFA on larval growth was the consequence of the high larvae HUFA requirement needed for high cellular turn-over.

The relatively high level of n-3 HUFA measured in PL *versus* NL is in accordance to the preferential

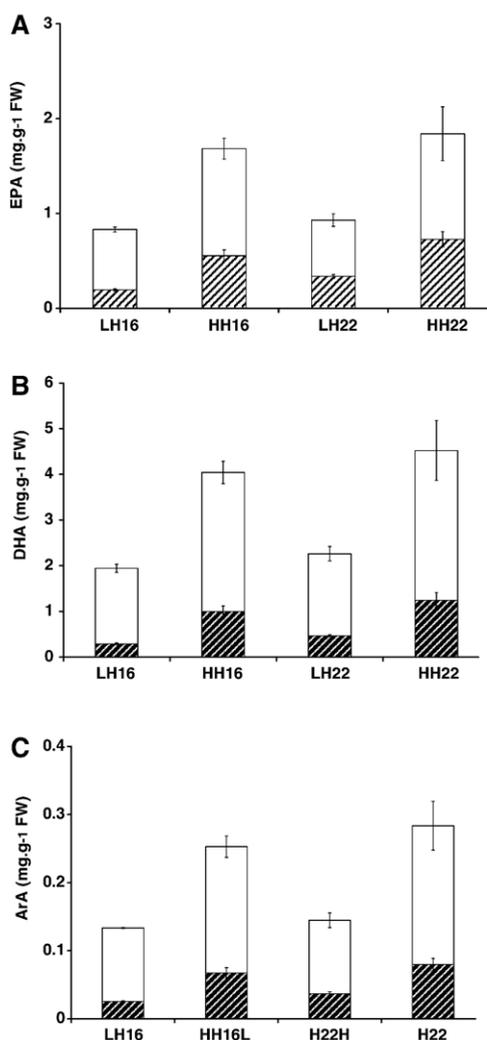


Fig. 6. Quantities of DHA, EPA and arachidonic acid (ArA) in d-45 larvae, expressed as mg g^{-1} Fresh Weight (mean \pm SE), in TL (total bar) and NL (dashed part) for each experimental conditions; quantities in PL being estimated by difference (white part).

incorporation of these FA in PL contributing to maintenance of phospholipid quality, as described by [Linares and Henderson \(1991\)](#). However, despite high selectivity of DHA in PL and higher DHA content in larvae than in diets, DHA content measured in PL of LH larvae remained low (near 14%) compared to HH larvae, revealing an n-3 deficiency in this group. This was also low compared to DHA PL content in European sea bass juveniles (higher than 20% in fish fed at or above requirement, [Skalli and Robin, 2004](#)). The n-3 HUFA content in LH diet (1.1% DM) was higher than the requirement level for juveniles determined at 0.7% DM by [Skalli and Robin \(2004\)](#). Total FAME contained in larvae was low compared to lipid content currently

observed in juveniles, indicating either intense energetic utilization of dietary FA or imperfect lipid digestion. Requirement of HUFA should cover PL increase with growth and losses induced by turn over ([Robin and Skalli, 2007](#)), which should be both more intense in larvae than in juveniles according to relative growth.

Larval skeletal development was highly influenced by temperature and developmental stages were more advanced in larvae reared at 22 °C than in those conditioned at 16 °C, which is in accordance with results of [Koumoundouros et al. \(2001\)](#) on sea bass larvae. However, a lower total length for a same developmental stage was observed: stage F was reached by 11 mm-larvae reared at 20 °C, while in our study, stage F was reached by fish measuring 16 mm and reared at 22 °C. These differences could be the consequence of differences in the strain or storage procedure used.

Amylase and trypsin secretions measured in pancreas were not significantly different between d-25 and d-45, which indicated that pancreatic maturation was already achieved at d-25, independently of dietary HUFA and rearing temperature. This is in agreement with [Zambonino Infante and Cahu \(2001\)](#), who found that secretory function of exocrine pancreas progressively develops and becomes efficient after the third week of life (*i.e.* d-21). Trypsin and amylase activities can be detected at d-3 post-hatching, before mouth opening, which suggests that those activities were not induced by food ([Zambonino Infante and Cahu, 1994](#)).

The AP/leu-ala ratio is an indicator of the intestinal maturation revealed by the onset of brush border membrane digestion by enterocytes, concurrently with the decline of cytosolic digestion. This leads to the enhancement of membranous enzymatic activities (AP and LAP) and to the decrease of cytosolic enzyme activities (leu-ala; [Zambonino Infante and Cahu, 1994](#)). Our study showed that low temperature combined with low dietary HUFA delayed intestinal maturation during all larval stages, while low temperature combined with high dietary HUFA conducted to a late maturation only at d-25 and then larvae compensated at d-45 for this initial maturation retardation. [Zambonino Infante and Cahu \(1999\)](#) already demonstrated the significant effect of dietary HUFA on intestinal maturation of sea bass larvae and showed that an earlier maturation of enterocytes was induced by diets containing more than 2.7% EPA+DHA (HH diet was 2.2%). Lipase and PLA₂ are lipolytic enzymes revealed in very young larvae (d-15). Lipase gene relative expression was significantly different in all groups while its enzymatic activities detected by a non-specific method were equivalent, which suggested the existence of a post-transcriptional regulation independent

of temperature and dietary HUFA and that could be under hormonal control as demonstrated in mammals (Ying et al., 1993), and as evoked for fish by Zambonino Infante and Cahu (1999). However, the use of a non-specific method to measure enzymatic activity means that other enzymatic activities were measured, such as esterase activities. This could hide the real lipase enzymatic activity and explain that non significant differences occurred between groups.

The significant increase in 18:3n-6 content in LH larvae indicated a desaturation from 18:2n-6 by the $\Delta 6D$. This result was supported by the higher relative expression of $\Delta 6D$ measured in LH larvae compared to HH ones during all the larval stage, which indicated the stimulation of this gene transcription by the HUFA deprived diet, independently of temperature. Nutritional modulation of $\Delta 6D$ gene has already been described in gilthead seabream by Seiliez et al. (2003), who identified 18:2n-9, *i.e.* the $\Delta 6D$ desaturation product of dietary 18:1n-9, and by Vagner et al. (in press), who measured a significant increase in $\Delta 6D$ gene expression in sea bass juveniles fed a HUFA deprived diet. $\Delta 6D$ and $\Delta 5D$ desaturation capacity were shown by Mourente and Tocher (1994) in starved gilthead seabream juvenile and by Mourente et al. (2005) in European sea bass.

Transcription of $\Delta 6D$ gene is modulated by both peroxisome proliferators (PP) and sterol binding element protein-1 (SREBP-1a and SREBP-1c) (for review see Nakamura and Nara, 2003). PP induce fatty acid oxidation enzymes and desaturases in rodent liver. However, the induction of desaturases by PP is slower than the induction of oxidation enzymes. This delayed induction could be a compensatory response to the increased HUFA demand caused by peroxisome proliferation and induction of FA oxidation (Nakamura and Nara, 2003). Dietary HUFA are ligands for PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), which form heterodimers with retinoid receptor (RXR) before acting on gene expression (James et al., 2003). It has been showed that the stimulation of the PPAR α was stronger in the presence of polyunsaturated fatty acids than with monounsaturated or saturated FA (Keller et al., 1993) and that diet supplemented with olive, corn, soybean or walnut oil (<20% of total calories) suppresses lipogenic expression (Ren et al., 1997). Our results demonstrated that PPAR α and PPAR β gene expressions were not affected neither by temperature nor by diet, which could reflect an adaptive response allowing cells to adjust the changes in the type of fat ingested for efficient cell growth and differentiation (Jump et al., 1996). However, as some post-transcriptional regulations occur, PPARs enzymatic activities could differ from PPARs gene expressions and could be responsible

for the stimulation of $\Delta 6D$ gene expression. SREBP-1 activates genes for FA synthesis in liver. Sterol regulatory element (SRE) is required for activation of the human $\Delta 6D$ gene by SREBP-1. Moreover, the same SRE also mediates the suppression of the $\Delta 6D$ gene by HUFA. In this study, the inhibition of $\Delta 6D$ gene by HUFA was clearly shown. However, the delayed activation by PP was not found as the expression of PPAR was the same in all groups and their activities were not measured. This could explain that the sharp stimulation of the $\Delta 6D$ gene in larvae fed a HUFA deprived diet could be due to other mechanisms: at first, it is likely that SREBP-1a, which is normally high in dividing cells such as cell lines, is still expressed in larvae (a maintain of some primary features has been already observed in sea bass larvae) resulting in a possible synergistic stimulation by SREBP-1a and SREBP-1c (the form expressed in differentiated cells including hepatocytes). Second, the affinity between SRE and SREBP could have been stimulated (by post-transcriptional events) in fish fed the HUFA deprived diet. Finally, epigenetic modifications of the $\Delta 6D$ gene could have occurred in conditioned fish. Pontoglio et al. (1997) identified hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α), which is a homeoprotein that is expressed in liver, kidney, pancreas and digestive tract. They showed that HNF1 α could activate transcription through the participation in the recruitment of the general transcription machinery to the promoter, or through the remodelling of chromatin structure and demethylation that would allow transcription factors to interact with their cognate *cis*-acting elements.

The high HUFA requirement in marine fish species was hypothesized as an inability to produce HUFA from precursors (18:3n-3 and 18:2n-6), but results obtained in these studies lead to modulate this hypothesis. Some fatty acid biotransformation capacities are potentially present in marine fish and can be stimulated by diet deficiency, but remain insufficient to cover the needs. Some post-transcriptional regulation may also occur, which can lead to a difference between the $\Delta 6D$ enzymatic activity and the $\Delta 6D$ gene expression. In consequence, our results have to be completed by the enzymatic activity measurements.

5. Conclusion

This study clearly showed that even though the existence of $\Delta 6D$ gene expression modulation, sea bass was not able to offset the effects of insufficient dietary HUFA on growth and PL fatty acid content. Larvae tended to adapt to an n-3 HUFA deprived diet by stimulation of enzymatic pathways for HUFA

desaturation independently of rearing temperature. Nevertheless, the measurement of $\Delta 6D$ enzymatic activity is required to better understand desaturation–elongation process under extreme HUFA contents in diets. It could also be interesting to know if the $\Delta 6D$ gene expression responds to a dietary HUFA gradient and in which tissue level this modulation occurs. Further studies will also be undertaken to check whether an enhanced $\Delta 6D$ expression could be maintained in juveniles allowing them to modulate $\Delta 6D$ expression in response to variations of dietary HUFA levels.

Acknowledgements

This work was supported by an IFREMER (French Institute of Sea Research and Exploitation) and an INRA (National institute of Agronomic Research) grants to the first author. We are grateful to N. Le Bayon, H. Le Delliou, M.M. Le Gall, J. Moriceau, P. Quazuguel and A. Severe for their technical assistance.

References

- Association of Official Analytical Chemists, 1984. In: Williams, S. (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. AOAC, Arlington, VA. 1141 pp.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid calorimetric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213–222.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245–258.
- Cho, H.P., Nakamura, M., Clarke, S.D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J. Biol. Chem.* 274, 37335–37339.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264–267.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fuiman, L.A., 1997. What can flatfish ontogenies tell us about pelagic and benthic lifestyles? *J. Sea Res.* 37, 257–267.
- Fuiman, L.A., Polling, K.R., Higgs, D.M., 1998. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia* 1998, 602–611.
- Gause, W.C., Adamovicz, J., 1994. The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* 3, 123–135.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.* 118, 515–520.
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of the red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59–69.
- James, S.Y., Lin, F., Kolluri, S.K., Dawson, M.I., Zhang, X.K., 2003. Regulation of retinoic acid receptor β expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands in cancer cells. *Cancer Res.* 63, 3531–3538.
- Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., Limatta, M., Ren, B., Badin, M., 1996. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog. Lipid Res.* 35, 227–241.
- Kanazawa, A., 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish nutrition in practice, Les Colloques*, vol. 61. Ed. INRA, Paris, pp. 519–530.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., Wahli, W., 1993. Fatty acids and retinoids control metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2160–2164.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M., 1999. Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae). *Mar. Biol.* 136, 561–572.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Anezaki, L., Kentouri, M., 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar. Biol.* 139, 817–830.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107–121.
- Le Milinaire, C., 1984. Etude du besoin en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifère *Brachionus plicatilis*. Université de Brest, France. 168 pp.
- Linares, F., Henderson, R.J., 1991. Incorporation of ^{14}C -labelled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) in vivo. *J. Fish Biol.* 38, 335–347.
- Lodemel, J.B., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., Espelid, S., Ringo, E., 2001. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquac. Res.* 32, 935–946.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221–234.
- Metais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.* 26, 133–142.
- Mourente, G., Tocher, D.R., 1994. In vivo metabolism of [^{14}C] linolenic acid (18:3n-3) and [^{14}C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in marine fish: time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 109–118.
- Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2005. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and oxidation of [^{14}C]18:3n-3 and [^{14}C]20:5n-3 in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248, 173–186.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2003. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *PLEFA* 68, 145–150.
- Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63, 110–117.

- Olsen, R.E., Henderson, R.J., McAndrew, B.J., 1990. The conversion of linoleic acid and linoleic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by *Tilapia* (*Oreochromis nilotica*) in vivo. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 261–270.
- Parpoura, A.C.R., Alexis, M.N., 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquac. Int.* 9, 463–476.
- Person-Le Ruyet, J., Skalli, A., Dulau, B., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Robin, J.H., 2004. Does dietary n-3 highly unsaturated fatty acids level influence the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to a high temperature? *Aquaculture* 242, 571–588.
- 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.
- Pontoglio, M., Faust, D.M., Doyen, A., Yaniv, M., Weiss, M.C., 1997. Hepatocyte nuclear factor 1alpha gene inactivation impairs chromatin remodelling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4948–4956.
- Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzales, F.J., Jump, D.B., 1997. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J. Biol. Chem.* 272, 26827–26832.
- Ringo, E., Lodemel, J.B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T.M., Olsen, R.E., 2002. The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida*. *Aquac. Res.* 33, 591–606.
- Robin, J.H., Peron, A., 2004. Consumption vs. Deposition of essential fatty acids in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae fed semi-purified diets. *Aquaculture* 238, 283–294.
- Robin, J.H., Skalli, A., 2007. Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) — a methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 263, 227–237.
- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183–198.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
- Seilliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta-6 desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., B* 130, 83–93.
- Seilliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a Δ 6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 135 (B), 449–460.
- Sfakianakis, D.G., Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M., 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L.1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* 232, 407–424.
- Skalli, A., Robin, J.H., 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399–415.
- Taylor, W.R., Van Dyke, G.C., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn* II 9, 107–119.
- Vagner, M., Zambonino Infante, J.L., Robin, J.H., Person-Le Ruyet, J., Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? *Aquaculture* in press (corrected proof, available online 30 January 2007).
- Ying, Z., Tojo, H., Nonaka, Y., Okamoto, M., 1993. Cloning and expression of phospholipase A_2 from guinea pig gastric mucosa: its induction by carbachol and secretion in vivo. *Eur. J. Biochem.* 215, 91–97.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 399–408.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129, 1195–1200.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol., C* 130 (4), 477–487.
- Zheng, X., Seilliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Δ 6-desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 139B, 269–279.

PARTIE 2

Capacité d'adaptation des juvéniles à un aliment carencé en HUFA n-3 selon le conditionnement nutritionnel et thermique des larves

Résumé

Est-il possible d'influencer le métabolisme des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) par un conditionnement larvaire ?

Cette expérience fait suite à l'expérience précédente décrite dans l'article 1. Quatre groupes de larves ont été élevés pendant 45 jours à 16 ou 22°C et nourris dès l'ouverture de la bouche avec deux aliments composés différents par leur teneur en HUFA n-3: LH (0,8% EPA+DHA) et HH (2,2% EPA+DHA). Au cours d'une période intermédiaire de trois mois, les quatre lots ont été nourris avec un aliment commercial riche en HUFA n-3 (2,7% EPA+DHA) et élevés à 19°C. A la suite de cette période, l'adaptabilité des quatre groupes initiaux à un aliment expérimental sub-carencé en HUFA n-3 (0,5% EPA+DHA) a été testée pendant 60 jours (J151-211). La température a été stabilisée à 19°C, correspondant à la moyenne des deux températures utilisées lors du conditionnement larvaire. Les quatre conditions expérimentales étaient ex-HH22 et ex-LH22 pour les deux groupes initialement élevés à 22°C (poids initial : 11,1±0,5 g), et ex-HH16 et ex-LH16 pour ceux élevés à 16°C au cours du stade larvaire (poids initial : 7,3±0,5g). L'aliment juvénile carencé en HUFA n-3 a été obtenu par incorporation de 8% d'huile de colza et de 50% de farine de lupin (protéines totales : 52% MS et lipides totaux : 17% MS). Les juvéniles ont été nourris *ad libitum* et la prise alimentaire a été mesurée tout au long de l'expérience.

A l'issue de l'expérience (J-211), le taux de survie était de 100% et le poids frais a été multiplié par 1,6-2 en 60 jours. La croissance pondérale était similaire dans tous les groupes, aucune différence entre les pentes des courbes de croissance (P=0,7). Les teneurs en lipides corporels des poissons J-211 étaient du même ordre de grandeur pour chacun des groupes (13-15% du poids frais). La composition en acides gras des phospholipides (PL) et des lipides totaux (TL) était significativement affectée par le poids initial des juvéniles résultant du conditionnement larvaire. Ceci pourrait être attribué à un effet de dilution, c'est-à-dire à l'impact du contenu initial en acides gras des poissons sur le contenu final en fonction du gain de poids au cours de l'expérience. La teneur en DHA des PL était plus élevée dans les groupes ex-LH que dans les ex-HH, quel que soit le conditionnement thermique des larves.

Ceci pourrait indiquer que les ex-LH ont eu une meilleure capacité à s'adapter à un aliment déficient en HUFA que les ex-HH.

Le niveau d'ARN de la delta-6 desaturase ($\Delta 6D$) a significativement augmenté lors de la première moitié de l'expérience (J-151-181) chez les ex-LH, comparé aux niveaux mesurés chez les ex-HH ($P < 0,001$). Ceci suggère une stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ par un aliment pauvre en HUFA exclusivement pendant une période transitoire (pas de différences significatives entre les groupes de J-181 à J-211). La stimulation de la première étape de désaturation par la $\Delta 6D$ permettrait la synthèse des acides gras nécessaires pour compenser le faible apport en HUFA n-3 par l'aliment.

Cette expérience a montré que l'utilisation d'un conditionnement nutritionnel spécifique (carence en HUFA) des larves a permis d'orienter le métabolisme lipidique des juvéniles de bar. Cependant, aucune répercussion sur les performances de croissance n'a été observée, malgré des différences entre les poids moyens en début d'expérience résultant du conditionnement larvaire (température x HUFA n-3).

Chez les juvéniles pré-conditionnés avec un aliment déficient en HUFA, une stimulation transitoire des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA en réponse à un aliment juvénile carencé en HUFA a été mesurée. Il serait intéressant d'essayer d'amplifier la réponse métabolique obtenue, ce qui fait l'objet du prochain chapitre.



Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage?

M. Vagner*, J.L. Zambonino Infante, J.H. Robin, J. Person-Le Ruyet

UMR 1067 INRA-Ifremer-Bordeaux 1, Ifremer Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané France

Received 10 November 2006; received in revised form 19 January 2007; accepted 22 January 2007

Abstract

The purpose of this study was to check if it is possible to influence sea bass juvenile metabolism by a conditioning of larvae from day 6 post hatching to day 45 to a low or a high HUFA compound diet (LH, 0.8% EPA+DHA and HH, 2.2% EPA+DHA) when reared at 16 or 22 °C. Following a 3-month intermediate period (at 19 °C using a commercial diet), the adaptability of the 4 initial larval groups to a HUFA experimental deprived diet (0.5% EPA+DHA) were tested at 19 °C in a 60 day-experiment (d-151–211). The four experimental duplicated conditions were ex-LH16 and ex-HH16 for the 2 groups previously reared at 16 °C (initial weight, 7.3±0.5 g) and ex-LH22 and ex-HH22 for the 2 groups previously reared at 22 °C (initial weight, 11.1±0.5 g). Survival was maximal and there was a 1.6–2 fold increase in mass during the experiment. Growth was similar in the 4 experimental groups: NS difference in growth curve slopes ($P=0.7$). At the end of the experiment (d-211), whole body fat levels were in the same range in all groups (13–15% WW). The fatty acid (FA) composition in polar lipids (PL) and total lipids (TL) were significantly affected by initial weight related to larvae conditioning, which can be mainly attributed to a dilution effect (impact of initial FA content on final FA content versus relative mass increase during the course of the experiment). Conversely to this trend, DHA content in PL was higher in the ex-LH groups than in the ex-HH groups whatever thermal conditioning of larvae was. This indicated that ex-LH groups had a better capacity to adapt to a deficient HUFA diet than ex-HH fish. The relative expression of the delta-6 desaturase ($\Delta 6D$) was significantly higher in ex-LH than in ex-HH groups ($P<0.001$) between d-151 and d-181, which suggested that $\Delta 6D$ transcription in ex-LH groups was positively modulated by the HUFA-deprived diet. This stimulation of the first step of the desaturation/elongation pathway could allow synthesizing FA needed to compensate low dietary HUFA supply. This study shows for the first time that it seems possible to influence juvenile fish metabolism by a nutritional conditioning during the larval stage. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aquaculture; Delta-6 desaturase; *Dicentrarchus labrax*; HUFA; Programming concept

1. Introduction

In contrast to freshwater fish, marine fish require the presence of preformed highly unsaturated fatty acids

(HUFA) in their diet as they have a low capacity to bioconvert 18 carbon fatty acids (linoleic 18:2n-6 and linolenic 18:3n-3) into HUFA with 20 or 22 carbons (arachidonic 20:4n-6, eicosapentaenoic EPA 20:5n-3 and docosahexaenoic acid DHA 22:6n-3), (Kanazawa et al., 1978; Mourente and Tocher, 1994). The first step of this bioconversion requires the presence of the delta-6 desaturase gene ($\Delta 6D$), which has been cloned in several

* Corresponding author. Tel.: +33 298 224 400; fax: +33 298 224 653.

E-mail address: mvgagner@ifremer.fr (M. Vagner).

freshwater species such as zebrafish (AF309556), common carp (AF309557), rainbow trout (Seiliez et al., 2001). $\Delta 6D$ gene has also been cloned in two marine fish species: gilthead seabream and turbot (Seiliez et al., 2003; Zheng et al., 2004). In gilthead seabream, an enhanced expression of the gene was obtained by feeding juveniles a HUFA-free diet. It has been previously showed by Cho et al. (1999) and Seiliez et al. (2001) that dietary HUFA inhibits $\Delta 6D$ gene expression in mammals and rainbow trout. The deficiency in $\Delta 6D$ activity observed in marine fish can be related to the abundance of n-3 HUFA in the marine food chain, which has induced an adaptation (Sargent et al., 1995) or a repression of desaturase activity (Olsen et al., 1990).

Until now, the main difficulty to meet the dietary n-3 HUFA requirement occurred in larvae fed living prey (Sargent et al., 1999). Specifically EPA and DHA are required for growth and play a major role in vision and brain development (Bell et al., 1996b; Sargent et al., 1997). As long as fish oil and fish meal represent the primarily ingredients of aquafeeds, juvenile HUFA requirements are easily covered. However, the rapid increase in farmed fish production in addition to the decline in natural stock has led to look for substitutes for fish products commonly used in aquafeeds (Lodemel et al., 2001; Ringo et al., 2002). Incorporation of vegetable feedstuffs in fish feeds constitutes at the present time, the only solution in Europe, although these vegetable feedstuffs do not contain adequate n-3 HUFA to cover marine fish requirements except C18 HUFAs which may disturb fish physiology (Bell et al., 1996a,b; Parpoura and Alexis, 2001). In European sea bass juveniles, the minimal dietary n-3 HUFA requirement to sustain maximum growth is 0.7% dry matter (DM; Skalli and Robin, 2004), indicating that only some marine feedstuffs (fish meal or fish oil) can fulfil this requirement. There is also considerable interest in producing fish selected for their capacity to use vegetable feedstuffs as incorporation of these feedstuffs in high proportion in feeds usually lead to a decrease in fish dietetic quality expressed in terms of n-3 HUFA flesh content (Regost et al., 2003). This could be possible by applying a metabolic programming, using a nutritional and thermal conditioning during the young stage, as described in mammals (Lucas, 1998). The concept of metabolic programming is defined as an adaptive process at the cellular, molecular or biochemical level occurring during very young stages of organism development and which durably modify the genomic expression in the adult. In the rat, it has been shown that nutritional and thermal conditioning during young stages had consequences on survival, growth, learning process,

lipid and glucoid synthesis (Lucas, 1998). In marine fish, several studies have shown the importance of temperature and trophic conditions on larval development, maturation of digestive functions, growth and larval quality (Bergeron and Person-Le Ruyet, 1997; Koumoundouros et al., 2001; Zambonino Infante and Cahu, 2001; Cahu et al., 2003; Lopez-Albors et al., 2003; Robin and Vincent, 2003). Since this adaptive process occurs during ontogenesis, the adaptability of juveniles could be modulated by larval "history".

The aim of this study was to determine if it is possible to influence European sea bass juvenile metabolism by a nutritional (HUFA) and thermal conditioning during larval development and specially if it is possible to modulate the $\Delta 6D$ expression.

2. Materials and methods

2.1. Rearing conditions and experimental design

Replicated groups of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae were initially reared at 16 or 22 °C and fed microparticulated diets from mouth opening (day 6 post-hatching, d-6), with a low (LH) or high (HH) HUFA content (0.8 and 2.2% EPA+DHA on dry matter basis, respectively). The four experimental conditions applied to larvae up to day 45 (d-45) were LH16, HH16, LH22 and HH22. The larval period was followed by an intermediate period of three months (d-46 to d-141) during which the four groups were separately held at 19 °C and fed a commercial diet with 2.7% EPA+DHA (DM basis).

At the end of this initial conditioning period, juveniles of each group were anaesthetised (ethylene-glycol-monophenylether, 0.15‰), individually weighed and then fish around the modal class were selected. At d-141, graded-fish were randomly distributed in square tanks, with an effective volume of 60 l, in order to obtain a similar biomass per condition: 5 tanks per condition with 75 fish per tank for the initial 16 °C groups (ex-HH16 and ex-LH16) and 40 fish per tank for the initial 22 °C group (ex-HH22 and ex-LH22). They were acclimated in the experimental unit for 10 days at the same temperature and diet as for the intermediate period (19 °C; commercial 2.7% EPA+DHA diet).

At d-151, 4 tanks per group were supplied with an experimental HUFA deprived diet (0.5% EPA+DHA, Table 1) and the last one was fed as previously in order to evaluate, from a qualitative point of view, the delay in growth induced by the deprived diet (this group was named qualitative reference, QR). Fish were hand fed to visual satiation at 09:00 and 15:00 h in order to avoid feed waste. All tanks were supplied with running

Table 1

Formulation (g 100 g⁻¹) and chemical composition (% DM) of the experimental HUFA-deprived diet and the commercial diet

Ingredients ^a	Experimental diet	Commercial diet
Lupin without pellicle	50	
Fish meal LT 94	20	
Wheat amygluten 110	7	
Fish hydrolysate CPSP 90	8	
Vitamin mixture ^b	1	
Mineral mixture ^c	1	
Methionine	0.2	
Precooked starch	4.8	
Rapeseed oil	8	
<i>Chemical composition</i>		
Dry matter (%)	93.4	90.8
Crude protein (% DM)	52.1	55.2
Crude fat (% DM)	16.8	12.6
Ash (% DM)	6.5	12.3
n-3 HUFA (% DM)	0.48	2.68

^a Sources: lupin without pellicle: Le Gouessant® aquaculture (Lamballe, France); fish meal LT 94: Norse (Fyllingsdalen, Norway); wheat amygluten 110: Chamtor Vitalor (Bazancourt, France); fish protein hydrolysate CPSP 90: Sopropêche (Boulogne sur mer, France); precooked starch: Prégéflo Roquette frères (Lestrem, France).

^b Vitamin mixture (g kg⁻¹ vitamin mix): retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 2.5; DL- α -tocopheryl acetate, 5; menadione, 1; thiamin-HCL, 0.1; riboflavin, 0.4; D-calcium panththenate, 2; pyridoxine-HCL, 0.3; cyanocobalamin, 1; niacin, 1; choline, 200; ascorbic acid (ascorbyl polyphosphate), 5; folic acid, 0.1; D-biotin, 1; meso-inositol, 30.

^c Mineral mixture (g kg⁻¹ mineral mix): KCL, 90; KI, 0.04; CaHPO₄ 2H₂O, 500; NaCl, 40; CuSO₄ 5H₂O, 3; ZnSO₄ 7H₂O, 4; CoSO₄, 0.02; FeSO₄ 7H₂O, 20; MnSO₄ H₂O, 3; CaCO₃, 215; MgOH, 124; Na₂SeO₃, 0.03; NaF, 1.

seawater at 19 °C, 34.5‰, 12L:12D light cycle. Water flow rate was 600% per h, which stabilized oxygen concentration around 90±5% saturation and prevented ammonia accumulation. The experiment lasted until the fish final weight was at least twofold the initial weight (2 months, d-211).

2.2. Sampling procedures

Fish were fasted for 12 h and water volume was lowered prior to random sampling using an appropriate net.

To measure $\Delta 6D$ gene expression, 9 fish per experimental condition (3 fish × 3 tanks) were taken at d-151, d-181 and d-211, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until assayed. The expression of $\Delta 6D$ (accession number: AJ715505) was measured in livers.

For body composition and lipid analysis, additional fish were taken at the start and end of the experiment

(d-151 and 211); they were previously anaesthetised (ethylene-glycol-monophenylether 0.15‰), individually weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C pending analysis. 8 fish for ex-16 groups and 6 fish for ex-22 groups were taken from 2 tanks per experimental condition at d-151, and from all tanks per condition at d-211 ($n=4$ tanks per experimental condition).

Growth was estimated by weighing individually all anaesthetised fish every two weeks (± 0.1 g). Growth index and feeding parameters were calculated for the 60-day-experiment (d-211) as follow:

$$SGR_{d-151-d-211} = 100 \times (\ln w_{d-211} - \ln w_{d-151}) \text{day}^{-1} \quad (1)$$

where SGR in % day⁻¹, w_{d-151} and w_{d-211} are the initial and final mean body weights, respectively.

As some fish were regularly removed from the tanks, daily feed intake (FI) and apparent feed conversion ratio (FCR) were calculated taking into account the average mass for d-151–d-211 period, using the following expressions:

$$FI_{d-151-d-211} = 100 \times [\text{mean daily mass of dry feed ingested (g)} \times \text{mean wet fish mass}^{-1}(\text{g})] \quad (2)$$

where: FI in % day⁻¹, mean fish mass = (fish mass at d-211 + fish mass at d-151) 2⁻¹, fish mass = mean body weight × fish number.

$$FCR_{d-151-d-211} = \text{dry feed ingested (g)} \times \text{fish mass gain}^{-1}(\text{g}) \quad (3)$$

2.3. Analytical methods

2.3.1. $\Delta 6D$ gene expression

Dissections were conducted on a glass plate maintained at 0 °C. The whole liver was extracted and the gall bladder was removed because it destructs RNAs. cDNAs were obtained in duplicate from total RNA by using a Quantitect Reverse Transcription kit with integrated removal of genomic DNA contamination (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using the iCycler iQTM (Bio-Rad® Laboratories Inc.). Quantitative PCR analyses for each gene were performed in triplicate for each cDNA duplicate (6 assays for each studied gene per experimental group), in a total volume of 15 μ l containing 5 μ l cDNA (dilution: 10–2), 0.5 μ l primers (10 μ mol/l), 7.5 μ l 2X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad®),

Hercules, CA). The specificity of forward and reverse primers of $\Delta 6D$ gene was checked by sequencing the amplicon (Table 2; Eurogentec, Labège, France). Thermal cycling was initiated with incubation at 95 °C for 13.5 min for activation of the hot-start enzyme, iTaq™ DNA polymerase. After this initial step, 45 cycles of PCR were performed. Each PCR cycle consisted of heating at 95 °C for 30 s for denaturing, at 60 °C for 1 min for annealing and extension. Cycle threshold values (CT) corresponded to the number of cycles at which the fluorescence emission monitored in real time exceeded the threshold limit. Standard curves were established for each gene by plotting the CT values against the log₁₀ of 5 different dilutions (in triplicate) of cDNA sample solutions. Real-time PCR efficiency E was determined for each gene from the given slopes in Bio-Rad® software, according to the Eq. (4):

$$E = 10[-1/\text{slope}] \quad (4)$$

We calculated the relative expression ratio of each gene using REST® software (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>). Relative expression ratio for a considered gene is based on the PCR efficiency (E) and the CT of a sample versus the control (standard group), and expressed in comparison to the reference gene (elongation factor EF-1), according to Pfaffl's mathematical model (Pfaffl, 2001)

$$\text{Ratio} = \frac{[(E_{\text{gene}})^{\Delta \text{CT}_{\text{gene}}(\text{control}-\text{sample})}]}{[(E_{\text{EF1}})^{\Delta \text{CT}_{\text{EF1}}(\text{control}-\text{sample})}]} \quad (5)$$

In this study, HH22 was used as the standard group because it was close to the rearing conditions in a fish farm. Normalization relative to EF1 provided a widely applicable value for comparative studies of gene expression at the mRNA level seeing that its expression is constant during activation and proliferation of cells (Gause and Adamovicz, 1994).

2.3.2. Fatty acid composition

Whole frozen fish were homogenised rapidly with a Hobart® mixer in order to keep a low temperature and then, more accurately using a Polytron® (PT 2100

Bioblock®). A representative portion (~5 g) was taken for lipid analysis and ~3 g were taken for dry weight measurement (105 °C in an oven for 24 h). Lipid analysis was conducted on triplicates at d-151 and on duplicates at d-211. Extraction of total lipids was done according to Folch et al. (1957), with chloroform being replaced by dichloro-methane. The separation of neutral and polar lipids was performed according to the procedure described by Juaneda and Roquelin (1985). The total lipid (TL) extracts were fractionated on silica cartridges (Sep-Pack, Waters®), neutral lipids (NL) were eluted by chloroform and polar lipids (PL) by methanol. Fatty acid methyl esters (FAME) of TL were prepared by saponification and then methylation while PL FAME were prepared by transmethylation with sulfuric acid in methanol. All FAME were separated by gas chromatography (Auto-system Perkin-Elmer® with a flame ionisation detector, BPX 70 capillary column: 25 m × 0.22 mm i.d. × 0.25 μm film thickness; split–splitless injector, with helium as carrier gas). The injector and detector temperatures were, respectively, 220 and 260 °C. Initial temperature of the oven was 50 °C, which increased to 180 °C by increment of 15 °C min⁻¹, maintained for 5 min, and then increased to 220 °C by increments of 3 °C min⁻¹. Data acquisition and handling were carried out by connecting the GLC to a PE Nelson computer. Individual FAMES were identified by comparing the retention times of authentic standard mixtures. The results of individual fatty acid composition were expressed as percent of total identified FAME.

Chemical analyses of feed were performed in triplicate for each sample according to AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1984) methods: ash (7 h at 550 °C), crude fat (Folch et al., 1957), crude protein (Dumas method with an Elementary NA 2000®, N × 6.25).

2.4. Statistical analysis

The data are presented as mean ± S.E. of the replicate groups. Concerning the weight gain between d-151 and d-211, regression curves were determined for each condition and they were compared using two-way ANOVA (Statistica®). Effects of temperature and diet on growth indices were tested using two-way ANOVA (Statistica®). Statistical differences in gene expression between control and samples 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 $P < 0.05$. Effects of temperature and diet on fatty acid composition were tested using two-way ANOVA

Table 2

Primer used for the Δ -6 desaturase gene expression analysis by RT-PCR

Forward: 5'–3'	(GCCCTATCATCACCAACACC)
Reverse: 3'–5'	(ACAGCACAGGTAGCGAAGGT)

(Statistica®). When significant interactions were observed, differences between means were compared by Newman–Keuls test, differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Growth performance

All groups of fish appeared healthy and survival was 100% at the end of the 60-day experiment (d-211).

The changes in mean weight versus time are shown in Fig. 1. There was a 1.6–2 fold increase in mass in the four experimental groups. Growth was linear as described by the equations reported in Fig. 1 legend and similar for all groups (NS differences observed between the curve slopes; $P = 0.7$).

As shown in Fig. 2, SGR and daily FI for all the experimental periods were affected by fish initial mean weight (Fig. 2A and B): SGR and FI decreased as initial weight increased. In comparison with the qualitative reference group (QR group) maintained on a commercial diet, SGR and FI of the 4 experimental groups were lower (75 and 96% of the QR group, respectively). The FCR (Fig. 2C) was in the same range regardless of fish size, 1.5 ± 0.1 , and it was higher than in the QR group (despite no comparison was possible).

3.2. Lipid and fatty acid composition

TL content of fish at d-211 was 12.9 ± 0.6 , 14.2 ± 0.9 , 14.8 ± 0.9 and $15.1 \pm 0.6\%$ wet weight in ex-LH16 group, ex-HH16, ex-LH22 and ex-HH22, respectively. More than 90% of the TL was NL. Since fish TL and

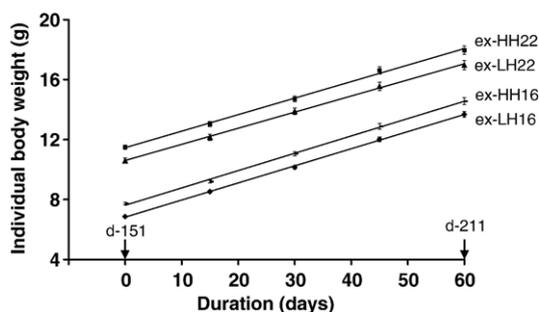


Fig. 1. Mean body weight (\pm SE) increase over time (d-151 to d-211) for the 4 experimental sea bass groups. Equation of each regression curve was: ex-HH22: $y = 0.12x + 11.30$; $R^2 = 0.9954$; $n = 632$. ex-LH22: $y = 0.11x + 10.45$; $R^2 = 0.9976$; $n = 632$. ex-HH16: $y = 0.12x + 7.45$; $R^2 = 0.9965$; $n = 948$. ex-LH16: $y = 0.12x + 6.66$; $R^2 = 0.9982$; $n = 716$.

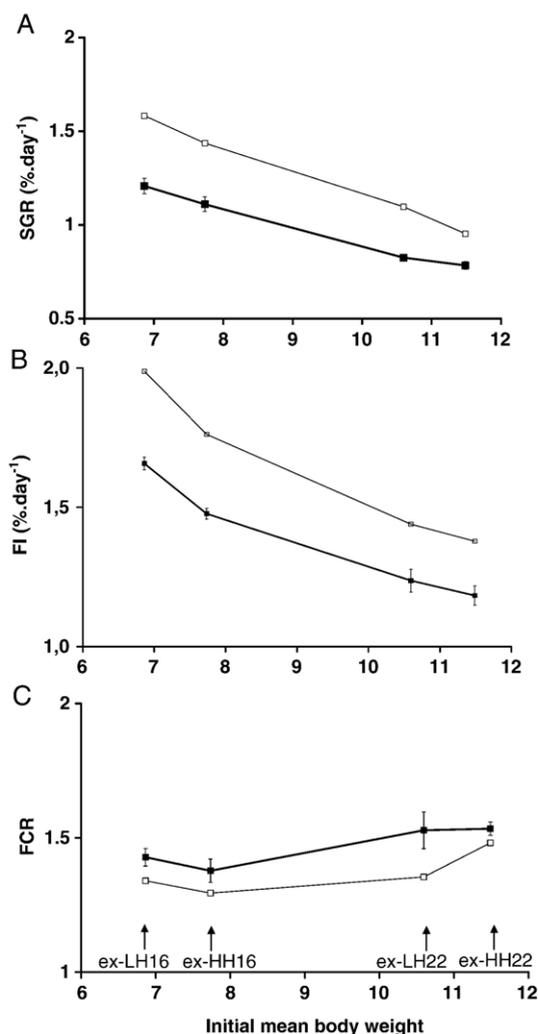


Fig. 2. Influence of initial mean body weight on SGR, FI and FC (2A: SGR; 2B: FI and 2C: FC) in the 4 experimental groups fed the HUFA-deprived diet (full symbols \pm SE) and in QR fed commercial diet (open symbols).

NL composition were comparable, NL profile is not presented in Fig. 3. Fig. 3A and B represents the PL and TL content of 4 polyunsaturated fatty acids at d-211. Linoleic acid (18:2n-6) content was higher in TL than in PL ($9.3 \pm 0.5\%$). Conversely, n-3 HUFA content was lower in TL than in PL.

In PL, the levels of n-3 HUFA and arachidonic acid (20:4n-6) were significantly higher in ex-22 °C ($P < 0.001$ and $P < 0.01$ for DHA) than in the ex-16 °C groups. Linoleic acid was significantly higher in the ex-16 °C groups ($P < 0.001$), a significant interaction ($P < 0.05$) was induced by a lower value in the ex-LH22 than in the ex-HH22 group, while no significant difference occurred within the ex-16 °C groups. The

DHA content in PL was higher in the ex-LH than in the ex-HH groups ($P < 0.05$).

In TL, the quantity of 18:2n-6 was significantly higher ($P < 0.001$) in the ex-16 °C groups, than in the ex-22 °C groups, and in the ex-LH groups than in the ex-HH groups ($P < 0.001$). DHA and EPA were affected by initial rearing temperature with higher contents for fish reared at 16 °C than at 22 °C ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), and also by larval diets with higher contents in the ex-HH than in the ex-LH groups ($P < 0.001$). This effect of larval diet affecting DHA in TL was opposite to that observed in PL. No significant differences were observed in 20:4n-6 content among groups.

Fatty acid (FA) composition of d-211 juveniles fed the HUFA deficient diet clearly differed from initial fish composition as well as from the composition of the QR group (at d-211) fed the commercial diet. These results are not reported in this study.

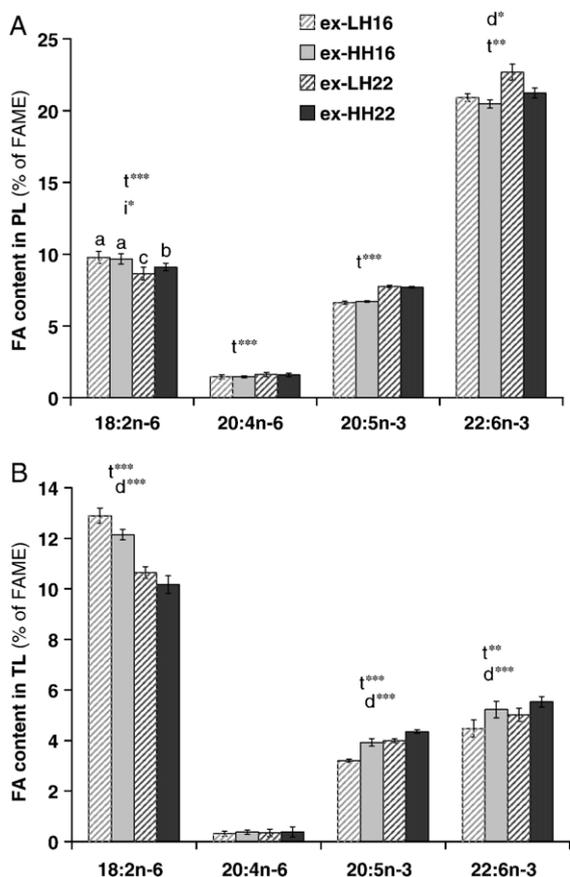


Fig. 3. Fatty acid content (mean±SE) in polar lipids, PL (A) and in total lipids, TL (B) at d-211. For each fatty acid represented, effect of temperature (t), diet (d) and interactions (i) are indicated: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. ($n = 4$ replicates for each conditions).

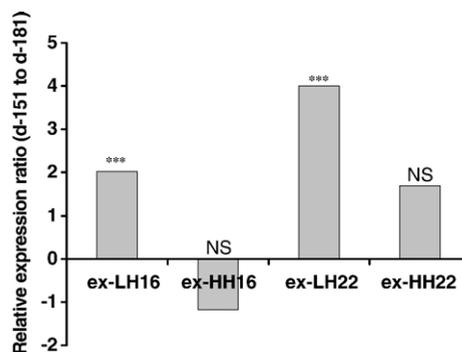


Fig. 4. Delta-6 desaturase expression variation in the 4 experimental groups from d-151 to d-181, respect to the larval conditioning ($n = 9$ at d-151 and d-181 for each condition). *** denotes a significant difference ($P < 0.001$), and NS a 'not significant difference' ($P > 0.05$).

3.3. $\Delta 6D$ gene expression

No amplification products were obtained in the negative control reactions (Fig. 4).

Between d-151 and d-181 of the experiment, the $\Delta 6D$ expression significantly increased in groups fed the LH diet during the larval stage by a factor of 2 in the ex-LH16 group and 4 in the ex-LH22 group ($P < 0.001$). In the ex-HH16 and ex-HH22 groups, this gene expression did not vary significantly with a factor of -1.2 and 1.7 , respectively. Between d-151 and d-211, the $\Delta 6D$ expression was not stimulated in any group with a factor of -7.61 , 1.09 , 1.09 and -1.19 in the ex-HH16, ex-HH22, ex-LH16 and ex-LH22 groups, respectively.

4. Discussion

This study brought new findings on the possibility to influence European sea bass juvenile metabolism by a nutritional conditioning during the larval stage. The nutritional conditioning was used to apply a metabolic programming, which is defined as an adaptive process at the cellular, molecular or biochemical level occurring during very young stages of organism development and, which durably modify the genomic expression in the adult. The strategy used in this study was to feed sea bass larvae a high or a low-HUFA diet at two temperatures, and an acclimation period to test the juveniles capacity to adapt to a HUFA-deprived diet (0.5% EPA + DHA). The HUFA-deprived diet used in this study was designed to be just below the requirement for n-3 HUFA (0.7% DM in 14 g sea bass; Skalli and Robin, 2004).

Growth of sea bass juveniles was not affected by the larval conditioning, despite a high difference in initial weight resulting from rearing temperature and HUFA content in diets during the larval stage (Vagner et al.,

unpublished results). Although weight increase was acceptable as it doubled during the 60-days experiment (Skalli and Robin, 2004), it was affected by the HUFA-restricted diet: in all experimental groups, growth was about 25% lower than in the qualitative reference (QR) groups. In the QR groups, growth was in the normal range for sea bass of this weight class (Skalli and Robin, 2004). Under similar conditions, it has been showed by Skalli and Robin (2004) that a decrease in n-3 HUFA from 0.7% to 0.5% DM in the diet leads to a decrease in growth of 10%. In this study, the relative growth decrease was higher than expected, which can be partly explained by some differences in feed composition, for example in this study dietary protein and lipid content was slightly lower than in the diet used by Skalli and Robin (2004) (52 instead of 54% DM and 16.8 instead of 18.1% DM, respectively). A substitution rate of 50% of the main protein sources with lupin meal did not lead to an adverse effect on growth both in sea bass and turbot (Burel et al., 2000; Person-Le Ruyet et al., 2004). Our results showed that sea bass juveniles had a high capacity to adapt to a HUFA-deprived diet (0.5% DM), which is in agreement with previous studies (Person-Le Ruyet et al., 2004; Skalli and Robin, 2004).

This study showed that fish metabolism can be modulated by larval life history. The significantly higher $\Delta 6D$ expression observed in the ex-LH groups than in the ex-HH groups indicated that FA desaturation was positively influenced in fish conditioned with a HUFA-deficient diet during larval stage. A $\Delta 6D$ activity has been shown in gilthead seabream by Tocher and Ghioni (1999) despite it is generally very low in marine fish compared to salmonids (Kanazawa, 1985). A nutritional modulation of the $\Delta 6D$ -like cDNA in a marine fish was demonstrated for the first time by Seiliez et al. (2003), who showed that the FA profile of gilthead seabream fed n-6 and n-3 FA deprived diets was characterized by high levels of $\Delta 6D$ desaturation products (18:2n-9 and 20:2n-9), combined with a high expression of the $\Delta 6D$ -like gene. The current study confirmed that it is possible to positively modulate the expression of this gene in sea bass juveniles fed a HUFA-deficient diet during larval development. Transcription of $\Delta 6D$ gene is modulated by both peroxisome proliferators (PP) and sterol binding element protein-1 (SREBP-1a and SREBP-1c) (for review see Nakamura and Nara, 2003). SREBP-1 activates genes for FA synthesis in liver. Sterol regulatory element (SRE) is required for activation of the human $\Delta 6D$ gene by SREBP-1. Moreover, the same SRE also mediates the suppression of the $\Delta 6D$ gene by HUFA. PP induced fatty acid oxidation enzymes and desaturases in rodent liver.

However, the induction of desaturases by PP is slower than the induction of oxidation enzymes. This delayed induction could be a compensatory response to the increased HUFA demand caused by peroxisome proliferation and induction of FA oxidation (Nakamura and Nara, 2003). In this study, the inhibition of $\Delta 6D$ gene by HUFA was clearly shown. However, the delayed activation by PP was not found (results not presented here), which could explain that the sharp stimulation of the $\Delta 6D$ gene in conditioned fish could be due to other mechanisms: at first, it is likely that SREBP-1a, which is normally high in dividing cells such as cell lines, is still expressed in conditioned larvae (a maintain of some primary features has been already observed in seabass larvae) resulting in a possible synergistic stimulation by SREBP-1a and SREBP-1c (the form expressed in differentiated cells including hepatocytes). Second, the affinity between SRE and SREBP could have been stimulated (by post-transcriptional events) in fish fed the HUFA deprived diet during larval stage. Finally, epigenetic modifications of the $\Delta 6D$ gene could have occurred in conditioned fish. Pontoglio et al. (1997) identified hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α), which is a homeoprotein that is expressed in liver, kidney, pancreas and digestive tract. They showed that HNF1 α could activate transcription through the participation in the recruitment of the general transcription machinery to the promoter, or through the remodeling of chromatin structure and demethylation that would allow transcription factors to interact with their cognate *cis*-acting elements.

As some post-transcriptional regulation occurs, the $\Delta 6D$ enzymatic activity may differ from the $\Delta 6D$ gene expression. So, our results have to be confirmed by enzymatic activity measurements. The stimulation in $\Delta 6D$ expression was not observed at the end of the experiment (d-211). This finding could be the consequence of an adaptation of the fish to the diet during the second period of the experiment d-181-d-211, revealing that the diet was not low enough in HUFA, and this was confirmed by the lack of breakdown in the growth curve. HUFA content in fish could be high enough to inhibit the $\Delta 6D$ gene expression. The stimulation in $\Delta 6D$ expression during the first period resulted from the diet change from a commercial feed (rich in HUFA, 2.7% EPA + DHA) to the experimental one (low level in HUFA, 0.5% EPA + DHA), suggesting that a significant expression of $\Delta 6D$ is only obtained and maintained during extreme nutritional conditions.

Whole body DHA content at the end of the experiment was only affected by larval life history. The high DHA content measured in the fish at the beginning of

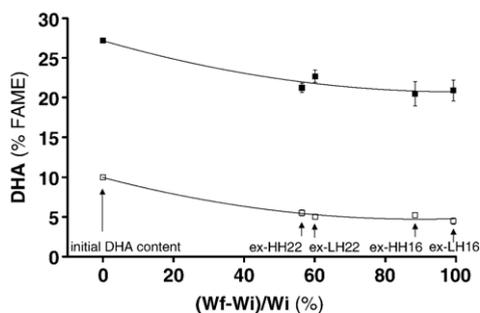


Fig. 5. Influence of relative growth: $(Wf - Wi)/Wi$ (where Wf = final weight and Wi = initial weight) on DHA content (mean \pm SE) in PL (full symbols) and LT (open symbols) in the 4 experimental groups fed the HUFA-deprived diet. Values at $X=0$ correspond to the initial fish weight previously fed on a commercial diet (for $X=0$, $n=3$ and for others X values, $n=4$ replicates of 8 fish per sample for the ex-16 groups and 6 fish for ex-22 groups). Equation of each polynomial curve was: PL: $y=0.0007x^2-0.117x+9.9766$; $R^2=0.9785$. LT: $y=0.0006x^2-0.128x+27.169$; $R^2=0.9492$.

the experiment (Fig. 5) was the consequence of feeding the rich-DHA commercial diet during the intermediate period. The differences observed in DHA content in PL as in TL at d-211 between the ex-22 and the ex-16 groups can be mainly explained by the higher relative growth of the smallest fish. The dilution of initial FA stores should affect the final FA content and this effect is growth dependent (Robin et al., 2003). Dilution effects could also partly explain the differences in DHA in TL between the ex-LH and the ex-HH groups but not in PL content. The observed minor differences in PL content could partly result from larval nutritional conditioning. The higher DHA content in PL measured in the ex-LH groups than in the ex-HH groups is concomitant with the increase in mRNA $\Delta 6D$ expression observed in the ex-LH juveniles. Increased $\Delta 6D$ gene expression could lead to an increase in $\Delta 6D$ enzymatic activity required for the first step of the bioconversion of 18 carbons into HUFA (20-22 carbons) and for bioconversion of EPA to DHA (Buzzi et al., 1997). The $\Delta 6D$ enzyme uses 18:3n-3 (alpha-linolenic acid) as a substrate, and transforms it in 18:4n-3 (stearidonic acid) adding a double bond. This first step of desaturation allows the subsequent formation of EPA and DHA (Cho et al., 1999). Produced DHA should be primarily incorporated in PL. The total quantity of PL in fish is relatively low (near 0.7% WW). It was estimated in the present experiment that 1% increase in DHA in PL required a production of about $0.4-0.5 \text{ pmole.mg protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ on whole fish basis. Such order of magnitude seems consistent with values measured in hepatocytes and enterocytes of sea bass fed on different diets (Mourante et al., 2005). However,

the validity of such comparison is difficult to assess. Other mechanisms, such as an improved capacity to incorporate DHA in PL, could also be involved. Compared to DHA, differences occurring for other FAs could be more related to weight increase than to a direct effect of larval conditioning. The high levels of DHA in PL versus TL, as well as the moderate decrease of DHA in PL of fish fed deficient diets are in accordance to the preferential incorporation of this FA in PL (Linares and Henderson, 1991). They are in the usual range in sea bass juveniles (Skalli and Robin, 2004) fed diets containing around 0.7% DM of n-3 HUFA. This study confirms that in this species, the minimal level of DHA in PL is about 20% of FAME (fatty acid methyl esters). Further studies are required to better understand the desaturation/elongation process, under more severe HUFA-deficient conditions, concomitantly measuring the specific enzymatic activity of the $\Delta 6D$ enzyme.

5. Conclusion

While no significant effect of larval life history on juvenile growth performances in terms of survival and weight gain were observed in this study, an effect of nutritional conditioning on lipid metabolism was evidenced in juveniles fed a HUFA-deficient diet (0.5% DM n-3 HUFA) by (i) a positive modulation of the $\Delta 6D$ transcription and (ii) by a higher capacity to regulate PL FAs when conditioned during the larval stage with a HUFA-deficient diet.

Acknowledgements

This work was supported by an IFREMER (French Research Institute for the exploitation of the Sea) and an INRA (National Institute of Agronomic Research) grants to the first author. We are grateful to N. Le Bayon, H. Le Delliou, M.M. Le Gall, J. Moriceau, P. Quazuguel and A. Severe for their technical assistance.

References

- Association of Official Analytical Chemists, 1984. In: Williams, S. (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. AOAC, Arlington, VA. 1141pp.
- Bell, J.G., Ashton, I., Secombes, C.J., Weitzel, B.R., Dick, J.R., Sargent, J.R., 1996a. Dietary lipids affects phospholipid fatty acid composition, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids 54, 173–182.
- Bell, M.V., McEvoy, L.A., Navarro, J.C., 1996b. Deficit of didocosahexaenoyl phospholipid in the eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. J. Fish Biol. 49, 941–952.

- Bergeron, J.P., Person-Le Ruyet, J., 1997. Teneur en ADN de la larve de *Dicentrarchus labrax*: évolution ontogénique et effet de la privation de nourriture. *Aquat. Living Resour.* 10, 307–314.
- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Bœuf, G., Van der Geyten, S., Mol, K.A., Kühn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M., Ribailleur, D., 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188, 363–382.
- Buzzi, M., Henderson, R.J., Sargent, J.R., 1997. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp. Biochem. Physiol.* 116B, 263–267.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Barbosa, V., 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid–neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.* 90, 21–28.
- Cho, H.P., Nakamura, M., Clarke, S.D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J. Biol. Chem.* 274, 37335–37339.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gause, W.C., Adamovicz, J., 1994. The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* 3, 123–135.
- Juaneda, P., Roquelin, G., 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and non-phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20, 40–41.
- Kanazawa, A., 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 281–298.
- Kanazawa, A., Teshima, S.I., Ono, K., 1978. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linoleic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B, 295–298.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Anezaki, L., Kentouri, M., 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar. Biol.* 139, 817–830.
- Linares, F., Henderson, R.J., 1991. Incorporation of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) in vivo. *J. Fish Biol.* 38, 335–347.
- Lodemel, J.B., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., Espelid, S., Ringo, E., 2001. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquac. Res.* 32, 935–946.
- Lopez-Albors, O., Ayala, M.D., Gil, F., Garcia-Alcazar, A., Abellan, E., Latorre, R., Ramirez-Zarzosa, G., Vasquez, J.M., 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juveniles stages. *Aquaculture* 220, 385–406.
- Lucas, A., 1998. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 128, 401S–406S.
- Mourente, G., Tocher, D.R., 1994. In vivo metabolism of [¹⁻¹⁴C] linolenic acid (18:3n-3) and [¹⁻¹⁴C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 109–118.
- Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2005. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and oxidation of [¹⁻¹⁴C]18:3n-3 and [¹⁻¹⁴C]20:5n-3 in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248, 173–186.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2003. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *PLEFA* 68, 145–150.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., McAndrew, B.J., 1990. The conversion of linoleic acid and linoleic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by *Tilapia* (*Oreochromis nilotica*) in vivo. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 261–270.
- Person-Le Ruyet, J., Skalli, A., Dulau, B., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Robin, J.H., 2004. Does dietary n-3 highly unsaturated fatty acids level influence the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to a high temperature? *Aquaculture* 242, 571–588.
- Parpoura, A.C.R., Alexis, M.N., 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquac. Int.* 9, 463–476.
- 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.
- Pontoglio, M., Faust, D.M., Doyen, A., Yaniv, M., Weiss, M.C., 1997. Hepatocyte nuclear factor alpha gene inactivation impairs chromatin remodelling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4948–4956.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean oil or linseed oil with return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 191–199.
- Ringo, E., Lodemel, J.B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T.M., Olsen, R.E., 2002. The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida*. *Aquac. Res.* 33, 591–606.
- Robin, J.H., Vincent, B., 2003. Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225, 463–474.
- Robin, J.H., Regost, C., Arzel, J., Kaushik, S.J., 2003. Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* 225, 283–293.
- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183–198.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1997. Requirement, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
- Seiliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta-6 desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 130B, 83–93.
- Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a Δ6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 449–460.
- Skalli, A., Robin, J.H., 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399–415.

- Tocher, D.R., Ghioni, C., 1999. Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl delta 5 desaturation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 34, 433–440.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 130C, 477–487.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Δ 6-desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 139B, 269–279.

CHAPITRE II

Essai d'amplification des mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles de bar par un challenge expérimental sévère

Objectifs

Les premiers travaux de thèse ont montré qu'il était possible de stimuler les capacités d'adaptation des juvéniles de bar à un aliment carencé en HUFA par incorporation de matières premières végétales en utilisant un conditionnement nutritionnel précoce, comme décrit chez les mammifères. Les effets mesurés, dans les conditions expérimentales utilisées, étaient transitoires (stimulation des mécanismes de désaturation des acides gras) ou inexistantes (performances de croissance). Il a paru intéressant de tenter d'amplifier la réponse métabolique obtenue en utilisant un challenge expérimental plus sévère : utilisation d'une gamme élargie de HUFA dans l'aliment larvaire, mise à l'épreuve plus précoce des juvéniles à partir d'un aliment plus fortement carencé en HUFA.

Les résultats obtenus lors de cette seconde série d'expérience sont présentés dans le troisième article (Life-lasting effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a range of dietary n-3 HUFA levels on the functioning of PUFA desaturation pathways) précédé d'un résumé en français (Partie 1).

Par ailleurs, afin de mieux étudier les mécanismes adaptatifs des juvéniles pré-conditionnés à des régimes carencés en HUFA, il a paru nécessaire de disposer du dosage enzymatique de la $\Delta 6D$, ce qui a justifié la mise au point de ce dosage au laboratoire en collaboration avec l'université de Stirling (Partie 2).

PARTIE 1

Effets d'un challenge expérimental sévère sur l'amplification des mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles

Résumé

Effet d'un challenge expérimental sévère sur l'amplification de la mise en place des mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles

Quatre groupes de larves ont été nourris de J-6 à J-45 avec les aliments XH (3,7% EPA+DHA), HH (1,7%), LH (0,7%) ou XLH (0,5%), différents par leur teneurs en HUFA n-3. Les teneurs en EPA+DHA des aliments larvaires expérimentaux ont été obtenues par l'incorporation d'1% d'huile de soja dans les aliments LH et XLH et par un gradient inverse de lécithine de soja et de lécithine marine dans les aliments XH, HH, LH et XLH (7, 16, 21 et 23% de lécithine de soja et 19, 9, 2 et 0% de lécithine marine respectivement). Les quatre conditions expérimentales de la phase larvaire étaient XH_I, HH_I, LH_I, XLH_I. Après la phase larvaire, les poissons ont été nourris avec un aliment commercial riche en HUFA (2,7% EPA+DHA) pendant un mois (période intermédiaire). Ensuite, la capacité d'adaptation à un régime fortement carencé en HUFA n-3 (0,3% EPA+DHA) des juvéniles issus des quatre lots initiaux a été testée pendant 35 jours. Cet aliment a été élaboré par l'incorporation de 6,6% d'huile de colza. Les quatre conditions expérimentales étaient XH_{2R}, HH_{2R}, LH_{2R}, XLH_{2R}, « R » signifiant « Restricted » diet.

Le conditionnement nutritionnel larvaire n'a pas significativement affecté le taux de survie des larves à J-45 (40-50% selon les groupes). Le poids final des larves LH_I et XLH_I était significativement plus faible que celui des groupes XH_I et HH_I (P<0,001). Le niveau d'ARN de la delta-6-désaturase ($\Delta 6D$) était en revanche plus élevé chez les groupes LH_I et XLH_I à J-45 (P<0,001). Cependant, la faible teneur en DHA des phospholipides corporels (PL) des larves LH_I et XLH_I a montré une déficience en HUFA n-3.

Lors du challenge des juvéniles (aliment sévèrement carencé en HUFA), aucun effet significatif du conditionnement larvaire sur les performances de croissance des juvéniles n'a été observé : taux de survie supérieurs à 95% et gains de poids similaires dans tous les groupes. Le niveau significativement plus élevé d'ARN de la $\Delta 6D$ mesuré chez les larves carencées s'est retrouvé uniquement chez les juvéniles des groupes LH_{2R} et XLH_{2R} ; cette

augmentation s'est maintenue voire amplifiée avec la durée de l'expérience. En comparaison, le niveau d'ARN de la $\Delta 6D$ des juvéniles $XH2_R$ était relativement stable tout au long de l'expérience. La composition en HUFA des phospholipides n'a cependant pas été significativement affectée par le conditionnement larvaire.

Les niveaux d'ARN des PPAR α et β étaient plus élevés chez les larves $XLH1$ à J45 que dans les autres groupes. De plus, à J-118, les PPAR β et γ étaient plus élevés chez les groupes $XLH2_R$ que chez les autres. Ces valeurs concordent avec les niveaux élevés d'ARN de la $\Delta 6D$ mesurés chez les larves et les juvéniles de ces mêmes groupes. Une implication des PPAR dans la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ est probable lors de l'utilisation d'un aliment très carencé en HUFA dès le stade larvaire.

Cette seconde série d'expérience a montré qu'il était possible d'amplifier la stimulation des capacités d'adaptation des juvéniles de bar à un aliment sévèrement carencé en HUFA chez des lots conditionnés dès la première alimentation. Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation du niveau d'ARN de la $\Delta 6D$ mesurée chez les larves carencées a persisté chez les juvéniles. Elle est retrouvée à l'issue des quatre mois d'expérience, malgré une période intermédiaire utilisant un aliment riche en HUFA. Cependant, cette stimulation n'était associée à aucun effet bénéfique en terme de croissance ni de modification de la teneur corporelle en HUFA des PL chez les juvéniles.

Cette étude a également permis de mieux comprendre la régulation des mécanismes de désaturation chez les poissons marins. Comme montrée chez les mammifères, l'implication des PPAR dans la stimulation du niveau d'ARN de la $\Delta 6D$ a été mise en évidence chez le bar. Le dosage enzymatique de la $\Delta 6D$ aurait permis de mieux comprendre les mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles de bar.

Life-lasting effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a range of dietary n-3 HUFA levels on the functioning of PUFA desaturation pathways

Marie Vagner ^{a1 c1}, Jean H. Robin ^{a1}, José L. Zambonino Infante ^{a1}, Douglas R. Tocher ^{a2} and Jeannine Person-Le Ruyet ^{a1}

^{a1} UMR 1067 INRA-Ifremer-Bordeaux 1, Ifremer Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

^{a2} Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK

^{c1} Corresponding author. Tel.: +33 298 224 400; fax: +33 298 224 653. mvagner@ifremer.fr; marie.vagner@ntlworld.com

Keywords: aquaculture; delta-6 desaturase; *Dicentrarchus labrax*; programming concept.

Publication soumise le 24/01/2008 à British Journal of Nutrition

Abstract

Four replicated groups of sea bass larvae were fed XH (3.7% EPA+DHA), HH (1.7%), LH (0.7%) or XLH (0.5%) diets from d-6 to d-45 (XH_I, HH_I, LH_I, XLH_I; exp.1). After a subsequent one-month period feeding a commercial diet (2.7% EPA+DHA), the capacity of the four initial groups to adapt to an n-3 HUFA-Restricted diet (0.3% EPA+DHA; R-groups: XH_{2R}, HH_{2R}, LH_{2R}, XLH_{2R}) was tested for 35 days. Larval dietary treatments had no effect on larval and juvenile survival rates. Wet weight of d-45 larvae was higher in XH_I and HH_I (P<0.001), but the R-juvenile mass gains were similar in all treatments. Delta-6-desaturase (Δ 6D) mRNA level was higher in LH_I and XLH_I at d-45 (P<0.001), and higher in LH_{2R} and XLH_{2R}, with a significant increase at d-118. Concomitantly, PPAR α and β mRNA levels were higher in XLH_I at d-45, and PPAR β and γ mRNA levels were higher in the XLH_{2R} at d-118, suggesting possible involvement of PPARs in stimulation of Δ 6D expression, when drastic dietary larval conditioning occurred. The low DHA content in phospholipid (PL) of LH_I and XLH_I revealed an n-3-HUFA deficiency in these groups. Larval conditioning did not affect DHA content in PL of R-juveniles. This study showed (i) a persistent Δ 6D mRNA enhancement in juveniles pre-conditioned with an n-3 HUFA deficient larval diet, over the one-month intermediate period, and (ii) brought new findings suggesting the involvement of PPARs in the Δ 6D mRNA level stimulation. However such nutritional conditioning had no significant effect on juvenile growth and lipid composition.

Introduction

Worldwide supplies of fish oils and meals have reached their sustainable limits, forcing industries to look for alternative lipid sources for use in marine fish diets ⁽¹⁾. As terrestrial animal products are prohibited, there is great interest in aquaculture to produce fish better able to utilise vegetable feedstuffs. Vegetable products are rich in 18 carbon fatty acids (C₁₈ FA) but do not contain C₂₀₋₂₂ n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA), such as eicosapentaenoic (EPA; 20:5n-3) and docosahexaenoic acids (DHA; 22:6n-3). These n-3 HUFA are required in the diet to provide the essential fatty acids for marine fish, as marine fish have a low capacity to produce C₂₀₋₂₂ HUFA from C₁₈ FA precursors, such as α -linolenic (18:3n-3) and linoleic (18:2n-6) acids ^(2,3). Delta-6 desaturase (Δ 6D) is the rate-limiting enzyme catalysing the first reaction of n-3 HUFA synthesis from 18:3n-3 and 18:2n-6 ⁽⁴⁾, but, as its activity is very low in marine fish ^(3,5), it could also limit the use of vegetable products by marine fish.

One solution could be to apply metabolic programming using nutritional conditioning during early larval stages, as already shown in mammals ⁽⁶⁾, in order to stimulate the FA desaturation pathways of n-3 HUFA synthesis in marine fish. We recently showed ^(7,8) that metabolism in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles can be modulated by larval nutritional conditioning. The Δ 6D mRNA level was enhanced in larvae fed a low n-3 HUFA diet (0.8% DM EPA+DHA), and this was retained in pre-conditioned juveniles fed an n-3 HUFA-restricted diet (0.5% DM EPA+DHA). Moreover, a slightly, but significantly, higher DHA content in phospholipid (PL) in pre-conditioned juveniles was measured. However, the larval conditioning did not significantly affect growth performance of juveniles in terms of weight and survival rates, suggesting that larval nutritional stimulus was not sufficient to induce further long-term effects.

The aim of the present study was to determine the range of dietary n-3 HUFA content that would elicit effects on desaturation/elongation pathways for n-3 HUFA synthesis and whether the effect could be amplified. Thus, a large range of n-3 HUFA dietary content (0.5-3.7% EPA+DHA) was used during the larval stage, followed by a severe n-3 HUFA-restricted diet (0.3% EPA+DHA) during the juvenile period.

Materials and methods

Rearing conditions and experimental design

Larval conditioning: Experiment 1

Three days post-hatching sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae were obtained from a commercial fish farm, Aquanord (Gravelines, France), and experiments were conducted at the Ifremer-Brest facility. Larvae were distributed in 20 conical fiberglass tanks (35 l; initial stocking density: 60 larvae l⁻¹, *i.e.* 2500 larvae tank⁻¹), and temperature was progressively increased from 13.5°C to 19°C within 2 days. All groups were fed microparticulate diets from mouth opening at day 6 (d-6) to d-45. Four diets differing only in their n-3 HUFA content were tested: XH (3.7% EPA+DHA on a DM basis); HH (1.7%); LH (0.7%) and XLH (0.5%) (Table 1). The different n-3 HUFA contents were obtained by the incorporation of soybean oil in LH and XLH diets and by an inverse proportion gradient of soy lecithin and marine phospholipid. Four tanks were fed the HH or XH diets and six tanks were fed the LH or XLH diets. The four experimental conditions were XH1, HH1, LH1 and XLH1. Diets were automatically distributed in excess 18h per day and the daily ration was progressively increased from 1g per day per tank at d-6 to 10 g at d-45. Tanks were supplied with running sea water (34.5‰) filtered through a sand filter, then passed successively through a tungsten heater and degassing column packed with plastic rings. The water renewing was progressively increased from 50% h⁻¹ at d-6 to 200% h⁻¹ at d-45, which maintained stable oxygen saturation around 95±3% and prevented ammonia accumulation. Larvae were exposed to full darkness until d-7 and then a light cycle of 24L:0D until d-45: light intensity was progressively increased from 1 to 500 lux, during this period.

Table 1. Formulation (g.100 g⁻¹), chemical composition (% DM) and fatty acid composition in TL (% FAME) of the four experimental larval diets (XH, HH, LH and XLH) used in the larval experiment (exp.1).

<i>Ingredients</i> [†]	XH	HH	LH	XLH
Fish meal LT 94	11	11	11	11
Defatted fish meal	41	41	41	41
CPSP 90	11	11	11	11
Soy oil	0	0	1	1
Soy lecithin	7	16	21	23
Marine lecithin LC 40	19	9	2	0
Vitamin mixture ^{††}	7	7	7	7
Mineral mixture [§]	3	3	3	3
Betaine	1	1	2	2
Cellulose	1	1	1	1
<i>Chemical composition</i>				
Dry matter (%)	91.4	91.0	90.3	90.7
Crude protein (% DM)	63.9	59.2	57.0	57.1
Crude fat (% DM)	18.5	19.1	19.9	20.2
Ash (% DM)	13.9	13.9	14.0	13.9
HUFA n-3 (% DM)	3.8	1.8	0.8	0.5
EPA+DHA (% DM)	3.7	1.7	0.7	0.5
<i>Fatty acids composition in TL</i>				
18:2n-6	18.6	35.2	44.6	47.2
18:3n-6	0.1	0.3	0.1	0.2
20:4n-6	1.7	0.8	0.5	0.2
18:3n-3	1.9	3.3	4.1	4.4
20:5n-3	9.1	4.7	2.2	1.7
22:6n-3	20.5	9.8	3.9	2.2
Σ saturated	27.5	26.1	24.9	24.1
Σ mono-unsaturated	18.5	18.1	18.7	18.7
Σ n-6	20.8	36.7	45.4	48.0
Σ n-3	32.9	19.0	11.0	9.2

[†] Sources: fish meal LT 94: Norse (Fyllingsdalen, Norway); hydrolysed fish meal: Archimex (Vannes, France); fish protein hydrolysate CPSP 90: Sopropêche (Boulogne sur mer, France); soy oil: Système U (Créteil, France); soy lecithin: Louis François (Saint-Maur, France); marine lecithin LC 60: Phosphotech (Saint-Herblain, France).

^{††} Vitamin mixture (g kg⁻¹ vitamin mix): retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 2.5; DL- α -tocopheryl acetate, 5; menadione, 1; thiamine-HCL, 0.1; riboflavin, 0.4; D-calcium panththenate, 2; pyridoxine-HCL, 0.3; cyanocobalamin, 1; niacin, 1; choline, 200; ascorbic acid (ascorbyl polyphosphate), 5; folic acid, 0.1; D-biotin, 1; meso-inositol, 30.

[§] Mineral mixture (g kg⁻¹ mineral mix): KCL, 90; KI, 0.04; CaHPO₄ 2H₂O, 500; NaCl, 40; CuSO₄ 5H₂O, 3; ZnSO₄ 7H₂O, 4; CoSO₄, 0.02; FeSO₄ 7H₂O, 20; MnSO₄ H₂O, 3; CaCO₃, 215; MgOH, 124; Na₂SeO₃, 0.03; NaF, 1.

Juvenile period: Experiment 2

The larval period was followed by an intermediate period of one month (d-46 to d-77), during which the four groups were separately held at 19°C and fed a commercial diet with 2.7% EPA+DHA (DM basis), corresponding to the mean between the XH (3.7% EPA+DHA) and HH (1.7% EPA+DHA) diets. The four experimental groups were XH2, HH2, LH2 and XLH2. The d-77 juveniles of each group were anaesthetised (ethylene-glycol-monophenylether, 0.15‰), selected (malformed fish were eliminated) and randomly distributed in square tanks, with an effective volume of 60 l: 6 tanks per condition with 180 fish per tank. The fish were acclimatised to the experimental unit for 6 days (d-77-83) at 19°C, and two experimental isolipidic and isoproteic diets differing in their n-3 HUFA content by the incorporation of either rapeseed oil or cod-liver oil (Table 2), were progressively introduced. Four replicate groups per condition were fed the experimental n-3 HUFA-Restricted diet (0.3% EPA+DHA); termed “R-groups” (XH2_R, HH2_R, LH2_R and XLH2_R). Two other tanks per condition were fed an n-3 HUFA-rich diet (1.4% EPA+DHA, *i.e.* 2-fold higher than the 0.7% EPA+DHA requirement defined for sea bass juveniles ⁽⁹⁾). These latter groups were defined as control “C-groups” (XH2_C, HH2_C, LH2_C and XLH2_C), in order to evaluate, from a qualitative point of view, the delay in growth induced by the deprived diet. Fish were hand-fed to visual satiation at 09:00 and then diet was automatically distributed in excess until 18:00. All tanks were supplied with running seawater at 19°C, 34.5‰, 18L:6D light cycle. Water flow rate was 572%.h⁻¹, which stabilised oxygen concentration around 90±5% saturation and prevented ammonia accumulation. The experiment started when fish were fed entirely on the HUFA-restricted or -rich diets (d-83, *i.e.* t0), and lasted until the final weights of all fish were increased at least two-fold (d-118; *i.e.* t35).

Table 2. Formulation ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), chemical composition (%DM) and fatty acid composition in total lipid (% fatty acid methyl esters FAME) of the experimental HUFA-restricted diet (R-diet) and the HUFA-control diet (C-diet) used in the juvenile experiment (exp. 2).

<i>Ingredients</i> [†]	R-diet	C-diet
Lupin without pellicle	50	50
Fish meal LT 94	12	12
Defatted fish meal	8	8
Wheat amygluten 110	7	7
Fish hydrolysate CPSP 90	8	8
Vitamin mixture ^{††}	1	1
Mineral mixture [§]	1	1
Betaine	0.5	0.5
Methionine	0.2	0.2
Precooked starch	3.7	3.7
Soy lecithin	2	2
Rapeseed oil	6.6	0
Cod-liver oil	0	6.6
<i>Chemical composition</i>		
Dry matter (%)	92.2	92.0
Crude protein (% DM)	51.8	52.2
Crude fat (% DM)	14.9	15.6
Ash (% DM)	6.5	6.5
n-3 HUFA (% DM)	0.4	1.6
EPA+DHA (% DM)	0.3	1.4
<i>Fatty acids composition in TL</i>		
18:2n-6	20.2	11.3
18:3n-6	0.1	0.1
20:4n-6	0.1	0.3
18:3n-3	8.5	4.3
20:5n-3	1.2	4.8
22:6n-3	1.6	6.1
Σ saturated	13.2	17.8
Σ mono-unsaturated	54.3	52.5
Σ n-6	20.7	12.3
Σ n-3	11.9	17.5

[†] Sources: lupin without pellicle: Le Gouessant® aquaculture (Lamballe, France); fish meal LT 94: Norse (Fyllingsdalen, Norway); wheat amygluten 110: Chamtor Vitalor (Bazancourt, France); fish protein hydrolysate CPSP 90: Sopropêche (Boulogne sur mer, France); precooked starch: Prégéflo Roquette frères (Lestrem, France). ^{††} Vitamin mixture (g kg^{-1} vitamin mix): retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 2.5; DL- α -tocopheryl acetate, 5; menadione, 1; thiamin-HCL, 0.1; riboflavin, 0.4; D-calcium panththenate, 2; pyridoxine-HCL, 0.3; cyanocobalamin, 1; niacin, 1; choline, 200; ascorbic acid (ascorbyl polyphosphate), 5; folic acid, 0.1; D-biotin, 1; meso-inositol, 30. [§] Mineral mixture (g kg^{-1} mineral mix): KCL, 90; KI, 0.04; CaHPO₄ 2H₂O, 500; NaCl, 40; CuSO₄ 5H₂O, 3; ZnSO₄ 7H₂O, 4; CoSO₄, 0.02; FeSO₄ 7H₂O, 20; MnSO₄ H₂O, 3; CaCo₃, 215; MgOH, 124; Na₂SeO₃, 0.03; NaF, 1.

Sampling procedures

Fish were fasted for 12 h, and the water volume was lowered prior to random sampling using an appropriate net.

Experiment 1

For larval growth assessment and lipid composition, samplings were performed at d-45, corresponding to the end of the larval period, when all enzymatic and molecular functions are established. For molecular analyses, intermediate samplings were also performed at d-10, d-17 and d-25.

Weight was monitored by sampling 30 larvae in four tanks per condition (n=120). After a minimum preservation period of three weeks in 4% seawater formalin, larvae were individually weighed ($\pm 10^{-2}$ mg), pooled and dried for 24h at 105°C to estimate the dry weight of each group (n=4). Final biomass expressed in mg.l^{-1} was the larvae mean wet weight per survival rate at d-45 (n=4). The apparent survival rate was estimated for each experimental group using the ratio final/initial number of larvae in each tank, minus the number of larvae sampled (n=6 for XLH/ and LH/ and n=4 for XH/ and HH/).

Measurement of mRNA level of genes involved in digestive functions and lipid metabolism (delta-6 desaturase $\Delta 6\text{D}$, and peroxisome-proliferator activated receptors alpha PPAR α , beta PPAR β and gamma PPAR γ) was performed on 100 mg of larvae at d-10 and d-17 and on about 300 mg of larvae at d-25 and d-45, in four tanks per condition (n=4). Larvae were conserved in TRIzol (1 ml for 100 mg of larvae) at -80°C pending analysis.

For lipid analysis, 50 pooled larvae from each of four tanks per condition (n=4) were sampled, weighed and conserved at -80°C pending analysis.

Experiment 2

Juveniles were anaesthetised before sampling. Growth was estimated by weighing individually 50 fish (± 0.1 g) at d-83 (t0), d-90 (t7), d-104 (t21) and d-118 (t35) in all tanks (n=200 and n=100 for R- and C-groups respectively). A HH2_C tank was lost at d-90, inducing n=50 for this group at d-90, d-104 and d-118. The apparent survival rate was estimated for each experimental group using the ratio initial/final number of fish in each tank (n=4 and n=2 for R- and C-groups respectively, except for HH2_C, for which n=1).

The daily growth index (DGI; %) between t0 (d-83) and t35 (d-118) was calculated as follow:

$$\text{DGI}_{\text{d-83-118}} = 100 \times (\sqrt[3]{w_{\text{d-83}}} - \sqrt[3]{w_{\text{d-118}}}) \text{ day}^{-1}$$

Measurement of mRNA level of genes involved in lipid metabolism ($\Delta 6\text{D}$, and PPAR α , β and γ) was performed on R-groups on 10 pooled fish from each of four tanks per condition (40 fish per condition, n=4) at d-83, d-90, d-107 and d-118. They were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until assayed.

Lipid analyses were performed on C- and R-groups. Six pooled fish per tank were taken at d-83 and 10 pooled fish per tank were taken at d-118. They were individually weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C pending analysis (n=4 and n=2 for R- and C-groups respectively, except for HH2_C groups, for which n=1 at d-90 and d-118).

Analytical methods

Gene expression

Expression of $\Delta 6\text{D}$, and PPAR α , PPAR β and PPAR γ genes was performed on whole body for larvae and on liver for juveniles.

Dissections of frozen juveniles were conducted on a glass plate maintained at 0°C . The whole liver was isolated and the gall-bladder removed because bile can destroy RNAs. Gene expression measurements of each sample were performed on 200 mg of homogenised pooled livers (Polytron® PT 2100 Bioblock®).

Total RNA was extracted from total larvae and livers using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNAs were obtained in duplicate from total RNA (1 μg) using Quantitect Reverse Transcription kit with integrated removal of genomic DNA contamination (QIAGEN® GmbH, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using the iCycler iQTM (Bio-Rad® Laboratories Inc.). Quantitative PCR analyses for each gene were performed in triplicate for each cDNA duplicate (6 assays for each studied gene per sample), in a total volume of 15 μl containing 5 μl cDNA (dilution: 10^{-2}), 0.5 μl primers (10 $\mu\text{mol/l}$), 7.5 μl 2X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA). The specificity of forward and reverse primers for each gene was checked by sequencing the amplicon (Table 3; Eurogentec, Labège, France). Thermal cycling was initiated by incubation at 95°C for 13.5 min for activation of the hot-start enzyme, iTaqTM DNA Polymerase. After this initial step,

45 cycles of PCR were performed. Each PCR cycle consisted in heating at 95°C for 30 sec for denaturing, at 60°C for 1 min for annealing and extension. Cycle threshold (CT) values corresponded to the number of cycles at which the fluorescence emission monitored in real time exceeded the threshold limit. Melting curve analysis was performed to confirm production of a single product in these reactions, and standard curves were established for each gene by plotting the CT values against the log₁₀ of 5 different dilutions (in triplicate) of cDNA sample solutions. Real-time PCR efficiencies were determined for each gene from the given slopes in Bio-Rad® software, according to the equation 1:

$$E=10^{[-1/\text{slope}]}$$

To determine the relative quantity of target gene-specific transcripts present in the different samples, expression ratios (R) were calculated according to the following formula (2):

$$\text{Ratio}=[(E_{\text{gene}})^{\Delta \text{CT target gene (mean control-mean sample)}}]/[(E_{\text{EF1}})^{\Delta \text{CT EF1 (mean control-mean sample)}}]$$

where “E” is the PCR efficiency and “mean sample” corresponds to triplicate average. The HH1 and HH2 samples were used as the standard group for larval and juvenile experiments, respectively, because they are close to the rearing condition in fish farming. Elongation factor 1 α (EF1 α) was used as the reference gene ⁽¹⁰⁾ as its expression is constant during activation and proliferation of cells ⁽¹¹⁾.

Table 3. Primer used in exp.1 and exp.2 for each gene expression analysis by RT-PCR.

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (3'-5')
$\Delta 6D$	GCCCTATCATCACCAACACC	ACAGCACAGGTAGCGAAGGT
PPAR α	ACCTCAGCGATCAGGTGACT	AACTTCGGCTCCATCATGTC
PPAR β	GCTCGGATCTGAAGACCTTG	TGGCTCCATACCAAACCACT
PPAR γ	CAGATCTGAGGGCTCTGTCC	CCTGGGTGGGTATCTGCTTA

Fatty acid composition

Whole frozen larvae were homogenised at 0°C using a Polytron® (PT 2100 Bioblock®), while whole frozen juvenile were homogenised rapidly with a Hobart® mixer in order to keep a low temperature and then, more accurately using a Polytron® (PT 2100 Bioblock®). Lipid analyses were performed on a representative portion (~1 g and ~5g for larvae and juvenile samples respectively) and ~3 g were taken for dry weight measurement (105°C; 24h). Assays were conducted on one larval sample, while for juveniles they were performed on duplicates at d-83 and at d-118.

Extraction of total lipid (TL) was performed ⁽¹²⁾ with chloroform replaced by dichloromethane. Lipid sub samples (around 3 mg in 80 µl for larvae and around 50 mg in 640 µl for juveniles) were deposited at the top of a Waters' Sep-Pak[®] Silica Cartridges (light for larvae); neutral lipids (NL) and free fatty acids were eluted with CHCl₃-MeOH (98:2 v/v; 6 ml and 30 ml for larvae and juveniles respectively), then phospholipids (PL) were eluted with MeOH ⁽¹³⁾, 8 ml and 30 ml for larvae and juveniles respectively.

For larvae, PL, NL fractions as well as TL sub samples were transmethylated in 2 ml 1% H₂SO₄ in MeOH and 1 ml of toluene was added in NL. Fractions were incubated overnight at 50°C. Fatty acid methyl esters (FAME) neutralised with 2% KHCO₃ were extracted twice with 5 ml hexane-diethyl ether (1:1). TL and NL FAME of juveniles were prepared by saponification and then methylation, while PL FAME were prepared by transmethylation with sulfuric acid in methanol.

All FAME were separated by gas-liquid chromatography (GLC; Auto-system Perkin-Elmer[®] with a flame ionisation detector, BPX 70 capillary column: 25 m x 0.22 mm i.d. x 0.25µm film thickness; split-splitless injector, with helium as carrier gas). The injector and detector temperatures were 220 and 260°C, respectively. Initial temperature of the oven was 50°C, which increased to 180°C at 15°C min⁻¹, was maintained for 5 min, and then increased to 220°C at 3°C min⁻¹. Data acquisition and handling were carried out by connecting the GLC to a PE Nelson computer. Each chromatogram was visually controlled on the computer using an amplification of the baseline in order to check the peak shape and quality of integration by the computer program. Internal standard (tricosanoic acid 23:0) was used quantify FAME in TL and NL on a fish fresh matter basis, and was added to a weighed known quantity of larvae before the TL extraction, while it was added before the TL and PL FAME extraction for juvenile lipid analysis. The results of individual FA compositions were expressed as percent of total identified FAME.

Chemical analyses of feed were performed in duplicate for each sample according to AOAC ⁽¹⁴⁾ methods: ash (7 h at 550°C), crude fat ⁽¹²⁾ and crude protein (Dumas method with an Elementary NA 2000[®], N × 6.25).

Statistical analysis

The data are presented as mean ± S.E. of the replicate groups. Before applying statistical tests using Statistica[®], percentage data were transformed by arcsine square root, and data for

body weight, biomass and relative gene expression ratio were transformed by Ln. Statistical effect of larval conditioning on juvenile growth was tested on all data (n=200 and n=100 for R-and C-groups respectively). Effect of diet on growth performances, mRNA level for each sampling date and lipid composition was tested on means per tank using a one-way ANOVA, after control of equality of variances using Levene test. Effects of diet and age of fish on mRNA level were tested on means per tank using two-way ANOVA, after control of equality of variances using Chi-deux test. Effect of larval nutritional conditioning on mass gain of R-groups of juveniles, as well as between R-and C-groups was tested comparing curve slopes between t0 and t7; t7 and t21 and t21 and t35 by a one-way ANOVA. The Newman-Keuls multiple-range test was used to compare means in case of a significant effect (P<0.05).

Results

Experiment 1

Growth performances

Diet did not significantly influence larval survival rate (Fig.1), while the mean wet weight was more than 25% higher in XH1 and HH1 groups than in LH1 and XLH1 groups (P<0.001). The mean final biomass of XLH1 groups (892±108 mg.l⁻¹) was around 34% lower than that of XH1 and HH1 (1367±47 mg.l⁻¹; P<0.01), while biomass measured in LH1 groups (1093±93 mg.l⁻¹) was not significantly different from the others.

Gene expression

At d-10, the $\Delta 6D$ mRNA level was similar in all groups (Fig.2A; 1.0±0.2). At d-17, LH1 and XLH1 groups exhibited higher values than XH1 (P<0.05) but were similar to HH1. The difference between groups fed a low-HUFA diet (XLH1, LH1) and those fed a rich-HUFA diet (XH1, HH1) increased with time, and mean $\Delta 6D$ mRNA level measured in XLH1 and LH1 groups was higher than that of XH1 and HH1 groups at d-45 (P<0.01).

One-way ANOVA analysis revealed that PPAR α , β and γ mRNA levels were not affected by diet from d-10 to d-25 (Fig.3A, 4A, 5A). At d-45, PPAR α and β mRNA levels were higher in XLH1 groups than in others (P<0.05), while PPAR γ mRNA level was higher in XLH1 groups than that measured in LH1 larvae (P<0.05) but similar to that measured in XH1 and HH1 groups.

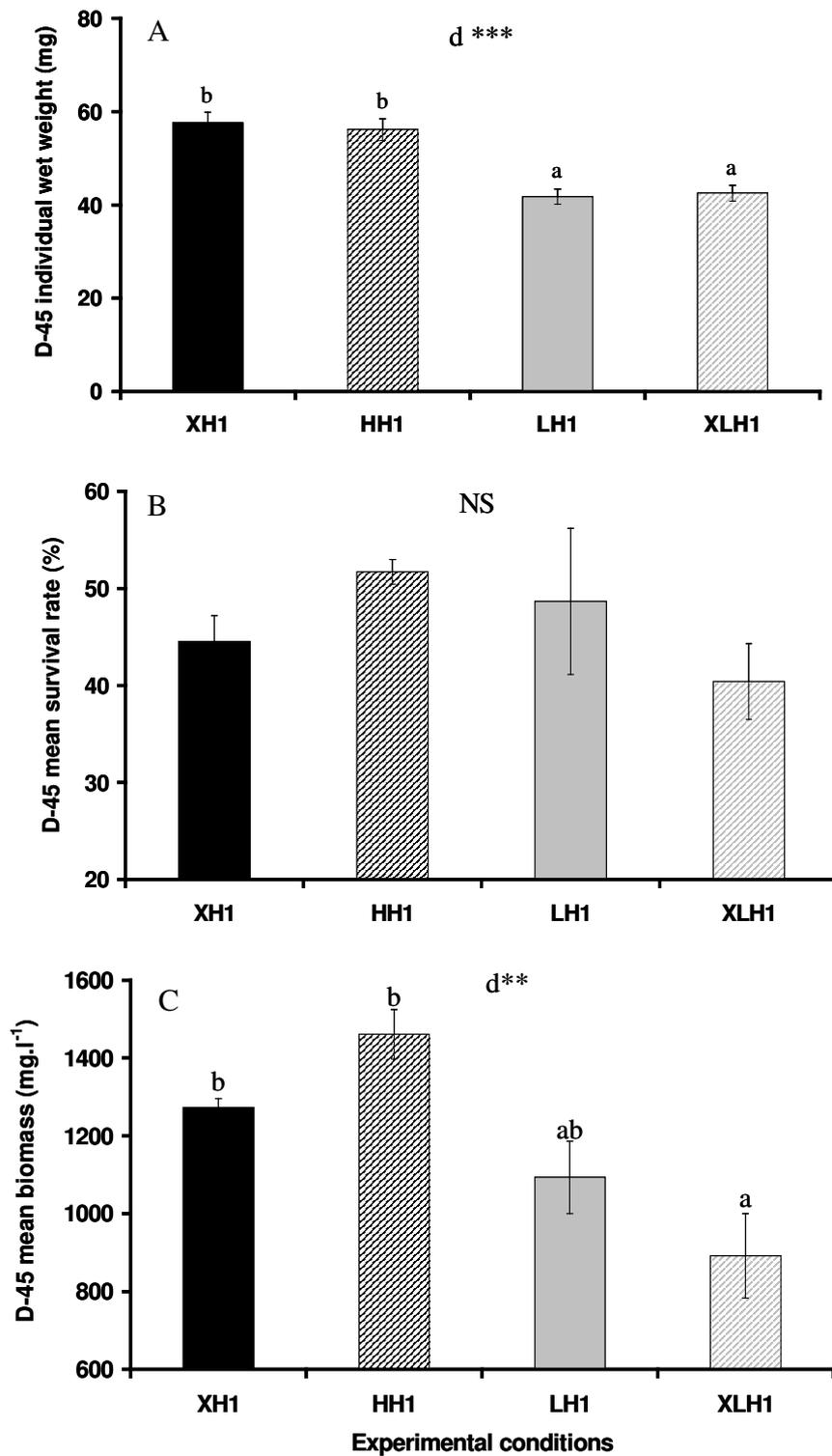


Fig.1. (A) D-45 mean larval wet weight (n=120), (B) survival rate (n=4 for XH1 and HH1 groups and n=6 for XLH1 and LH1 groups) and (C) biomass (n=4 for XH1 and HH1 groups and n=6 for XLH1 and LH1 groups) at each experimental condition. Values are means ± SE and statistical significance of diet (d) is indicated (NS non significant, ** P<0.01; *** P<0.001). Values not sharing a common letter are significantly different.

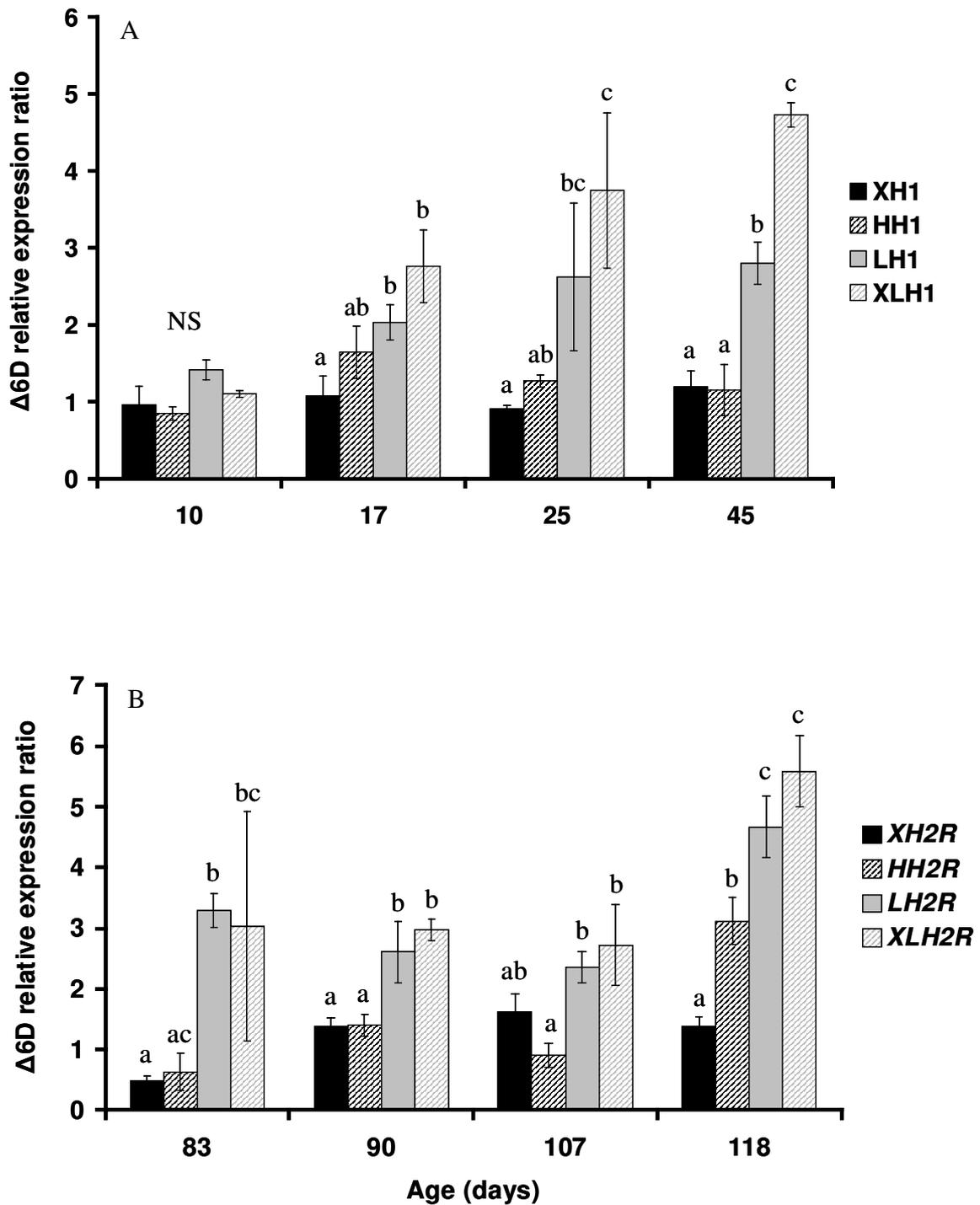


Fig.2. Mean $\Delta 6$ desaturase gene expression ratio (\pm SE) relative to HH1 (A) and HH2_R groups (B) according to time in larval (A) and juvenile (B) experiment and for each experimental condition (n=4). ^{a, b, c} differing letters denote significant difference for each date (P<0.05).

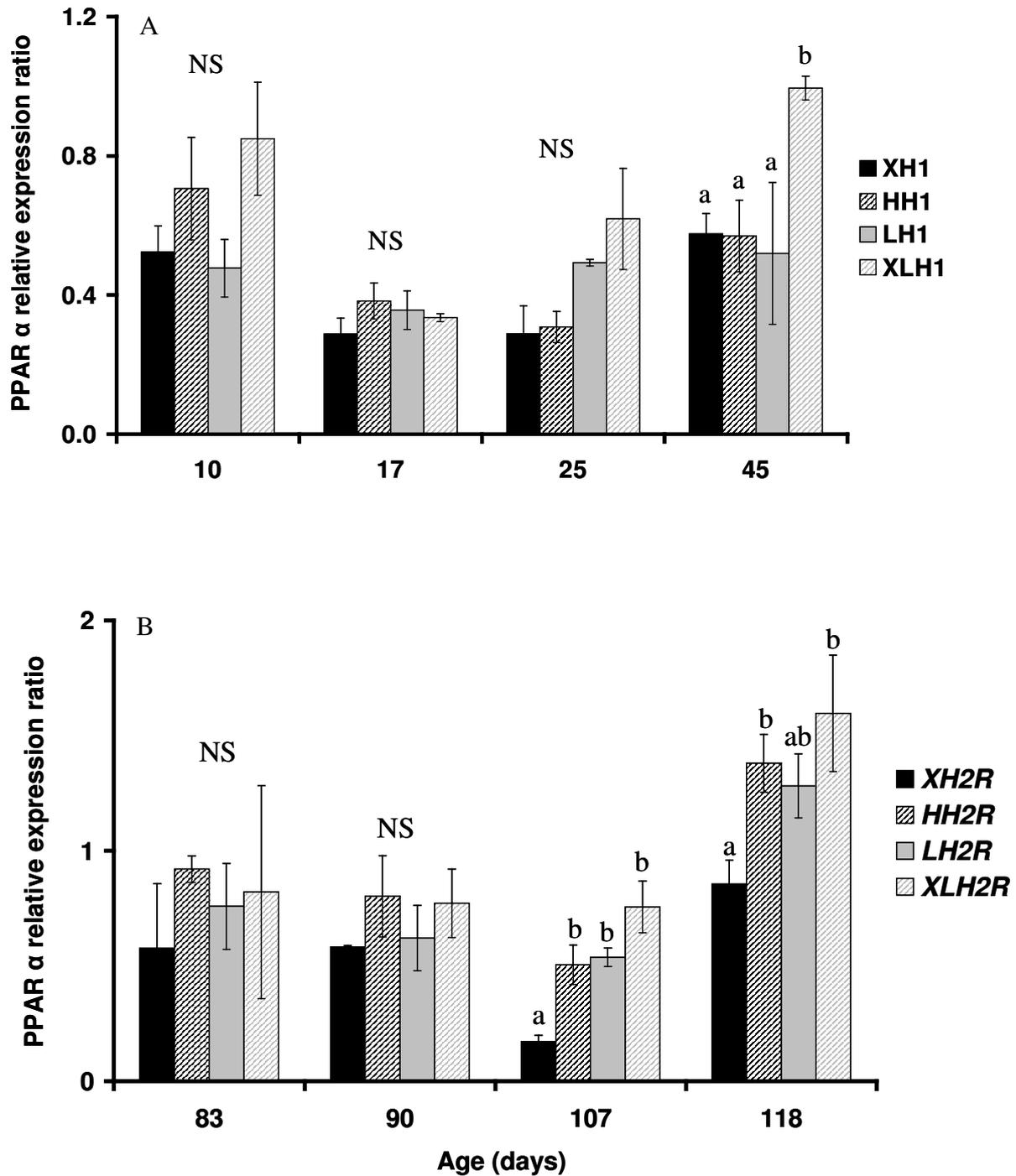


Fig.3. Mean PPAR α expression ratio (\pm SE) relative to HH1 (A) and HH2_R groups (B) according to time in larval (A) and juvenile (B) experiment and for each experimental condition (n=4). For each date, NS indicates non significant differences between groups and ^a, ^b, ^c differing letters denote significant difference at P<0.05.

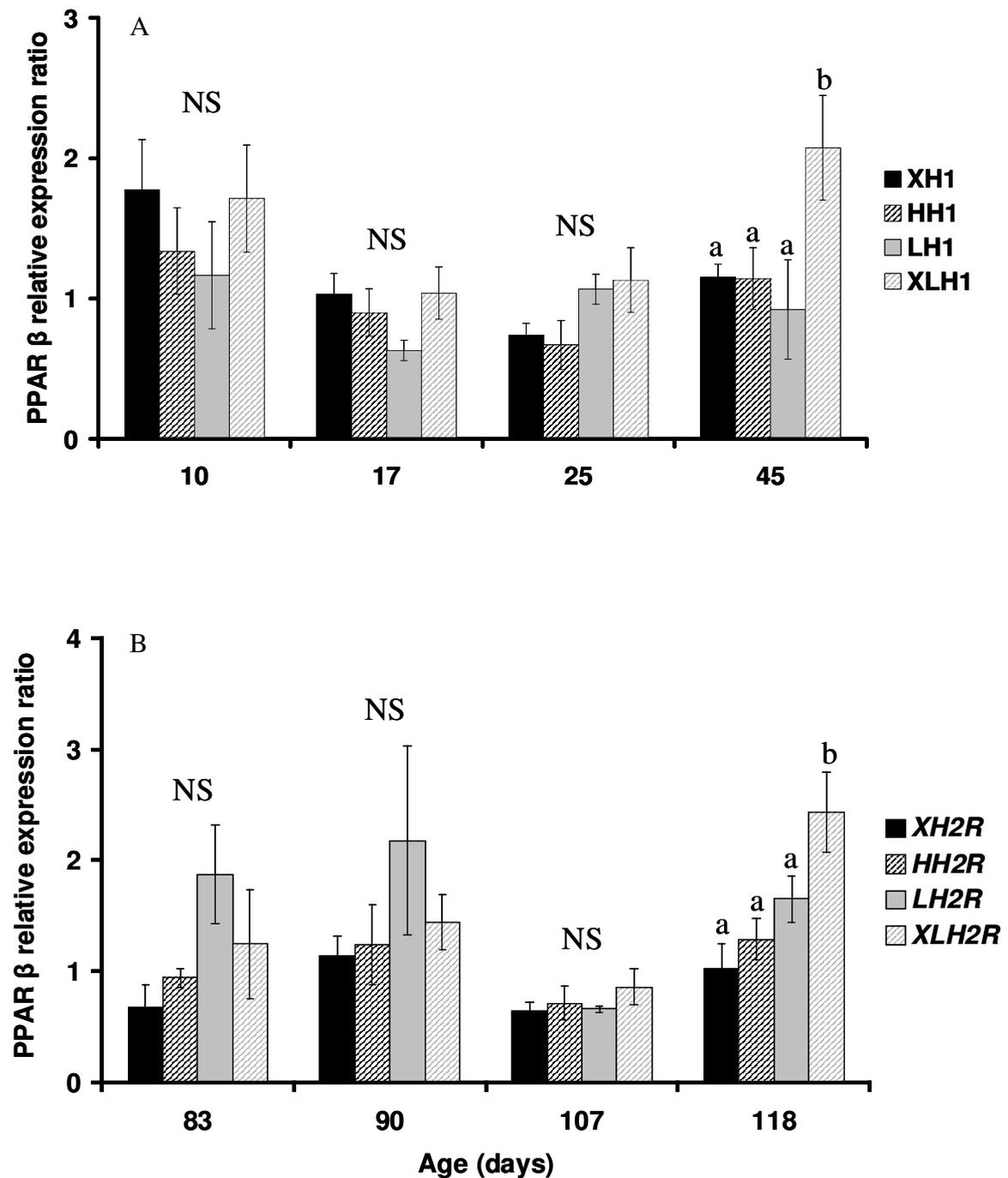


Fig.4. Mean PPAR β expression ratio (\pm SE) relative to HH1 (A) and HH2_R (B) according to time in larval (A) and juvenile (B) experiment and for each experimental condition (n=4). For each date, NS indicates non significant differences between groups and ^{a, b, c} differing letters denote significant difference at P<0.05.

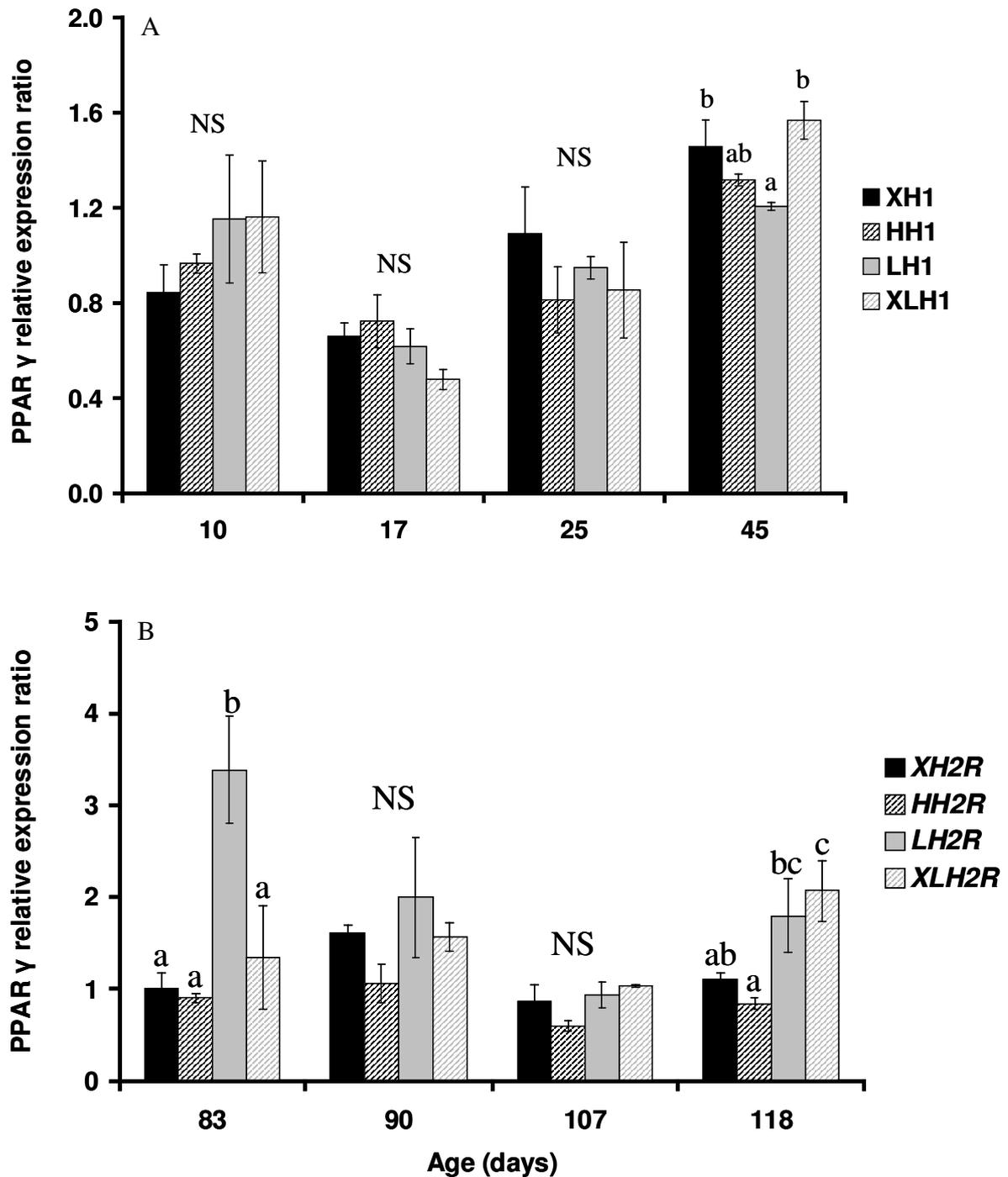


Fig.5. Mean PPAR γ expression ratio (\pm SE) relative to HH1 (A) and HH2_R (B) according to time in larval (A) and juvenile (B) experiment and for each experimental condition (n=4). For each date, NS indicates non significant differences between groups and ^{a, b, c} differing letters denote significant difference at P<0.05.

Lipid analysis

TL content in d-45 larvae was low (between 2 and 3% wet weight WW) and there were no significant differences between treatments (Table 4). Differences in NL composition of larvae at d-45 reflected those of the diets (Tables 1, 4). However, 18:3n-6 was significantly higher in NL of XLH/ and LH/ larvae than in NL of XH/ and HH/ larvae ($P < 0.01$) independent of 18:3n-6 dietary content. HUFA: AA (arachidonic acid 20:4n-6), EPA and DHA contents were high in PL of d-45 larvae, and increased from XLH/ to XH/, according to diet ($P < 0.05$). The 18:2n-6 and 18:3n-3 contents were lower in PL of larvae than in diets, and decreased from XLH/ to XH/, according to diet ($P < 0.001$). Other PUFA were low and not directly related to diet composition: 18:3n-6 and 20:3n-6 were significantly higher in PL of LH/ and XLH/ than in PL of XH/ and HH/ ($P < 0.001$ and $P < 0.05$ respectively) and 20:2n-6 was lower in PL of XH/ than in PL of other groups ($P < 0.001$). The other intermediates in n-3 FA synthesis (18:4; 20:3, 20:4) were very low (0.12%; 0.06% and 0.20% of FAME, respectively) and their content was not different between groups (not presented in Table 5A).

The PL content in d-45 larvae represented a major proportion of TL ranging from 41% to 47% with a significantly higher value in XH/ fish than in LH/ and XLH/ groups ($P < 0.05$). Accordingly, TL FA profiles of larvae (not presented here) showed intermediate percentages between those obtained in NL and PL.

Table 4. Total lipid content (TL in % wet weight WW), polar lipid (PL in % TL) and FA profiles (in % FAME) of neutral lipids (NL) and PL in d-45 larvae. Values are mean \pm SE (n=4). Statistical significance of diet is indicated (NS no significant; * P<0.05, ** P<0.01 and *** P<0.001). Values not sharing a common letter in the same line are significantly different.

	D-45 larval composition								Statistical analysis
	XH/		HH/		LH/		XLH/		
	<i>mean</i>	<i>SE</i>	<i>mean</i>	<i>SE</i>	<i>mean</i>	<i>SE</i>	<i>mean</i>	<i>SE</i>	
TL (% WW)	2.3	0.2	2.9	0.2	2.9	0.2	2.7	0.2	NS
PL (% TL)	47 ^a	4	44 ^{ab}	2	42 ^b	0	41 ^b	1	*
NL									
18:2n-6	18.7 ^a	0.1	36.0 ^b	0.1	43.4 ^c	0.2	44.4 ^d	0.3	***
18:3n-6	0.2 ^a	0.0	0.1 ^b	0.0	0.5 ^c	0.0	0.9 ^d	0.1	**
20:2n-6	1.2 ^a	0.0	1.4 ^b	0.1	1.3 ^{ab}	0.0	1.2 ^a	0.1	*
20:4n-6	1.4 ^a	0.0	0.7 ^b	0.0	0.3 ^c	0.0	0.2 ^d	0.0	**
18:3n-3	1.8 ^a	0.0	3.1 ^b	0.0	3.7 ^c	0.0	3.8 ^c	0.1	***
18:4n-3	0.5 ^a	0.0	0.4 ^{ab}	0.0	0.4 ^{ab}	0.0	0.4 ^b	0.0	*
20:4n-3	0.4 ^a	0.0	0.2 ^b	0.0	0.2 ^b	0.0	0.2 ^b	0.0	***
20:5n-3	7.7 ^a	0.1	3.9 ^b	0.1	1.8 ^c	0.1	1.1 ^d	0.0	***
22:5n-3	0.7 ^a	0.0	0.5 ^b	0.0	0.3 ^c	0.0	0.3 ^c	0.0	***
22:6n-3	18.2 ^a	0.2	7.3 ^b	0.2	2.3 ^c	0.0	1.4 ^d	0.0	***
Σ saturated	26.8 ^a	0.2	25.4 ^b	0.2	24.6 ^c	0.1	24.4 ^c	0.1	***
Σ MUFAs	22.2 ^a	0.1	20.7 ^c	0.3	21.1 ^{bc}	0.0	21.4 ^b	0.0	***
Σ PUFAs	51.0 ^a	0.4	53.9 ^b	0.3	54.3 ^b	0.3	54.1 ^b	0.3	***
PL									
18:2n-6	8.8 ^a	0.1	22.6 ^b	0.1	34.9 ^c	0.2	39.6 ^d	0.2	***
18:3n-6	0.0 ^a	0.0	0.2 ^b	0.1	0.3 ^c	0.1	0.5 ^c	0.0	***
20:2n-6	1.3 ^a	0.1	1.7 ^b	0.1	1.8 ^b	0.0	1.9 ^b	0.0	***
20:3n-6	0.1 ^a	0.0	0.1 ^a	0.0	0.2 ^b	0.0	0.2 ^b	0.0	*
20:4n-6	3.1 ^a	0.0	1.9 ^b	0.0	1.0 ^c	0.0	0.6 ^d	0.1	***
18:3n-3	0.5 ^a	0.0	1.2 ^b	0.0	1.7 ^c	0.0	1.9 ^d	0.0	***
20:5n-3	9.7 ^a	0.1	6.8 ^b	0.0	4.7 ^c	0.1	3.7 ^d	0.1	***
22:5n-3	0.5 ^a	0.0	0.6 ^{ab}	0.0	0.6 ^b	0.0	0.6 ^b	0.0	*
22:6n-3	33.1 ^a	0.4	23.5 ^b	0.2	13.5 ^c	0.2	9.2 ^d	0.1	***
Σ saturated	29.8 ^a	0.3	29.1 ^a	0.1	28.2 ^b	0.3	28.1 ^b	0.2	**
Σ MUFAs	12.7 ^{ab}	0.3	12.1 ^a	0.3	12.6 ^{ab}	0.1	13.0 ^b	0.0	*
Σ PUFAs	57.6 ^a	0.7	58.8 ^b	0.3	59.2 ^b	0.4	58.9 ^b	0.3	*

Experiment 2

Growth performances

Juvenile survival rate, at around 98% in all groups, was not affected by larval nutritional conditioning (Table 5). There was no significant difference in weight increase from d-83 (t0) to d-118 (t35) in the four R-groups, being about 2-fold in all groups. The mass gain was similar between R-groups and C-groups from t0 to t7 (Fig.6; NS differences in curves slopes). From t7 to t21, mass increase was significantly higher in R-groups than in C-groups ($P < 0.01$) and significantly lower from t21 to t35 ($P < 0.01$). D-83 to d-118 daily growth index was not significantly different ($P = 0.075$) between R- ($1.13 \pm 0.02\%$) and C-groups ($1.19 \pm 0.00\%$).

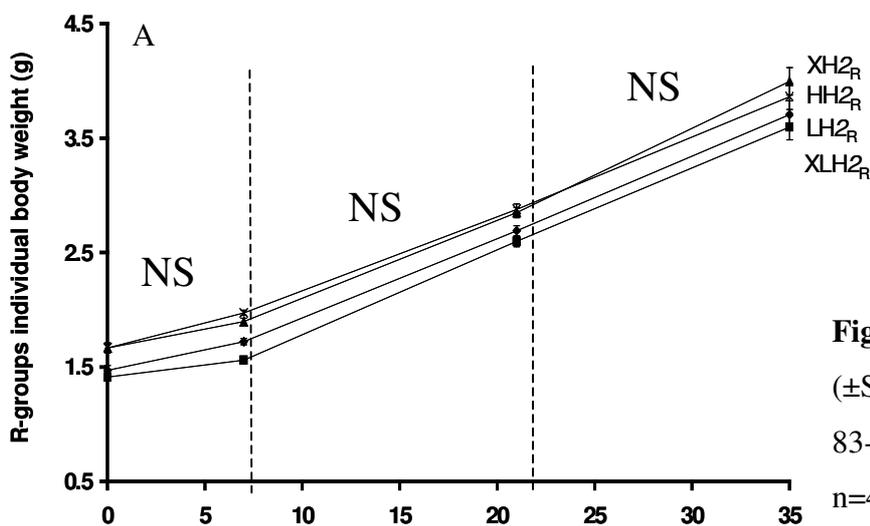


Fig.6. Mean fresh body weight (\pm SE) increase over time (d-83-118) for the 4 R- (Fig. A; n=4) and C-groups (Fig. B; n=2 except for HH2_C; n=1).

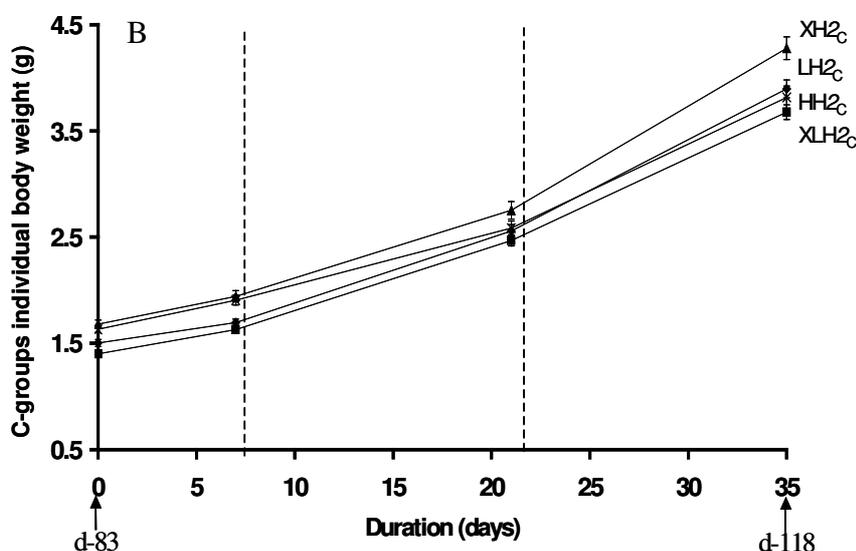


Table 5. D-83-118 survival rate and mass gain of R-groups (Exp.2) at each experimental condition (n=4). Values are mean \pm SE and significant effect of diet (d) is represented (NS no significant).

	XH2 _R		HH2 _R		LH2 _R		XLH2 _R		d
	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	
D-83-118 survival rate (%)	97.8	0.4	97.8	0.6	98.5	0.9	98.8	0.4	NS
D-83-118 mass gain (g)	2.3	0.0	2.2	0.1	2.2	0.0	2.2	0.1	NS

Gene expression

The mean Δ 6D mRNA level was 2-fold higher at d-118 than any time-point earlier (Fig.2B; two-way ANOVA; $P<0.001$). One-way ANOVA performed at each sampling date indicated that Δ 6D mRNA level was significantly higher in XLH2_R and LH2_R than in XH2_R groups at d-83 ($P<0.05$), while XLH2_R and HH2_R showed similar values. At d-90, XLH2_R and LH2_R showed ~2-fold higher values than XH2_R and HH2_R ($P<0.05$) and at d-107, XLH2_R, LH2_R and XH2_R showed higher values than in HH2_R ($P<0.05$). At d-118, the Δ 6D mRNA level was lowest in XH2_R groups (1.4 ± 0.2) and highest in XLH2_R and LH2_R groups (4.7 ± 0.5 and 5.6 ± 0.6 respectively; $P<0.001$).

The mean PPAR α and β mRNA levels were globally higher at the end of exp.2 (d-118) than any previous time-point (Fig.3B and 4B; two-way ANOVA; $P<0.01$). Using one-way ANOVA, PPAR α and β mRNA levels were similar in all R-groups at d-83 and d-90. At d-107, PPAR α mRNA level was about 3-fold lower in XH2_R than in other groups ($P<0.01$), while PPAR β mRNA levels were similar in all groups. At d-118, PPAR α mRNA level was similar in XH2_R and LH2_R groups, and about 50% lower than in HH2_R and XLH2_R groups ($P<0.05$). In comparison, PPAR β was significantly higher in XLH2_R groups than in other groups ($P<0.01$). PPAR γ mRNA level was significantly lower at d-107 than at other sampling periods (Fig. 5B; two-way ANOVA; $P<0.001$). At d-83, it was more than 3-fold higher in LH2_R groups than in others (3.4 ± 0.6 ; $P<0.05$), while non-significant differences occurred between groups at d-90 and d-107. At d-118, XLH2_R groups showed a significantly higher mRNA level than XH2_R and HH2_R ($P<0.01$).

Lipid analysis

The mean whole body TL content of R-groups was not significantly different between groups during the course of the experiment (Table 6). It was 4.4 ± 0.4 % WW at d-83 and 9.2 ± 0.2 % at d-118. The PL content represented a higher proportion of TL at d-83 than at d-118 (29.5 ± 1.1 vs. 13.4 ± 0.9 % TL). At d-83 (*i.e.* after one-month feeding the commercial diet), the influence of diets observed during larval stage disappeared, FA composition was very similar in all groups, except for DHA, which was higher in NL of XH_{2R} groups than in others (12.4 ± 0.2 vs. 11.5 ± 0.0 % FAME; $P < 0.05$). At d-118, the DHA, EPA, AA, 18:3n-6 and saturated fatty acid contents in NL of R-groups were higher than in the R-diet ($P < 0.05$), while 18:2n-6, 18:3n-3, MUFA and PUFA levels were lower (Tables 6, 2). DHA, EPA and 20:3n-3 were higher in NL of XH_{2R} groups than in others at d-118 ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively). The 22:5n-3 content in NL of XH_{2R} groups was higher than in LH_{2R} and XLH_{2R} ($P < 0.05$). Other FAs in NL were not significantly different within R-groups. From d-83 to d-118, 18:2n-6, 18:3n-3 and MUFA content in NL increased by 45%, 75% and 41% respectively, while other FA, including DHA, EPA and AA decreased (11.9 ± 0.2 vs. 2.4 ± 0.1 % FAME for DHA). The 18:3n-6, AA, EPA and DHA contents were higher in PL of d-118-juveniles than in their R-diet, while the contrary was observed for 18:2n-6 and 18:3n-3. From d-83 to d-118, 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 18:3n-3 and MUFA content in PL increased, while others FA, including DHA, EPA and AA decreased. FA content in PL was not significantly different within R-groups at d-83, as well as at d-118, except for 20:4n-3, higher in LH_{2R} groups than in others ($P < 0.05$). The AA, EPA, DHA, saturated FA and PUFA were noticeably higher in PL than in NL at d-83 and d-118.

The fatty acid content of C-groups was related to C-diet (not detailed here). Their HUFA content was clearly higher than in R-groups (Fig.7). The AA, EPA and DHA contents in PL of C-groups were 1.9 ± 0.0 , 9.8 ± 0.2 and 24.2 ± 1.3 % FAME respectively. The low number of replicates did not allow a statistical evaluation within C-groups.

Table 6. Total lipid content (TL in % wet weight WW), polar lipid (PL in % TL) and FA profiles (in % FAME) of neutral lipids (NL) and PL in each treatment of d-83 and d-118 R-groups. Values are mean \pm SE (n=4). Statistical significance of diet is indicated (NS no significant; * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001; # differences between treatments in D-83 juveniles at P<0.05). Values not sharing a common letter in the same line are significantly different.

	D-83 juveniles				D-118 juveniles						Statistical analysis
	Pooled fish		XH2 _R		HH2 _R		LH2 _R		XLH2 _R		
	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	
TL (% WW)	4.4	0.4	9.8	0.6	8.8	0.2	8.8	0.5	9.3	0.2	NS
PL (% TL)	29.5	1.1	13.6	1.0	14.2	0.8	11.6	0.9	14.1	1.0	NS
NL											
18:2n-6	9.5	0.1	16.2	0.2	16.6	0.3	17.0	0.1	16.8	0.1	NS
18:3n-6	0.4	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	NS
20:2n-6	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	NS
20:3n-6	0.3	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	NS
20:4n-6	1.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	NS
18:3n-3	1.6	0.1	6.2	0.1	6.3	0.2	6.5	0.0	6.4	0.0	NS
18:4n-3	2.1	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	NS
20:3n-3	0.2	0.0	0.1 ^a	0.0	0.1 ^b	0.0	0.1 ^b	0.0	0.1 ^b	0.0	**
20:4n-3	0.8	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	NS
20:5n-3	12.0	0.1	2.4 ^a	0.0	2.1 ^b	0.1	2.1 ^b	0.1	2.0 ^b	0.1	*
22:5n-3	2.0	0.0	0.5 ^a	0.0	0.4 ^{ab}	0.0	0.4 ^b	0.0	0.4 ^b	0.0	*
22:6n-3	11.9 [#]	0.2	2.8 ^a	0.1	2.3 ^b	0.1	2.2 ^b	0.1	2.3 ^b	0.1	*
Σ saturated	27.0	0.2	17.7	0.2	17.6	0.4	17.1	0.1	17.2	0.2	NS
Σ MUFAs	30.6	0.3	51.9	0.2	52.7	0.3	52.7	0.2	52.8	0.2	NS
Σ PUFAs	42.3	0.3	30.3	0.2	29.7	0.3	30.2	0.2	30.0	0.2	NS
PL											
18:2n-6	4.1	0.1	13.1	0.2	13.3	0.2	13.4	0.3	13.5	0.2	NS
18:3n-6	0.2	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	NS
20:2n-6	0.8	0.0	0.9	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.1	NS
20:3n-6	0.2	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	NS
20:4n-6	2.7	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	NS
18:3n-3	0.6	0.0	3.4	0.1	3.5	0.1	3.4	0.1	3.5	0.1	NS
18:4n-3	0.5	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	NS
20:3n-3	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	NS
20:4n-3	0.4	0.0	0.2 ^a	0.0	0.2 ^a	0.0	0.3 ^b	0.0	0.2 ^a	0.0	*
20:5n-3	12.2	0.1	6.6	0.1	6.5	0.2	6.4	0.1	6.5	0.1	NS
22:5n-3	2.0	0.0	1.1	0.0	1.1	0.0	1.1	0.0	1.1	0.0	NS
22:6n-3	27.7	0.2	17.7	0.2	17.5	0.4	16.8	0.6	17.2	0.2	NS
Σ saturated	30.0	0.2	24.6	0.2	24.8	0.3	24.7	0.2	24.7	0.3	NS
Σ MUFAs	18.6	0.1	29.8	0.1	29.7	0.3	30.3	0.3	29.7	0.1	NS
Σ PUFAs	51.4	0.3	45.6	0.1	45.5	0.4	45.0	0.4	45.6	0.2	NS

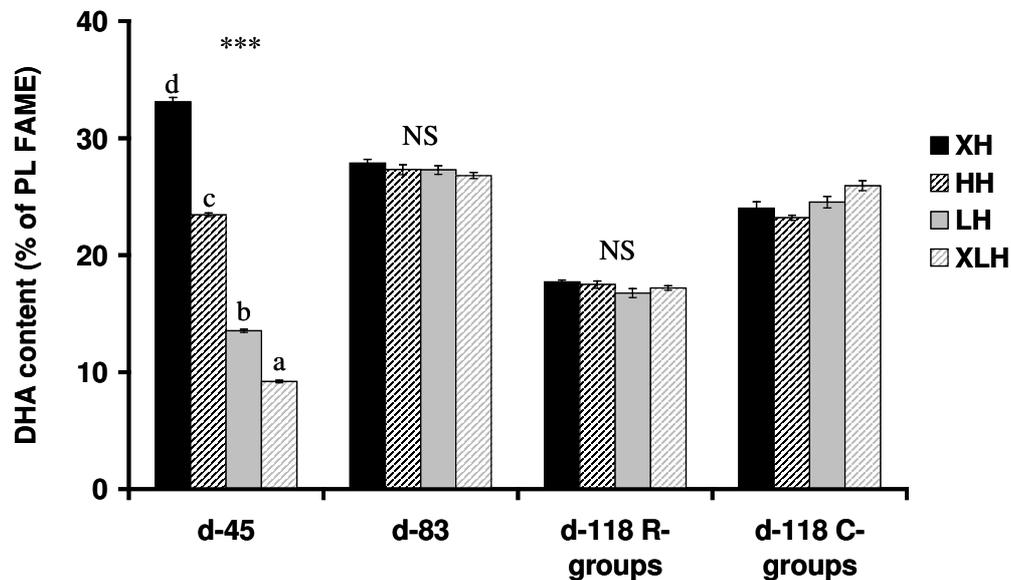


Fig.7. DHA content in PL of d-45 larvae (n=4), d-83 (n=4) and d-118 juveniles fed either the R-diet (n=4) or the C-diet (n=2, except of HH_{2R}, for which n=1), according to the larval initial diet. Statistical effect of initial diet is indicated (NS non significant ***P<0.001) for each date. ^{a, b, c, d} differing letters denote significant difference at P<0.05 for each date. No statistical significance of larval conditioning is indicated for the d-118 C-groups, as number of samples did not allow to apply statistical tests.

Discussion

The aim of this study was to elucidate whether the stimulation of desaturation/elongation pathways for n-3 HUFA synthesis in juveniles induced by a larval nutritional conditioning shown in a previous study ⁽⁸⁾ can be amplified using a large range of n-3 HUFA content (0.5-3.7% EPA+DHA) in the larval diet and a severe n-3 HUFA-restricted diet (0.3% EPA+DHA; R-diet) during the juvenile period.

As encountered in other studies ^(7, 15), diet composition had no significant effect on larval survival rates, while very low dietary n-3 HUFA content (XLH 0.5% EPA+DHA) led to decreased larval mass gain. Survival rates obtained were in agreement with a previous study ⁽¹⁵⁾, in which sea bass larvae reared at 19°C and fed a diet similar to HH₁ had a survival rate of 48% at d-38. The effect of high dietary HUFA content on mass gain could be the consequence of an elevated n-3-HUFA requirement for high cellular turn-over during the

larval stage⁽¹⁶⁾. Larval mean weights obtained in this study were high at d-45, and the values obtained in HH1 groups was much higher than found previously⁽¹⁵⁾ in sea bass larvae reared in similar conditions. This could indicate the initial larvae were of high quality. As previously observed⁽⁸⁾, larval conditioning did not affect growth performance of sea bass juveniles fed the R-diet, despite large differences in juvenile initial weight at the onset of the experiment 2, as a result of the different n-3 HUFA contents of the larval diets. The weight increase of R-juveniles was good in all groups, as it more than doubled in 35 days, and was not significantly different from that observed in C-groups during the first week of the experiment. However, the growth of R-groups seemed to be limited during the last period of the experiment. This was in accordance with a significant growth retardation of sea bass juveniles fed different HUFA dietary contents for 7 weeks⁽⁹⁾.

As observed earlier^(7,8), the level of $\Delta 6D$ mRNA was significantly higher in larvae fed a restricted n-3 HUFA diet during the larval stage (0.5 or 0.7% EPA+DHA), and in juveniles fed a low HUFA diet (0.3% EPA+DHA), following a transient feeding on a HUFA diet. This revealed that (i) $\Delta 6D$ transcription could be modulated by the n-3 HUFA content of the diet, as observed in seabream⁽¹⁷⁾ and, that (ii) conditioned juveniles were better than unconditioned fish in better developing desaturation processes in order to adapt to a low dietary HUFA content. The mRNA expression data were supported by the significant increase in 18:3n-6 measured in PL, as it is the $\Delta 6D$ desaturation product of 18:2n-6, and could not have been obtained through the diet. These findings indicate that the increase in the level of $\Delta 6D$ mRNA likely led to an increase in $\Delta 6D$ enzymatic activity required for the first step of the bioconversion of 18 carbon FA to HUFA (20-22 carbons), and for the conversion of EPA to DHA⁽¹⁸⁾. Contrary to our previous study⁽⁸⁾, the present results showed a persistence of $\Delta 6D$ mRNA level in juveniles 30 days after feeding of the larval diets ceased, and beyond the intermediate period on a high HUFA diet. It may be a consequence of (i) the more restricted HUFA contents in the larval (0.5 and 0.7% EPA+DHA vs. 0.8%) and juvenile (0.3% vs. 0.5%) diets used, (ii) from the younger fish used (d-83 vs. d-151 at the beginning of experiment 2), or (iii) from a shorter acclimation period (30 days vs. 90 days).

Our results demonstrated that PPAR α and PPAR β genes, which are involved in FA catabolism and keratinocyte differentiation, showed (i) a higher mRNA level in d-45 larvae fed the lowest dietary n-3 HUFA content (0.5% EPA+DHA) and, (ii) this was maintained in d-118 juveniles in the case of PPAR β . These results were in concordance with the higher $\Delta 6D$ mRNA level measured in these groups at the same times. According to several studies

conducted in mammals ⁽¹⁹⁾, PPARs are involved, along with sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1a and SREBP-1c), in the control of the $\Delta 6D$ gene transcription. SREBP-1 binds to sterol regulatory elements (SREs), and mediates the suppression of the $\Delta 6D$ gene by HUFA. In the present study, the concomitant increase of PPARs and $\Delta 6D$ mRNA levels suggested that PPARs could be partly involved in modulating $\Delta 6D$ gene expression in larval and juvenile sea bass. PPAR γ is involved in adipocyte differentiation and induction of lipogenic enzymes and, although its mRNA level was not significantly higher in larvae fed an n-3 HUFA-deprived diet, it was significantly higher in d-118 juveniles pre-conditioned with the lowest n-3HUFA diet during the larval stage. This suggested that PPAR γ could also have a role in the stimulation of the $\Delta 6D$ gene expression observed at the same time. The stimulation of PPAR mRNA level was not significantly higher in juveniles pre-conditioned with the LH diet (0.7% HUFA dietary content), in spite of the significantly higher $\Delta 6D$ mRNA level measured in these groups. We could hypothesise that the $\Delta 6D$ gene could possibly be stimulated by PPARs when drastic nutritional conditions occurred, and that above a threshold, other mechanisms like those observed in mammals may be implicated, such as SREBP-1. This hypothesis is in concordance with previous results ⁽⁸⁾, which did not reveal any significant stimulation of PPARs, using a conditioning larval diet containing 0.8% EPA+DHA, while a higher $\Delta 6D$ mRNA level was observed.

As the increase in PPAR and $\Delta 6D$ mRNA levels observed in larvae fed a low HUFA diet were retained in juveniles fed a low HUFA diet, this indicated that (i) pre-conditioned fish were able to develop adaptation to low dietary HUFA content during juvenile period and that (ii) this adaptation could be the consequence of nutritional programming occurring during larval stage. Several existing biological mechanisms described in mammals could explain the “memory” of metabolic effects of early nutritional environments in juveniles ⁽²⁰⁾: Induced variations in organ structure, alterations in cell number, clonal selection, metabolic differentiation, hepatocyte polyploidisation and epigenetic modifications. In this study, memory of metabolic process in juveniles could be due to epigenetic modifications of the $\Delta 6D$ and PPARs genes. Epigenetic modifications are modifications of DNA and covalent modifications of histones, which condition the accessibility of chromatin to transcription factors, facilitating the recognition of genes to be expressed or silenced, transiently or permanently, by these factors ⁽²⁰⁾. The hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) has been identified as an homeoprotein expressed in liver, kidney, pancreas and digestive tract that could activate transcription through participation in the recruitment of the general

transcription machinery to the promoter, or through the remodelling of chromatin structure and demethylation that would allow transcription factors to interact with their cognate *cis*-acting elements ⁽²¹⁾.

The relatively high level of n-3 HUFA measured in PL *vs.* NL of larvae and juveniles was in agreement with the preferential incorporation of these FA in PL contributing to the maintenance of PL quality ⁽²²⁾. Although AA, EPA and DHA were selectively incorporated in PL of larvae, low values were observed in PL of fish fed low n-3 HUFA diet (LH1 and XLH1), revealing an n-3 deficiency in these groups. Even though growth was similar in LH1 and XLH1 larvae, HUFA content in PL was different within these groups, in accordance with values previously observed in d-45 sea bass larvae fed a diet with similar EPA+DHA content ⁽⁷⁾. The XH1 groups showed an exceptionally high DHA content in both PL and NL in d-45 larvae, which has rarely been observed in aquaculture, except in larvae fed on natural plankton or on rotifers enriched with DHA ^(23, 24).

D-83 R-juveniles showed a similar composition in NL, while at d-118, several n-3 HUFA, including EPA and DHA, were present at a higher level in NL of XH2_R juveniles than in others. This indicated that differences observed at d-118 could be the consequence of the growth dependent-dilution effect of initial (d-83) FA stores in the smaller fish ⁽²⁵⁾. The DHA content in PL of R-juveniles at d-118 (about 17%; P<0.001) was intermediate between the DHA content of n-3 deprived LH1 and sufficient HH1 larvae, and significantly lower than in C-groups (about 24%), and d-83 juveniles (about 27%). This was in agreement with a previous study ⁽⁹⁾, which showed that sea bass juveniles fed at or above requirement had a minimal DHA content in PL of around 20% of total FA. The FA content in PL of d-118 juveniles remained similar in all groups, except for 20:4n-3, which was at a higher level in XH2_R groups than in others. In a previous experiment ⁽⁸⁾, a slightly higher DHA content in PL was found in juveniles conditioned with a n-3 HUFA deprived diet during the larval stage than in others, suggesting an enhanced capacity to adapt to a restricted-HUFA diet. A similar result was not obtained in the present study, which could be the consequence of technical differences between the two experiments, or to biological mechanisms. Irrespective, the two studies showed that the observed stimulation of Δ 6D mRNA was not linked to an increase in PL n-3 HUFA content, and this could be due to the very low rate of desaturation already described for European sea bass, even when up-regulated by diet ⁽²⁷⁾.

Conclusion

This study demonstrated an amplified stimulation of $\Delta 6D$ mRNA induced by dietary n-3 HUFA deficiency in juveniles pre-conditioned with a low dietary n-3 HUFA content during the larval stage, and persisting in young juveniles. However, this did not have a noticeable influence on FA composition and growth performances in juveniles challenged with a HUFA restricted diet. Our results also suggested the involvement of PPARs in the regulation of $\Delta 6D$ gene expression. Further studies concerning enzymatic activities of $\Delta 6D$ and PPARs gene regulation are required to further investigate and understand the metabolic pathways for HUFA synthesis in marine fish.

Acknowledgements

This work was supported by an Ifremer (Institut Français pour la recherche et l'exploitation de la mer) and an INRA (Institut National de Recherche Agronomique) grants to the first author. M. Vagner did analysis of growth and molecular biology, as well as the statistical analysis of all data. J.H. Robin was responsible for the lipid analysis, J.L. Zambonino contributed to the analysis of molecular biology, D. Tocher contributed to the lipid analysis and the English corrections. J. Person-Le Ruyet contributed to all data analysis, as she was the PhD supervisor of the first author. We are grateful to N. Le Bayon, H. Le Delliou, M.M. Le Gall, P. Quazuguel and A. Sévère for their technical assistance.

References

1. Ringo E, Lodemel JB, Myklebust R, Jensen L, Lund V, Mayhew TM & Olsen RE (2002) The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida*. *Aquac Res* **33**, 591-606.
2. Mourente G & Tocher DR (1994) In vivo metabolism of [^{1-14}C] linolenic acid (18:3n-3) and [^{1-14}C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim Biophys Acta* **1212**, 109-118.
3. Sargent JR, Tocher DR & Bell JG (2002) The lipids, Third edition. In Fish Nutrition (Halver JE & Hardy RW, eds) pp. 182-259. Academic Press, London.

4. Cho HP, Nakamura M & Clarke SD (1999) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 37335-37339.
5. Owen JM, Adron JW, Middleton C & Cowey CB (1975) Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot (*Scophthalmus maximus* L.), and rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Rich.) *Lipids* **10**(9), 528-531.
6. Lucas A. (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* **128**, 401S-406S.
7. Vagner M, Robin JH, Zambonino Infante JL & Person-Le Ruyet J (2007) Combined effect of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*D. labrax*) larvae development. *Aquaculture* **266**, 179-190.
8. Vagner M, Zambonino Infante JL, Robin JH & Person-Le Ruyet J (2007) Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage ? *Aquaculture* **267**, 165-174.
9. Skalli A & Robin JH (2004) Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* **240**, 399-415.
10. 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.
11. Gause WC & Adamovicz J (1994) The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl* **3**, 123-135.
12. Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
13. Marty Y, Delaunay F, Moal J & Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Eco.* **163**, 221-234.
14. Association of Official Analytical Chemists (1984). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Williams S. (Ed.). AOAC, Arlington, VA, pp. 1141.
15. Zambonino Infante JL & Cahu CL (1999) High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* **129**, 1195-1200.
16. Le Milinaire C (1984) Etude du besoin en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifère *Brachionus plicatilis*. Université de Brest (France), pp.168.

17. Seilliez I, Panserat S, Corraze G, Kaushik S & Bergot P (2003) Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol* **135B**, 449-460.
18. Buzzi M, Henderson RJ & Sargent JR (1997) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp Biochem Physiol* **116B**, 263-267.
19. Nakamura MT & Nara TY (2003) Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *PLEFA* **68**, 145-150.
20. Waterland RA & Garza C (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **69**, 179-197.
21. Pontoglio M, Faust DM, Doyen A, Yaniv M & Weiss MC (1997) Hepatocyte nuclear factor 1-alpha gene inactivation impairs chromatin remodelling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Cell Biol* **17**, 4948-4956.
22. Linares F & Henderson RJ (1991) Incorporation of ^{14}C -labelled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) in vivo. *J Fish Biol* **38**, 335-347.
23. Van Der Meeren T, Klugsoyr J, Wilhelmsen S & Kventseth PG (1993) Fatty acid composition of unfed cod larvae *Gadus morhua* L. and cod larvae feeding on natural plankton in large enclosures. *J World Aquacult Soc* **24** no.2, pp. 167-185.
24. Garcia AS, Parrish CC & Brown JA (2008) A comparison among differently enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. *Aquaculture nutrition* **14**, 14-30
25. Robin JH, Regost C, Arzel J & Kaushik SJ (2003) Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* **225**, 283-293
26. Robin JH & Skalli A (2007) Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) — A methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* **263**, 227-237.
27. Mourente G, Dick JR, Bell JG, Tocher DR (2005) Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and oxidation of $[1-^{14}\text{C}]18:3\text{n-3}$ and $[1-^{14}\text{C}]20:5\text{n-3}$ in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **248**, 173-186.

PARTIE 2

Dosage enzymatique de la delta-6 désaturase

1. Introduction

Les deux expériences menées au cours de cette thèse ont montré qu'un conditionnement nutritionnel carencé en HUFA n-3, appliqué dès l'ouverture de la bouche et tout au long du stade larvaire (45 jours), stimulait la mise en place des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA chez les larves de bar, puis chez les juvéniles issus de ces groupes, en réponse à un aliment carencé en HUFA. Ceci a été notamment mis en évidence par la stimulation du niveau d'ARN de la $\Delta 6D$, enzyme responsable de la première étape de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA. Cependant, en raison des modifications post-transcriptionnelles possibles de l'ARN de la $\Delta 6D$, il nous a paru nécessaire de doser l'activité enzymatique de la $\Delta 6D$ pour étayer les résultats obtenus dans cette étude et mieux comprendre le rôle de la teneur en HUFA n-3 du régime sur la fonctionnalité de l'enzyme.

L'objectif était (i) de mettre en place la technique de dosage de l'activité de la $\Delta 6D$ au laboratoire puis (ii) de mesurer cette activité chez les juvéniles de bar issus de l'expérience décrite en partie 1 (chapitre II).

2. Matériels et méthodes

La méthode de dosage de l'enzyme a été réalisée sur les microsomes de foie selon la technique par radioactivité utilisée au laboratoire d'Aquaculture de l'Université de Stirling Ecosse, UK (Tocher et al., 1999 ; 2001 ; 2006). Elle a ensuite été appliquée aux juvéniles issus de l'expérience décrite en partie 1 de ce chapitre.

2.1. Animaux et conditions d'élevage

Quatre groupes de larves ont été initialement élevés à 19°C et nourris de l'ouverture de la bouche (Jour 6) jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45) avec un aliment composé XH (3,7% EPA+DHA, % MS), HH (1,7%), LH (0,7%) ou XLH (0,5%) (Table 1, chapitre II - partie 1). Les quatre conditions expérimentales étaient : XH1, HH1, LH1, XLH1. Cette période larvaire a été suivie d'une période intermédiaire d'un mois (J-46-77) pendant laquelle les quatre groupes étaient nourris avec un aliment commercial (2,7% EPA+DHA), correspondant à la

moyenne de la teneur en EPA+DHA des aliments XH et HH. Les quatre conditions expérimentales étaient XH2, HH2, LH2 et XLH2. A J-77, les juvéniles ont été anesthésiés (éthylène-glycol-monophenylether, 0.15‰), sélectionnés (les poissons mal formés ont été éliminés), et distribués au hasard en quatre réplicats par condition dans des bassins de 60 l à raison de 180 poissons par bassin. Les animaux ont été acclimatés à l'unité expérimentale pendant 6 jours (J-77-83) à 19°C, puis ont été progressivement nourris avec un régime restreint (R) en HUFA n-3 (0.3% EPA+DHA) par l'incorporation d'huile de colza (Table 2, chapitre II – partie 1). Les quatre conditions expérimentales étaient : XH2_R, HH2_R, LH2_R et XLH2_R. Les poissons ont été nourris à la main *ad libitum* à 9h00, puis le reste de l'aliment était automatiquement distribué en excès jusqu'à 18h. L'expérience a débuté quand les animaux ont été nourris intégralement avec un régime restreint (J-83 ; t0) et s'est terminée lorsque le poids de tous les poissons a doublé (J-118; t35).

2.2. Prélèvements

Avant d'effectuer les prélèvements, les juvéniles étaient à jeun pendant 12h. Le volume d'eau était baissé au moment de la pêche. Dix juvéniles par bassin ont été prélevés dans les quatre bassins par condition à J-83, J-90, J-107 et J-118 (40 poissons par condition ; n=4). Ils ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C dans l'attente d'être analysés.

2.3. Dosage de l'activité de la $\Delta 6D$

Les juvéniles congelés ont été disséqués sur une plaque en verre maintenue à 0°C. Le foie entier a été isolé et la vésicule biliaire a été retirée. Les foies de 10 poissons par bassin ont été regroupés puis broyés au broyeur à billes (type Danguomeau avec pots en acier).

2.3.1. Préparation des microsomes

Les échantillons de foie encore congelés ont été pesés (poids minimum de 0,5 g) puis homogénéisés à l'aide d'un broyeur Potter[®] Elvehjem (piston en téflon) dans un tampon d'homogénéisation contenant 0.25ml de sucrose dans 10 mM d'HEPES et 1mM EDTA (pH

7,4), à raison de 1g de foie dans 4 ml de tampon. L'homogénat a été centrifugé 6 min à 3000 tours (600g) à 4°C. Le culot contenant les débris cellulaires et nucléaires a été éliminé et le surnageant a été centrifugé 10 min à 5 000 tours (6 800 g) à 4°C. Le culot contenant la fraction mitochondriale a été éliminé et le surnageant a été centrifugé 15 min à 14 000 tours (25 000 g) à 4°C. Le culot contenant la fraction péroxisomale a été éliminé et le surnageant a été centrifugé 15 min à 30 000 tours (105 000 g) à 4°C. Le culot contenant les microsomes a ensuite été repris dans 0,5 ml de tampon sucrose et homogénéisé au Polytron® PT2100 Bioblock® (Buzzi et al., 1996). Un volume de 100 µl a été prélevé et stocké à -20°C pour le dosage des protéines (annexe 1 page 170).

Lorsque le poids initial des échantillons était inférieur à 0,5g, les échantillons d'une même condition étaient regroupés. Ceci a eu pour conséquence de diminuer le nombre de réplicats par condition (de n=4 initialement à n=1), rendant l'usage de tests statistique impossible.

2.3.2. Dosage de la $\Delta 6D$

Préparation des esters méthylés d'acides gras (FAME)

Un volume de 200µl de microsomes a été incubé à 20°C pendant 1h30 dans des tubes en verre contenant 50µl d'acide α -linoléinique 18:3n-3 radioactif d'activité spécifique 1,91 GBq.mmol⁻¹ (Nec-779 PerkinElmer Life, MA, USA) ajouté à un complexe free-fatty acid-BSA (protocole de préparation en annexe 2 page 171) et 950 µl de milieu d'incubation (protocole de préparation en annexe 3 page 172). La réaction d'incubation a été arrêtée en ajoutant 5ml de mélange chloroforme-méthanol froid (2 :1, v/v) + 0.01% BHT puis les tubes ont été centrifugés 5 min à 1500 rpm. La phase inférieure contenant les acides gras a été prélevée et filtrée (Whatman No.1 diamètre 90mm CAT NO 1001 090) puis le solvant évaporé sous azote à 50°C (N-evap). Les acides gras ainsi isolés ont été transformés en FAME (fatty acid methyl esters) par transméthylation une nuit entière à 50°C après l'ajout de 1 ml de toluène et de 2,5 ml de méthanol contenant 1% d'acide sulfurique concentré à 95%. Les FAME ont été extraits en ajoutant 2 ml de KHCO₃ et 5ml d'hexane/diethylether (1 :1, v/v) + 0,01% BHT puis en centrifugeant ce mélange 2 min à 1200 rpm. La phase supérieure a été transférée dans un tube en verre conique. Une seconde extraction a été réalisée en ajoutant 5ml d'hexane/diethylether (1 :1, v/v) sans BHT et en centrifugeant une seconde fois. La phase

supérieure a été ajoutée au précédent tube. Les FAME ont été récupérés en évaporant le solvant sous azote, puis ont été repris dans 100µl d'hexane + 0,01% BHT.

Séparation des acides gras par chromatographie sur couche mince

Après l'avoir lavée (migration complète du solvant hexane/diethylether ; 1 :1 ; v/v) puis séchée (une nuit sous hotte), une plaque TLC (thin-layer chromatography silicagel 60 épaisseur 0,2 mm, Merck ®) a été imprégnée d'une solution de 2 g de nitrate d'argent dans 20 ml d'acétonitrile et activée à 120°C pendant 30 min dans le noir. Après refroidissement, les FAME ont été déposés uniformément sur la plaque dans le noir à l'aide d'une seringue Hamilton® (Fig.1). La migration des échantillons est réalisée dans une cuve en verre saturée en toluène/acétonitrile pendant environ 1h (95 :5 ; v/v ; Wilson & Sargent, 1992). Après séchage sous hotte dans le noir, la révélation de la plaque est effectuée par autoradiographie.

Autoradiographie

L'autoradiographie a été réalisée en mettant en contact la plaque TLC avec un film Kodak BioMax MR2 (Carestream Health Inc., USA) pendant 6 jours dans l'obscurité, à 20°C. Le film a ensuite été développé (Développeur Kodak® GBX, Carestream Health Inc., USA) et fixé (Fixateur Kodak® GBX, Carestream Health Inc., USA). Les bandes obtenues sur le film correspondent à des acides gras identifiés en fonction de leur migration par rapport au substrat marqué 18 :3n-3, la vitesse de migration dépendant de leur degré d'insaturation et de la longueur de leur chaîne carbonée (Fig.1). Les bandes de silice correspondantes ont été grattées puis récupérées dans une fiole à scintillation contenant 4 ml de liquide scintillant (Opt-Fluor® O, Perkin-Elmer ®, MA, USA). La radioactivité de chacune des bandes a été mesurée par un compteur à scintillation TRI-CARB 2000CA (United Technologies Packard, UK) utilisant un programme de lecture spécifique au ¹⁴C.

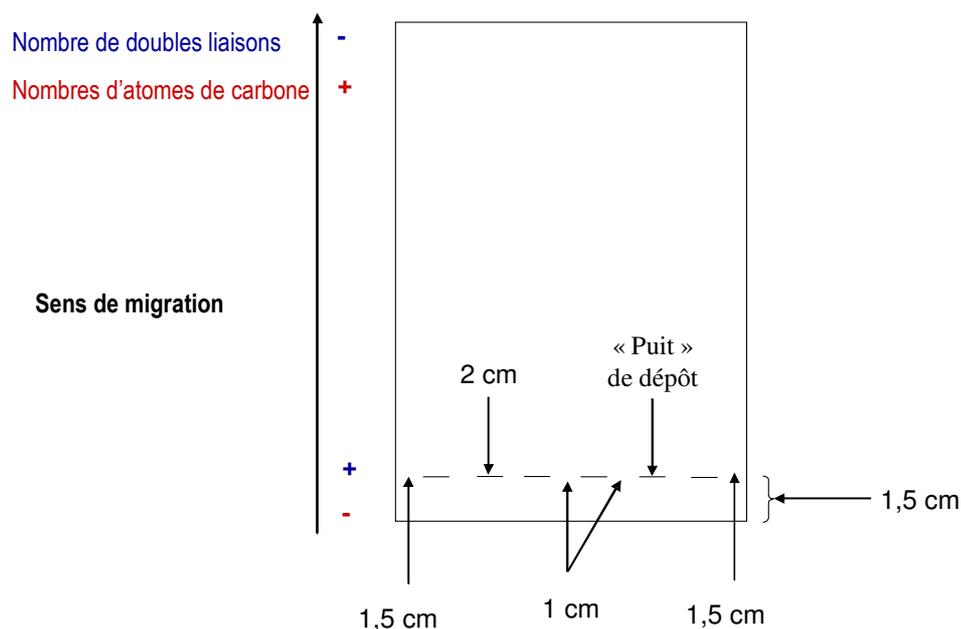


Fig.1. Représentation des puits de migration de la plaque TLC et de la migration des acides gras en fonction de leur degré d'insaturation et de la longueur de leur chaîne carbonée.

2.4. Quantification des protéines

La concentration en protéines de chaque échantillon a été déterminée en $\mu\text{g/ml}$ selon la méthode de Lowry et al. (1951) décrite en annexe 1.

2.5. Analyse des résultats

Les résultats obtenus par le compteur à scintillation en coups par minute (CPM) ont été corrigés par l'efficacité du comptage E , et par la concentration en protéines de l'échantillon, pour être exprimés en $\text{pmol. mg protéine}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$:

Les données en CPM sont transformées en DPM :

$$DPM (\text{désintégration. min}^{-1} \text{ de } ^{14}\text{C.g}^{-1}) = CPM / E,$$

Où E est l'efficacité du compteur qui se calcule par :

$$E = 56 + (0.03333 * tsie),$$

$tsie$ étant le paramètre de quenching donné par l'appareil.

Les données en DPM sont ensuite transformées en picomoles par la relation :

$$Pmol = DPM/110$$

Ces valeurs en picomoles sont ensuite ramenées à la quantité de protéines de l'échantillon et au nombre d'heure d'incubation entre l'échantillon et le substrat radioactif (pmol. mg protéine⁻¹. h⁻¹). La faible quantité de réplicats n'a pas permis de réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Ces résultats sont donc purement préliminaires et indicatifs.

3. Résultats-Discussion

La Fig.2 montre le résultat de la migration des acides gras en fonction du substrat marqué (18 :3n-3) par autoradiographie. En raison de la faible radioactivité des autres bandes, seul le 18 :4n-3 a été représenté sur la Fig.3. La production à peine détectable d'EPA et DHA dans notre étude pourrait s'expliquer par le fait que le dosage a été effectué dans les microsomes et non dans les hépatocytes. Buzzy et al. (1996) ont mis en évidence que la formation de DHA (22 :6n-3) à partir du substrat marqué (18 :4n-3) était peu détectable dans les microsomes de poissons nourris avec un aliment végétal, comparée à la teneur mesurée dans les hépatocytes.

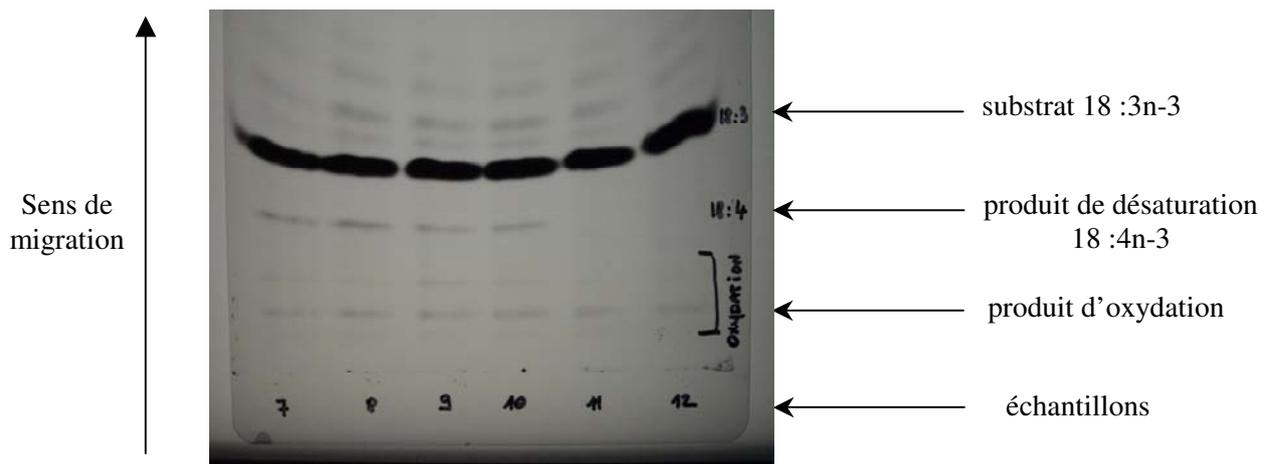


Fig.2. La migration des acides gras de 6 échantillons de microsomes de foie de juvéniles de bar en fonction du substrat marqué (acide α-linolénique ¹⁴C-18 :3n-3) par autoradiographie.

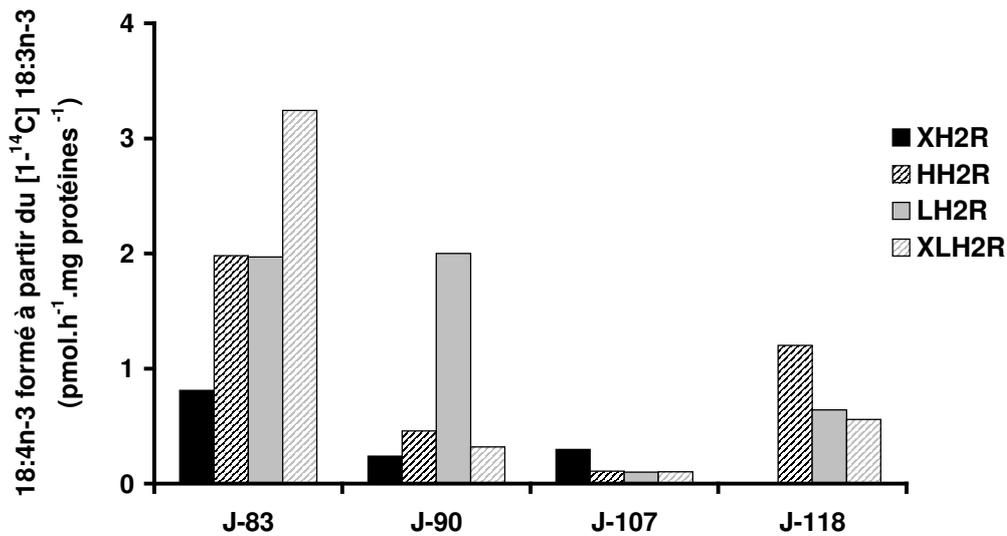


Fig.3. Taux de production du 18:4n-3 par désaturation du substrat marqué (acide α -linoléique ^{14}C -18:3n-3) dans les microsomes de juvéniles de bar nourris avec un aliment carencé (0,3% EPA+DHA) en fonction de leur pré-conditionnement nutritionnel au stade larvaire (XH 3,7% ; HH 1,7% ; LH 0,7% et XLH 0,5% EPA+DHA). L'activité du groupe XH_{2R} n'a pas pu être calculée à J-118.

La Fig.2 représente la quantité de 18:4n-3 formée par la $\Delta 6\text{D}$ à partir du substrat radioactif 18:3n-3. La production de 18:4n-3 a globalement diminué dans les groupes XH_{2R}, HH_{2R} et XLH_{2R} entre J-83 et J-107. Le groupe LH_{2R} a montré une production similaire à J-83 et J-90. La production a augmenté globalement dans tous les groupes en fin d'expérience, entre J-107 et J-118, mais aucune donnée n'est disponible pour le groupe XH_{2R} à J-118.

A J-83, les juvéniles XLH_{2R} ont produit environ quatre fois plus de 18:4n-3 (3,2 pmol.mg protéine⁻¹.h⁻¹) que les juvéniles pré-conditionnés avec l'aliment XH (0,8 pmol.mg protéine⁻¹.h⁻¹), alors que des valeurs similaires ont été observées entre les groupes LH_{2R} et HH_{2R}. A J-90, la production du groupe LH_{2R} était environ dix fois plus élevée chez les LH_{2R} que chez les trois autres groupes. A J-107, elle était similaire chez les groupes HH_{2R}, LH_{2R} et XLH_{2R} alors qu'une valeur 2 fois plus élevée a été mesurée chez le groupe XH_{2R}. En fin d'expérience, la quantité de 18:4n-3 produite était environ 50% supérieure chez les juvéniles HH_{2R} que chez les LH_{2R} et XLH_{2R}.

L'absence d'analyse statistique ne permet pas d'évaluer l'effet du conditionnement nutritionnel larvaire sur l'activité enzymatique de la $\Delta 6\text{D}$ chez les juvéniles de bar, ni de

comparer les résultats obtenus avec les données de la littérature. En revanche, la mise en place de la technique au laboratoire ouvre de nouvelles perspectives de recherche pour comprendre la mise en place des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA chez le bar. Les prochains travaux du laboratoire vont viser à comparer la sensibilité de cette technique de dosage à celle utilisée pour les mammifères au laboratoire de la faculté de médecine de Brest (Fer et al., 2006), et qui consiste à séparer les acides gras par RP-HPLC (Reverse Phase ion-pair High Performance Liquid Chromatography), puis à les identifier par la méthode de couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse.

CHAPITRE III

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse s'inscrit dans une problématique aquacole de substitution des produits de la mer (huiles et farines) par des sources végétales dans l'alimentation des poissons marins. Comme les huiles de poisson ont une disponibilité plus limitée que les farines (Barlow, 2000), cette étude a plus spécifiquement porté sur leur substitution par des huiles végétales. Contrairement aux huiles de poissons riches en HUFA n-3, les huiles végétales ne contiennent que des traces de ces nutriments. Elles pourraient donc induire une carence des animaux en HUFA n-3. Une des conséquence de cette carence serait une diminution de la qualité de la chair en EPA et DHA.

L'objectif de cette étude était de voir si, par le concept de programmation métabolique bien connu chez les mammifères, il est possible de produire des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) pouvant mieux utiliser ces huiles végétales pour assurer notamment leur développement et la qualité de leur chair en EPA et DHA. Comme les poissons marins ont une faible capacité à bioconvertir en HUFA les acides gras précurseurs à 18 carbones apportés par les huiles végétales, cette étude supposait de pouvoir stimuler les capacités de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA chez les juvéniles de bar, en utilisant un conditionnement nutritionnel larvaire caractérisé par un régime pauvre en HUFA n-3. Au cours de cette thèse, deux conditionnements nutritionnels précoces nommés C1 et C2 ont été testés, dès la première alimentation et jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45). Les effets de ces conditionnements nutritionnels (i) sur le métabolisme lipidique des larves, puis (ii) sur les capacités des stades ultérieurs à s'adapter à un régime alimentaire carencé en HUFA n-3 élaboré à partir d'huile végétale ont été étudiés.

Les régimes utilisés au cours des deux conditionnements nutritionnels C1 et C2 étaient, dans la mesure du possible, isolipidiques (~20% matière sèche MS) et isoprotéiques (>50-60% MS) et respectaient les besoins estimés pour les larves de bar (Pérès et al., 1996 ; Zambonino et Cahu, 1997). L'apport en protéines de poisson sous forme hydrolysée (12% MS) respectait la valeur recommandée par Cahu et al. (2003a) pour assurer le développement squelettique sans affecter la croissance des larves de poissons marins. L'apport en phospholipides PL (~15%) était supérieur à la valeur optimale estimée à 12% chez les larves de poissons marins (Cahu et al., 2003b). Pour les deux conditionnements, le but était que les régimes utilisés ne diffèrent que par leurs teneurs en HUFA n-3 (EPA+DHA en % MS). Cette teneur a varié de 0,8% à 2,2% EPA+DHA (% MS) pour les régimes de C1 et de 0,5% à 3,7% EPA+DHA pour les régimes de C2 (Table 1). Les besoins des larves en HUFA n-3 étant mal

connus, les teneurs en EPA+DHA des aliments utilisés pour C1 (régime LH : 0,8% ; régime HH : 2,2% EPA+DHA) ont été définies par rapport aux besoins estimés chez les juvéniles de bar, soit 0,7% HUFA n-3 (Skalli et Robin, 2004). La faible teneur en HUFA n-3 testée (régime LH) a été obtenue d'une part en utilisant des lipides d'origine végétale représentant 90% des lipides de l'aliment (2% MS d'huile de soja et 20% MS de lécithine de soja) et d'autre part en incorporant plus de 50% de la farine de poisson sous forme délipidée. Ainsi, les 10% de lipides restants étaient des lipides d'origine marine apportés par la farine de poisson. Ce premier conditionnement C1 a montré qu'un conditionnement nutritionnel carencé jusqu'à 0,8% EPA+DHA appliqué dès la première alimentation des larves de bar, et tout au long du stade larvaire (J-45), permettait une croissance correcte et n'avait pas de conséquence sur la survie des larves. Nous avons donc pris le risque d'utiliser un régime XLH1 40% plus carencé (0,5% EPA+DHA) au cours de C2. Ce régime a été obtenu en utilisant des lipides d'origine végétale représentant 96% des lipides de l'aliment (1% d'huile de soja et 23% de lécithine de soja). A l'opposé, un régime XH1, dont la teneur en HUFA n-3 était ~45% plus élevée que le régime HH de C1 a été également utilisé. Pour ce régime, les lipides d'origine végétale n'assuraient que 26% des lipides de l'aliment (7% de lécithine de soja), le reste étant apporté par des lipides d'origine marine (19% lécithine marine et 4% de lipides marins apportés par la farine de poisson). Deux autres régimes équivalents à ceux utilisés pour C1 ont été utilisés pour C2 afin de pouvoir comparer les deux conditionnements testés. Dans tous les régimes de C2, l'incorporation de 75% de farine de poisson délipidée a permis de limiter à 4% l'apport lipidique d'origine marine par la farine de poisson. Les taux d'incorporation de produits végétaux dans les régimes LH, LH1 et XLH1 concordaient avec les 20% habituellement utilisés dans les régimes commerciaux.

Bien que l'objectif premier était d'obtenir des régimes ne différant que par leur teneur en HUFA n-3, l'incorporation de différents teneurs en produits végétaux et en lécithine marine dans les régimes ont également induit des différences de teneur en acides gras n-6 entre ces régimes. Ainsi, les régimes LH, LH1 et XLH1, riches en huile et lécithine de soja, avaient une teneur en acide gras n-6 environ 80% supérieure à leur teneur en acide gras n-3. Le ratio DHA/EPA des régimes de C1 et C2 (de 1,6 à 2,6) était en accord avec la valeur recommandée supérieure à 1,5-2 pour une meilleure croissance et une meilleure survie des larves de poissons marins (Kjørsvik et al., 2004).

Les régimes HH et HH/ utilisés lors de C1 et C2 respectivement, et contenant ~2% EPA+DHA (% MS) sont appelés « régimes de référence ». Les régimes LH et LH/ contenant 0,7 et 0,8% EPA+DHA sont qualifiés de « sub-carencés » et le régime XLH/ contenant 0,5% EPA+DHA est nommé « fortement carencé ». Le régime XH/ dont la teneur en EPA+DHA est supérieure à celle des régimes de référence est appelé « régime riche ».

Table 1. Principales caractéristiques des régimes alimentaires utilisés au cours de C1 et C2, par rapport à certains besoins connus ou estimés de l'espèce (Ackman, 1980 ; Pérès et al., 1996 ; Zambonino et Cahu, 1997 ; Cahu et al., 2003a, 2003b ; Kjørsvik et al., 2004 ; Skalli et Robin, 2004). En vert sont représentés les régimes de référence ; en violet et rouge, les régimes respectivement sub-carencés et fortement carencé. Le régime riche est représenté en bleu.

Principales caractéristiques	C1		C2				Besoins estimés
	HH	LH	XH1	HH1	LH1	XLH1	
Teneur en lipides (% MS)	22,1	21	18,5	19,1	19,9	20,2	20
Teneur en protéines (% MS)	55,2	58,5	63,9	59,2	57,0	57,1	>50-60
Taux de substitution des lipides marins par des lipides végétaux (%)	58	90	26	61	88	96	
Somme des acides gras n-6 (% FAME)	32	45	21	37	45	48	
Somme des acides gras n-3 (% FAME)	20	11	33	19	11	9	
Ratio DHA/EPA	1,8	1,6	2,3	2,1	1,8	1,3	1,5-2
Teneur en EPA+DHA (% MS)	2,2	0,8	3,7	1,7	0,7	0,5	0,7

I. L'effet du conditionnement sur le métabolisme lipidique des larves

Tout au long des deux expériences, les aliments ont été apportés en excès en assurant du maintien de la qualité de l'eau (contrôle du pH et des concentrations en ammoniacque et en oxygène). Ceci exclut l'effet de la quantité de l'aliment et de la qualité de l'eau dans la discussion des différences observées entre les deux expériences.

Les deux conditionnements testés ont montré qu'une gamme de teneur en HUFA n-3 de l'aliment s'étalant de 0,5 à 3,7% EPA+DHA n'affectait pas les taux de survie des larves. Le conditionnement C1 a montré qu'une teneur minimale de 0,8% EPA+DHA n'influçait pas le développement squelettique à J-25 et J-45, ni la maturation pancréatique (dosage des activités enzymatiques de l'amylase et de la trypsine) des larves, achevée à J-25. Toutefois, cette teneur a induit un retard de maturation intestinale (ratio des activités enzymatiques de la phosphatase alcaline/ leucine-alanine) à J-45 mais uniquement chez les larves élevées à 16°C. Ces résultats nous ont amenés à ne pas tenir compte du développement squelettique et de la maturation pancréatique et intestinale au cours de C2. Contrairement à notre attente, les taux de croissance des individus nourris avec un aliment sub-carencé ou fortement carencé n'étaient pas significativement différents de ceux des lots de référence pour les deux conditionnements testés (Fig.1). Ceci reflétait la croissance rapide des larves, relative à l'ontogénèse. Néanmoins, les croissances pondérales finales (J-45) des lots carencés restaient significativement 20% inférieures à celles des lots de référence.

Pour les deux conditionnements éprouvés, la composition lipidique des larves reflétait globalement celle de l'aliment. Cependant, une production significative d'acide γ -linoléinique (18 :3n-6), produit de désaturation de l'acide linoléique (18 :2n-6) par la delta-6 désaturase (Δ 6D), a été observée chez les larves sub-carencées et fortement carencées. Ce résultat était supporté par le niveau d'ARNm de la Δ 6D 3 à 5 fois plus élevé mesuré chez ces mêmes individus (larve entière) que chez les lots de référence (niveau d'ARNm constant tout au long de C1 et C2). Bien que les deux températures d'élevage utilisées au cours de C1 aient influencé le développement squelettique et la maturation intestinale, elles n'ont pas influencé la production de 18 :3n-6 ni le niveau d'ARNm de la Δ 6D. Ceci a alors justifié l'utilisation, lors de C2, d'une température unique de 19°C, moyenne entre les deux précédemment utilisées, et température de référence des élevages du laboratoire.

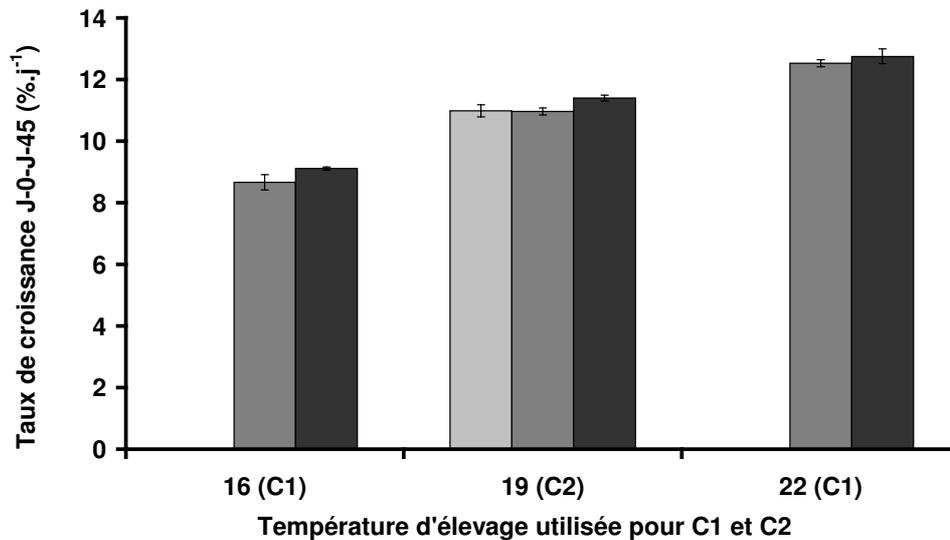


Fig.1. Taux de croissance journalier (%.j⁻¹ ± SE ; n=4) de J-0 à J-45 des larves nourries avec un régime de référence (barres noires), sub-carencés (barres gris foncé) ou fortement carencé (barres gris clair).

Malgré la difficulté de collecte des larves qui rend relativement imprécise leur estimation, les taux de survie mesurés à J-45 pour C2 à 19°C (~46%) et pour C1 à 16°C (~52%) étaient élevés, alors que des taux de survie deux fois inférieurs ont été obtenus pour C1 à 22°C (~23%). La comparaison des taux de survie selon la température est toutefois difficile car ils varient selon le stade de développement considéré, et aucune comparaison à stade de développement équivalent n'a été faite dans cette étude. Les stades de développement squelettique étaient moins avancés à faible température (16°C) qu'à forte température (22°C), ce qui est en accord avec Koumoundouros et al. (2001). Ainsi, la diminution du taux de survie à 22°C ne peut pas être interprétée comme un effet de la température. Elle pourrait aussi, par exemple, être la conséquence d'une différence de qualité de ponte entre les deux conditionnements.

Pour les deux conditionnements testés, les poids des larves obtenus en fin d'ontogénèse (J-45) correspondaient à des poids normaux de larves de bar nourries avec des régimes équivalents. Les poids moyens obtenus à l'issue de C2 à la température moyenne de 19°C représentaient environ la moyenne de ceux obtenus à 16 et à 22°C à l'issue de C1 (Fig.2).

L'augmentation significative des poids avec la température est en accord avec les résultats habituellement obtenus chez les poissons (Fuiman, 1998 ; Koumoundouros et al., 2001).

Les différences de poids mesurées à J-45 lors de C1 et C2 entre les larves carencées (0,5-0,8% EPA+DHA) et les lots de référence (~2% EPA+DHA) seraient en grande partie dues à la teneur en HUFA n-3 du régime, les aliments apportés en excès étant isolipidiques et isoprotéiques. Cette hypothèse est en accord avec plusieurs études (Kamler et al., 1990 ; Koumoundouros et al., 1999 ; Cahu et al., 2003a). Cependant, comme mis en évidence par Person-Le Ruyet et al. (2004) chez les juvéniles de bar, ces différences de croissance pourraient également être dues à un effet de la teneur en HUFA n-3 du régime sur la prise alimentaire des larves. Il est toutefois techniquement difficile d'estimer la prise alimentaire chez les larves en raison de leur petite taille.

Ces différences de poids sont observées à partir d'une teneur en HUFA n-3 du régime comprise entre 1,7 et 0,8% EPA+DHA (% MS). Les régimes dont la teneur en EPA+DHA est inférieure à cette teneur (XLHI : 0,5 ; LHI : 0,7 et LH : 0,8% EPA+DHA % MS) sont donc à juste titre définis de « carencés » en HUFA n-3; la carence d'un nutriment étant définie comme un apport alimentaire insuffisant de celui-ci pour assurer le maintien optimal de la croissance et des fonctions de l'organisme. Ces régimes carencés n'ont pas induit de différences de poids final entre les lots sub-carencés et fortement carencés. De même, les régimes de teneur en HUFA n-3 supérieure à [0,8-1,7% EPA+DHA] n'ont pas non plus induit de différence de poids final entre les lots de référence et les lots nourris avec un régime riche. Ceci indique le déclenchement d'une croissance pondérale en palier par la teneur en HUFA n-3 comprise entre [0,8-1,7% EPA+DHA]. Ceci est en accord avec ce qui est classiquement observé au-dessus des besoins. En revanche, en dessous du besoin, les données de la littérature montrent plutôt une diminution du poids proportionnelle à la diminution de la teneur d'un nutriment dans le régime (Zeitoun et al., 1976). Dans cette étude, le poids final non différent entre les larves fortement carencées et les larves sub-carencées indiquerait une grande plasticité des larves de bar à s'adapter à une teneur en HUFA n-3 de leur régime allant jusqu'à 0,5% EPA+DHA.

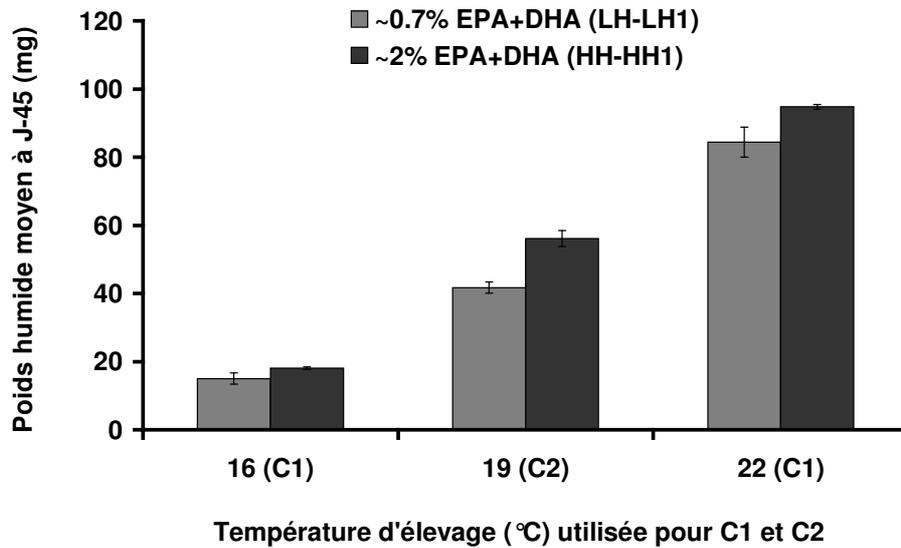


Fig.2. Comparaison entre les poids moyens (mg±SE) à J-45 des lots de référence (gris foncé) et des lots sub-carencés (gris clair) selon le conditionnement thermique appliqué : C1 (16 ou 22°C) et C2 (19°C).

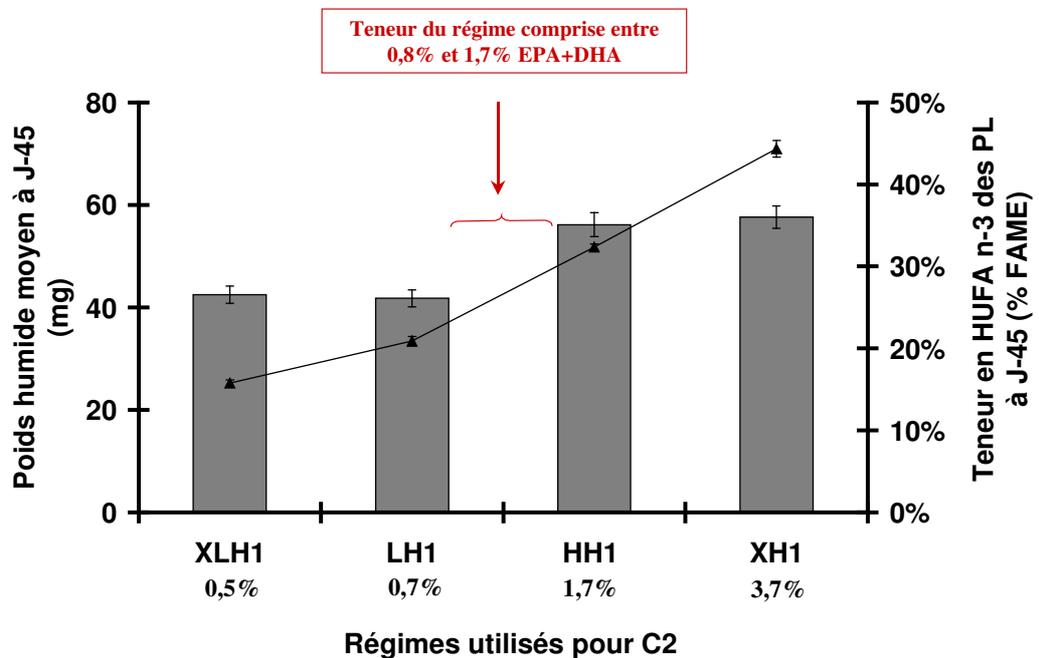


Fig.3. Effet de la teneur en HUFA n-3 (% FAME total Fatty Acid Methyl Esters) des régimes utilisés pour C2 (XH1 ; HH1 ; LH1 ; XLH1) sur le poids moyen et la teneur en HUFA n-3 des phospholipides (PL) à J-45 (moyenne ± SE).

Alors qu'une croissance en palier a été observée chez les larves suivant la teneur en HUFA n-3 de leur régime, la teneur en HUFA n-3 des PL et des lipides neutres (NL) des larves reflétait celle de leur régime à J-45, comme attendu (Fig.3). La teneur en HUFA n-3 des PL était supérieure à celle des NL en raison de l'incorporation préférentielle des HUFA n-3 dans les PL des larves, pour couvrir la quantité de PL nécessaire à la croissance rapide et au renouvellement cellulaire intense des larves pour la métamorphose (Robin et Vincent, 2003). Ainsi, la teneur en DHA des PL des larves nourries avec le régime riche en HUFA n-3 (~30% FAME) était ~20% supérieure à celle des lots de référence (~24% FAME). Une telle teneur n'a que très rarement été observée en aquaculture, sauf chez des larves nourries avec du plancton naturel ou avec des rotifères enrichis en DHA (Van der Meeren et al., 1993 ; Garcia et al., 2008). A l'opposé, les régimes sub-carencés et fortement carencés ont induit une teneur en DHA (~14% et ~9% FAME respectivement) et EPA (~5 et 4% FAME) des PL des larves entre 40% et 60% inférieure à celle des lots de référence, indiquant une déficience en HUFA n-3 dans ces groupes.

Bien que, comme attendu, la composition lipidique des larves reflète celle de leur régime à J-45, la teneur en 18:3n-6 des larves sub-carencées et fortement carencées (0,5-0,8% EPA+DHA) était respectivement 5 et 9 fois supérieure à celle des lots de référence à l'issue des deux conditionnements, alors que cet acide gras était apporté de façon équivalente par tous les régimes. Cela indique une désaturation du 18:2n-6 par la $\Delta 6D$ (Fig.4). Cette hypothèse est supportée par le niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ respectivement 3 et 5 fois plus élevé chez ces mêmes individus que chez les lots de référence à J-45. Ces résultats indiquent que les larves carencées ont stimulé des mécanismes enzymatiques de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA pour s'adapter à la carence en HUFA n-3 de leur régime. Le second conditionnement testé montre que la stimulation de ces mécanismes est d'autant plus forte que le régime est carencé en HUFA n-3 ; un niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ environ deux fois plus élevé ayant été mesuré chez les larves fortement carencées (0,5% EPA+DHA) que chez les larves sub-carencées (0,7% EPA+DHA). Ceci est supporté par la teneur en 18:3n-6 deux fois plus élevée mesurée dans les NL de ces mêmes individus. Les niveaux d'ARNm de la $\Delta 6D$ faibles et constants mesurés dans les lots de référence et dans ceux nourris avec le régime riche pourrait s'expliquer par l'inhibition de la transcription du gène la $\Delta 6D$ liée à la teneur élevée en HUFA n-3 du régime selon un mécanisme mis en évidence chez les mammifères (Ou et al., 2001 ; Xu et al., 2001, 2002 ; Nara et al., 2002 ; Hegarty et al., 2005) et qui sera détaillé en troisième partie de cette discussion.

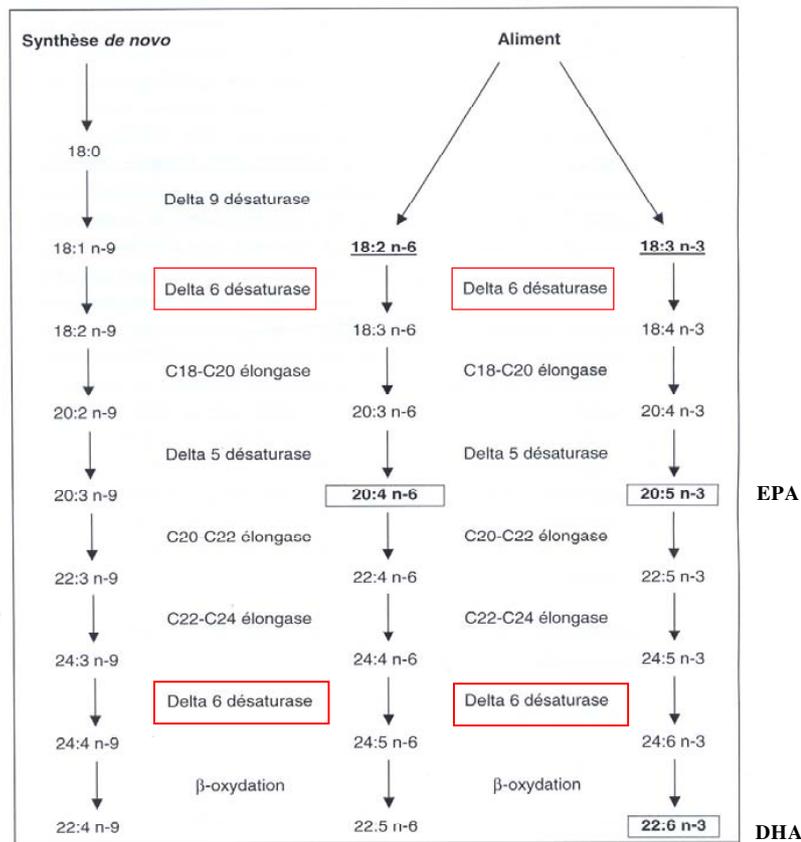


Fig.4. Mécanismes enzymatiques de synthèse des HUFA à partir des acides gras précurseurs de l'aliment.

La modulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ par les HUFA n-3 mise en évidence dans cette étude est en accord avec les résultats obtenus par Seiliez et al. (2003) chez la daurade (*Sparus aurata*) adulte. Ces auteurs ont montré une stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ ainsi que des quantités élevées de produits de désaturation de la $\Delta 6D$ (18:2n-9 et 20:2n-9) chez des individus nourris avec un aliment totalement dépourvu d'HUFA, et dont l'huile d'olive était l'unique apport lipidique.

En plus d'une augmentation de la teneur en 18 :3n-6, les deux conditionnements testés ont mis en évidence une augmentation significative de la teneur en 20 :3n-6, produit d'élongation du 18 :3n-6, chez les larves carencées, alors que cet acide gras était apporté en plus grande quantité par le régime de référence. Cela indique une activité enzymatique de l'élongase C18-C20 dans ces groupes. Toutefois, les productions de 18 :3n-6 et de 20 :3n-6 n'ont pas donné lieu à une production suffisante de 20 :4n-6 (acide arachidonique AA), une déficience en cet HUFA ayant été mesurée chez les larves carencées à l'issue des deux

conditionnements. Le 20 :4n-6 étant le produit de désaturation du 20 :3n-6 par la $\Delta 5D$, ce résultat suggère une activité limitée de la $\Delta 5D$ chez ces individus (Fig.4). Cette hypothèse serait en accord avec Tocher et Ghioni (1999) qui ont démontré une activité enzymatique de la $\Delta 5D$ plus faible que celles de la $\Delta 6D$ et des élongases chez la daurade.

Aucun des deux conditionnements n'a mis en évidence une augmentation significative de la teneur en 18 :4n-3 (produit de désaturation du 18 :3n-3 par la $\Delta 6D$) chez les larves carencées. Il est toutefois difficile d'observer une production de 18 :4n-3 en raison de la forte teneur en cet acide gras dans les larves et de la faible teneur de son précurseur dans les régimes utilisés. De plus, d'après une étude menée par Dunbar et Bauer (2002) dans les microsomes de rat et de chien, la désaturation du 18 :3n-3 en 18 :4n-3 par la $\Delta 6D$ pourrait être masquée par une meilleure stimulation de la bioconversion du 18 :2n-6 du à sa concentration environ 10 fois plus élevée dans les régimes, bien qu'une affinité de la $\Delta 6D$ plus grande soit habituellement observée pour les substrats de la série n-3 que pour ceux de la série n-6 (Zheng et al., 2004). Ainsi, une production de 18 :4n-3 existerait chez les larves carencées, bien que non observée par les techniques de dosage utilisées. Ceci est supporté par la quantité plus élevée d'acide docosapentaénoïque (22 :5n-3), mesurée à l'issue de C2 et de C1 à 22°C dans les PL des larves carencées, alors que l'apport alimentaire en cet acide gras était supérieur dans les lots de référence. Ce résultat indiquerait alors la stimulation de la synthèse d'HUFA n-3 chez les larves carencées (Fig.4). Ces hypothèses nécessitent d'être appuyées par la quantification d'acides gras réellement issus de la désaturation de la $\Delta 6D$ en utilisant le dosage enzymatique de la $\Delta 6D$ décrit dans le chapitre II-Partie 2.

Les deux conditionnements larvaires étudiés ont montré que la diminution de la croissance pondérale des larves, la déficience en HUFA n-3 et la stimulation des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA à J-45 ne sont observées que pour des teneurs en HUFA n-3 du régime inférieure à une teneur comprise entre 1,7 et 0,8% EPA+DHA (% MS). Cela suggère qu'en dessous de cette teneur, le régime serait trop carencé en HUFA n-3 pour assurer une croissance et une composition lipidique comparable à celle des lots de référence, induisant alors la stimulation des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA.

Cette étude a montré qu'un conditionnement nutritionnel, appliqué dès la première alimentation et jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45) permettait d'orienter le

métabolisme lipidique des larves de bar dans le sens d'une adaptation à un régime carencé en HUFA n-3, élaboré à partir de matières premières végétales. Malgré une modification de la teneur corporelle en HUFA n-3, ces conditionnements ont permis une croissance correcte et n'ont pas eu de conséquence sur la survie des larves. La quantité élevée d'individus obtenue à l'issue de l'ontogénèse nous a permis de tester l'effet des conditionnements nutritionnels larvaires sur les capacités des juvéniles à s'adapter à un régime carencé en HUFA n-3, élaboré par la substitution totale des huiles de poisson par de l'huile de colza.

II. Effet du conditionnement nutritionnel larvaire sur le métabolisme lipidique des juvéniles

A la suite du conditionnement larvaire, les lots issus de C1 et C2 ont été nourris avec un régime commercial à 2,7% EPA+DHA (% MS) pendant une période intermédiaire de trois mois et d'un mois respectivement, afin (i) de lisser les effets du conditionnement nutritionnel obtenus au stade larvaire, et (ii) de permettre une croissance suffisante des juvéniles. Puis, l'impact du conditionnement sur les capacités d'adaptation des juvéniles à un aliment carencé ont été évalués en éprouvant les juvéniles issus des groupes C1 et C2, pendant 60 jours (J-151-211) et 35 jours (J-83-118) respectivement, avec un régime carencé en HUFA n-3. Les deux expériences de mise à l'épreuve des lots issus de C1 et C2 sont nommés challenge R1 et R2, du nom des régimes carencés en HUFA n-3 utilisés (Fig.5).

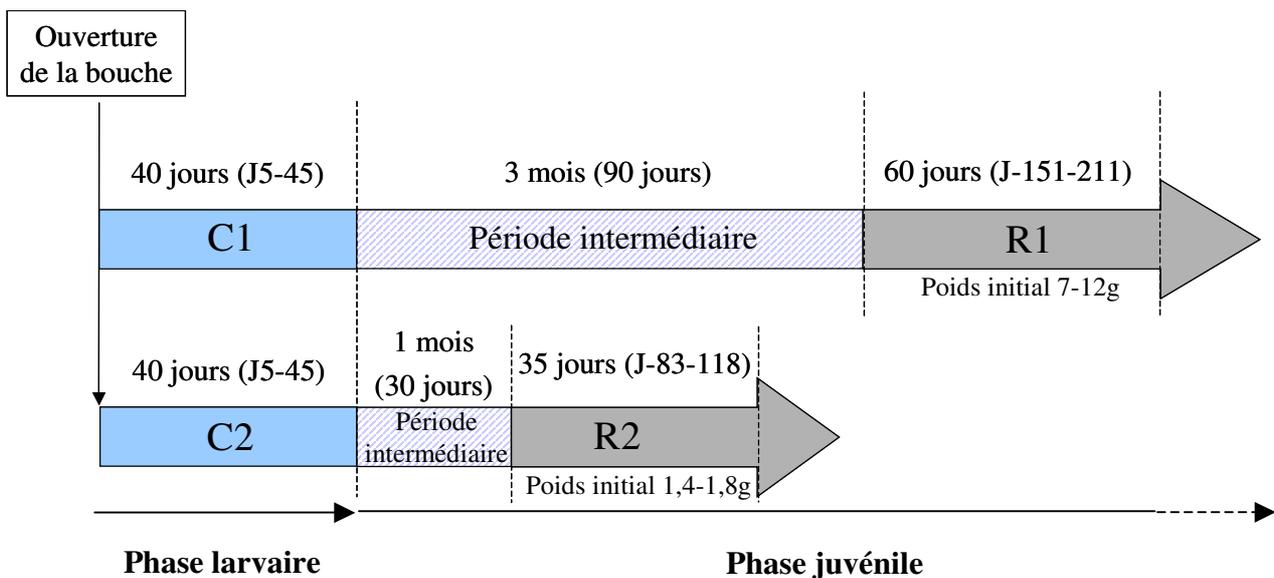


Fig.5. Schéma du protocole utilisé pour tester l'effet du conditionnement larvaire sur les capacités d'adaptation des juvéniles à un régime carencé en HUFA n-3 élaboré à partir d'huiles végétales.

Les teneurs en HUFA n-3 des régimes R1 et R2 ont été choisies comme étant respectivement ~30% et ~60% inférieures aux besoins minimaux précédemment estimés à 0,7% HUFA n-3 chez les juvéniles de bar de 14g (Skalli et Robin, 2004) : ainsi, le régime R1 contenait 0,5% EPA+DHA et le régime R2, 0,3% EPA+DHA (Table 2). Ces teneurs ont été obtenues par l'incorporation de 67% des protéines totales sous forme végétale, et par la substitution totale des huiles de poisson par de l'huile de colza. La plus faible teneur en HUFA n-3 du régime R2 par rapport à celle du régime R1 a été obtenue en limitant l'apport de ces nutriments par la partie lipidique de la farine de poisson. Ainsi, 40% de la farine de poisson a été apportée sous forme délipidée.

L'incorporation de produits végétaux dans ces régimes a entraîné une teneur en acides gras n-6 environ 40% supérieure à celle des n-3. La teneur en acide arachidonique AA dans les deux régimes testés était faible (0,1% FAME), proportionnellement à sa teneur dans l'huile de colza, et équivalente à celle obtenue par Skalli et Robin (2004) lors de l'estimation des besoins des juvéniles de bar. Les teneurs en EPA et DHA des régimes R1 et R2 étaient respectivement ~20% et ~30% inférieures à celles obtenues par Skalli et Robin (2004). Néanmoins, les ratios DHA/ EPA des régimes R1 et R2 était proches du ratio 1,5 :1 obtenu par ces auteurs. Le ratio HUFA n-3/HUFA n-6 était équivalent (~8) dans les deux régimes testés.

Table 2. Caractéristiques principales de la composition des régimes carencés R1 et R2 utilisés pour les juvéniles respectivement issus des conditionnements larvaires C1 et C2, en comparaison avec l'aliment élaboré par Skalli et Robin (2004), dont la teneur en HUFA n-3 a servi de point de départ à cette étude (aliment « témoin »).

Caractéristiques principales	R1	R2	Aliment « témoin »
Taux de substitution des huiles marines (huile de colza ; %)	100	100	
Taux de substitution des protéines marines par des protéines végétales (farine de lupin et gluten de blé, %)	67	67	
Taux d'incorporation de farine de poisson délipidée (% de farine de poisson)	0	40	
Teneur en DHA (% FAME)	2	1,6	2,5
Teneur en EPA (% FAME)	1,3	1,2	1,7
Teneur en AA (% FAME)	0,1	0,1	0,1
Somme des acides gras n-6 (% FAME)	18	21	19
Somme des acides gras n-3 (% FAME)	12	12	12
Ratio HUFA n-3/ HUFA n-6	8,1	7,7	
Ratio DHA/EPA	1,5	1,3	1,5-2
Teneur en EPA+DHA (% MS)	0,5	0,3	0,7

Contrairement à ce qui était attendu, aucun effet du conditionnement nutritionnel larvaire sur les performances de croissance des stades juvéniles n'a été observé pendant la durée des deux challenges R1 et R2. La survie des juvéniles était égale ou proche de 100%, et leur croissance était conforme aux valeurs habituellement observées, malgré des différences initiales de poids, induites par les conditionnements larvaires et non compensées au cours des challenges. Toutefois, les deux challenges testés ont mis en évidence un effet du conditionnement larvaire sur le métabolisme lipidique des juvéniles. Une augmentation significative du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ (foie isolé) a été retrouvée chez les juvéniles pré-conditionnés avec un aliment sub-carencé ou fortement carencé au stade larvaire, par rapport à ceux pré-conditionnés avec un aliment de référence. Cette augmentation n'a été observée qu'au cours de la première moitié du challenge R1 (30 jours), puis a disparu en fin d'expérience. En revanche, elle a été mesurée tout au long du challenge R2 (35 jours), avec même un niveau d'ARNm significativement plus élevé en fin d'expérience. Le challenge R1 a

montré que cette stimulation était supportée, en fin d'expérience, par une teneur en DHA dans les PL significativement plus élevée chez ces mêmes individus que chez les individus de référence, ce qui n'a pas été confirmé lors du challenge R2.

L'absence d'un effet du conditionnement nutritionnel larvaire (J5-45) sur les performances de croissance des juvéniles est en accord avec les résultats obtenus par Geurden et al. (2007) chez la truite arc-en-ciel. Ces auteurs ont testé si un stimulus hyperglucidique aigu appliqué dès l'ouverture de la bouche (J-3) pouvait induire un effet à long-terme sur l'utilisation des glucides chez les juvéniles de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Par ailleurs, la comparaison des taux de croissance par la mesure de la prise alimentaire, du taux de croissance spécifique et de l'indice de croissance journalier au cours de R1 n'est pas précise car elle est faite à partir de poids initiaux différents (juvéniles de poids initial 7-12 g). Ces indicateurs n'ont pas pu être mesurés lors de R2 en raison de la petite taille des poissons (poids initial 1,4-1,8 g).

Bien que le conditionnement larvaire n'ait pas influencé les performances de croissance des juvéniles, il a induit la stimulation de mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA chez les juvéniles pré-conditionnés avec un aliment carencé ; une augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ ayant été mesurée chez ces individus. Le fait que cette stimulation n'ait été que transitoire au cours du challenge R1, alors qu'elle était mesurée tout au long du challenge R2, suggère que son maintien dépendrait, en partie, de la teneur en HUFA n-3 du régime juvénile carencé. La teneur en HUFA n-3 du régime R1, bien que 30% inférieure aux besoins précédemment estimés, serait suffisante pour inhiber à long terme l'expression de la $\Delta 6D$ selon un mécanisme mis en évidence chez les mammifères (Ou et al., 2001 ; Xu et al., 2001, 2002 ; Nara et al., 2002 ; Hegarty et al., 2005) et suggéré chez les larves dans cette étude. Ce mécanisme sera détaillé en troisième partie de cette discussion.

Par ailleurs, les niveaux d'ARNm des juvéniles R1 n'étaient pas différents au temps initial du challenge, alors que les juvéniles R2 pré-conditionnés au stade larvaire avec un régime carencé montraient déjà un niveau significativement plus élevé. Ceci pourrait s'expliquer par une acclimatation des juvéniles R1 à l'aliment commercial utilisé lors de la période intermédiaire. Cette acclimatation aurait été induite par la durée trois fois supérieure de la période intermédiaire des juvéniles R1 par rapport à celle des juvéniles R2. Ceci suggère alors que l'augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ mesurée au cours de la première moitié

d'expérience R1 serait le résultat du changement de régime entre la phase intermédiaire et la phase de challenge.

En plus de la teneur en HUFA n-3 de leur régime, les deux challenges R1 et R2 testés divergeaient par leur durée et par l'âge initial des juvéniles. Il aurait donc été intéressant de prolonger le challenge R2 au-delà de 35 jours pour savoir si la stimulation mesurée jusqu'en fin d'expérience persisterait ou disparaîtrait dans un délai plus long, comme observé lors du challenge R1. De plus, la prolongation des challenges pendant quelques mois supplémentaires aurait peut-être pu permettre de montrer des différences de taux de croissance. La durée de la thèse n'a cependant pas permis de mener des expériences d'une durée supérieure à 6 mois.

Bien que transitoire, l'augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ mesurée chez les juvéniles R1 était associée à une augmentation de la teneur en DHA des PL de ces individus en fin d'expérience. Cela indique une activité fonctionnelle de la $\Delta 6D$ permettant la conversion en HUFA des acides gras précurseurs à 18 carbones présents dans le régime. Les autres différences de teneur en HUFA n-3 mesurées entre les groupes de juvéniles R1 seraient plutôt la conséquence d'une dilution des acides gras liée à la croissance relative plus élevée des individus initialement plus petits (Robin et al., 2003).

Le fait que l'augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ des juvéniles R2 ne soit associée à aucune modification significative de la composition lipidique des juvéniles suggère un effet de la teneur en HUFA n-3 du régime juvénile sur la fonctionnalité de l'enzyme de la $\Delta 6D$. Mitchell et al. (2003) ont montré, sur des cellules de rat, qu'une diminution de la teneur en HUFA n-3 du régime induirait un changement de conformation des membranes cellulaires, et en conséquence une modification de l'activité des protéines membranaires impliquées dans la transmission du signal à la cellule. Ceci altérerait la suite de réaction en découlant à l'intérieur de la cellule. Il est donc possible qu'une diminution de la teneur en HUFA n-3 du régime ait induit un changement de conformation des membranes des microsomes, lieu d'action de la $\Delta 6D$, altérant alors l'activité de l'enzyme. Selon cette hypothèse, le fait d'avoir choisi un aliment d'avantage carencé pour la phase juvénile de C2, *a priori* pour augmenter la réponse métabolique des juvéniles, aurait eu un effet contraire en inhibant la stimulation de l'activité enzymatique de la $\Delta 6D$, rendant les animaux inaptes à répondre à une carence trop sévère. Cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par le dosage de l'activité enzymatique de la $\Delta 6D$ décrite dans le chapitre II. Ce dosage permettrait également d'évaluer la proportion d'HUFA réellement produite à partir de la $\Delta 6D$ au cours des deux challenges, ce qui est impossible par la méthode de quantification globale des acides gras utilisée dans cette étude.

Par ailleurs, comme les HUFA quantifiés dans cette étude sont les HUFA tissulaires, résultant d'une suite de réactions de régulation avant leur incorporation dans les tissus, il ne peut pas être exclu que leur faible teneur chez les juvéniles R2 soit le résultat d'un rétrocontrôle négatif de leur synthèse par une production élevée de leurs molécules dérivées, tels que les eicosanoïdes (leucotriènes, prostaglandines et thromboxanes) impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, dont la réponse au stress. Un tel mécanisme de rétrocontrôle a été mis en évidence par Tsubouchi et al. (2001) dans les cellules synoviales articulaires humaines. Ces auteurs ont montré un rétrocontrôle de la synthèse d'acide arachidonique par les prostaglandines.

L'augmentation de la teneur en DHA observée, en fin d'expérience, dans les PL des juvéniles R1 pré-conditionnés avec un aliment carencé au stade larvaire reste très faible (+2-6%) par rapport à la teneur en cet HUFA n-3 des juvéniles issus des lots de référence. Cette faible production est due à la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ lors de la première partie de l'expérience, mais était ensuite limitée par l'inhibition de cette transcription en fin d'expérience. Cette faible production peut néanmoins avoir permis d'améliorer la fonctionnalité des membranes cellulaires et des tissus des juvéniles. D'après Skalli et al. (2006), les juvéniles de bars nourris avec un aliment sub-carencé en HUFA n-3 incorporeraient préférentiellement le DHA dans les tissus visuels et cérébraux constituant une sauvegarde vitale pour l'animal. Ceci n'a pas pu être vérifié dans notre étude, la composition lipidique des juvéniles ayant été étudiée sur l'animal entier.

Bien que la réponse obtenue chez les juvéniles ne soit pas aussi franche qu'espérée, cette étude montre que l'application d'un conditionnement nutritionnel larvaire permet de stimuler le métabolisme lipidique des juvéniles dans le sens d'une meilleure utilisation des huiles végétales. Ceci indique l'application possible du concept de programmation métabolique chez le bar, bien que l'existence à long terme de cette stimulation du métabolisme lipidique reste mal définie. En effet, elle apparaît plutôt comme une acclimatation à l'environnement nutritionnel dans lequel se trouvent les juvéniles que comme une adaptation durable.

III. Régulation du métabolisme lipidique des larves et des juvéniles de bar

Plusieurs études menées chez les mammifères (pour revue, voir Nakamura et Nara, 2003) ont montré que la régulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ par les HUFA était sous le contrôle de deux facteurs de transcription : les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) et les SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1). L'étude des trois isoformes des PPAR (α , β et γ) par PCR en temps réel au cours de la thèse a permis de mieux comprendre la mise en place des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n-3 chez les larves (larve entière) et les juvéniles de bar (foie isolé). Le facteur de transcription SREBP-1 n'a pas été étudié car sa séquence n'a jamais été décrite chez le poisson et le temps octroyé était trop limité pour s'investir dans ce travail.

Les deux conditionnements C1 et C2 testés ont montré qu'une teneur sub-carencée de 0,7-0,8% EPA+DHA (% MS) du régime n'induisait pas de différence significative du niveau d'ARNm des PPAR α , β et γ par rapport aux groupes de référence chez les larves. De même, aucune différence n'a été observée entre les juvéniles issus de ces groupes. En revanche, le conditionnement larvaire C2 a montré qu'une teneur fortement carencée de 0,5% EPA+DHA induisait un niveau d'ARNm des PPAR α et β à J-45 des larves significativement deux fois plus élevé que celui des groupes de référence. Ces différences se sont retrouvées, concernant PPAR β , entre les juvéniles issus de ces groupes au dernier jour du challenge R2. De plus, une augmentation significative du niveau d'ARNm de PPAR γ a été mesurée en fin de challenge chez les juvéniles issus de ces groupes par rapport à ceux issus des lots de référence.

Cette augmentation du niveau d'ARNm des PPAR chez les larves et les juvéniles peut être corrélée aux niveaux élevés d'ARNm de la $\Delta 6D$ mesurés chez ces mêmes groupes expérimentaux. Cela suggère l'implication, au moins partielle, des facteurs de transcription PPAR dans la stimulation de l'expression de la $\Delta 6D$ chez les larves (PPAR α et β) et les juvéniles issus de C2 (PPAR β et γ). Ceci est en accord avec Boukavala et al. (2004) qui ont évoqué une implication possible des PPAR α , β et γ dans le métabolisme des acides gras chez le bar, avec un mode de fonctionnement similaire à celui des mammifères (Nakamura et Nara, 2003). Ainsi, les PPAR pourraient activer la transcription du gène de la $\Delta 6D$ chez le bar suivant le mécanisme décrit chez les mammifères (Nakamura et Nara, 2003). Les HUFA joueraient le rôle de ligand pour les PPAR, lesquels se lieraient alors aux RXR (récepteurs

rétinoïques). L'hétérodimère formé se fixerait ensuite sur le PPRE, décrit chez le bar par Boukavala et al. (2004), ce qui activerait les enzymes mitochondriales et peroxisomales de la β -oxydation. Les acides gras ainsi dégradés créeraient alors une demande en HUFA qui induirait la transcription du gène de la $\Delta 6D$. On parle alors de voie de stimulation de l'expression du gène de la $\Delta 6D$ retardée ou indirecte. Cependant, Tang et al. (2003) ont mis en évidence une séquence similaire à celle des PPRE, le DR-1 (direct response element 1), sur le gène de la $\Delta 6D$ dans les hépatocytes humains, indiquant une action directe des PPAR sur la transcription du gène de la $\Delta 6D$. Mais le retard d'activation des désaturases par rapport à l'activation des enzymes de la β -oxydation observés dans les hépatocytes de rat indiquerait que c'est l'action indirecte des PPAR qui régulerait majoritairement la transcription du gène de la $\Delta 6D$, et non l'action directe (Tang et al., 2003). Les mécanismes précis de ces régulations restent encore mal connus.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que les PPAR seraient régulés au niveau transcriptionnel par les HUFA n-3 et qu'ils seraient impliqués dans la stimulation du gène de la $\Delta 6D$ pour une teneur en HUFA n-3 du régime larvaire inférieure à une valeur comprise entre 0,8 et 0,5% EPA+DHA. Au-dessus de cette teneur, les PPAR ne semblent pas impliqués, ce qui voudrait dire que d'autres mécanismes seraient responsables de cette stimulation.

Le SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1), autre facteur de transcription régulant l'expression de la $\Delta 6D$ chez les mammifères, pourrait intervenir dans la stimulation de l'expression de la $\Delta 6D$ au-dessus de cette teneur, soit seul, soit conjointement aux PPAR comme montré chez les mammifères (Nakamura et Nara, 2003). Chez les mammifères, le SREBP-1 est présent dans les cellules en cours de différenciation sous forme SREBP-1a et dans les cellules différenciées sous forme SREBP-1c. La larve ayant terminé sa métamorphose à J-45, la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ pourrait être sous le contrôle de SREBP-1c, comme montré dans des cellules d'hépatocarcinome humaine par Nara et al. (2002). Dans notre étude, nous pouvons établir l'hypothèse que l'isomère SREBP-1a soit toujours présent chez les larves en fin d'ontogénèse et que la régulation de l'expression du gène de la $\Delta 6D$ résulterait d'une stimulation synergique de SREBP-1a et SREBP-1c chez les poissons nourris avec un régime carencé.

D'après le mécanisme d'action des SREBP-1 sur les gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras décrit chez les mammifères par Brown et Goldstein (1997), la protéine SREBP-1 serait initialement présente sous la forme d'un précurseur lié à la membrane du réticulum

endoplasmique. Lorsque la teneur en HUFA n-3 de la cellule est faible, la protéine précurseur SREBP-1 traverse la cellule jusqu'à l'appareil de Golgi, où elle perd son NH₂ terminal, c'est le processus de maturation. Cette maturation par protéolyse permet alors à la protéine de traverser le noyau et de se fixer sur la région promotrice SRE-2 de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, induisant leur transcription. Ce mécanisme pourrait donc permettre la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ par le facteur de transcription SREBP-1 lorsque la teneur en HUFA n-3 du régime est faible. Hegarty et al. (2005) ont mis en évidence que la transcription du gène de SREBP-1 et l'activation de sa protéine précurseur étaient initialement activées par la liaison d'un ligand (oxystérol) sur un récepteur nucléaire Liver X Receptor (LXR) dans les hépatocytes de rat (Fig.6 A).

L'inhibition du gène de la $\Delta 6D$ par les fortes teneurs en HUFA n-3 du régime suggérée chez les larves de référence (~2% EPA+DHA %MS) et chez les juvéniles R1 (0,5% EPA+DHA %MS) pourrait également être liée au facteur de transcription SREBP-1, comme chez les mammifères (Nara et al., 2002). Comme montré sur des cultures de cellules hépatiques de rat et d'humain par Ou et al. (2001), les HUFA n-3 pourraient jouer le rôle de compétiteurs antagonistes des récepteurs LXR, altérant ainsi la transcription du gène de SREBP-1. La diminution du niveau d'ARNm du SREBP-1 entraînerait, en retour, une diminution de la traduction du gène de la $\Delta 6D$, inhibant alors la synthèse d'HUFA n-3 (Fig.6B). Xu et al. (2001) ont montré que les HUFA n-3 pouvaient également abaisser le niveau d'ARNm de SREBP-1c dans des hépatocytes de rat en accélérant leur dégradation. Enfin, Xu et al. (2002) ont observé une diminution de la concentration en protéine SREBP-1 mature dans le noyau des hépatocytes de rat en présence d'une teneur élevée d'HUFA n-3. Ceci pourrait être dû à une inhibition du processus protéolytique de maturation de la protéine SREBP-1 par les HUFA n-3, empêchant ainsi la translocation de la protéine mature vers le noyau.

La Fig.6 représente l'effet de la teneur en HUFA n-3 du régime sur la régulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ *via* son facteur de transcription SREBP-1.

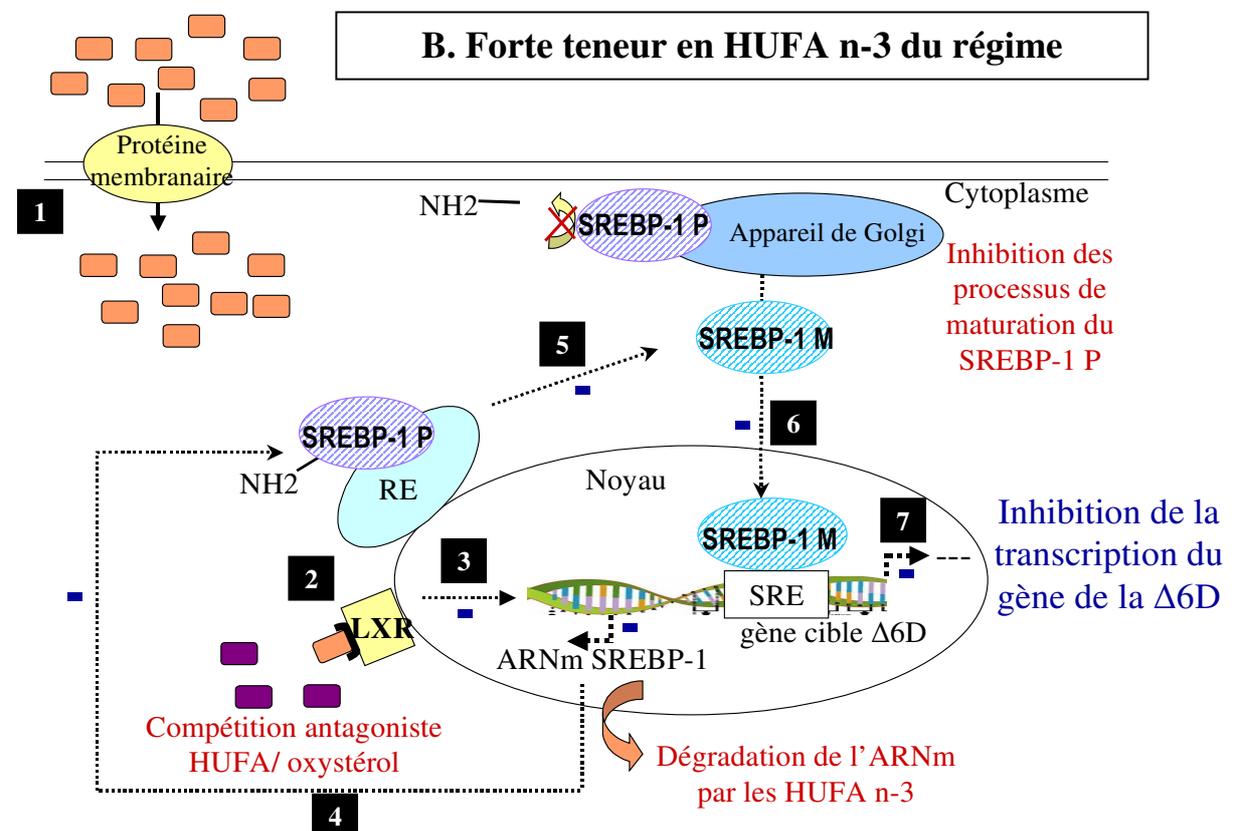
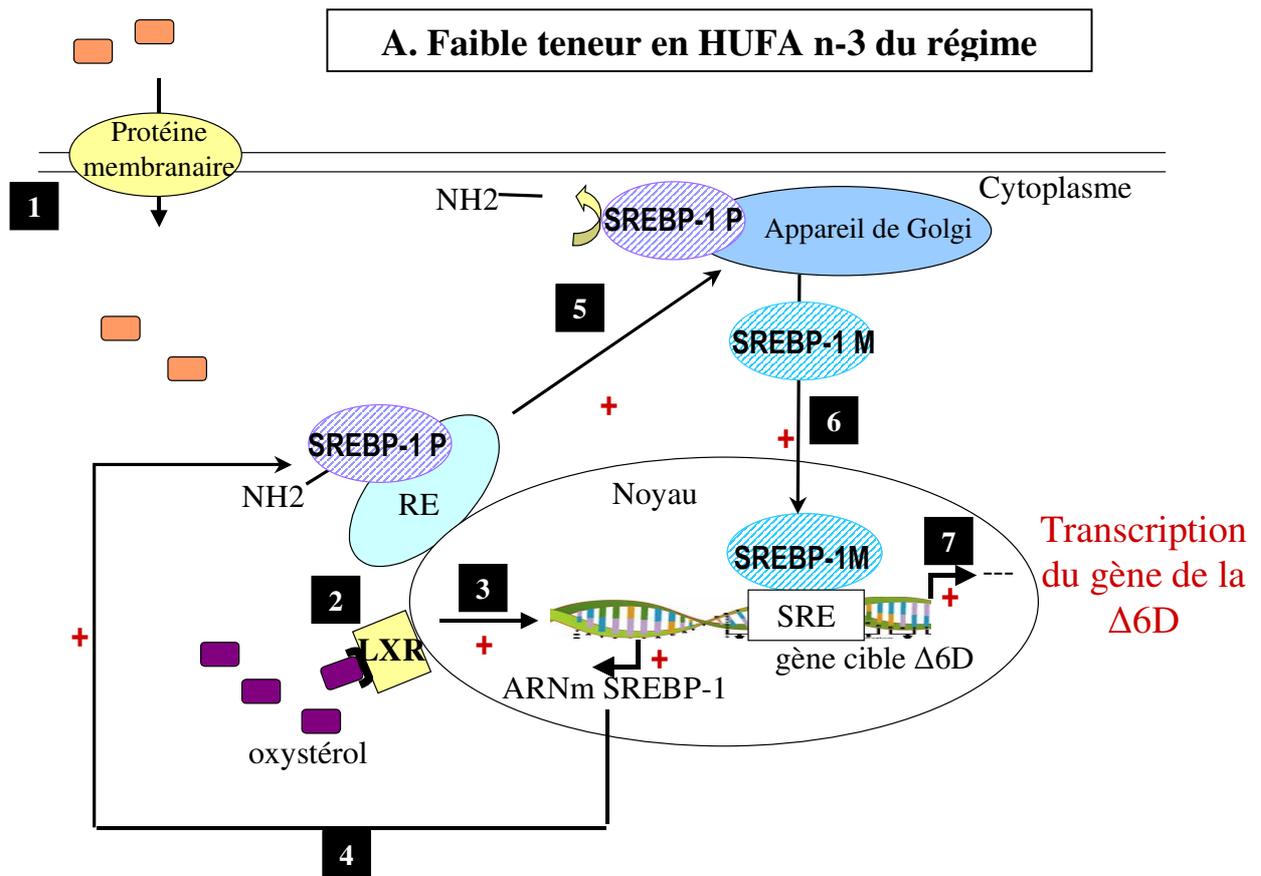


Fig. 6. Hypothèse d'un mécanisme de modulation de la transcription de la $\Delta 6D$ par la teneur en HUFA n-3 du régime alimentaire (■) *via* le facteur de transcription SREBP-1 d'après les travaux menés chez les mammifères par Ou et al. (2001), Xu et al. (2001, 2002) et Nara et al., (2002).

Fig. 6 A. Une faible teneur en HUFA n-3 du régime entraîne une faible teneur de ces HUFA n-3 dans le cytoplasme de la cellule **1**. Cette faible teneur permet la liaison oxystérol-LXR (Liver X Receptor), **2** induisant la transcription du gène SREBP-1 **3**. La protéine SREBP-1 précurseur (SREBP-1 P) ensuite produite se fixe sur le réticulum endoplasmique (RE) **4**. Puis, la faible teneur en HUFA n-3 de la cellule permet la migration de SREBP-1 P vers l'appareil de Golgi dans lequel elle perd sa terminaison NH₂ **5**. La protéine précurseur SREBP-1 P est devenue mature (SREBP-1 M). Ce processus de maturation permet la translocation de la protéine vers le noyau de la cellule **6**. Le SREBP-1 M se fixe alors sur la région promotrice SRE-2 du gène de la $\Delta 6D$, activant ainsi sa transcription **7**.

Fig. 6 B. Une forte teneur en HUFA n-3 du régime entraîne une forte teneur de ces HUFA n-3 dans le cytoplasme de la cellule **1**. Les HUFA n-3 deviennent alors des inhibiteurs compétitifs des oxystérol pour le récepteur nucléaire LXR **2**, empêchant ainsi la transcription du gène SREBP-1 **3**. De plus, les HUFA limiteraient cette transcription en stimulant le taux de dégradation des ARNm de SREBP-1. Ces processus conduisent donc à inhiber la formation de la protéine précurseur SREBP-1 P **4**, et *in fine*, la transcription du gène de la $\Delta 6$ **5 6 7**. Les HUFA inhiberaient également les processus de maturation de SREBP-1 par protéolyse, empêchant ainsi la translocation de la protéine dans le noyau, et donc la transcription du gène de la $\Delta 6D$ **6 7**.

La stimulation des niveaux d'ARNm de la $\Delta 6D$ ainsi que des PPAR β chez les larves carencées, puis chez les juvéniles issus de ces groupes, suggère la mise en place d'une mémorisation, au niveau moléculaire, des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n-3 par le conditionnement larvaire. Comme suggéré par Waterland et Garza (1999) chez les mammifères puis par Geurden et al. (2007) chez la truite arc-en-ciel, cette mémorisation pourrait être induite par des modifications épigénétiques. Ce sont des transformations chimiques de l'ADN ou des histones permettant de réguler l'accessibilité du génome à la machinerie responsable de sa traduction en protéines, et ainsi d'induire une reprogrammation de la cellule. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication du facteur nucléaire hépatocytaire 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ou HNF-4 α), homéoprotéine exprimée dans le foie, les reins, le pancréas, et le tube digestif des mammifères, dans la transcription générale de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique en permettant l'interaction des facteurs de transcription, tels que SREBP-1, avec les éléments de réponse SRE (Odom et al., 2004 ; Misawa et al., 2003). Ceci a été montré dans les hépatocytes de rat et d'humain. Le HNF-4 α serait également impliqué dans l'activité hypolipidémique dans les hépatocytes de rat et d'humain en liaison avec les PPAR (Hertz et al., 2001). Ces différentes études pourraient alors suggérer l'implication possible du facteur HNF-4 α dans la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ par le SREBP-1 et les PPAR.

Toutefois, cette stimulation des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n'apparaît pas comme une adaptation durable chez les juvéniles mais plutôt comme une acclimatation à leur environnement nutritionnel. Ceci est en accord avec une étude menée chez les mammifères par Patel et Srinivasan (2001) selon laquelle l'environnement nutritionnel dans lequel se trouvent les stades ultérieurs pourrait agir comme un facteur additionnel régulant les mécanismes moléculaires préalablement acquis. Ainsi les régimes carencés utilisés lors des challenges R1 et R2 pourraient réguler les mécanismes de désaturation des acides gras préalablement acquis au stade larvaire. Cette hypothèse supporte alors l'idée d'une inhibition de la transcription de la $\Delta 6D$, via le SREBP-1, chez les juvéniles R1, dûe à la teneur en HUFA n-3 de leur régime trop proche du besoin (Fig.6).

La Fig.7 récapitule l'effet du conditionnement nutritionnel larvaire sur la mise en place des mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA chez les larves puis chez les juvéniles, en intégrant l'hypothèse de l'instauration d'une programmation métabolique par le conditionnement larvaire.

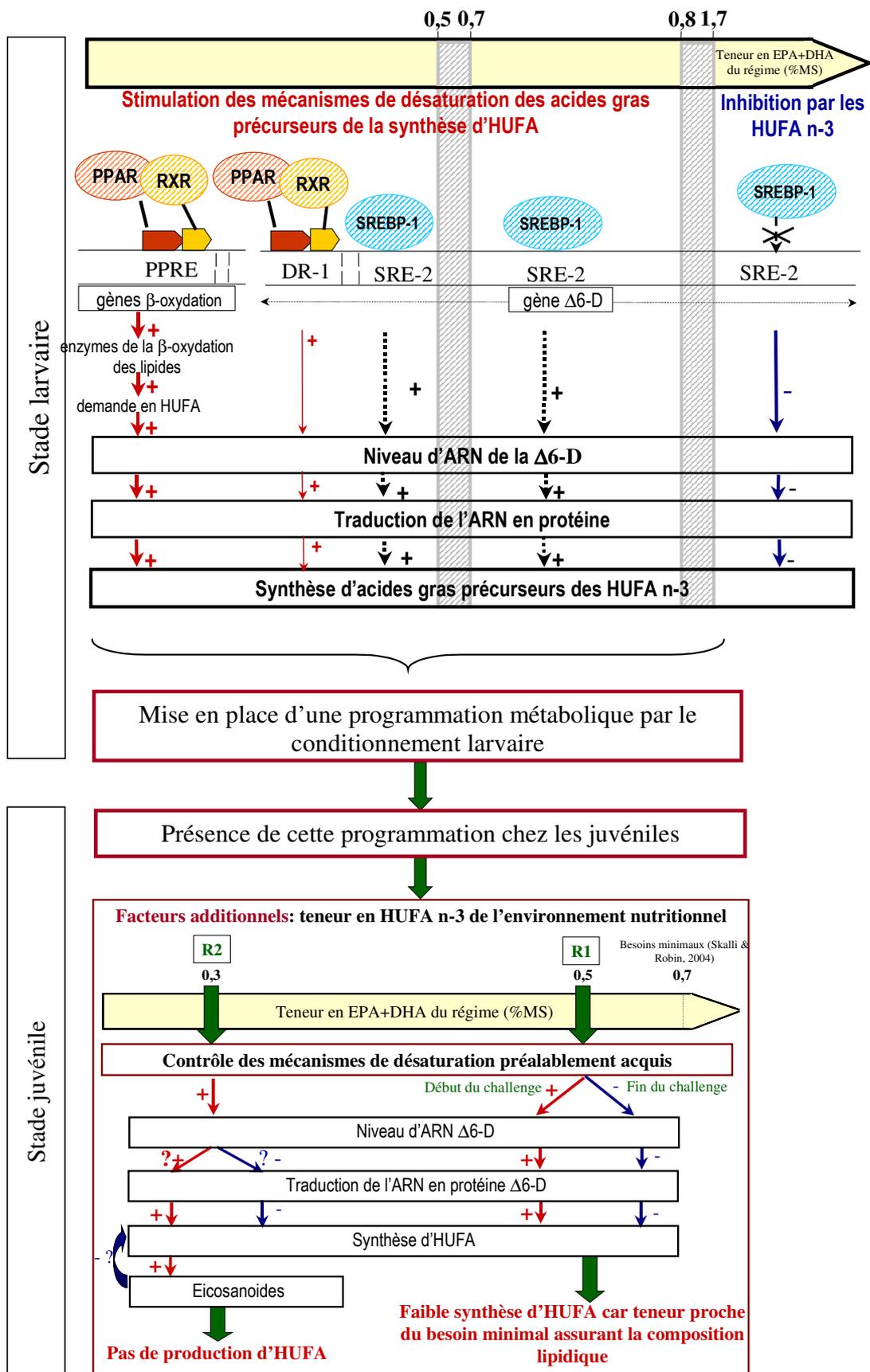


Fig.7

En dessous d'une teneur en EPA+DHA du régime comprise entre 0,8 et 1,7%, le régime larvaire serait trop carencé pour assurer une croissance et une composition lipidique comparable à celles des lots de référence, induisant alors la mise en place de mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n-3. Au-delà de cette teneur, les HUFA seraient présents en quantité suffisante dans le régime pour inhiber la transcription du gène de la $\Delta 6D$ selon le mécanisme décrit Fig.6B. En dessous d'une teneur en EPA+DHA du régime comprise entre 0,5 et 0,3%, l'augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ serait sous le contrôle majoritairement indirect des PPAR (traits rouges épais): les PPAR formeraient un hétérodimère avec RXR pour aller se fixer sur la région promotrice PPRE des gènes codant pour les enzymes de la β -oxydation. La demande en HUFA induite résulterait en l'activation indirecte du gène de la $\Delta 6D$. Les PPAR pourraient aussi induire directement la transcription du gène de la $\Delta 6D$ en se fixant sur son promoteur DR-1. Cette activation directe de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ serait minoritaire par rapport à l'action indirecte (traits rouges fins). Conjointement à l'action des PPAR, le facteur de transcription SREBP-1 pourrait induire la transcription du gène de la $\Delta 6D$ selon le mécanisme décrit Fig.6A. Le facteur SREBP-1 pourrait également être responsable de l'augmentation du niveau d'ARNm de la $\Delta 6D$ pour une teneur en EPA+DHA du régime comprise entre 0,5 et 0,8%. Le SREBP-1 n'a pas été étudié dans cette étude, son action purement hypothétique est donc représentée en pointillés. L'ensemble de ces mécanismes pourraient avoir été mis en mémoire au niveau moléculaire lors du conditionnement larvaire par des facteurs épigénétiques tels que HNF-4 α .

Lors du challenge juvénile, le taux de carence en HUFA n-3 du régime utilisé agirait comme un « facteur additionnel » régulant les mécanismes moléculaires de désaturation préalablement acquis. Après une stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ en première partie d'expérience, certainement dûe au changement de régime entre la phase intermédiaire et la phase de challenge, la forte teneur en HUFA n-3 du régime R1 aurait inhibé la transcription de la $\Delta 6D$ en fin d'expérience via le facteur SREBP-1 comme décrit Fig.6B. Les juvéniles R2 ont maintenu la transcription du gène de la $\Delta 6D$ tout au long du challenge. Cependant, l'absence de production finale d'HUFA significative pourrait être la conséquence d'une modification de la composition des membranes microsomaux par la teneur trop carencée en HUFA n-3, induisant une altération de l'activité enzymatique de la $\Delta 6D$ (Mitchell et al., 2003). Cette absence de production significative pourrait aussi être dûe à un rétrocontrôle négatif de la production élevée d'eicosanoïdes sur la synthèse d'HUFA comme montré par Tsubouchi et al. (2001) dans les cellules synoviales articulaires humaines.

IV. Contribution supplémentaire à l'étude des besoins en HUFA n-3 du bar

Les premiers travaux de recherche sur les besoins en HUFA n-3 chez les poissons marins ont été menés en utilisant des proies vivantes. L'utilisation d'aliments inertes a ensuite facilité ces recherches en permettant l'incorporation de nutriments spécifiques en concentrations précises dans l'aliment. L'utilisation, dans cette étude, d'aliments inertes, différant uniquement par leur teneur en HUFA n-3, a permis d'apporter des données supplémentaires concernant les besoins en HUFA n-3 des larves de bar, mal connus jusqu'à présent, et de préciser les besoins des juvéniles préalablement estimés par Skalli et Robin (2004).

IV.1. Estimation des besoins en HUFA n-3 des larves de bar

Bien que la teneur en EPA, DHA et AA des larves ait toujours été supérieure à celle de leurs aliments respectifs, la Fig.8 montre que le taux d'incorporation des HUFA dans les PL des larves en fonction de leurs teneurs dans l'aliment n'est pas linéaire : une rupture de la pente pour des teneurs de l'aliment de 6% de DHA, 2,7% d'EPA et 1,25% AA (% FAME) est observée dans les PL, alors qu'un taux d'incorporation linéaire a été observé dans les NL quelque soit la teneur en ces HUFA dans le régime. Ces ruptures de pentes correspondraient à aux besoins minimaux en HUFA des larves de bar pour assurer leur composition en PL nécessaire à leur croissance et à leur métamorphose. Concernant les HUFA n-3, ces besoins ont été évalués à 1,1% EPA+DHA (%MS). Cette estimation est presque deux fois inférieure à la teneur des aliments HH et HH1 utilisés comme référence dans cette étude. De plus, cette estimation est plus de 36% supérieure aux besoins définis chez les juvéniles de la même espèce et ayant servi de point de départ à cette étude. Ceci pourrait s'expliquer par la croissance plus rapide des larves que des juvéniles (Fig.9) entraînant un plus fort accroissement des membranes cellulaires et donc induisant une plus forte demande d'énergie chez les larves.

Cette étude montre que les larves nourries avec un régime dont la teneur en EPA+DHA (% MS) était jusqu'à plus de 50% inférieure à 1,1% avaient un taux de croissance journalier, un développement squelettique et un taux de survie non significativement différents de ceux des

lots de référence nourris selon les besoins. Ce résultat pourrait suggérer une grande plasticité des larves de bar à une teneur carencée jusqu'à 0,5% EPA+DHA de leur régime alimentaire. La partie lipidique de la farine de poisson, assurant majoritairement l'apport en HUFA n-3 des régimes carencés, suffirait à couvrir les besoins en HUFA n-3 des larves pour assurer les performances de croissance. Cet apport lipidique était de 2,6% dans l'aliment sub-carencé à 0,8% utilisé lors de C1, ce qui est en accord avec les ~2% précédemment estimés par Kaushik et al. (2004) pour permettre le maintien de la croissance des larves de bar. En revanche, cet apport n'était que de 1,1% dans les aliments carencés du conditionnement C2, soit ~2 fois inférieur à la valeur estimée par Kaushik et al. (2004). Le maintien des performances de croissance des groupes nourris avec ces régimes carencés pourrait donc être dû, par exemple, à la teneur en PL (~15% MS) de leurs régimes, supérieure aux 10% estimés pour assurer la croissance des larves de bar (Cahu et al., 2003b), ou encore à leur ratio en DHA/EPA en accord avec le ratio supérieur à 1,5-2 recommandé par Kjørsvik et al. (2004) pour assurer la croissance et la survie des larves de poissons marins. Ces hypothèses ouvrent de nouvelles perspectives sur le choix de l'expression des besoins en HUFA n-3 habituellement utilisée en aquaculture. Ce mode d'expression a d'ailleurs déjà été remis en cause dans plusieurs études (Takeuchi et al., 1992 ; Glencross et al., 2002 ; Skalli et Robin, 2004).

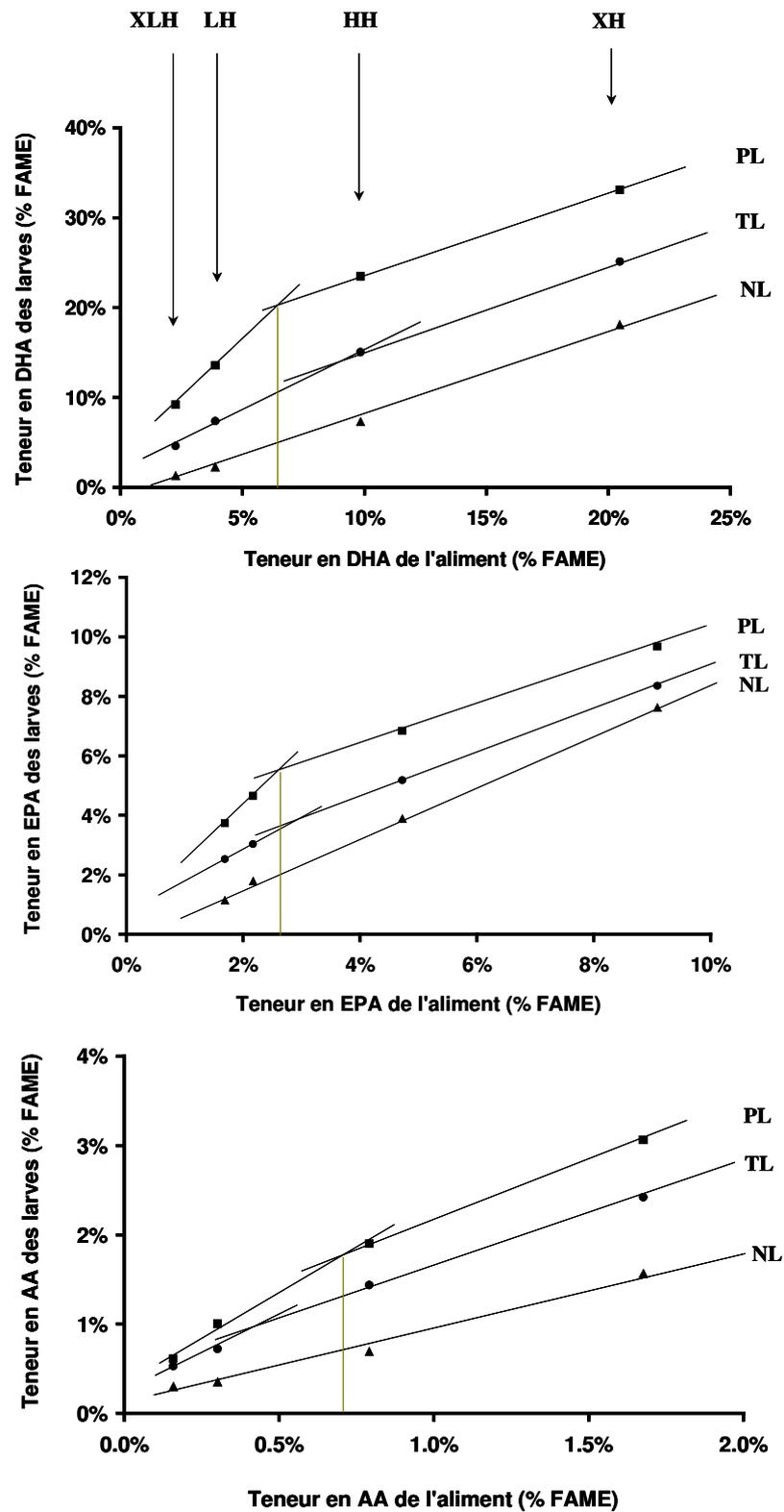


Fig.8. Teneur en DHA, EPA et AA (% acides gras totaux) des lipides totaux (TL), lipides neutres (NL) et phospholipides (PL) des larves en fonction de la teneur en DHA, EPA et AA (% FAME) de leurs régimes.

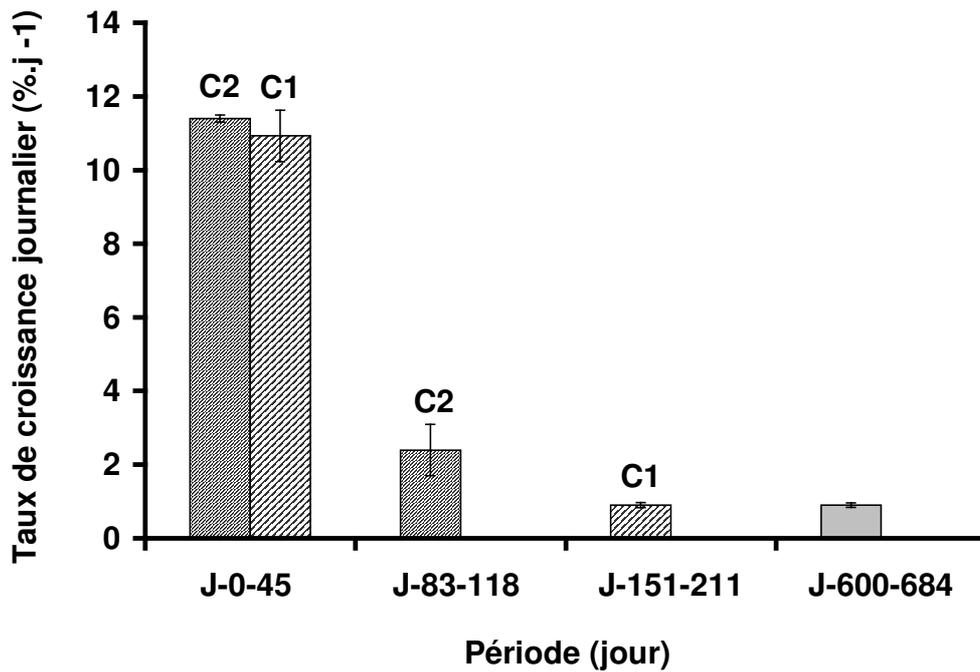


Fig.9. Taux de croissance journalier moyen (%.jour⁻¹ ± SE ; n=4), à des intervalles de temps différents, des lots nourris avec un régime de référence à ~2% EPA+DHA au cours des conditionnements larvaires C1 (teneur en EPA+DHA variant de 0,8 à 2,2% MS) et C2 (teneur en EPA+DHA variant de 0,5 à 3,7% MS) respectivement : J-0-45 représente le stade larvaire pour les deux conditionnements ; J-83-118 est la phase de challenge des juvéniles issus de C2 ; J-151-211 est la phase de challenge des juvéniles issus de C1 ; J-600-684 est une donnée tirée de Person-Le Ruyet et al. (2004) pour des juvéniles de bar (~60g) nourris avec un régime carencé en HUFA n-3 (0,4% EPA+DHA) tout au long de l'expérience.

IV.2. Les besoins des juvéniles

Les mises à l'épreuve des juvéniles R1 et R2 avec un régime carencé en HUFA n-3 a permis de préciser les besoins en HUFA n-3 des juvéniles de bar précédemment estimés par Skalli et Robin (2004). Nous avons effectivement pu comparer la croissance et la composition lipidique des juvéniles carencés à celles de juvéniles contrôles, nourris avec un « régime contrôle » riche en HUFA n-3 au cours des challenges et également issus des conditionnements larvaires C1 et C2. Le régime contrôle du challenge R1 était un régime commercial à 2,7% EPA+DHA. En plus de sa teneur en HUFA n-3, il différait de l'aliment carencé R1 par sa teneur en lipides (12,6 vs. 16,8% MS) et en protéines (55,2 vs. 52,1% MS). Le régime contrôle du challenge R2 était un aliment expérimental à 1,4% EPA+DHA. Il différait de l'aliment carencé R2 uniquement par l'incorporation de 100% d'huile de poisson (6,6% d'huile de morue). Outre la différence en HUFA n-3 recherchée, la présence d'huile de poisson dans les régimes contrôles a augmenté leur teneur en acides gras n-3 d'environ 40% par rapport à celle des régimes carencés, et a diminué leur teneur en acides gras n-6 d'environ 50%. La teneur en acide arachidonique AA des régimes contrôles était environ 3 fois supérieure à celle des régimes carencés (0,3 vs. 0,1 % FAME).

Bien que les gains de poids des juvéniles carencés R1 (x 1,6-2) et R2 (x 2-2,5) étaient corrects, au moins pendant la durée des challenges (35 jours et 60 jours respectivement), ils étaient significativement ~20% inférieurs à ceux des juvéniles contrôles. Cette limitation de croissance des juvéniles carencés a été observée tout au long du challenge R1, mais seulement à partir de 21 jours après le début du challenge pour les juvéniles R2. Parallèlement à cette limitation de gain de poids, les juvéniles R1 et R2 ont respectivement montré une diminution significative de ~30% et ~40% de leur teneur en HUFA n-3 dans les PL. En fin d'expérience, cette teneur était significativement ~16% et ~30% inférieure à celle des juvéniles contrôles (~24% FAME Fatty Acid Methyl Ester).

Les gains de poids corrects des individus carencés obtenus au cours des deux expériences de challenge suggèrent une bonne capacité d'adaptation de l'espèce à un régime élaboré par la substitution totale des huiles de poisson par de l'huile de colza et dont la teneur en HUFA n-3 est jusqu'à 60% inférieure aux besoins précédemment estimés. Cela indiquerait

qu'un apport de 1,2% de lipides marins par la farine de poisson suffirait à assurer les besoins en HUFA n-3 des juvéniles de bar (poids initial : de 1,5 à 12g) pour la croissance, au moins pendant la période de challenge (*i.e.* 60 et 35 jours pour R1 et R2 respectivement). Ces résultats sont en accord avec Skalli et Robin (2004) qui ont montré qu'un régime de composition équivalente permettait un gain de poids des juvéniles de bar (poids initial : 14g) proche du doublement en 52 jours. Les gains de poids corrects des juvéniles carencés peuvent également être expliqués, dans le cas du challenge R1, par une compensation de la carence du régime en augmentant le taux de conversion en gain de poids de l'aliment ingéré. Ce résultat est en accord avec Person-Le Ruyet et al. (2004) et pourrait aussi expliquer les gains de poids corrects des juvéniles carencés R2, cependant, le taux de conversion alimentaire n'a pas été mesuré lors de R2.

La limitation de croissance des juvéniles carencés par rapport à celle des juvéniles contrôles pourrait, en partie, être due à la teneur en HUFA n-3 des régimes carencés R1 et R2 respectivement ~30% et ~60% inférieure aux besoins précédemment estimés. Concernant les juvéniles R1, la limitation de croissance pourrait aussi être expliquée par les teneurs en lipides et protéines de leur régime différentes de celles du régime contrôle. De plus, bien que les besoins en acide arachidonique AA soit mal connus chez les juvéniles de bar, la faible teneur en cet HUFA n-6 dans les régimes carencés pourrait expliquer en partie la limitation de croissance observée. Un effet de la teneur en AA du régime sur la croissance a été mis en évidence chez les juvéniles de turbot par Castell et al. (1994). La limitation de croissance pourrait également être la conséquence d'une diminution d'environ 20% de leur prise alimentaire par rapport aux groupes contrôles, quelque soit leur poids initial. Ceci est en accord avec Person-Le Ruyet et al. (2004) qui ont montré que le passage d'un aliment commercial à un aliment carencé en HUFA n-3 par l'apport de matières premières végétales induisait une diminution de la prise alimentaire. Ceci pourrait également expliquer la limitation de croissance des juvéniles carencés R2, cependant la prise alimentaire n'a pas été mesurée lors de R2.

Le fait que cette limitation de croissance ait été observée tout au long de l'expérience R1, mais seulement à partir de 21 jours d'expérience lors de R2 indique qu'un temps de latence peut être nécessaire avant que le régime carencé en HUFA n-3 ne commence à avoir de réels effets sur la croissance de l'animal. Ce temps de latence dépendrait du niveau de carence du régime ainsi que du poids initial des juvéniles utilisés (R1 : 7-12g ; R2 : 1,4-1,8g). Skalli et Robin (2004) ont montré que des juvéniles de bar de poids initial supérieur à ceux

utilisés dans notre étude (~14g), mais nourris avec un régime plus carencé (~0.2% EPA+DHA, *i.e.* ~70% inférieur aux besoins), révélèrent des croissances pondérales inférieures à celles des groupes dont les besoins étaient couverts (0,7-1,9% EPA+DHA) après 81 jours d'expérience. Person-Le Ruyet et al. (2004) ont observé que des juvéniles de bar de poids initial plus élevé (60g) nourris avec un aliment proche du régime R1 (0,4% HUFA n-3) montraient une limitation de croissance par rapport à ceux dont les besoins étaient couverts (2,2% HUFA n-3), après 28 jours d'expérience. La mortalité étant l'indicateur ultime des effets néfastes d'une carence alimentaire, il n'est pas surprenant d'observer des taux de croissance proches de 100% à l'issue des deux challenges de courtes durées testés dans cette étude. Même après 81 jours d'expérience, Skalli et Robin (2004) ont obtenu des taux de survie de 98% chez des juvéniles de bar (poids initial ~14 g) nourris avec un aliment contenant 0,2% HUFA n-3 (% MS).

Parallèlement à leur limitation de croissance, les juvéniles carencés R1 et R2 ont montré une diminution de leur teneur en HUFA n-3 des PL au cours des deux expériences de challenge. Cependant, la teneur mesurée, en fin de challenge, chez les juvéniles R1 était équivalente à celle obtenue par Skalli et Robin (2004) chez des juvéniles nourris à la limite des besoins en HUFA n-3 (~21%). Ceci pourrait indiquer que le régime R1 est proche du besoin minimal assurant la composition en HUFA n-3 des PL des juvéniles. D'après Skalli et Robin (2004), la composition en EPA et DHA des PL des juvéniles nourris selon les besoins se stabiliserait après que le poids ait doublé, ce qui serait le cas pour les juvéniles R1 pré-conditionnés à 16°C au stade larvaire. Ceci suggère une préservation de la qualité des membranes en DHA de ces individus au-delà de la période de challenge. La composition en EPA et DHA des PL des juvéniles R1 pré-conditionnés à 22°C pourrait encore évoluer légèrement, leur poids n'ayant pas tout à fait doublé au cours du challenge (x1,6).

La teneur finale en HUFA n-3 des PL des juvéniles R2 était en revanche ~20% inférieure à la valeur obtenue par Skalli et Robin (2004) chez des juvéniles nourris à la limite des besoins en HUFA n-3 (~21%). Ceci indiquerait un effet plus avancé de la carence de l'aliment R2 sur la composition lipidique des juvéniles. Ceci s'explique par la teneur en HUFA n-3 du régime R2 plus de 40% inférieure à celle du régime R1 et près de 60% inférieure aux besoins minimaux définis à 0,7% HUFA n-3. De plus, les besoins en HUFA n-3 des juvéniles R2 ne sont d'autant pas couverts par leur aliment qu'ils sont plus élevés que ceux des juvéniles R1. Ceci est dû à leur taux de croissance plus élevé lié à leur plus jeune âge. D'après Skalli et Robin

(2004), la teneur en HUFA n-3 des PL des juvéniles R2 pourrait encore diminuer au-delà du challenge, leur régime ne répondant pas aux besoins.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette thèse était de produire des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) pouvant mieux utiliser les substituts végétaux, et en particulier les huiles végétales, en appliquant le concept de « programmation métabolique » décrit chez les mammifères.

Nous avons montré qu'il est possible d'induire une meilleure utilisation des huiles végétales chez les juvéniles de bar (R1 : J-151-211 et R2 : J-83-118) en appliquant un conditionnement nutritionnel dès l'ouverture de la bouche (J-5) et jusqu'à la fin du stade larvaire (J-45). Ceci a été montré par la stimulation de mécanismes de désaturation des acides gras précurseurs de la synthèse d'HUFA n-3 chez les juvéniles, instaurés dès le stade larvaire, en réponse à une carence alimentaire en HUFA n-3. L'environnement nutritionnel des juvéniles agirait comme un facteur additionnel régulant ces mécanismes et contrôlant ainsi la composition lipidique des juvéniles.

Cette thèse a permis de mieux comprendre la mise en place des mécanismes de désaturation chez le bar en suggérant l'implication des facteurs de transcription PPAR dans la stimulation de la transcription du gène de la $\Delta 6D$ pour une teneur en HUFA n-3 du régime comprise entre 0,8 et 0,5% EPA+DHA (% MS).

Cette étude a été réalisée alors que les besoins en HUFA n-3 des larves de bar étaient mal connus. Ce travail de thèse a d'ailleurs apporté une estimation de ces besoins à 1,1% EPA+DHA, et précisé ceux des juvéniles en montrant la capacité d'un régime carencé à 0,5% (30% plus carencé que les besoins préalablement estimés par Skalli et Robin, 2004) à assurer la composition lipidique des juvéniles de bar. Les résultats obtenus ont également ouvert de nouvelles perspectives sur le mode d'expression des besoins des poissons marins en HUFA n-3.

A notre connaissance, cette étude est la première concernant le concept de programmation métabolique chez le bar, et l'une des pionnières chez le poisson, la première publication à ce sujet datant de 2007 (Geurden et al., 2007). Les résultats originaux obtenus sont encourageants pour continuer dans la recherche de substitution des produits marins par des sources végétales chez le bar. Les perspectives qui en découlent sont nombreuses pour permettre, à terme, de mieux comprendre la mise en place de cette programmation métabolique et le métabolisme lipidique chez le bar.

Dans un premier temps, des améliorations techniques des expériences permettraient de mieux comprendre ces mécanismes. Par exemple, le prolongement du challenge juvénile permettrait de savoir si, comme montré chez les mammifères, cette programmation mise en place au stade larvaire serait transmise à la génération suivante. Le prolongement de l'expérience pourrait également mettre en évidence un effet du conditionnement nutritionnel sur les performances de croissance des juvéniles, non observable pendant la durée des challenges. Par ailleurs, l'étude de la période intermédiaire donnerait des informations sur la disparition ou la persistance de la stimulation des mécanismes moléculaire de désaturation des acides gras précurseurs en réponse à un environnement nutritionnel juvénile très favorable.

En plus des considérations techniques de notre étude, de nouvelles investigations seraient nécessaires pour mieux comprendre la mise en place de la programmation métabolique et le métabolisme lipidique chez le bar. Notamment, la mise en place d'une programmation métabolique au niveau moléculaire nécessite d'être supportée par l'étude des indicateurs de modifications épigénétiques, tels que HNF1 α .

Par ailleurs, les acteurs du mécanisme de désaturation des acides gras sont encore mal connus chez le bar. D'une part, une étude transcriptomique du facteur de transcription SREBP-1 doit être menée afin de mieux comprendre son rôle dans la stimulation de la $\Delta 6D$ chez le bar. D'autre part, les prochains travaux du laboratoire vont viser à mieux caractériser les enzymes $\Delta 6D$ et élongase 6 chez cette espèce par une mise en culture d'hépatocytes en système hétérologue, en présence de concentrations variables d'HUFA. Le rôle de la $\Delta 6D$ dans le métabolisme lipidique du bar sera également étudié *in vivo* par le dosage de son activité enzymatique. Ce dosage permettra d'évaluer qualitativement l'effet du conditionnement larvaire sur la fonctionnalité de l'enzyme $\Delta 6D$, mais aussi d'évaluer quantitativement la production d'acides gras réelle à partir de la $\Delta 6D$ chez les larves conditionnées avec un aliment carencé ainsi que chez les juvéniles issus de ces groupes. Il serait également intéressant de mieux caractériser le rôle de la $\Delta 5D$, dont la séquence et l'activité enzymatique sont proches de celle de la $\Delta 6D$ chez plusieurs espèces de poissons comme le zebrafish (Hastings et al., 2001).

Afin de localiser plus finement les tissus d'incorporation préférentiels des HUFA synthétisés à partir de la $\Delta 6D$, il serait intéressant de quantifier ces HUFA dans des tissus isolés, plutôt que dans le poisson entier, au moins pour le stade juvénile ; ce travail étant plus difficilement réalisable pour les larves. L'étude du métabolisme lipidique chez le bar pourrait

être complétée par la quantification des eicosanoïdes dérivés des HUFA (prostaglandines, leucotriènes et thromboxanes) par un dosage biochimique de ces composés. L'effet de ces composés sur l'expression des gènes pourrait également être étudié *in vitro*. Ceci permettrait de mettre en évidence un possible rétrocontrôle de la synthèse d'HUFA par ces molécules.

Par ailleurs, l'effet du génome sur les capacités de désaturation des larves et des juvéniles n'a pas été pris en compte au cours de ce travail, les individus utilisés provenant tous de la même éclosion et leur familles n'ayant pas été génétiquement identifiées. La prochaine étude menée par le laboratoire va consister à utiliser des familles génétiquement identifiées au départ par génotypage afin de voir si la survie des larves est affectée par un effet d'interaction entre le génotype et la teneur en HUFA n-3 de l'aliment. Ceci pourrait donner des indications sur une sélection de poissons présentant des caractéristiques génétiques les prédisposant à stimuler les mécanismes de désaturation.

Enfin, l'application possible du concept de programmation métabolique chez le bar ouvre de nouvelles perspectives de recherche sur la substitution des matières premières d'origine marine par des sources végétales dans l'alimentation d'autres espèces de poissons carnivores à forte valeur aquacole, comme le turbot ou la daurade par exemple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Ackman RG (1980). Fish lipids: Part 1. In: J.J. Connell, Editor, Advances in fish science and technology, Fishing News Books, Farnham, UK, pp. 87–103.

Aki T, Shimada Y, Inagaki K, Higashimoto H, Kawamoto S, Shiget S, Ono K & Suzuki O (1999). Molecular cloning and functional characterization of rat $\Delta 6$ fatty acid desaturase. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 575-579.

Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S, Takeuchi T (2005). Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon delta6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res* 14(2), 159-65.

Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S, Takeuchi T (2007). Expression of masu salmon delta5-desaturase-like gene elevated EPA and DHA biosynthesis in zebrafish. *Mar Biotechnol* 9 (1), 92-100.

Association of Official Analytical Chemists (1984). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Williams S. (Ed.). AOAC, Arlington, VA, pp. 1141.

Ayala MD, López Albors O, García Alcázar A, Abellán E, Latorre R, Vázquez JM, Ramírez Zarzosa G, Martínez F, Gil F (2003). Effect of two thermal regimes on the muscle growth dynamics of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax* L. *Anat Histol Embryol* 32(5), 271-275.

-B-

Barlow S (2000). Fishmeal and oil : sustainable feed ingredients for aquafeeds. *Global Aquacult Advocate* 4, 85-88.

Barnabé G, Boulineau-Coatanea F & René F (1976). Chronologie de la morphogénèse chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.) (*Pisces, Serranidae*) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture* 8, 351-363.

Bell MV, Henderson RJ, Pirie BJS & Sargent JR (1985). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus). *J. Fish Biol.* 26, 181–191.

Bell JG, Dick JR, Sargent JR & McVicar AH (1992). Dietary linoleic acid affect phospholipid fatty acid composition in heart and eicosanoid production by cardiomyocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol* 103A, 337-342.

- Bell** JG, Tocher DR, MacDonald FM & Sargent JR (1995). Effects of dietary borage oil [enriched in γ -linoleic acid, 18:3(n-6)] or marine fish oil [enriched in ecosapentaenoic acid, 20:5(n-3)] on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol Biochem* 14, 373-383.
- Bell** JG, Ashton I, Secombes CJ, Weitzel BR, Dick JR & Sargent JR (1996a). Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandin Leukot Essent Fat Acids* 54, 173-182.
- Bell** MV, McEvoy LA & Navarro JC (1996b). Deficit of didocosaheptaenoyl phospholipid in the eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. *J Fish Biol* 49 (5), 941-952.
- Bell** JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ & Sargent JR (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** JG, McGhee F, Campbell PJ & Sargent JR (2003). Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil "wash out". *Aquaculture* 218, 515-528.
- Bergeron** JP & Person-Le Ruyet J (1997). Teneur en ADN de la larve de *Dicentrarchus labrax*: évolution ontogénique et effet de la privation de nourriture. *Aquatic Living Resour* 10, 307-314.
- Bessey** OA, Lowry OH & Brock MJ (1946). Rapid calorimetric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum. *J Biol Chem* 164, 321-329.
- Bessonart** M, Izquierdo MS, Sahli M, Hernandez-Cruz CM, Gonzales MM & Fernandez-Palacios H (1999). Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Boukavala** E, Antonopoulou E, Favre-Kery L, Diez A, Bautista JM, Leaver MJ, Tocher DR & Krey G (2004). Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39 (11), 1085-1092.
- Bradford** MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown** MS & Goldstein JL. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3), 331-40.

Burel C, Boujard T, Kaushik SJ, Bœuf G, Van der Geyten S, Mol KA, Kühn ER, Quinsac A, Krouti M & Ribaillet D (2000). Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188, 363-382.

Buzzi M, Henderson RJ & Sargent JR (1996). The desaturation and elongation of linolenic acid and ecosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochimica & Biophysica Acta* 1299, 235-244.

Buzzi M, Henderson RJ & Sargent JR (1997). Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp Biochem Physiol* 116B, 263-267.

-C-

Caballero MJ, Obach A, Roselund G, Montero D, Gisvold M & Izquierdo MS (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253-271.

Cahu CL & Zambonino Infante JL (1994). Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp Biochem Physiol* 109A, 213-222.

Cahu CL & Zambonino Infante JL (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.

Cahu CL, Zambonino Infante JL & Takeuchi T (2003a). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.

Cahu CL, Zambonino-Infante JL & Barbosa V (2003b). Effect of dietary phospholipid level and phospholipid-neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br J Nutr* 90, 21-28.

Castell JD, Bell JG, Tocher DR & Sargent JR (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128, 315-333.

Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavialle M & Denis I (2006). Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci* 24(11), 3084-3090.

Cho HP, Nakamura M, Clarke SD (1999). Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J Biol Chem* 274, 471-477.

Corraze G (1999). Nutrition lipidique. In: Guillaume J, Kaushik S, Bergot P & Métailler R (Eds). *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. INRA Editions, Paris, France, pp 229-245.

Crane RK, Boge G, Rigal A (1979). Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim Biophys Acta* 554, 264-267.

-D-

De Torrenço MP & Brenner RR (1976). Influence of environmental temperature on the fatty acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus maculatus*) liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 424, 36-44.

Dias J, Alvarez MJ, Diez A, Corraze G, Bautista JM & Kaushik SJ (1998). Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169-186.

Delarue J, Matzinger O, Binnert C, Schneiter P, Chiolo R & Tappy L (2003). Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men. *Diabetes and metabolism* 29 (3), 289-295.

Delarue J, LeFoll C, Corporeau C & Lucas D (2004). N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reproduction-nutrition-development* 44 (3), 289-299.

Dunbar BL & Bauer JE (2002). Conversion of essential fatty acids by delta-6 desaturase in dog liver microsomes. *J Nutr* 132, 1701-1703.

-F-

Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL & Dennis EA (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46 (5), 839-861.

FAO (2007). The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Aquaculture Organisation of the United Nations, Rome.

Fauconneau B, Corraze G, Lebaill PY & Vernier JM (1990). Les lipides de dépôt chez les poissons d'élevage : contrôle cellulaire, métabolique et hormonal. INRA Prod Anim 3, 369-381.

Fer M, Goulitquer S, Dréano Y, Berthou F, Corcos L & Amet Y (2006). Determination of polyunsaturated fatty acid monoepoxides by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Chroma 1115, 1-7.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497-509.

Fuiman LA (1997). What can flatfish ontogenies tell us about pelagic and benthic lifestyles? J Sea Res 37, 257-267.

Fuiman LA, Polling KR, Higgs DM (1998). Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. Copeia 1998, 602-611.

Furuïta H, Takeushi T & Uematsu K (1998). Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 193, 49-63.

-G-

Ganga R, Bell JG, Montero D, Robaina L, Caballero MJ & Izquierdo MS (2005). Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 142(4), 410-8.

Garcia AS, Parrish CC & Brown JA (2008). A comparison among differently enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. Aquaculture nutrition 14, 14-30.

Gause WC & Adamovicz J (1994). The use of the PCR to quantitate gene expression. PCR Methods Appl. 3, 123-135.

Geurden I, Aramendi M, Zambonino-Infante JL & Panserat S (2007). Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292 (6), R2275-83.

Girin M (1979). Méthodes de production des juvéniles chez trois poissons marins, le bar, la sole et le turbot. Rapports. Scientifiques et Techniques, publication 39, CNEXO (France, 1979, 202 p.

Glenncross BD, Smith DM, Thomas MR & Williams KC (2002). Optimising the essential fatty acids in the diet for weight gain in prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture 204, 89-99.

Goldman AS, Hopkinson JM & Rassin DK (2007). Benefits and risks of breastfeeding. Adv Pediatr 54, 275-304.

-H-

Hagar AF & Hazel JR (1985). Changes in desaturase activity and the fatty acid composition of microsomal membranes from liver tissue of thermally-acclimating rainbow trout. J Comp Physiol B 156, 35-42.

Hahn P (1984). Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. J Nutr 114, 1231-1234.

Hastings N, Agaba M, Tocher DR, Leaver MJ, Dick JR, Sargent JR & Teale AJ (2001). A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. Proc Natl Acad Sci USA 98, 14304-14309.

Hegarty B, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P & Foufelle F (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. PNAS 102 (3), 791-796.

Henderson RJ, Bell MV & Sargent JR (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.

Henderson RJ, Sargent JR & Hopkins CCE (1984). Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin *Mallotus villosus* during sexual maturation and spawning. Mar Biol 78, 255.

Hertz R, Sheena V, Kalderon B, Berman I & Bar-Tana J (2001). Suppression of hepatocyte nuclear factor-4 α by acyl-CoA thioesters of hypolipidemic peroxisome proliferators. Biochem Pharmacol. 61 (9), 1057-62.

Holm H, Hanssen LE, Krogdahl A & Florholmen J (1988). High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. J Nutr 118, 515-520.

Horton JD, Goldstein JL & Brown MS (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125–1131.

Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL & Wang X (1993). SREBP-2 a second basic-helix–loop-helix–leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11603–11607.

Huang YS, Chaudhary S, Thurmond J, Bobik EG, Yuan L, Chan GE, Kirchner SJ, Mukerji P & Knutson DS (1999). Cloning of $\Delta 12$ - and $\Delta 5$ -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 34, 649-659.

-I-

Iijima N, Tanaka S & Ota Y (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiol Biochem* 18, 59-69.

Izquierdo MS, Tandler A, Sahli M & Kolkovski S (2001). Influence of dietary polar lipids' quantity and quality on ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead sea bream. *Aquac Nutr* 7, 153-160.

-J-

Jaenish R & Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33, 245-254.

James SY, Lin F, Kolluri SK, Dawson MI & Zhang XK (2003). Regulation of retinoic acid receptor β expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands in cancer cells. *Cancer Res* 63, 3531-3538.

Juaneda P & Roquelin G (1985). Rapid and convenient separation of phospholipids and non-phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20, 40-41.

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Limatta M, Ren B & Badin M (1996). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog Lipid Res* 35, 227-241.

-K-

- Kamler E**, Slaminska M, Przybyl A, Barska B & Jakubas M (1990). Developmental response of carp, *Cyprinus carpio*, larvae fed different foods or starved. *Environ Biol Fishes* 29, 303-313.
- Kanazawa A**, Teshima S, Inamori S & Matsubara H (1983). Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem Fac Fisheries, Kagoshima University* 32, 109-114.
- Kanazawa A** (1985). Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds), *Nutrition and feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 281-298.
- Kanazawa A** (1993). Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: *Fish nutrition in practice, Les Colloques*, eds S.J. Kaushik and P. Luquet, Paris: Ed. INRA, 61, 519-530.
- Kaushik SJ**, Cves 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 sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391-404.
- Keller H**, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K & Wahli W (1993). Fatty acids and retinoids control metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2160-2164.
- Kjær MA**, Vegusdal A, Gjøen T, Rustan AC, Todorčević M & Ruyter B.(2008). Effect of rapeseed oil and dietary n-3 fatty acids on triacylglycerol synthesis and secretion in Atlantic salmon hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbali.2007.12.004.
- Kjørsvik E**, Pittman K & Pavlov D (2004). From fertilization to the end of metamorphosis-functional development. First feeding technology. In: Moksness E, Kjørsvik E, Olsen Y(Eds.), *Culture of cold-water marine fish*. Blackwell Publishing Ltd. pp 204-278.
- Koumoundouros G**, Divanach P & Kentouri M (1999). Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae). *Mar Biol* 136, 561-572.
- Koumoundouros G**, Divanach P, Anezaki L & Kentouri M (2001). Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar Biol* 139, 817-830.
- Koven WM**, Tandler A, Kissil GW, Sklan D, Friezlander O & Harel M (1990). The effect of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 91, 131-141.
- Koven W**, Kolkovski S, Hadas E, Gamsiz K & Tandler A (2001). Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107-121.

Krogdahl A & Sundby A (1999). Characteristics of pancreatic function in fish. In: Pierzynowski, SG, Zabielski R (Eds), *Biology of the Pancreas in Growing Animals*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 437-458.

-L-

Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH & Michaelsen KF (2001). The essentiality of long chain *n*-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1-94.

Le Milinaire C (1984). Etude du besoin en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifère *Brachionus plicatilis*. Université de Brest (France), pp.168.

Lie O, Hemre GI & Lambertsen G (1992). Influence of dietary fatty acids on the glycerophospholipid composition in organs of cod (*Gadus morhua*). *Lipids* 27, 770-775.

Lin H, Romsos DR, Tack PI & Leveille GA (1977). Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Onchorhynchus mykiss*). *J Nutr* 107, 846-854.

Linares F & Henderson RJ (1991). Incorporation of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) in vivo. *J Fish Biol* 38, 335-347.

Lodemel JB, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE, Espelid S & Ringo E (2001). Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquac Res* 32, 935-946.

Lopez-Albors O, Ayala MD, Gil F, Garcia-Alcazar A, Abellan E, Latorre R, Ramirez-Zarzosa G & Vasquez JM (2003). Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juveniles stages. *Aquaculture* 220, 385-406.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193, 265-275.

Lucas A (1991). Programming by early nutrition in man. In: *The childhood Environment and Adult disease* pp. 38-55. CIBA Foundation Symposium 156. Wiley, Chichester, UK.

Lucas A (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 128, 401S-406S.

-M-

- Maroux S**, Louvard D & Baratti J (1973). The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim Biophys Acta* 321, 282-295.
- Marty Y**, Delaunay F, Moal J & Samain JF (1992). Changes in the fatty acid composition of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Eco* 163, 221-234.
- Matsuzaka T**, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hastly AH, Tamura Y, Osuga JI, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, & Yamada N (2002). Dual regulation of mouse $\Delta 5$ and $\Delta 6$ -desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR α . *J Lipid Res* 43, 107-114.
- McCance RA** (1962). Food growth and time. *Lancet* 2, 271-272.
- McEvoy L**, Estevez A, Bell JG, Shields RJ, Gara B & Sargent JR (1998). Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L. In: Hendry, C., Editor. Proceedings of the Live Feeds Session, Aquaculture Canada '98. St. Andrews, NB, Canada, No. 98-4, pp. 17–20.
- Metais P & Bieth J** (1968). Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann Biol Clin* 26, 133-142.
- Mitchell DC**, Niu SL & Litman BJ (2003). DHA-rich phospholipids optimize G-Protein-coupled signaling. *J Pediatr* 143 (4), 80-86.
- Misawa K**, Horiba T, Arimura N, Hirano Y, Inoue J, Emoto N, Shimano H, Shimizu M & Sato R (2003). Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem* 278 (38), 36176-82.
- Montero D**, Kalinowski T, Obach A, Robaina L, Tort L, Caballero MJ & Izquierdo MS (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 270– 353.
- Montero D**, Robaina L, Caballero MJ, Ginés R & Izquierdo MS (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248, 121-134.

Morais S, Cahu CL, Zambonino Infante JL, Robin JH, Ronnestad I, Dinis MT & Conceição LEC (2004). Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39, 449-458.

Morais S, Caballero MJ, Conceição LEC, Izquierdo MS & Dinis MT (2006). Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae : Effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity.

Mourente G & Tocher DR (1994). In vivo metabolism of [¹⁻¹⁴C] linolenic acid (18:3n-3) and [¹⁻¹⁴C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim Biophys Acta* 1212, 109-118.

Mourente G, Dick JR, Bell JG, Tocher DR (2005). Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and oxidation of [1-¹⁴C]18:3n-3 and [1-¹⁴C]20:5n-3 in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248, 173-186.

-N-

Nakamura MT & Nara TY (2002). Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6),1076-1079.

Nakamura MT & Nara TY (2003). Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *PLEFA* 68, 145-150.

Napier JA, Hey SJ, Lacey DJ & Shewry PR (1998). Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ6 fatty acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 330, 611-614.

Nara TY, He WS, Tang C, Clarke SD & Nakamura MT (2002). The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 111–117.

Nicholson JA & Kim YS (1975). A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal Biochem* 63, 110-117.

Ninno RE, De Torrenzo MAP, Castuma JC & Brenner RR (1974). Specificity of 5- and 6-fatty acid desaturases in rat and fish. *Biochim Biophys Acta* 360, 124-133.

NRC National Research Council (1993). Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, DC.

-O-

Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI & Young RA (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303 (5662), 1378-81.

OFIMER Office National Interprofessionnel des produits de la MER et de l'aquaculture. documentation@ofimer.fr.

Olsen RE, Henderson RJ & McAndrew BJ (1990). The conversion of linoleic acid and linoleic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by *Tilapia* (*Oreochromis nilotica*) in vivo. *Fish Physiol Biochem* 8, 261-270.

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.

Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd R A, Bashmakov Y, Goldstein JL & Brown M S (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6027-6032.

Owen JM, Adron JW, Middleton C & Cowey CB (1975). Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot (*Scophthalmus maximus* L.), and rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Rich.). *Lipids* 10 (9), 528-531.

-P-

Parpoura ACR & Alexis MN (2001). Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquac Int* 9, 463-476.

Patel MS & Srinivasan M (2001). Metabolic programming : causes and consequences. *J Biol Chem* 277 (3), 1629-1632.

Pérès A, Cahu C, Zambonino Infante JL, Le Gall MM & Quazuguel P (1996). Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 15, 237-242.

Person-Le Ruyet J, Alexandre JC, Thébaud L & Mugnier C (1993). Marine fish larvae feeding : formulated diets or live prey ? *J World Aquac Soc* 24 (2), 211-224.

Person-Le Ruyet J, Skalli A, Dulau B, Le Bayon N, Le Delliou H & Robin JH (2004). Does dietary n-3 highly unsaturated fatty acids level influence the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to a high temperature? *Aquaculture* 242, 571-588.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.

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.

Pontoglio M, Faust DM, Doyen A, Yaniv M & Weiss MC (1997). Hepatocyte nuclear factor 1-alpha gene inactivation impairs chromatin remodelling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Cell Biol* 17, 4948-4956.

-R-

Refstie S & Storrebaken T (2001). Vegetable protein sources for carnivorous fish: potential and challenges. *Recent Adv Anim Nutr Australia* 13, 195-203.

Regost C, Arzel J, Robin J, Rosenlund G & Kaushik SJ (2003). Total replacement of fish oil by soybean oil or linseed oil with return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): Growth performance, flesh fatty acid profile and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 191-199.

Reitan KI, Rainuzzo JR & Olsen Y (1994). Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquac Int* 2, 33-48.

Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzales FJ & Jump DB (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem* 272, 26827-26832.

Ringo E, Lodemel JB, Myklebust R, Jensen L, Lund V, Mayhew TM & Olsen RE (2002). The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida*. *Aquac Res* 33, 591-606.

Robin JH, Regost C, Arzel J & Kaushik SJ (2003). Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* 225, 283-293.

Robin JH & Vincent B (2003). Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225, 463-474.

Robin JH & Peron A (2004). Consumption vs. Deposition of essential fatty acids in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae fed semi-purified diets. *Aquaculture* 238, 283-294.

Robin JH & Skalli A (2007). Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - A methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 263, 227-237.

Robertson JC & Hazel JR (1995). Cholesterol content of trout plasma membranes varies with acclimation temperature. *Am J Physiol* 269, 1113-1119.

-S-

Sahli M, Izquierdo MS, Hernandez-Cruz CM, Bessonart M & Fernandez-Placios H (1999). Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3HUFA content in polar lipids on the gut and liver histological structure of seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 253-264.

Sargent J, Henderson RJ & Tocher DR (1989). The lipids. In : Halver, JE (Ed.). *Fish nutrition*, vol.2. Academic Press, New York, pp. 154-218.

Sargent J, Bell JG, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DR (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *J Appl Ichthyol* 11, 183-198.

Sargent JR, Bell JG, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DR (1997). Requirement, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.

Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, Bell M, Henderson J & Tocher D (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.

Sargent JR, Tocher DR & Bell JG (2002). The lipids, Third edition. In *Fish Nutrition* (Halver JE & Hardy RW, eds) pp. 182-259. Academic Press, London.

Schünke M & Wodtke E (1983). Cold-induced increase of Δ^9 - and Δ^6 -desaturase activities in endoplasmic membranes of carp liver. *Biochim Biophys Acta* 734, 70-75.

Seilliez I, Panserat S, Kaushik S & Bergot P (2001). Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta-6 desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol B* 130, 83-93.

Seilliez I, Panserat S, Corraze G, Kaushik S & Bergot P (2003). Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol* 135B, 449-460.

Sfakianakis DG, Koumoundouros G, Divanach P & Kentouri M (2004). Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L.1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* 232, 407-424.

SFAM Syndicat Français de l'Aquaculture Marine. <http://www.aqualog-international.com/fr/guidesfam.htm#sfam>.

Shikata T & Shimeno S (1994). Metabolic response to dietary stearic acid, linoleic acid, and highly unsaturated fatty acid in carp. *Fish Sci* 60, 735-739.

Simopolous AP (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54, 438-463.

Sitjà-Bobadilla A, Padrós F, Aguilera C & Alvarez-Pellitero P (2005). Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. *Appl Environ Microbiol* 71 (1), 131-9.

Skalli A & Robin JH (2004). Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399-415.

Skalli A, Robin JH, Le Bayon N, Le Delliou H & Person-Le Ruyet J (2006). Impact of essential fatty acid deficiency on tissues' fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 255, 223-232.

Sperling P, Ternes P, Zank TK & Heinz E (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 68, 73-95.

-T-

Takeuchi T, Shiina Y, Watanabe T, Sekiya S & Imaizumi K (1992). Suitable levels of n-3 highly unsaturated fatty acids in diet of fingerlings of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1341-1346.

- Tan** NS, Shaw NS, Vinckenbosh N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W & Noy N (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 22 (14), 5114-5127.
- Tang** C, Cho HP, Nakamura MT & Clarke SD (2003). Regulation of human D-6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *J Lipid Res* 44, 686-694.
- Taylor** WR & Van Dyke GC (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn* II 9, 107-119.
- Tocher** DR, Fraser AJ, Sargent JR & Gambie JC (1985). Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids* 20, 69-74.
- Tocher** DR & Ghioni C (1999). Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl delta 5 desaturation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 34, 433-440.
- Tocher** DR, Bell JG, MacGlaughlin P, McGhee F & Dick JR (2001). Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil. *Comp. Biochem. Physiol.* 130, 257-270.
- Tocher** DR, Fonseca-Madrigal J, Dick JR, Ng W, Bell JG & Campbell PJ (2004). Effects of water temperature and diet containing palm oil on fatty acid desturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* 137B, 49-63.
- Tocher** DR, Dick JR, MacGlaughlin PM & Bell JG (2006). Effect of diets enriched in $\Delta 6$ desaturated fatty acids (18:3n-6 and 18:4n-3), on growth, fatty acid composition and highly unsaturated fatty acid synthesis in two populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*).
- Tsubouchi** Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue KE, Hla T & Sano H (2001). Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy- $\Delta 12,14$ -prostaglandin J₂. *Biochem and Biophys Res Com* 283, 750-755.

-U-

- Ushio** H, Ohshima T, Koizumi C, Visuthi V, Kiron V & Watanabe T (1997). Effect of Dietary Fatty Acids on Ca²⁺-ATPase Activity of the Sarcoplasmic Reticulum of Rainbow Trout Skeletal Muscle. *Comp Biochem Physiol* 118 B, 681-691.

-V-

Vagner M, Robin JH, Zambonino Infante JL & Person-Le Ruyet J (2007a). Combined effect of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*D. labrax*) larvae development. *Aquaculture* 266, 179-190.

Vagner M, Zambonino Infante JL, Robin JH & Person-Le Ruyet J (2007b). Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage ? *Aquaculture* 267, 165-174.

Valentine RC & Valentine DL (2004). Omega-3 fatty acids in cellular membranes : a unified concept. *Prog Lip Res* 43, 383-402.

Van Der Meeren T, Klugsoyr J, Wilhelmsen S & Kventseth PG (1993). Fatty acid composition of unfed cod larvae *Gadus morhua* L. and cod larvae feeding on natural plankton in large enclosures. *J World Aquacult Soc* 24 (2), 167-185.

Villeneuve L, Gisbert E, Cahu CL, Le Gall MM & Zambonino-Infante J (2004). Expression and localization of some retinoid receptor during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 242, 537-551.

Villeneuve L, Gisbert E, Le Delliou H, Cahu CL & Zambonino-Infante J (2005). Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br J Nutr* 93(6), 791-801.

-W-

Walton MJ & Cowey CB (1982). Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp Biochem Physiol* 73B, 59-79.

Watanabe T & Kiron V (1994). Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124, 223-251.

Waterland RA & Garza C (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 69, 179-197.

Waterland RA & Jirtle RL (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 20, 63-68.

Wilson R & Sargent JR (1992). High resolution separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 623, 403-407.

Wilson RP (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124, 67-80.

Wold PA, Hoehne-Reitan K, Cahu CL, Zambonino-Infante JL, Rainuzzo J & Kjorsvik E (2007). Phospholipids vs. neutral lipids: effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture* 272, 502-513.

-X-

Xu J, Teran-Garcia M, Park JHY, Nakamura MT & Clarke SD (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276, 9800-9807.

Xu J, Cho H, O'Malley S, Park JH & Clarke SD (2002). Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms. *J Nutr* 132 (11), 3333-3339.

-Y-

Yamada K, Kobayashi K & Yone Y (1980). Conversion of linolenic acid to n-3 highly unsaturated fatty acids in marine fishes and rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 40, 181-188.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL & Brown MS (1993). SREBP-1 a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75 (1), 187-197.

-Z-

Zambonino Infante JL & Cahu CL (1994). Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 12, 399-408.

Zambonino Infante JL, Cahu CL & Peres A (1997). Partial substitution of di- and tripeptides for native protein in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 127, 604-614.

Zambonino Infante JL & Cahu CL (1999). High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 129, 1195-1200.

Zambonino Infante JL & Cahu CL (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol C* 130 (4), 477-487.

Zeitoun IH, Ullrey DE, Magee WT, Gill JL & Bergen WG (1976). Quantifying nutrient requirement of fish. *J Fish Res Board Can* 33, 167-172.

Zhang F, Lavan BE & Gregoire FM (2006). Selective modulators of PPAR- γ activity: molecular aspects related to obesity and side-effects. *PPAR research* vol.2007, article 32696, pp7.

Zheng X, Seiliez I, Hastings N, Tocher DR, Panserat S, Dickson CA, Bergot P & Teale AJ (2004). Characterization and comparison of fatty acyl Δ 6-desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp Biochem Physiol* 139B, 269-279.

ANNEXES

ANNEXE 1

DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY

Préparation de la gamme standard

Ajouter 0, 0,25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 et 5 ml de BSA (1mg/ml^{-1}) dans des tubes de 10 ml.
Ajuster le volume à 10 ml avec de l'eau distillée.

Dosage

Déposer 400 μl d'échantillons dilués au 40ème et d'échantillons de la gamme dans des tubes à hémolyse. Y ajouter 2ml de solution A (Na_2CO_3 / Sulfate de cuivre/ Tartrate de sodium; 1/10: 1:1 v/v).

Mélanger. Laisser 10 min à température ambiante.

Ajouter 200 μl de solution B (réactif Folin ciocalteur du phénol dilué au $\frac{1}{2}$).

Mélanger aussitôt et laisser 30 min à température ambiante.

Lire au spectrophotomètre (longueur d'onde 750 nm).

Déterminer la concentration en protéine en ($\mu\text{g/ml}$) des échantillons par rapport à la courbe standard réalisée à partir de la gamme.

ANNEXE 2

PREPARATION DU COMPLEXE [1-¹⁴C]PUFA/BSA

L'isotope utilise dans notre cas est le [1-¹⁴C] 18:3(n-3), dont l'activité spécifique est habituellement ~ 50-55 mCi/mmol.

Le protocole décrit ci-dessous est valable pour 25 µCi, mais les volumes peuvent être ajustés pour des quantités inférieures (10 µCi.)

1. Prélever 25 µCi dans un tube conique en verre. Evaporer au N-evap.
2. Ajouter 100 µl d'éthanol + 0.1 M KOH, mélanger pendant 10 min.
3. Préparer une solution de fatty acid-free BSA de 50 mg.ml⁻¹ dans un tampon phosphate (1 volume de solution KH₂PO₄ 0.4M +4 volumes de K₂HPO₄ 0.4M)
4. Ajouter 5 ml de la fatty acid-free BSA dans la solution isotope-KOH. Mélanger à température ambiante pendant 45 min.
5. Prélever trios aliquots de 10 µl et les déposer dans des tubes à scintillation, ajouter 5 ml de liquide de scintillation. Déterminer la radioactivité au compteur à scintillation.
Théoriquement, les valeurs de radioactivité devraient être autour de 100 000 dpm/10 µl.

ANNEXE 3

PREPARATION DU MILIEU D'INCUBATION DES MICROSOMES

Mélanger 10 ml de chacune des 6 solutions ci-dessous avec 35 ml de tampon d'homogénéisation (0.25ml de sucrose dans 10 mM d'HEPES et 1mM EDTA, pH 7,4).

60 mM MgCl ₂	(122 mg / 10 ml; form. wt. 203.3)
18 mM Glutathione	(60 mg / 10 ml; form. wt. 307.3)
6 mM Nicotinamide	(10 mg / 10 ml; form. wt. 122.1)
12 mM NADH	(100 mg / 10 ml; form. wt. 709.4)
1.2 mM Coenzyme A	(10 mg / 10 ml; form. wt. 767.5)
60 mM ATP	(350 mg / 10 ml; form. wt. 551.1)

Les concentrations finales sont MgCl₂ (5 mM), glutathione (1.5 mM), nicotinamide (0.5 mM), NADH (1 mM), CoA (100 mM), ATP (5 mM).

ANNEXE 4

METHODOLOGIE

1. Méthodologie générale

1.1. Animaux

Le modèle d'étude est le bar européen *Dicentrarchus labrax* :

Super classe :	Poisson
Classe :	Ostéichthyen
Sous Classe	Actinoptérygien
Super Ordre :	Téléostéen
Ordre :	Perciforme
Sous ordre :	Percoidé
Famille :	Moronidé

Les larves utilisées proviennent de l'écloserie marine de Gravelines (Pas-de-Calais, France). A leur réception, elle sont âgées de 1 à 3 jours, mesurent entre 3,5 et 4,5 mm et pèsent entre 0,3 et 0,5 mg. Ces larves ne provenaient pas de familles génétiquement identifiées. Dans les deux expériences larvaires menées au cours de cette thèse, les larves ont été élevées pendant 40 jours dans une structure adaptée à leur bon développement et nourries dès l'ouverture de la bouche (jour 6, J6) avec des aliments composés expérimentaux.

A l'issue de cette phase larvaire, les animaux d'une même condition expérimentale ont été transférés dans un seul bassin par condition et nourris avec le même aliment commercial (2.7% EPA+DHA, % de MS de l'aliment). C'est la période intermédiaire nécessaire à la mise en place d'une programmation métabolique.

A l'issue de cette période intermédiaire de durée variable selon les expériences menées, les capacités des juvéniles à s'adapter à un régime carencé en HUFA à été testée en nourrissant tous les individus avec un aliment composé expérimental carencé en HUFA : c'est le challenge juvénile.

Deux conditionnements larvaires ont été testés au cours de cette thèse (C1 puis C2). Ils ont été suivis d'une période intermédiaire de 90 et 30 jours respectivement puis d'un challenge R1 et R2 de 60 et 35 jours respectivement (Fig.1).

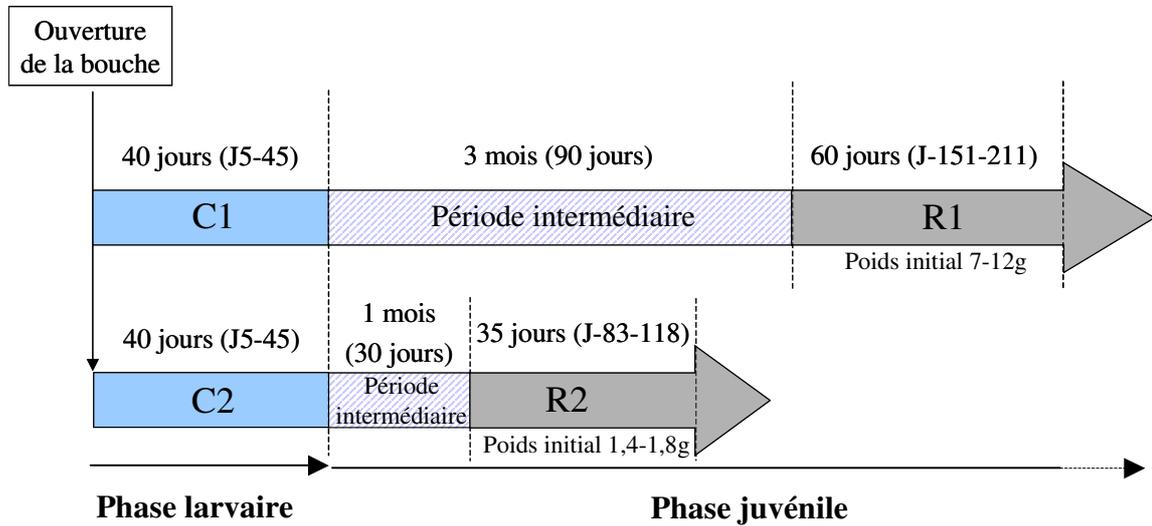


Fig.1. Design des expériences 1 et 2 menées au cours de la thèse

1.2. Installations expérimentales

1.2.1. Bacs d'élevage

L'ensemble des élevages a été réalisé à l'Ifremer de Brest. L'élevage des larves a été réalisé dans des bacs de 35 l en fibre de verre, de forme cylindro-conique (Fig.2). Cette forme permet la concentration des déchets au fond des bacs. La couleur noire des parois évite l'agglutination des larves. La densité moyenne était de 60 larves par litre, soit environ 2500 larves par bac. L'eau de mer, pompée en rade de Brest, était renouvelée par un circuit ouvert et ce renouvellement était augmenté au cours de la croissance des larves (de 50%.h⁻¹ à J6 à 200%.h⁻¹ à J45). L'eau était préalablement filtrée à travers un filtre à sable, passait ensuite dans un système de chauffage au tungstène et une colonne de dégazage garnie d'anneaux en plastique. Elle passait ensuite sous une lampe UV et à travers un filtre à cartouches en polypropylène contenant des pores de 10 µm. À leur arrivée, les larves étaient placées dans une eau à 14°C environ. La température d'élevage a été progressivement augmentée jusqu'à 16°C, 19°C ou 22°C selon les expériences menées. La salinité était de 35 g.l⁻¹ et le taux

d'oxygène maintenu autour de 90-95% de saturation. Les larves étaient exposées à un noir complet jusqu'à J7 puis à un jour complet jusqu'à J45. L'intensité lumineuse a été progressivement augmentée de 1 lux à 500 lux pendant cette période. La qualité de la ponte a été contrôlée à J10 par l'estimation du pourcentage d'inflation de la vessie natatoire. Une bonne qualité de ponte a été admise lorsque ce pourcentage était supérieur ou égal à 90%. Chaque bac disposait de distributeurs à bandes automatisés de l'aliment (Fig.2). Les bars, dès leur stade larvaire, ne chassent leurs proies que si elles sont en suspension dans l'eau. Les aliments étaient donc distribués en excès 18h/24h pour assurer une meilleure disponibilité de l'aliment pour les larves et éviter un jeûne. La ration journalière a évolué entre 1g. jour⁻¹ (J6) et par bassin à 10g. jour⁻¹ à J45. L'accumulation de nourriture non consommée et de fèces qui en résultait a nécessité la mise en place d'un dispositif d'élimination des déchets au fond des bacs.

Au cours de la période intermédiaire, les poissons des quatre bassins par condition expérimentale ont été regroupés dans un bassin carré par condition, à 19°C, température de référence des élevages du laboratoire (Fig.2). Pendant cette période, les poissons ont été nourris automatiquement et en excès avec un aliment commercial riche en HUFA n-3. La durée de cette période a varié entre les deux expériences menées au cours de la thèse (90 et 30 jours pour les expériences 1 et 2 respectivement).

Les juvéniles issus des élevages larvaires ont ensuite été individuellement pesés, et les poissons se trouvant autour de la classe modale ont été sélectionnés et de nouveau distribués au hasard dans 4 bacs par condition expérimentale (bacs carrés de 60 l), avec, dans la mesure du possible, des biomasses équivalentes dans tous les bacs (Fig.2). Après une acclimatation de 6 à 10 jours à la structure expérimentale avec le même aliment et la même température que lors de la période intermédiaire, les poissons ont été nourris avec un régime composé expérimental carencé en HUFA. Seuls un ou deux bacs par condition (R1 et R2 respectivement) ont reçu un régime composé expérimental riche en HUFA (groupes contrôle) afin d'avoir un élément de comparaison des performances de croissance et de la composition lipidique des groupes carencés. Les poissons ont été nourris à la main jusqu'à satiation visuelle à 9h et 15h, afin d'éviter la gaspillage de nourriture.

Tout au long des expériences, la température a été contrôlée quotidiennement et l'oxygène mesuré une fois par semaine.

La méthodologie utilisée lors de chacun des conditionnements testés C1 et C2 puis R1 et R2 est détaillée dans les chapitres I et II.

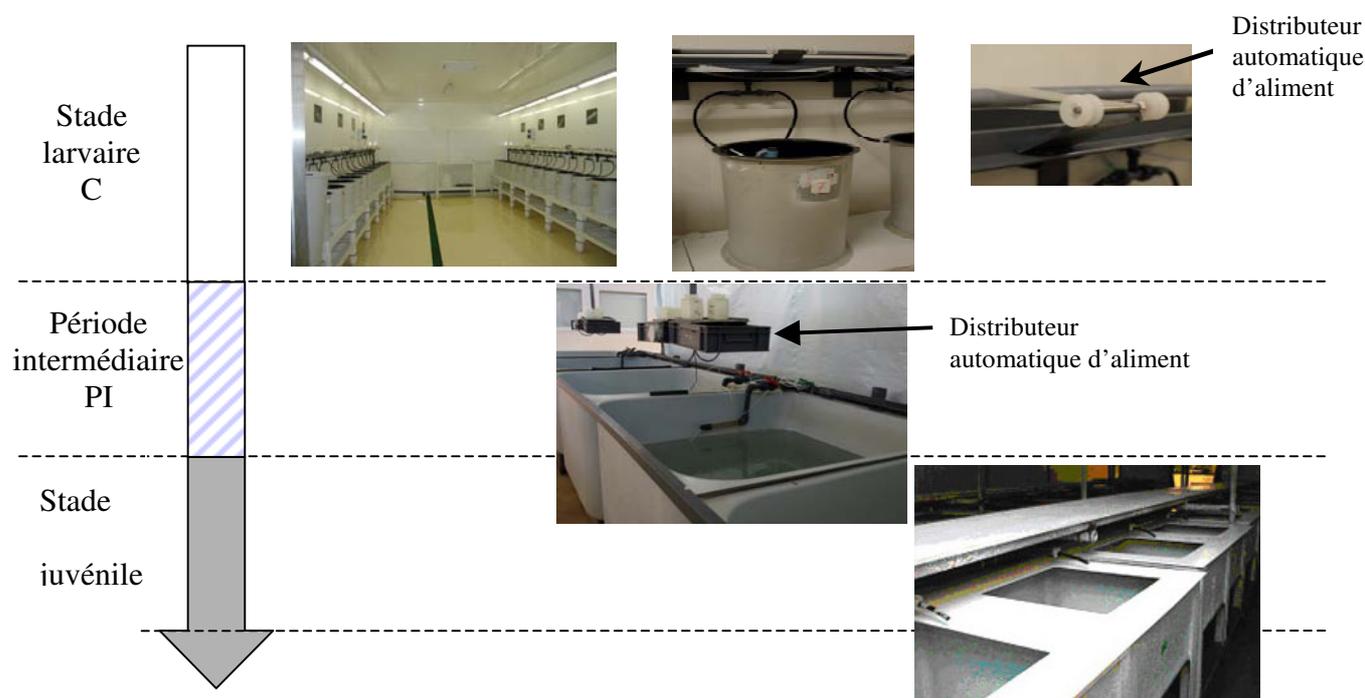


Fig.2. Installations expérimentales utilisées au cours des expériences

1.2.2. Entretien des bacs d'élevage

L'accumulation de fèces, d'animaux morts et de nourriture non consommée a nécessité un nettoyage minutieux des bacs chaque jour afin d'éviter l'accumulation d'ammoniaque et de nitrate-nitrite. Les bacs ont été nettoyés quotidiennement avant la distribution de l'aliment par un siphonnage des parois et du fond. Les déchets en suspension étaient éliminés par le tuyau d'évacuation des eaux de renouvellement dont l'embout était protégé par une toile à plancton de maille supérieure au diamètre des particules alimentaires ($450\ \mu\text{m}$). Le fond et les parois des bacs utilisés au cours de la période intermédiaire et juvénile ont été nettoyés grâce à une balayette et les particules en suspension évacuées par une purge.

1.3. Aliments

Toutes les formules alimentaires contiennent une source protéique (farine de poisson, concentré protéique CPSP, farine de poisson délipidée), une source glucidique (amidon), une

source lipidique (lécithine de soja, lécithine marine, huile de foie de morue) et un mélange de vitamines, minéraux et liants.

La fabrication des aliments réalisée au laboratoire suit toujours le même ordre. La farine de poisson est tamisée à 160 μm , les particules inférieures à cette taille sont mélangées avec le CPSP et la lécithine de soja. Les vitamines sont ajoutées, mélangées, puis les minéraux sont incorporés. Les lipides sont ajoutés ensuite (huiles puis lécithine). Les phospholipides marins se présentant sous forme de pâte sont ajoutés à de l'eau pour faciliter le mélange. L'eau est le dernier élément à être ajouté. La pâte obtenue est hachée en spaghettis qui seront séchés à 50°C à l'étuve. Les spaghettis sont ensuite concassés puis tamisés. Les larves âgées de 5 à 15 jours ont été nourries avec les particules mesurant entre 120 et 200 μm . Puis, les larves ont reçu des particules mesurant de 200 à 400 μm . Les juvéniles ont été nourris avec des granulés mesurant de 400 à 630 μm . La formulation de chacun des aliments expérimentaux utilisés au cours de cette thèse sont présentés dans les chapitres I et II.

2. Prélèvement et préparation des échantillons biologiques

Pour tous les prélèvements effectués (larves et juvéniles), le niveau d'eau du bassin a été abaissé et les poissons anesthésiés au phénoxyéthanol (0,15 ml.l^{-1}).

2.1. Les Larves

Les prélèvements de larves ont été effectués à J25 et à J45 lors de la première expérience larvaire C1. Elles correspondent respectivement au début du développement des enzymes digestives spécifiques de la bordure en brosse des entérocytes (J25), et à la fin de la période larvaire, lorsque toutes les fonctions enzymatiques et moléculaires ont été établies (J45). Concernant l'expérience C2, des prélèvements intermédiaires (J10 et J17) ont été effectués pour l'étude d'expression des gènes.

2.1.1. La croissance pondérale

Elle a été estimée par un échantillonnage de 30 larves par bassin prises au hasard. Après un temps de fixation de trois semaines au formol à 4%, le poids frais et le poids sec (105°C, 24h) ont été déterminés ($\pm 10^{-2}$ mg), n=4 par condition expérimentale.

2.1.2. *La croissance métrique et les stades de développement*

Après fixation au formol (4% d'eau de mer). Les longueurs totales de 10 larves par bassin ont été déterminées ($\pm 10^{-2}$ mm), n=4 par condition expérimentale. Pour les larves d'une longueur inférieure à 13 mm le logiciel TNPC 3.2 relié à une loupe binoculaire a été utilisé. Pour les larves plus grandes, un pied à coulisse à affichage digital (Codium-Scientific) a été utilisé. Les stades de développement ont été déterminés selon des critères morphométriques par bicoloration (au bleu Alcyan et rouge Alizarin, méthode de Taylor et Van Dyke, 1985).

2.1.3. *La survie*

Les poissons survivants ont été comptés en fin d'expérience. Ce nombre, rapporté au nombre initial de larves mises en élevage, a permis d'estimer le taux de survie. Ce taux tient compte des poissons prélevés pour les analyses et est exprimé en pourcentage.

2.1.4. *Le niveau d'activité de certaines enzymes digestives*

- . Amylase et trypsine pancréatique
- . Lipase pancréatique
- . Phospholipase A2 pancréatique (PLA2)
- . Phosphatase alcaline (PA) et leucine-amino-peptidase (LAP) de la bordure en brosse de l'intestin
- . Leucine-alanine (Leu-ala), trypsine, amylase et AP de l'intestin

Une centaine de larve a été prélevée dans chaque bassin et conservée à -20°C. Elles ont ensuite été disséquées en deux segments (pancréatique et intestinal, Fig.3). Les segments pancréatiques d'un même échantillon ont été réunis dans un tube puis broyés dans 2 ml d'eau distillée. Ils sont ensuite centrifugés à 3300 g pendant 3 min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés puis les enzymes dosées. En ce qui concerne le segment intestinal, les enzymes spécifiques de la bordure en brosse (LAP et PA) et celle du cytosol (Leu-ala) sont dosées. Pour cela, les segments intestinaux ont été broyés au Polytron® PT 2100 (Polytron Bioblock®) dans 30 volumes de tampon mannitol (50 mM) et tris (2 mM) à pH 7. Un millilitre de cet

homogénat a été prélevé pour permettre le dosage des enzymes du cytosol ainsi que le dosage des enzymes pancréatiques présentes dans la lumière du tube digestif. Le reste a été centrifugé 10 min à 9000 g après ajout de CaCl_2 dans le but de casser les membranes cellulaires. Le surnageant prélevé a subi une seconde centrifugation de 20 min à 34 000 g permettant de séparer les bordures en brosse des autres constituants des entérocytes. Le culot contenant ces bordures en brosse a été repris dans 1 ml de KCl 0.1 M, DTT (Dithiothreitol) 1mM, Tris HEPES 5 mM à pH 7,5. Les activités enzymatiques ont été calculées par rapport à la teneur en protéines. La PLA2 a été dosée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Les protéines ont été dosées dans les segments pancréatiques et intestinaux par la méthode de Bradford (1976).

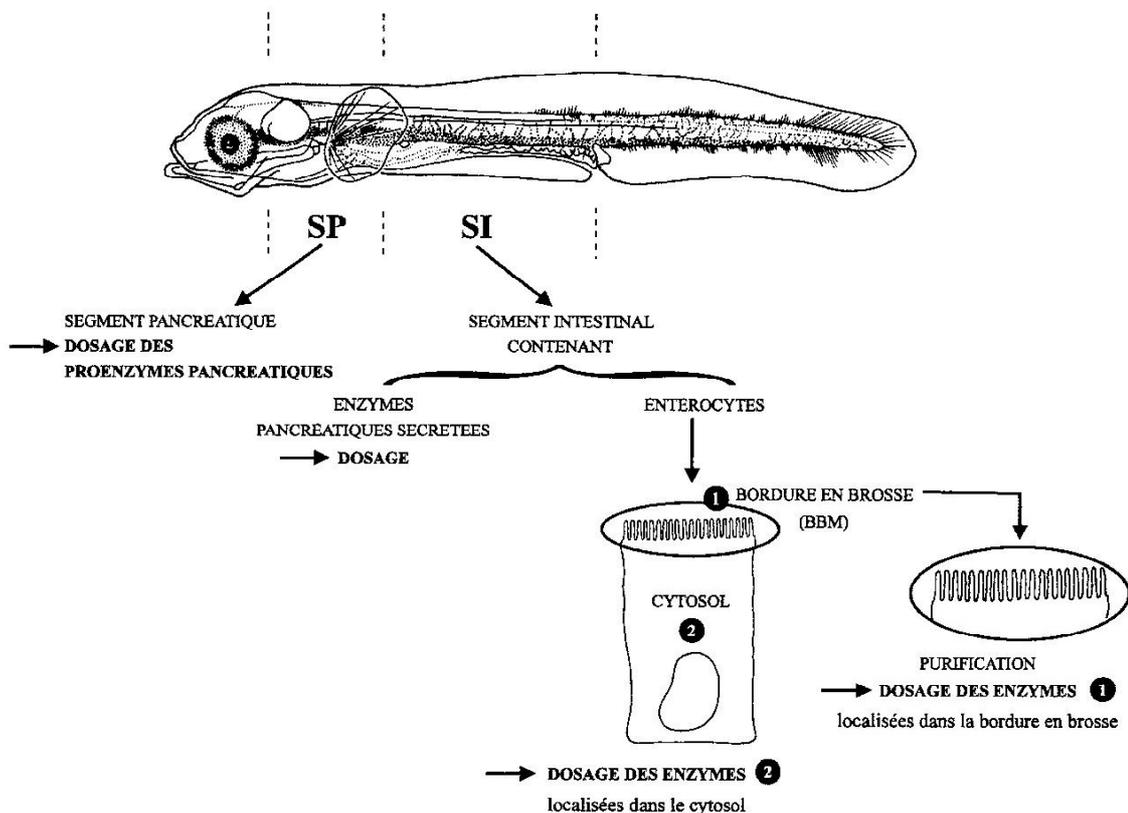


Fig.3. Dissection des larves de bar et localisation des enzymes dosées

2.1.5. La composition biochimique des larves

50 larves comptées individuellement ont été prélevées dans chaque bassin (200 larves par condition) puis conservées à -80°C jusqu'à l'analyse.

2.1.6. Biologie moléculaire

Le niveau d'expression de gènes codant pour des fonctions digestives (lipase, PLA2, delta-6-désaturase) ainsi que des gènes dont l'expression est régulée par les acides gras (peroxisome-proliferator activated receptor PPAR α , β , γ) a été quantifié par PCR quantitative. 150 mg de larve ont été prélevés dans chaque bassin et le segment digestif de chaque individu disséqué aussitôt. Il a été conservé dans du trizol à -80°C jusqu'à l'analyse.

2.2. Les juvéniles

2.2.1. Croissance

La croissance a été estimée par pesées individuelles de tous les poissons (R1) ou de 50 poissons (R2) toutes les deux semaines ($\pm 0,1$ g), $n=4$ pour chaque condition expérimentale. Lors de R1, les performances de croissance ont également été estimées par le calcul des indices de croissances SGR (Specific Growth Rate ou taux de croissance spécifique), FCR (Feed Conversion Index ou indice de conversion alimentaire) et FI (Feed Intake ou prise alimentaire) comme suit :

$$\text{SGR}_{J_{\text{initial}} - J_{\text{final}}} = 100 \times (\text{Ln}_{\text{poids final}} - \text{Ln}_{\text{poids initial}}) \text{ jour}^{-1},$$

Où SGR in $\% \text{ jour}^{-1}$

$$\text{FI}_{J_{\text{initial}} - J_{\text{final}}} = 100 \times [\text{masse journalière moyenne d'aliment sec ingérée (g)} \times \text{masse humide moyenne des poissons}^{-1} \text{ (g)}],$$

Où FI est en $\% \text{ jour}^{-1}$, masse humide moyenne des poissons = $(\text{poids final} + \text{poids initial}) / 2$,
poids des poisson = poids individuel moyen x nombre de poissons.

$$\text{FCR}_{J_{\text{initial}} - J_{\text{final}}} = \text{poids sec de l'aliment ingéré (g)} \times \text{gain de poids moyen des poissons}^{-1} \text{ (g)}$$

Où FCR n'a pas d'unité.

Lors de R2, l'indice de croissance journalier (ou Daily Growth Index DGI) a été calculé comme suit :

$$\text{DGI}_{\text{d-83-118}} = 100 \times (\sqrt[3]{P_{\text{initial}}} - \sqrt[3]{P_{\text{final}}}) \text{ jour}^{-1}$$

2.2.2. *Survie*

Les poissons survivants ont été comptés en fin d'expérience. Ce nombre, rapporté au nombre initial de poissons mis en élevage, a permis d'estimer le taux de survie. Ce taux tient compte des poissons prélevés pour les analyses et est exprimé en pourcentage ; n=4 pour chaque condition expérimentale.

2.2.3. *La composition biochimique des juvéniles*

Concernant le challenge juvénile R1, 8 poissons ont été prélevés pour les groupes ex-16 et 6 poissons pour les groupes ex-22 dans deux bassins par condition expérimentale en début d'expérience (J151) et dans tous les bassins par condition expérimentale en fin d'expérience (J211), n=4 par condition expérimentale.

Concernant le challenge R2, 6 poissons par bassin ont été prélevés en début d'expérience (J83) et 10 poissons par bassins en fin d'expérience (J118), n=4 par condition expérimentale.

Les poissons ont été individuellement pesés puis congelés dans l'azote liquide et stockés à –80°C jusqu'à l'analyse.

2.2.4. *Quantification des ARNm*

Concernant le challenge R1, le niveau d'expression de la delta-6 désaturase (numéro d'accès AJ715505) a été mesuré sur un pool de 9 poissons prélevés dans trois bassins par condition expérimentale (n=3) à J151 (point initial), J181 et J211 (point final). Les poissons ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à –80°C jusqu'à l'analyse.

Concernant le challenge R2, le niveau d'expression de la delta-6-désaturase ainsi que des gènes dont l'expression est régulée par les acides gras (peroxisome-proliferator activated receptor PPAR α , β et γ) a été quantifié par PCR quantitative sur un pool de 10 poissons par bassin (n=4) à J83 (point initial), J90, J107 et J118 (point final). Les poissons ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à –80°C jusqu'à l'analyse.

3. Analyses des échantillons

3.1. Dosage des enzymes digestives

3.1.1. La trypsine (Holm et al., 1988)

Le dosage de cette enzyme consiste à mesurer la cinétique de l'hydrolyse du substrat standardisé (BAPNA) par la trypsine, en présence du tampon Tris HCl, CaCl₂. Les produits de dégradation sont quantifiés par spectrophotométrie (407 nm, 37°C). 407 nm correspond au coefficient d'absorption du substrat. Une unité tryptique correspond à l'activité enzymatique hydrolysant 1µmole de BAPNA min⁻¹ ml⁻¹. L'activité enzymatique est calculée par la relation suivante:

$$U \text{ ml}^{-1} = (\Delta DO / \text{min} / \epsilon) \times (V/v) \times d$$

ϵ = coefficient d'extinction µmolaire du substrat

V = volume réactionnel en ml

v = volume de l'homogénat en ml

d = facteur de dilution

3.1.2. L'amylase (Metais et Bieth, 1968)

L'homogénat est incubé à 37°C pendant 5 mn dans une solution tampon d'amidon et de NAH₂PO₄ (3 g l⁻¹, pH 7,4). L'amidon non dégradé par l'enzyme est coloré en bleu par une solution d'iode N/3000 puis est dosé par spectrophotométrie à 580 nm. L'activité de l'amylase correspond à la masse d'amidon hydrolysé pendant 30 min à 37°C par le volume d'homogénat et se calcule par la relation suivante:

$$U_w \text{ ml}^{-1} = (DO \text{ blanc} - DO \text{ réactif}) / DO \text{ blanc} \times Q \times R \times d$$

Q = quantité d'amidon de l'essai

R = coefficient rapportant le volume d'homogénat prélevé à 1 ml

d = dilution de l'homogénat

3.1.3. La phosphatase alcaline (PA, Bessey et al., 1946)

2 ml de milieu réactionnel contenant du tampon carbonate-bicarbonate et du p-nitrophényl phosphate (PNPP), substrat spécifique de l'enzyme, sont ajoutés à 200 µl d'extrait enzymatique. La cinétique de dégradation du substrat est suivie au spectrophotomètre à 407 nm. L'activité enzymatique est obtenue par la relation suivante:

$$U \text{ ml}^{-1} = (\Delta\text{DO}/\text{min})/\varepsilon \times 2.5/v$$

ε = coefficient d'extinction µmolaire du substrat

v = volume de l'homogénat en ml

3.1.4. *La leucine-amino-peptidase (LAP)*

Ce dosage correspond à la mesure de dégradation du substrat spécifique de l'enzyme, le L-Leucine p-nitroanilide (0.1 M dans du DMSO), en présence de tampon phosphate (80 mM, pH 7) et à 410 nm.

$$U \text{ ml}^{-1} = (\Delta\text{DO}/\text{min})/\varepsilon \times 2.5/v$$

ε = coefficient d'extinction µmolaire du substrat

v = volume de l'homogénat en ml

3.1.5. *La leucine-alanine (Leu-ala; Nicholson et Kim, 1975)*

Le dosage repose sur la dégradation du substrat spécifique de l'enzyme en présence du milieu réactif composé d'o-dianisidine (10 g l⁻¹), L-aminooxidase (90 mg), Horshadish peroxidase (2 mg) et d'une solution tampon tris-HCl (50 mM, pH 8). 25 µl d'homogénat sont ajoutés à 1 ml de réactif et 0,5 ml de substrat, le tout étant incubé à 37°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée par 0,74 ml d'acide sulfurique 50% puis l'absorption est lue au spectrophotomètre à 530 nm contre un échantillon sans substrat.

$$U \text{ ml}^{-1} = (\text{DO lue} \times 40)/(\text{C} \times \text{t})$$

C = concentration

t = 20 min

3.1.6. *La phospholipase A2 (PLA2 ; Tojo et al, 1993)*

La PLA2 pancréatique est dosée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La PLA2 intervient dans la digestion des phospholipides en coupant les liaisons entre l'acide palmitique (C16) et l'acide oléique (C18). La technique de l'HPLC repose sur l'extraction de ces acides gras libérés. Les produits d'hydrolyse doivent être associés à l'ADAM (9-anthryldiazométhane), un fluorophore, pour être détectés par l'appareil: c'est la dérivatisation. La quantification des acides gras libérés se fait par lecture à la longueur d'onde de l'ADAM (254 nm). Une gamme étalon contenant différentes quantités connues de C16 et C18 sont associés aux échantillons dans l'appareil. Enfin, un étalon interne (l'acide heptadécanoïque C17) est également ajouté aux échantillons pour tenir compte des pertes pendant le passage dans l'appareil.

3.1.7. *La lipase (Iijima et al., 1998)*

L'activité de la lipase pancréatique a été déterminée au spectrophotomètre par une technique d'hydrolyse du ρ -nitrophényl myristate. Chaque dosage (0,5 ml) contenait 0.53 mM de ρ -nitrophényl myristate, 0,25 mM de 2-méthoxyéthanol, 5 mM de cholate de sodium et 0,25 mM de Tris-HCL (pH 9,0). 5 à 10 μ l d'homogénat ont été ajoutés au substrat puis le tout incubé 15 min à 37°C. La réaction a été stoppée par l'ajout de 0,7 ml d'une solution acétone-n-heptane (5 :2, v/v). La mixture a été vigoureusement mixée puis évaporée au speedvac. L'absorbance a été mesurée à 405 nm. Une unité d'activité enzymatique est définie comme 1 μ mol de ρ -nitrophényl myristate libérée par min.

3.2. *Indices de développement*

3.2.1. *La sécrétion*

L'activité enzymatique du segment pancréatique rend compte de la synthèse alors que celle du segment intestinal rend compte de la sécrétion. Le rapport entre ces deux activités correspond à l'efficacité de la sécrétion ou taux de sécrétion spécifique (Zamboninno et Cahu, 2001):

$$S = I/(I+P) \%$$

I = Activité du segment intestinal

P = Activité du segment pancréatique

3.2.2. La maturation du tractus digestif

La Leu-Ala est une enzyme caractéristique du cytosol des entérocytes. Le rapport des activités segmentales, enzyme de la bordure en brosse/Leu-Ala, permet de mesurer l'importance de la digestion extracellulaire ou membranaire par rapport à la digestion intracellulaire ou cytosolique. La digestion extracellulaire se met en place tardivement au cours du développement larvaire et une forte activité de la digestion extracellulaire reflète la maturation du tractus digestif.

3.3. Composition biochimique

3.3.1. Des larves

Les larves ont été broyées à 0°C au Polytron® (PT 2100 Bioblock®). Une portion représentative (~1g) a été gardée pour l'analyse des lipides et ~3g ont été utilisés pour la mesure du poids sec (105°C pendant 24h). L'analyse des lipides a été faite sur un répliquas par échantillon. Les lipides totaux (LT) ont été extraits selon Folch et al (1957) avec le chloroforme remplacé par du dichlorométhane et avec l'acide tricosanoïque 23:0 ajouté comme standard interne de quantification. Les LT ont été fractionnés sur les colonnes en silice (Sep-Pack, Waters®) : les LN ont été obtenus par ajout de 6 ml de chloroforme-méthanol (98 :2 v/v) et les PL par 6 ml de méthanol (Marty et al., 1992). Les esters méthylés d'acides gras (FAME) des LT, NL et PL ont été préparés par transméthylation (2 ml de 1% H₂SO₄ dans du méthanol) et 1 ml de toluène a été ajouté au LN. Toutes les fractions ont été placées une nuit à 50°C. Les FAME neutralisés avec du KHCO₃ à 2% ont été extraits deux fois avec 5 ml d'hexane-diethyl ether (1 :1).

3.3.2. Des juvéniles

Les poissons congelés entiers ont été grossièrement et rapidement broyés au mixeur Hobart ® (pour garder une température froide) puis, plus finement grâce au Polytron ® (PT 2100 Bioblock ®). Une portion représentative (~5g) a été gardée pour l'analyse des lipides et ~3g ont été utilisés pour la mesure du poids sec (105°C pendant 24h).

Concernant R1, l'analyse des lipides a été faite sur des triplicats par échantillon en début (J151) d'expérience et sur des duplicats en fin d'expérience (J211). Concernant R2, elle a été faite sur des duplicats au point initial (J83) et au point final (J118).

Les lipides totaux (LT) ont été extraits selon Folch et al (1957) avec le chloroforme remplacé par du dichlorométhane et avec l'acide tricosanoïque 23:0 ajouté comme standard interne de quantification. Les lipides neutres (LN) et lipides polaires (LP, phospholipides) ont été séparés selon Juaneda et Roquelin (1985). Les LT ont été fractionnés sur les colonne en silice (Sep-Pack, Waters ®) : les LN ont été obtenus par ajout de 30 ml de chloroforme-méthanol (98 :2 v/v) et les PL par 30 ml de méthanol (Marty et al., 1992). Les esters méthylés d'acides gras (FAME) des LT et NL ont été préparés par saponification puis méthylation, alors que les FAME des PL ont été obtenus par transméthylation avec de l'acide sulfurique dans du méthanol (1% H₂SO₄ dans du méthanol).

Tous les FAME (larves et juvéniles) ont été séparés par chromatographie à gaz (Perkin-Elmer® autosystem GC, équipé avec une colonne capillaire 30mx22mm BPX 70 0.25, injecteur split-splitless et hélium comme gaz porteur). Les températures d'injection et de détection étaient respectivement 220 et 260°C. La température initiale du four était de 50°C, puis a progressivement augmenté jusqu'à 180°C par palier de 15°C.min⁻¹ maintenu chacun pendant 5 min, puis jusqu'à 220°C par palier de 3°C.min⁻¹. L'acquisition de données a été faite par la connexion du chromatographe à un ordinateur PE Nelson. Les FAME ont été individuellement identifiés par comparaison de leur taux de rétention par rapport au standard. Chaque chromatogramme a été visuellement contrôlé sur l'ordinateur en utilisant une ligne d'amplification de base dans le but de vérifier la forme du pic ainsi que la qualité de l'intégration par le programme de l'ordinateur. La composition en acides gras est exprimée en pourcentage par rapport aux acides gras totaux chez les larves.

L'analyse des lipides a été réalisée sur les aliments expérimentaux en dupliques pour chaque échantillon selon la méthode de l'AOAC : cendres (7h à 550°C), lipides et protéines selon la méthode de DUMAS (NA 2000®, Nx6.25).

3.4. Quantification des ARNm

3.4.1. Criblage de la banque de données et détermination des amorces

Pour chaque gène candidat, une recherche a été effectuée dans la banque de données GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) afin d'identifier les séquences géniques annotées et déposées comme des ADNc partiels ou complets de ces gènes. Pour chaque gène, les séquences nucléotidiques et protéiques des ADNc de mammifères et de poissons ont été alignés ce qui a permis d'identifier des zones conservées au cours de l'évolution au sein de ces organismes et de dessiner ainsi des amorces correspondant à deux zones conservées du gène, l'une en 5', l'autre en 3'. Un couple d'amorce de 150 à 200 paires de bases (pb) a été défini pour chaque gène d'intérêt. Ces amorces ne doivent pas être complémentaires entre elles ni contenir de structures secondaires. En outre, elles doivent avoir un maximum de G et C dans leur séquence, l'idéal étant de 60%. Ces amorces ont été synthétisées par Eurogentec®. Les séquences des amorces de chaque gène utilisé sont présentées dans la table 1.

Table 1 : Séquences sens et antisens des amorces de chaque gène d'intérêt utilisé

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (3'-5')
$\Delta 6D$	GCCCTATCATCACCAACACC	ACAGCACAGGTAGCGAAGGT
Lipase	TGGATGGCATGATGGAGA	CTGCAGCAGGTGGGCTAT
PLA ₂	TCCTGTGTGTGATGCCTGAT	TCTCGTCGCAGTTGTAGTCG
PPAR α	ACCTCAGCGATCAGGTGACT	AACTTCGGCTCCATCATGTC
PPAR β	GCTCGGATCTGAAGACCTTG	TGGCTCCATAACCAACCACT
PPAR γ	CAGATCTGAGGGCTCTGTCC	CCTGGGTGGGTATCTGCTTA

3.4.2. Extraction des ARNm

Les ARN totaux (ARN_{tot}) ont été extraits au TrizolTM et à froid. Environ 150 mg de segments intestinaux ont été broyés au Polytron® PT2100 (Polytron Bioblock®) dans 1 ml de Trizol. Le Trizol permet d'inactiver les ribonucléases exogènes et endogènes. Les segments ont été incubés 5 min à température ambiante afin de dissocier les protéines des ARN_{tot}. La dissociation complète des complexes nucléoprotéiques a nécessité l'ajout de 0,6 ml de chloroforme suivi d'une incubation de 2 min à température ambiante. Après une centrifugation de 15 min à 12000g, la phase aqueuse a été récupérée et les ARN_{tot} précipités par l'ajout de 1,5 ml d'isopropanol. Une seconde centrifugation (10 min à 12000g) a permis de les récupérer sous forme d'un culot gélatineux séché puis lavé à deux reprises par de l'éthanol à 75%. Ce culot a été séché sous vide puis dissous dans de l'eau DEPC (eau distillée sans

RNase) avant d'être analysé au spectrophotomètre à deux longueurs d'onde (260 et 280 nm). Le rapport entre les deux densités optiques lues (DO_{260}/DO_{280}) doit être compris entre 1,6 et 2. Il permet d'évaluer le degré de pureté du pool d'ARN_{tot} extrait (à 260 nm) et la possible contamination par des protéines (à 280 nm). La concentration d'ARN_{tot} en $\mu\text{g ml}^{-1}$ a ensuite été calculée par la relation:

$$[\text{ARN}] = DO_{260} \times 40 \times \text{dilution}$$

3.4.3. *Transcription reverse des ARNm en ADNc*

La transcription reverse (RT) du pool d'ARN_{tot} en un brin d'ADNc complémentaire ne concerne que les ARN messager (ARNm) puisque l'amorce initiant la transcription est un nucléotide dT s'hybridant spécifiquement avec la queue poly-A de l'extrémité 3' des ARNm. La RT est réalisée grâce au kit Quantitect Reverse Transcription (QIAGEN® GmbH, Hilden, Germany). Ce kit agit en deux étapes: dans un premier temps, l'ADN génomique est éliminé en ajoutant 2 μl de tampon et 7 μl d'eau sans RNase au 5 μl d'ARN_{tot} ($0.2\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$). Les tubes sont ensuite passés dans un appareil PCR classique (Polymerase Chain Reaction Stratagène®) pendant 2 min à 42°C. La seconde étape est la RT proprement dite: 1 μl de transcriptase RT, 4 μl de tampon RT quantiscript ainsi qu'1 μl de mélange d'amorces RT sont ajoutés à la solution obtenue à l'issue de la première étape. Les tubes sont de nouveau passés dans l'appareil PCR 15 min à 42°C puis 3 min à 95°C. Ils sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la quantification des gènes.

3.4.4. *La PCR en temps réel*

La quantification des ADNc passe par l'amplification des fragments cibles en utilisant des amorces spécifiques. La PCR en temps réel permet de suivre à chaque cycle la quantité d'amplicons synthétisés par la Taq polymérase à partir des amorces spécifiques sens et antisens qui entourent le gène cible. Cette méthode a été réalisée sur un appareil iCycler iQ™ (Bio-Rad® Laboratories Inc.).

Les gènes quantifiés sont le gène codant pour la lipase, la PLA2, la delta-6 désaturase ($\Delta 6\text{D}$) et les Peroxisome Proliferator-Activated Receptors PPAR α , PPAR β , PPAR γ . En plus des gènes qui nous intéressent, il est nécessaire de quantifier un gène dont l'expression est connue

comme étant constante dans l'organe étudié. Ce gène de ménage ou "house-keeping gene" permet d'exprimer la quantité d'ARNm de manière relative et ainsi de s'affranchir des éventuelles différences de matériel cellulaire. Le gène du facteur d'élongation-1 EF1 a été utilisé dans cette étude. Pour chacun des gènes étudiés, les analyses en PCR quantitative ont été faites dans un volume total de 15 µl contenant 5 µl d'ADNc (dilution 10^{-2} pour la $\Delta 6D$ et 10^{-3} pour les autres gènes), 7,5 µl de mix (Kit Bio-Rad contenant de la fluorescine), 0,5 µl de chacune des deux amorces et 1,5 µl d'eau stérile. La dilution d'ADNc utilisée a été choisie en réalisant une gamme en triplicats de 10^{-1} à 10^{-5} (Fig.6). Cette gamme est également placée dans la plaque PCR lors de la quantification de chacun des gènes. Deux blancs contenant de l'eau stérile à la place de l'ADNc sont également effectués afin de vérifier la pureté de la méthode.

L'étape initiale de la PCR en temps réel consiste en une incubation de 13,5 min à 95°C qui active l'ADN polymérase. Cette incubation est suivie de 45 cycles de PCR. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C et une phase d'hybridation/élongation de 1 min à 60°C.

Les valeurs de CT (Cycle Threshold, cycle seuil) correspondent au nombre de cycles où l'émission de fluorescence mesurée en temps réel dépasse la limite seuil du bruit de fond : la quantité d'amplicon est significative au moment où elle commence à sortir du bruit de fond. Le CT doit être défini suffisamment bas pour être encore en phase exponentielle et ne pas avoir atteint le plateau d'utilisation de tous les composants du mélange, mais suffisamment haut pour être au dessus du bruit de fond. Ainsi, le CT est déterminé après avoir ôté le bruit de fond (PCR baseline subtracted) et avoir placé la courbe en log. Il correspond à l'intersection entre le milieu de la phase exponentielle déterminée à l'œil nu et l'axe des abscisses (Fig.4). L'analyse des courbes de fusion (Fig.5) et le séquençage des produits synthétisés au cours de la PCR (MilleGen®, Labège, France) a permis de vérifier que seul un amplicon était amplifié. Les courbes standard de chaque gène ont été tracées en reliant les valeurs de CT au \log_{10} de 5 dilutions différentes (réalisées en triplicats) des échantillons d'ADNc (Fig.6). L'efficacité E de la PCR en temps réel pour chaque gène a été déterminée à partir de la pente des droites données par le logiciel Bio-Rad selon l'équation $E = 10^{(-1/\text{pente})}$. Le rapport de l'expression relative des gènes a été calculé par le logiciel REST© (REST-22-5-2002 ; Pfaffl et al., 2002) pour le chapitre 1 (parties 1 et 2) et par Excel pour le chapitre 2 partie 2. Le rapport est basé sur l'efficacité de la PCR et sur le CT d'un échantillon par rapport au contrôle. Il est exprimé par rapport au gène de référence EF1 et rend compte du facteur d'expression du gène étudié:

$$\text{Rapport} = \frac{[(E_{\text{gène}})^{\Delta CT_{\text{gène}} (\text{contrôle-échantillon})}]}{[(E_{\text{EF1}})^{\Delta CT_{\text{EF1}} (\text{contrôle-échantillon})}]}$$

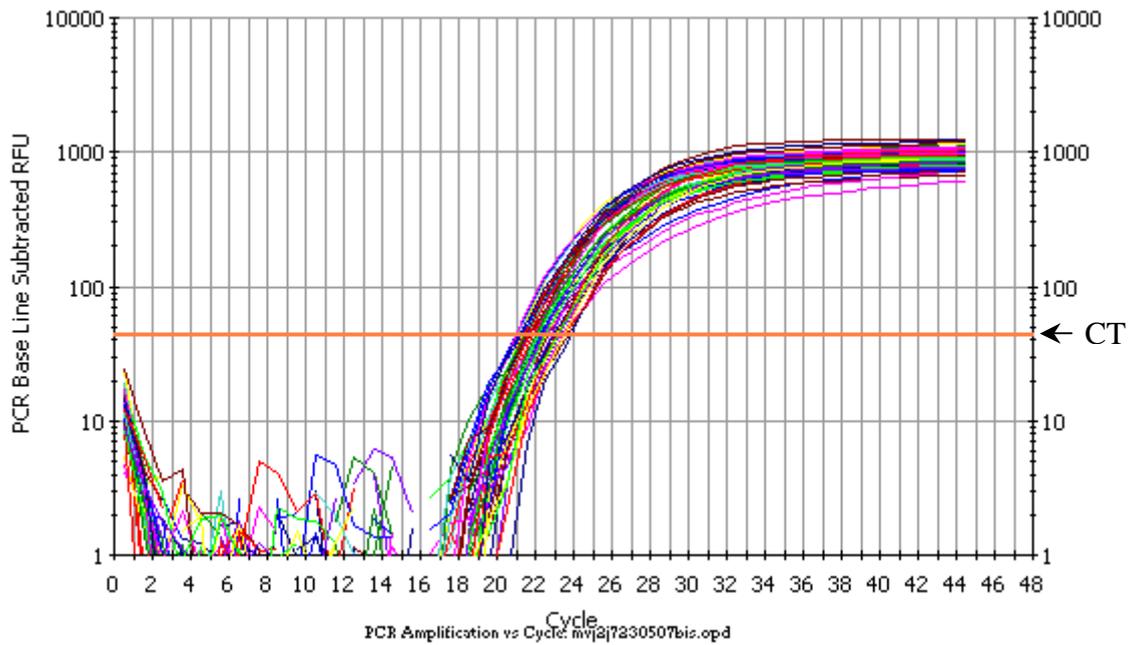


Fig.4. Courbe PCR en temps réel obtenue après amplification de la delta-6 désaturase sur différents échantillons d'ADNc (45 cycles). La ligne CT a été déterminée

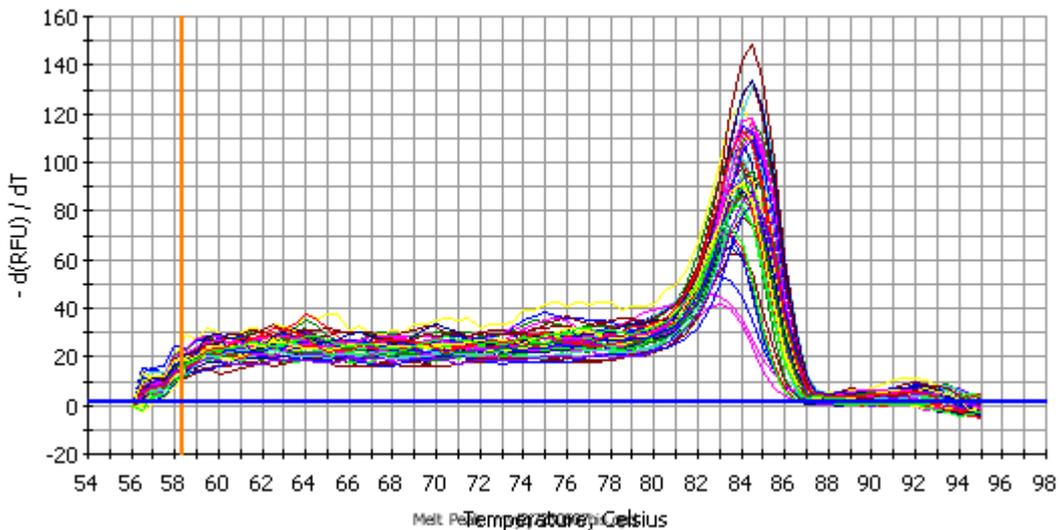


Fig.5. Courbe de fusion après amplification de la delta-6 désaturase sur différents échantillons d'ADNc (45 cycles). Les variations de fluorescence ont été exprimées en fonction de la température (-dRFU/dt).

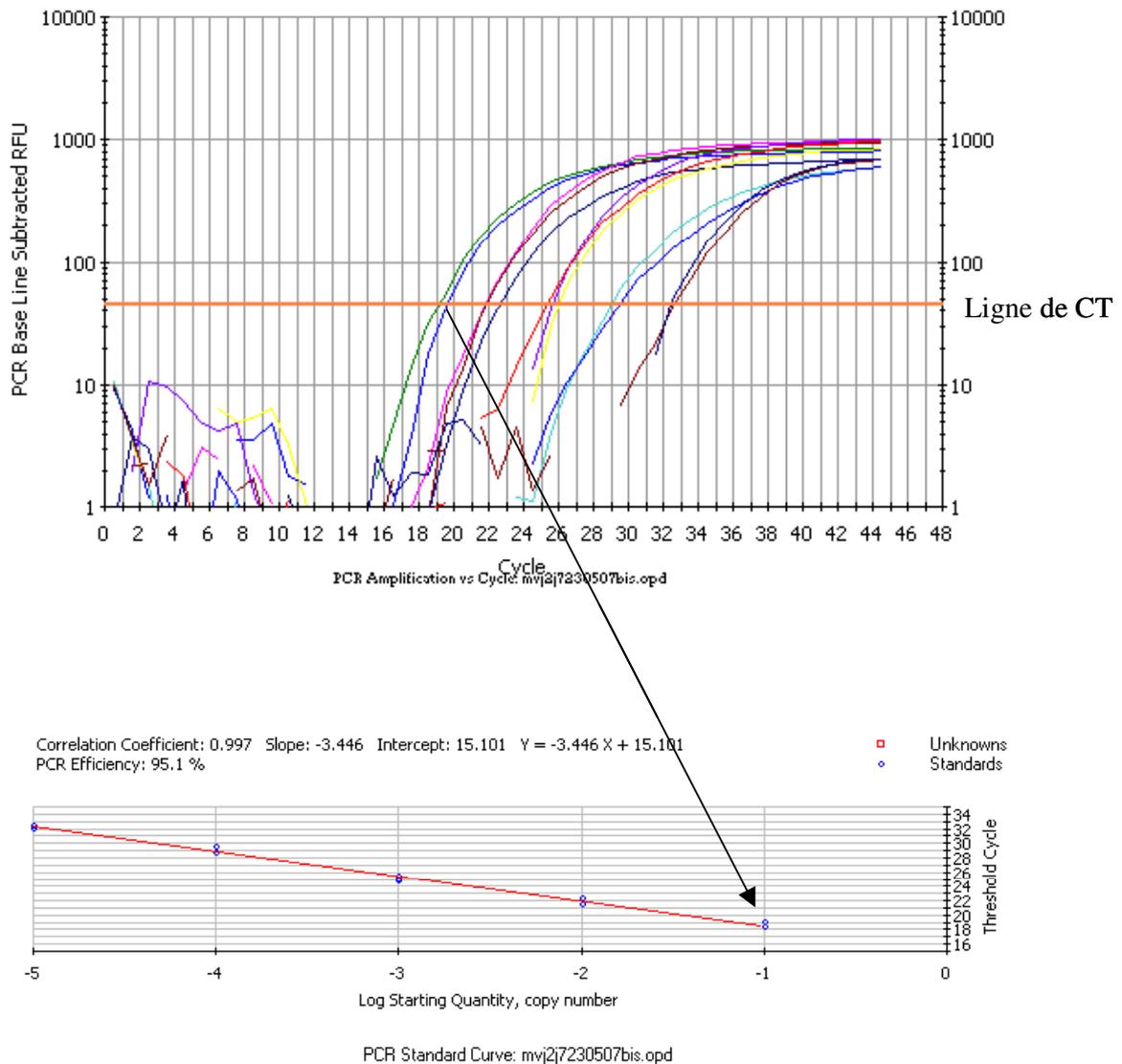


Fig.6. Gamme étalon (courbe standard) obtenue à partir de différentes dilutions (10^{-2} à 10^{-4}) d'ADNc pour le gène de la delta-6 désaturase.

4. Analyses statistiques

Tous les résultats sont donnés avec la moyenne \pm erreur standard. Avant d'appliquer les tests statistiques grâce au logiciel Statistica®, les données en pourcentage ont été transformées en racine carrée de l'arc sinus, et les données de performance de croissance, de niveau d'ARNm et de composition en acides gras ne respectant pas l'homogénéité des variances ont été transformées en Ln.

4.1. Les performances de croissance

L'effet du conditionnement larvaire C1 (régime alimentaire x température) sur les performances de croissance des larves et des juvéniles a été testé par une ANOVA à deux voies après avoir testé l'homogénéité des variances par un test de Chi-Deux.

L'effet du conditionnement larvaire C2 (régime alimentaire) sur les performances de croissance des larves et des juvéniles a été testé par une ANOVA à une voie après avoir testé l'homogénéité des variances par un test de Levene.

L'effet du conditionnement larvaire sur le gain de poids des juvéniles R1 et R2 ainsi qu'entre les groupes contrôles et les groupes expérimentaux a été testé en comparant les courbes de croissance par une ANOVA à deux voies (R1, effet régime x température larvaire) ou une voie (R2, effet régime).

Le test post-hoc Newman-Keuls a été utilisé pour des différences significatives à $P < 0,05$.

4.2. Les activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont exprimées en Unités (ou milli-Unités) et correspondent au nombre de micromoles de substrat hydrolysé par minute à une température donnée. Les activités exprimées par segment ou par mg de protéines correspondent respectivement à l'activité segmentale et l'activité spécifique. L'effet du conditionnement larvaire sur les activités enzymatiques a été testé par une ANOVA à deux voies après avoir testé l'homogénéité des variances par le test de Levene. Le test post-hoc Newman-Keuls a été utilisé pour des différences significatives à $P < 0,05$.

4.3. Quantification des ARNm

Concernant l'expérience 1 (C1 et R1), les différences statistiques entre le niveau d'ARNm du groupe contrôle et ceux des échantillons ont été évaluées par un test de permutations aléatoires du logiciel REST© dans lequel 2000 répartitions aléatoires sont faites et les différences significatives sont déterminées à $P = 0,05$ (Pfaffl et al., 2002). Ce logiciel permet de s'affranchir du paramètre de normalité de distribution des données. Il s'appuie sur le mode de distribution aléatoire des échantillons. D'autre part, il permet de comparer plusieurs gènes à la fois (jusqu'à 16) avec plusieurs points de répliquas par gène.

Le logiciel REST® présentant toutefois des limites d'utilisation (un seul facteur de comparaison, erreurs standards non disponibles avec la version utilisée), les données obtenues lors de la seconde expérience (C2 et R2) ont été statistiquement comparées en utilisant une ANOVA à deux voies (régime alimentaire et âge) suivie d'un test de Newman Keuls quand les différences significatives apparaissaient ($P < 0,05$). Préalablement au test ANOVA, l'homogénéité des variances a été testée par le test du Chi-Deux. Une ANOVA à une voie, précédée d'un test d'homogénéité des variances de Levene, a également été utilisée pour tester l'effet statistique du régime alimentaire sur le niveau d'ARNm des gènes étudiés. Un test post-hoc de Newman Keuls a été utilisé quand les différences significatives apparaissaient ($P < 0,05$).

4.4. La composition biochimique

L'effet du conditionnement larvaire sur la teneur en acides gras des larves et des juvéniles ainsi qu'entre les groupes contrôles et les groupes expérimentaux a été testé par une ANOVA à deux voies (R1, effet régime x température larvaire) ou une voie (R2, effet régime). L'homogénéité des variances a été préalablement testée par un test du Chi-Deux (R1) ou de Levene (R2). Le test post-hoc Newman-Keuls a été utilisé pour des différences significatives à $P < 0,05$.

Title

Influence of a larval conditioning on the metabolic process of European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*).

Abstract

Worldwide supplies of fish oils and meals have reached their sustainable limits, forcing industries to look for alternative lipid sources for use in marine fish diets. As terrestrial animal products are prohibited, there is great interest in aquaculture to produce fish better able to utilise vegetable feedstuffs. Vegetable products are rich in 18 carbon fatty acids (C₁₈ FA) but do not contain C₂₀₋₂₂ n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA), such as ecosapentaenoic (EPA; 20:5n-3) and docosahexaenoic acids (DHA; 22:6n-3).

The aim of this study was to know if it would be possible to apply a metabolic programming using nutritional conditioning during early larval stages, as already described in mammals, in order to stimulate the FA desaturation pathways of n-3 HUFA synthesis in marine fish.

For the first experience (E1), four replicated groups of larvae were reared at 16 or 22°C and fed microparticulated diets from mouth opening (day 6 post-hatching d-6) to d-45. Two diets with a low (LH) or high (HH) HUFA content were tested: 0.8 and 2.2% EPA+DHA on dry matter basis. The larval period was followed by an intermediate period of three months during which the four groups were separately held at 19°C and fed on a commercial diet with 2.7% EPA+DHA. Following this period, the capacity of juveniles to adapt to a HUFA-deprived diet (0.5% EPA+DHA) was tested during 60 days (19°C). For the second experience (E2), four replicated groups of sea bass larvae were fed XH (3.7% EPA+DHA), HH (1.7%), LH (0.7%) or XLH (0.5%) diets from d-6 to d-45. After a subsequent one-month period feeding a commercial diet (2.7% EPA+DHA), the capacity of the four initial groups to adapt to an n-3 HUFA-Restricted diet (0.3% EPA+DHA) was tested for 35 days.

Results obtained at the end of the two larval period indicated a significant higher delta-6 desaturase mRNA level ($\Delta 6D$, rate-limiting enzyme responsible of the first step of the fatty acid desaturation pathways for the n-3 HUFA synthesis) in larvae fed a low dietary HUFA n-3 content (0.8 ; 0.7 et 0.5% EPA+DHA) than in others. This indicated a positive modulation of the $\Delta 6D$ gene transcription by low dietary n-3 HUFA levels. However, this stimulation of desaturation pathways did not allow an enough HUFA production in larvae, as a deficiency in DHA in phospholipides (PL) was observed. A lower growth rate was also observed. No significant effect of larval nutritional conditioning was observed in juveniles, but E1 showed a transient increase in mRNA level, over the intermediate period. It also showed a low but significant increase in DHA content in PL. The second experience E2 showed a persistent mRNA increase in pre-conditioned fish during the juvenile period, but similar DHA content in PL in all groups.

Our studies clearly showed that it was possible to influence fatty acid desaturation pathways for HUFA synthesis, using a nutritional conditioning during larval stage, even if no noticeable higher HUFA synthesis was measured in pre-conditioned fish. This work also brought new findings suggesting the involvement of PPARs in the $\Delta 6D$ mRNA level stimulation. The enzymatic $\Delta 6D$ assay was performed and gave preliminary results about the existence of post-transcriptional regulation of the $\Delta 6D$ gene.

The originality of results lead to better investigate mechanisms involved in desaturation pathways in response to a low HUFA dietary content, as well as the mechanisms involved in the metabolic programming in fish.

Key words

Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, n-3 HUFA, metabolic programming, delta-6 desaturase, aquaculture

Orientation des processus métaboliques chez les juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) par un conditionnement au stade larvaire.

Résumé

Cette thèse s'inscrit dans un contexte de substitution des produits de la mer par les produits végétaux dans l'aliment des poissons marins d'aquaculture. Même s'il ne permettent pas de couvrir totalement les besoins en acides gras polyinsaturés (HUFA n-3, notamment EPA 20:5n-3 et DHA 22:6n-3), les produits végétaux constituent actuellement la seule alternative en Europe.

Le but de l'étude est de voir si par le concept de programmation métabolique déjà décrit chez des mammifères, il est possible d'orienter les processus physiologiques des juvéniles de bar par un conditionnement larvaire avec un régime pauvre en HUFA, et de stimuler leurs capacités de désaturation des acides gras pour la synthèse d'HUFA n-3, afin de produire des poissons pouvant mieux utiliser les matières premières végétales.

Lors d'une première expérience (E1), quatre groupes de larves ont été élevés à 16 ou 22°C et nourris de l'ouverture de la bouche (Jour 6) jusqu'à la fin de l'ontogénèse (J-45) avec deux aliments composés : LH (« Low HUFA » : 0,8% EPA+DHA) et HH (« High HUFA » : 2,2% EPA+DHA). Cette période larvaire a été suivie d'une période intermédiaire de trois mois pendant laquelle les quatre groupes étaient élevés séparément à 19°C et nourris avec un aliment commercial (2,7% EPA+DHA). La capacité des juvéniles à s'adapter à un aliment carencé (0,5% EPA+DHA) à été testée pendant 60 jours (19°C). La seconde expérience (E2) a été construite sur le même modèle que la première pour tenter d'amplifier la réponse obtenue, en utilisant une seule température d'élevage (19°C) et une gamme plus étendue de teneur en HUFA n-3 dans quatre aliments composés : XH (3,7% EPA+DHA), HH (1,7%), LH (0,7%) et XLH (0,5%) pour les larves de J-6 à J-45. Cette période larvaire a été suivie d'une période intermédiaire d'un mois pendant laquelle les quatre groupes étaient élevés séparément et nourris avec un aliment commercial (2,7% EPA+DHA). La capacité d'adaptation à un régime restreint (0,35% EPA+DHA) à été testée pendant 35 jours.

Les résultats obtenus lors des deux phases larvaires ont montré qu'en fin d'ontogénèse (J-45), le niveau d'ARN de la delta-6 désaturase ($\Delta 6D$, enzyme responsable de la première étape de formation des HUFA n-3 à partir d'acides gras précurseurs présents dans l'aliment) chez les groupes ayant été nourris avec les aliments déficients en HUFA n-3 (0,8 ; 0,7 et 0,5% EPA+DHA) était significativement plus élevé que chez les autres. Ceci indique que les régimes à faibles teneurs en HUFA n-3 stimuleraient la transcription du gène de la $\Delta 6D$ chez les larves. Cependant, cette stimulation de la désaturation n'a pas été suffisante puisqu'une déficience en DHA dans les phospholipides (PL), et des retards de croissance ont été observés chez ces individus. Le conditionnement larvaire n'a pas significativement affecté les performances de croissance des juvéniles mais E1 a montré une augmentation du niveau d'ARN de la $\Delta 6D$ transitoire chez les juvéniles pré-conditionnés au stade larvaire avec un aliment déficient en HUFA, ainsi qu'une légère augmentation de la teneur en DHA des PL. L'expérience E2 a mis en évidence une augmentation du niveau d'ARN persistante jusqu'à la fin de l'expérience, mais une teneur en DHA similaire dans les PL.

Cette étude a démontré qu'il était possible de stimuler les mécanismes de désaturation des acides gras chez les juvéniles en utilisant un conditionnement larvaire dès les plus jeunes stades, bien que cette stimulation n'ait pas permis une production notable d'HUFA pour compenser le faible apport par l'aliment. Cette étude a également mis en évidence le rôle des peroxisome proliferator activated-receptors (PPAR) dans la régulation de la $\Delta 6D$. La technique de dosage enzymatique de la $\Delta 6D$ a été mise au point au cours de la thèse et a permis d'obtenir des résultats préliminaires concernant l'existence de régulations post-transcriptionnelles de la $\Delta 6D$. L'originalité des résultats ouvrent des perspectives de travail pour mieux comprendre les mécanismes de désaturation stimulés par la carence en HUFA n-3, et les mécanismes de programmation métaboliques mis en jeu chez le bar.

Mots clés : Bar, *Dicentrarchus labrax*, HUFA n-3, programmation métabolique, delta-6 désaturase, aquaculture