

Université de Bretagne Occidentale

MEMOIRE PRESENTE POUR L'OBTENTION D'UNE
HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES
Section 66 – Physiologie

Nutrition, digestion et développement des larves de crevettes et poissons marins

Soutenu le 22 juin 2006
par

Chantal CAHU
Cadre de recherche, Ifremer

Devant le jury composé de :

| Nom | Titre | Etablissement |
|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Marcel Le Pennec (Président) | Professeur | Univ. Bretagne Occidentale |
| Jean Laroche (Rapporteur) | Professeur | Univ. Bretagne Occidentale |
| Michel Mathieu (Rapporteur) | Professeur | Univ. Caen Basse Normandie |
| Stéphane Pansérat (Rapporteur) | Chargé de recherche | INRA, St-Pée |
| Jeannine Person (Examineur) | Cadre de recherche | Ifremer, Brest |
| Pierre-Yves Le Bail (Examineur) | Directeur de recherche | INRA, Rennes |

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Liste des publications | 3 |
| A- Publications dans revues à comité de lecture | 3 |
| B- Articles dans ouvrages | 7 |
| C- Articles dans revues sans comité de lecture | 7 |
| D- Communications orales ou posters dans les colloques avec publication des actes | 8 |
| E- Articles ou communications à vocation de transfert | 10 |
| F- Brevet | 11 |
| G- Dépôts de séquences de gènes | 12 |
| H- Rapports de contrats CEE, FAO ou avec industriels | 14 |
| I- Rapports de mission | 18 |
| | |
| Recherches réalisées et encadrements d'étudiants | 17 |
| | |
| I-Nutrition des reproducteurs et qualité des œufs chez les crevettes Pénéides | 18 |
| 1- Contexte de l'étude..... | 18 |
| 2- Relation entre la capacité de développement des œufs et l'aliment des géniteurs | 19 |
| 3- Variations de la composition en lipides au cours du développement lécitotrophe | 19 |
| 4- Détermination de la concentration minimale d'acides gras polyinsaturés permettant le développement de l'œuf | 21 |
| 5- Besoins et rôle de la vitamine E chez les œufs de Pénéides en développement | 22 |
| 6- Besoin et rôle de la vitamine C | 23 |
| 7- Transfert des lipides et des vitamines de l'hépatopancréas et du muscle vers les ovaires | 24 |
| 8- Conclusion/Résumé | 24 |
| | |
| II- Digestion et nutrition chez les larves de poissons marins | 25 |
| 1- Contexte de l'étude | 25 |
| 2- Description de la mise en place des fonctions digestives et effet de l'aliment | 26 |
| 3- Besoins en protéines, lipides et phospholipides chez les larves de bar | 30 |
| 4- Comparaison de notre modèle avec d'autres espèces. Validation des hypothèses | 37 |
| 5- Formulation d'un aliment pour larves de poissons marins | 45 |
| 6- Conclusion/Résumé | 40 |

| | |
|--|---------------|
| III- Effet de la vitamine A et des acides gras longs polyinsaturés sur le développement de la larve de bar. Implication de la voie des rétinoïdes | 41 |
| 1- Contexte de l'étude | 41 |
| 2- Expression et localisation de certains gènes au cours du développement | 42 |
| 3- Effet du taux de vitamine A dans l'aliment sur le développement du bar | 45 |
| 4- Effet du taux d'AGLPI dans l'aliment sur le développement du bar | 45 |
| 5- Période de sensibilité à un régime contenant un excès de vitamine A ou d'AGLPI ... | 48 |
| 6- Conclusion/Résumé | 52 |
| Perspectives | 53 |
| I- L'effet des nutriments sur le développement squelettique des larves de poisson | 53 |
| 1- Effet des nutriments pendant la vie larvaire | 56 |
| 2- Effet de l'alimentation maternelle sur la descendance | 58 |
| II- Les sources alternatives de protéine et de lipide dans l'alimentation des poissons ... | 58 |
| III- Références | 60 |

Liste des publications

A- PUBLICATIONS DANS REVUES A COMITE DE LECTURE

- A54. Savoie A., Le François N., **Cahu C.**, Blier P.U., Andreassen I., 2006. Is protein digestion capacity a limiting factor of growth and survival of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*), a non-metamorphic aquaculture fish species? Aquaculture, in press.
- A53. Villeneuve L., Gisbert E., Moriceau J., **Cahu C.**, Zambonino Infante JL 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Brit. J. Nutr. 95: 676-686.
- A52. Villeneuve L., Gisbert E., Zambonino Infante JL., P. Quazuguel P., **Cahu C.**, 2005. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. Brit. J. Nutr. 94: 877-884.
- A51. Mai K, Yu H., Ma H., Duan Q., Gisbert E., JL Zambonino Infante and **Cahu C.**, 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. J. Fish Biol., 67: 1094-1106.
- A50. Villeneuve L., Gisbert E., Le delliou H., **Cahu C.**, Zambonino Infante JL., 2005. Dietary Levels of all-trans retinol affect retinoid receptors expression and skeletal development in European sea bass larvae. Br. J. Nutr., 93: 791-801.
- A49. Gisbert E., Villeneuve L., Zambonino-Infante JL., Quazuguel P., **Cahu C.**, 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for highly unsaturated fatty acid supply in European sea bass larval development. Lipids, 40 : 609-618.
- A48. Ma H., **Cahu C.**, Zambonino J., Yu H., Duan Q., Le Gall MM., Mai K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Aquaculture 245: 239-248.
- A47. Tovar-Ramírez D., Zambonino Infante J., **Cahu C.**, Gatesoupe F.J., and Vázquez-Juárez R., 2004. Dietary incorporation level of live yeast influences European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234: 415-427.
- A46. **Cahu C.**, Salen P. and M de Lorgeril M., 2004. Farmed fish and wild fish for the prevention of cardiovascular diseases: assessing possible differences in lipid nutritional value. Nutr. Metab. Cardiocasc. Dis. 14, 34-41.
- A45. Villeneuve L., Gisbert E., **Cahu C.**, Le Gall MM, Zambonino Infante J.L., 2004. Expression and localization of some retinoid receptors during european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) development. Aquaculture 242, 537-551.
- A44. Morais S., **Cahu C.**, Zambonino Infante JL., Robin J., Ronnestad I., Dinis M.T., Conceição LEC., 2004. Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Lipids 39: 449-458.
- A43. **Cahu C.**, 2004. Domestication et fonction nutrition chez les poissons. INRA Prod. Anim. 17 : 205-210.

- A42. **Cahu C.**, I. Rønnestad, V. Grangier and J. L. Zambonino Infante, 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238 : 295-308.
- A41. Yu H., Mai K., Duan Q., Ma H., **Cahu C.**, Zambonino J., Liufu Z., Tan B., Zhang W., Xu W., 2003. Feeding habits and growth performance of larvae and juveniles of *Pseudosciaena crocea* under artificial rearing conditions. *Journal Fishery Sciences of China*, (Zhongguo Shuichan Kexue) 10: 495-500.
- A40. Blair T., Castell J., Neil S., D'Abramo L., **Cahu C.**, Harmon P. and Ogunmoye K., 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* 225: 451-461.
- A39. Gamboa-Delgado J., Molina-Poveda C., **Cahu C.**, 2003. Study of the digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture research*, 34: 1403-1411.
- A38. **Cahu C.**, Zambonino Infante JL, Takeuchi T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
- A37. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L. and Barbosa V., 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.* 90 (1): 21-28.
- A36. **Cahu C.** and Zambonino J.L., 2002. Marine fish larval diet: Formulated diets will replace live food in marine fish larvae hatchery. *Global Aquaculture Advocate*, 5: 18-19.
- A35. Tovar D., Zambonino J., **Cahu C.**, Gatesoupe F.J., Vasquez-Juarez R. and Lésel R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204: 113-123.
- A34. Ribeiro L., Zambonino Infante JL, **Cahu C.** and Dinis M.T., 2002. Digestive enzyme profile of *Solea senegalensis* post-larvae fed Artemia and a compound diet. *Fish Physiol. Biochem.* 27: 61-69.
- A33. **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diet in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161-180.
- A32. Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 2001. Ontogeny of the intestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130: 477-487.
- A31. Grangier V., Zambonino Infante J.L., Quazuguel P. and **Cahu C.**, 2001. Effect of phospholipid, protein hydrolysate and vitamin content on formulated diets for marine fish larvae. *Larvi'01-Fish and Shellfish Larviculture Symposium*, C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds), European Aquaculture Society, Special publication N°30, Oostende, Belgium, 229-232.
- A30. Buchet V., Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 2000. Effect of lipid level in compound diet on the development of red drum (*Scianops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*, 184: 339-347.

- A29. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Corraze G. and Coves D., 2000. Dietary lipid level affects fatty acid composition and hydrolase activities of intestinal brush border membranes in sea bass. *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 165-172.
- A28. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Quazuguel P. and Le Gall M.M., 1999. Protein hydrolysate vs fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171: 109-119.
- A27. Ribeiro L., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.** and Dinis M.T, 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup. *Aquaculture*, 179: 465-473.
- A26. Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.*, 129: 1195-1200.
- A25. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Péres A., Quazuguel P. and Le Gall M.M., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture*, 161: 479-489.
- A24. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Escaffre A.M., Bergot P. and Kaushik S.J., 1998. Preliminary results on larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) without live food. Comparaison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 169: 1-7.
- A23. Péres A., Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 145-152.
- A22. **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for a compound diet feeding? *Aquaculture International*, 5: 151-160.
- A21. Escaffre A.M., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Mambrini M., Bergot P. and Kaushik S.J., 1997. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 153: 63-80.
- A20. Gatesoupe J., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.** and Quazuguel P., 1997. Early weaning of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture*, 158: 117-127.
- A19. Zambonino Infante J.L., **Cahu C.** and Péres A., 1997. Partial substitution of native protein by di- and tripeptides in diet improves sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *J.Nutr.*, 127: 608-614.
- A18. Péres A., **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 479-485.
- A17. Péres A., **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Le Gall M.M. and Quazuguel P., 1996. Amylase and trypsin response to dietary carbohydrate and protein level depends on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 237-242.
- A16. Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Péres A. Quazuguel P. and Le Gall M.M., 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture*, 139: 129-138.

- A15. **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 209-214.
- A14. **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 431-437.
- A13. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Le Gall M.M. and Quazuguel P., 1995. Early weaning of sea bass: are digestive enzymes limiting? *In Larvi' 95*, Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants (Editeurs). European Aquaculture Society, Special Publication, 24: 268-271.
- A12. **Cahu C.**, Cuzon G. and Quazuquel P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112A: 417-424.
- A11. Cuzon G., Guillaume J. and **Cahu C.**, 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. *Aquaculture* 124: 253-267.
- A10. Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109: 209-212.
- A9. **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109: 213-222
- A8. Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 299-408.
- A7. **Cahu C.**, Guillaume J., Stéphan G. and Chim L., 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture*, 126: 159-170.
- A6. **Cahu C.**, Villette M., Quazuquel P. and Guillaume J., 1993. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid and vitamin E supplementation in broodstock feed on reproduction of *Penaeus indicus*. *In Fish Nutrition in Practice*. S. Kaushik and P. Luquet (Editeurs). Ed. INRA, Les Colloques, 61: 589-598. Paris, France.
- A5. **Cahu C.**, Fakhfakh M. and Quazuguel P., 1991. Effect of dietary alpha-tocopherol on reproduction of *Penaeus indicus*. *In Larvi' 91*, Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (Editeurs). European Aquaculture Society, Special Publication 15: 242-244, Gent, Belgium.
- A4. Alvarez M., **Cahu C.** and Stephan G., 1989. Teneur en alpha-tocophérol des oeufs et des organes de reproducteurs de *Penaeus indicus*. *Océanis*, 15: 553-560.
- A3. **Cahu C.** and Quazuguel P., 1989. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. *Aquaculture Europe 89'*. R. Billard and N. De Pauw (Editeurs). European Aquaculture Society, Special publication 10: 45-46. Bredene, Belgium.

- A2. **Cahu C.**, 1987. Besoins nutritionnels des larves de crevettes Pénéides: techniques actuelles de production en éclosérie. *Océanis*, 13: 167-177.
- A1. Cuzon G., **Cahu C.**, Aldrin J.F., Messenger J.L., Stephan G. et Mevel M., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 410-42.

B- ARTICLES DANS OUVRAGES

- B6. **Cahu C.** 2004. Les facteurs nutritionnels influençant la qualité des larves et post-larves de crevettes pénéides . In Styli 2003, trente ans de crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Goarant C., Harache Y., Herbland A et Mugnier C., editeurs. Editions IFREMER 38 : 93-98.
- B5. Muller-Feuga A., Robert R., **Cahu C.**, Robin J and Divanach P., 2003. Uses of microalgae in aquaculture. In Live feeds in aquaculture, JG Stottrup and LA McEvoy editors, Blakwell Science, Oxford, UK: 253-299.
- B4. **Cahu C.**, 2003. La campagne de Sicile. In Sous toutes les latitudes, France Aquaculture, 10 ans d'aventures, J. Perrot Editeur, Edition France Aquaculture, France, 77-78.
- B3. **Cahu C.**, 1999. Ontogénèse, besoins nutritionnels et alimentation des larves de crevettes Pénéides. In Alimentation des poissons et des crustacés. J.C. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot et R. Métailler (Editeurs). Editions INRA, 313-323.
- B2. Gatesoupe J., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.** et Bergot P., 1999. Physiologie digestive des larves de poisson. In Alimentation des poissons et des crustacés. J.C. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot et R. Métailler (Editeurs). Editions INRA, 249-263.
- B1. **Cahu C.**, 1987. La nutrition des larves de crustacés. In La Nutrition des Crustacés et des Insectes. CL. Léger (Editeur). Editions CNERNA, Paris, 37-56.

C- ARTICLES DANS REVUES SANS COMITE DE LECTURE

- C6. **Cahu C.**, 2005. Progress in fish larval nutrition in Ifremer. *Aquafeeds: Formulation and Beyond* 2: 6.
- C5. Zambonino Infante JL., **Cahu C.**, Villeneuve L., Gisbert E., 2005. Nutrition, development and morphogenesis in fish larvae: some recent developments. *Aquafeeds: Formulation and Beyond* 2: 3-5.
- C4. **Cahu C.**, J. Zambonino, L. Villeneuve et E. Gisbert, 2004. Nutrition, développement et morphogénèse chez les larves de poisson. *Aquafilia*.
- C3. **Cahu C.** et Barret J., 1998. L'aquaculture des crevettes Pénéides dans le sud-est Asiatique. *Ecolobby News*, 7: 8-16.
- C2. **Cahu C.**, 1994. La nutrition des géniteurs et des larves de crevettes Pénéides. *La Pisciculture Française*, 118: 29-35
- C1. **Cahu C.**, 1991. L'aquaculture des crevettes pénéides dans le sud-est asiatique. *La Pisciculture Française*, 106: 28-40.

D- COMMUNICATIONS ORALES OU POSTERS DANS LES COLLOQUES AVEC PUBLICATION DES ACTES OU DES RESUMES

- D42. Yu H., Ai Q., Mai K., Ma H., Duan Q., **Cahu CL.** And Zambonino Infante JL. 2005. Dietary protein requirement of large yellow croaker (*Pseudociaena crocea*) during early stages. . Larvi'05- Fish and Shellfish Larviculture symposium, Hendry CI, Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. ediors. European Aquaculture Society, Special publication N° 36, Oostende, Belgium: 575-578.
- D41. Zambonino Infante JL.and **Cahu CL.** 2005. Dietary modulation of some digetive enzymes and metabolic processes in developping marine fish : applications to diet formulation. Larvi'05- Fish and Shellfish Larviculture symposium, Hendry CI, Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. ediors. European Aquaculture Society, Special publication N° 36, Oostende, Belgium: 581-582.
- D40. **Cahu CL.** 2005. La recherche en pisciculture en Europe. Exemples dans le domaine de la nutrition des poissons. Rencontre technologique organisée par le Centre Québécois de Valorisation des Biotechnologies et le Réseau Aquaculture Québec. Université laval, Québec, Canada, 12 septembre.
- D39. Gisbert E., Villeneuve L., Moriceau J., **Cahu CL.**, Zambonino Infante JL, 2005. Efecto de la vitamina A y HUFA sobre el desarrollo esquelético en larvas de lubina. X Congreso Nacional de Acuicultura, Valencia, 17-21 octubre 2005, Espagne.
- D38. **Cahu C.**, 2005. Tools for a aquaculture diversification: fish larval weaning. Meeting of European Fisheries and Aquaculture Research Organisation, 17-20 february 2005. Budapest.
- D37. Gisbert E., Villeneuve L., Zambonino Infante JL, Quazuguel P., Le Gall MM. and **Cahu C.**, 2005. Nature and level of dietary phospholipids affect the digestive physiology and larval quality of European sea bass larvae. Larvi'05- Fish and Shellfish Larviculture symposium, Hendry CI, Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. ediors. European Aquaculture Society, Special publication N° 36, Oostende, Belgium: 188-191.
- D36. Morais S., Conceicao LEC, Koven W.,Ronnestad I., **Cahu CL.**, Zambonino Infante JL, Dinis MT, 2005. Dietary neutral lipid level and source affect food intake, nutrient absorption, gut structure, enzymatic activity and growth in marine fish larvae. . Larvi'05- Fish and Shellfish Larviculture symposium, Hendry CI, Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. ediors. European Aquaculture Society, Special publication N° 36, Oostende, Belgium: 336-337.
- D35. Savoie A., Le François NR., **Cahu CL.**, Blier PU. And Andreassen, 2005. Do protein hydrolysates improve survival and growth of newly hatched spotted wolffish, a non metamorphic species? Larvi'05- Fish and Shellfish Larviculture symposium, Hendry CI, Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. ediors. European Aquaculture Society, Special publication N° 36, Oostende, Belgium: 460-463.
- D34. Villeneuve L., Gisbert E., .Le Gall MM., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, 2004. Influence of vitamin A levels on malformations during sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae development. World aquaculture Society Symposium, Honolulu, March 1-5, 2004. Abstract book, 612.
- D33. Yu H., Mai K., Ma H., Duan Q., Zambonino Infante JL and **Cahu C.**, 2004. Weaning juveniles of large yellow croaker (*Pseudociana crocea*) with artificial microdiets. 11th

International Symposium of Nutrition and Feeding in Fish, Phuket Island, Thailand, 2-7 May 2004, P159. Book of abstracts, 272.

- D32. **Cahu C.**, Renault T., Gouilletquer P., Lacroix D. Baud JP., 2004. Marine aquaculture, disease prevention and environment protection. Sino-France bilateral workshop on marine sciences, Xiamen, China, November 9-10, Book of abstracts, 7-9.
- D31. Gisbert E., Zambonino Infante J.L., Villeneuve L., Quazuguel P., **Cahu C.L.**, 2003. Marine vs.vegetal phospholipids in formulated diets for first feeding sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on the histological organization of the digestive system and swim bladder. World Aquaculture Society Symposium, Salvador, Brazil, 20-23 mai. Poster. Book of abstract, 312.
- D30. Villeneuve L., **Cahu C.**, Zambonino J., Le Gall MM, 2003. Effect of vitamin A levels on malformations during sea bass larvae development. World Aquaculture Society Symposium, Salvador, Brazil, 20-23 mai. Poster. Book of abstract, 822.
- D29. **Cahu C.**, 2003. Nutritional factors affecting quality in Penaeid shrimp larvae and post-larvae. Styli 2003, 30 ans de crevetticulture en Nouvelle Calédonie, 2-6 Juin 2003, Nouméa, Koné, Nouvelle Calédonie. Communication orale. Book of abstract, 17.
- D28. **Cahu C.** 2003. La fonction nutrition utilisée comme indicateur des possibilités de domestication chez les poissons. Séminaire Diversification-Domestication, 24-24 Juin, Nantes. Communication orale.
- D27. Cahu C., Ma H., Zambonino J; Mai K., 2003. Digestive capacity in marine fish larvae and formulation of adapted microdiets. 2003' Forum on Fishery Science and Technology, Sustainable Aquaculture, Resources, Environment and Quality. September 22-25 2003, Guangzhou, China. Book of abstract, p 41.
- D26. Gisbert E., Villeneuve L., Zambonino J., **Cahu C.**, 2003. Effects of vitamin A and polyunsaturated fatty acids on *Dicentrarchus labrax* larval skeletal formation. Forum on Fishery Science and Technology, Sustainable Aquaculture, Resources, Environment and Quality. September 22-25 2003, Guangzhou, China. Book of abstract, p 42.
- D25. **Cahu C.**, 2003. Nutrients affecting skeletal development in marine fish. Université de Guangzhou (Zhonghan university). 23 septembre 2003.
- D24. Ma H., Zambonino JL., Yu H., Duan Q, Le Gall MM, **Cahu C.** and Mai K, 2003. Activity of selected digestive enzymes during larval development of yellow croaker (*Pseudociana crocea*). World Aquaculture Society Symposium, Salvador, Brazil, 20-23 mai. Communication orale. Book of abstract, 437.
- D23. **Cahu C.**, 2002. Le poisson d'élevage, quelle qualité ? Les 4èmes entretiens de Nutrition de l'Institut Pasteur de Lille : les produits de la pêche. 14 juin 2002.
- D22. Tovar D., Zambonino J., Gatesoupe F.J., **Cahu C.**, Nolasco-Soria H. and Vasquez-Juarez R., 2002. Polyamine producing yeast as potential probiotics for spotted juvenile sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 10 th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. 2-7 june 2002. Rhodes (Greece). Book of abstract: 131. Poster.
- D21. Gamboa-Delgado J., Molina-Poveda C. and **Cahu C.** 2002. Study on the digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* as a function of body

- weight. The annual meeting of the world Aquaculture Society, April 23-27, 2002, Beijing, China. Communication orale.
- D20. **Cahu C.**, 2002. Le poisson d'élevage: quelle qualité? Quatrièmes Entretiens de Nutrition. Institut Pasteur de Lille : Les produits de la pêche. 14 Juin 2002. 6 pages + communication orale.
- D19. Blair T., Castell J., Neil S., D'Abramo L., **Cahu C.**, Harmon P. and Ogunmoye K., 2002. Effect of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). 10 th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. 2-7 June 2002. Rhodes (Greece). Book of abstract: 116. Poster.
- D18. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Ceulemans S. and Coutteau P., 2002. Effect of dietary fish meal replacement by vegetable protein sources on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) growth and body composition. 10 th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. 2-7 June 2002. Rhodes (Greece). Book of abstract: 131. Poster.
- D17. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L. and Takeuchi T., 2001. Nutrients affecting quality in marine fish larval development. Larvi'01-Fish and Shellfish Larviculture Symposium, C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds), European Aquaculture Society, Special publication N°30, Oostende, Belgium, 94-95. Oral communication.
- D16. Nys C., **Cahu C.**, Zambonino J., De Nigris P., Cirillo A., Candreva P. and Coutteau P., 2000. An innovative diet for early weaning of marine fish larvae. Symposium of European Aquaculture Society, 2-6 Mai, Nice, France. European Aquaculture Society, special publication, 28: 512. Poster.
- D15. Tovar-Ramirez D., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Gatesoupe J. and Vasquez-Juarez R., 2000. Efecto de la administration de levaduras en el proceso de maduracion del tracto digestivo de peces. V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, 19-22 Noviembre 200, Merida, Yucatan, Mexico. In Cruz-Suarez L.E., Rique Marie D., Tapia Salazar M., Olvera Novoa M.A. and Civera Cerado R. (Eds.), P. 16. Poster.
- D14. Zambonino Infante J.L, **Cahu C.**, and Coutteau P., 2000. Fish meal and fish oil replacement by vegetable lipid and protein sources in sea bass diets. ICES Annual Science Conference, 27-30 September, Brugge, Belgium. ICES CM 2000/P:06. Poster.
- D13. Covès D., Rosenlund G., Dutto G., Arzel J. and **Cahu C.**, 2000. Influence of dietary lipid content on voluntary feed intake and growth in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fed on demand at 17°C. COST 827, 3rd workshop on Voluntary Food Uptake in fish, 8-10 June 2000, Potenza, Italia, Communication orale.
- D12. Zambonino Infante J.L, **Cahu C.**, 2000. Ontogeny of the intestinal tract of marine fish larvae. 21st Congress of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 24-28 July, liege, Belgium, p. 162. Abstract. Communication orale.
- D11. **Cahu C.** 2000. Trend in research for finfish aquaculture. Nutrition and feeding. Sino-french finfish culture workshop, Mars 3-4 2000, Wuhan, Hubei, China. Communication orale
- D10. **Cahu C.**, 1999. Substitution of live food by formulated diet in marine fish larvae. Workshop in Advanced Biotechnology in Finfish Hatchery Production. December 6-9 1999, Honolulu, Hawaii,. Communication orale.

- D9. **Cahu C.**, 1998. Diets for shrimp broodstock and their effect on larva quality. In R. Civera and E. Cruz Editors, Proceeding of IV International Symposium on Aquatic Nutrition., November 15-18, La Paz, Mexico, 9p.
- D8. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Quazuquel P. and Le Gall M.M., 1998. Effect of protein hydrolysate on the development of sea bass larvae. VIII International symposium on Nutrition and Feeding of fish. June 1-4 Las Palmas, Spain, p. 194. Communication orale
- D7. Ribeiro L., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.** and Dinis M.T., 1998. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup. VIII International symposium on Nutrition and Feeding of fish. June 1-4 Las Palmas, Spain, p. 195. Communication orale
- D6. Péres A., Zambonino Infante J.L and **Cahu C.**, 1997. Dietary and developmental regulation of amylase activity and mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Abstract, ESCPB, IIIrd international Symposium on research for Aquaculture: fundamental and applied aspects, P-197. August 24-27, Barcelona, Spain, Poster.
- D5. Buchet V., Zambonino Infante J.L. and **Cahu C.**, 1997. Variation in activities of some digestive enzymes during larval development of *Scianops ocellatus*. Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, Les Trois Ilets, Martinique, 4-9 Mai 1997: 55-56.
- D4. **Cahu C.**, Gouillou-Coustans M.F., Fakhfakh M. and Quazuquel P., 1991. The effect of ascorbic acid concentration in broodstock feed on reproduction of *Penaeus indicus*. ICES, Mariculture Committee, F: 40, 10p.
- D3. Fakhfakh M., Villette M., and **Cahu C.**, 1991. L'action de l'alpha-tocophérol dans le développement embryonnaire de *Penaeus indicus*: rôle d'antioxydant ou rôle spécifique? ICES, Mariculture Committee, F: 35, 11p.
- D2. Cahu C., Sévère A. and Quazuquel P., 1988. Variation in lipid content in *Penaeus indicus* during larval development. ICES, Mariculture Committee, F: 22, 16p.
- D1. Cahu C., Fauvel C. et Aquacop, 1986. Effect of food fatty acid composition of *Penaeus vannamei* broodstock on egg quality. ICES, Mariculture Committee, F: 28, 8p.

E- ARTICLES OU COMMUNICATIONS A VOCATION DE TRANSFERT

- E14. Villeneuve, L., Gisbert E., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, 2005. Effet de la vitamine A et des acides gras polyinsaturés sur le développement de la larve de bar : Implication de la voie des rétinoïdes. Journées INRA-IFREMER Qualité des poissons, 7 avril 2005, Paris.
- E13. Medale F., **Cahu C.** 2005. Coordination Recherches piscicoles INRA-IFREMER. Réunion du Syndicat Français des Aquaculteurs Marins, 10 mars 2005, Montpellier.
- E12. **Cahu C.**, 2005. Le dispositif de recherche piscicole à l'Ifremer : collaborations avec l'INRA. Journée de la commission filière Poisson INRA, Paris, 22 avril 2005.
- E11. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L. Villeneuve L., Gisbert E., 2004. Nutrition et morphogénèse chez les larves de poisson. Journée du Syndicat Français de l'Aquaculture Marine et Nouvelle, 18 mars 2004, Montpellier.

- E10. **Cahu C.**, 2003. Poisson d'élevage , poisson de pêche : quelle qualité nutritionnelle ? Cycle de Conférences « Les produits de la mer », Palais des congrès, Service Communal d'hygiène et de santé, mairie de Lorient, 7 novembre 2003, Lorient.
- E9. Villeneuve L., Gisbert E., Le Gall MM., Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, 2003. Effet de la vitamine A sur l'expression de gènes impliqués dans le développement des larves de bar. Journée « Qualité des poissons » INRA-Bordeaux, 11 Septembre 2003.
- E8. **Cahu C.** 2003. La fonction nutrition utilisée comme indicateur des possibilités de domestication chez les poissons. Séminaire Diversification-Domestication, 24-24 Juin, Nantes. Communication orale.
- E7. **Cahu C.**, Zambonino Infante J., Barbosa V., Quazuguel P., 2002. Effet du taux de phospholipide alimentaire sur le développement des larves de bar. Journée INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, VIIème Symposium Bordeaux Aquaculture, 20 septembre: 3-5
- E6. Zambonino Infante JL **C. Cahu**, , Tovar D., Le Gall MM, Quazuguel P., 2002. Effet de l'incorporation de levures vivantes dans les aliments pour larves de poissons marins. Journée INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, VIIème Symposium Bordeaux Aquaculture, 20 septembre: 10-12.
- E5. Villeneuve L. **C. Cahu**, J. Zambonino Infante, Le Gall MM, Quazuguel, 2002. Effet du taux de vitamine A sur le développement des larves de bar. Journée INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, VIIème Symposium Bordeaux Aquaculture, 20 septembre: 10-12.
- E4. **Cahu C.**, Zambonino Infante J., Le Gall M.M., Quazuguel P., 1999. Aliments composés pour larves de poissons marins: I- La fraction protéique de l'aliment. Journées INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, Brest 9-10 mars, 4p.
- E3. Zambonino J.L., **C. Cahu**, S. Rolland et P. Quazuguel, 1999. Aliments composés pour larves de poissons marins: I- La fraction lipidique de l'aliment. Journées INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, Brest 9-10 mars, 4p
- E2. **Cahu C.**, Zambonino Infante J., Le Gall M.M., Quazuguel P., 1999. Aliments composés pour larves de poissons marins: I- La fraction protéique de l'aliment. Journées INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, Brest 9-10 mars, 4p.
- E1. **Cahu C.**,1996. Aliments composés pour larves de poissons marins: I- La fraction protéique de l'aliment. Journées INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, Saint-Pée-sur –Nivelle, 21-22 février. 1996. 3p.

F- BREVET

- F1. Zambonino J.L, **Cahu C.**, Quazuguel P. et Bergot P., 1999. Aliment complet pour larves de poissons et procédé pour sa préparation. Brevet d'invention N° WO0064273, déposé le 21 Avril 1999, Cabinet Harlé et Phelip.

G- DEPOTS DE SEQUENCES DE GENES

- G15. Kotzamanis Y., F.J. Gatesoupe, **C. Cahu**, J.L. Zambonino Infante (2004). *Marinomonas* sp. B4N46 partial 16S rRNA gene. [AJ630652](#), 518 BP, EMBL/GenBank/DDBJ Databases 26 march 2004.
- G14. Skalli A., E. Desbruyeres, M.M. Le Gall, **C.L. Cahu**, J.L. Zambonino Infante (2004). *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for delta-6 desaturase (fd6d gene). AJ715505, 367 BP, EMBL/GenBank/DDBJ Databases 19 may 2004.
- G13. Desbruyeres E.F., M.M. Le Gall, A. Skalli, J. Person-Le Ruyet, **C.L. Cahu**, J.L. Zambonino-Infante (2004). *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for elongation factor 1-alpha (ef1-alpha gene). [AJ866727](#), 955 BP, EMBL/GenBank/DDBJ Databases 01 december 2004.
- G12. Villeneuve L.A.N., **Cahu C.**, Le Gall MM, Quazuguel P. and JL Zambonino Infante (2003). *Dicentrarchus labrax* mRNA for bone morphogenetic protein 4(bmp4 gene), partial. AJ567451, 522 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 19 June 2003.
- G11. Villeneuve L.A.N., **Cahu C.**, Le Gall MM, Quazuguel P. and JL Zambonino Infante (2003). *Dicentrarchus labrax* mRNA for glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (gapdh gene), partial. AJ567450, 529 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 19 June 2003.
- G10. Villeneuve L.A.N., **Cahu C.**, Le Gall MM, Quazuguel P. and JL Zambonino Infante (2003). *Dicentrarchus labrax* mRNA for retinoid X receptor (rxr gene), partial. AJ567907, 822 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 23 June 2003.
- G9. Moreau Y., Avarre J.-C., **Cahu C.**, Suryanti Y. and Utami R 2003. *Pangasius hypophthalmus* mRNA for trypsinogen, complete. AY316360, 864BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 07 july 2003.
- G8. Villeneuve L.A.N., **Cahu C.**, Le Gall MM, Quazuguel P. and JL Zambonino Infante (2002).). *Dicentrarchus labrax* mRNA for retinoic acid receptor gamma (RAR gamma gene), partial. AJ496181, 522 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 18 july 2002.
- G7. Villeneuve L.A.N., **Cahu C.**, Le Gall MM, Quazuguel P. and JL Zambonino Infante (2002). *Dicentrarchus labrax* mRNA for retinoic acid receptor alpha (RAR alpha gene), partial. AJ496189, 383 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 19 july 2002.
- G6. **Cahu C.L.**, J.L. Zambonino Infante, M.M. Le Gall, and V. Grangier (2001).). *Dicentrarchus labrax* mRNA for alpha-amylase (amy2 gene), partial. AJ310653, 564 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 01 march 2001.
- G5. Tovar Ramirez D., J.L. Zambonino Infante and **C.L. Cahu** (2000). *Dicentrarchus labrax* mRNA for triglyceride lipase, partial. AJ275976, 288 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 06 March 2000.
- G4. Zambonino Infante J.L., **C.L. Cahu** and V. Barbosa (1999). *Dicentrarchus labrax* mRNA for phospholipase A2, partial. AJ1322762, 447 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 11 february 1999.
- G3. Zambonino Infante J.L., S. Rolland and **C.L. Cahu** (1998). *Dicentrarchus labrax* mRNA for phospholipase A2, partial. AJ006339, 235 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 29 may 1998.

- G2. Péres A., J.L. Zambonino Infante and **C.L. Cahu** (1998). Dicentrarchus labrax mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, partial. AJ006883, 366 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 12 june 1998.
- G1. Péres A., J.L. Zambonino Infante and **C.L. Cahu** (1998). Dicentrarchus labrax mRNA for trypsin, partial. AJ006882, 366 BP. Submission to EMBL/GenBank/DDBJ Databases 13 june 1998.

H- RAPPORTS DE CONTRATS CEE, FAO OU AVEC INDUSTRIELS

- H26. Pham D., Chim L., **Cahu C.** and Nutreco. 2004. Substitution of live preys (Artemia) by artificial diets (Nutreco) in Peneid post-larval rearing. Second report, February 2004, 15p.
- H25. Pham D., Chim L., **Cahu C.**, Corneillie S. and A. Roem, 2004. Test of Gemma micro for artemia replacement in shrimp larval rearing. Contract N° 04/2 210 710/F. Final report, May 2004, 25p.
- H24. Pham D., Chim L., **Cahu C.** and Nutreco.2003. Substitution of live feeds (Artemia) by artificial diets (Nutreco) in Peneid larval rearing. Test of Gemma pellet in shrimp grow out conditions. First report, November 2003, 16p.
- H23. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Le Delliou H., Quazuguel P., Le Gall M.M. 2001. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Final Report. Contrat FAIR CT 98 9197, 32p.
- H22. **Cahu C.** et Zambonino Infante J.L. et Quazuguel P. 2001. Test of two experimental microparticulated diets formulated for marine fish larvae. Rapport final. Contrat BIOMAR-IFREMER, Contract N° 2 210 379/F, 4p.
- H21. Le Guedes R. et **Cahu C.**, 2001. Mise en place d'une unité de fabrication d'aliments pour poisson au Maroc. Rapport final. Contrat n° 97/1212755/BF ; 21pp + annexes.
- H20. Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Le Delliou H., Quazuguel P., Le Gall M.M. 2001. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Individual Progress Report for the period 30-05-2000 to 28-02-2001. Contrat FAIR CT 98 9197, 13p.
- H19. Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Le Delliou H., Quazuguel P., Le Gall M.M. and 2000. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Individual Progress Report for the period 01-12-1999 to 31-05-2000. Contrat FAIR CT 98 9197, 14p.
- H18. **Cahu C.**, 2000. Rapport de mission en Tunisie, 3-9 avril 2000. Soutien et optimisation des élevages de loup et de daurade : définition des protocoles de nutrition. AQUA 2001/MI/00-04, 12p.
- H17. Quazuguel P., **Cahu C.** and Zambonino Infante J.L., 1999. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Choix de l'aliment pour les expériences de sevrage de bar. Expérience préliminaire au projet. Contrat FAIR CT 98 9197, 8p.

- H16. Zambonino Infante J.L., **Cahu C.**, Quazuguel P. 1999. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Individual Progress Report for the period 01-12-1998 to 31-05-1999. Contrat FAIR CT 98 9197, 9p.
- H15. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Quazuguel P., Le Gall M.M. and Le Delliou H., 1999. Novel products and applications based on lecithins to improve health and nutrition of aquaculture species. Individual Progress Report for the period 31-05-1999 to 30-11-1999. Contrat FAIR CT 98 9197, 10p.
- H14. **Cahu C.** et Zambonino Infante J.L., 1997. Testage d'aliments pour larves de poissons marins. Rapport final. Contrat INVE- IFREMER, 97/2 210 093/FC, 10p.
- H13. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L. and Quazuguel P., 1997. Valeur biologique de 5 aliments composés produits par INVE pour le sevrage de poissons marins. Rapport final. Contrat INVE- IFREMER, 97/2 210 153/FC, 7p.
- H12. **Cahu C.** et Zambonino Infante J.L., 1996. Testage d'aliments pour larves de poissons marins. Rapport final. Contrat BIOMAR- IFREMER, DRV/PA/96.084/LG, 10p.
- H11. **Cahu C.**, Zambonino Infante J.L., Le Delliou H., Quazuguel P. et Poullaouec G., 1996. Institut de recherche en pêche et aquaculture aux Philippines. Définition du département nutrition. Contrat SEPIA-IFREMER, 11p.
- H10. **Cahu C.**, Fuchs J., Buchet V., Lacroix D., Fauvel C., Martin J.L., Guelorget O. and Marino G., 1993. Report of the mission in the Philippines. Asean Aquaculture Development and Coordinating Programme, Component 3, Aquaculture Technology Verification and Training. Rapport CEE/ASEAN- IFREMER, 36p.
- H9. Lacroix D., Fauvel C. and **Cahu C.**, 1992. Rapport de mission aux Philippines et à Hong-Kong. Contact avec plusieurs organismes de recherche. Asean Aquaculture Development and Coordinating Programme, Component 3, Aquaculture Technology Verification and Training. Rapport CEE/ASEAN- IFREMER, 8p.
- H8. **Cahu C.**, Ferlin P., Fuchs J., Mazurié J. et Thouard E., 1991. Rapport de mission aux Philippines. Asean Aquaculture Development and Coordinating Programme, Component 3, Aquaculture Technology Verification and Training. Rapport CEE/ASEAN- IFREMER, 35p. + Annexes.
- H7. **Cahu C.**, 1990. Analyses biochimique de gonades de *Penaeus stylirostris* provenant de la station de St Vincent (IFREMER, Nouvelle Calédonie): Recherche d'un indicateur de la qualité des oeufs. Rapport IFREMER, RIDRV-90.51-RA/Brest, 15p.
- H6. Ferlin P., Fuchs J. and **Cahu C.**, 1990. IFREMER team visit to Bureau of Fisheries and Aquaculture Resarch (Philippines). Asean Aquaculture Development and Coordinating Programme, Component 3, Aquaculture Technology Verification and Training. Rapport CEE/ASEAN- IFREMER, 25p.
- H5. **Cahu C.** and Lavenant M., 1989. Development of Coastal Aquaculture in India; Report + book of plans. Rapport Ministry of Agriculture and Rural Development of India - Food and Agriculture Organization of the United Nations IND/85/059 - France Aquaculture, 45p.

- H4. **Cahu C.**, 1988. Rapport de mission à la station d'aquaculture du Bolon de Katakalousse (Basse Casamance, Sénégal). Analyse des résultats 1987-1988 et définition de la poursuite du projet. Rapport Ministère de la coopération - France Aquaculture, 24p.
- H3. **Cahu C.**, 1986. Rapport de mission à la station d'aquaculture du Bolon de Katakalousse (Basse Casamance, Sénégal). Démarrage de la production de l'écloserie de crevettes. Rapport Ministère de la coopération - France Aquaculture, 12p.
- H2. **Cahu C.**, 1981. Les potentialités aquacoles du site de Plogoff. Rapport France-Aquaculture - Electricité de France, 101p.
- H1. Calvas J., **Cahu C.** et Synajko Y., 1981. Définition d'un centre régional de développement de l'aquaculture des crevettes Pénéides en Indonésie. Recherche de sites à Java, Sumatra et Sulawesi pour l'implantation de trois de ces centres. Rapport Direction Générale des Pêches Indonésiennes - Food and Agriculture Organization of the United Nations TCP/INS/0002 - France Aquaculture, 118p. + Annexes.

I- RAPPORTS DE MISSION

- I8. Thouard E., Buchet V., **Cahu C.**, Coeurdacier J.L., Elie P., Hussenot J., Legendre M. Prou J., Robert R., 2005. Compte rendu de mission en Tunisie(13-17 juin 2005). Atelier de travail sur les nouvelles perspectives de la recherche scientifique en aquaculture. 16p.
- I7. **Cahu C.** et Gisbert E. Rapport de mission en Chine, du 19 au 29 septembre 2003. Projet PRA BT01-03. 3 p.
- I6. Baroiller J.F., Bernardet J.F., **Cahu C.**, Fuchs J., Harache Y., Jalabert B., Jones, A, Lemarié G., Li Z., Maisse G. and Vandeputte M., 2000. Compte-rendu de mission en Chine : Psiculture marine et d'eau douce, 1-12 mars 2000, 38 p.
- I5. **Cahu C.** et Fuchs J., 1999. Compte rendu de la réunion annuelle du département des ressources aquacoles, Thème: Appels d'offres Européens. Le Bono, Morbihan, 17-18 Juin 1999, 85p.
- I4. **Cahu C.**, 1997. Compte rendu de la mission effectuée à Barcelone, du 25 au 28 Aout 1997. Rapprt IFREMER- Ministère des affaires étrangères, 11p.
- I3. **Cahu C.** et Paquette P., 1997. Compte rendu du colloque bilan « Aliment Demain 1993-1997 ». 21-22 octobre, Ministère de la recherche, Paris 6 p.
- I2. **Cahu C.**, 1987. Rapport de mission à la station de biologie marine d'Urla, Université de la Mer Egée (Izmir, Turquie). Rapport Ministère des Affaires Etrangères - IFREMER, 20p.
- I1. **Cahu C.**, 1984. Rapport de mission au Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti), à la station d'aquaculture de St Vincent (Nouvelle Calédonie) et au Southeast Asian Fisheries Development Center (Phillipines). Rapport IFREMER, 28p.

Recherches réalisées et encadrements d'étudiants

Depuis 1981, mon activité de recherche concerne l'étude de la nutrition des reproducteurs et des jeunes stades de développement d'organismes marins appartenant à deux embranchements différents, les crustacés et les poissons. Ce travail réalisé dans un organisme de recherche finalisée, l'Ifremer, se situe dans un programme plus général de développement de l'aquaculture. En effet, quelles que soient les espèces en jeu, le développement de l'aquaculture en France comme au niveau mondial repose sur la production de juvéniles en éclosion. Mon travail a donc plus précisément pour objectif l'acquisition de connaissances sur les besoins nutritionnels, les mécanismes de digestion et le développement de ces animaux afin d'améliorer la production de post-larves de crevettes et d'alevins de poissons en éclosion.

Ce travail s'est déroulé en trois grandes périodes qui apparaissent dans ce mémoire :

- L'étude de la nutrition des reproducteurs et son influence sur la qualité des œufs et des larves de crevettes Pénéides. Mon travail a essentiellement porté sur l'effet des lipides et des vitamines sur le développement des œufs et des larves.
- L'étude de l'ontogenèse des fonctions digestives et les besoins nutritionnels des larves de poissons marins, avec le bar comme modèle. Le but était de déterminer les besoins nutritionnels spécifiques des jeunes stades, en étudiant la mise en place et la régulation des enzymes digestives pancréatiques et intestinales.
- L'étude de la régulation de certains gènes du développement par les nutriments, de façon à comprendre comment ces nutriments agissent lors de l'ontogenèse, notamment lors du développement du squelette.

Comme il apparaît dans mon curriculum vitae, j'ai dirigé le laboratoire de nutrition des poissons à l'Ifremer pendant 4 ans et je suis depuis deux ans directrice d'un département étudiant la physiologie des poissons et des huîtres. Mais dans ce mémoire, je ne décrirais que les recherches que j'ai réalisées personnellement, avec des collègues et en encadrant des étudiants.

I- NUTRITION DES REPRODUCTEURS ET QUALITE DES ŒUFS CHEZ LES CREVETTES PENEIDES

1- Contexte de l'étude

- **Contexte général.** L'élevage des crevettes pénéides s'est considérablement développé au cours de ces dernières décennies: la production est passée de quelques milliers de tonnes en 1980 à 1,5 million de tonnes en 2004. Il s'agit d'un secteur d'activité en plein essor pour lequel les résultats de la recherche sont transférés rapidement aux producteurs. Les Pénéides élevées sont principalement des espèces tropicales, dont la production s'est développée dans le sud-est asiatique et l'Amérique du sud, avec respectivement pour espèces principales *Penaeus monodon* et *Penaeus vannamei*.

Mon travail sur les crevettes Pénéides a été réalisé en collaboration avec les équipes du Centre IFREMER du Pacifique (Tahiti). Les espèces retenues comme modèles étaient *Penaeus vannamei*, les équipes de Tahiti étant impliquées dans de nombreux projets de développement en Amérique latine et *Penaeus indicus* constituant, grâce à sa petite taille et la courte durée de son cycle de reproduction, un animal de laboratoire intéressant.

Le cycle de vie des crevettes est maintenant bien connu. Il est très bref, la vie larvaire dure environ deux semaines et la reproduction a lieu au bout de 4 à 6 mois. Les premières pontes de crevettes Pénéides en captivité ont été obtenues en 1975. Le nombre d'œufs obtenus par ponte et leur qualité, en prenant comme critère le taux d'éclosion, ainsi que la survie des larves au cours du développement étaient très variables et souvent insuffisants au moment où j'ai abordé ce sujet. Mon travail a consisté à déterminer quels facteurs nutritionnels, dans l'aliment des femelles reproductrices, intervenaient pour conditionner la qualité des œufs et le développement des larves. Mes premiers travaux, ainsi que des résultats concluants obtenus chez les poissons m'ont rapidement conduit à m'orienter vers les lipides et les vitamines.

- **Matériel et méthodes.** Les différentes expériences ont été réalisées avec des protocoles semblables: les crevettes étaient élevées dans des bassins de 10 puis de 3 m³, à une température de 28°C, en eau de mer courante à une salinité de 35 ppm, avec 100% de renouvellement par jour. Dix femelles et dix mâles étaient généralement répartis par bac. Les aliments expérimentaux étaient distribués en excès, en trois fois par jour, et les animaux étaient acclimatés à ce régime 1 mois avant l'expérience. Ces aliments étaient des régimes composés, formulés et fabriqués au laboratoire, et dans lesquels le nutriment étudié variait suivant des concentrations préalablement définies; les animaux témoins étaient nourris de moules fraîches. L'expérience durait 4 semaines. Chaque jour, l'état de maturation de l'ovaire des femelles était observé par transparence, et les femelles prêtes à pondre étaient placées dans un bac de 300 litres. Les œufs collectés étaient comptés; un échantillon de 10 000 œufs était alors placé en incubation pour déterminer le taux d'éclosion, les autres œufs étant rincés puis congelés à -80°C pour dosages ultérieurs. A la fin de l'expérience, les animaux étaient

sacrifiés pour réaliser le dosage dans les différents organes des lipides et des vitamines, suivant des techniques décrites dans nos publications.

2- Relation entre la capacité de développement des oeufs obtenus et l'aliment des géniteurs.

Lorsque nous avons commencé ces séries d'expériences, les stocks de géniteurs des différentes écloséries étaient nourris uniquement d'aliments frais. Lors des premières expériences, nous avons formulé un aliment contenant les ingrédients classiques des aliments pour poissons et crevettes, et ayant la même teneur en protéines et lipides totaux que les moules. Les fréquences de pontes ($2,1 \pm 0,23$ pontes par femelle et par mois) et les nombres d'œufs par ponte ($105\ 000 \pm 5800$ oeufs par ponte) obtenus avec les femelles nourries avec cet aliment étaient non significativement différents de ceux obtenus avec les animaux témoins, nourris de moules fraîches. Par contre, le taux d'éclosion des oeufs (pourcentage des oeufs éclos par rapport aux oeufs fécondés) pondus par les femelles nourries d'aliments composés était significativement inférieur à ceux obtenus dans le groupe témoin.

Les teneurs en protéines totales étaient semblables dans les deux groupes d'œufs, ainsi que la teneur en lipides totaux. Par contre, les profils en acides gras des deux régimes étaient très différents, induisant une différence dans la composition en acides gras des oeufs. Le profil en acide gras des deux régimes ne constituait pas leur seule différence; il est évident que de nombreux autres nutriments différaient entre l'aliment composé et les moules. Cependant l'hypothèse pouvant être dégagée de ce résultat était que les potentialités de développement embryonnaires et post- embryonnaires des oeufs sont liés à leur composition biochimique, elle-même induite par l'alimentation des géniteurs [A3, D1].

3- Variations quantitatives et qualitatives de la composition en lipides au cours du développement lécithotrophe

Chez les crevettes Péneides, la phase de développement lécithotrophe dure environ 48 heures, à 29°C, comprenant le développement embryonnaire, puis, après l'éclosion, le développement des 6 stades Nauplius. L'organisme se métamorphose ensuite en Zoé, le tube digestif s'ouvre et devient fonctionnel et l'animal accède alors à une alimentation exogène. Les lipides représentant jusqu'à 25% de la matière sèche (m.s.) de l'œuf au moment de la ponte, il était primordial de connaître l'évolution de leur composition au cours du développement endogène. Les résultats qui vont suivre ont été obtenus avec *Penaeus indicus*. Au cours de la phase d'alimentation endogène, la concentration en lipides totaux passe de 25%/m.s. dans l'œuf immédiatement après la ponte à 7,5%/m.s. au moment de la métamorphose en Zoé. Ce sont principalement les lipides neutres, représentant 14% /ms de l'œuf au moment de la ponte qui sont utilisés comme substrat énergétique. Les phospholipides sont relativement épargnés (figure 1).

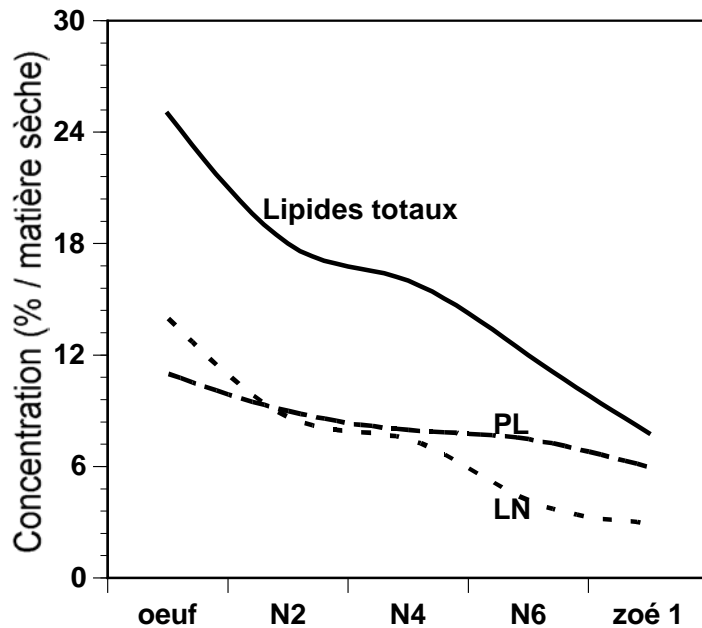


Figure 1. Concentration en lipides totaux, en phospholipides (PL) et en lipides neutres (LN) de *Penaeus indicus* au cours du développement larvaire (N2, N4 N6: nauplius au stade de développement 2,4 et 6, Zoé I : premier stade de la phase Zoé)

Chez les organismes marins, les acides gras composants les membranes cellulaires appartiennent à la série linoléique, et sont comme chez les autres animaux, des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGLPI). Les crustacés ayant, comme les poissons, une faible capacité d'élongation et de désaturation, les AGLPI doivent être apportés par l'aliment, ou être déjà présents dans l'organisme lors du développement endogène. Au moment de la ponte, la composition en acides gras de ces deux grandes classes de lipide est très proche. Notamment, les deux principaux AGLPI des crustacés, le C20:5n-3 (acide eicosapentaénoïque ou EPA) et le C22:6n-3 (acide docohexaénoïque ou DHA) sont largement répartis dans les deux classes : ils représentent à eux deux 24% des acides gras totaux dans les phospholipides et 20% dans les lipides neutres. Cette valeur se maintient pendant tout le développement endogène dans les lipides neutres, indiquant que les AGLPI de cette classe sont utilisés, au même titre que les autres acides gras, saturés et monoinsaturés, comme substrat énergétique. Par contre, leur teneur relative dans les phospholipides augmente considérablement, jusqu'à représenter 37% des acides gras totaux à la fin du développement endogène. L'organisme ne s'alimentant pas, leur quantité absolue ne peut augmenter dans la larve; l'augmentation de leur concentration relative montre que ce sont les autres acides gras qui sont catabolisés. Les AGLPI des phospholipides sont donc conservés au cours de cette phase de développement pendant laquelle l'animal passe du stade unicellulaire à un organisme très complexe: les AGLPI des phospholipides sont utilisés lors de ce développement cellulaire extrêmement intense pour former les membranes cellulaires. La larve, au moment de l'alimentation exogène présente une répartition des acides gras proche de celle que l'on rencontre chez les juvéniles : les ALGPI sont concentrés dans les phospholipides, les lipides neutres étant essentiellement constitués d'acides gras saturés et monoinsaturés [D2, B3].

4- Détermination de la concentration minimale d'acides gras polyinsaturés permettant le développement de l'œuf

Les AGLPI étant fortement impliqués dans le métabolisme embryonnaire et post-embryonnaire, il était important de déterminer la concentration minimale permettant le développement de l'œuf. La composition en lipide de l'œuf étant fortement liée au régime nutritionnel des géniteurs, il s'agissait également de définir la concentration en ALGPI du régime induisant cette composition de l'œuf.

Une expérience a été réalisée en nourrissant des reproducteurs de *Penaeus indicus* avec des régimes composés, ayant la même composition de base et différents entre eux uniquement par la nature des lipides ajoutés: dans le régime HH, les lipides ajoutés étaient des lipides extraits de gonades de poisson, dans le régime MH, il s'agissait d'huile de foie de morue, et dans le régime LH, de l'huile de tournesol. Le groupe témoin était nourri avec des moules (MU). Les concentrations en ALGPI dosées dans les régimes et celles obtenues dans les oeufs des groupes correspondant, ainsi que leurs taux d'éclosion, figurent dans le tableau 1.

Tableau 1. Concentration en acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans les oeufs de *Penaeus indicus* et taux d'éclosion en fonction de la concentration du régime des reproducteurs.

| Régime | MU | HH | MH | LH |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|---------------------|
| ALGPI dans l'aliment (%) | 2,5±1,3a* | 2,4±0,09a | 1,4±0,07b | 0,6±0,03c |
| ALGPI dans les oeufs (%) | 3,8±2,2a | 3,9±0,20a | 3,6±0,20b | 2,0±0,80c |
| Taux d'éclosion (%) | 60,5±10,5a | 41,5±9,0b | 34,3±7,3c | 8,2±8% ^d |

* moyenne ± écart-type, les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test ANOVA, suivi quand nécessaire du test Newmann-Keuls)

Le nombre d'œufs pondus par femelle n'était pas affecté par le régime. Par contre, le taux d'éclosion des oeufs ainsi que leur teneur en ALGPI, était directement liée à celle du régime: ces deux paramètres sont d'autant plus élevés que la teneur en ALGPI du régime est élevée. Une concentration de 2,5% d'ALGPI dans le régime alimentaire induit des concentrations d'ALGPI proches de 4% dans les oeufs; ces concentrations apparaissent comme minimales pour permettre un bon développement embryonnaire [A6, A7, A12]. Une concentration de 2% d'ALGPI dans les oeufs, obtenues en nourrissant les géniteurs avec des régimes pauvres en ces composants, est insuffisante d'assurer le développement de l'organisme. Le meilleur taux d'éclosion obtenu dans le groupe MU par rapport au groupe HH confirme que les ALGPI ne sont pas les seuls composants biochimiques responsables de la qualité de l'œuf.

Une partie de ce travail a été réalisé lors du stage de DAA de Myriam Villette. Publications [A6, D3].

5- Besoins et rôle de la vitamine E chez les oeufs de Pénéide en développement

Le rôle de la vitamine E ou α -tocophérol comme antioxydant biologique des acides gras, et agissant spécifiquement au niveau des membranes, est bien connu dans le règne animal. L'œuf de Pénéides, pour se développer, a besoin de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne, molécules très sensibles à l'oxydation. D'autre part, une action de l' α -tocophérol sur le développement embryonnaire de certains invertébrés, comme les mollusques ou les insectes, a été démontré. Nous avons donc essayé de déterminer les besoins et le rôle de cette molécule chez les oeufs de crevettes en développement.

L' α -tocophérol est une vitamine chez les crevettes comme chez les vertébrés: ces organismes sont incapables de synthétiser cette molécule à partir de précurseurs et elle doit donc se trouver dans l'aliment. Nous avons donc réalisé des séries d'expériences en formulant des aliments avec différentes concentrations d' α -tocophérol. L'aliment composé sans ajout d' α -tocophérol contenait 41 mg d' α -tocophérol amené par les farines. Au cours de 2 mois d'expérience, les pontes obtenues à partir des femelles nourries avec cet aliment étaient aussi abondantes que celles obtenues avec le même aliment composé auquel était ajouté 300 mg d' α -tocophérol par Kg d'aliment sous forme d'acétate d' α -tocophérol (600 mg). Alors que les taux d'éclosion des oeufs demeuraient constants, proche de 50%, au cours des pontes successives produites par les femelles nourries avec l'aliment enrichi en α -tocophérol, il chutait régulièrement chez les femelles recevant l'autre aliment. La concentration en α -tocophérol des oeufs provenant des femelles nourries avec l'aliment enrichi se maintenait à une valeur élevée alors qu'elle décroissait régulièrement dans l'autre groupe (figure 2).

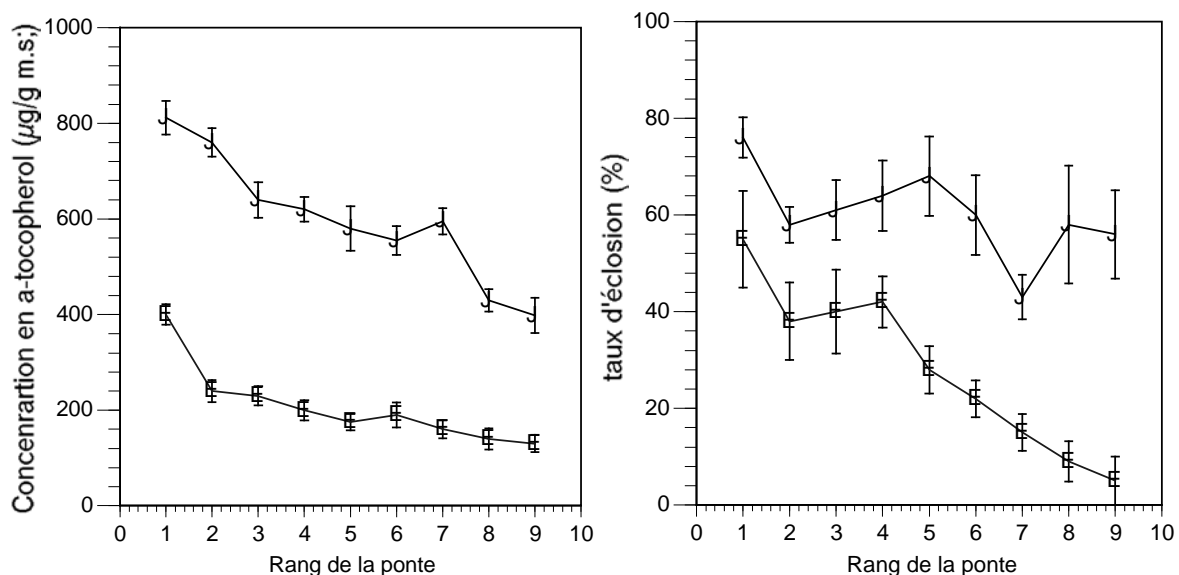


Figure 2. Concentration en α -tocophérol et taux d'éclosion des oeufs (% d'œufs éclos/œufs fécondés) de *Penaeus indicus* nourris avec un régime contenant 340 mg d' α -tocophérol (●) ou 40 mg d' α -tocophérol (○) par Kg d'aliment.

Cette expérience montre bien que les réserves en α -tocophérol de la femelle sont utilisées très rapidement au cours des pontes successives et que la capacité de développement de l'œuf est liée, entre autres facteurs, à sa teneur en cette molécule [A4, A5, D3].

Ce travail a été réalisé en partie lors du DEA de Myriam Alvarez, publication [A4] et du DAA de Maher Fakhfakh [A5, D3, D4].

D'autres expériences ont montré que les oeufs provenant des femelles recevant le régime enrichi en α -tocophérol contenaient une plus forte concentration d'ALGPI que les oeufs provenant de l'autre groupe. La fonction d'antioxydant biologique de cette vitamine sur les ALGPI était bien vérifiée. Cependant, la concentration en ALGPI restait dans les deux groupes supérieure au seuil de concentration identifié comme permettant un bon développement des oeufs. Ce résultat suggère donc que l'action de l' α -tocophérol sur le développement embryonnaire ne peut être attribué aux seules propriétés antioxydantes de cette molécule. Cette vitamine aurait donc une action propre sur le développement embryonnaire des oeufs, comme cela a été démontré chez les mollusques ou les insectes, sans que toutefois le mécanisme en soit explicité.

6- Besoins et rôle de la vitamine C.

L'influence de la vitamine C sur la reproduction des poissons a été largement étudiée, mais peu de données étaient disponibles sur les crevettes. Au cours de nos expériences, des géniteurs nourris avec un régime contenant peu d'acide ascorbique ont produit des oeufs ayant un faible taux d'éclosion et présentant également une faible concentration en acide ascorbique. A l'opposé, le même régime contenant des concentrations élevées d'acide ascorbique (820 mg/Kg de matière sèche) ont conduit à l'obtention d'œufs 3 fois plus concentrés en acide ascorbique et présentant des taux d'éclosion jusqu'à 5 fois plus élevés. [D4, A12]. Comme la vitamine E, la vitamine C a un rôle d'antioxydant. Mais l'action positive de l'acide ascorbique sur le développement embryonnaire doit certainement être attribuée au rôle de cette vitamine dans l'hydroxylation de la proline, permettant la formation du collagène.

Ces différentes expériences ont montré que les nutriments étudiés, ALGPI, vitamine E, vitamine C ont bien une influence sur la qualité des oeufs, exprimée en terme de capacité à se développer, et en terme de composition biochimique. Le taux d'éclosion des oeufs est lié, entre autres, à leur concentration en ALGPI, en vitamine E et en vitamine C, elle-même dépendante de la concentration présente dans le régime alimentaire des géniteurs. D'autre part, les concentrations de ces 3 nutriments dans les oeufs sont interdépendantes, la vitamine E agissant en protégeant les ALGPI en s'oxydant sous sa forme quinone. Cela a pour conséquence, d'un point de vue appliqué, qu'une augmentation d'ALGPI dans un régime devra être accompagnée d'une augmentation de sa concentration en vitamines antioxydantes.

7- Transfert des lipides et des vitamines de l'hépatopancréas et du muscle vers les ovaires pendant la vitellogénèse.

Chez les crevettes Pénéides, la vitellogénèse secondaire s'effectue en 3 à 4 jours. L'ovaire passe de l'état filiforme à l'état d'un organe représentant près de 20% de la masse de l'animal. Une femelle de 30 g pond plus de 100 000 oeufs par ponte et, dans certaines conditions, peut pondre 2 à 3 fois par mois. On perçoit alors aisément pourquoi le régime alimentaire des reproducteurs conditionne autant la composition biochimique de l'œuf: les nutriments sont très rapidement utilisés pour la fabrication du vitellus.

L'hépatopancréas est le principal organe de stockage des nutriments que nous avons étudié, les ALGPI et les vitamines. En effet, la concentration de l'hépatopancréas en ces composants est plus faible chez les femelles, ayant effectué quelques pontes, que chez les mâles nourris avec le même régime. Ceci montre que chez les femelles, ces composants ont été transférés vers d'autres organes, les ovaires en l'occurrence, montrant une très forte concentration en ces composants. Ces composants se retrouvent à une concentration beaucoup moins élevée dans le muscle (5 à 10 fois plus faible que dans l'hépatopancréas), mais les réserves du muscle sont utilisées pour la synthèse du vitellus dans le cas où l'alimentation ne fournit pas une quantité suffisante de certains nutriments essentiels à sa composition. Le muscle, malgré une faible concentration en ces nutriments peut constituer un organe de réserve important du fait de sa grande masse [A3, A12].

8- Conclusion.

Nos études ont montré que les potentialités de développement embryonnaires et post-embryonnaires des oeufs de crevettes Pénéides sont liées à leur composition biochimique, elle-même induite par l'alimentation des géniteurs [D9]. Les AGLPI, la vitamine E et la vitamine C ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et l'éclosion des oeufs. Nous avons montré que ces vitamines intervenaient par leur fonction d'antioxydant biologique, mais aussi par d'autres fonctions. L'hépatopancréas est le principal organe de stockage de ces nutriments. Le muscle, malgré une faible concentration en ces nutriments constitue un organe de réserve important du fait de sa grande masse. Les réserves en AGLPI, α -tocophérol et acide ascorbique de la femelle sont utilisées très rapidement au cours des pontes successives. Il importera donc de les fournir dans l'aliment à une concentration soutenant les pontes successives. Notre travail a ainsi aboutit à des recommandations pour l'aliment des géniteurs [B6]: l'aliment ayant par ailleurs une composition protéique convenable, une concentration de 25 g d'ALGPI, de 820 mg d'acide ascorbique et 340 mg d' α -tocophérol par Kg d'aliment (matière sèche) est optimale pour induire un bon développement des œufs.

II- DIGESTION ET NUTRITION CHEZ LES LARVES DE POISSONS MARINS

1- Contexte de l'étude

- **Contexte général.** L'élevage des poissons marins et d'eau saumâtre reposait il y a deux décennies en grande partie sur l'obtention d'alevins du milieu naturel. C'est encore le cas par exemple de la valliculture en Italie, les alevins de bars, mullets et daurades pénétrant d'eux-mêmes dans les aires de grossissement, ou de l'élevage de milkfish (*Chanos chanos*) dont l'importante production en Asie est encore liée la capture d'alevins sauvages. Cependant, le développement durable de la pisciculture ne pourra se faire que si le prélèvement d'alevins dans la nature n'augmente pas et si le relais est pris par des écloséries. Au cours des deux dernières décennies, des techniques d'élevage des larves de différentes espèces, bar, turbot, daurade, ont été mises au point et étendues à d'autres espèces. En 2004, la production des écloséries méditerranéennes atteignait 800 millions d'alevins de bar et de daurade. La production de ces alevins était encore totalement dépendante il y a quelques années d'élevages annexes de « proies vivantes »: en effet, les larves étaient nourries pendant les premiers jours de leur vie avec un rotifère, *Brachionus sp.*, mesurant environ 100 µm, puis avec les jeunes stades de développement (nauplius et metanauplius) d'un petit crustacé, *Artemia salina*, mesurant environ 500 µm. Des algues unicellulaires devaient être cultivées dans les écloséries pour nourrir les *Brachionus*. Ces élevages annexes constituaient donc une part très importante du coût de production de l'alevin; d'autre part, la qualité de ces proies n'était pas constante et introduisait une variabilité supplémentaire dans les élevages.

Différentes équipes de recherche, dont celle de l'Ifremer, travaillent depuis quelques années sur la mise au point d'un aliment composé adapté aux besoins spécifiques des larves de poisson, qui permettrait de fiabiliser la production d'alevins en éclosérie et d'en abaisser le coût. En 1992, lorsque mon groupe de recherche commençait les études dans ce domaine, tous les essais d'alimentation des très jeunes larves de poisson marin avec un aliment composé se soldaient par un échec, bien que les larves ingéraient l'aliment. Le sevrage, c'est-à-dire la substitution des proies vivantes par un aliment composé, ne pouvait être réalisé que chez des larves âgées de 25 à 30 jours, malgré l'utilisation d'aliments de compositions très diverses et apparemment équilibrées. L'hypothèse d'une carence en enzymes digestives chez les larves était alors avancée pour expliquer ce phénomène. Nous avons donc réalisé des séries d'expériences dans le but de comprendre les spécificités digestives de la larve et de formuler un aliment en tenant compte de ces différences par rapport au juvénile. Il est en effet bien connu que les larves poursuivent leur développement pendant plusieurs semaines après l'éclosion, et en particulier celui de leur tractus digestif, très inachevé à l'éclosion.

-**Matériel et méthodes.** Le bar, *Dicentrarchus labrax*, à été choisi comme espèce modèle. Les élevages étaient conduits dans une batterie de bacs de 35 litres, cylindriques, avec un fond légèrement conique, alimentés en eau de mer courante, à 19°C, avec un taux de renouvellement de 50% par heure. Les larves y étaient placées le lendemain de l'éclosion, à

raison de 80 par litre. L'ouverture de la bouche avait lieu au jour 5 (5 jours après l'éclosion). Suivant l'expérience, les larves étaient alors alimentées avec la séquence proies vivantes: *Brachionus sp* jusqu'au jour 9, nauplii d'*Artemia* jusqu'au jour 15 puis *Artemia* de 1 jour jusqu'au sevrage avec l'aliment composé expérimental, ou alimentées dès la première prise de nourriture avec un aliment composé, de taille 120-200 μm jusqu'au jour 20 puis de taille 200-400 μm . Les différents aliments composés étaient fabriqués dans notre laboratoire, et distribués en excès par tapis roulant pendant 18 heures/24. Cinq réplicats étaient utilisés par traitement. L'expérience s'achevait au jour 40. Trente larves par bac étaient prélevées 2 fois par semaine et disséquées pour les dosages enzymatiques (figure 3), réalisés suivant les protocoles décrits dans nos publications. Des larves étaient également prélevées et pesées afin de contrôler la croissance. A la fin de l'expérience, les larves de chaque bac étaient comptées 1 par 1 afin d'évaluer la survie.

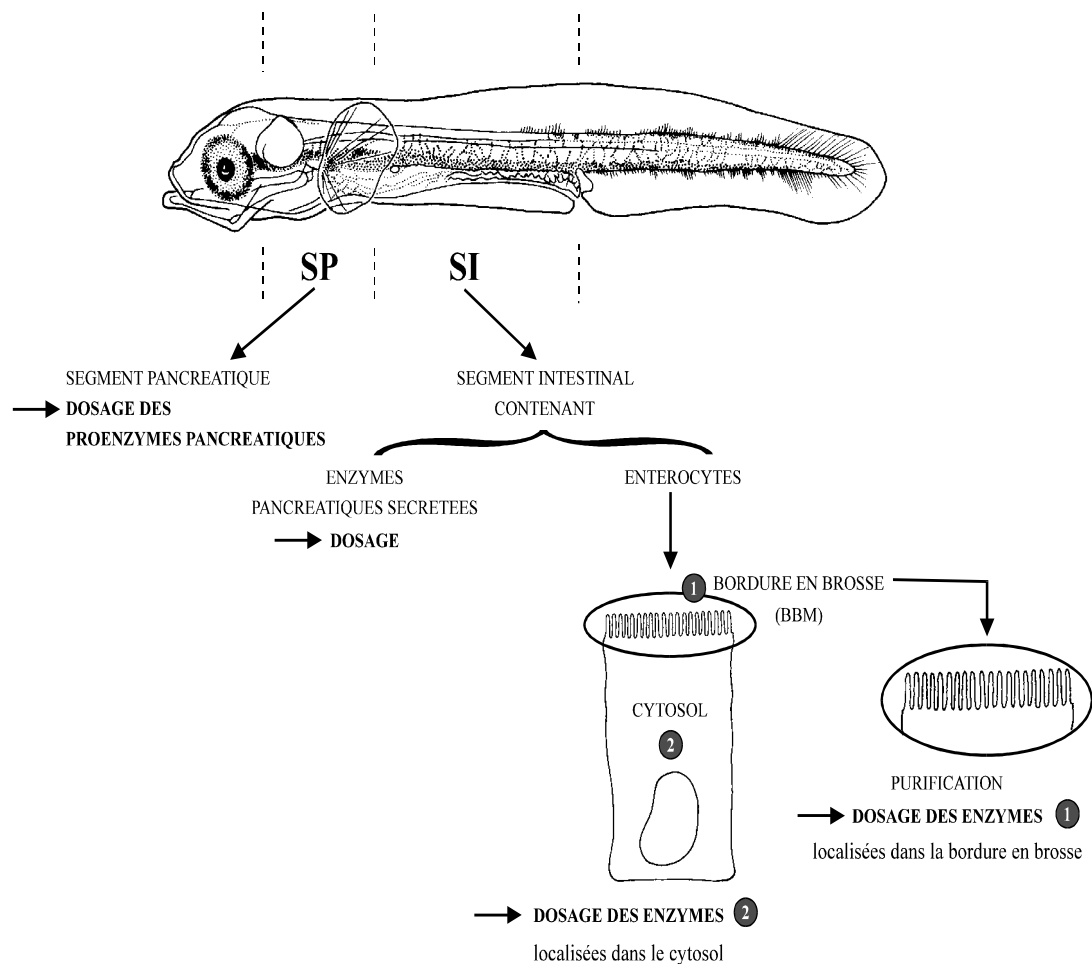


Figure 3. Dissection des larves de poisson et dosage des enzymes localisées dans les différents compartiments tissulaires et cellulaires.

2- Description de la mise en place des fonctions digestives et effet de l'aliment

2.1- Variation de l'activité de différentes enzymes digestives au cours du développement des larves.

Les enzymes digestives, pancréatiques et intestinales, les plus couramment dosées ont pu être détectées chez les larves de bar, et ceci dès les plus jeunes stades. En particulier, l'activité de deux enzymes pancréatiques, la trypsine et l'amylase, a été dosée chez des larves âgées de 3 jours, chez lesquelles la bouche n'était pas encore ouverte. La synthèse de ces enzymes digestives n'est donc pas à ce stade déclenchée par une prise d'aliment. Les activités spécifiques, exprimées en Unité Internationale/mg de protéines, de toutes les enzymes digestives dosées dans la larve entière suivent le même profil au cours du développement de la larve : elles augmentent brutalement à la première prise de nourriture, restent à un niveau élevé jusqu'au jour 25 environ puis décroissent (figure 4). Elles se stabilisent à un niveau plus bas à partir du jour 30 [A8]. Cette baisse ne correspond pas à une diminution de la quantité d'enzymes mais à une augmentation des protéines de l'animal. Les larves présentent donc, par rapport à leur poids, une capacité enzymatique considérable.

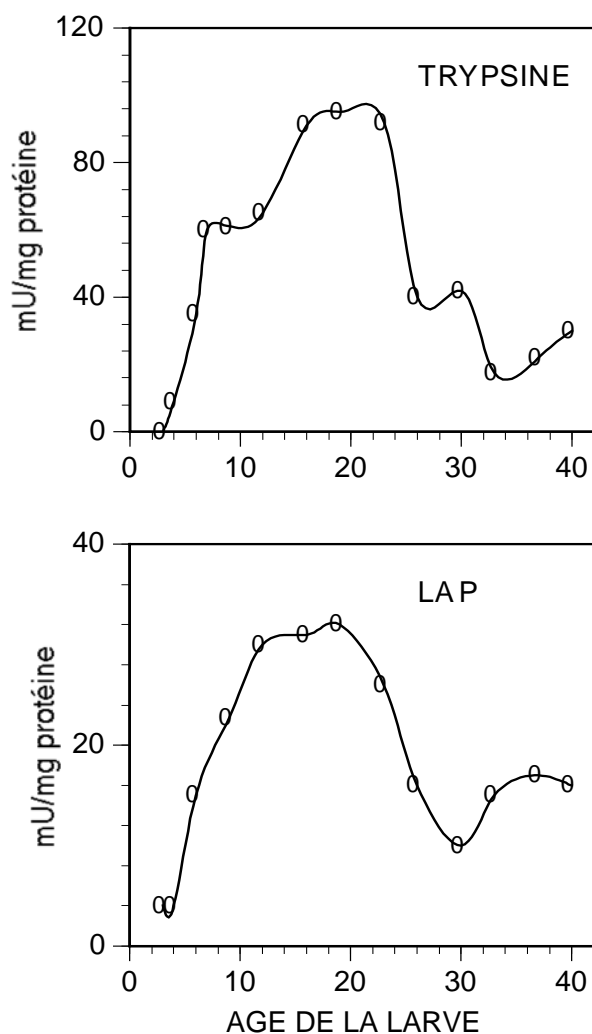


Figure 4. Evolution d'une enzyme pancréatique, la trypsine, et d'une enzyme intestinale, la leucine aminopeptidase (lap) au cours du développement de la larve de bar, et dosées sur des larves entières broyées et homogénéisées.

Le même profil d'activité des enzymes digestives est décrit chez des espèces de divers embranchements, comme les crustacés ou les mammifères: ce profil est caractéristique de la mise en place des enzymes digestives au cours de la période postnatale. La pepsine, enzyme gastrique, n'a pu être dosée qu'à partir du jour 25, l'estomac ne devenant fonctionnel qu'à partir de ce moment [A10].

2.2- Adaptation des activités enzymatiques à la quantité et à la composition de l'aliment.

Une expérience réalisée en nourrissant des lots de larves de bar avec la ration *d'Artemia ad libitum*, ou 1/2, 1/4, 1/8 de cette ration a montré que l'activité spécifique de la trypsine était directement liée à la quantité d'aliment ingérée, la composition de l'aliment étant la même pour les quatre lots [A16].

Une autre expérience réalisée en nourrissant les larves avec des aliments composés, formulés afin de représenter un gradient de concentration en protéines et un gradient inverse de concentration en glucides (amidon pré-gélatinisé) a montré que l'activité spécifique de la trypsine et de l'amylase chez les larves est directement liée à la concentration de leur substrat dans l'aliment ingéré. A titre d'exemple, l'activité de la trypsine augmente de 90% quand la concentration en protéine passe de 30 à 60% dans l'aliment, et celle de l'amylase triple quand la concentration en amidon de l'aliment passe de 7 à 37%. De même, des larves nourries avec des régimes composés isoprotéiques, mais contenant différents taux de farine de poisson ont montré une adaptation de l'activité de la phosphatase alcaline, enzyme intestinale, à la concentration en substrat phosphorylé des régimes [A17]. Il apparaît donc que les larves de bar sont, dès les plus jeunes stades, capables de moduler leurs synthèses enzymatiques en fonction de la quantité et de la nature de l'aliment ingéré. Cependant, la composition du régime alimentaire n'intervient que pour moduler le niveau des activités enzymatiques, le profil d'évolution de ces activités au cours du développement étant déterminé génétiquement.

Les larves ayant une forte capacité enzymatique et étant en mesure de l'adapter à l'aliment proposé, l'hypothèse d'une déficience enzymatique ne peut être retenue pour expliquer les mauvaises croissances des larves nourries avec de l'aliment composé [A22].

| |
|---|
| Ces résultats ont été obtenus au cours de la thèse d'Armande Péres, publications [A16, A17, A18, A19, A23, D6]. |
|---|

2.3- Maturation des processus digestifs au cours du développement.

Les travaux de différents auteurs ont décrit l'ontogenèse du tractus digestif des larves de poisson marins au cours du développement, en utilisant des techniques d'histologie. Nos travaux, réalisés en dosant différentes enzymes digestives sur des larves disséquées puis sur

des fractions cellulaires purifiées, ont permis de montrer qu'une maturation du tractus digestif s'opère suivant une séquence bien déterminée au cours du développement.

Les enzymes pancréatiques peuvent être détectées avant même l'ouverture de la bouche dans le segment pancréatique mais n'apparaissent que quelques jours après dans la lumière du tube digestif. Ceci suggère que, chez les larves de poisson comme chez les autres organismes, les mécanismes liés à la synthèse des enzymes sont fonctionnels avant les mécanismes liés à la sécrétion. Les enzymes de la bordure en brosse, comme la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase, la γ -glutamyl transaminase ou la maltase, dosées sur la fraction membranaire purifiée, sont très faiblement exprimées pendant les 3 premières semaines suivant l'éclosion, puis augmentent brutalement du jour 25 au jour 30. Cette brusque montée correspond à un développement morphologique de la bordure en brosse (figure 5). Parallèlement, la leucine-alanine peptidase, enzyme localisée majoritairement dans le cytosol, est fortement exprimée chez les jeunes stades, puis décroît fortement autour du jour 25 [A14].



Figure 5 . Evolution d'une enzyme de la bordure en brosse, la phosphatase alcaline (AP), dosée dans la fraction purifiée des bordures en brosse des entérocytes, et d'une enzyme cytosolique, la leucine- alanine peptidase (leu-ala) au cours du développement des larves de bar.

Cette mise en place d'un nouveau type de digestion coïncide avec le moment où les larves sont capables de s'alimenter avec un aliment composé conventionnel. La forte augmentation des enzymes de la bordure en brosse, associée à une chute de l'activité des enzymes cytosoliques correspond à une maturation de l'entérocyte et caractériserait le passage d'une digestion de type larvaire à une digestion de type adulte.

Ces travaux montrent également que les larves ont une grande capacité de digestion cytosolique. Les enzymes cytosoliques étant principalement des di- et tripeptidases, il était nécessaire de tirer parti de cette donnée pour formuler un aliment pour larves.

2.4- Effet de l'ingestion d'un aliment composé sur la maturation des fonctions digestives

Les aliments composés utilisés dans nos expériences contenaient, comme tous les aliments destinés aux poissons et crustacés, une base de farine de poisson, d'huile de foie de morue, de lécithine de soja, un mélange minéral et un mélange vitaminique. Différents composants, tels que la levure lactique, de l'hydrolysât de farine de poisson, des farines de crevette, de calmar ou des farines végétales étaient ajoutées dans différentes proportions.

Il est apparu que des larves nourries dès les jeunes stades avec un aliment composé, de formulation équilibrée permettant une bonne croissance chez les juvéniles, montraient un retard dans la mise en place des fonctions de sécrétion des enzymes pancréatiques. Ce retard était d'autant plus important que les larves étaient sevrées précocement. Au niveau intestinal, un retard dans l'augmentation de l'activité des enzymes de la bordure en brosse, et dans la décroissance de l'enzyme cytosolique était observé. Il apparaît donc que le sevrage précoce des larves avec un aliment conventionnel retarde, voire empêche, la maturation des fonctions digestives pancréatiques et intestinales [A14].

Une des conclusions tirées des expériences précédentes était que l'aliment qui conviendrait aux larves serait un aliment qui ne perturberait pas la séquence normale d'apparition des fonctions digestives génétiquement programmée. En tenant compte des données acquises sur les spécificités de la digestion chez les larves, différentes expériences ont été conduites afin de parvenir à la formulation d'un tel aliment.

3. Besoins en protéines, lipides et phospholipides chez les larves de bar

Il convenait donc de déterminer les besoins des larves pour les grandes classes de nutriments comme les protéines et les lipides (les glucides ne constituant pas un besoin nutritionnel chez les poissons) et de déterminer les formes moléculaires optimales pour l'apport de ces nutriments.

3.1- Fraction protéique de l'aliment

3.1.1- Protéines totales et glucides

Dans un premier temps, le besoin en protéines totales a été évalué en testant la réponse à 4 régimes alimentaires, isolipidiques et isoénergétiques: l'énergie apportée par les protéines était balancée par l'énergie apportée par des glucides. Les protéines étaient amenées sous forme de farine de poisson, ainsi que de l'hydrolysât de caséine, les glucides étant amenés sous forme de maltose et d'amidon (tableau 2).

Tableau 2. Composition des quatre régimes alimentaires utilisés pour nourrir les larves de bar

| | P30 | P40 | P50 | P60 |
|----------------------------------|------|------|------|------|
| Faine de poisson | 26 | 35 | 43 | 52 |
| Hydrolysat de caséine | 10 | 13.3 | 17 | 20 |
| Maltose | 12.3 | 8.9 | 5.6 | 2.3 |
| Amidon pré-gélatinisé | 24.5 | 17.9 | 11.2 | 4.5 |
| Huile de foie de morue | 8.5 | 7.6 | 6.7 | 5.8 |
| Lécithine de soja | 2.9 | 2.5 | 2.3 | 1.9 |
| Cellulose | 10.5 | 9.5 | 9.2 | 8.2 |
| Mélange vitaminique | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| Mélange minéral | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Vitamine C | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Protéines (N X 6,25) | 29.5 | 40.1 | 49.7 | 59.9 |
| Lipides | 14.6 | 15.0 | 14.9 | 15.0 |
| Cendre | 4.3 | 6.0 | 7.4 | 9.0 |
| Energie (J / 100g matière sèche) | 1680 | 1690 | 1685 | 1690 |

Les meilleures croissances et survies ont été obtenues chez les larves nourries avec le régime contenant 50% de protéines et 17% de glucides, suivi de près par les larves nourries avec le régime contenant 60% de protéines et 7% de lipides. La croissance et la survie étant des critères biologiques intégrateurs de l'ensemble des processus métaboliques, on peut donc considérer que les besoins optimum en protéines sont compris entre 50 et 60% de la matière sèche du régime. Ceci constitue des taux élevés par rapport aux besoins des vertébrés supérieurs, mais cohérents avec les besoins en protéines connus chez les juvéniles de poisson. L'activité spécifique de l'amylase augmentait en fonction du taux de glucides dans les régimes dès le 18^{ème} jour après l'éclosion et cette régulation est toujours apparente au jour 35 (figure 6). Par contre, quel que soit le régime, la diminution de l'expression de l'amylase apparaît au cours du développement, des forts taux de glucides alimentaires ne parvenant pas à enrayer cette diminution. Cette décroissance de l'amylase au cours du développement est génétiquement programmée. La quantification des ARN messagers codant pour l'amylase montre une régulation transcriptionnelle de l'expression de cette enzyme par le taux de glucides.

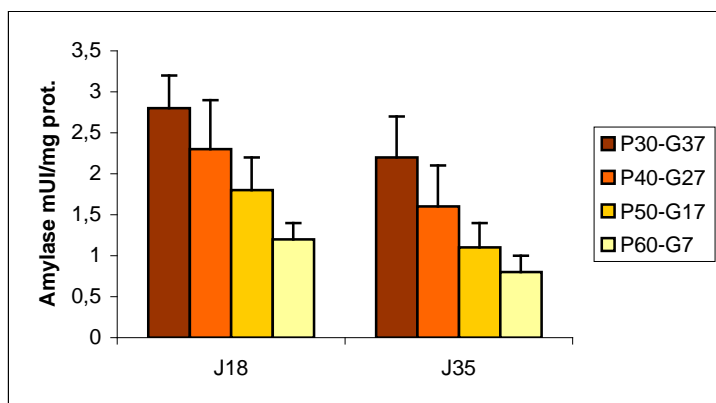


Figure 6. Activité spécifique de l'amylase chez des larves de bar âgées de 18 et 35 jours et nourries avec un gradient de glucide.

Au contraire de l'amylase, une corrélation entre l'activité de la trypsine et le taux protéique du régime n'apparaît qu'au jour 35 (figure 7). Cette régulation tardive de la trypsine par son substrat suggère que les mécanismes qui contrôlent l'adaptation de la trypsine ne sont pas opérationnels avant le jour 35. Avant cette date, les niveaux d'ARNm codant pour la trypsine étaient comparables quel que soit le taux protéique du régime alimentaire des larves.

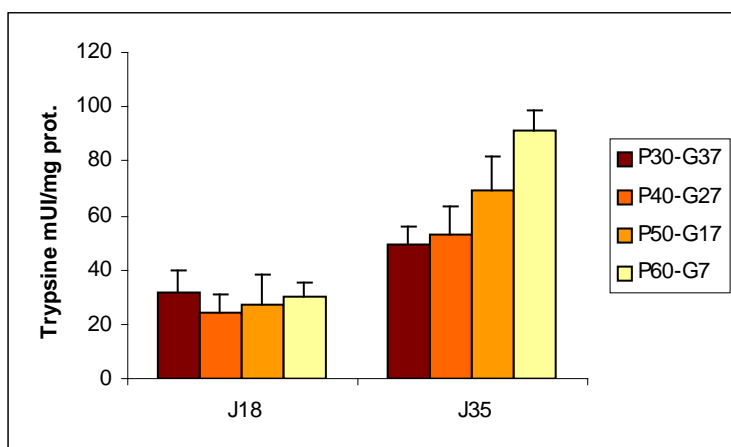


Figure 7. Activité spécifique de la trypsine chez des larves de bar âgées de 18 et 35 jours et nourries avec un gradient de protéine.

Il apparaît ainsi que la régulation de la synthèse des enzymes protéiques est un phénomène age-dépendant [A17]. Des expériences ultérieures ont montré que ces niveaux d'ARNm varient en fonction de la nature de la protéine utilisée.

3.1.2- Longueur des chaînes protéiques

La régulation de la trypsine étant faible dans les jeunes stades, et les larves montrant une forte expression des dipeptidases cytosoliques, nous avons fait l'hypothèse qu'un apport protéique sous forme de protéines hydrolysées pouvaient être mieux utilisé par ces jeunes stades que des protéines natives.

Une expérience a été réalisée en utilisant un mélange de di- et tripeptides que nous avons fait fabriquer à façon par l'IUT de Limoges à partir de farine de poisson. Trois aliments étaient

ainsi formulés : l'un ne contenant comme source de protéine que de la farine de poisson, dans les deux autres 20 ou 40% de cette farine de poisson était remplacé par le mélange de di-et tripeptides. Ces aliments, outre qu'ils étaient isoprotéiques, isolipidiques et isoénergétiques, présentaient le même profil en acides aminés. Seule la longueur des chaînes protéiques d'une partie de l'aliment changeait. Les larves de bar étaient nourries avec l'un de ces aliments du jour 20 au jour 40.

Ce sont les larves nourries avec le régime contenant 20% de peptides qui ont montré les meilleures croissances et survies. Cette augmentation de la croissance et de la survie était associée à une amélioration générale du développement des larves. Moins de 6% des larves nourries avec ce régime présentaient des malformations squelettiques (colonne vertébrale ou mâchoire), alors que 24% des larves nourries avec le régime ne contenant que des protéines natives présentaient des anomalies. Cette amélioration globale du développement était associée à des activités élevées des peptidases cytosoliques chez les jeunes stades. De plus, chez ces larves, la maturation intestinale, illustrée par l'augmentation brusque des enzymes des bordures en brosse et la décroissance de l'enzyme cytosolique dosée, s'effectuait plus précocement et avec une plus grande amplitude que chez les animaux nourris du régime sans peptides. Cependant, le régime contenant 40% de di et tripeptides, bien qu'induisant une forte activité cytosolique, ne conduisait pas à de meilleures performances que le régime en contenant 20%. Cet excès de di et tri-peptides dans le régime 40% induisait d'une part un retard du développement de la bordure en brosse, d'autre part conduisait à un apport massif d'acides aminés pouvant saturer les transporteurs [A19].

Cette expérience confirme qu'un bon développement des larves, illustré par une croissance correcte et une survie élevée, est lié au bon déroulement de la séquence de maturation du système digestif et particulièrement à la mise en place, dès J25 chez le bar, d'une digestion efficace au niveau des bordures en brosse. Il a été effectivement démontré chez les mammifères que la « fenêtre d'apparition » des bordures en brosse est très étroite au cours du développement, et que le processus ne peut avoir lieu après ce délai.

Une autre expérience a été réalisée en utilisant une source de peptides du commerce, le CPSP (Concentré soluble de Protéine de Poisson). Il s'agit de peptides d'environ 20 acides aminés, fabriqués à partir de farine de poisson. L'utilisation de ces peptides a permis pour la première fois de réaliser un élevage expérimental en nourrissant des larves de poissons marins avec un aliment composé dès l'ouverture de la bouche, et sans utilisation aucune de proies vivantes. Le taux optimal a été déterminé à 12% de la matière sèche de l'aliment [A28]. Ces résultats étaient importants, car malgré un rôle avéré des di-et tripeptides sur le développement des larves, le prix de ces composés était rédhibitoire pour un aliment commercial. Au contraire, le CPSP a un prix tout à fait permettant son incorporation dans des aliments pour larves.

Une étude réalisée avec un collègue norvégien a montré qu'à la fois la concentration en protéines alimentaires et la longueur de chaîne de ces protéines agit sur la sécrétion d'une

hormone, la cholecystokinine, qui à son tour régule les sécrétions pancréatiques. Ceci expliquerait en partie l'effet positif observé des peptides alimentaires [A42].

Ces résultats ont été en partie obtenus au cours du DEA de Virginie Grangier, publication A42.

3.1.3- Acides aminés libres

Si des chaînes de 20 acides aminés ou même de deux ou trois acides aminés ont un effet bénéfique sur le développement de larves, l'incorporation dans l'aliment d'acides aminés libres n'a pas montré d'effet sur la croissance ou la survie des larves. Par contre, une incorporation de 10% d'acides aminés libres a induit une augmentation de la sécrétion de trypsine [A15]. Cette possibilité d'induire plus précocement la sécrétion des enzymes pancréatiques est intéressante, puisque si mes mécanismes de synthèse des enzymes sont en place très tôt chez les larves, les mécanismes de sécrétion se mettent en place plus tardivement. Un résultat semblable avait déjà été décrit chez les mammifères.

3.2- Fraction lipidique de l'aliment. Régulation des enzymes digestives lipolitiques

3.2.1-Besoins en lipides totaux

Les lipides constituent une source importante d'énergie nutritionnelle, et présents sous forme de deux grandes classes, les lipides neutres et les phospholipides. De nombreux auteurs ont abordé l'étude des besoins en lipides totaux, phospholipides et acides gras en nourrissant les larves avec des proies vivantes enrichies en différents lipides. Ces enrichissements (bain des proies vivantes dans des émulsions) étaient sujets à une grande variabilité et les conclusions étaient difficiles à tirer. Nos expériences conduites en utilisant des aliments composés de composition prédéterminée nous ont permis d'évaluer la capacité de digestion de ces deux classes de lipides au cours du développement de la larve de bar. Une première expérience a permis de déterminer le taux de lipides totaux optimal pour soutenir le développement des larves de bar. Ce taux a été fixé à 25% de la matière sèche de l'aliment [A26].

3.2.2- Besoins en phospholipides

Puis, afin de connaître si c'était la fraction phospholipide ou la fraction lipide neutre qui était le mieux utilisée par ces individus en développement, cinq aliments composés isoprotéïniques, isolipidiques et isoénergétiques ont été formulés avec un gradient de 3 à 12% de phospholipides et un gradient inverse de 23 à 14% de lipides neutres (tableau 4).

Tableau 4. Composition lipidique des régimes

| | | PL3 | PL6 | PL9 | PL12 |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------|------|------|------|
| | | g/100 g dry diet | | | |
| Added lipid in diets | Soybean lecithin ¹ | 0 | 5.6 | 11.1 | 16.7 |
| | Fish oil | 16.7 | 11.1 | 5.6 | 0 |
| Lipid composition | Neutral lipids | 22.9 | 20.3 | 17.3 | 13.7 |
| | Phospholipids | 2.7 | 6.0 | 9.1 | 11.6 |
| | Phosphatidylcholine ² | 0.9 | 1.8 | 2.6 | 3.5 |
| | Phosphatidylinositol ² | 0.2 | 0.7 | 1.2 | 1.6 |
| | EPA+DHA ³ | 4.9 | 3.6 | 2.4 | 1.5 |

¹ Soybean lecithin, provided by Nickerson (Marne-la-Vallée, France) contains 62% phospholipid, including 26% phosphatidylcholine, 20% phosphatidylethanolamine and 14% phosphatidylinositol.

² Value calculated from raw material specifications

³ EPA, eicosapentaenoic acid, DHA, docosahexaenoic acid

Cette représentation relative des grandes classes de lipides est apparue déterminante pour le développement des jeunes stades. En effet, il est apparu que la croissance, la survie et qualité du développement squelettique des larves suivait le gradient de phospholipides : le poids des larves à jours après l'éclosion atteignait 32 mg dans le groupe nourri avec le régime contenant 12% de phospholipides, la survie 72% et seulement 2% des larves présentaient des malformations squelettiques. Les larves nourries avec le régime ne contenant que 3% de phospholipides atteignaient un poids de 2 mg, la survie n'était que de 12% et 35% des larves présentaient des malformations de la mâchoire ou de la colonne vertébrale (figures 10 et 11).

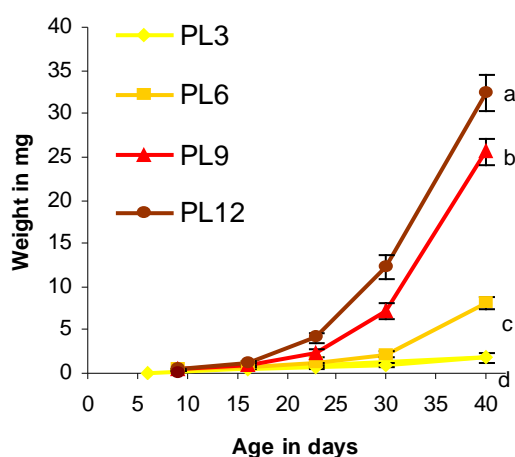


Figure 10. Croissance des larves de bar nourries dès l'ouverture de la bouche avec des régimes contenant un gradient phospholipides

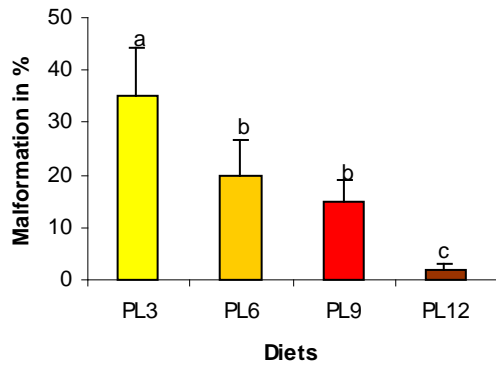


Figure 11. Pourcentage des individus présentant des malformations osseuses parmi les larves nourries avec les régimes contenant un gradient de phospholipides

Cet effet bénéfique des phospholipides sur le développement des larves de bar pourrait s'expliquer par l'action conjuguée des deux principales classes: la phosphatidylcholine aurait un effet promoteur sur la croissance, le phosphatidylinositol limiterait l'apparition de difformités, comme cela aurait été suggéré chez la carpe.

Les mesures des activités enzymatiques des deux enzymes lipolitiques, lipase et phospholipase, explique également le rôle essentiel des phospholipides au cours du développement, contrairement aux lipides neutres.

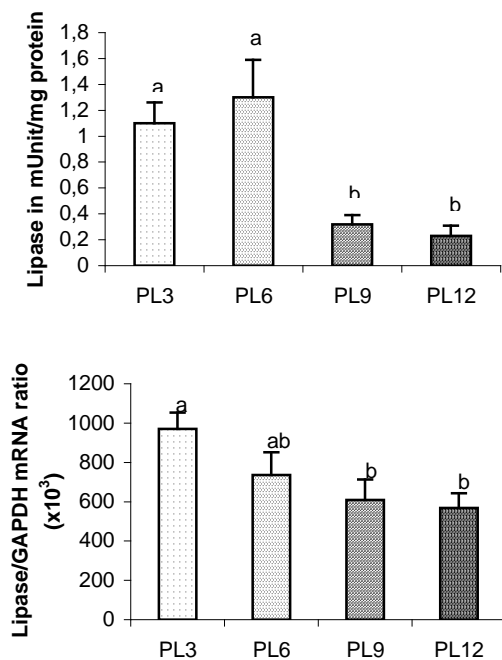


Figure 12. Activité spécifique de la lipase et ratio des ARNm codant pour la lipase rapportée aux ARNm codant pour la GAPDH chez les larves de bar âgées de 40 jours et nourries avec es différents régimes

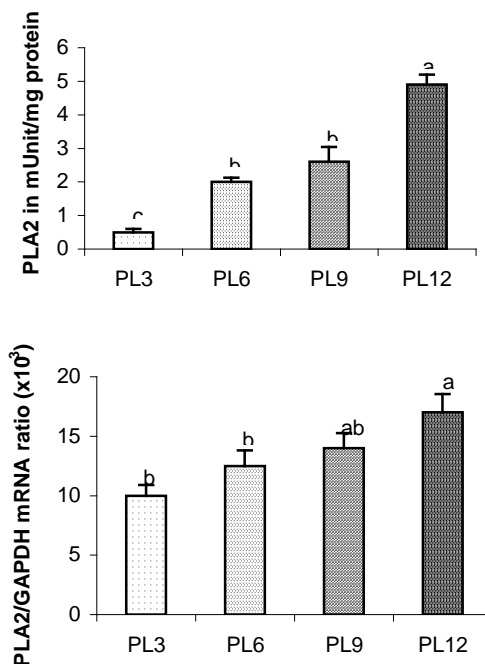


Figure 13. Activité spécifique de la phospholipase et ratio des ARNm codant pour la phospholipase rapportée aux ARNm codant pour la GAPDH chez les larves de bar âgées de 40 jours et nourries avec es différents régimes

La réponse de la lipase au taux de lipides neutres alimentaires n'est pas linéaire. On peut discerner une activité de lipase faible en réponse à des taux de lipides alimentaires de 14 et 17%, et une activité forte pour des taux de lipides alimentaires de 20 et 23%. Par contre, la synthèse d'ARNm codant pour la lipase semble assez finement régulée par la concentration du substrat, les lipides neutres (figure 12). Il semblerait donc qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle pour l'expression de la lipase. Elle pourrait être due à action d'une hormone gastrointestinale, la secrétine, régulant les sécrétions pancréatiques. Plus que par la concentration de lipides neutres, il semblerait que l'activité de la lipase soit affectée par la nature des triglycérides. En effet, une expérience a montré que la quantité d'ARNm codant pour la lipase, aussi bien que son activité enzymatique différait quand les larves de bar étaient nourries avec des régimes contenant soit de l'huile de poisson, de l'huile de coco ou de la trioléine [44].

L'expression de la phospholipase A2 (PLA2) est au contraire très finement régulée par son substrat, les phospholipides [A37]. La régulation de la PLA2 se fait essentiellement au niveau transcriptionnel, les activités de l'enzyme reflétant les quantités d'ARNm mesurées (figure 13). Cependant, une régulation supplémentaire semble influencer les activités enzymatiques. L'activité de l'enzyme est multipliée par 9 alors que la quantité d'ARNm n'augmente que de 1,6 fois entre les larves nourries avec le régime PL3 et le régime PL12. Cela suggère une régulation post-transcriptionnelle par une hormone, la cholecystokinine [A45].

Ces résultats confirment donc que les enzymes digestives chez les larves en développement sont différemment régulées : la régulation apparaît plus ou moins tôt au cours du développement. De plus, une mauvaise utilisation d'un substrat, les lipides neutres en l'occurrence, semblent liée à une régulation médiocre de la synthèse de l'enzyme correspondante. Il apparaît que le substrat lipidique préférentiellement utilisable par les larves est sous forme phospholipide. Les lipides n'interviennent donc pas uniquement comme apport énergétique, dans ce cas les lipides neutres seraient efficaces. Les rôles des phospholipides sont multiples : ils facilitent l'émulsion des lipides et leur digestion, ils interviennent dans le transport sanguin des lipides sous forme de lipoprotéines et ils sont une source d'acides gras longs polyinsaturés . Les poissons juvéniles ont la capacité de synthétiser les phospholipides à partir des précurseurs, mais cette capacité de synthèse est trop faible chez les larves pour couvrir les besoins liés à une morphogenèse, une organogenèse et une croissance très importante. En effet, une larve de bar multiplie son poids par un facteur 20 en un mois.

Ces résultats ont été en partie obtenus au cours du DEA de Valérie Barbosa, publication A37.

4- Comparaison de notre modèle, le bar, avec d'autres espèces. Validation des hypothèses.

Il nous a semblé intéressant de confronter nos hypothèses à d'autres modèles de poissons marins, vivant dans des conditions environnementales différentes, notamment en ce qui concerne la température, et ayant des vitesses de développement différentes de celle du bar.

En effet, le but de notre recherche n'est pas seulement de comprendre le développement de cette espèce, ni même de formuler un aliment adapté à ses besoins, mais bien de tirer des lois générales sur le développement des poissons marins, et mettre aussi les différences en évidence. J'ai travaillé dans ce but avec de nombreuses équipes européennes ou hors Europe, en co-encadrant des étudiants étrangers, qui ont passé plusieurs mois dans notre laboratoire avec leurs échantillons de larves, obtenus lors d'expériences réalisées suivant un protocole que nous avons établi en commun.

C'est le cas des travaux réalisés sur ces différentes espèces :

- la sole, *Solea senegalensis*

La sole sénégalaise, dont la répartition naturelle est la cote atlantique portugaise et africaine, ainsi que la méditerranée, fait l'objet d'études et de développement en Espagne et au Portugal. Comparée à la sole des côtes française, *Solea solea*, c'est une espèce de grande taille à croissance rapide. Nous avons montré que, bien qu'étant un poisson plat, le schéma de développement des fonctions digestives est proche de celui des poissons ronds, les événements de maturation pancréatique et intestinale intervenant plus précocement que chez le bar (maturation intestinale autour de J16 au lieu de J25) à cause de la température à laquelle se développe cette espèce. Le développement larvaire se déroule sans problème quand les larves sont nourries avec des proies vivantes, le passage sur alimentation composée provoque de nombreuses mortalités comme cela avait été constaté chez *Solea solea*.

Ces études ont été réalisées dans le cadre de la thèse de Laura Ribeiro, Université de Faro, Portugal, publications A27, A34.

- l'églefin, *Melanogrammus aeglefinus*

L'églefin, ou haddock, fait l'objet d'une forte demande. Il est élevé sur les côtes atlantiques du Canada dans des cages semblables à celle utilisées pour le saumon. Mais le problème reste l'élevage larvaire, pendant lequel la survie est très faible (environ 5%). Nous avons réalisé une étude afin de mieux cerner les besoins nutritionnels de cette espèce pendant la vie larvaire, en les nourrissant avec des aliments présentant différentes teneurs en AGLPI. Il apparaît que, actuellement, aucun aliment composé ne permet de soutenir la croissance et la survie des larves.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du master de Tammy Blair, Université de St-Andrews, Canada, publication A40.

- un scianidé, le « yellow croaker », *Pseudosciaena crocea*

C'est une espèce très prisée des chinois, et dont l'élevage se développe très rapidement dans les éclosiers et les cages le long du littoral de la Chine du Sud. C'est une espèce subtropicale, assez proche de l'ombrine *Scianops ocellatus* élevée dans les Dom-Tom français. Le schéma de mise en place des fonctions digestives est très proche de celui du bar, avec une avance dans la maturation des fonctions pancréatiques et intestinales due à une température

d'élevage plus élevée (25°C). Comparée au bar, il apparaît que la décroissance de l'activité de l'amylase au cours du développement larvaire est moins prononcée que chez le bar. Cela suggérerait chez cette espèce une capacité à assimiler les glucides, ce qui constitue un avantage considérable pour son élevage, les farines végétales pouvant être utilisées en proportion non négligeable dans son alimentation.

Cette étude a été réalisée dans le cadre de la thèse de Hongming Ma, Université de Qingdao, Chine, publications A41, A48, A51.

- le loup nordique, *Anarhichas minor*

C'est une espèce indigène des côtes norvégiennes et canadiennes, présentant un préférence thermique autour de 8°C pendant la vie larvaire. C'est une espèce qui se développe très rapidement et dont la mise en place des fonctions digestives de type adulte se fait très précocement, de la même façon que le saumon. Les aliments composés tels que nous les avons formulés peuvent soutenir la croissance et le développement des larves. Nous avons montré notamment que, contrairement aux larves de bar, les larves de cette espèce se développaient parfaitement avec un aliment ne contenant que des protéines natives, l'incorporation d'hydrolysats n'améliorant pas les performances. De ce point de vue, les larves réagissent comme des juvéniles. C'est une espèce très facile à élever, à croissance rapide et de grande taille. Pourtant, ce n'est pas actuellement un bon candidat pour l'aquaculture, les consommateurs n'apprécient pas son aspect un peu effrayant.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Master d'Arianne Savoie, Université de Québec, Canada, publication A54.

5- Formulation d'un aliment pour larves de poissons marins

Après avoir défini les taux de protéines optimum, les différentes formes d'apports protéiques, puis les besoins en lipides totaux, les résultats sur les besoins en phospholipides des larves de bar se sont avérés discriminants dans la formulation d'un aliment pour larves de poissons marins. En effet, pour des aliments identiques par ailleurs, isoprotéiniques, isoenergétiques, la forme d'apport des lipides, lipides neutres ou phospholipides apparaît jouer un rôle primordial dans le développement des larves. Un brevet international a été déposé en 1999 sur cette invention, WO0064273, consultable sur le site <http://www.inpi.fr>.

En tant qu'inventeur et directrice du laboratoire de nutrition des poissons à l'époque, j'ai participé à la rédaction de ce brevet avec le cabinet Harley et Phillip, puis à la vente de la licence d'exploitation à la société Nutreco/Skretting, premier producteur mondial d'aliment pour poissons. Cette société a embauché notre doctorante, Armande Cuvier, qui a eu pour charge pendant 2 ans de passer cette invention à l'échelle commerciale et former les éclosiers à l'utilisation d'un tel aliment en remplacement des proies vivantes.

Outre la négociation d'une certaine somme au départ, ce brevet ramène chaque année des royalties conséquentes aux deux instituts inventeurs, Ifremer et INRA. En effet, des expériences menées en collaboration avec différents pays, et des tests menés par Nutreco lui-même, ont montré que cet aliment est utilisable pour toutes les espèces de poissons marins testés qu'ils soient de la zone tempérée, nordique ou tropicale, comme la daurade, la morue, le flétan, l'ombrine, le barramundi.

6- Conclusions/Résumé

Notre travail avait pour but de comprendre les mécanismes de mise en place et de régulation des fonctions digestives des jeunes larves afin d'en déduire leurs besoins nutritionnels spécifiques. Nos études ont été menées sur un modèle, le bar, puis étendues à d'autres poissons marins. Il est apparu que les larves de poissons marins présentent par rapport à leur poids une capacité enzymatique considérable. Autour de J25 chez le bar, un phénomène de maturation des fonctions digestives se produit, comme chez les vertébrés supérieurs, caractérisé par une forte augmentation des enzymes de la bordure en brosse, associée à une chute de l'activité des enzymes cytosoliques. Une partie du profil des activités enzymatiques au cours du développement est déterminé génétiquement : par exemple, la décroissance de l'activité de l'amylase au cours du développement ne peut être enrayée par une augmentation de la teneur en glucides du régime. D'autres enzymes sont régulées très finement par l'aliment dès les plus jeunes stades: c'est le cas de la phospholipase, dont l'expression est liée à la teneur en phospholipides de l'aliment. Cette fine régulation est associée à un rôle important des phospholipides dans le développement. Nous avons en effet montré que, dès lors qu'un aliment avait une composition protéique adéquate, la teneur en PL était déterminante pour la survie, la croissance et un bon développement des larves.

III- EFFET DE LA VITAMINE A ET DES ACIDES GRAS LONGS POLYINSATURES SUR LE DEVELOPPMENT DE LA LARVE DE BAR ; IMPLICATION DE LA VOIE DES RETINOÏDES

1- Contexte de l'étude

Nos études sur la mise en place des fonctions digestives au cours de l'ontogenèse du bar et sur les besoins nutritionnels spécifiques des jeunes larves nous ont donc permis de formuler un aliment permettant de soutenir le développement et la croissance des larves. Cet aliment composé ouvrait donc toutes les possibilités de progresser dans l'étude du rôle de chaque nutriment dans le développement des larves de poissons marins. Les écloséries de poissons se multipliant dans le monde et produisant de plus en plus d'alevins, le problème identifié se révélait être une qualité médiocre des alevins, 20 à 60% des alevins produits étant affectés de malformations osseuses. Les sources de malformations sont multiples et peuvent être rangées dans 3 catégories : facteurs environnementaux de l'élevage mal adaptés, notamment température trop élevée, facteurs physiques tels que l'hydrodynamique des bassins ou les manipulations d'alevins, facteurs nutritionnels comme certains nutriments fournis en quantité non adéquate. J'ai identifié dans un travail préliminaire de synthèse les nutriments qui en fonction de leur concentration pouvaient avoir un rôle négatif ou positif sur le développement squelettique des larves de poissons [A38]. Parmi ces nutriments, il ressortait les phospholipides, avec notamment le phosphatidylinositol et le phosphatidylcholine, les peptides de différentes longueurs de chaîne, les acides gras longs polyinsaturés et les vitamines.

Il m'a semblé intéressant de comprendre le rôle de deux nutriments différents, les AGLPI et la vitamine A, dont l'action sur le développement de l'axe vertébral et sur la morphogenèse en général et le mode d'action avait déjà été mise en évidence chez les vertébrés supérieurs. La vitamine A, au travers de son dérivé actif l'acide rétinoïque est impliquée dans la différenciation cellulaire (figure 14). L'acide rétinoïque 9-cis et tout-trans passe par des récepteurs nucléaires, RXR (Retinoid X Receptor) et RAR (Retinoid Acid Receptor), qui vont moduler la transcription de certains gènes. La voie de l'acide rétinoïque peut contrôler directement ou indirectement plus de 500 gènes, dont certains impliqués directement dans l'organogenèse et la synthèse osseuse (prolifération des ostéoblastes), tels que les gènes Hox , IGF (Insulin Growth factor), BMP (Bone Morphogenetic Protein), Shh (Sonic hedgehog). Les AGLPI, notamment le DHA, agissent sur d'autres récepteurs nucléaires, les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors). Les PPARs forment avec les RXR des hétérodimères qui vont moduler l'expression de gènes cibles. Il apparaît donc que les voies de signalisation cellulaires de la vitamine A et des AGLPI sont imbriquées dans la voie de signalisation cellulaire des rétinoïdes .

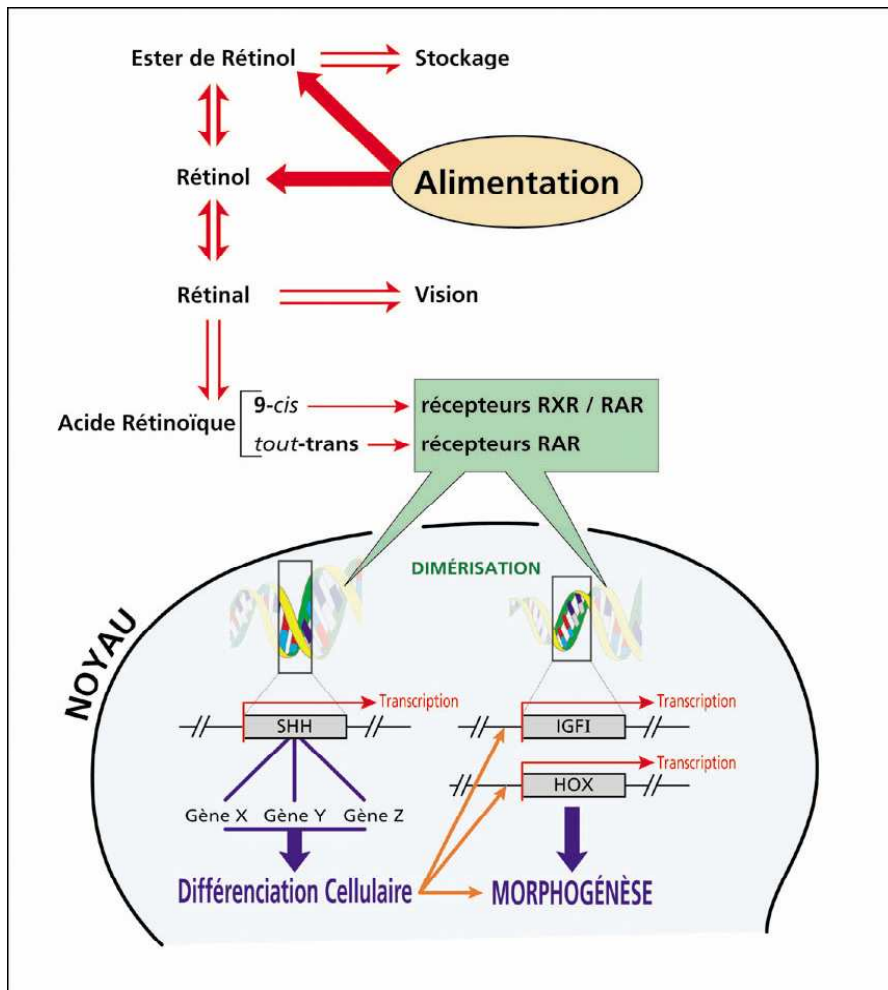


Figure 14. Oxydations successives du rétinol en acide rétinoïque et action de cet acide grâce à ses récepteurs nucléaires au niveau des noyaux cellulaires sur différents gènes.

Ces deux types de nutriments, vitamine A et AGLPI, sont généralement recommandés dans l'alimentation des larves de poissons; l'idée générale qui prévaut est que plus ces nutriments sont apportés en forte quantité, meilleur c'est pour le développement des larves. En effet, la vitamine A est une vitamine antioxydante, qui a un rôle dans la vision, le rétinol fonctionnant comme un pigment absorbant la lumière. Des auteurs japonais ont également émis l'hypothèse qu'elle aurait un rôle dans la mise en place de la pigmentation des écailles sur la face dorsale des poissons plats. C'est une vitamine, c'est-à-dire qu'elle est essentielle pour le fonctionnement de l'organisme, mais que l'organisme ne peut synthétiser. Il faut donc l'amener par voie alimentaire. Mais l'effet tératogène d'un excès de vitamine A a été démontré chez les vertébrés supérieurs et des auteurs japonais ont induit des tératogénies chez des poissons par balnéation des embryons dans des bains d'acides rétinoïques. Par contre, aucun effet par voie alimentaire n'avait été mis en évidence chez les poissons. De la même façon, les AGLPI, particulièrement EPA et DHA, ont un rôle démontré dans le développement des poissons, étant aussi des nutriments essentiels que le poisson ne peut synthétiser. Comme pour la vitamine A, les concentrations optimales pour le développement des poissons n'étaient pas connues et peu de travaux avaient évoqué l'effet d'un excès d'AGLPI sur le développement.

J'ai donc proposé le sujet de thèse suivant : Influence nutritionnelle de la vitamine A et de la nature des lipides sur la morphogenèse de la larve de bar (*Dicentrarchus labrax*) : implication de la voie des rétinoïdes.

2- Expression et localisation de certains gènes au cours du développement des larves de bar

Un travail préliminaire a été de cloner les gènes du développement que nous voulions étudier, localiser leur lieu d'expression dans les tissus larvaires et étudier l'évolution de leur expression au cours du développement normal de la larve de bar. Nous avons introduit et développé dans notre laboratoire les techniques d'hybridation d'ARN *in situ* pour localiser l'expression des gènes et la technique de RT-PCR quantitative pour mesurer leur expression. Notamment, les récepteurs à l'acide rétinoïque ont été clonés : RAR α , RAR γ et RXR α . Le gène de la GAPDH a été également cloné, l'expression de ce gène étant constante au cours de la prolifération cellulaire, l'expression des différents gènes est normalisée en présentant cette valeur comme un rapport de l'expression du gène étudié sur l'expression de la GAPDH. L'IGF-I et le BMP-4, gènes directement impliqués dans le développement, ont également été clonés pour l'étude.

```

Homme      TPEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLWDKFSELSTKCIIKTV
Souris    TPEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLWDKFSELSTKCIIKTV
P. zèbre  SPDTEQMIDRVKAHQETFPSPLCQLGKYTTNNSERRVALDVDLWDKFSELSTKCIIKTV
Bar       -----

Homme      DFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAACLDLILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
Souris    EFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAACLDLILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
P. zèbre  EFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAACLDLILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
Bar       -----TTLTIADQITLLKAACLDLILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
          *****

Homme      GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLICGDRQDLEQPDRVDMLQEPLLEALK
Souris    GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLICGDRQDLEQPKVDMLQEPLLEALK
P. zèbre  GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLLCGDRQDLEQADKVDVLQEPLLEALK
Bar       GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLLCGDRQDLEQAEKVDILQEPLLEALK
          *****:*****.:**:*

Homme      VYVRKRRPSRPHMFPKMLMKITDLRSISAKGAERVITLKMEIPGSMPLIQEMLENSEGL
Souris    VYVRKRRPSRPHMFPKMLMKITDLRSISAKA-----
P. zèbre  IYVRNRRPHKPHMFPKMLMKITDLRSISAKGAERVITLKMEIPGSMPLIQEMLENSEGL
Bar       IYVRRRRPHKPHMFPK-----
          :***.*** :*****

```

Figure 15: Alignement des séquences protéiques de RAR α pour l'homme (AAD05222), la souris (CAA40749), le poisson zèbre (AAB22276) et le bar (AJ496189). Les numéros d'accès sont ceux de la banque de données Genbank. Le domaine de liaison au ligand est surligné en gris et les trois acides aminés essentiels pour la liaison à l'ADN et les propriétés de dimérisation de la séquence humaine sont en rouge. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés dans toutes les séquences alignées.

Des fragments de gènes de 383, 522, 822 et 529 nucléotides ont été obtenus pour RAR α , RAR γ et RXR α et GAPDH respectivement et sont enregistrés à l'EMBL sous les numéros

d'accession AJ496189, AJ496181, AJ567907, AJ567450. Les séquences d'acides aminés déduites de ces séquences de nucléotides montrent un fort niveau d'homologie avec des séquences d'autres organismes, notamment le RAR α présentant 97% d'homologie avec le poisson zèbre, 93% avec la souris et 92% avec l'homme (figure 15).

L'hybridation in situ a révélé un fort niveau d'expression du RAR α dans la mâchoire au tout début du développement, J5 (figure 16). A J37, on observe aussi un fort niveau de RAR α dans les mâchoires, les vertèbres, les nageoires pectorales, mais aussi dans le foie, le muscle, les tissus nerveux et les yeux. Le RAR γ est détecté dans le cartilage et les yeux, le RXR α est observé dans le pancréas, le foie, la thyroïde, les mâchoires et les dents.

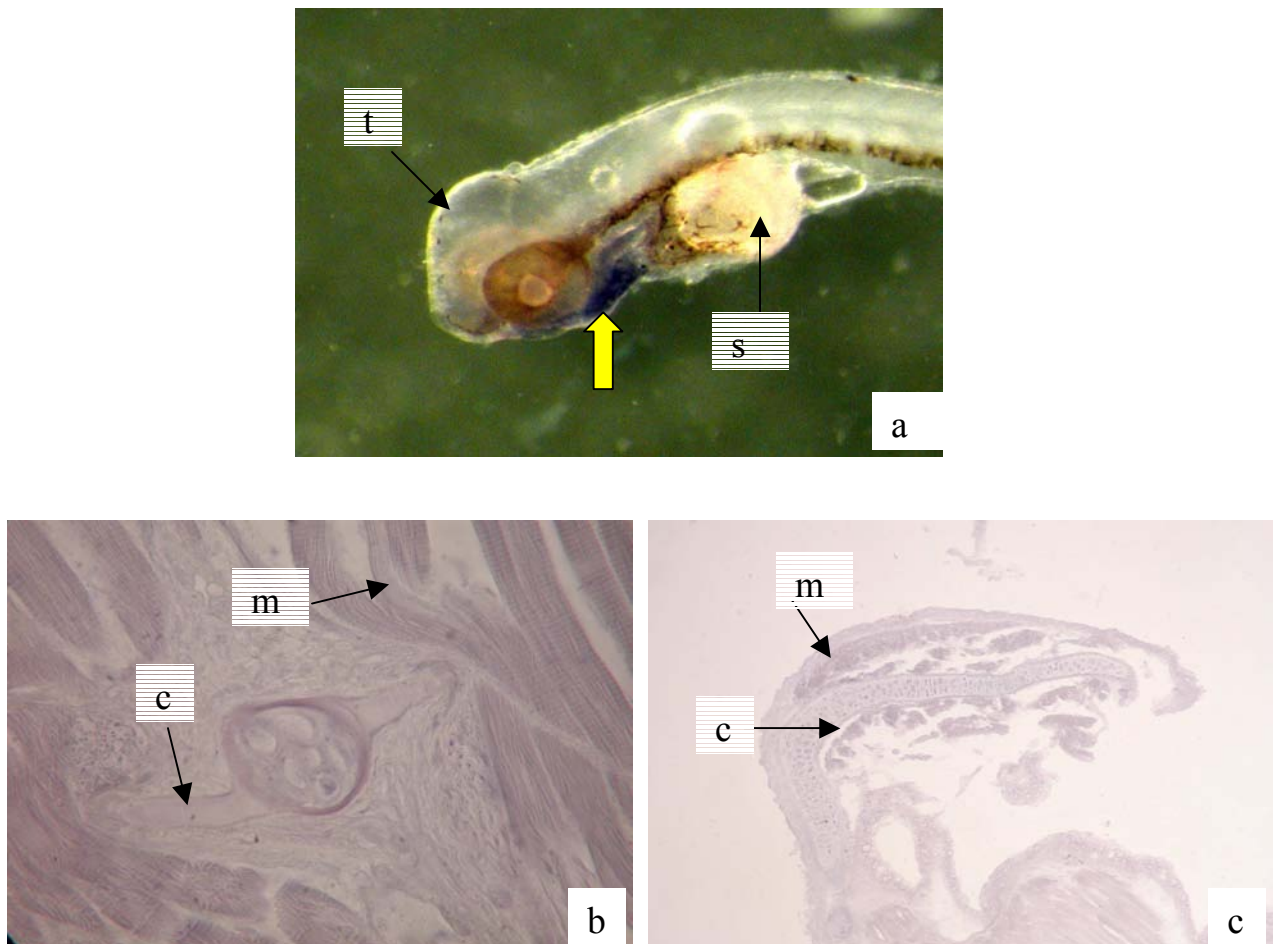


Figure 16: Localisation par hybridations in situ des ARNm de RAR α , RAR γ et RXR α pendant le développement larvaire du bar. (a) Hybridation avec la sonde antisens de RAR α à J5 dans la mâchoire (flèche jaune); t : tête, s : sac vitellin. (b-c) Hybridations avec la sonde antisens de RAR γ à J37, respectivement dans une vertèbre et une nageoire pectorale; c : cartilage, m : musculature.

Il apparaît que l'expression du RXR α est 35 fois plus importante à J10 qu'à J42. Cela suggère que ce récepteur est essentiel au cours des très jeunes stades pendant lesquels les processus de

différentiation tissulaires sont intenses. L'expression du RAR α et du RAR γ augmente au contraire de 7 et 36 fois respectivement au cours de cette même période, montrant que ces récepteurs sont déterminants pour le développement et la morphogenèse [A45].

Parallèlement nous avons réalisé des expériences avec des gradients de vitamine A ou d'ALGPI dans les régimes afin de déterminer l'effet de ces doses sur le développement des larves, évalué par la survie, la croissance, des indicateurs de maturation du tube digestifs précédemment définis et des critères de développement squelettique ainsi que sur l'expression de ces gènes. Le but était de relier des niveaux d'expression des gènes à certaines malformations squelettiques.

3- Effet du taux de vitamine A de l'aliment sur le développement des larves de bar

Cinq taux d'incorporation de la vitamine A dans l'aliment destiné aux larves ont été testés. L'aliment de base utilisé correspondait à la formule du brevet déposé. La vitamine A était incorporée sous forme d'acétate de rétinol *tout-trans*. Le gradient était ainsi composé : 0, 16, 80, 400 et 1600 mg d'acétate de rétinol ajoutés par Kg d'aliment, constituant les aliments RA0, RA 16, RA 80, RA 400 et RA 1600 respectivement.

Ce sont les larves nourries avec l'aliment RA 80 qui ont montré les meilleures croissances, significativement supérieures (20 et 30% respectivement) à celles obtenues chez les larves nourries avec les aliments RA0 et RA1600. Les niveaux de sécrétion de la trypsine et d'expression des enzymes de la bordure en brosse montraient que c'étaient les larves nourries avec ce régime qui présentaient le meilleur développement du tube digestif. Par ailleurs, la survie des groupes nourris avec les régimes extrêmes représentait les deux tiers de la survie obtenue dans le groupe RA80. L'ensemble de ces données montre bien qu'une carence vitamine A (mais pas un niveau 0 de cette vitamine, une certaine quantité de vitamine A étant apportée par les huiles et les farines) et un excès conduisaient à un déficit de développement.

Après avoir été nourries pendant les premières semaines de développement avec ces aliments, jusqu'à J42, tous les groupes ont reçu le même aliment standard pendant 1 mois et demi et une typologie des anomalies du développement osseux a été réalisée sur 1000 alevins. Il est apparu que le nombre de poissons malformés dans un groupe était directement lié au taux de vitamine A dans l'aliment. Dans le groupe recevant l'aliment RA0, moins de 15% des poissons présentaient des malformations, alors que dans le groupe recevant la dose la plus forte de vitamine A, ce pourcentage atteignait 79% (figure 17). Il est à noter qu'il s'agissait principalement dans tous les groupes de malformations de la tête, neurocrane ou splanchnocrane (mâchoire inférieure). Des malformations de la colonne vertébrale apparaissaient également, comme des lordoses ou des scolioses. Les poissons du groupe RA1600 pouvaient présenter plusieurs anomalies.

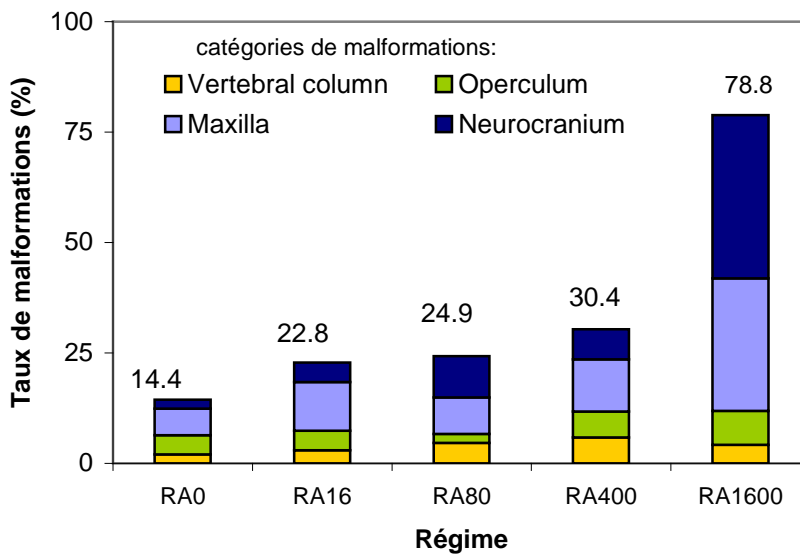


Figure 17. Taux de malformations squelettiques en fonction du régime à J87.

L'expression des gènes $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$, IGF-1 et BMP-4, régulée par l'acide rétinoïque, a été étudiée au cours du développement des larves de chaque groupe et ces valeurs ont été rapportées aux valeurs obtenues dans le groupe RA80 considéré comme le groupe control car c'est celui où le meilleur développement (en terme de croissance, survie, développement des fonctions digestives) était observé. Le résultat le plus marquant était la mise en évidence d'une forte surexpression de $RAR\gamma$ chez les larves nourries avec le régime RA1600 en tout début de développement. En effet, à J10, soit quelques jours après la prise de nourriture, l'expression de $RAR\gamma$ était 82 fois supérieure chez les larves nourries avec ce régime par rapport aux larves nourries avec le régime control. Le taux élevé de malformations céphaliques a été associé à une surexpression précoce du $RAR\gamma$, induite par des taux élevés d'acide rétinoïque [A50].

4- Effet du taux d'AGLPI de l'aliment sur le développement de la larve de bar

Les AGLPI, principalement l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20: 6n-3) et le DHA (acide docohexaénoïque, C22: 6n-3) sont des acides gras longs essentiels au développement des poissons et sont les composants des membranes cellulaires. Ils peuvent être amenés sous forme de triglycérides ou de phospholipides. Ces acides gras sont connus pour moduler l'expression de certains gènes. Ils régulent la transcription de gènes de leur propre métabolisme grâce à leurs récepteurs nucléaires, les PPARs. Les PPARs forment des dimères avec les RXR. Une modification de l'équilibre entre les RXR et les PPARs, par exemple une augmentation des PPARs, perturbe le nombre de récepteurs engagés dans la voie de signalisation des rétinoïdes. La nature et le taux de lipides alimentaires peuvent donc modifier l'expression de récepteurs impliqués dans la croissance, la différenciation et l'homéostasie cellulaire. Nous avons voulu voir de quelle façon la forme d'apport des AGLPI et leur

concentration agissait sur le développement des larves de poisson. Pour cela, nous avons étudié l'effet de ces AGLPI sur la régulation des gènes de la voie des rétinoïdes.

Nous avons utilisé la formulation de base de l'aliment mis au point dans notre laboratoire et nous avons fait varier la forme d'apport et la quantité d'ALGPI de la façon suivante : 3 aliments contenaient les AGLPI dans la fraction phospholipide: l'aliment PL1 en contenait 1,1%, l'aliment PL3, 2,5%, l'aliment PL5, 4,8%. Deux aliments contenaient les AGLPI dans les lipides neutres : l'aliment NL1 1,3%, l'aliment NL3 2,6%. Par ailleurs, tous ces aliments étaient isolipidiques.

C'est le groupe nourri avec l'aliment PL3 qui a donné les meilleurs résultats en survie, croissance et développement des fonctions digestives (figure 18). Les larves nourries avec le régime NL3 ne se sont pas développées et sont mortes avant J30. Les larves du groupe NL1 ont réalisé une faible croissance. Ce premier résultat montrait déjà que la forme d'apport des AGLPI est déterminante : apportés sous forme de lipides neutres, ils sont inopérants. 2,5% d'ALGPI dans l'aliment, apporté sous forme de phospholipide induit les meilleurs résultats alors que la même quantité amenée sous forme de lipide neutre ne permet aucun développement.

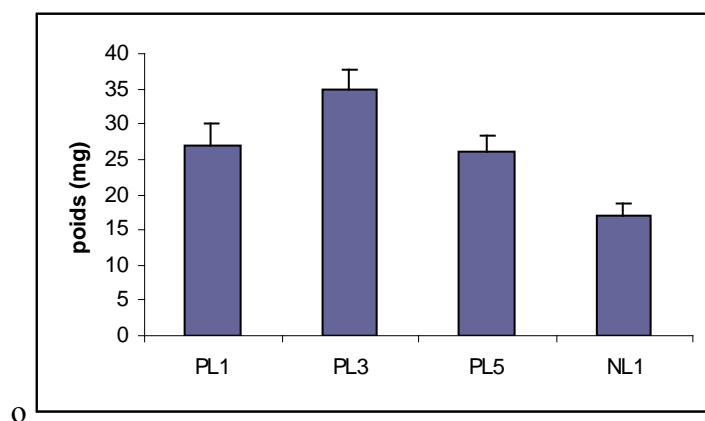


Figure 18. Poids des larves de bar nourries avec les 4 aliments expérimentaux à J37 (les larves nourries avec le régime NL3 sont mortes à J30).

A partir de J37, les larves des différents groupes ont été nourries avec le même régime standard et à J71, les anomalies squelettiques ont été observées. Près de 50% des larves du groupe nourri avec le régime contenant près de 5% d'AGLPI dans les phospholipides montraient des anomalies, alors que ce taux n'était que de 13% chez les larves du groupe PL3 et 6% dans le groupe PL1 (figure 19). Il s'agissait principalement d'anomalies de la colonne vertébrale : lordoses, scoliozes, fusions vertébrales. Il apparaît donc que les ALGPI apportés en excès, induisent une perturbation du développement [A49]. Il faut préciser que cet excès ne représente que le double de la concentration optimale !

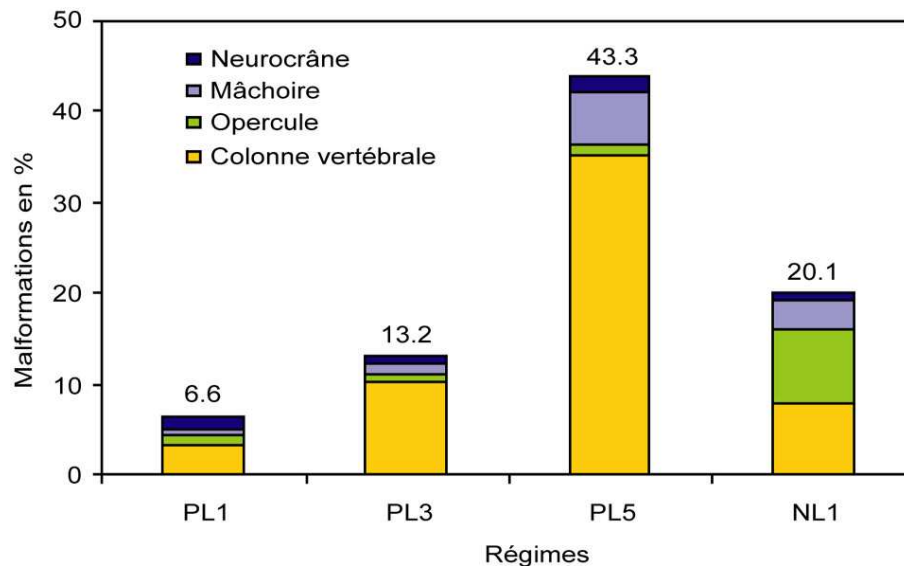


Figure 19. Pourcentage de malformations à J71 chez les juvéniles de bar en fonction des régimes.

L'expression des gènes $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$, IGF-1 et BMP4 n'était pas différente entre les larves des groupes PL1 et PL3 qui présentaient un développement normal. Au contraire, les taux élevés de malformations de l'axe vertébral dans le groupe PL5 ont été associés à une sous expression des gènes $RAR\alpha$, $RXR\alpha$, BMP4, notamment à J16 [A52].

5- Période de sensibilité des larves à un régime contenant un excès de vitamine A ou d'ALGPI

L'effet de la vitamine A et des AGLPI sur le développement de la larve de bar a donc été démontré, et notamment, l'effet négatif d'un excès de ces nutriments sur le développement osseux a été mis en évidence. Ces nutriments ont été distribués pendant tout le développement larvaire, de la première alimentation (J8) à J40. Mais il est connu que des changements majeurs se déroulent très précocement. Par exemple, le développement du neurocrâne et de la mâchoire se fait dans les 20 premiers jours, de la même façon la segmentation de la colonne vertébrale apparaît au jour 20. Il a été démontré chez les mammifères que les nutriments agissent sur l'expression des gènes clés de la morphogenèse pendant des fenêtres de temps bien définies au cours du développement. Nous avons donc voulu voir si l'effet des deux nutriments testés, vitamine A et AGLPI, ingérés en excès, affectaient le développement du bar pendant toute la période larvaire ou à un certain moment.

Nous avons donc nourri trois groupes de larves avec soit le régime control habituel, soit avec le même régime enrichi du taux élevé en vitamine A (80 mg/kg d'acétate de rétinol, régime RA), ou du taux élevé d'AGLPI (50g/kg d'aliment apporté par les phospholipides marins, régime PL). Un groupe de larves était nourri pendant toute la période avec le régime control, les autres groupes recevaient l'aliment RA ou PL pendant la période J8 à J13 (première

alimentation, période A), J13 à J18 (période B), J18 à J23 (période C), et le reste du temps étaient nourris avec l'aliment control (figure 20).

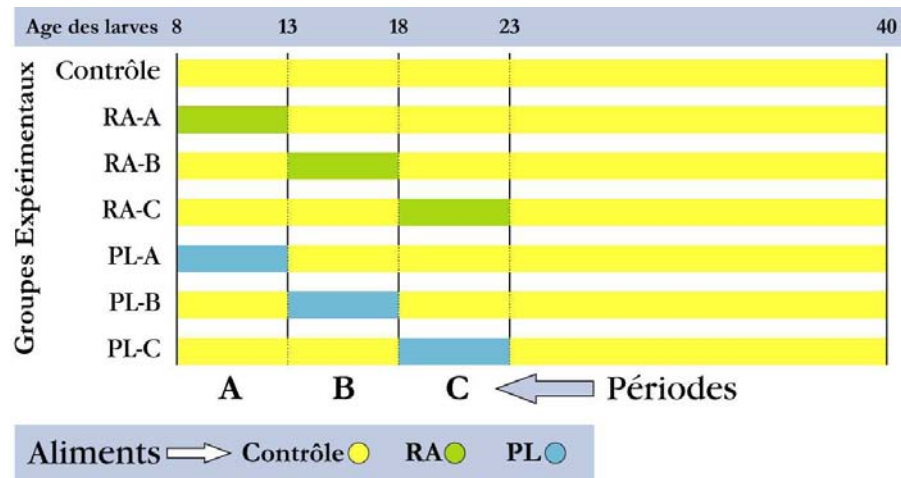


Figure 20. Séquence d'alimentation des 7 groupes de larves de bar

5.1- Croissance, survie, développement digestif

Au jour 25, c'est à dire après la fin des 3 périodes expérimentales, c'est le groupe control qui montrait la meilleure croissance. Les larves nourries avec le régime PL étaient systématiquement plus grosses que les larves recevant le régime RA quelle que soit la période. Il apparaissait que la croissance était d'autant plus faible que la période de nourrissage avec régime PL ou RA avait été précoce. Nous avons également utilisé un indicateur de développement défini dans nos travaux précédents, l'expression de la phosphatase alcaline dans les membranes des bordures en brosses des entérocytes. Cet indicateur montrait dès J25 que les régimes RA et PL avaient négativement affecté le développement du tube digestif, quelle que soit leur période de distribution et que l'effet était d'autant plus prononcé que la période était précoce (figure 21).

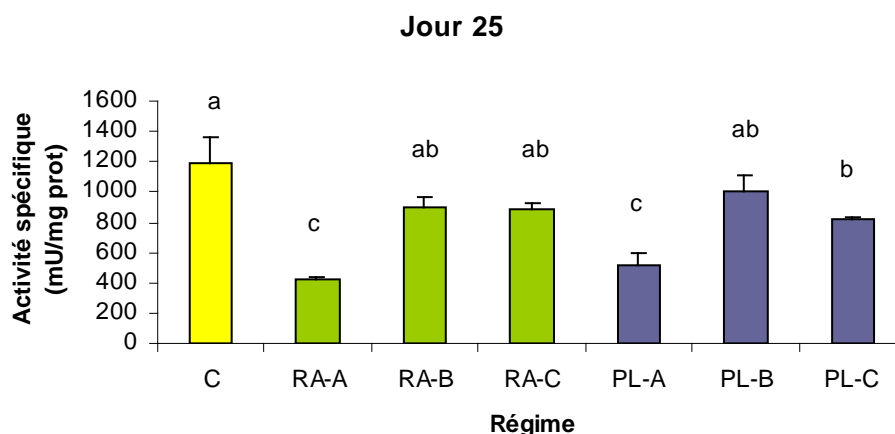


Figure 21. Activité spécifique de la phosphatase alcaline à J25 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET ($n=3$) affectées de lettres différentes pour une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

5.2- Malformations squelettiques

Les malformations squelettiques étaient aussi observées à J37. Le nombre de poissons présentant des malformations de la tête, en particulier de la mâchoire inférieure, était significativement plus élevé dans les groupes recevant de l'aliment RA (12 à 20% dans les groupes RA contre 4 à 8% dans les groupes PL), tandis que les animaux présentant des malformations vertébrales (lordose, scoliose) étaient plus élevés chez les animaux ayant reçu l'aliment PL (20 à 29% dans les groupes PL contre 6 à 9% dans les groupes RA).

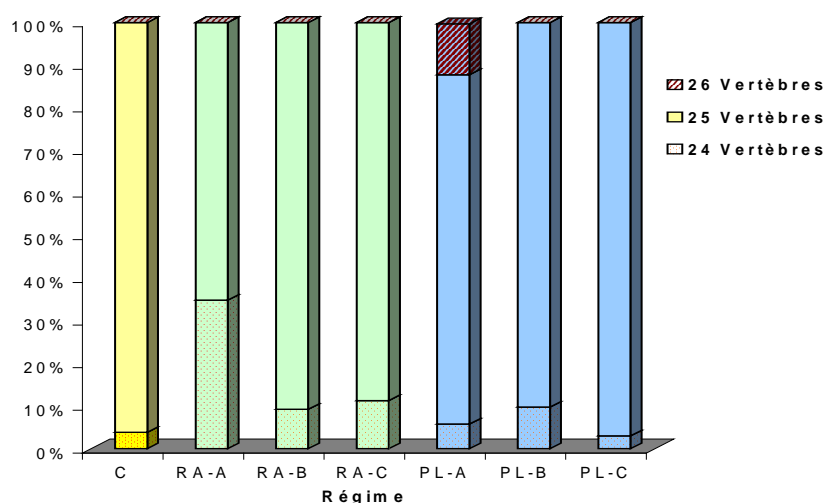


Figure 22. Pourcentage de bars ayant 24, 25 ou 26 vertèbres en fonction du régime.

Le résultat le plus étonnant a été un effet de l'alimentation sur le nombre de vertèbres (figure 22). Le nombre de vertèbres le plus fréquemment observé chez le bar est de 25. Il est apparu que plus de 35% des larves ayant reçu le régime RA en première période d'alimentation ne présentaient que 24 vertèbres. Un excès de vitamine A à cette période induisait significativement la perte d'une vertèbre (analyse de variance à 2 voies : effet de l'aliment $F=21.1$, $P=0.001$, effet de la période $F=8.7$, $P=0.006$). De la même façon, un effet significatif de l'aliment PL ($F=17.8$, $P=0.002$) au cours de la première période d'alimentation ($F=17.2$, $P=0.0006$) était mis en évidence : 13% des poissons de ce groupe présentaient 26 vertèbres. C'est la première fois qu'un effet de l'alimentation précoce sur le nombre de vertèbres était signalé. Jusqu'à présent, une plasticité du nombre de vertèbres avait été associée à la température d'incubation chez le flétan, ou à la triploïdie chez la truite.

5.3- Expression des gènes

L'expression des gènes $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$, IGF et BMP a été étudiée chez ces différents groupes au cours des périodes et les différences statistiques par rapport au groupe control ont été évaluées par des tests de randomisation en utilisant le logiciel REST ©. Les variations de

l'expression de ces gènes par rapport au contrôle pour les groupes nourris avec l'aliment RA sont reportées dans le graphe (figure 23) pour les périodes A et B. En effet, après J23, il n'apparaît que peu de différences d'expression des gènes entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux. La tendance déjà observée de l'augmentation de l'expression des RAR et de diminution de RXR α au cours du développement se confirme.

Chez les animaux recevant le régime RA en première alimentation, il apparaît à la fin de la période A (A-13) une surexpression du RAR γ et du BMP-4. Cette surexpression du RAR γ est en cohérence avec ce qui avait été trouvé dans les précédentes expériences et l'association de la surexpression de ce gène avec l'apparition d'anomalies céphaliques est confirmée. Dans la littérature, il a été montré qu'une synergie entre le BMP et la voie des rétinoïdes peut conduire à des apoptoses cellulaires : en présence de d'une forte expression de BMP-4, l'activation spécifique de RAR peut causer la mort cellulaire. Il est également montré que les BMP et les voies de rétinoïdes peuvent coopérer pour induire la différenciation de préadipocytes en ostéoblastes. On peut donc suggérer que la forte expression de RAR γ et BMP-4 ont conduit à une diminution du nombre des ostéoblastes disponibles pour la formation osseuse et que cela a conduit à une perte d'une vertèbre et à des malformations osseuses dans la région céphaliques.

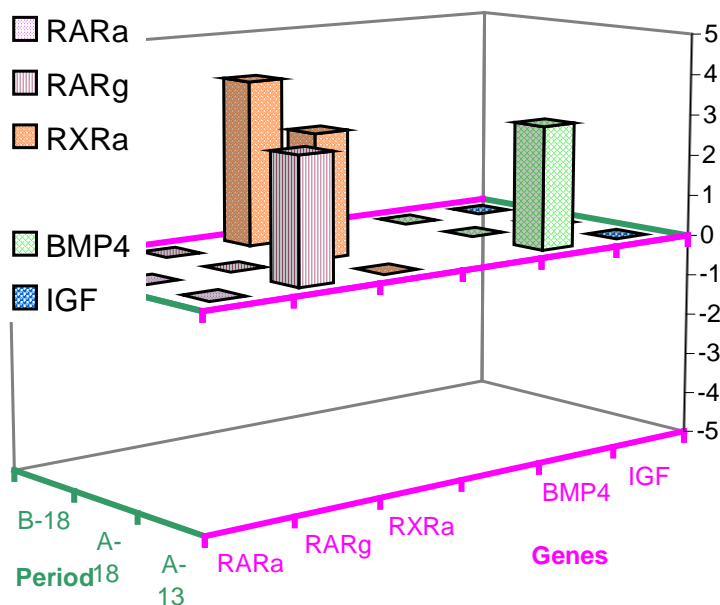


Figure 23: Représentation des variations significatives de la transcription des gènes étudiés pendant les périodes A et B, chez les larves nourries avec l'aliment à forte teneur en vitamine A.

Une forte expression du RXR α est observée à J18 chez les larves ayant reçu l'aliment LP aussi bien en période A qu'en période B et peut s'expliquer par le fait que le DHA est le ligand naturel des PPARs se dimérisant avec les RXR et également un ligand du RXR. Cela peut

donc expliquer la forte transcription des RXR observée chez les larves nourries avec 5% d'AGLPI. La forte expression du BMP-4 à J13 peut avoir amplifié la différenciation des ostéoblastes, chez les larves ayant reçu l'aliment PL, puis sa faible expression à J18 suggérerait que la maturation des ostéoblastes est terminée, des auteurs ayant montré dans la littérature que l'expression du BMP diminue quand la différenciation des ostéoblastes est achevée.

Il apparaît donc que c'est au cours des premiers jours, et notamment entre les jours 8 à 13 c'est à dire correspondant à la première alimentation, que l'action des nutriments sur la morphogenèse est la plus sensible. Pourtant le bar a encore au cours de cette période des réserves vitellines, qui ne seront totalement épuisées que vers le jour 14. L'alimentation est donc mixte, lécitrophe et externe. Mais même si l'alimentation externe n'intervient que pour une part, elle est déterminante au cours de ces jeunes stades.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thèse de Laure Villeneuve, publications A45, A49, A50, A52 et A53.

6- Conclusions/Résumé

Ce travail avait pour but de comprendre comment certains nutriments peuvent affecter le développement normal de la larve de bar. Il est apparu qu'un excès de vitamine A dans l'aliment donné aux larves provoquait un ralentissement de la croissance, et des anomalies dans la mise en place des structures osseuse, notamment au niveau céphalique. Les anomalies de la mâchoire inférieure, souvent constatées dans les écloséries, ont été associées à une surexpression du gène codant pour le RAR γ . Ces études ont également montré que les acides gras longs polyinsaturés alimentaires n'agissent sur le développement larvaire que s'ils sont amenés sous forme phospholipide. La forme lipide neutre est inopérante. S'ils sont fournis à une concentration égale ou supérieure à deux fois la concentration optimale, les AGLPI ont une action tératogène, s'exprimant essentiellement par des malformations de la colonne vertébrale. Ces malformations ont été reliées à une sous-expression des gènes RAR α , RXR α et BMP-4. C'est pendant les premiers jours d'alimentation que les larves présentent une période de sensibilité extrême à un mauvais dosage de ces nutriments.

Perspectives

Mes perspectives de recherches pour les années à venir sont orientées vers la durabilité et la qualité des productions aquacoles. En effet, l'aquaculture est maintenant une activité bien implantée dans le monde. Elle concerne actuellement un nombre limité d'espèces, mais ce nombre est en croissance même s'il reste faible en regard de la diversité biologique des espèces aquatiques et particulièrement marines. Les cycles biologiques sont connus pour les espèces élevées : reproduction, élevage larvaire, grossissement. De nombreux facteurs interviennent pour déterminer la durabilité et la qualité des productions aquacoles : les systèmes d'élevage et leur intégration dans le système socio-économique, la limitation des pollutions dues aux productions aquacoles, et la qualité du produit offert au consommateur. La nutrition des espèces en élevage intervient pour une grande part dans ces deux derniers paramètres : le mode d'alimentation et la composition des aliments peuvent permettre de limiter la pollution liée aux élevages et la nutrition est un des principaux facteurs intervenant sur la qualité du poisson offert au consommateur. En effet, nos travaux précédents ont démontré que un développement harmonieux des larves de poisson était lié à une alimentation adaptée, un léger déséquilibre pouvant entraîner des déformations squelettiques préjudiciables au développement ultérieur et à l'aspect visuel du poisson (scolioses, lordoses, déformation de la tête). Outre son action sur la conformation morphologique du poisson, l'alimentation est le principal facteur agissant sur la qualité organoleptique et nutritionnelle du filet offert au consommateur (Regost et al. 2003, Cahu et al., 2004). La qualité de la chair du poisson sera à maintenir et à améliorer dans un contexte de remplacement des sources de protéines et de lipides marins par des sources végétales dans les prochaines années. Mes études lors les prochaines années seront donc orientées vers ces deux aspects : principalement la connaissance de l'effet des nutriments sur le développement des larves de poisson et dans une moindre mesure, l'influence de l'alimentation du poisson sur la qualité du filet produit.

I- L'EFFET DES NUTRIMENTS SUR LE DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE DES LARVES DE POISSON

L'aquaculture repose sur la production d'alevins de qualité en éclosérie. En 2004, on estime à 800 millions le nombre d'alevins de bar et de daurade produits par les pays méditerranéens (France, Grèce, Italie, Espagne, Turquie). Avec l'augmentation de la production, une augmentation du nombre de poissons présentant des malformations s'est révélée. L'incidence de ces malformations serait de 15 à 40% pour les déformations de l'opercule, 10 à 30% pour les déformations de la mâchoire et 10 à 40% pour les déformations vertébrales. Ces malformations sont parfois létales, parfois les poissons se développent avec des anomalies visibles et des retards de croissance importants. Le nombre d'anomalies affectant les alevins dans la nature est inconnu, ces individus mourant pendant les très jeunes stades, ne pouvant nager correctement et trouver leur nourriture. Il faut rappeler que dans la nature, à un couple

de reproducteur succède un couple de descendant, ce qui correspond à une survie de l'ordre de 1 sur 500 000, alors que la survie en éclosion atteint 50% (entre la larve à l'éclosion et l'alevin entrant en prégrossissement).

1- Effet des nutriments pendant la vie larvaire

1.1-Contexte

Différentes études ont suggéré que les causes de malformations des alevins en éclosion étaient diverses (Divanach et al., 1996) : environnementales, génétiques, nutritionnelles. L'importance de ce problème ayant été identifié par les producteurs et les scientifiques, un projet Européen (Collective Research Proposal), FINE FISH, est financé par l'Europe et a commencé fin 2005, pour une durée trois ans (19 partenaires). Trois types de paramètres seront étudiés :

- la température d'élevage : il est apparu qu'une température d'élevage un peu trop élevée a un effet tératogène (Baeverfjord 1998). Les élevages en éclosiers sont souvent réalisés à des températures supérieures aux températures naturelles pour accélérer le développement ;
- les autres paramètres environnementaux : salinité, oxygène, renouvellement de l'eau, courant, hydrodynamique du bassin, dont un effet sur le développement a déjà été suggéré (Chatain, 1994, Lein et al, 1997). L'hypothèse est qu'une qualité médiocre de l'eau, comme un PH bas, agirait en mobilisant les réserves minérales du squelette et réduirait la concentration en proline et hydroxyproline, agissant ainsi sur le cartilage. (Hamilton et Haines, 1989)
- les facteurs nutritionnels : notre groupe se chargera plus particulièrement de cet aspect. J'ai rédigé en 2003 avec un collègue japonais une revue faisant le point sur les facteurs nutritionnels dont l'effet sur les malformations avait été suggéré ou démontré chez différentes espèces de poissons, notamment le bar *Dicentrarchus labrax* et le flétan japonais, *Paralichthys olivaceus* (Cahu et al, 2003). Depuis, l'effet de la vitamine A a été mieux expliqué (Haga et al., 2003, Villeneuve et al., 2005a). De même, l'effet des AGLPI a été étudié dans notre laboratoire (Villeneuve et al., 2005b, Gisbert et al., 2005). Nous avons montré comment la vitamine A par la voie des rétinoïdes (Retinoid A Receptor, RAR, et Retinoid X Receptor, RXR) et les AGLPI par la voie des PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) pouvait moduler l'expression de certains gènes impliqués dans le développement comme IGF-1 (Insulin Growth Factor) et BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein).

1.2- Expériences prévues

Les résultats que nous avons obtenus sur cet aspect et les études prévues sont résumés dans le schéma 24.

Action des Nutriments sur le Développement et la Morphogénèse

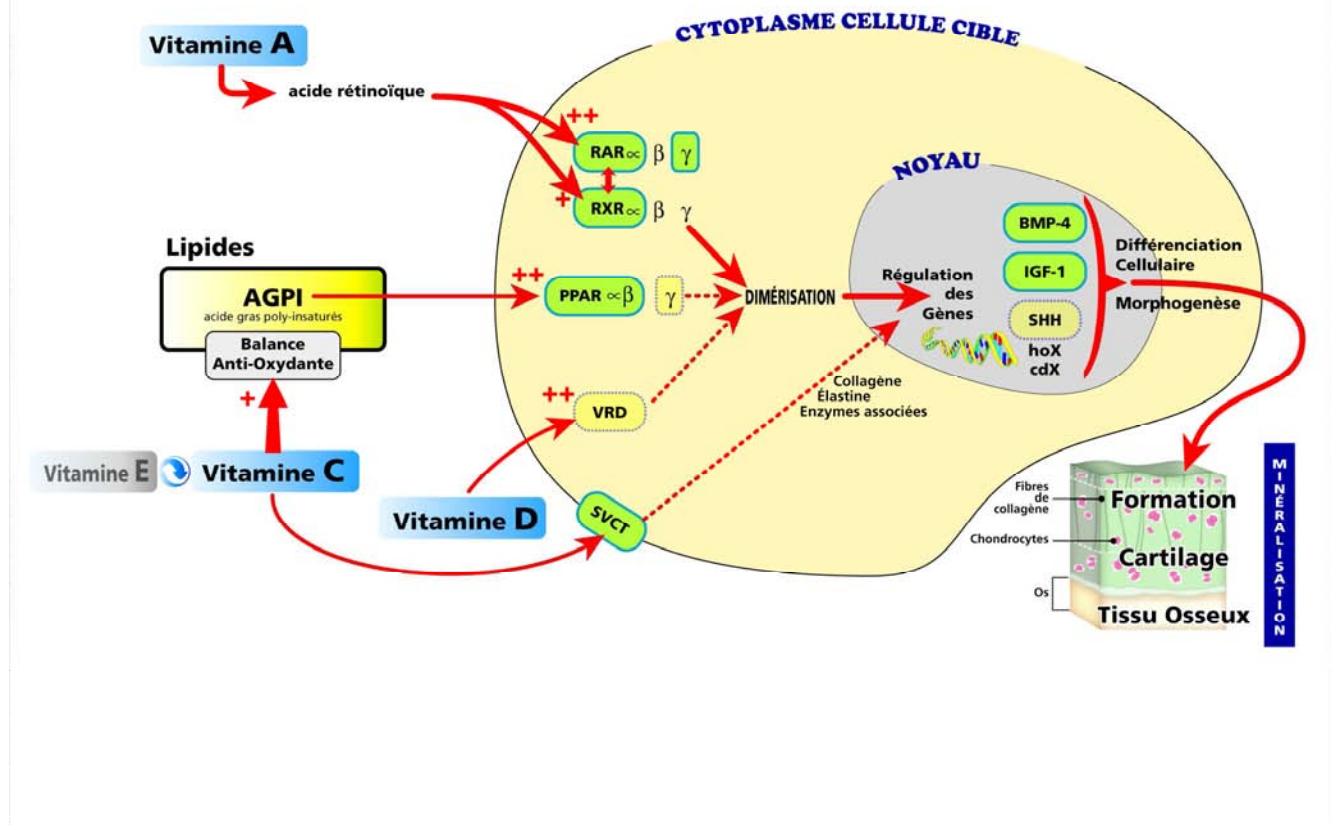


Figure 24. Action des AGLPI et des vitamines sur la morphogénèse et notamment la formation osseuse chez les vertébrés. Les nutriments agissent sur un récepteur cellulaire (RAR, RXR pour la vitamine A, VDR pour la vitamine D, PPAR pour les AGLPI). Ces récepteurs régulent l'expression de nombreux gènes intervenant dans le développement, tels que BMP-4, IGF-1, Shh... L'expression de ces gènes modulera la formation d'ostéoblastes et la mise en place du tissu osseux.

Besoin global en vitamines

Dans un premier temps, nous réaliserons une étude globale sur les besoins en vitamine chez les larves de poisson. En effet, jusqu'à présent, dans les aliments expérimentaux comme dans les aliments du commerce pour larves d'eau douce (carpe) comme pour larve de poissons marins (bar), la teneur en mélange vitaminique est de 8% de la matière sèche de l'aliment¹ alors que les besoins définis pour les juvéniles est de 1% (Kaushik et al., 1998).

Ces vitamines sont certainement amenées au-delà des besoins réels des larves. En effet, les besoins en chaque vitamine étant impossibles à déterminer en absence d'aliment composé, cette quantité a été évaluée de façon très large, afin d'être sûrs de couvrir les besoins. Maintenant que les besoins en protéine, lipides, énergie des larves ont été précisés et qu'un aliment permettant une bonne croissance est disponible, les besoins en vitamine pourront être étudiés de façon précise. La première expérience consistera à faire une courbe dose-réponse, pour savoir jusqu'à combien cette concentration peut être diminuée sans effet sur le développement. A partir du moment où une concentration induira une baisse de croissance, de survie ou de qualité des larves, cela signifiera que la teneur de une ou plusieurs vitamines est limitante. Cette expérience aura donc pour but de préciser les besoins globaux en vitamine et de pouvoir faire les expériences suivantes, sur chaque vitamine, avec un mélange non surdosé. Les expériences seront faites sur le bar, les résultats seront ensuite validés sur d'autres espèces.

Besoins spécifique en vitamine C et D

En plus de la vitamine A, d'autres vitamines, comme la C (acide ascorbique) ou la D (calciférol), peuvent intervenir sur la régulation des gènes du développement. En effet, leurs voies de signalisation cellulaire pourraient interagir avec la voie des rétinoïdes (Yu et al. 1991, James et al. 2003). En effet, des malformations osseuses ainsi que d'autres malformations organiques ont été observées chez des larves de bar ou de milkfish *Chanos chanos* ayant une alimentation déficiente en vitamine C (Gaspin et al., 1998). L'action de la vitamine C s'explique à la fois par son intervention dans la formation du collagène, et par son action d'antioxydant biologique. Les besoins en vitamine C seront bien sûr évalués lors d'une courbe dose-réponse par la survie, la croissance et la présence de malformation chez les larves. Mais ceci est insuffisant pour établir des besoins en vitamine C. Le niveau de saturation des tissus en acide ascorbique constitue aussi un indicateur des besoins (Fournier et al. 2000), la teneur en acide ascorbique des larves sera donc dosée. Ces données seront reliées à l'expression du gène du transporteur sodium-dépendant de la vitamine C (SVCT) et nous verront comment l'expression des gènes du développement varie avec l'expression de SVCT. Ce gène a été cloné récemment pour le bar dans notre laboratoire. Il a été montré récemment sur des cultures cellulaires humaines que l'expression du gène SVCT diminue lorsque des fortes doses de vitamine C sont administrées (Mac Donald et al., 2002). Il est par ailleurs connu que l'absorption intestinale de la vitamine C diminue lorsque des fortes doses sont administrées

¹ Le mélange est le suivant, par kg de mélange de vitamine: concentrât de choline 50% 200 g, rétinyl acétate 340 mg, vitamine E (500 UI/g) 10 g, vitamine D3 (500000 UI/g) 500 mg, vitamine B3 1 g, vitamine B5 2 g, vitamine B1 100 mg, vitamine B2 400 mg, vitamine B6 300 mg, vitamine C 20 g, vitamine B9 100 mg, concentrât de vitamine B12 (1g/kg) 1g, biotine 1 g, vitamine K3 1g, meso-inositol 30 g, cellulose 732.1 g.¹

chez l'humain (Graumlich et al. 1997). Ces expériences nous permettront donc de comprendre comment agit la vitamine C au cours du développement de la larve de bar et nous permettra de déterminer les besoins.

La vitamine D (forme active D3) joue un rôle essentiel dans un grand nombre d'évènements biologiques, comme l'homéostasie calcique, la différenciation cellulaire et la formation et le métabolisme des os. Elle se lie à son récepteur cellulaire, le VDR (Vitamin D Receptor), qui forme un hétérodimer avec un RXR. Cet hétérodimer VDR-RXR active les gènes cibles et régule leur expression (Kato, 2000). Ces gènes tels que BMP-4, IGF-1, SHH, Hox et cdx contrôlent la différenciation cellulaire et la formation du cartilage et du tissu osseux. Deux types de VDR ont été identifiés chez le flétan japonais, *Paralichthys olivaceus*, alors que seulement un récepteur est connu chez les tétrapodes (Suzuki et al., 2000). L'effet de différentes doses de vitamine D sera étudié sur le développement des larves, et on essaiera de relier l'expression du récepteur à la vitamine D à celle de différents gènes du développement, afin de comprendre comment les différentes doses de vitamine D affectent le développement osseux au cours de la vie larvaire. En effet, il est connu qu'une hypervitaminose à la vitamine D a des conséquences très néfastes chez les mammifères en développement. Chez les poissons, les données actuelles sont contradictoires : Rao et Raghuramulu (1999) ont montré que la vitamine D3 n'avait aucun rôle dans le métabolisme calcique alors que Swarup et al. (1991) montraient que cette vitamine apportée en excès chez les poissons induisait une hypercalcémie et une hyperkaliémie.

Ces expériences seront réalisées sur le bar avec le régime de base mis au point dans notre laboratoire. La concentration et la composition l'apport minéral interviennent certainement dans la mise en place d'une bonne constitution squelettique. Les premières expériences seront réalisées en utilisant le mélange minéral classique de l'aliment², amené à 4%, puis d'autres concentrations et compositions seront testées. Les expériences seront conduites sur le bar et les résultats seront validés par les autres partenaires (the Center of Marine Science (Portugal), the National Center for Mariculture (Israël), the University of Patras (Grece), the Royal Veterinary College (UK), Akvaforsk (Norvège)) sur les autres espèces étudiées dans le projet : la daurade, la morue, le saumon.

Effet d'un apport en lipides oxydés et protection par les vitamines antioxydantes

Il a été montré que des carpes ou des esturgeons nourris expérimentalement avec des lipides oxydés présentaient des malformations musculaires ou spinales (Hata and Kaneda, 1980, Fontagné et al., 2004). L'oxydation des aliments peut être facilement évitée s'ils sont conservés dans des conditions correctes (endroit frais et sec), mais des malformations parfois observées sur des poissons nourris avec des régimes contenant des forts taux d'AGLPI pourraient être dues à une oxydation in vivo des acides gras. Les vitamines A, C et E (α -tocophérol) agissent comme antioxydant cellulaire et un équilibre AGLPI/antioxydants doit

² La composition du mélange minéral actuel est la suivante par kg de mélange minéral: KCl 90 g, KI₄O 40 mg, CaHPO₄ 2H₂O 500 g, NaCl 40 g, CuSO₄ 5H₂O 3 g, ZnSO₄ 7H₂O 4 g, CoSO₄ 7H₂O 20 mg, FeSO₄ 7H₂O 20 g, MnSO₄ H₂O 3g, CaCO₃ 215 g, MgSO₄ 7H₂O 124 g, NaF 1g.

être respecté dans l'aliment pour éviter cette peroxydation in vivo. Nous testerons donc cet équilibre AGLPI /vitamines alimentaires sur le développement des larves.

Nos études sur notre espèce modèle, le bar, ont jusqu'à présent été réalisées avec l'approche gène-candidat. L'accès à une base de 30 000 EST (Expressed Sequence Tags) actuellement disponible en Europe nous permettra d'explorer un grand nombre de gènes impliqués à un dans le développement de la larve de bar, éventuellement exprimés pendant des périodes déterminées, et modulés par les facteurs alimentaires.

2- Effet de l'alimentation maternelle sur la descendance

Le développement des larves de poisson est apparu particulièrement affecté par les facteurs nutritionnels lors des premiers jours de vie, alors qu'ils s'alimentent encore en partie sur leurs réserves vitellines. Pendant les phases précédentes, c'est à dire pendant le développement embryonnaire (4 jours chez le bar) et les premiers jours de vie libre pendant lesquels la bouche n'est pas ouverte (6 jours chez le bar), la lécitotrophie est la seule source d'alimentation. Pendant ces phases, l'organogenèse et la morphogénèse sont intenses. De nombreux auteurs ont montré l'influence de l'alimentation des géniteurs sur la qualité des alevins à l'éclosion. Notamment, la viabilité des alevins a été reliée à leur teneur en AGLPI, elle-même reliée à la teneur en AGLPI des aliments donnés aux géniteurs (Lavens et al. 1999). J'avais moi-même obtenu des résultats dans ce sens sur les crevettes (Cahu et al. 1995).

Par ailleurs Haga et al (2002) ont montré que les stades embryonnaires de *Paralichthys olivaceus* sont très sensibles à l'action tératogène de la vitamine A: Ces auteurs obtenaient de nombreuses malformations en immergeant des œufs dans des bains de différents isomères de l'acide rétinoïque. Nous avons donc commencé un projet ayant pour but de voir comment des doses croissantes de vitamine A dans l'alimentation des géniteurs de truites affectaient le développement embryonnaire et post-embryonnaire des alevins. Le développement osseux sera étudié en liaison avec l'expression des gènes BMP-4 et Shh. Le développement musculaire sera étudié, en collaboration avec l'UMR Différenciation Cellulaire et croissance de l'Inra Montpellier, notamment par l'expression des facteurs myogéniques, évalué par l'hybridation in situ du gène MyoD.

II- LES SOURCES ALTERNATIVES DE PROTEINE ET DE LIPIDE DANS L'ALIMENTATION DES POISSONS

A coté de l'étude du développement larvaire, l'autre axe de recherche du groupe est la recherche de protéines et de lipides de substitution aux sources marines pour l'alimentation des poissons. Le groupe est engagé dans différents projets sur cet aspect. Pour ma part, je suis impliquée dans un projet dont le but est de déterminer l'effet de la suppression de l'huile de poisson dans l'alimentation de la truite sur son métabolisme intestinal et hépatique. L'étude

porte sur l'expression des gènes clef de ce métabolisme. L'approche gènes candidats sera utilisée pour voir comment l'expression des gènes des enzymes digestives, aminopeptidase, lipoprotéine lipase, ou du métabolisme lipidique comme la fatty acid synthétase, l'acylCoA Oxydase ou la delta-6-désaturase sera affecté par cette suppression d'huile de poisson. L'approche génomique, réalisées avec des puces à ADN génériques de truite hybridées avec des ARN totaux hépatiques des truites alimentées avec des huiles de poisson ou non nous permettra d'explorer les gènes différemment exprimés entre les deux groupes. Cela permettra également d'accéder à une connaissance plus complète du métabolisme lipidique chez la truite.

III- REFERENCES

Baeverfjord G, Lein I, Aasgaard T, Rye M, Storset A, 1998. High temperature during egg incubation may induce malformations in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In Aquaculture and water. EAS special publication 26: 24-25.

Cahu C., Cuzon G., Quazuguel P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112A: 417-424.

Cahu C., Zambonino Infante JL, Takeuchi T., 2003. nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture 227: 245-258.

Cahu C., Salen P., de Lorgeril M., 2004. Farmed fish and wild fish for the prevention of cardiovascular diseases : assessing possible difference in lipid nutritional value. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 14: 34-41.

Chatain B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). Aquaculture 119: 371-379.

Divanach P., Boglione C., Menu B., Komoudouros G., Kentouri M., Cautadella S. 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problems, causes and solutions;. In Sea bass and sea bream culture: problems and projects. Verona-Italy. Handbook of contributions and short communications: 45-51.

Fontagné S., Rouault T., bergot P., 2004. Effect of oxidized lipids and vitamin A on early development and antioxidant status in Siberian sturgeon larvae ; 6th Congress of international society for the study of Fatty Acids and lipids ; June 27-july 1, 2004. Brighton UK, p. 115.

Fournier V., Gouillou-Coustans MF, Kaushik S., 2000. Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Nutr. 130: 617-620.

Gaspin RSJ, Bombeo R., Lavens P. Sorgeloos P., Nelis H., 1998. Enrichment of live food with essential fatty acid and vitamin C: effect on milkfish *Chanos chanos* larval performance. Aquaculture 162: 269-286.

Gisbert E., Villeneuve L., Zambonino-Infante JL., Quazuguel P., Cahu C., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for highly unsaturated fatty acid supply in European sea bass larval development. Lipids, 40 : 609-618.

Graumlich JF, Ludden TM, Conry-Cantilena C., Cantilena LR, Wang Y , Levine M., 1997. Pharmacokinetic modele of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion. Parmaceutic. Res.14: 1133-1139.

- Hata K., Kaneda T. 1980. Effect of autoxidized oil on carp. Bull. Jpn. Soc. Sci. fish. 46: 997-1000.
- Haga Y., Suzuki T., Takeuchi T., 2002. Retinoic acid isomers produce malformations in post-embryonic development of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Zool. Sci. 19: 1105-1112.
- Haga Y., Suzuki T., Kagechika H., Takeuchi T., 2003. A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 221: 381-392.
- Hamilton SJ, Haines TA, 1989. Bones characteristics and metal concentrations in white suckers (*Catesomus commersoni*) from one neutral and three acidified lakes in Maine. Can. J. Fish. Sci. 46: 440-446.
- James S.Y., Lin F., Kolluri SK, Dawson MI, Zhang XK, 2003. Regulation of acid retinoic acid receptor β expression by peroxisome proliferator-activated receptor ligands in cancer cells. Cancer res., 63: 3531-3538.
- Kato S., 2000. Molecular mechanism of transcriptional control by nuclear vitamin receptors. Br. J. Nutr., 84: S229-S233.
- Kaushik SJ, Gouillou-Coustans MF, Cho CY., 1998. Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and seabass using practical and purified diets. Aquaculture 161: 463-474.
- Lavens P., Lebegue E., Jaunet H., Brunel A., Dgert P., Sorgeloos P., 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. Aquac. Internat. 7: 225-240.
- Lein I., Holmefjord I., Rye M., 1997. Effect of temperature on yolk sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 157: 123-135.
- Mac Donald L., Thumser A., Sharp P., 2002. Decreased expression of the vitamin C transporter SCCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line. Br. J. Nutr. 87: 97-100.
- Rao DS., Raghuramulu N., 1999. Vitamin D₃ and its metabolites have no role in calcium and phosphorus metabolism in *Tilapia mossambica*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 45: 9-19.
- Regost C., Arzel A., Cardinal M., Rosenlund G., Kaushik SJ, 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*). Flesh quality properties. Aquaculture 220: 737-747.
- Suzuki T., Suzuki N., Srivastava A., Kurokawa T., 2000. Identification of cDNAs encoding two subtypes of vitamin D receptor in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 270: 40-45.
- Swarrup K., Das VK, Norman AW., 1991. Dose dependent vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male cyprinoid *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. 100: 445-447.
- Villeneuve L., Gisbert E., Le delliou H., Cahu C., Zambonino Infante JL., 2005a. Dietary Levels of all-trans retinol affect retinoid receptors expression and skeletal development in European sea bass larvae. Br. J. Nutr., 93: 791-801

Villeneuve L, Gisbert E, Zambonino Infante JL, P. Quazuguel P., Cahu C., 2005b. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *Brit. J. Nutr.* In press

Yu VC, Delsert C., Andersen B., Holloway JM, Devary OV, Naar AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG, 1991. RXR β : a coregulator that enhance binding of retinic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67: 1251-1266.