

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE III**  
**FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE SAINT-JÉRÔME**

N° d'identification

01Aix30015

**Thèse**

présentée par

***Yann MOREAU***

*pour l'obtention du grade de DOCTEUR EN SCIENCES*

**ÉCOLE DOCTORALE**  
**SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**  
*Spécialité*  
**BIOCHIMIE DE LA NUTRITION**  
**Aspects moléculaires et cellulaires**

**Couverture des besoins énergétiques  
des poissons tropicaux  
en aquaculture**

*Purification et comparaison des amylases de deux tilapias  
Oreochromis niloticus et Sarotherodon melanotheron*

**Soutenue le 8 Février 2001**

Devant la commission d'examen composée de :

Pierre BESANÇON	Professeur	Rapporteur
Jean-François SAMAIN	Directeur de recherche	Rapporteur
Jérôme LAZARD	Directeur de recherche	Examineur
Antoine PUIGSERVER	Professeur	Directeur de thèse
Guy MARCHIS-MOUREN	Professeur	Examineur

**IMRN**  
**Institut Méditerranéen  
de Recherche en Nutrition**

**IRD**  
**Institut de Recherche  
pour le Développement**

à Matou pour avoir supporté et accepté toutes les  
contraintes propres à ce travail,

à Sylvia, Yolande et Anta pour m'avoir apporté  
réconfort et appui,

à ma famille pour y avoir cru jusqu'au bout,

à mon père avec qui j'aurais aimé partager cette  
dernière réflexion :

*« Je ne sais si le Mieux est l'ennemi du  
Bien, mais il apparaît bien souvent l'ami  
du Rien. »*

## REMERCIEMENTS

Mes premières pensées vont à mon directeur et à mon parrain de thèse, les professeurs Antoine Puigserver et Guy Marchis-Mouren qui m'ont permis de réaliser ce travail et m'ont aidé à le mener à terme, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude qui leur revient à juste titre. J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à MM. Le Prof. Pierre Besançon et Jean-François Samain pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et à M. Jérôme Lazard pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je voudrais remercier l'ensemble de mes collègues et partenaires du LBBN, Laboratoire de Biologie et Biochimie de la Nutrition devenu depuis Institut Méditerranéen de Recherche en Nutrition, qui ont rendu possible par leur soutien et leur conseil la réalisation de bon nombre d'étape de ce travail, avec plus particulièrement Mme Véronique Desseaux et M. Marius Santimone. Je tiens aussi à remercier, MM. Claude Villard et Jacques Bonicell (CNRS, Marseille) pour leur aide technique et la réalisation d'analyses.

Je me dois aussi de remercier les collègues et étudiants de tous les groupes de recherche avec lesquels j'ai pu travailler en Côte d'Ivoire, en Guyane française, du Brésil, au Viêt-Nam et en Indonésie qui par leur aide, leur réflexion ou leur soutien ont eux aussi contribué de façon notable à la bonne poursuite de cette tâche. Mes remerciements vont aussi à mes collègues du CIRAD, du CEMAGREF, de l'INRA et de l'IRD, ex ORSTOM bien sûr, avec qui j'ai eu et j'aurai toujours plaisir à travailler.

Je voudrais enfin exprimer toute ma gratitude à mes collègues et amis, El Hassan Ajandouz, Brigitte Bournier, Jean-Claude Chaix, Christian Colin, Véronique Desseaux, Sybille Farine, Saurin Hem, Lê Thanh Hùng, Roger Koukiekolo, Jérôme Lazard, Marc Legendre, Sevastianos Roussos, Jacques Slembrouck, Nonato Teixeira, Claude Villard qui d'un geste, d'une phrase ou d'un comportement m'ont apporté aide, soutien, appui et réconfort. La liste est longue mais certainement incomplète et je m'excuse par avance auprès de tous ceux que j'aurai pu oublier.



# PLAN

Plan.....	i
Liste des abréviations.....	iv
Publications et communications liées à la thèse .....	vii
Introduction .....	1
<b>Chapitre I Exposé bibliographique.....</b>	<b>3</b>
I.1 L'alimentation en énergie des poissons.....	4
I.1.1 Facteurs influant sur la dépense énergétique.....	6
I.1.1.1 Les dépenses minimales.....	7
I.1.1.2 La croissance .....	8
I.1.1.3 La reproduction.....	17
I.1.1.4 L'activité physique .....	18
I.1.2 Valeur énergétique des aliments.....	18
I.1.3 Mode de couverture des besoins.....	19
I.1.3.1 Identification des substrats potentiellement utilisables.....	19
I.1.3.2 Utilisation des protéines comme substrat énergétique.....	22
I.1.3.3 Utilisation des glucides comme substrat énergétique.....	23
I.1.3.4 Estimation des besoins alimentaires en énergie.....	27
I.2 La digestion chez les poissons Téléostéens.....	30
I.2.1 Anatomie de l'appareil digestif.....	30
I.2.1.1 La bouche et le pharynx.....	31
I.2.1.2 L'estomac.....	31
I.2.1.3 Les appendices pyloriques.....	32
I.2.1.4 L'intestin.....	34
I.2.1.5 Le foie.....	35
I.2.1.6 Le pancréas.....	35
I.2.2 Fluides digestifs et enzymes.....	37
I.2.2.1 Sécrétions non-enzymatiques.....	37
I.2.2.2 Sécrétions enzymatiques.....	39
I.2.2.3 Adaptation au régime alimentaire.....	43
I.2.2.4 Influence de la flore microbienne.....	44
I.2.2.5 Mode et site d'adsorption des nutriments.....	44
<b>Chapitre II Matériel et méthodes.....</b>	<b>48</b>
II.1 Matériel biologique et conditions expérimentales.....	48
II.1.1 Les poissons.....	48
II.1.2 Préparations des aliments.....	49
II.1.3 Conditions d'élevages.....	51
II.1.4 Calcul des indices et analyse statistique .....	53
II.2 Méthodes d'analyses en expérimentation animale .....	54
II.2.1 Analyse des aliments, des poissons et des fèces.....	54
II.2.1.1 Analyse proximale.....	54
II.2.1.2 Calcul de l'énergie brute et de l'énergie digestible .....	54
II.2.2 Analyse de l'eau .....	55
II.3 Méthodes d'analyses biochimiques .....	56
II.3.1 Dosage des protéines .....	56
II.3.2 Dosage des glucides.....	57
II.3.2.1 Dosage de sucres réducteurs.....	57
II.3.2.2 Dosages des sucres totaux.....	57
II.3.2.3 Analyse des maltodextrines par HPAEC-PAD.....	58
II.3.2.4 Dosage de l'amidon .....	59

## Plan

II.3.3	Dosage des activités enzymatiques.....	60
II.3.3.1	Dosage de l'amylase.....	60
II.3.3.2	Dosage des activités trypsique et chymotrypsique.....	62
II.3.4	Techniques d'isolement et de préparation des extraits.....	62
II.3.4.1	Échange de tampon.....	62
II.3.4.2	Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium.....	63
II.3.5	Techniques de chromatographie.....	63
II.3.5.1	Chromatographie d'affinité sur $\alpha$ -Cyclodextrine Sepharose® 6B.....	63
II.3.5.2	Chromatographie sur échangeur d'anions.....	64
II.3.5.3	Chromatofocalisation.....	64
II.3.5.4	Purification en présence d'un mélange d'inhibiteurs.....	65
II.3.6	Techniques d'électrophorèse.....	65
II.3.6.1	Électrophorèses SDS-PAGE.....	65
II.3.6.2	Isoélectrofocalisation.....	66
II.3.6.3	Électroélution.....	68
II.3.6.4	Analyse et coloration des gels.....	68
II.3.7	Détermination de la masse moléculaire.....	71
II.3.8	Détermination du point isoélectrique.....	71
II.3.9	Composition en acides aminés et séquence.....	71
II.3.10	Amidation des carboxylates.....	72
<b>Chapitre III</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>73</b>
III.1	Études zootechniques.....	73
III.1.1	Estimation des besoins alimentaires en énergie.....	73
III.1.1.1	Principe expérimental.....	73
III.1.1.2	Poissons et conditions expérimentales.....	75
III.1.1.3	L'exemple du tambaqui, <i>C. macropomum</i> .....	78
III.1.1.4	Application aux autres espèces.....	85
III.1.2	Détermination des substrats métabolisables.....	92
III.1.2.1	Mise au point des respiromètres.....	92
III.1.2.2	Poissons et conditions expérimentales.....	96
III.1.2.3	Analyse postprandiale des échanges et de l'excrétion.....	98
III.1.2.4	Bilan sur les 13 heures suivant le repas.....	99
III.1.3	Effet de l'incorporation de l'amidon sur la croissance.....	101
III.1.3.1	Poissons et conditions expérimentales.....	102
III.1.3.2	L'aliment.....	102
III.1.3.3	Croissance et fixation des protéines.....	103
III.2	Études biochimiques.....	105
III.2.1	Purification des amylases de tilapias.....	106
III.2.1.1	Localisation et identification de l'activité amylasique.....	106
III.2.1.2	Matériel biologique et préparation de l'extrait brut.....	108
III.2.1.3	Purification.....	108
III.2.1.4	Analyse de la pureté.....	111
III.2.1.5	Bilan.....	112
III.2.2	Étude structurale des amylases de tilapias.....	113
III.2.2.1	Masse moléculaire et pI.....	113
III.2.2.2	Composition en acides aminés et séquence.....	114
III.2.2.3	Étude des isoformes des amylases des deux tilapias.....	115
III.2.3	Caractérisation fonctionnelle des amylases de tilapias.....	119
III.2.3.1	Produits d'hydrolyse de l'amidon.....	119
III.2.3.2	Température et pH optimaux.....	120
III.2.3.3	Étude cinétique et inhibition par les cyclodextrines.....	121
III.2.3.4	Digestion <i>in vitro</i> de différentes sources d'amidon d'origine tropicale.....	124
III.2.4	Adaptation au régime alimentaire.....	131
<b>Chapitre IV</b>	<b>Discussion générale.....</b>	<b>133</b>

## Plan

IV.1	Études zootechniques.....	133
IV.1.1	La détermination des besoins énergétiques.....	133
IV.1.2	Détermination des substrats métabolisables .....	137
IV.1.3	Effet de l'incorporation d'amidon dans l'aliment.....	139
IV.2	Comparaison des amylases de tilapias.....	140
IV.2.1	Purification et caractérisation .....	140
IV.2.2	Digestion <i>in vitro</i> de l'amidon .....	144
IV.2.3	Adaptation au régime.....	146
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>148</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>151</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>171</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS (PAR ORDRE ALPHABÉTIQUE)

- AA – Acides aminés
- AM – Amidon
- APS – Ammonium persulfate
- BAPNA – N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine 4-nitroaniline
- BSA – Albumine sérique de boeuf
- CB – Cendres brutes
- CBB R250 – Bleu de Coomassie R250
- CD – Cyclodextrine
- CEP – Coefficient d'efficacité protéique
- CUDa – Coefficient d'utilisation digestive apparent
- CUP<sub>L</sub> – Coefficient d'utilisation pratique des lipides
- CUP<sub>P</sub> – Coefficient d'utilisation pratique des protéines
- CUP<sub>S</sub> – Coefficient d'utilisation pratique de la matière sèche
- DP – Degré de polymérisation
- DTT – Dithiotréitol
- EB – Énergie brute
- ED – Énergie digestible
- EDC – 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- EEG – Éther éthylique de glycine
- EM – Énergie métabolisable
- ENA – Extractif non-azoté
- ET-G7pNP – 4,6-éthylidène(G7)-4-nitrophénol(G1)- $\alpha$ ,D-maltopheptaoside
- G1 – Glucose
- G2 – Maltose
- G3 – Maltotriose
- G4 – Maltotétraose
- G5 – Maltopentaose
- G6 – Maltohexaose
- G7 – Maltoheptaose
- HPAEC-PAD – Chromatographie haute performance sur échangeurs d'anions avec détection par ampérométrie pulsée
- IC – Indice de consommation
- IEF – Isoélectrofocalisation

## Listes des abréviations

LT – Lipides totaux

MES – Acide 2-(*N*-morpholino) éthanesulfonique

MF – Masse fraîche (humide)

MS – Matière sèche

PB – Protéines brutes (quantité calculée à partir de la détermination de l'azote total selon Kjeldahl)

PC – Production de chaleur

pNA – 4-nitroaniline

pNP – 4-nitrophénol

pNP-G7 – voir ET-G7pNP

PPV – Valeur productive protéique

R – Régime

RP – Rétention protéique

S‰ – Salinité

SDS-PAGE – Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SucA<sub>2</sub>PppNA – N $\alpha$ -succinyl-L-alanine-L-alanine-L-proline-L-phénylalanine-4-nitroanilide

TCS – Taux de croissance spécifique

TEA – Triéthanolamine

TEMED – N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

TR – Taux de rationnement

Tris – *N*-tris(hydroxyméthyl)-aminométhane



## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIÉES À LA THÈSE

### *Publications (Textes fournis en annexe)*

1. Moreau Y, Médale F, Boujard T, Luquet P. 1991. Indirect calorimetry method to study energy metabolism of an air-breathing fish, *Hoplosternum littorale* (Siluriform, Callichthyidae). J. Aquacult. Trop. 6: 193-199.
2. Moreau Y, Médale F, Boujard T, Luquet P. 1992. Postprandial utilization of energy substrates by a tropical catfish, *Hoplosternum littorale*: indirect calorimetry analysis. J. Aquacult. Trop. 7: 249-256.
3. Moreau Y, Cisse A, Luquet P. 1995. Absolute feeding design, a realistic way for fish nutrient requirement determination. J. Appl. Ichthyol. 11: 367-371.
4. Moreau Y, Desseaux V, Koukiekolo R, Koukiekolo R, Marchis-Mouren G, Santimone M. 2001. Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of  $\alpha$ -amylases from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. Comp. Biochem. Physiol. B 128: 543-552.

### *Communications*

1. Moreau Y, Médale F, Boujard T, Luquet P. 1991. Energy resources in 'Atipa', *Hoplosternum littorale*. A neotropical air breathing catfish. Présenté à : Fish nutrition in practice. VIth International Symposium on Finfish Nutrition, 24 - 27 juin 1991; Biarritz, France.
2. Moreau Y. 1991. Détermination des coefficients de digestibilité apparents pour *Oreochromis niloticus* de sous-produits agro-industriels disponibles. Présenté à : The third international symposium on tilapia aquaculture, 11- 16 novembre 1991 ; Abidjan, Côte d'Ivoire.
3. Moreau Y, Lazard J. 1998. Comparison of growth and feed utilisation performance between species without knowledge on their main nutrients requirements: application to two African Cichlidae, *Oreochromis niloticus* (Linné, 1758) and *Sarotherodon melanotheron* (Rüpell, 1852). Présenté à : International Conference for the PARADI Association and the Fisheries Society of Africa: African Fish and Fisheries: Diversity and Utilisation, 13 – 19 septembre 1998 ; Grahamston, Afrique du Sud.
4. Moreau Y, Tofani S, Desseaux V, Marchis-Mouren G. 1998. Food digestion in two farmed tilapiine species (Cichlidae) and in their hybrids: characterisation of their respective amylase. Présenté à : International Conference for the PARADI Association and the Fisheries Society of Africa: African Fish and Fisheries: Diversity and Utilisation, 13 – 19 septembre 1998 ; Grahamston, Afrique du Sud.



## INTRODUCTION

Avec près de 40 millions de tonnes pour l'année 1998, la production mondiale en aquaculture représente environ 29 % de la production halieutique contre 13 % en 1990 (Rana 1997). Près de la moitié de la production aquacole en masse et 55 % en valeur commerciale, provient de l'élevage des poissons Téléostéens. L'essentiel de la production piscicole a lieu en eau douce, avec les carpes chinoises, *Hypophthalmichthys molitrix*, et indiennes, *Catla catla*, qui constituent la majeure partie de la production mondiale (49 %). Vis-à-vis de cette activité, la Chine est le premier pays producteur au monde. Avec 970 000 tonnes en 1998, les tilapias constituent le troisième groupe de poissons produits au monde après les Cypriniformes et les Salmoniformes, et devant les silures. Parmi les tilapias, celui du Nil, *Oreochromis niloticus*, est la principale espèce élevée. Offrant la perspective d'un moyen de production durable de protéines alimentaires d'origine animale destinées à l'homme, la pisciculture constitue pour partie une alternative fiable à la pêche, notamment en milieu tropical où les espèces les plus productives peuvent être élevées.

Après la production d'alevins, la mise au point d'une alimentation adaptée aux poissons joue un rôle essentiel dans le développement de l'activité piscicole par ses répercussions économiques et environnementales. Cette mise au point repose sur l'amélioration de l'aliment et des techniques d'alimentation, dans le but d'optimiser la production et de réduire simultanément les coûts et les effets sur l'environnement. Le premier objectif de la pisciculture mondiale étant la production de protéines animales, l'optimisation de cette production passe nécessairement par une meilleure connaissance des besoins alimentaires des espèces élevées dans le but d'améliorer l'accrétion protéique. Une meilleure connaissance de ces besoins est un atout fondamental pour définir les pratiques d'alimentation les mieux adaptées, limitant les conséquences sur l'environnement par le contrôle de la production d'effluents solubles (azote, phosphate, etc..) ou insolubles (aliment non ingéré, fécès, etc..). Ce dernier point constitue l'une des recommandations affichées pour le développement de l'aquaculture dans les années à venir (Naylor *et al* 2000). Parmi les besoins nutritionnels, la connaissance de ceux en protéines et en énergie a un rôle majeur dans la production de poisson, mais aussi sur celle de déchets solubles ou solides (Cho 1993).

L'objectif de ce travail est de contribuer à une meilleure connaissance des besoins alimentaires des poissons élevés en milieu tropical, pour optimiser la fixation des protéines et réduire l'émission des effluents. Dans un premier temps, les études porteront sur la détermination des besoins alimentaires en énergie, associés à la capacité d'ingestion et de croissance des poissons, et sur l'utilisation de sources d'énergie non-protéique. Dans un second temps, nous étudierons la possibilité d'utiliser de l'amidon pour la couverture d'une partie des besoins alimentaires en énergie des poissons par l'étude des amylases digestives. L'amidon a été choisi pour sa grande disponibilité et son faible coût à apport énergétique équivalent. Il constitue, en effet, une source alimentaire d'énergie non protéique de choix pour les animaux monogastriques et les volailles qui n'ont pas la capacité d'utiliser la cellulose. Bien que son usage chez les poissons soit peu répandu, les espèces tropicales semblent mieux l'utiliser que celles d'eaux froides (Luquet & Moreau 1989 ; Wilson 1994).

# Chapitre I EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

## *UTILISATION DE L'ÉNERGIE ET CAPACITÉ DIGESTIVE CHEZ LES POISSONS*

Avec un peu plus de 22 000 espèces, les Poissons et les Agnathes regroupent plus de la moitié des espèces actuelles de Vertébrés. On compte 50 espèces d'Agnathes, 2 000 Chondrichthyens et 20 000 Ostéichthyens, dont les principaux représentants sont les Téléostéens. Même si cette statistique doit être nuancée par le fait que le traitement de l'espèce n'est pas le même pour toutes les classes de Vertébrés (monotypique pour les Poissons, polytypique pour les Oiseaux), les Poissons constituent un vaste ensemble d'animaux très diversifiés, autant par leur morphologie que leur physiologie ou leur comportement. Ainsi, un simple transfert des acquis obtenus sur les Vertébrés supérieurs en matière de physiologie ou de tout autre aspect de la biologie ne peut être satisfaisant sans une solide argumentation.

Très tôt, les poissons ont été retenus pour des études de nutrition. Au 18<sup>ème</sup> siècle, John Hunter réalise l'une des premières expériences sur la digestion (Rumsey 1994). À cette époque, la digestion était considérée comme le produit d'une action mécanique et d'une dégradation par putréfaction. En 1772, observant l'aspect de poissons avalés par de plus gros, Hunter constate que les proies retrouvées dans l'œsophage ne sont pas altérées, contrairement à celles ayant séjournées dans l'estomac. Pour Hunter, ceci est la démonstration de l'existence d'un processus, dans l'estomac seulement, responsable de la digestion des aliments. Il conclut cependant qu'un animal ou une partie de celui-ci ne peut être digéré en absence d'action mécanique. Plus tard, Spallanzani (1729-1799) contredira cette assertion. Plaçant la patte d'une grenouille dans la gueule d'une seconde grenouille, il constate une altération de l'extrémité de la patte en contact avec le contenu de l'estomac et conclut à la présence d'éléments permettant la digestion sans l'intervention d'une action mécanique ou d'un phénomène de putréfaction. C'est sur la base des résultats de ces expériences qu'a été établi l'ensemble des études portant sur les mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués dans la nutrition du règne animal.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Pour les poissons, l'étude de la nutrition a pris un intérêt plus fondamental avec le développement de nouvelles pratiques d'élevage. Si l'élevage de poisson est une pratique agricole très ancienne, le recours à des méthodes plus intensives, impliquant l'apport d'aliment exogène, est plus récent. Cette nouvelle pratique nécessitant une meilleure connaissance des espèces élevées, des études ont été entreprises pour déterminer les besoins nutritionnels des premières espèces élevées en intensif, notamment chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. Plus tard, les efforts ont été consacrés à d'autres espèces, en raison de l'augmentation de la pratique de leur élevage, comme le poisson-chat américain, *Ictalurus punctatus*, les saumons ou les tilapias. Pour la carpe, dont l'élevage en étang constitue la plus ancienne pratique piscicole, l'alimentation était généralement assurée par la production naturelle dans le milieu d'élevage et les études de nutrition ne se sont développées que plus récemment.

Depuis, les recherches en nutrition chez les poissons ont permis d'aborder différents aspects de cette fonction, allant de l'étude du système digestif (Smith 1980) à l'effet de l'alimentation sur les autres fonctions physiologiques tels que la reproduction (Gunasekera *et al* 1996b). Plusieurs ouvrages de synthèse ont été publiés sur ces aspects, celui de Halver (1972) suivis plus récemment par ceux de Steffens (1989), de Wilson (1991) et de Guillaume *et al.* (1999).

L'objectif de cet exposé est de présenter les particularités propres aux poissons en matière d'utilisation de l'énergie alimentaire. Ensuite, les acquis des études sur la digestion seront abordés.

### ***1.1 L'alimentation en énergie des poissons***

L'alimentation doit apporter les métabolites qui seront utilisés par l'organisme pour produire l'énergie nécessaire à son maintien et à son développement. Le devenir de l'énergie ingérée (I) est généralement décrit par des modèles intégrant les principales fonctions de l'organisme (Figure I-1). Les aliments ingérés ont une énergie brute, dont une partie est perdue au cours de la digestion et de l'élimination des fèces. L'énergie digestible correspond à celle des produits qui peuvent franchir la paroi intestinale. En soustrayant les pertes énergétiques branchiales et urinaires, on obtient l'énergie métabolisable, utilisée pour la croissance et la reproduction, ainsi que pour le maintien de l'organisme

## Chapitre I Exposé bibliographique

et l'activité. Les dépenses énergétiques pour la maintenance et l'activité produisent de la chaleur qui se dissipe dans l'environnement.

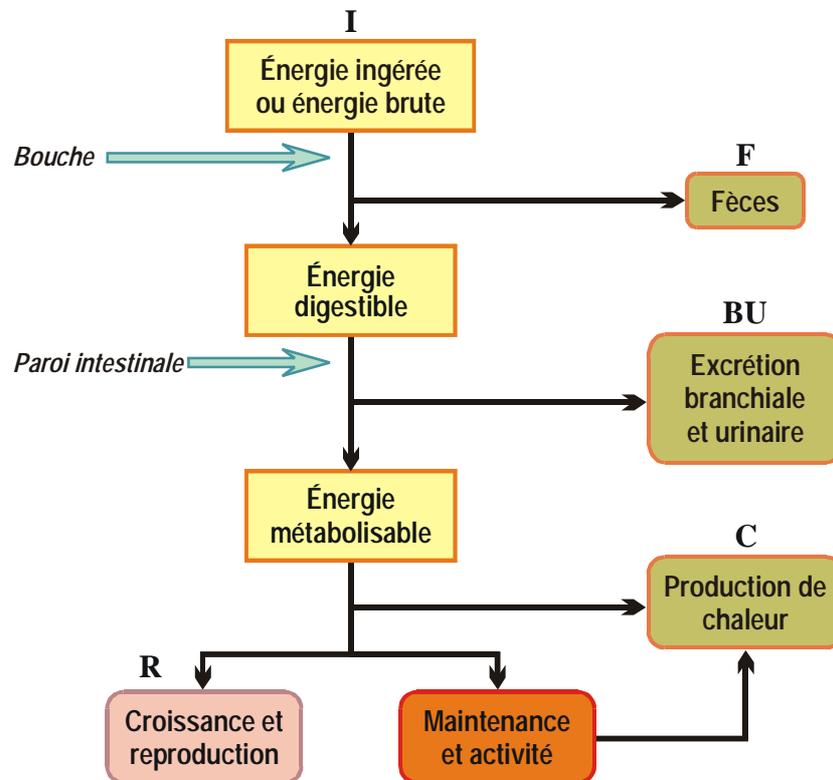


Figure I-1 Modèle du devenir de l'énergie ingérée chez les poissons (d'après Steffens 1989).

Le modèle du devenir de l'énergie ingérée correspond à l'équation usuelle,  $I = F + R + C + BU$ , où l'énergie ingérée se décompose en une partie non assimilée sous formes de fèces (F) et une partie assimilée qui correspond à l'énergie retenue (R), à celle non retenue, excrétion branchiale et urinaire (BU) ou production de chaleur (C). Cette dernière comprend la dépense énergétique liée à la consommation et à l'utilisation de l'aliment (extrachaleur) et celles associées au maintien et à l'activité de l'organisme. L'enjeu de la détermination des besoins énergétiques consiste essentiellement à essayer de couvrir la part non retenue par des apports exogènes non-protéiques plutôt que par des protéines amenées à être fixées. Si l'ensemble des substrats ingérés métabolisables sont pris en compte dans les apports énergétiques alimentaires, on fait le plus souvent référence implicite à ceux qui contribuent à la couverture des dépenses : production de chaleur, expiration et excrétion. Ces substrats doivent donc être dégradés au cours du métabolisme au lieu d'être fixés comme ceux contribuant à la croissance, à l'instar des protéines (Luquet & Moreau 1989).

## Chapitre I Exposé bibliographique

L'énergie résulte de l'oxydation cellulaire des lipides, des protéines et des glucides (N.R.C. 1993). Aussi, les besoins énergétiques des poissons ne sauraient être déterminés que par la mesure des dépenses énergétiques à l'aide des techniques de calorimétrie directe en estimant la chaleur dégagée, ou de calorimétrie indirecte, grâce à la mesure de la consommation d'oxygène et de la formation des produits d'oxydation (Médale 1999). Les besoins énergétique peuvent être estimés en analysant la réponse d'animaux recevant des aliments dont le contenu énergétique varie (N.R.C. 1993). Dans ce cas, les apports en énergie couvrent à la fois les dépenses (maintien et activité), la croissance corporelle et la production de gamètes. Dans la suite du texte le besoin en énergie concernera les apports alimentaires, alors que la dépense énergétique sera limitée à celle de l'organisme.

Dans l'étude de la relation dose-réponse de l'animal vis-à-vis du contenu énergétique de l'aliment, l'apport optimal peut être considéré comme celui qui permet la croissance maximale de l'animal. Peu utilisé dans le cas de l'apport en énergie, ce concept est mieux défini dans celui des apports en protéines (N.R.C. 1993), mais il reste transposable si l'on ne prend en compte que l'accrétion protéique.

Pour déterminer l'apport optimal en énergie, il faut tenir compte des facteurs influant sur la dépense et le contenu énergétique de l'animal, ainsi que de la valeur énergétique effective des aliments. La dépense énergétique globale est étroitement dépendante de celles liées au maintien et à l'entretien de l'organisme (homéostasie), et de celles associées à sa croissance et à sa reproduction (homéorèse). Nous nous proposerons de faire le point sur les facteurs susceptibles de modifier la dépense et le contenu énergétique des poissons tropicaux et sur les aliments utilisables comme source d'énergie, en y incluant les méthodes utilisées pour l'identification des substrats.

### I.1.1 Facteurs influant sur la dépense énergétique

La dépense énergétique des poissons dépend de leur niveau métabolique minimal, correspondant à l'état à jeun avec une activité physique réduite (Médale 1999), ainsi que de la croissance, la reproduction et l'activité physique. Les besoins énergétiques, quant à eux, sont principalement fonc-

tion de facteurs abiotiques tels que la température ou la salinité, et de facteurs biotiques tels que la taille ou l'âge.

### I.1.1.1 LES DÉPENSES MINIMALES

#### *La température*

À l'exception de quelques taxons comme les thonidés, les poissons sont des organismes poïkilothermes, dont la température interne est voisine de la température externe. Cette différence essentielle avec les Vertébrés Supérieurs se traduit par des besoins énergétiques de 10 à 30 fois plus faibles chez les poissons que chez les Mammifères ou les Oiseaux élevés par l'homme (Brett & Groves 1979). Indépendamment de cet aspect, les résultats obtenus sur plusieurs espèces montrent une élévation de la dépense énergétique minimale avec la température d'acclimatation (Brett & Groves 1979). Pour une même espèce, la dépense énergétique minimale augmente avec la température, mais la dépense énergétique liée à l'activité diminue au-delà de la température optimale (Fry 1970).

#### *La salinité*

Elle agit sur le coût métabolique de l'osmorégulation, qui peut représenter près de 20 % de la dépense énergétique chez le tilapia du Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Morgan *et al* 1997). Chez le tilapia du Nil, Farmer et Beamish (1969) observent un minimum de consommation d'oxygène pour une salinité de 11,6 ppm et un maximum à 30 ppm. Le coût énergétique de l'osmorégulation serait donc minimal pour une salinité dont l'osmolalité correspond à celle du sang, alors que chez les individus élevés en eau de mer le coût métabolique est plus important (Moreau 1988b).

#### *La taille et l'âge*

La croissance corporelle relative étant plus importante chez les jeunes individus, leurs besoins absolus en protéines sont logiquement plus importants (Robinson & Lovell 1986 ; Xie *et al* 1997). Cependant, la relation entre les besoins alimentaires n'étant pas forcément linéaire, certains auteurs utilisent la notion de masse métabolique (masse corporelle à la puissance 0,8 ou 0,75), à l'image des relations liant la consommation d'oxygène à la masse corporelle des poissons (Winberg 1960). L'influence de la taille sur les besoins en protéines a été observée chez des poissons élevés en eaux

## Chapitre I Exposé bibliographique

chaudes, comme *Clarias gariepinus* (Henken *et al* 1986), *Colossoma macropomum* (van der Meer *et al* 1995) ou *Liza haematecheila* (Yoshimatsu *et al* 1992), mais la prise en compte de la masse métabolique n'a pas permis de définir un besoin indépendant de la taille chez les deux premières espèces. Chez le poisson-chat américain, Masser *et al.* (1991) définissent un modèle de croissance intégrant des relations logarithmiques entre la masse du poisson et sa teneur en protéines, d'une part, et entre la masse du poisson et le rapport optimal en protéines et en énergie, d'autre part (Figure I-2). Si ces équations permettent de décrire l'évolution des besoins du poisson-chat au cours de sa vie, elle ne correspondent pas à des relations linéaires et ne permettent pas de définir les besoins à l'aide d'une seule constante. La détermination des besoins en protéines et en énergie d'un poisson est étroitement dépendante de la taille de l'animal et ne peut être exprimée par une seule fonction simple intégrant la taille de l'animal. Pour la croissance chez la carpe, Kaushik (1995) obtient une expression aboutissant à une valeur indépendante de la taille en utilisant la masse à la puissance  $-1/3$ .

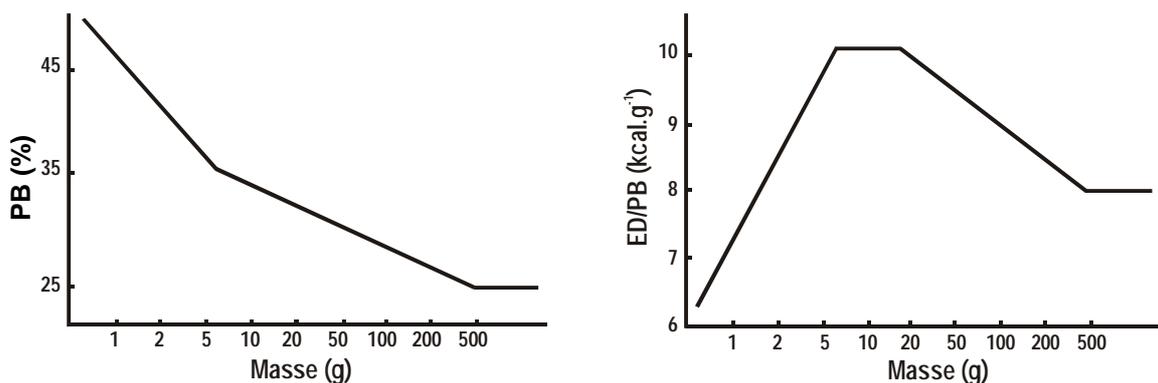


Figure I-2 Variation des besoins en protéines brutes et du rapport optimal énergie digestible/protéines en fonction de la masse chez le poisson-chat américain, *Ictalurus punctatus* (d'après Masser *et al* 1991). ED/PB : rapport énergie digestible sur protéines brutes.

### I.1.1.2 LA CROISSANCE

Les dépenses énergétiques associées à la croissance sont principalement dépendantes des apports protéiques (quantité et qualité) fourni au poisson, de leur utilisation, du contenu énergétique de l'aliment et, enfin, du coût énergétique de la synthèse protéique.

### *Les apports en protéines*

#### – Rôle alimentaire et détermination des protéines

Les protéines ont pour objectif d'apporter les quantités d'acides aminés nécessaires au bon développement de l'animal. D'un point de vue nutritionnel, les acides aminés essentiels se distinguent de celui des non-essentiels par le fait que leur synthèse n'existe pas dans l'organisme ou se fait trop lentement pour couvrir les besoins. Le problème des besoins relatifs en acides aminés indispensables ou non n'est pas l'objet de ce travail, mais la composition en acides aminés des protéines alimentaires utilisées devra être prise en compte afin de pouvoir comparer les résultats.

La teneur en azote d'un aliment, généralement déterminée par la méthode de Kjeldahl, permet d'obtenir la quantité de protéines brutes en utilisant le facteur, 6,25, compte tenu de la composition moyenne en azote des protéines, 16 %. Ce facteur peut être corrigé selon les protéines considérées (SaloVaananen & Koivistoinen 1996). La méthode de Kjeldahl, dans laquelle tout l'azote de l'échantillon est transformé en azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) à l'exclusion des formes oxydées comme les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) ou les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), se distingue de celle de Dumas, où c'est de l'azote qui est obtenu par combustion de l'échantillon. Dans la mesure où le contenu total en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  est faible, la méthode de Dumas (CHN) peut se substituer à celle de Kjeldahl (Etheridge *et al* 1998).

#### – Teneur en protéines et ration

L'augmentation de la teneur en protéine d'un aliment améliore graduellement la croissance du poisson jusqu'à un seuil ; alors que la rétention protéique (protéines fixées / protéines ingérées) diminue de façon concomitante (Figure I-3). À teneur en protéines et contenu énergétique équivalents, la croissance dépend aussi de la ration journalière alimentaire distribuée (Figure I-4). L'interaction entre ces deux paramètres est réellement prise en compte s'il on exprime les apports en valeurs absolues, c'est à dire en apports journaliers exprimés de protéines brutes par unité de masse corporelle et par unité de temps,  $\text{g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  (Figure I-5).

Plus généralement, Tacon et Cowey (1985) constatent une corrélation positive entre les apports absolus en protéines et les taux de croissance observés chez plusieurs espèces de poissons. Pour

## Chapitre I Exposé bibliographique

une même espèce, l'effet des apports en protéines dépend de la taille, de l'âge, de la température et de la salinité pour les espèces euryhalines, mais aussi de la qualité des protéines et du contenu énergétique de l'aliment, tant en qualité et qu'en quantité. Les apports protéiques dépendent aussi de la croissance maximale du poisson et de sa dépense énergétique liée à son état physiologique et à son environnement.

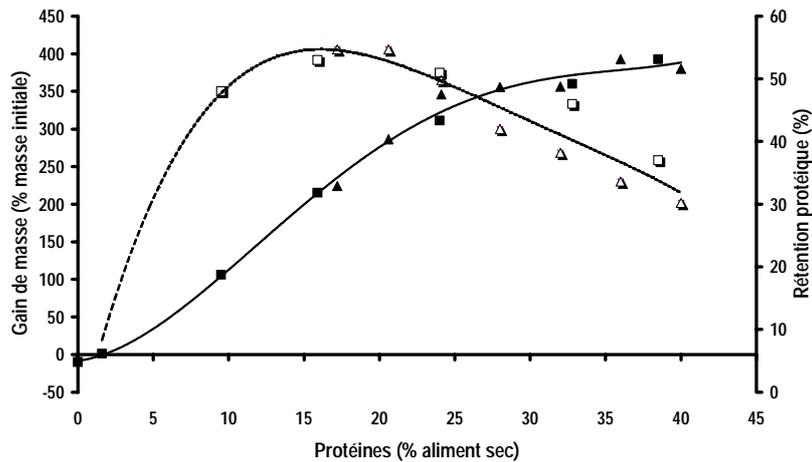


Figure I-3 Influence de la teneur en protéines de l'aliment sur le gain de masse (symbole pleins) et sur la rétention protéique (symboles creux) chez des poissons-chats américains, *I. punctatus* (triangles) et des tilapias du Nil, *O. niloticus* (carrés). (d'après par Garling Jr. & Wilson 1976 et Kaushik et al 1995).

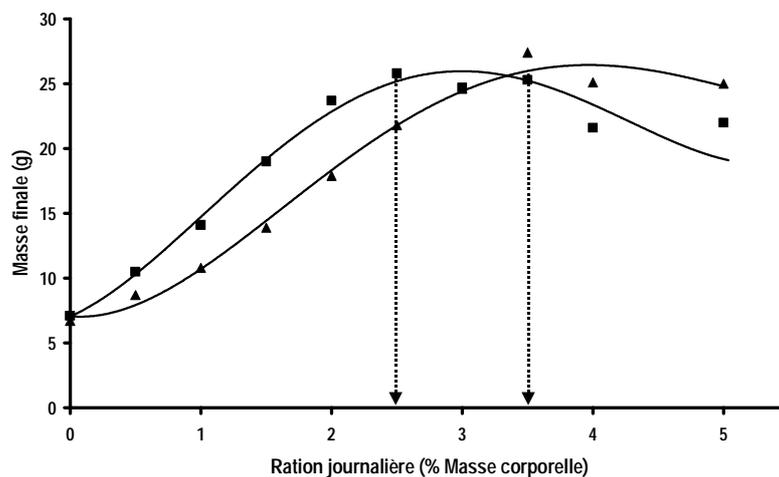


Figure I-4 Influence de la ration journalière sur le gain de masse chez des poissons-chats américains, *I. punctatus*, recevant deux types d'aliment : 25 % de protéines et 11,9 kJ.g<sup>-1</sup> (▲), 35 % protéines et 16,7 kJ.g<sup>-1</sup> (■). (d'après Gatlin III et al 1986).

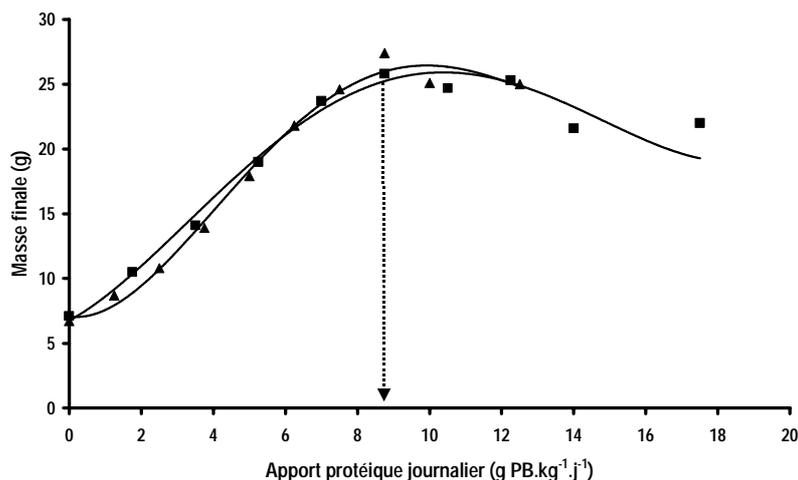


Figure I-5 Influence de l'apport journalier en protéines sur le gain de masse chez des poissons-chats américains, *I. punctatus*, recevant deux types d'aliment : 25 % de protéines et 11,9 kJ.g<sup>-1</sup> (▲), 35 % protéines et 16,7 kJ.g<sup>-1</sup> (■). (d'après Gatlin III *et al* 1986).

### – Qualité des protéines

Les apports en protéines étant définis en valeurs absolues, leur composition en acides aminés définira les apports de chaque acide aminé considéré comme essentiel relativement aux protéines (g AA.100 g<sup>-1</sup> protéines) ou les apports absolus dans la ration (g AA.kg<sup>-1</sup> poisson.j<sup>-1</sup>).

Les auteurs ont d'abord exprimé les besoins en acides aminés essentiels en pourcentage du contenu protéique dans l'aliment, mais l'existence d'une relation linéaire entre les besoins apparents en lysine et en protéines n'ayant pu être confirmée, les besoins en acides aminés ont été alors exprimés en pourcentage des protéines et de l'aliment (N.R.C. 1993). Même si les expériences sur les besoins en acides aminés ont été réalisées avec des L-aminoacides cristallisés (Wilson *et al* 1977), cette forme ne peut se substituer totalement aux acides aminés au sein des protéines (Li & Robinson 1998). Contrairement au tilapia, l'utilisation de lysine de synthèse améliore les performances chez la carpe (Viola *et al* 1994b). Les croissances chez ces deux espèces sont mieux corrélées aux apports journaliers en lysine, qu'à la teneur en lysine de l'aliment ou des protéines (Figure I-6).

Certains composés présents dans les matières premières protéiques généralement utilisées pour la préparation d'aliments destinés aux poissons, tel que le facteur antitrypsine du tourteau de soja, peuvent influencer sur la disponibilité de l'aliment. La cuisson détruit ce facteur mais peut s'avérer avoir un effet négatif sur la disponibilité de la lysine (Viola *et al* 1983). Dans la farine de sang riche en ly-

## Chapitre I Exposé bibliographique

sine, la disponibilité dépend du processus de fabrication (Métailler & Guillaume 1999). Les concentrés protéiques sont susceptibles d'être carencés en tryptophane. Quant aux tourteaux, la présence de phytates peut agir sur la disponibilité du calcium ou celle des polyphénols et du gossypol, modifier la digestibilité des protéines (Cheftel *et al* 1985) et de la lysine (Lloyd *et al* 1978).

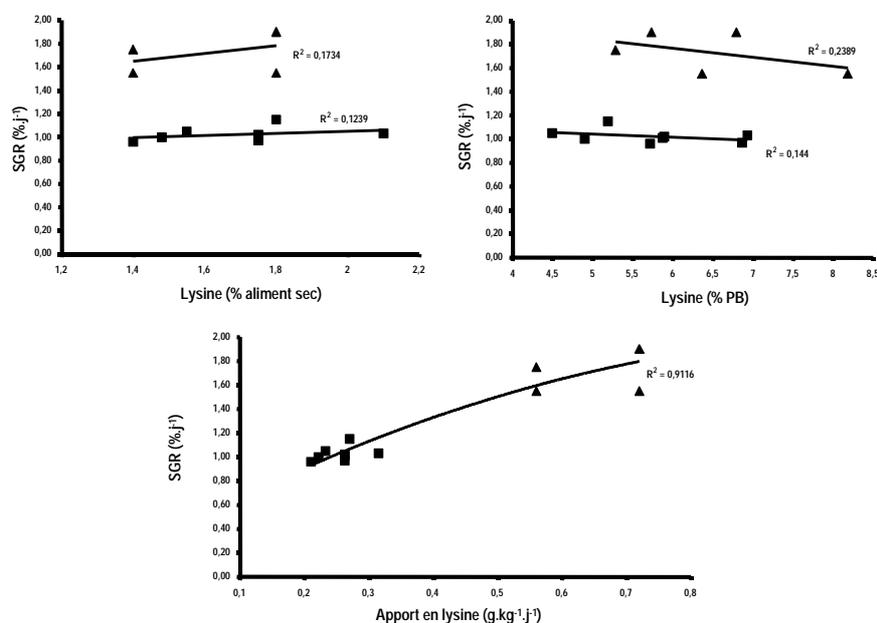


Figure I-6 Relation entre la croissance de carpes ▲ (250 – 400 g) ou de tilapias ■ (200 – 350 g) et les apports en lysine. (d'après Viola *et al* 1994a).

La digestibilité de chaque acide aminé a été mesurée chez le poisson-chat américain, à partir de différentes protéines (Wilson & Poe 1985). Bien que son CUDA soit voisin de 100 %, l'utilisation de la L-lysine cristalline en supplémentation dans un mélange de protéines est plus faible que celle de la lysine d'un tourteau de soja (Robinson *et al* 1980). À CUDA équivalent, la forme d'un acide aminé peut donc retentir sur son utilisation, en raison d'un déséquilibre possible du pool intra-tissulaire des acides aminés, qui en favoriserait le catabolisme (Cowey & Sargent 1979). Chez la même espèce, la croissance maximale est obtenue avec 40 % de protéines dans l'aliment quand il s'agit de la caséine ou du gluten de blé, alors que 25 % de protéines de soja permettent d'obtenir une croissance très proche (Cowey & Sargent 1972). L'utilisation d'une source de protéines de bonne qualité, telle que la farine de poisson, est donc préconisée pour éviter la présence de facteurs antinutritionnels et avoir la meilleure évaluation possible de l'effet d'une source protéique sur la croissance ou la dépense énergétique chez une espèce de poisson considérée.

### ***La température et la salinité***

Les dépenses énergétiques du poisson dépendent de la température, et de différences s'observent sur la répartition des besoins en énergie de l'animal, entre la part utilisée pour couvrir les dépenses et celle correspondant à l'énergie fixée. Les valeurs de croissance et de coefficient d'efficacité protéique obtenues à 32 ou 28 °C chez des jeunes tilapias du Nil, sont plus importantes que celles de poissons élevés à 24 °C (Likongwe *et al* 1996). Chez le tilapia rouge de Floride, la consommation volontaire d'aliment est plus élevée à 27 – 32 °C qu'à 22 °C (Watanabe *et al* 1993). Chez le silure africain, *C. gariepinus*, le rapport protéines/énergie pour une croissance optimale est plus élevé à 29 °C qu'à 24 °C (34,7 contre 25,4 mg PB.kJ<sup>-1</sup>), et l'accrétion protéique augmente avec la température (Henken *et al* 1986). Dans leur modèle de croissance du poisson-chat américain Masser *et al.* (1991) ont intégré l'effet conjoint de la température et du rapport protéines/énergie de l'aliment. Du fait que l'élévation de la température entraîne simultanément une augmentation de la croissance, de l'ingestion volontaire et de l'indice de conversion (Brett 1979), les teneurs en protéines requises pour une croissance optimale, besoins relatifs en protéines, sont les mêmes à 9 °C et 18 °C chez la truite, soit 35 % protéines pour un aliment contenant 15 kJ.g<sup>-1</sup> d'énergie digestible (N.R.C. 1993). Les besoins relatifs en protéines peuvent donc paraître indépendants de la température (Mambrini & Guillaume 1999), sous réserve que les rations alimentaires soient adaptées alors que la détermination des besoins absolus en protéines et en énergie est dépendante de la température dans les conditions de l'expérience.

Chez les espèces euryhalines comme les tilapias, la salinité agit sur les dépenses énergétiques. Ces modifications doivent donc avoir une influence sur l'utilisation respective des apports alimentaires pour la croissance et la couverture des dépenses énergétiques. À ration alimentaire équivalente, les besoins relatifs en protéines sont plus faibles pour les tilapias du Nil élevés à des salinités de 10 à 15 g.L<sup>-1</sup>, que pour ceux élevés en eau douce (De Silva & Perera 1985), soit 28 % PB au lieu de 30,4 % (Tableau I.1). Élevés dans un milieu plus proche de l'eau de mer (29 g.L<sup>-1</sup>), les meilleurs résultats de croissance et de transformation de l'aliment sont obtenus avec des teneurs en protéines brutes de 30 % (Fineman-Kalio & Camacho 1987). Chez l'hybride de tilapia, *O. niloticus* x *O. aureus*, les besoins

## Chapitre I Exposé bibliographique

relatifs en protéines, déterminés pour des poissons élevés en eau de mer (32-34 ppm) sont plus faibles que ceux déterminés chez d'autres espèces de tilapia en eau douce, soit 24 % PB contre 30 à 40 % (Shiau & Huang 1989). Chez le tilapia rouge, *O. mossambicus* x *O. niloticus*, l'effet de la salinité sur la croissance et l'indice de conversion des aliments dépend de la température. Dans l'eau douce, une augmentation de température de 27 à 30 °C n'a pas d'effet, alors que pour des salinités de 18 g.L<sup>-1</sup> ou 36 g.L<sup>-1</sup> (eau saumâtre et eau de mer) la même augmentation de température améliore notablement la croissance (Watanabe *et al* 1993). Chez les poissons euryhalins, les besoins apparents en protéines, et donc la dépense énergétique, dépendent de la salinité.

Tableau I.1 Effet de la salinité sur les besoins en protéines de différentes espèces de tilapias.

Espèces	Masse (g)	S ‰ (g.L <sup>-1</sup> )	T° (°C)	Énergie* (kJ.g <sup>-1</sup> )	Besoins en protéines		Références
					relatifs (% PB)	absolus (g PB.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	
<i>O. niloticus</i>	0,03-1,4	0		19,5 <sup>1</sup>	30,4	18	47
	0,02-3,8	5		19,5 <sup>1</sup>	30,4	18	
	0,02-4,5	10		19,2 <sup>1</sup>	28,0	17	
	0,03-0,8	15		19,2 <sup>1</sup>	28,0	17	
<i>O. niloticus</i>	8-37	0	28	20,3		12	111
<i>O. mossambicus</i> x <i>O. niloticus</i>	21-54	0	28,5	18,0 <sup>2</sup>	28	8,4	230
<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	2,4-8,4	34	26	16,7 <sup>3</sup>	23,5	7	203

\* Énergie brute mesurée (1) calculée (2) ou recalculée (3) à partir de la composition proximale de l'aliment, avec respectivement 22,2, 38,9 et 17,2 kJ.g<sup>-1</sup> pour les protéines, les lipides et les glucides totaux ou extractif non azoté (Luquet & Moreau 1989).

### ***Le contenu énergétique de l'aliment***

La teneur minimale en protéine permettant la meilleure croissance dépend du contenu énergétique de l'aliment (Cowey 1979). Chez des jeunes poissons-chats américains, la croissance est dépendante des apports relatifs en protéines et du contenu énergétique de l'aliment (Figure I-7), alors qu'à apports absolus en protéines identiques, la croissance est équivalente avec des aliments dont le contenu énergétique est différents. Dans ce dernier cas, le rapport entre la teneur en protéine et le contenu en énergie de l'aliment étant le même, les apports absolus en énergie correspondant à la croissance maximale observée sont aussi les mêmes. Pour le contenu énergétique de l'aliment comme pour les protéines, il semble donc que ce soit plutôt les apports journaliers qui doivent être pris en compte.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Dans plusieurs travaux, la même croissance a pu être obtenue avec des apports absolus en protéines constants, mais différents apports en énergie (Garling Jr. & Wilson 1976 ; Arzel *et al* 1998). De telles observations peuvent être associées à des conditions d'alimentation pour lesquelles les apports en énergie ne sont pas limitants vis-à-vis de l'apport en protéine sans influence sur la prise volontaire d'aliment. Ce type de résultats ne permet pas de conclure à un effet potentiel du contenu énergétique de l'aliment sur les dépenses liées à la croissance.

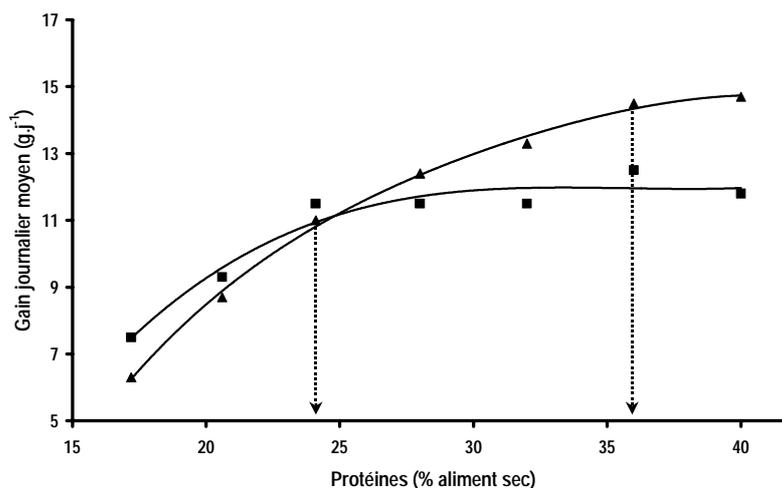


Figure I-7 Influence du contenu énergétique de l'aliment sur la relation observée entre le gain de masse et la teneur en protéines de l'aliment, chez *I. punctatus*. (d'après Garling Jr. & Wilson 1976). Teneur en énergie des aliments 11,5 (▲) et 14,3 kJ.g<sup>-1</sup> (■).

Smith et al. (1978) ont mesuré l'extrachaleur produite par des truites arc-en-ciel et des saumons atlantiques, *Salmo salar*, en fonction de la nature de l'aliment ingéré. L'extrachaleur observée chez les poissons est toujours plus réduite (<5 % de l'énergie métabolisable) que chez les Mammifères ou les Oiseaux. Entre des animaux n'ayant reçu que des protéines et ceux n'ayant reçu que des glucides, l'extrachaleur mesurée est identique et supérieure à celle trouvée pour les animaux recevant des lipides. Ces résultats ont été confirmés par Legrow et Beamish (1986) chez la truite, où une augmentation de l'extrachaleur avec la teneur en protéines de l'aliment à teneur en lipides équivalentes a été observée. À 8 °C, le coût de l'extrachaleur chez des truites recevant des glucides est identique à celui de truites recevant des lipides, mais supérieur à celui de truites placées 18 °C (Médale 1999). Pour ces auteurs, l'amplitude de l'extrachaleur est essentiellement liée à l'importance de la synthèse protéique, et le coût de l'extrachaleur serait plus lié au mode d'utilisation du nutriment qu'à sa nature.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Avec le développement de techniques de mesure de vitesse de la synthèse protéique, des études plus précises ont pu être réalisées quant à l'effet de la nature de l'aliment sur les dépenses énergétiques associées à la croissance.

### *La synthèse protéique*

Les études de synthèse protéique ont été faites sur des poissons entiers ou des cultures cellulaires. Les taux de synthèse et de dégradation des protéines ont été mesurés en utilisant des isotopes, alors que le suivi du coût énergétique associé à la synthèse a été réalisé par la méthode de calorimétrie indirecte. D'une manière générale, les taux de synthèse protéique trouvés chez les poissons dépassent largement les taux de rétention, ce qui confirme l'existence d'un renouvellement protéique important dont l'amplitude peut dépendre de plusieurs conditions y compris nutritionnelles. Les protéines étant les macromolécules dont le coût de synthèse est le plus élevé, l'influence de la composition de l'aliment sur la synthèse et le renouvellement protéique est déterminante pour l'analyse des facteurs impliqués dans la dépense énergétique liée à la croissance.

Tableau I.2 Effet de la composition de l'aliment et des apports alimentaires sur la production de chaleur et la rétention protéique chez la carpe, *Cyprinus carpio*. (d'après Meyer-Burgdorff & Rosenow 1995).

Aliment		Apports (kg <sup>-1</sup> .J <sup>-1</sup> )		Utilisation		
Rapport <sup>1,4</sup> ENA/LT	Rapport <sup>2</sup> PD/ED (mg/kJ)	Protéines digestibles (g PD)	Énergie digestible (kJ)	Production de chaleur (kJ.kg <sup>-0,8</sup> .j <sup>-1</sup> )	Rétention protéique <sup>3</sup> (g.kg <sup>-0,8</sup> .j <sup>-1</sup> )	Rapport PC/RP <sup>4</sup> (kJ.g <sup>-1</sup> )
4,4	17,5	7,6	435	88	1,49	59
4,0	23,1	9,6	415	89	1,65	54
19,2	21,8	8,8	404	80	1,55	52
1,5	19,1	8,5	442	77	1,55	50

<sup>1</sup> Rapport extractif non azoté (glucides) sur lipides totaux. <sup>2</sup> Rapport protéines digestibles sur énergie digestible. <sup>3</sup> N x 6,25. <sup>4</sup> Calculé à partir des données fournies par les auteurs

Chez la carpe, une corrélation positive a été observée entre le taux de synthèse protéique et l'ingéré protéique (Meyer-Burgdorff & Rosenow 1995). Une effet similaire est observé pour le taux de dégradation des protéines, mais de moindre amplitude, ce qui conduit globalement à une augmentation de la fixation des protéines malgré l'augmentation du renouvellement. Parallèlement, ces auteurs constatent des modifications de la dépense énergétique associée au niveau des apports protéiques et au

## Chapitre I Exposé bibliographique

rapport protéino-énergétique (PD/ED) de l'aliment (Tableau I.2). Chez la carpe herbivore, *Ctenopharyngodon idella*, le taux de synthèse protéique est corrélé positivement aux apports alors que le taux de dégradation ne l'est pas (Carter *et al* 1993). De même, aucune corrélation n'a été remarquée entre le taux de synthèse protéique et le coefficient d'utilisation pratique de l'azote. Mesurés sur plusieurs types de cellules de poisson, le coût relatif de synthèse de la même quantité de protéine diminue avec l'augmentation du taux global de synthèse protéique (Smith & Houlihan 1995).

L'ensemble de ces observations est quelque peu contradictoire. Si pour la carpe, l'augmentation de production de chaleur est associée à l'augmentation du renouvellement protéique, les valeurs fournies par les auteurs montrent des variations de l'ordre de 2 % de la production de chaleur, par unité de rétention à dépôt de protéine équivalent, et supérieures à 85 % pour le taux de synthèse. Dans ce cas, il est raisonnable de penser que l'impact de l'augmentation du taux de synthèse protéique, sur la dépense énergétique associée à la modification du contenu de l'aliment, soit largement compensé par la diminution relative du coût énergétique de la synthèse. De plus, le calcul de la dépense énergétique réalisé pour la carpe semble n'avoir été fait que sur la base de la consommation d'oxygène et de l'excrétion azotée, et ne présume pas des variations qui pourraient être associées à l'utilisation relative des glucides et des lipides. Cet aspect est d'autant plus important que les valeurs présentées ont montré une grosse variation des apports relatifs entre ces deux nutriments. L'ensemble de ces observations semblent indiquer que, si le taux de synthèse protéique augmente avec la quantité de protéine ingérée, son impact sur les dépenses énergétiques liées à la croissance diminue quand le taux de croissance augmente.

### I.1.1.3 LA REPRODUCTION

Les activités de reproduction mettent en jeu un ensemble de processus dont le coût énergétique ne peut être étudié qu'à long terme. Il ne peut être limité au seul coût énergétique de la production des gonades, soit pour les œufs d'environ  $23,5 \text{ kJ.g}^{-1}$  de matière sèche (Médale 1999). La qualité de l'apport en protéine peut agir sur la production d'œufs et la qualité des larves chez le tilapia du Nil (Gunasekera *et al* 1996a ; Gunasekera *et al* 1996b). En règle générale, lorsque les apports sont insuffisants, la production de gonades est favorisée aux dépens de la croissance.

### I.1.1.4 L'ACTIVITÉ PHYSIQUE

Chez les poissons, comme chez les autres animaux, les modifications de l'activité physique, telle que la vitesse de nage, agissent sur les dépenses énergétiques (Fry 1970). Ce phénomène doit être pris en compte dans la conduite d'expériences d'estimation des besoins et dans la gestion d'élevages dont l'implantation peut augmenter l'activité physique des poissons, cages en rivière ou « race-ways ».

### I.1.2 Valeur énergétique des aliments

L'organisme tire son énergie du catabolisme des lipides, glucides et protéines. Pour le thermodynamicien, le contenu énergétique d'un aliment est la quantité de chaleur dégagée par combustion de l'aliment en présence d'oxygène. Elle est mesurée dans une bombe calorimétrique et correspond donc à l'énergie libérée par une oxydation complète des éléments constitutifs de l'aliment. Pour les lipides ou les glucides, le catabolisme oxydatif aboutit à la formation d'eau et de dioxyde de carbone, ce qui correspond bien à une oxydation complète. Pour les protéines, le catabolisme aboutit à la production d'eau et de dioxyde de carbone, mais aussi de composés azotés qui ne sont pas eux complètement oxydés. Pour le physiologiste, la valeur énergétique des protéines est toujours plus faible que celle mesurée dans une bombe calorimétrique. Brett et Groves (1979) proposent des équivalents en énergie brute, métabolisable et intracorporelle pour les lipides, les glucides et les protéines, fondé sur le contenu en énergie brute de chaque éléments, des coefficients respectifs de digestibilité de 0,85, 0,8 et 0,9 pour les lipides, les glucides et les protéines, et enfin sur un contenu énergétique de l'ammoniaque de 5,4 kJ.g<sup>-1</sup> principal produit d'excrétion azoté chez le poisson (Tableau I.3).

Tableau I.3 Équivalent en énergie brute, métabolisable et intracorporelle (kJ.g<sup>-1</sup>) des trois constituants biologiques (d'après Brett & Groves 1979).

	<b>Lipides</b>	<b>Glucides</b>	<b>Protéines</b>
Énergie brute	39,6	16,7	23,7
Énergie métabolisable	33,5	13,9	17,7
Énergie intracorporelle	39,6	17,2	20,1

### I.1.3 Mode de couverture des besoins

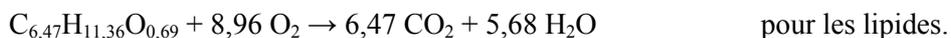
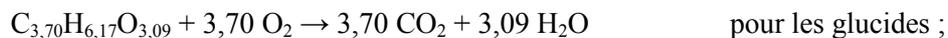
#### I.1.3.1 IDENTIFICATION DES SUBSTRATS POTENTIELLEMENT UTILISABLES

L'analyse par calorimétrie indirecte permet l'identification et la quantification des substrats oxydés, c'est à dire consommés par le catabolisme pour la couverture des besoins énergétiques de l'animal, à partir de la mesure des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée. Elle repose sur les différences de stœchiométrie entre les réactions d'oxydation des lipides, glucides et protéines. Cette méthode a été utilisée pour déterminer les besoins énergétiques de Vertébrés Supérieurs, Mammifères ou Oiseaux, et plus récemment, appliquée à des espèces animales aquatiques (Shick *et al* 1988 ; Shick *et al* 1988) et aux poissons en particulier (Médale & Kaushik 1989 ; van Waversveld *et al* 1989 ; Moreau *et al* 1991 ; Kaushik *et al* 1995). L'application de cette méthode aux animaux aquatiques a fait l'objet de plusieurs revues (Van Waversveld *et al* 1989 ; Gnaiger 1989). Chez les poissons, la prédominance de l'ammoniaque comme forme d'excrétion de l'azote a nécessité une adaptation du calcul des quantités de substrats oxydés et de la valeur énergétique correspondante, selon les formules générales choisies par les auteurs pour la composition élémentaire des lipides et des protéines. Pour les poissons susceptibles d'éliminer des produits du métabolisme anaérobie (acide lactique, éthanol, etc.), Van Waversveld *et al.* (1988) donnent un jeu d'équations pour déterminer les quantités de protéines, lipides et glucides utilisées par le catabolisme et la dépense énergétique correspondante. Gnaiger (1983) et Brafield (1985) soulignent l'importance de la nature des produits d'excrétion azotée sur la valeur énergétique des composés oxydés et la détermination des quantités d'oxygènes consommées correspondantes. Les formules de Van Waversveld ne prenant pas en compte une partition éventuelle de l'excrétion azotée entre l'ammoniaque et l'urée. Nous développerons ici la méthode de calcul des quantités de protéines, lipides et glucides, lorsque la contribution de l'urée dans l'excrétion azotée n'est pas négligeable.

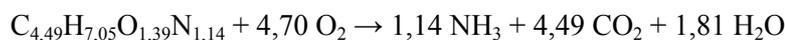
Dans un premier temps, une formule générale pour chaque type de substrat doit être choisie pour calculer la stœchiométrie des réactions d'oxydation correspondant à chacun d'eux. Pour permettre le calcul des quantités de substrats en terme de masse, ces réactions sont établies sur la base d'une quantité égale à 100 g de substrat. Les glucides sont généralement assimilés à un polymère de glucose

## Chapitre I Exposé bibliographique

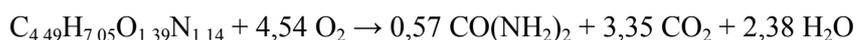
de formule générale  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , et les lipides à un triglycéride de formules générale  $(C_{18,8}H_{33,0}O_2)_3$  (Gnaiger 1983). Les réactions d'oxydation correspondantes pour 100 g de substrat sont respectivement :



Les protéines sont assimilées à une molécule de formule moyenne  $(C_{4,83}H_{7,58}O_{1,50}N_{1,23}S_{0,025})_n$  dont la fraction soufrée, qui est très limitée, n'est pas prise en compte dans la réaction d'oxydation. Deux types de réactions sont obtenues selon la nature du produit d'excrétion :



quand le produit d'excrétion est l'ammoniaque et



quand le produit d'excrétion est l'urée.

Pour chacune de ces réactions les quotients respiratoires (QR) sont de 1 pour les glucides, de 0,72 pour les lipides, et respectivement de 0,96 ou 0,74 pour les protéines quand le produit d'excrétion est de l'ammoniaque ou de l'urée. Les formules de calcul des quantités de substrat oxydés sont obtenues à partir du système d'équation établi sur la base des quantités d'oxygène et de dioxyde de carbone correspondant à l'oxydation de chacun d'eux (van Waversveld *et al* 1988). En prenant en compte une excrétion de l'azote sous forme d'urée, on obtient un système de quatre équations reliant les quantités de substrats oxydées à la mesure des échanges respiratoires observés (Tableau I.4).

Tableau I.4 Quantités d'oxygène consommé et de dioxyde de carbone produit, associées à l'oxydation d'1 mg de différents substrats et à la nature des produits de l'excrétion azotée.

Substrat oxydé	Consommation d'O <sub>2</sub> (μmoles)	Production de CO <sub>2</sub> (μmoles)
Glucides	37,0	37,0
Lipides	89,6	64,7
Protéines (avec production d'ammoniaque)	47,0	47,0
Protéines (avec production d'urée)	45,4	33,5

## Chapitre I Exposé bibliographique

Les quantités de protéines oxydées sont calculées à partir de l'équivalent en azote des produits formés ( $N \times 6,25$ ). Les formules de calcul des quantités de lipides et glucides oxydés à partir des échanges respiratoires observés sont alors :

$$L = 0,040 \cdot M_{O_2} - 0,040 \cdot M_{CO_2} - 0,083 \cdot P_N - 0,477 \cdot P_U$$

$$G = -0,070 \cdot M_{O_2} + 0,097 \cdot M_{CO_2} - 1,067 \cdot P_N - 0,070 \cdot P_U$$

avec L et G, les quantités oxydées respectives de lipides et de glucides en mg,  $M_{O_2}$  la quantité d'oxygène consommée en  $\mu$ moles,  $M_{CO_2}$  la quantité de  $CO_2$  produit en  $\mu$ moles,  $P_N$  la quantité de protéines oxydées avec le produit de désamination excrété sous forme d'ammoniaque en mg, et  $P_U$  la quantité de protéines oxydées avec le produit de désamination excrété sous forme d'urée en mg. Les résultats de ces équations sont positifs si le quotient respiratoire est compris entre 0,72 et 1. Quand la mesure des échanges respiratoires aboutit à une valeur du QR non comprise entre ces limites, le calcul donne une valeur négative pour G ( $QR < 0,72$ ) ou L ( $QR > 1$ ). Ces valeurs négatives sont alors assimilées à une synthèse de glucides ( $G < 0$ ) ou de lipides ( $L < 0$ ).

L'équivalent en énergie utilisée peut être calculée directement à partir des quantités oxydées en posant la formule suivante à partir des équivalents énergétiques des substrats (N.R.C. 1993) et des produits d'excrétion azotés (Brett & Groves 1979) :

$$H = 39,5 \cdot L + 17,2 \cdot G + 19,7 \cdot P_N + 18,5 \cdot P_U$$

avec H, l'énergie utilisée (J) et L, G,  $P_N$  et  $P_U$  les quantités (mg) de substrats oxydées. Des formules de calcul de l'énergie utilisée sont aussi proposées à partir de la mesure des échanges respiratoires et de l'excrétion, à l'instar des formules précédentes (Brafeld 1985 ; Van Waversveld *et al* 1989). Toutes ces formules, qui intègrent le bilan obtenu pour l'ensemble des substrats, ne sont applicables que lorsque le calcul des quantités de substrat oxydés a abouti à un ensemble de valeurs positives. Une valeur négative étant généralement assimilée à une synthèse du substrat correspondant, celle-ci ne peut donc être prise en compte dans la détermination de la quantité d'énergie consommée qui ne doit être estimée qu'à partir des seules quantités de substrats effectivement consommés. De plus, la synthèse ne pouvant se réaliser qu'aux dépens d'autres substrats, une partie des substrats apparemment consommés n'a pu contribuer effectivement à la couverture des besoins énergétiques. L'interprétation d'un ensemble de

## Chapitre I Exposé bibliographique

données conduisant à un estimé négatif pour l'utilisation d'un substrat doit donc être prudente et prendre en compte la possibilité d'un transfert d'élément d'un substrat à un autre.

L'ensemble de ces formules ne diffèrent que sensiblement de celles proposées par Van Waverveld et al. (1988), pour lesquelles le quotient respiratoire retenu pour les lipides est de 0,71, mais elle permettent de tenir compte de la formation éventuelle d'urée dans le calcul des bilans. Si l'on se réfère aux coefficients associés aux quantités de protéines correspondantes, cette prise en compte est importante même si la quantité d'urée formée ne représente que 10 % de la quantité d'azote excrétée.

Bien que déjà largement reconnue, l'application de la méthode de la calorimétrie indirecte est utilisable sur des animaux tels que le poisson, même si pour certaines espèces une part non négligeable de l'azote est excrétée sous forme d'urée. En absence de documentation sur l'espèce à étudiée, la contribution de l'urée dans l'excrétion doit donc être prise en compte pour l'application de cette méthode.

### I.1.3.2 UTILISATION DES PROTÉINES COMME SUBSTRAT ÉNERGÉTIQUE

Chez les Poissons, les protéines constituent la principale source d'énergie (Vellas 1981). Les poissons, qui sont des animaux essentiellement ammoniotéliques, excrètent les produits de désamination des protéines sous forme d'ammoniaque, principalement par diffusion passive au niveau des branchies (Wilkie 1997). Une excrétion d'urée est aussi observable chez les poissons, mais elle reste généralement faible et indépendante des repas (Mambrini & Guillaume 1999). Ainsi, l'énergie nette disponible des protéines représente 74 % de l'énergie totale des protéines chez les poissons (ammoniotéliques), contre respectivement 59 % et 51 % chez les Mammifères (uréotéliques) et les Oiseaux (uricotéliques) (Sire & Vernier 1992). L'utilisation par les poissons des protéines comme source d'énergie se fait donc naturellement sans limite et sans une augmentation importante de la dépense énergétique liée à une nécessaire détoxification des produits de désamination par la synthèse d'acide urique ou d'urée avant excrétion.

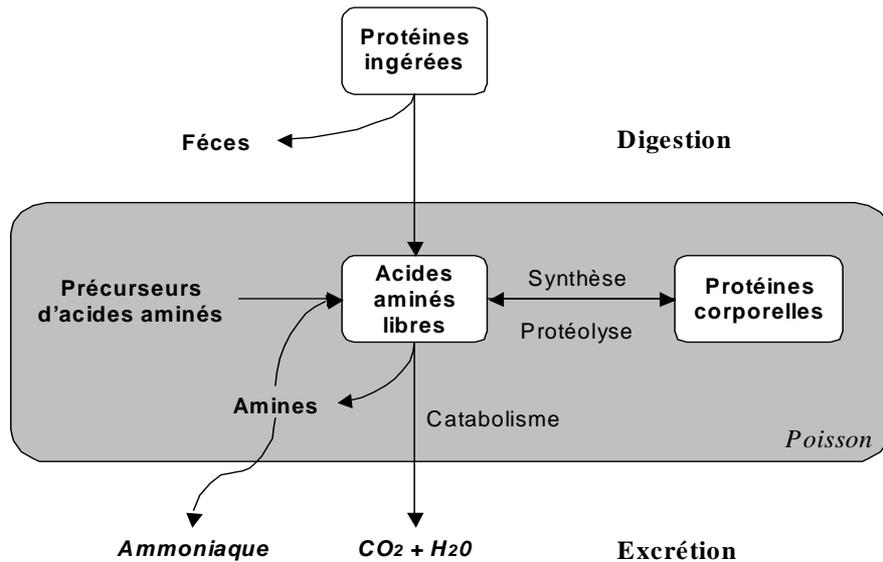


Figure I-8 Modèle d'utilisation des protéines ingérées par le poisson.

L'utilisation des protéines ingérées par le poisson peut être décrite par un modèle à plusieurs compartiments (Figure I-8). Les protéines ingérées contribuent à l'approvisionnement du stock d'acides aminés libres, qui sont utilisés pour la synthèse protéique ou dégradés par le catabolisme pour la production d'énergie. La quantité de protéines brutes fixées est mesurée par l'augmentation de la quantité d'azote totale contenue dans la masse corporelle du poisson. Cette accréation correspond principalement à l'augmentation de l'azote associé aux protéines corporelles et au stock d'acides aminés libres. La quantité de protéines brutes non-fixées est égale à la différence entre les protéines brutes ingérées et l'accréation protéique brute. Elle correspond à la quantité d'azote associé aux fèces et à la quantité d'azote apparu sous forme d'amines, dans les premières étapes du catabolisme des acides aminés, et qui a été effectivement excrétée. La quantité d'azote apparu sous forme d'amines qui est susceptible d'être réutilisée pour la synthèse d'acides aminés, fait elle partie intégrante du contenu corporel en azote.

### I.1.3.3 UTILISATION DES GLUCIDES COMME SUBSTRAT ÉNERGÉTIQUE

Chez les poissons, l'utilisation des glucides comme substrat énergétique est réputée mauvaise. L'analyse comparative des résultats obtenus chez les espèces tempérées et chez les espèces tropicales a montré une moindre rétention de l'énergie non-protéique chez ces dernières, qui indique une meilleure utilisation de contenu en énergie non-protéique des aliments (Luquet & Moreau 1989). Les ex-

## Chapitre I Exposé bibliographique

plications de ces phénomènes peuvent être multiples et de nombreuses revues récentes traitent du problème de l'incorporation de glucides, comme source d'énergie non-protéique, dans un aliment destiné au poisson (Shiau 1997 ; Kaushik 1999). Seuls les principaux aspects de la connaissance acquises dans ce domaine seront donc présentés, notamment sur les poissons tropicaux tel que les tilapias.

L'utilisation des glucides par les poissons est dépendante de la nature du composé, les amidons étant généralement mieux utilisés que les sucres simples (Wilson 1994). Pour l'hybride de tilapia, *O. niloticus* x *O. aureus*, les meilleurs résultats de croissance sont obtenus avec l'amidon, puis dans l'ordre des performances : maltose, saccharose, lactose et glucose (Shiau 1997). Chez cette même espèce, des performances analogues, en gain de masse et indice de consommation ont été obtenues avec l'incorporation d'amidon ou des dextrines, et les différences observées entre l'amidon et le glucose sont moindres avec 6 repas par jour au lieu de 2. La vitesse d'apparition du glucose dans l'organisme semble avoir un rôle déterminant sur son utilisation métabolique chez le poisson.

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer l'effet de l'incorporation de glucides dans l'aliment destiné à des poissons sur l'épargne protéique. Pour l'hybride de tilapia, l'incorporation d'amidon ou de dextrines conduit à de meilleurs taux de croissance et indice de consommation que le glucose (Tableau I.5).

La mauvaise utilisation de l'amidon chez le poisson a été aussi attribuée à sa mauvaise digestibilité. Celle-ci dépend de la source de l'amidon et de son état physique (natif, gélatinisé, empois, etc.). Chez la truite, la digestibilité de l'amidon cru a pu être sensiblement améliorée par un traitement hydrothermique, conduisant à une pré-gélatinisation (Bergot & Brecque 1983). Cependant, si un tel traitement a permis d'améliorer les résultats obtenus par l'incorporation d'amidon pré-gélatinisé chez les salmoniformes, son utilisation reste limitée à un niveau d'incorporation ne dépassant 25 à 30 % (Pfeffer 1995). Pour les poissons tropicaux, les données relatives à l'utilisation digestive de l'amidon montrent une meilleure capacité que pour les espèces d'eaux froides comme la truite (Tableau I.6), et les différences entre l'amidon cru (natif) et l'amidon cuit (gélatinisé, empois) sont plus limitées. La justification de cette aptitude particulière n'a pu être éclaircie et l'hypothèse la plus souvent avancée

## Chapitre I Exposé bibliographique

est celle de la présence d'une microflore dont le développement est favorisée par la température (Sugita *et al* 1982).

Tableau I.5 Croissance, indice de consommation et taux de rétention protéique, chez un hybride de tilapia, *O. niloticus* x *O. aureus*. Effet de l'incorporation de différents glucides dans les aliments avec des contenus protéiques différents. (d'après Shiau & Peng 1993).

Contenu protéique (%)	Source de glucides		
	Amidon	Dextrine	Glucose
<i>Gain de poids (%)</i>			
24 %	366 <sup>a</sup>	347 <sup>a</sup>	313
28 %	393 <sup>ay</sup>	383 <sup>ay</sup>	339 <sup>x</sup>
32 %	480 <sup>by</sup>	462 <sup>by</sup>	354 <sup>x</sup>
<i>Indice de consommation</i>			
24 %	0,75 <sup>ay</sup>	0,71 <sup>ay</sup>	0,65 <sup>x</sup>
28 %	0,78 <sup>ay</sup>	0,78 <sup>ay</sup>	0,71 <sup>x</sup>
32 %	0,91 <sup>by</sup>	0,84 <sup>by</sup>	0,72 <sup>x</sup>
<i>Rétention protéique (%)</i>			
24 %	43,2	39,8	36,3 <sup>a</sup>
28 %	39,2	38,9	37,3 <sup>a</sup>
32 %	39,5 <sup>y</sup>	37,8 <sup>y</sup>	29,8 <sup>bx</sup>

Différentes lettres indiquent les différences significatives observées entre les trois contenus protéiques pour un même glucides (a, b, c) ou entre les trois glucides pour un même contenu protéique (x,y).

Tableau I.6 Coefficient d'utilisation digestive apparent (CUDA) de l'amidon cru ou cuit observé chez espèces des poissons de différentes origines.

Espèces	Origine de l'amidon	État de l'amidon	CUDA	Références
Truite arc-en-ciel	Pomme de terre	Cru	40,2	179
<i>O. mykiss</i>	Pomme de terre	Cuit	79,9	179
Esturgeon	Maïs	Cru	31,8	96
<i>Acipenser transmontanus</i>				
Carpe commune	Pomme de terre	Cru	55,0	29
<i>C. carpio</i>	Pomme de terre	Cuit	85,0	29
Carpe herbivore	Maïs	Cru	63,0	224
<i>C. idella</i>	Maïs	Cuit	89,9	224
Poisson-chat américain	Maïs	Cru	60,9	192
<i>I. punctatus</i>	Maïs	Cuit	78,3	192
Tilapia	Maïs	Cru	79,0	224
<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	Maïs	Cuit	89,3	224

## Chapitre I Exposé bibliographique

L'apparente incapacité des poissons à réguler leur glycémie a fait considérer ces animaux comme victimes d'un diabète « non insulino-dépendant » puisque la présence d'une hormone analogue à l'insuline avait été démontrée (Mommsen & Plisetskaya 1991). Cependant, les études menées sur le rôle de l'insuline chez les poissons ont montrées que la sécrétion d'insuline est plus stimulée par certains acides aminés que par le glucose, et que le glucose induit la production de somatostatine pouvant inhiber la sécrétion d'insuline (Sheridan *et al* 1991). L'analyse des récepteurs d'insuline dans le tissu musculaire de la truite n'a pas permis de trouver de différence de comportement associée à la quantité de glucides présent dans les régimes (Gutierrez *et al* 1991). Pour les poissons, le rôle et le mécanisme d'action de l'insuline ne doivent pas être considérés comme analogue à ce qui est connu chez les Mammifères.

Des études ont aussi été réalisées pour montrer l'effet de l'incorporation de glucides ou de lipides dans la ration alimentaire sur l'activité des enzymes de la glycolyse, de la lipogénèse, de la néogluco-génèse, du catabolisme des acides aminés et de la synthèse de glycogène. Chez la plupart des espèces poissons étudiées, l'incorporation d'amidon dans les aliments conduit à une augmentation de la rétention lipidique. Chez le tilapia du Nil et chez la carpe, l'ingestion de quantités croissantes de glucide entraîne une accélération de la glycolyse et de la lipogénèse, et une diminution de la néogluco-génèse et de la dégradation des acides aminés (Shimeno *et al* 1995). Chez le tilapia, l'incorporation de lipides sans glucides, ne conduit pas à une modification de la lipogénèse, et entraîne une diminution de la rétention des protéines. À cet égard les tilapias semblent faire une meilleure utilisation des glucides que des lipides comme source d'énergie. Si chez les poissons, une activité hexokinase, même faible, a pu être observée, aucune activité de type glucokinase n'a pu être décelée, ce qui expliquerait la piètre utilisation des sucres libres, conduisant à une saturation de la première enzyme (Shiau 1997).

L'incorporation de glucides dans l'aliment destiné à des espèces tropicales, peut donc conduire à une meilleure utilisation des protéines alimentaires et contribuer à la fourniture d'énergie pour le poisson. Toutefois, les études réalisées n'ont pas permis de définir la part relative de leur contribution effective au métabolisme oxydatif et à l'épargne protéique. Les différences observées entre l'utilisation de l'amidon et celle du glucose, indiquerait un rôle déterminant dans la vitesse

d'apparition du glucose dans l'organisme, lequel serait mieux utilisé à quantité égale quand il résulte de la digestion de l'amidon.

### I.1.3.4 ESTIMATION DES BESOINS ALIMENTAIRES EN ÉNERGIE

Les besoins en énergie des espèces tropicales sont généralement méconnus, la plupart des travaux portant préférentiellement sur la détermination des besoins en protéines. De plus, les approches expérimentales sont le plus souvent très disparates (conditions d'alimentation ou d'élevage différentes) et rendent difficiles à la fois les comparaisons interspécifiques et intraspécifiques.

L'un des points les plus importants dans la couverture des besoins alimentaires d'un poisson est le choix d'un aliment dont le contenu énergétique et la teneur en protéines soient susceptibles de permettre l'obtention d'un rendement maximal en protéine avec la meilleure croissance possible. En fait, le choix de la teneur en protéines et celui du contenu énergétique sont mutuellement liés, et l'on utilise plus généralement le rapport entre la teneur en protéines de l'aliment et son contenu énergétique, *rapport protéino-énergétique*, pour décrire les conditions optimales d'alimentation d'un poisson. Pour déterminer la valeur optimale de ce rapport, un test est d'abord réalisé en nourrissant des lots de poissons avec des aliments dont le contenu énergétique est fixe et la teneur en protéine variable, *test isocalorique*. Ensuite, un test est réalisé en nourrissant des lots de poissons avec des aliments dont la teneur en protéine est fixe et le contenu énergétique variable, *test isoprotéique*. Ces deux tests, qui peuvent être menés dans n'importe quel ordre, sont réalisés à taux de rationnement alimentaire fixe (quantité d'aliment par unité de biomasse et par jour). La teneur optimale en protéine est alors déterminée à partir des résultats du test isocalorique, et le contenu énergétique optimal à partir des résultats du test isoprotéique.

Cependant, pour définir les conditions d'une alimentation optimale, il est aussi nécessaire de tenir compte de la ration alimentaire distribuée quotidiennement. Ainsi, un poisson recevant une ration suboptimale ne pourra fixer qu'une quantité limitée de protéines et aura donc, à contenu énergétique équivalent de l'aliment, un besoin en protéine apparent plus faible qu'un poisson recevant une quantité plus importante d'aliment. C'est donc l'ensemble de ces trois facteurs (teneur en protéines de

## Chapitre I Exposé bibliographique

l'aliment, valeur énergétique de l'aliment et ration alimentaire) qui doivent être pris en compte pour la définition des conditions optimales d'alimentation. Sur le plan de la pratique expérimentale, la résolution d'un tel problème n'est possible qu'avec un plan expérimental à trois facteurs où toutes les conditions choisies pour un facteur sont confrontées à toutes les combinaisons de conditions choisies pour les deux autres. Pour simplifier l'approche expérimentale, il est toutefois possible de ne plus prendre en compte les interactions entre la ration alimentaire et la teneur en protéine ou entre la ration alimentaire et le contenu énergétique de l'aliment, en utilisant le concept d'apport journalier en protéines ou en énergie ( $\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ou  $\text{kJ.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ). Ces concepts ont été utilisés pour la comparaison des besoins en protéines des poissons avec ceux d'autres animaux (Cowey & Luquet 1983), des espèces de poissons au sein d'un même groupe (Wilson & Moreau 1996) ou pour l'estimation des besoins en protéines ou en énergie d'une espèce de poisson (Mc Googan & Gatlin III 1998). Le plan expérimental se retrouve alors réduit aux apports en protéine et en énergie.

Pour satisfaire les besoins en protéines du poisson, l'aliment doit tout d'abord apporter une quantité de protéines brutes au moins équivalente à celle fixées. Cette quantité est calculée à partir des protéines fixées et de la digestibilité des protéines de l'aliment. Cependant, une certaine quantité d'acides aminés libres est nécessairement dégradée car le rendement entre les protéines brutes fixées et leur équivalent en ingéré digestible ne peut être considéré comme égal à 100 %. Cette quantité d'acides aminés correspond à ceux dégradés pour les besoins d'entretien de l'organisme ou résultant d'une augmentation de l'activité métabolique liée à la croissance. En dehors d'une connaissance précise des conditions d'un apport optimal en protéines et en énergie, les besoins en acides aminés nécessaires à l'entretien ne sont généralement pas quantifiables directement. Ils peuvent cependant être estimés par la mesure des pertes endogènes d'un animal recevant un régime aprotéique, mais aussi à partir des apports protéiques permettant une accréation protéique très faible ou proche de zéro. Dans le premier cas, le régime peut être à l'origine de déséquilibre physiologique important (Bastrop 1991), alors que dans le second cas, même si les animaux ne croissent pas, les biais résultant d'adaptations physiologiques particulières sont évités. Les besoins en acides aminés nécessaires à l'entretien peuvent

## Chapitre I Exposé bibliographique

alors correspondre à la quantité de protéines brutes ingérées quand la croissance observée est nulle ou proche de zéro.

Les besoins alimentaires totaux en énergie correspondent à l'énergie ingérée, nécessaire pour que la croissance et le gain en protéine soient optimaux. Selon la source d'énergie alimentaire utilisée, les équivalents énergétiques correspondant à la couverture des dépenses et à celle de la fixation ne sont pas toujours identiques (Figure I-9). Ainsi, l'équivalent en énergie ingérée des protéines utilisées par le catabolisme n'est pas le même que celui des protéines fixées. Les besoins en énergie alimentaire (protéique ou non-protéique), nécessaires à la couverture des dépenses, correspondent donc à la différence entre les quantités ingérées et celles fixées qui sont calculées sur la base des équivalents énergétiques appropriés. La composante non-protéiques de ces besoins peut être estimée par excès en calculant la différence entre l'énergie ingérée et celle fixée, diminuée de l'équivalent énergétique des protéines brutes ingérées quand l'accrétion protéique du poisson est nulle ou négligeable.

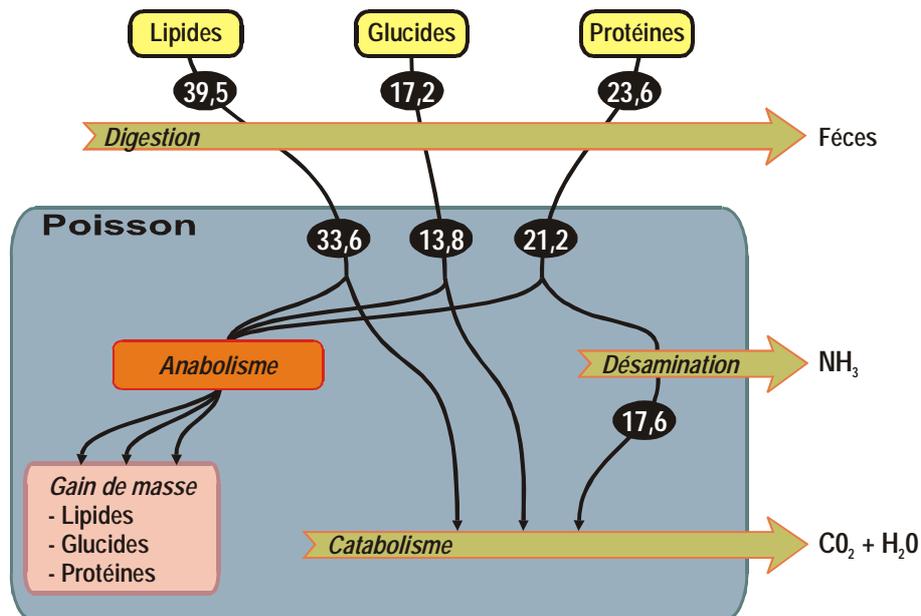


Figure I-9 Modèle d'utilisation des différentes sources énergétiques alimentaires par le poisson. Équivalents énergétiques des nutriments à chaque étape du processus. Les valeurs sont indiquées en kJ.g<sup>-1</sup>.

## ***1.2 La digestion chez les poissons Téléostéens***

### **1.2.1 Anatomie de l'appareil digestif**

Outre les descriptions fournies par Bertin dans le traité de zoologie de Grassé, l'anatomie de l'appareil digestif du poisson a fait l'objet de nombreuses revues spécifiques avec notamment celle de Fänge et Grove (1979) et, plus récemment, celle de Guillaume et Choubert (1999).

On observe une grande variété de formes du tube digestif y compris au sein d'un même taxon comme celui de l'ordre des Pleuronectiformes ou Poissons plats, qui ne compte pas moins de 133 espèces (De Groot 1971). La morphologie générale du tractus digestif a été reliée à la nature du régime alimentaire, avec la présence d'un estomac chez les carnivores ou son absence chez les micro- ou phytophages, ou encore avec des intestins courts pour les espèces à dominante carnivore, et longs pour celle à dominante détritivore ou microphytophage (Sturmbauer *et al* 1992). À partir d'une étude réalisée sur les poissons d'un même bassin fluvial, on constate une évolution importante du rapport longueur de l'intestin/longueur du corps en fonction de la taille des individus d'une même espèce dont le régime change avec les saisons ou l'âge (Kramer & Bryant 1995a). Cependant, l'utilisation de la longueur de l'intestin comme indicateur du régime de l'espèce est imprécise. Elle ne peut être appliquée qu'à des individus de taille analogue pour distinguer les grands groupes de comportement alimentaire et non une simple tendance plus herbivore chez un groupe d'animaux omnivores (Kramer & Bryant 1995b). En fait une telle classification est hasardeuse, car la plupart des espèces n'ont pas de régimes stricts (Steffens 1989).

Globalement, le tractus digestif des poissons est composé d'une bouche, d'une cavité buccale, d'un pharynx, d'un œsophage, d'un estomac, d'un intestin, d'un rectum et d'un anus débouchant sur le milieu extérieur au voisinage du méat urinaire. Autour du tube digestif, on retrouve les organes annexes communs aux autres Vertébrés : le foie, la vésicule biliaire et le pancréas. Chez certaines espèces de poissons, l'estomac est absent comme chez la carpe commune, *C. carpio*. À la jonction entre l'estomac et l'intestin, des appendices plus ou moins nombreux peuvent être présents.

### I.2.1.1 LA BOUCHE ET LE PHARYNX

Chez les Téléostéens, la bouche peut être munie de dents maxillaires dont le rôle essentiel est la préhension des aliments, mais rarement la mastication. Les poissons ingèrent habituellement leurs aliments d'un seul tenant, à l'exception de certaines espèces dont les individus peuvent arracher des morceaux de proies ou de végétaux à l'aide de dents spécifiques comme les Serrassalminae, famille d'origine amazonienne regroupant les piranhas. Si la cavité buccale d'un poisson peut contenir une langue, on n'y trouve jamais de glandes salivaires. Les arcs branchiaux situés dans le fond de la cavité buccale peuvent porter des structures en brosse ou peigne, les branchiospines. Ces structures jouent un rôle essentiel chez les poissons filtreurs, en permettant la rétention des particules présentes dans l'eau à la manière d'un tamis. Au niveau du pharynx, certaines espèces, comme les tilapias, sont munies de plaques ou dents pharyngiennes. Ces assemblages de plaques ossifiées et très résistantes constituent un système de broyage efficace et contribuent au processus de digestion par une dégradation mécanique des aliments (Galis 1993). Le pharynx s'ouvre sur un œsophage court, large et musculeux. Chez les tilapias, la muqueuse de l'œsophage est recouverte de cellules à mucus et l'on ne trouve pas dans la bouche de structure assimilable à des papilles gustatives (Gargiulo *et al* 1996).

### I.2.1.2 L'ESTOMAC

Les Téléostéens sans estomac représentent moins de 15 % des espèces vivantes actuellement décrites. En absence d'estomac, l'œsophage débouche directement dans l'intestin qui peut comporter un léger renflement ou bulbe susceptible de retenir le bol alimentaire. Dans ce cas, l'ouverture du canal cholédoque est toujours située en amont du bulbe, ce qui ne permet pas d'assimiler cette structure à un estomac. Chez les larves, l'estomac n'apparaît qu'après éclosion. La perte de l'estomac chez certaines espèces peut donc être considérée comme un caractère néoténique. Lorsque l'estomac est présent, on observe quelque fois un cardia plus ou moins développé. La forme et la taille de l'estomac sont variables. La forme de l'estomac est généralement décrite par analogie avec l'aspect d'une lettre : forme en J (ou 1), en U ou en Y. Chez certaines espèces comme l'anguille, *Anguilla anguilla*, ou le tilapia, l'estomac en Y peut former un sac plus ou moins allongé, appelé cæcum gastrique. L'estomac des poissons est très extensible, ce qui rend difficile d'établir toute relation entre la taille de l'estomac

## Chapitre I Exposé bibliographique

et celle de l'animal. Chez la truite commune, *Salmo trutta*, l'estomac peut s'allonger de 30-35 % et s'élargir de 75 %. Chez le brochet, *Esox lucius*, l'ingestion de proie peut entraîner une extension de 180 % en longueur et de 220 % en diamètre. Chez le *Prochilodus*, une diminution de 30 à 45 % de la taille de l'estomac a été observée après le jeûne.

La paroi stomacale est constituée d'une tunique musculaire et d'une tunique muqueuse tapissée de glandes gastriques de formes tubulaires ou en doigt. Des cellules à mucus sont présentes au col de ces glandes. Trois régions sont identifiables chez le tilapia : une région proche du cardia, une région fundique et une région pylorique (Caceci *et al* 1997). Chacune se distingue par l'apparence de la paroi stomacale et la structure de la muqueuse. Dans la région cardiaque, la paroi est simple, lisse et sans structure en doigt. La muqueuse est exempte de cellule à gobelet et riche en glandes à mucus. Dans le fundus, la paroi est tapissée de structures en doigt et la muqueuse riche en glandes tubulaires gastriques. Dans la région pylorique, la paroi est fortement plissée et la muqueuse ne contient ni glande tubulaire, ni cellule à mucus. Ces trois régions distinctes sont aussi observées chez un silure d'Amazonie, *Ancistrus multispinnis*, qui utilise son estomac comme organe de respiration aérienne (Satora 1998).

Chez les Téléostéens, il n'y a pas, comme chez les Mammifères, une distinction entre les cellules sécrétant le pepsinogène et celles sécrétant l'acide chlorhydrique (Gas & Noaillac-Depeyre 1981). La présence d'un seul type de cellules sécrétrices laisse supposer que ces dernières sont à l'origine des deux sécrétions. Chez le tilapia, un seul type de cellule est aussi rencontré mais ne semble responsable que de la sécrétion d'HCl. Chez plusieurs espèces microphages comme les mulets, *Mugil spp*, la paroi musculaire de l'estomac peut être épaisse et former une structure assimilable à un gésier. Un sphincter pylorique plus ou moins important marque la jonction de l'estomac et de l'intestin, avec en aval et pour certaines espèces des structures particulières : les appendices pyloriques.

### I.2.1.3 LES APPENDICES PYLORIQUES

Environ 60 % des espèces connues de Téléostéens ont des appendices à la jonction de l'estomac et de l'intestin. Plusieurs termes sont utilisés pour les nommer, appendices pyloriques, intestinaux

## Chapitre I Exposé bibliographique

ou stomacaux, diverticules pyloriques, etc.. et plus généralement, au moins dans le monde franco-  
phone, cæcums pyloriques.

Nul chez les poissons qui ne possèdent pas d'estomac, le nombre des cæcums varie fortement (de 1 à plus de 1000) d'un taxon à l'autre et même d'une espèce à l'autre. Il est indépendant du régime de l'espèce, de l'aspect de l'estomac, ou du taxon d'appartenance de l'espèce (Figure I-10). Chez les tilapias, il n'y a pas de cæcums pyloriques.

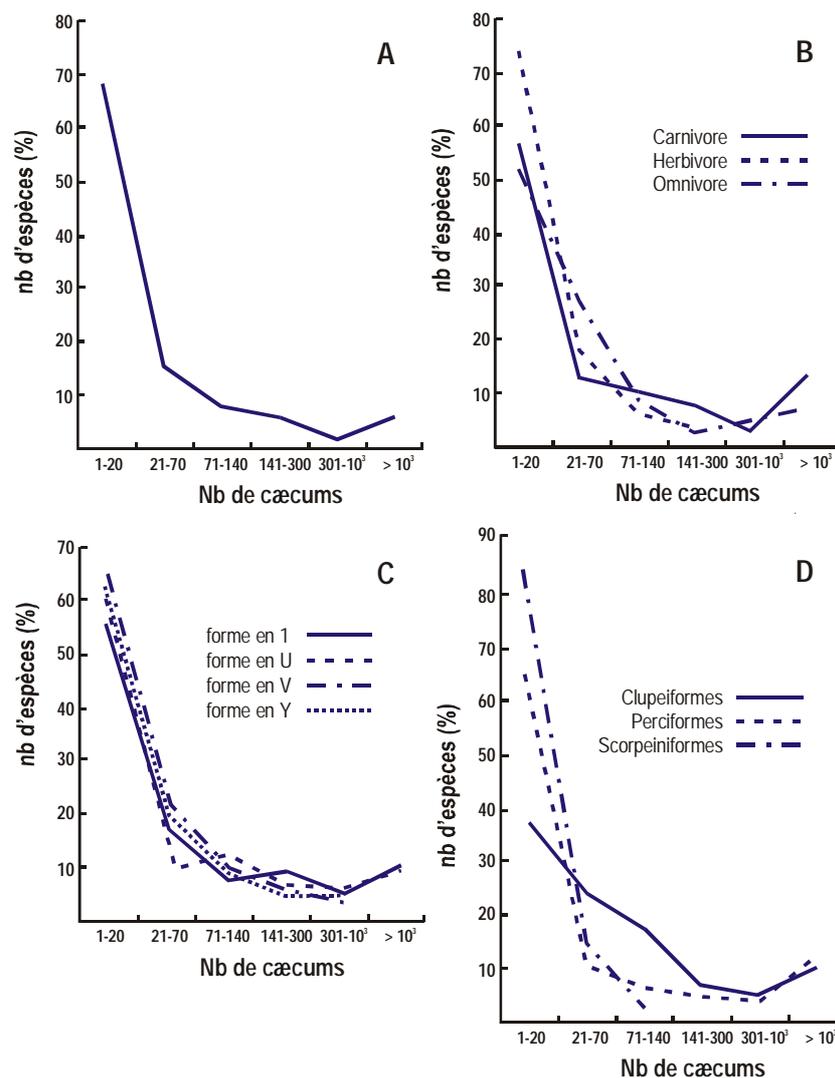


Figure I-10 Fréquence de distribution du nombre de cæcums pyloriques chez l'ensemble des Téléostéens en possédant (A), selon le régime alimentaire (B), l'aspect de l'estomac (C) et l'appartenance taxinomique des poissons (D) (d'après Hossain & Dutta 1996).

Aujourd'hui, la fonction des cæcums pyloriques est toujours méconnue. Plusieurs hypothèses ont été émises. Certains auteurs y voient des précurseurs du pancréas, dont le tissu exocrine est diffus chez la plupart des espèces de Téléostéens (cf. *infra*) et disséminé en particulier entre les cæcums.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Chez *Lepomis macrochirus*, l'analyse ontogénique montre que la formation des cæcums est associée à la formation de l'estomac. Cependant l'analyse histologique met en évidence une forte similarité de structure avec l'intestin, mais pas de cellules sécrétrices. Il semble que les cæcums soient impliqués comme l'intestin dans les processus de digestion et d'absorption (Hossain & Dutta 1996). Une implication des cæcums dans l'assimilation des graisses et des cires est aussi supposée. L'intestin proprement dit commence en aval des appendices pyloriques.

### I.2.1.4 L'INTESTIN

L'intestin se présente comme un tube plus ou moins long et plus ou moins enroulé ou replié sur lui-même. Il est d'apparence uniforme sans différence visible à l'œil nu. La différence de longueur de l'intestin est généralement reliée au comportement alimentaire de l'espèce avec un intestin plus long chez les herbivores et les microphages que chez les carnivores. Si une forte corrélation a pu être observée entre le régime alimentaire et la longueur de l'intestin, cette règle ne peut cependant pas être considérée comme absolue.

La paroi intestinale comporte trois tuniques : une muqueuse, une musculuse et une séreuse. Sur la base des différences histologiques, on distingue trois régions : l'intestin proximal, l'intestin moyen et l'intestin distal, mais cela est controversé. Les résultats de l'analyse histologique des différentes régions indiquent que la partie proximale serait plutôt le site d'absorption des lipides, et la partie moyenne celle des macromolécules par pinocytose (Gargiulo *et al* 1998). Au niveau distal, les phénomènes d'absorption seraient limités aux échanges d'eau et d'ions. Chez les Téléostéens, l'intestin peut-être associé à d'autres fonctions physiologiques comme la respiration (Moreau 1988b), l'osmorégulation (Abaurrea Equisoain & Ostos Garrido 1996) ou la régulation acide-base (Wilson *et al* 1996). La partie terminale de l'intestin est plus ou moins différenciée en un rectum généralement de section plus large, dont la structure s'apparente à celle de l'intestin. La fermeture de l'intestin est réalisée par un sphincter anal. L'anus s'ouvre à l'extérieur en avant des papilles urinaires et génitales. Il n'y a pas de cloaque comme chez les Amphibiens.

### I.2.1.5 LE FOIE

Le foie est situé dans la partie antérieure de la cavité abdominale, il reçoit le sang de l'artère hépatique, et celui d'une ou plusieurs veines portes qui drainent les muqueuses intestinale et gastrique, la vessie natatoire, la rate et les tissus pancréatiques. Chez les Téléostéens, l'aspect du foie est variable. Le foie peut avoir une structure tubulaire comme chez l'anguille ou la plie, *Pleuronectes platessa*, mais la structure est généralement plus complexe. Il n'y a pas de lobules hépatiques comme chez les Vertébrés supérieurs. Toute la glande est un réseau de tubes glandulaires formant des canalicules biliaires qui s'anastomosent pour donner les canaux biliaires (Bruslé & González i Anadon 1996). Les canalicules sont généralement intracellulaires, à l'exception du foie du poisson-chat américain, dont la canalisation biliaire est totalement extracellulaire (Fänge & Grove 1979). Le foie des Téléostéens contient deux types d'hépatocyte, les uns riches en lipides, les autres riches en glycogène. L'importance relative de chaque type varie selon les espèces. Les lipides peuvent être présents en grande quantité dans le foie des poissons comme la morue, *Gadus morhua*, dont est extrait l'huile à usage thérapeutique. Ce caractère lipogénique du tissu hépatiques peut conduire à assimiler le foie comme un lieu de stockage des lipides (Guillaume & Choubert 1999).

### I.2.1.6 LE PANCRÉAS

À l'inverse du foie, le pancréas exocrine n'est pas directement identifiable chez la plupart des Téléostéens. D'un point de vue anatomique la structure du pancréas exocrine des Téléostéens diffère d'une espèce à l'autre. Une classification des types de pancréas a été proposée par Legouis en 1873 (Naguib 1958). Quatre types de pancréas sont ainsi distingués : compact, intrahépatique, disséminé et diffus.

Le pancréas compact, qui est la structure type du pancréas des Sélaciens, n'est pas réellement rencontré chez les Téléostéens. Chez le brochet, *E. lucius*, le silure glane, *Silurus glanis*, l'anguille ou le congre, *Conger conger*, le pancréas décrit comme compact constitue un amas de tissus exocrine enclavé dans le tissu adipeux et mésentérique qui suit la veine porte à la surface de l'intestin. Ces tissus sont facilement identifiables et peuvent être isolés à l'aide d'un scalpel. Le suc pancréatique rejoint la lumière intestinale par un canal commun à l'ensemble du tissu glandulaire.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Le pancréas intrahépatique est une structure courante chez les Téléostéens, qui correspond à une « invasion » du tissu hépatique par des cellules pancréatiques exocrines. Les canaux pancréatiques débouchent alors dans le cholédoque avant de rejoindre la lumière intestinale. Ce type de distribution est rencontré notamment chez les carassins et les labres. La masse tissulaire apparemment identifiable comme un foie, est le plus souvent appelé « hépatopancréas » mais ne peut être assimilée à l'hépatopancréas des Invertébrés.

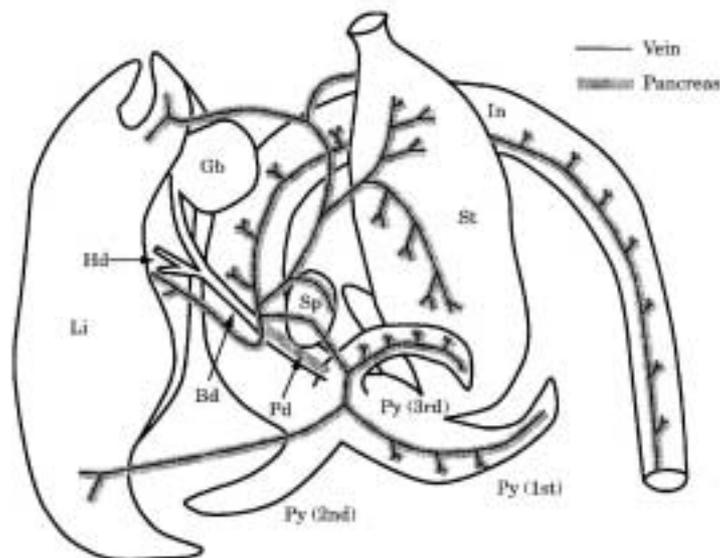


Figure I-11 Distribution du tissu pancréatique exocrine chez le flet, *P. olivaceus* (d'après Kurokawa & Suzuki 1995). St : estomac, Py : cæcums pyloriques, Pd : canal pancréatique, Bd : canal biliaire, Sp : rate, Gb : vésicule biliaire, Li : foie, Hd : canaux hépatiques, In : intestin.

La distinction entre pancréas diffus et pancréas disséminé est moins claire et peut-être moins utilisée actuellement. Selon Legouis, le pancréas disséminé correspond à une distribution du tissu pancréatique exocrine autour des vaisseaux sanguins de la cavité abdominale, comme chez le flet du Japon, *Paralichthys olivaceus* (Figure I-11). Cette distribution particulière est opposée à celle correspondant au pancréas intrahépatique. Le pancréas diffus devient alors une combinaison plus ou moins équilibrée de ces deux formes de distribution du pancréas exocrine. Le tissu pancréatique est constitué d'un réseau de tubules ramifiés ou d'acinus éparpillés dans le tissu conjonctif à la surface de la paroi intestinale, dans le mésentère, entre les cæcums pyloriques, dans la rate et dans le foie. Plusieurs canaux permettent l'écoulement du suc pancréatique dans l'intestin ou au niveau des cæcums. Ils peu-

## Chapitre I Exposé bibliographique

vent quelquefois se regrouper en un seul canal, analogue au canal de Wirsung chez les Vertébrés supérieurs, débouchant dans l'intestin à la hauteur du cholédoque. Ce type de pancréas diffus est très répandu chez les Téléostéens et notamment les tilapias. Présent sous forme d'un organe compact chez la truite à l'éclosion, le tissu se dissémine ensuite dans les tissus de la cavité abdominale et, selon les espèces, ce processus de diffusion est plus ou moins étendu. Une description du processus de développement du pancréas a été réalisée chez la larve du flet du Japon (Kurokawa & Suzuki 1996). Trois jours après l'éclosion, le pancréas exocrine est compact et localisé autour de la vésicule biliaire. Des granules de zymogènes sont déjà présentes. Le tissu pancréatique exocrine s'étend ensuite peu à peu à la surface de l'intestin à J10 et J20, puis gagne les cæcums pyloriques à J30, et l'ensemble du tissu conjonctif enveloppant le tractus digestif au moment de la métamorphose à J45. Ce type particulier de développement a permis de montrer qu'il n'existe aucun rapport fonctionnel entre les tissus pancréatiques exocrines et le tissu hépatique ou splénique selon le lieu de diffusion des cellules du pancréas exocrine.

Concernant le pancréas endocrine, les cellules du tissu pancréatique endocrine des Téléostéens sont séparées du tissu exocrine et regroupées en amas au voisinage du cholédoque constituant les corpuscules de Brockmann.

### I.2.2 Fluides digestifs et enzymes

#### I.2.2.1 SÉCRÉTIONS NON-ENZYMATIQUES

Dans le tractus digestif des Vertébrés, les sécrétions non-enzymatiques sont produites indépendamment, comme l'acide chlorhydrique et la bile, ou en même temps que les sécrétions enzymatiques. Une caractéristique des Poissons est l'absence de glandes salivaires.

#### ***Acide chlorhydrique***

La sécrétion d'un fluide gastrique acide est courante chez les Téléostéens muni d'un estomac. Des valeurs de pH allant de 3 à 5 ont été observées chez plusieurs espèces dont la perche, *Perca fluviatilis*, ou le tilapia du Mozambique. L'augmentation de l'acidité gastrique est associée à la prise de nourriture. Chez le tilapia du Nil, Moriarty (1973) a montré que dès l'entrée du bol alimentaire dans la

## Chapitre I Exposé bibliographique

cavité stomacale, le pH chute pour atteindre une valeur inférieure à 2, sept heures après le début de la prise alimentaire.

La sécrétion de l'acide chlorhydrique est produite par les glandes gastriques. Un seul type de cellule sécrète à la fois l'acide chlorhydrique et le pepsinogène (Gas & Noaillac-Depeyre 1981). Chez plusieurs espèces de tilapia, Gargiulo et al. (1997) n'observent pas de granules dans les cellules des glandes gastriques et concluent à la présence d'une seule forme de cellules responsables uniquement de la sécrétion acide. Des études *in vitro* réalisées chez la morue ont montré, qu'à l'image des Mammifères, la sécrétion acide est dépendante du pH de la lumière stomacale et agit de manière à le maintenir. Le taux de sécrétion acide de base est de  $6,0 \text{ nEq H}^+ \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  et peut être doublé sous l'action de l'histamine qui agit par l'intermédiaire d'un récepteur analogue au récepteur  $\text{H}_2$  des Mammifères (Bomgren & Jonsson 1996).

### ***Bile***

Chez les poissons la composition de la bile est similaire à celle des Mammifères (Fänge & Grove 1979). Elle est faiblement alcaline avec une concentration élevée en sodium et pauvre en chlorure. Les sels biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol hépatique, comme le montre l'incorporation de  $^{14}\text{C}$  dans les sels biliaires après injection de cholestérol- $^{14}\text{C}$ . Les composés majeurs sont le taurocholate et le taurochénodésoxycholate (Goto *et al* 1996). Ces mêmes auteurs décrivent la présence d'autres conjugués comme l'acide D-cystéinologique chez quelques espèces. Chez certains poissons, la bile pourrait contenir des enzymes liées à la présence de tissu pancréatique intrahépatique. Comme chez les Mammifères, les sels biliaires sont en partie réabsorbés au niveau intestinal (Sheridan 1988).

### ***Suc pancréatique***

Chez les Vertébrés supérieurs, le pancréas est aussi le siège d'une sécrétion non enzymatique, principalement des carbonates qui participent à la neutralisation du bol alimentaire quittant l'estomac. En raison des difficultés inhérentes à l'anatomie particulière du pancréas chez les poissons, la composition du suc pancréatique n'est pas connue. Il doit cependant être, comme chez les autres Vertébrés, riche en enzymes et contenir des carbonates. Des enzymes ont pu être extraites de tissus

riche en enzymes et contenir des carbonates. Des enzymes ont pu être extraites de tissus exempts de fluide intestinal et l'analyse histologique des cellules du tissu pancréatique exocrine montre la présence de zymogènes (Kurokawa & Suzuki 1995).

### I.2.2.2 SÉCRÉTIONS ENZYMATIQUES

Chez les Poissons, des activités correspondant à la plupart des grandes familles d'enzymes digestives présentes chez les autres Vertébrés, ont été observés dans la lumière intestinale. Avec notamment des protéases, des lipases et des glucosidases.

#### *Protéases*

Plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les protéines ont été mises en évidence chez les Poissons. Elles sont généralement retrouvées dans la plupart des segments du tube digestif (Tableau I.7). Rarement purifiées et caractérisées, elles sont désignées par analogie de comportement avec les enzymes décrites chez les Mammifères. Dans un souci de simplification, les dénominations pepsine, trypsine, chymotrypsine, etc.. seront utilisées pour qualifier les analogues de ces enzymes.

#### – Pepsine

Une activité de type pepsine a pu être mise en évidence chez les espèces dotées d'un estomac (Creac'h 1963), comme les silures ou les tilapias (Moreau 1988a). L'analyse histologique des glandes gastriques montre la présence de granules apparentées à des granules de pepsinogène (Gas & Noailac-Depeyre 1981). De la pepsine a tout d'abord été cristallisée à partir de la muqueuse stomacale du saumon pacifique, *O. tschawitcha* (Norris & Elam 1940). Les valeurs de pH optimal relevées étaient de 0,5 et 3,2 pour des préparations fraîches. D'autres activités de type pepsine ont été cristallisées chez plusieurs espèces comme l'albacore, *Thunnus albacores*, dont la composition en acides aminés de la pepsine s'est révélée différente de celle du porc. Chez le tilapia du Nil, une protéase gastrique a pu être purifiée et caractérisée (Yamada *et al* 1993). D'une masse moléculaire de l'ordre de 54 kD, son pH optimal est de 3,5 à 50 °C. Elle hydrolyse spécifiquement des substrats aromatiques. Lors du développement larvaire, l'apparition de l'activité pepsique est postérieure à celle de l'activité trypsique, chez le silure africain (Gaylord & Gatlin III 2000) et chez une dorade, *A. schlegelii* (Kawai & Ikeda 1973b).

## Chapitre I Exposé bibliographique

Tableau I.7 Localisation des différentes activités protéolytiques mises en évidence dans le tube digestif de poisson. \* E, estomac ; I, intestin ; C, cæcums pyloriques. Les caractères en italique indiquent les cas pour lesquels, l'enzyme a été cristallisée ou purifiée.

Enzyme	Localisation*	pH optimal	Espèce	Références
Pepsine	E	-	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	115
	E	3,0	<i>C. gariepinus</i>	232
	E	-	<i>Clarias mossambicus</i>	34
	<i>E</i>	-	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	58
	E	-	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	175
	<i>E</i>	0,5 & 3,2	<i>Onchorynchus tshawitsha</i>	171
	E	2,0	<i>O. mossambicus</i>	66
	E	2,8	<i>O. mossambicus</i>	167
	E	-	<i>O. niloticus</i>	2
	<i>E</i>	3,5	<i>O. niloticus</i>	256
	E	1,8	<i>P. fluviatilis</i>	40
	E	2,0	<i>P. fluviatilis</i>	66
	E	-	<i>Thunnus albacores</i>	172
	Trypsine	C	-	
			<i>A. schlegelii</i>	115
I		7 – 8	<i>Barbus paludinosus</i>	35
I			<i>Carassius auratus</i>	105
CI		-	<i>Chanos chanos</i>	13
I		8,2	<i>C. gariepinus</i>	232
			<i>C. carpio</i>	115
I		-	<i>Dicentrarchus labrax</i>	59
C		-	<i>D. labrax</i>	5
C		8,0	<i>G. morhua</i>	9
C		8,0	<i>G. morhua</i>	11
C		-	<i>Gadus aeglefinus</i>	175
C		-	<i>G. morhua</i>	174
C		-	<i>Katsuwonus wagans</i>	175
I		-	<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	59
C		8,0	<i>Mugil cephalus</i>	87
I		-	<i>O. mykiss</i>	175
C		9,0 – 10,0	<i>O. mykiss</i>	125
C		-	<i>Oncorhynchus sp.</i>	41
I		> 7,0	<i>O. mossambicus</i>	66
I		8 – 8,2	<i>O. mossambicus</i>	167
I		7,9	<i>O. niloticus</i>	116
I			<i>O. niloticus</i>	164
<i>I</i>		8,5 – 9,0	<i>O. niloticus</i>	253
I		-	<i>Oreochromis shiranus chilwae</i>	34
I		> 7,0	<i>P. fluviatilis</i>	66
I		-	<i>S. trutta</i>	101
I		-	<i>Tinca tinca</i>	101
Chymotrypsine		<i>I</i>	8,6 & 10,0	<i>Alloctytus niger</i>
	CI	-	<i>C. chanos</i>	13
	I	7,8	<i>C. gariepinus</i>	232
	I	-	<i>D. labrax</i>	59
	C	7,8	<i>G. morhua</i>	8
	I	-	<i>M. chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	59
	C	9,0	<i>O. mykiss</i>	125
	<i>I</i>	8,5 – 9,0	<i>O. niloticus</i>	253

## Chapitre I Exposé bibliographique

Enzyme	Localisation*	pH optimal	Espèce	Références
Carboxypeptidases (A ou B)		-	<i>D. labrax</i>	5
	CI	-	<i>D. labrax</i>	59
	CI	-	<i>M. chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	59
Aminopeptidases	Absente	-	<i>O. niloticus</i>	164
	CI	-	<i>D. labrax</i>	59
	CI	-	<i>M. chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	59
	I	-	<i>Pagrus major</i>	128
	I	-	<i>P. olivaceus</i>	128
Peptidases	I	-	<i>P. fluviatilis</i>	98
	I	-	<i>C. mossambicus</i>	34
	EI	-	<i>O. mossambicus</i>	156
	I	-	<i>O. niloticus</i>	116
	I	-	<i>O. shiranus chilwae</i>	34

### – Trypsine et chymotrypsine

Des activités trypsiques ont été mises en évidence dans les différents segments de l'intestin ainsi que dans les cæcums pyloriques (Tableau I.7). Pour certaines espèces, les protéines ont pu être purifiées et même cristallisées. Les valeurs des masses moléculaires varient de 23,8 à 28,0 kDa pour les trypsines ou les analogues (Beirao & Mackie 1994). Pour ces mêmes enzymes, les pH optimaux observés sont de l'ordre de 8. Chez le saumon atlantique, deux isozymes de la trypsine sont décrits, TRP-2\*92 et TRP-2\*100. La présence de l'allèle TRP-2\*92 dans une souche se traduit par une meilleure assimilation des protéines (Torrissen *et al* 1994).

Une enzyme de type chymotrypsine a été mise en évidence chez la plupart des poissons pour lesquels une activité trypsique a été observée. Une masse moléculaire de 28 kDa a été trouvée chez la truite (Kritjansson & Nielsen 1992) et de 21 kDa chez le tilapia du Nil (Yamada *et al.*, 1991). Chez cette dernière espèce, une autre protéase de masse moléculaire 32 kDa a été isolée.

### – Amino-, carboxy- et dipeptidase

Des activités de types exopeptidases sont aussi décrites (Tableau I.7). Avec des aminopeptidases, plusieurs carboxypeptidases et d'autres activités plus généralement décrites comme dipeptidases ou peptidases, dont la localisation sur l'ensemble du tube digestif est imprécise. Chez le tilapia du Nil, aucune activité carboxypeptidase n'a pu être mise en évidence.

### ***Lipases***

L'existence d'une lipase permettant l'hydrolyse de la tributyrine a été décrite dans l'estomac et l'intestin du tilapia du Mozambique, avec un pH optimal de 7,15 (Nagase 1964), alors que la recherche de lipase dans l'intestin et le tissu pancréatique exocrine du tilapia du Nil est restée vaine (Keddis 1956). En évitant l'utilisation de solvants organiques dans leurs préparations, une activité qualifiée de lipase pancréatique a pu être isolée dans le tissu adipo-conjonctif intercaecal de la truite et dans le tissu hépatique de la carpe (Léger 1981). Une activité de même nature a aussi été décrite chez un anchois, *Engraulis mordax* et chez un chinchard, *Trachurus symmetricus*.

### ***Amylases et autres glucosidases***

Des activités amylasiques ont été décrites chez de nombreuses espèces, que ce soit des espèces à tendance omnivore, comme le tilapia, ou carnivore, comme la perche (Tableau I.8), ou des espèces d'origine dulçaquicole ou marine, comme le *Siganus*. Plus récemment, l'amylase de l'intestin d'un tilapia du Nil a été purifiée (Yamada *et al* 1991b). Deux isoformes seraient présentes avec des masses moléculaires de 54 et 56 kD et des pI de 7.7 et 7.2.

La localisation de l'activité amylasique reste incertaine. Pour certains auteurs, elle serait aussi présente dans l'estomac. Nagase (1964) mentionne la présence d'une faible activité dans l'œsophage et l'estomac du tilapia du Mozambique. Yamada *et al.* (1996) purifient une amylase stomacale chez le tilapia, mais obtiennent une protéine de masse moléculaire plus faible que celle de l'amylase provenant de l'intestin, 40 kDa contre 54 – 56 kDa.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Tableau I.8. Localisation des différentes activités amylasiques mises en évidence dans le tube digestif de poissons \* E, estomac ; I, intestin ; C, caecums pyloriques ; H, hépatopancréas.

Espèce	Localisation	pH optimal	Références
<i>B. paludinosus</i>	I	8 – 9	35
<i>C. gariepinus</i>	I	7,8	232
<i>C. mossambicus</i>	I	-	34
<i>C. carpio</i>	I	-	112
<i>Heterotis niloticus</i>	ECI	8,5	231
<i>L. macrochirus</i>	EI	-	257
<i>O. mossambicus</i>	I	6,7	166
<i>O. mossambicus</i>	EI	5 – 8	66
<i>O. mossambicus</i>	EI	-	258
<i>O. niloticus</i>	I	6,2	116
<i>O. niloticus</i>	I	6,0	254
<i>O. niloticus</i>	E	6,0	257
<i>O. shiranus chilwae</i>	EI	-	34
<i>P. fluviatilis</i>	I	-	66
<i>P. major</i>	H	-	112
<i>Periophthalmus koelreuteri</i>	I	7,0 – 7,4	50
<i>Plecoglossus altivelis</i>	ECI	-	112
<i>Rutilus rutilus</i>	I	-	99
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	I	-	99
<i>Siganus canaliculatus</i>	I	6,5	193

D'autres osidases ont été observées, comme des maltases (Keddis 1956 ; Kawai & Ikeda 1971 ; Ugwumba 1993), ou une alpha-glucosidase purifiée dans l'intestin du tilapia du Nil (Yamada *et al* 1992), mais aussi des laminarinases (Piavaux 1977) et des cellulases (Niederholzer & Hofer 1979).

Le gène de l'amylase a aussi été largement étudié chez une espèce utilisées par les généticiens, le gambusie, *Gambusia affinis* (Yardley 1988).

### I.2.2.3 ADAPTATION AU RÉGIME ALIMENTAIRE

Dans le cadre d'études écologiques, de nombreux travaux ont permis de montrer une relation entre le régime naturelle des espèces et les activités des enzymes digestives présentes dans le tube digestif. Hofer et Siemer (1981) analysent huit espèces d'un lac du Sri Lanka, et trouvent une activité protéolytique plus élevées chez les espèces à tendance omnivore ou carnivore. Des résultats analogues ont été trouvés par ces mêmes auteurs chez les poissons du Lac Majeur (Hofer, *comm. pers.*).

Les études intraspécifiques sont plus rares. Chez le tilapia du Mozambique, une adaptation positive a été observée pour l'amylase et la trypsine, en fonction du régime (Nagase 1964). Kawai et Ikeda (1972) montrent une augmentation des activités protéolytiques avec la teneur en protéines des

## Chapitre I Exposé bibliographique

aliments chez la carpe commune. Plus récemment, l'évolution de l'activité trypsique et amylasique a été suivie dans l'intestin de la larve du bar, et une évolution analogue à celles existant chez les Mammifères, a été observée après 18 jours d'adaptation (Péres *et al* 1996). Chez *C. chanos*, une disparition de l'activité trypsique a été observée chez des animaux élevés en étang où la source de nourriture dominante était une algue verte filamenteuse, *Chaetomorpha brachygonia* (Benitez & Tiro 1982) qui contient un inhibiteur de la trypsine. Chez la larve de bar, la sécrétion de trypsine est stimulée par l'ingestion d'un mélange d'acides aminés essentiels et inhibés par l'ingestion d'un hydrolysat de caséine (Cahu & Zambonino Infante 1995). Enfin, une modification des activités enzymatiques, principalement des glucosidases, peut aussi être observée en fonction de l'âge et du régime habituel des espèces (Kuzmina 1996). Ainsi, chez le brochet, l'activité de l'amylase diminue avec l'âge alors qu'elle augmente chez le gardon.

### I.2.2.4 INFLUENCE DE LA FLORE MICROBIENNE

La présence d'une flore microbienne dans le tractus digestif des poissons est largement décrite (Lesel 1981). Toutefois son implication dans les processus digestifs reste douteuse (Sugita *et al* 1997) en raison des difficultés rencontrées pour l'estimation de l'importance *in situ* des enzymes d'origine microbienne. La présence d'acide gras à chaîne courte dans le tractus de certaines espèces permet de supposer l'existence d'un processus de fermentation (Clements & Choat 1995). Une flore capable de synthétiser la vitamine B12 a pu être mise en évidence et de ce fait les besoins alimentaires en cette vitamine sont considérés comme nuls pour le tilapia (Shiau & Lung 1993)

### I.2.2.5 MODE ET SITE D'ADSORPTION DES NUTRIMENTS

Hormis l'eau et les ions qui font l'objet d'échanges au niveau branchial, l'intestin est le site principal d'absorption des nutriments chez les poissons. Vis-à-vis de l'ensemble des processus d'absorption, l'intestin peut être considéré globalement comme composé de deux parties : une antérieure est le siège de l'absorption des lipides et de petites molécules, et une distale celui de l'absorption de macromolécules par pinocytose.

## Chapitre I Exposé bibliographique

Impliquée chez certaines espèces dans les processus permettant l'osmorégulation, l'intestin joue un rôle majeur dans l'absorption des ions tel que  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+$ . L'épithélium de l'intestin antérieur et des cæcums pyloriques serait principalement impliqué dans ces processus (Abaurrea Equisoain & Ostos Garrido 1996). L'intestin est le site principal d'absorption du calcium chez les espèces d'eau douce et de sécrétion chez les espèces marines. La régulation des apports en calcium est le résultat d'un ensemble de processus impliquant une absorption par diffusion passive et une excrétion par un transport actif du calcium avec un système d'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Robertson 1993 ; Flik & Verboost 1993). L'intestin joue aussi un rôle primordial dans l'absorption du magnésium chez le tilapia du Mozambique (Flik *et al* 1993).

Chez les Poissons, l'absorption du glucose produit par la digestion des polysaccharides est réalisée par un processus analogue à celui des Vertébrés Supérieurs, impliquant des transporteur spécifiques (Ferraris & Ahearn 1984). Le glucose dissous dans l'eau d'élevage peut être directement assimilé par la larve du bar ou de la dorade, *Sparus aurata* (Diaz *et al* 1994). Cette assimilation serait réalisée par l'intestin après ingestion de l'eau. Chez le tilapia, *O. mossambicus*, le transport de glucose et l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sont interdépendants et stimulés par l'application de thyroxine (T3) ou inhibés par l'application de 17  $\alpha$ -méthyl testérolone (Reshkin *et al* 1989).

Trois processus permettent l'absorption des protéines chez les poissons (Sire & Vernier 1992) : l'hydrolyse intraluminaire suivie de l'absorption sous forme d'acides aminés ou de dipeptides, l'absorption directe suivie d'une digestion intracellulaire des protéines, et enfin le transport transépithélial.

L'hydrolyse intraluminaire est réalisée par l'action conjointe des sécrétions acides, pour les poissons doté d'un estomac, et des enzymes protéolytiques sécrétées dans le tube digestif. Quelle que soit l'espèce, le principal site d'hydrolyse est la lumière intestinale. Les acides aminés libérés sont absorbés par la muqueuse selon un processus actif, qui peut-être saturant dans la partie distale de l'intestin. Chez le carassin, *Carassius carassius*, la vitesse d'absorption est dépendante de la nature des acides aminés formés et de la température (Smith 1983). *In vitro*, l'absorption est associée à la présence d'oxygène et à des mécanismes impliquant le système  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase. Ce processus est

## Chapitre I Exposé bibliographique

analogue à celui de l'absorption de glucose, mais indépendant (Marcotte & de la Noüe 1984). Pour Dabrowski (1983), les concentrations d'acides aminés produits *in vivo* seraient très élevées et l'absorption de ces acides aminés ne résulterait que d'un phénomène passif. Cette observation ne justifie cependant pas l'existence du mécanisme étudié *in vitro* par Smith qui permet l'absorption de la glycine par la muqueuse intestinale du carassin contre un gradient de concentration.

L'absorption directe des protéines est réalisée par pinocytose au niveau de la muqueuse du segment intestinal postérieur. Elle a tout d'abord été décrite comme une adaptation particulière chez la larve dont le tube digestif n'est pas encore fonctionnel. L'observation du même phénomène chez l'adulte a permis de montrer qu'il s'agit d'un processus plus généralement répandu chez les poissons (Gas & Noillac-Depeyre 1978). L'existence du processus d'endocytose des protéines a été démontrée avec des protéines aussi volumineuse que la ferritine (480 kDa) et plus généralement étudiée avec la peroxydase de raifort (40 kDa) pour sa facilité de détection en histologie. Le phénomène a été décrit chez de nombreuses espèces de poissons dont la carpe, un autre poisson-chat américain, *Ameiurus nebulosus*, le silure africain (Sire & Vernier 1992) ou l'anguille (Kurokawa *et al* 1996). Les protéines ainsi absorbées au niveau de la partie distale de l'intestin font l'objet d'une digestion intracellulaire, qui est accomplie par l'action conjointe de deux protéases lysomales, les cathepsines D et B, l'activité de la première étant régulée par la prise alimentaire (Sire & Vernier 1992).

Observé initialement chez la carpe, le transport transépithélial des protéines peut-être la conséquence de conditions pathologiques particulières agissant sur l'intégrité de la muqueuse ou de phénomènes permettant le transit sans dégradation des protéines absorbées par les cellules de la muqueuse (Sire & Vernier 1992). Ce dernier phénomène a été observé chez la carpe et la truite arc-en-ciel, en particulier pour le transport de l'hormone de croissance bovine après injection rectale (Le Bail *et al* 1989). Ce processus met en jeu le système immunitaire intestinal des poissons et permettrait le transfert non-invasif de molécules d'intérêt biologique dans le cas des élevages avec des vaccins ou de l'étude de certaines hormones.

Comme chez les autres Vertébrés, l'absorption de lipides par les poissons se fait par l'intermédiaire de micelles formés sous l'action des sels biliaires sur les lipides ingérés (Guillaume &

## Chapitre I Exposé bibliographique

Choubert 1999). Les lipides alimentaires sont assimilés sous forme d'acides gras qui peuvent être réestérifiés en triglycérides dans l'entérocyte (Sheridan 1988). Ces produits sont assemblés à des lipoprotéines pour former des chylomicrons qui constituent la forme de transport des acides gras dans le sang. La taille de ces chylomicrons est dépendante de la nature du repas. De 1000 à 5000 Å pour un repas standard, ils peuvent avoir un diamètre supérieur à 6500 Å pour un repas riche en acide gras n-3. L'observation de ces chylomicrons a permis de localiser le site préférentiel de l'absorption des lipides au niveau de la partie antérieure de l'intestin et des cæcums pyloriques chez la truite (Garrido *et al* 1993). Pour les acides gras polyinsaturés, une absorption spécifique a été décrite au niveau de la partie distale de l'intestin ou du rectum chez le turbot, *Scophthalmus maximus* (Koven *et al* 1994).

## Chapitre II MATÉRIEL ET MÉTHODES

Au cours de ce travail, des méthodologies particulières ont été mises en oeuvre pour des études zootechniques sur des individus vivants et leur environnement, et pour des études de biochimie sur les propriétés des amylases de tilapias. Les expériences ont été réalisées sur plusieurs espèces de poissons tropicaux, au Centre de Recherches Océanologiques (CRO) à Abidjan (Côte d'Ivoire), à la Station de l'INRA à Kourou (Guyane Française), au Groupe d'Aquaculture continentale Méditerranéenne et Tropicale (GAMET) à Montpellier (France métropolitaine), et à la Faculté des Sciences et Technique de St-Jérôme, Université Aix-Marseille III à Marseille (France métropolitaine).

### ***II.1 Matériel biologique et conditions expérimentales***

#### **II.1.1 Les poissons**

Six espèces de poissons susceptibles d'être élevés en eaux chaudes ont été l'objet de cette étude : le tambaqui, *C. macropomum* d'origine sud américaine ; deux tilapias d'origine africaine, *O. niloticus* et *S. melanotheron* ; et trois silures, le silure africain, *Heterobranchus longifilis* d'origine africaine, le silure glane, *S. glanis* d'origine européenne, et l'atipa *Hoplosternum littorale* d'origine sud américaine. Les tambaquis proviennent d'une pisciculture expérimentale du Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) dans l'État du Pará au Brésil. Les deux espèces de tilapias ont été obtenues auprès du CRO d'Abidjan ou du GAMET. Ils proviennent de souches ivoiriennes, souche « Bouaké » pour *O. niloticus* et souche « lagune Ébrié » pour *S. melanotheron*. Les silures africains *H. longifilis* proviennent également de Côte d'Ivoire. Ils ont été obtenus au GAMET à partir des géniteurs descendant d'une population d'individus initialement capturés dans la lagune Ébrié et élevés au CRO d'Abidjan. Les silures glanes ont été fournis par le CEMAGREF qui dispose d'un stock de géniteurs élevés au GAMET. Les atipas, *H. littorale*, ont été fournis par la station expérimentale de Soucoumou de l'INRA en Guyane française.

L'ensemble du travail a été réalisé sur des jeunes individus, avec une masse corporelle comprise entre 2 et 50 g en début d'expérimentation. Dans tous les cas, les poissons ont été obtenus directement à la taille convenant au type d'expérimentation envisagée. Avant chaque expérience de zoo-

## Chapitre II Matériel et Méthodes

technie, les poissons ont été acclimatés aux structures expérimentales pendant au moins quatre semaines. Au terme de cette période, ils ont été triés et pesés individuellement, au dixième de gramme près, pour constituer le nombre de lots requis pour chaque expérimentation avec un coefficient de variation maximal de la masse corporelle de 5 %. Pour les études de calorimétrie indirecte, les poissons destinés à l'expérimentation ont été préalablement acclimatés au confinement et utilisés à la demande. Toutes les manipulations de poissons ont été réalisées sur des individus préalablement anesthésiés dans une solution de phénoxyéthanol (150 mg.L<sup>-1</sup>). Aucune mortalité n'a été observée après anesthésie, et le fait que les poissons acceptent de la nourriture dans les deux heures suivant le « réveil » atteste de la bonne récupération post anesthésie. Les poissons prélevés en cours d'expériences ont été sacrifiés, égouttés, puis enveloppés dans des sacs plastiques hermétiques et maintenus à -20 °C avant préparation pour analyse. En préalable à toute analyse, les corps des poissons ont été broyés à l'état congelé à l'aide d'un broyeur ménager à couteaux (Hachoir Moulinex<sup>®</sup>) et en présence d'une masse équivalente d'eau distillée pour faciliter l'homogénéisation. Des aliquotes de l'homogénat ainsi obtenu ont été prélevées et insérées dans des microtubes à centrifuger type Eppendorf<sup>®</sup>, hermétiquement clos et conservés à -20 °C avant les analyses proprement dites.

### II.1.2 Préparations des aliments

Les expériences ont été menées en utilisant des aliments semi-purifiés rassemblant les ingrédients nécessaires de manière à fournir les quantités requises en protéines, énergie d'origine glucidique, acides gras essentiels et oligo-éléments (vitamines et minéraux). Les protéines ont été fournies par des farines de poisson. Des farines de poissons réputées pour leur qualité (Cho & Kaushik 1990), type Corpesca<sup>®</sup> ou Islande70<sup>TM</sup> (SANOFI), ont été sélectionnées à cet effet. L'utilisation de ces produits a été préférée à un apport « synthétique » du type mélange caséine/gélatine pour leur coût et leur disponibilité, pour l'équilibre de leur composition en acides aminés et pour fournir un apport alimentaire plus proche de l'alimentation naturelle de l'animal. L'énergie glucidique a été fournie par incorporation d'amidon. Une « farine basse de manioc », sous produit agro-industriel de la fabrication de tapioca et de fleur de manioc, a été utilisée. Ce produit a été obtenu auprès de l'usine de Toumody en Côte d'Ivoire. Il s'agit d'une farine riche en fibres et produite par séchage à chaud de la pulpe de manioc

## Chapitre II Matériel et Méthodes

après extraction de la fleur de manioc à l'eau. L'apport en acides gras essentiels a été satisfait par adjonction d'huile de soja commercial (Lesieur®) afin de garantir un rapport d'acides gras polyinsaturés linoléique/linoléique (n-3/n-6) inférieur à 1, préférable pour les espèces de poissons d'eau douce et d'origine tropicale (Steffens 1989).

Les oligo-éléments, vitamines et minéraux, sont incorporés sous forme de mélanges fournis à façon par la société AGRIBASE. Préparés à partir de composés constituant des sources facilement assimilables notamment pour les minéraux, leur composition a été définie sur la base des besoins déterminés pour les tilapias (Jauncey & Ross 1982 ; Shiau & Suen 1992 ; Shiau & Jan 1992 ; Shiau & Lung 1993 ; Shiau & Hwang 1993 ; Shiau & Hsieh 1997 ; Shiau & Chin 1999). La composition de chaque mélange est indiquée dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 Composition des mélanges vitaminique et minéral utilisés pour la préparation des aliments. Les valeurs sont exprimées en unités de matière active pour chaque mélange par kg de masse sèche.

Mélange vitaminique			Mélange minéral		
Vitamines	Quantité	Unités	Élément minéral	Quantité	Unités
A	200 000	UI	P	168	g
D3	1 000 000	UI	Ca	210	g
E	40 200	UI	Mg	13	g
K3	4	G	Na	30	g
C	100	G	S	1,2	g
B1	5	G	Zn	1,25	g
B2	5	Mg	Cu	200	mg
B6	5	G	Mn	300	mg
B12	10	mg	Fe	6,7	g
Pantothénate	11	g	I	150	mg
PP	20	g	Co	100	mg
Biotine	600	mg	Se	8	mg
Acide Folique	1,5	g			
Choline	230	g			

Avant usage, tous les ingrédients ont été conservés dans des barils hermétiques en plastique alimentaire (polyéthylène haute densité) dans un milieu sec, frais et à l'abri de la lumière, à l'exception des vitamines qui ont été conservées en chambre froide (4 °C) en fraction de 500g dans des sacs plastiques munis d'une fermeture hermétique (Ziploc®).

Les aliments ont été préparés par voie humide à l'aide d'un hachoir de boucherie muni d'une filière dotée de perforations de 1,5 mm de diamètre. La cohésion de l'aliment a été assurée par l'incorporation d'alginate de sodium (Sigma®) dans le mélange (10 g.kg<sup>-1</sup>). L'aliment humide a été

## Chapitre II Matériel et Méthodes

fragmenté manuellement en tronçons d'environ 5 mm, emballé dans des sacs hermétiques par fraction de 500 g et conservé à -20 °C. Une fraction aliquote a été prélevée pour chaque préparation au moment de la fabrication et maintenue à -20 °C pour analyse. Avant utilisation, les aliments ont été décongelés pendant une nuit à 4 °C, et la matière sèche a été déterminée pour l'ajustement des rations. En cours d'utilisation, l'aliment ainsi décongelé a été conservé à 4 °C pendant un laps de temps minimal, toujours inférieur à quatre jours pour éviter toute dégradation. L'aliment ainsi préparé a une consistance molle bien acceptée par les poissons.

Les coefficients d'utilisation digestive apparents des aliments et nutriments ont été déterminés en utilisant un marqueur non assimilable (Cho & Kaushik 1990). De l'oxyde de chrome ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) a été ajouté dans les aliments comme marqueur, à raison 10 g par kg d'aliment sec.

### II.1.3 Conditions d'élevages

Les expériences menées au sein du GAMET (Montpellier France), ont été conduites dans un circuit d'élevage autonome doté d'un système de recirculation de l'eau avec filtration mécanique et biologique (Figure II-1). Ce circuit était composé de 18 bacs rectangulaires d'un volume de 70 L réalisés en polyester stratifié recouvert d'un gelcoat alimentaire.

Le débit de l'eau a été ajusté à l'entrée de chaque bac afin de permettre son renouvellement en moins d'une heure. L'ensemble du circuit était doté d'un mécanisme de thermorégulation à l'aide de résistances électriques permettant le maintien de la température de l'eau à  $28\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Chaque bac était équipé d'un système d'aération par bulleur permettant un maintien de la concentration en oxygène dissout proche de la saturation. Une photopériode de 12h:12h (jour:nuit) a été maintenue par des lampes à fluorescence contrôlée à l'aide d'une minuterie. La qualité de l'eau d'élevage a été suivie chaque semaine. Elle est toujours restée dans les limites de tolérance acceptables par les poissons : concentration en azote ammoniacale  $[\text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+]$  inférieure à  $1\text{ mg.L}^{-1}$  ( $71\text{ }\mu\text{M}$ ), concentration en nitrite  $[\text{NO}_2^-]$  inférieure à  $0,002\text{ mg.L}^{-1}$  ( $43,5\text{ nM}$ ) et pH 8. La teneur en oxygène dissout dans l'eau à l'intérieur des bacs est restée comprise entre  $3\text{ et }5\text{ mg.L}^{-1}$  ( $94\text{ et }156\text{ }\mu\text{M}$ ).

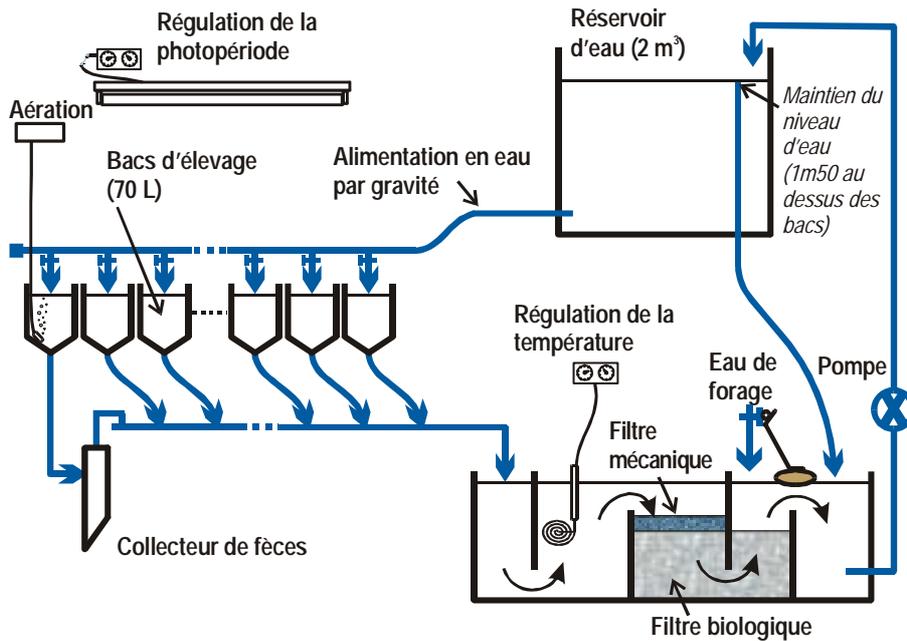


Figure II-1 Schéma de l'installation expérimentale en circuit fermé utilisée au GAMET.

En début d'expérience, les poissons ont été pesés individuellement et distribués de façon aléatoire dans les bacs de manière à constituer des lots homogènes. Les rations alimentaires quotidiennes ont été distribuées en trois repas égaux à 8h00, 12h00 et 17h00, tout en veillant à ce que l'ensemble de la ration soit effectivement consommé. Chaque semaine, les poissons de chaque bac ont été pesés pour permettre l'ajustement des rations. En début et en fin d'expériences, au moins cinq individus de chaque lot expérimental ont été sacrifiés pour analyse. Toutes les manipulations de poissons ont été réalisées dans les conditions préalablement décrites. Au Centre de Recherches Océanologiques d'Abidjan, un système d'élevage analogue a été utilisé. Cette structure comprenait 10 bacs en polyester cylindro-coniques de 110 L alimenté par un circuit fermé. Aucun moyen de thermorégulation n'a été nécessaire et le régime naturel de la photopériode (env. 12h:12h) a été conservé. Pour la mesure des CUDa, un système de collecte permettant la récolte en continu de fèces par décantation, « type Guelph », a été installé en sortie chaque bac. Les fèces ont été collectées juste avant la distribution des aliments. Pour éviter toute contamination avec des aliments qui n'auraient pas été ingérés par les poissons, les collecteurs ont été purgés après chaque distribution d'aliment. Les échantillons de fèces ont été congelés puis lyophilisés et conservés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant analyse.

### II.1.4 Calcul des indices et analyse statistique

Trois indices zootechniques ont été utilisés pour la description des résultats: le taux de croissance spécifique en masse fraîche (TCS), l'indice de consommation (IC) et le coefficient d'efficacité protéique (CEP). Ils ont été calculés selon les formules suivantes : (1)

$$TCS = \frac{\text{Ln}(M_f) - \text{Ln}(M_i)}{\Delta T} = \frac{\text{Ln}(1 + \% \text{gain})}{\Delta T}, \text{ avec } M_i \text{ et } M_f \text{ la masse moyenne initiale et la masse}$$

moyenne finale des poissons exprimées (g), % **gain**, le gain de masse relatif ( $\text{g.g}^{-1}$ ), et  $\Delta T$  l'intervalle de temps (j) – un indice similaire peut aussi être calculé pour les variations de la masse protéique, de la

masse lipidique ou du contenu énergétique (Hogendoorn 1983 ; Xie *et al* 1997) ; (2)  $IC = A_i / \Delta M$ ,

avec  $A_i$ , la masse sèche d'aliment ingéré (g) et  $\Delta M$  le gain de masse corporelle associé (g) ; (3)

$CEP = \Delta M / P_i$ , avec  $\Delta M$  le gain de masse corporelle (g) et  $P_i$ , la quantité de protéines ingérée (g).

Le rapport entre l'accrétion d'un élément de la masse corporelle du poisson et la quantité ingérée de ce même élément a aussi été calculé pour la matière sèche, les protéines brutes et les lipides totaux. Pour les protéines brutes, le mode de calcul est le suivant : accrétion protéique / protéines ingérées. Ce rapport, ou taux de rétention protéique, est le même que le coefficient d'utilisation pratique de l'azote proposé par Terroine (Mambrini & Guillaume 1999) ou la valeur productive protéique (Steffens 1989). Pour reprendre les abréviations usuelles, le rapport correspondant à la matière sèche a été noté,  $CUP_s$ , pour coefficient d'utilisation pratique de la matière sèche, celui à l'azote ou aux protéines brutes  $CUP_p$  et celui aux lipides totaux  $CUP_L$ . Les formules de calcul correspondantes sont :  $CUP_s = \text{accrétion en MS} / \text{MS ingérée}$  ;  $CUP_p = \text{accrétion en protéines brutes PB} / \text{PB ingérées}$  ;  $CUP_L = \text{accrétion en LT} / \text{LT ingérés}$ .

L'analyse statistique des résultats a été effectuée en suivant un modèle d'analyse de variance hiérarchisé. Les calculs ont été faits à l'aide des procédures GLM et MIXED du logiciel SAS (SAS Institute Inc. 1989). Les comparaisons multiples des moyennes ont été réalisées avec un test de Tukey. Pour l'ensemble des tests, un seuil de confiance ( $\alpha$ ) de 5 % a été retenu.

## ***II.2 Méthodes d'analyses en expérimentation animale***

### **II.2.1 Analyse des aliments, des poissons et des fèces**

#### **II.2.1.1 ANALYSE PROXIMALE**

La matière sèche (MS), mesurée par perte de masse après avoir placé les échantillons dans une étuve pendant une nuit à 105 °C, est exprimée par unité de masse fraîche. La teneur en cendres brutes (CB), mesurée en comparant la masse des échantillons séchés à l'étuve à 105 °C à celle des mêmes échantillons après calcination durant 4 heures dans un four à moufle à 550 °C et refroidissement dans un dessiccateur, est donnée par unité de masse sèche. Les protéines brutes (PB), déterminées par la méthode Kjeldahl (Hart & Fisher 1971) avec le coefficient 6,25, sont exprimées par unité de masse sèche. Les lipides totaux (LT), déterminés par gravimétrie après extraction à l'éther de pétrole (40 – 60 °C) dans un appareil de Soxhlet (Hart & Fisher 1971) avec un minimum de 6 cycles de lavage (3 heures), sont donnés par unité de masse sèche.

#### **II.2.1.2 CALCUL DE L'ÉNERGIE BRUTE ET DE L'ÉNERGIE DIGESTIBLE**

Le contenu en énergie des échantillons a été calculé selon le principe général de la méthode d'Atwater à partir des concentrations en protéines, en lipides et en glucides. Les coefficients utilisés pour l'énergie brute sont : protéines brutes, 23,6 kJ.g<sup>-1</sup>, lipides totaux, 39,5 kJ.g<sup>-1</sup> et glucides, 17,2 kJ.g<sup>-1</sup> (N.R.C. 1993). Pour l'énergie digestible, les coefficients ont été calculés en utilisant le CUDa de chaque nutriment, ou à défaut 0,9 pour les protéines brutes, 0,85 pour les lipides totaux, et 0,8 pour les glucides (Guillaume & Choubert 1999). Pour obtenir l'équivalent énergétique métabolisable des protéines, un coefficient a été calculé à partir de la valeur de l'énergie digestible en tenant compte de l'équivalent énergétique de l'ammoniaque (24,9 kJ.g<sup>-1</sup> N) principale forme d'excrétion azotée, soit en final 17,6 kJ.g<sup>-1</sup> PB (Elliott & Davison 1975). En absence de données analytiques, la valeur de l'extractif non azoté a été utilisée pour estimer la teneur en glucides.

Le dosage du chrome a été réalisé en solubilisant l'oxyde de chrome Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> par oxydation en présence d'acide sulfurique, à l'aide de bromate de sodium et de permanganate de potassium (Stevenson & Clare 1963). La concentration en chrome, mesurée par absorption atomique après ajout

de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5 % m/v) pour éliminer toutes interférences avec le fer (Guncaga *et al* 1974), est donnée par unité de masse sèche à l'aide d'une courbe de référence, allant de 1 à 6  $\text{mg.L}^{-1}$  de chrome, réalisée avec une solution de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

### II.2.2 Analyse de l'eau

Les échantillons d'eau ont été prélevés dans des flacons hermétiques. Pour l'oxygène et le dioxyde de carbone total, les échantillons ont été dosés extemporanément. Pour l'azote ammoniacal total et l'urée, les échantillons ont été convenablement fixés ou conservés à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  après ajout d'une goutte de chloroforme pour éviter toute contamination bactérienne (Aminot & Chaussepied 1983).

L'oxygène dissous a été dosé par polarimétrie (Gnaiger & Forstner 1983), soit directement dans le milieu d'élevage à l'aide d'une sonde portable type YSI 57, soit au laboratoire à l'aide d'une électrode ORION<sup>®</sup> (réf. 9508) connectée à un pH-mètre/Ionomètre Consort. Les mesures ont été réalisées à la température du prélèvement et les concentrations exprimées en  $\mu\text{moles O}_2\text{.L}^{-1}$ .

La dioxyde de carbone total a été déterminée à la température du prélèvement à l'aide d'une électrode spécifique ORION<sup>®</sup> (réf. 9502) connectée à un pH-mètre/Ionomètre Consort<sup>®</sup> P507, après déplacement de l'ensemble des formes dissoutes de l'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  et carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  en dioxyde de carbone par acidification du milieu à l'aide d'un tampon citrate (1 M, pH 4,5) selon le protocole fourni par le constructeur (Manuel ORION<sup>®</sup> IM9502). L'appareillage a été étalonné avant chaque détermination avec deux dilutions (10 et 100  $\mu\text{M}$ ) d'une solution standard de bicarbonate de sodium (0,1 M). Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{moles de CO}_2\text{ tot.L}^{-1}$ .

L'azote ammoniacal total dans l'eau a été déterminé par la méthode au bleu d'indophénol ou à l'aide d'une électrode spécifique ORION<sup>®</sup> (réf. 9512-01). Pour la première méthode, les échantillons ont été fixés au moment du prélèvement par ajout des réactifs et maintenus dans l'obscurité à température ambiante pendant une nuit, avant analyse. Une courbe de référence (1 à 10  $\mu\text{M}$ ) a été réalisée dans les mêmes conditions avec une solution 150  $\mu\text{M}$  de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  conservée à  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Dans la seconde méthode, le dosage a été réalisé immédiatement après le prélèvement en déplaçant les ions ammoniums  $\text{NH}_4^+$  en ammoniac  $\text{NH}_3$ , par alcalinisation (NaOH 10 M) selon le protocole fourni

## Chapitre II Matériel et Méthodes

par le constructeur (Manuel ORION® IM9512). L'appareillage a été étalonné avant chaque détermination avec deux dilutions (1 et 10  $\mu\text{M}$ ) d'une solution standard de sulfate d'ammonium (150  $\mu\text{M}$ ). Les concentrations en azote sont été exprimées en  $\mu\text{moles N-NH}_3/\text{NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ .

La concentration en urée, déterminée par la méthode à la diacétylmonoxine sur les échantillons conservés à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , est exprimée en  $\mu\text{moles}.\text{L}^{-1}$ , en utilisant une courbe de référence de 1 à 10  $\mu\text{M}$  d'urée.

### ***II.3 Méthodes d'analyses biochimiques***

#### **II.3.1 Dosage des protéines**

Deux méthodes ont été retenues pour leur facilité de mise en œuvre et leur reproductibilité : la méthode par mesure de l'absorption à 280 nm pour les solutions ne contenant majoritairement qu'un seul type de protéine, et la méthode de Bradford, pour tous les autres cas. Une bonne corrélation entre ces deux méthodes analytiques a pu être constatée pour les protéines purifiées.

Pour l'absorption à 280 nm, la concentration a été calculée à partir de la densité optique mesurée dans une micro cuve en quartz (ou en méthacrylate) de 1 cm de trajet optique, en prenant le coefficient d'extinction spécifique ( $\epsilon$ ) de l'amylase pancréatique de porc (Koukiekolo *et al* 1999), soit  $2,5\text{ mg}^{-1}.\text{mL}.\text{cm}^{-1}$ .

Pour la méthode de Bradford, elle a été réalisée sur microplaque en utilisant le réactif Protein Bioassay (Biorad®) et l'albumine sérique de bœuf, BSA (Sigma®) pour établir la courbe de référence de 8 à 80  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Après avoir introduit dans chaque puits, 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon puis 200  $\mu\text{L}$  de réactif dilué (4x), l'absorption est lue à 590 nm dans un délai de temps compris entre 5 et 60 min. Une courbe de référence a été réalisée pour chaque série de mesure.

#### **II.3.2 Dosage des glucides**

##### **II.3.2.1 DOSAGE DE SUCRES RÉDUCTEURS**

Les sucres réducteurs ont été déterminés par la méthode de Dygert et al.(1965), qui repose sur la réduction en milieu alcalin des ions cuivriques en ions cuivreux par la fonction semi-acétal des su-

ces réducteurs. Les ions cuivreux réagissent avec de la néocuproïne et entraînent la formation d'une coloration brun-jaune, lue à 450 nm. Le seuil de détection est de l'ordre de 10 nM, et une courbe de référence (10 à 100 nM) est réalisée avec du maltose (Merck®). Il est à noter qu'on obtient à concentration égale, une intensité de coloration 1,5 fois plus forte avec du maltotriose (DP=3) qu'avec du glucose (DP=1). Les résultats obtenus sont exprimés en µmoles de groupements réducteurs par litre, en utilisant le maltose comme référence.

### II.3.2.2 DOSAGES DES SUCRES TOTAUX

Le réactif phénol sulfurique classique (Dubois *et al* 1956), utilisé pour ce dosage, est préparé extemporanément à partir de deux solutions mères (Tableau II.2) selon la méthode proposée par Volenweider (1974).

Tableau II.2 Solutions mères utilisées pour la préparation du réactif phénol sulfurique.

Solution de phénol 80 % (m/m)		Solution d'acide sulfurique 84 % (v/v)	
Phénol	80 g	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrée 96 %	250 mL
Eau	20 g	Eau	84 mL

Chaque microtube, contenant 200 µL de solution à doser additionnés d'1 mL de réactif phénol sulfurique, est chauffé à 100 °C dans un bain à sec pendant 30 min pour développer la coloration, et après refroidissement l'absorption est lue à 485 nm. La courbe de référence est établie avec du glucose (100 à 800 µM) préparé extemporanément à partir d'une solution mère 10 mM conservée à 4 °C. Les concentrations sont exprimées en µmoles.L<sup>-1</sup>. Pour l'amidon, une hydrolyse préalable à l'acide sulfurique est nécessaire (2,5 mg dans 1 mL d'acide sulfurique 0,5 M, à 100 °C dans un bain sec pendant 30 min). L'hydrolysât est refroidi et repris avec de l'eau avant de procéder au dosage.

### II.3.2.3 ANALYSE DES MALTODEXTRINES PAR HPAEC-PAD

L'analyse par HPAEC-PAD permet de séparer les sucres en milieu alcalin, par chromatographie sur une colonne d'échangeurs d'anions avec un gradient d'acétate de sodium, puis de les détecter et de les quantifier par ampérométrie pulsée. Un appareillage Dionex® comportant un injecteur automatique TSP AS3500, une pompe GP40 pour la réalisation des gradients, un détecteur type ED40 et équipé d'une colonne PA-100 (4x250 mm) protégé par une colonne de garde est utilisé à cet effet. Les

## Chapitre II Matériel et Méthodes

informations fournies par le détecteur sont recueillies et traitées avec un micro-ordinateur à l'aide du logiciel Borwin<sup>®</sup>. Le volume d'injection est de 25  $\mu\text{L}$ , le tampon d'équilibrage est un mélange de soude (100 mM) et d'acétate de sodium (5 mM), le gradient est obtenu avec un mélange de soude (100 mM) et d'acétate de sodium (500 mM) à raison de (1mL.min<sup>-1</sup>), soit 6 volumes de colonne en 19 min. Le glucose, le maltose et 5 maltodextrines (Sigma<sup>®</sup>) ont été utilisés comme standards (Tableau II.3).

Tableau II.3 Oligosaccharides utilisés comme standards de maltodextrines pour l'analyse en HPAEC-PAD.

Oligosaccharides	Abréviations	Gamme ( $\mu\text{M}$ )
Glucose	G1	10 à 50
Maltose	G2	10 à 50
Maltotriose	G3	5 à 25
Maltotétraose	G4	5 à 25
Maltopentaose	G5	5 à 25
Maltohexaose	G6	5 à 25
Maltoheptaose	G7	5 à 25

Pour les échantillons contenant des maltodextrines de DP supérieur à 7, aucune courbe de référence n'a pu être réalisée à partir de produits purs, mais les variations de pentes des courbes de références diminuant avec le degré de polymérisation (Tableau II.4), les quantités de maltodextrines de degré de polymérisation supérieur à 7 ont pu être évaluées à partir de la courbe de référence obtenue avec le G7. Les résultats sont été exprimés en  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ .

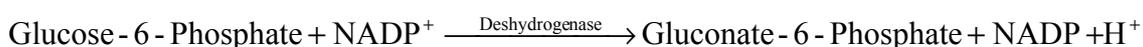
Tableau II.4 Estimation des pentes des droites d'étalonnages obtenues pour chaque maltodextrine utilisée comme standard. Les groupes de valeurs associées à un même lettre ne sont pas significativement différents. DDL : degré de liberté.

Standard	Pente	Erreur standard	DDL
G1	66 168 <sup>a</sup>	1 319	70
G2	80 697 <sup>b</sup>	1 319	70
G3	109 309 <sup>c</sup>	2 631	70
G4	119 244 <sup>d</sup>	2 638	70
G5	151 011 <sup>e</sup>	2 627	70
G6	146 109 <sup>e</sup>	2 625	70
G7	146 343 <sup>e</sup>	2 613	70

### II.3.2.4 DOSAGE DE L'AMIDON

#### *Méthode enzymatique*

Dans le kit de dosage (réf. 207 748, Boehringer®) utilisé, l'amidon est hydrolysé en glucose par une amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) d'*Aspergillus niger* qui coupe l'ensemble des liaisons  $\alpha$ -(1→4) et  $\alpha$ -(1→6). Le glucose libéré est dosé en mesurant le NADPH formé à 340 nm au terme des réactions suivantes :



Les échantillons d'amidon sont solubilisés dans un mélange de diméthyl sulfoxyde et d'acide chlorhydrique 8 M, et les résultats exprimés en mg d'amidon par g d'échantillon, sachant que 1 mg d'amidon correspond à la formation de 6,17  $\mu$ M de résidu glucose (1/162,1), soit à 6,17  $\mu$ M de NADPH. Le rendement de la méthode a été contrôlé à l'aide de l'amidon standard (maïs) fourni dans le kit.

#### *Méthode à l'iode*

Dans la méthode décrite par Oteng-Gyang (1979), la réaction est réalisée en mélangeant 100  $\mu$ L de solution à doser avec 2,4 mL de réactif iodo-ioduré (KI, 30  $\text{g.L}^{-1}$  et  $\text{I}_2$ , 3  $\text{g.L}^{-1}$ ) dilué à 4 % dans de l'eau. La densité optique à 620 nm permet de quantifier l'amidon à partir d'une courbe de référence réalisée avec de l'amidon de maïs « soluble selon Zukowski » (Merck®) de 1 à 10  $\text{g.L}^{-1}$ .

### II.3.3 Dosage des activités enzymatiques

#### II.3.3.1 DOSAGE DE L'AMYLASE

Les activités amylasiques ont été mesurées en suivant l'apparition des extrémités réductrices ou la disparition du substrat. Seule la première méthode permet de dénombrer les liaisons  $\alpha$ -(1→4) hydrolysées. Un coffret de dosage au pNPG7 (Sigma®) a aussi été utilisé pour mesurer ces activités.

### ***Apparition des sucres réducteurs***

Les activités amylasiques ont été mesurées à pH 6,9 dans du tampon phosphate de sodium 20 mM à 30 °C, température proche de la température corporelle du poisson. Le Tableau II.5 donne la composition finale du milieu réactionnel (500 µL). De l'amidon de maïs « soluble selon Zukowski » ou de l'amylose de pomme de terre (Type III Sigma®) dont la concentration finale est respectivement 1 g.L<sup>-1</sup> et 0,5 g.L<sup>-1</sup>, sont utilisés comme substrat. La réaction est arrêtée à 0, 2, 4 et 6 min, par une alcalinisation brusque du milieu avec le premier réactif de dosage des sucres réducteurs, le mélange mis dans un bain de glace, et au temps 0, l'enzyme est ajoutée. Le nombre de liaisons α-(1→4) clivées est déterminé par la méthode préalablement décrite pour le dosage des sucres réducteurs.

Tableau II.5 Composition finale du milieu réactionnel pour le dosage de l'activité amylasique.

<b>Composant</b>	<b>Concentration</b>
Tampon pH 6,9	
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	20 mM
<i>NaCl</i>	6 mM
<i>Amidon</i> ou	1 g.L <sup>-1</sup>
<i>Amylose</i>	0,5 g.L <sup>-1</sup>
Enzyme	< 16 10 <sup>-3</sup> UI

L'activité amylasique, en µmoles de liaisons α-(1→4) clivées par minute, correspond à la valeur d'usage de l'unité internationale (UI) d'activité amylasique (Dawson *et al* 1986).

### ***Disparition de l'amidon***

La concentration finale de l'amidon de maïs soluble est de 1 g.L<sup>-1</sup>, et le protocole suivi, identique à celui décrit précédemment pour les sucres réducteurs, excepté que la réaction a été arrêtée par ajout de 200 µL d'acide sulfurique 0,5 M. La concentration en amidon a été ensuite dosée par la méthode à l'iode. L'activité amylasique est exprimée en g d'amidon hydrolysé par minute.

### ***Méthode au pNPG7***

Cette méthode de détermination rapide de l'activité amylasique (coffret de dosage au pNPG7, Amylase Sigma Diagnostics N° 577) repose sur l'utilisation d'un substrat synthétique, le 4,6-éthylidène(G7)-4-nitrophénol(G1)-α,D-maltoheptaoside, ET-G7pNP ou pNPG7 (Rauscher *et al* 1986).

## Chapitre II Matériel et Méthodes

Sous l'action de l'amylase à 30 °C, plusieurs produits sont libérés dont un comportant un groupe 4-nitrophénol (pNP) associé à une maltodextrine plus ou moins longue dont l'extrémité réductrice est hydrolysable par l' $\alpha$ -glucosidase de levure (EC 3.2.1.20) fournie dans le coffret (Figure II-2). Le pNP libéré est suivi à 405 nm.

L'activité amylasique, calculée en multipliant la valeur de la différence d'absorption rapportée par unité de temps par un coefficient donné par le fournisseur (7 244 à 30 °C) est exprimée en unités enzymatiques arbitraires, par comparaison à un échantillon d'amylase humaine d'activité connue.

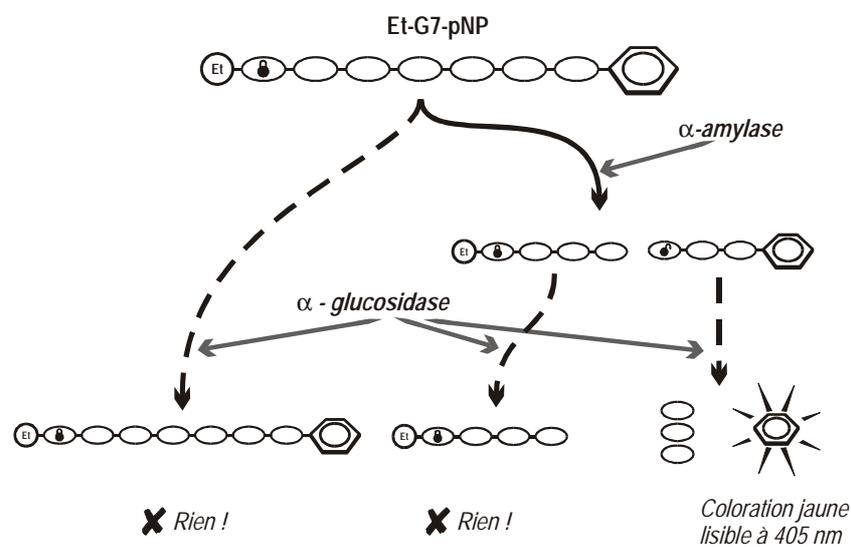


Figure II-2 Schéma de principe du kit de dosage de l'amylase Sigma®.

### II.3.3.2 DOSAGE DES ACTIVITÉS TRYPSIQUE ET CHYMOTRYPSIQUE

L'activité trypsique est mesurée en dosant à 405 nm la 4-Nitroaniline (pNA), libérée par l'hydrolyse du N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide (BAPNA) en cuve thermostatée à 30 °C pendant 10 min (Geiger & Fritz 1988). Dans le test 20  $\mu$ L d'extrait enzymatique sont ajoutés à 980  $\mu$ L d'une solution de BAPNA 0,8 mM dans du tampon triéthanolamine (0,2 M, pH 7,8 + CaCl<sub>2</sub> 20 mM). Une unité trypsique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu$ mole de pNA par minute, dans les conditions de l'analyse (30 °C, pH 7,8).

## Chapitre II Matériel et Méthodes

Pour l'activité chymotrypsique, le peptide de synthèse, N $\alpha$ -succinyl-L-alanine-L-alanine-L-proline-L-phénylalanine-4-nitroanilide (SucA<sub>2</sub>PPpNA) est utilisé (Bergmeyer & Graßl 1988). Le mélange réactionnel comprend 20  $\mu$ L d'extrait enzymatique, 980  $\mu$ L de SucA<sub>2</sub>PPpNA (0,5 mM) dans du tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 7,8 + CaCl<sub>2</sub> 20 mM) et de Triton-X100 0,05 % (m/v). L'apparition du pNA est suivie par spectrophotométrie à 405 nm, en cuve thermostatée à 30 °C pendant 10 min. Une unité chymotrypsique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu$ mole de pNA par minute, dans les conditions de l'analyse (30 °C, pH 7,8).

### II.3.4 Techniques d'isolement et de préparation des extraits

#### II.3.4.1 ÉCHANGE DE TAMPON

L'équilibrage des solutions d'amylases dans le tampon choisie a été réalisé dans des tubes Spectrapor<sup>®</sup> avec un seuil de coupure compris entre 3000 et 6000 daltons en respectant un rapport minimal de 1 à 100 entre le volume de l'échantillon à dialyser et le tampon final. Le tampon est changé une première fois après 30 min, et une deuxième fois après 1 heure. L'échantillon est ensuite laissé pendant une nuit dans le tampon à 4 °C, sous agitation. L'échange de tampon est aussi réalisé à l'aide de colonnes de gel filtration destinées à cet effet (HiDesalt<sup>®</sup> 5ml, Pharmacia) et d'un système FPLC<sup>™</sup> 500 (Pharmacia<sup>®</sup>). Après équilibrage de la colonne dans le tampon final, 1,5 mL d'échantillon sont déposés. Les protéines éluées sont recueillies manuellement en suivant en sortie de colonne l'absorption à 280 nm et la conductivité. Pour les échantillons d'un volume supérieur à 1,5 mL, le procédé est répété plusieurs fois.

#### II.3.4.2 PRÉCIPITATION DES PROTÉINES AU SULFATE D'AMMONIUM

Cette opération est réalisée dans un bain de glace sous une agitation modérée, en ajoutant progressivement le sulfate d'ammonium, afin que sa solubilisation soit totale. Après 1 heure d'agitation à 0 °C pour achever la précipitation des protéines, le mélange est centrifugé (10 000 g, 10 min, 4 °C) et le surnageant ou le culot sont alors récupérés.

### II.3.5 Techniques de chromatographie

Deux dispositifs permettant un débit de tampon constant, le suivi en continu de l'absorption à 280 nm de l'éluat et la collecte automatique des fractions sont utilisés : l'un, assemblé au laboratoire, comprenant, une pompe péristaltique ISTA, un lecteur UVICORD SII (LKB<sup>®</sup>) et un collecteur de fractions (LKB<sup>®</sup>) ; l'autre étant un système FPLC<sup>™</sup> 500 (Pharmacia<sup>®</sup>). Tous les tampons ont été filtrés sur une membrane à 0,45  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un système connecté à une pompe à vide permettant le dégazage partiel des solutions.

#### II.3.5.1 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR $\alpha$ -CYCLODEXTRINE SEPHAROSE<sup>®</sup> 6B

Elle est réalisée sur un gel de Sepharose 6B Pharmacia<sup>®</sup> (G6B) sur lequel a été greffé une  $\alpha$ -cyclodextrine Sigma<sup>®</sup> ( $\alpha$ -CD) selon le protocole suivant : 4 g de G6B, hydratés dans 32 ml d'eau, sont lavés sur verre fritté avec 400 ml d'eau pendant environ 1 h, puis le greffage est réalisé en incubant le gel dans 12 ml de NaOH 0,1M contenant 400  $\mu\text{moles}$  d' $\alpha$ -CD pendant 16 heures à 45 °C sous un système d'agitation par un va-et-vient. Le G6B greffé ( $\alpha$ -CD G6B) est ensuite lavé successivement avec 100 ml d'eau, 200 ml de glucose 0,14 M, 100 ml d'eau, 100 ml de tampon borate (0,1 M, pH 8 + NaCl 0,5 M) et 100 ml de tampon acétate (0,1 M, pH 4 + NaCl 0,5 M). Après introduction du gel greffé dans une colonne XK 16/20 Pharmacia<sup>®</sup> (16 x 110 mm), il est équilibré avec du tampon phosphate (20 mM, pH 6,9 + CaCl<sub>2</sub> 1mM) à raison de 0,4 ml.min<sup>-1</sup>. Après avoir chargé l'échantillon sur la colonne à l'aide de la pompe, le gel est rincé avec le tampon d'équilibrage afin d'éliminer les protéines non-retenues. Enfin, l'élution des protéines retenues sur le gel est réalisée en appliquant 20 ml d'une solution de  $\beta$ -cyclodextrine à 1 % dans le tampon d'équilibrage et l'éluat est collecté par fractions de 5 ml.

#### II.3.5.2 CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'ANIONS

Elle a été réalisée sur gel Mono Q<sup>™</sup> dans des colonnes Hitrap Q<sup>™</sup> (Pharmacia<sup>®</sup>) de 1mL. Le gel Mono Q<sup>™</sup> est équilibré à débit constant (1 ml.min<sup>-1</sup>) avec du tampon Tris-HCl (20mM, pH 8,2). L'élution des protéines fixées est obtenue en appliquant un gradient de NaCl (0 à 100mM) dans un

volume de tampon égal à 5 fois celui de la colonne. Des fractions de 0,5 mL sont recueillies à l'aide du système FPLC™ 500.

### II.3.5.3 CHROMATOFOCALISATION

Celle-ci permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). Elle a été réalisée sur un gel échangeur d'anions forts équilibré à un pH suffisamment élevé pour retenir l'ensemble des protéines à séparer. Après application des protéines sur le gel, celles-ci sont éluées séquentiellement par ajout d'un tampon constitué d'un mélange d'ampholines qui crée un gradient de pH à l'intérieur de la colonne. Comparée à la chromatographie sur échangeur d'anions, la chromatofocalisation permet une meilleure résolution de la séparation d'un mélange de protéines de pI voisin.

Pour la purification des amylases de poissons, la chromatofocalisation est réalisée sur gel PBE™ 94 (Pharmacia®) dans une colonne de 10 x 300 mm (Réf. 737-073, Bio-Rad®). Le débit d'éluion est maintenu constant (0,28 mL.min<sup>-1</sup>) et le volume des fractions collectées est de 2 ml.

Dans le cas du tilapia du Nil, *O. niloticus*, le gel est équilibré avec du tampon Tris-acétate (25 mM, pH 8,5) l'éluion des protéines étant réalisée avec 200 ml d'une solution 3 % (v/v) de Polybuffer™ 96 (Pharmacia) et 7 % (v/v) de Polybuffer™ 74 (Pharmacia®), dont le pH a été préalablement ajusté à 5,0 par addition d'acide acétique (5 M). Pour le tilapia bleu, *S. melanotheron*, le gel est équilibré avec du tampon éthanolamine-HCl (25 mM, pH 9,4) suivi de l'éluion des protéines avec 200 ml d'un tampon contenant 10 % de Polybuffer™ 96 ajusté à pH 7,5 avec de l'acide chlorhydrique (6 M). Pour la chromatofocalisation, le dispositif local de chromatographie a été utilisé à 4 °C et tous les tampons d'éluion ont été dégazés après filtration.

### II.3.5.4 PURIFICATION EN PRÉSENCE D'UN MÉLANGE D'INHIBITEURS

Elles sont réalisées à partir de plusieurs tractus digestifs de *S. melanotheron* conservés à -20 °C. La masse de tissu est scindée en deux parties aliquotes de 10 g chacune, la première étant homogénéisée avec 500 µL d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (SIGMA® réf. P8340), la seconde sans inhibiteur. Après l'étape de chromatographie d'affinité, les deux produits ont été chargés sur une

colonne échangeuse d'anions (QMA™, Waters SA®) et les protéines éluées en isocratique avec du tampon Tris 10 mM à pH 8,2.

### II.3.6 Techniques d'électrophorèse

Ces techniques permettent la séparation des protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Dans un gel créant une matrice solide qui permet le flux de solutés, les protéines sont soumises à un champ électrique et migrent plus ou moins rapidement selon leur taille, plus exactement leur encombrement stérique, dans le cas de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) ou selon leur point isoélectrique pI, dans le cas de l'isoélectrofocalisation (IEF).

La première technique a été utilisée pour dénombrer les entités protéiques présentes et comparer leurs masses moléculaires, la deuxième pour comparer et déterminer leurs points isoélectriques.

#### II.3.6.1 ÉLECTROPHORÈSES SDS-PAGE

Les électrophorèses SDS-PAGE ont été réalisées suivant le protocole de Laemmli (1970) en utilisant un appareil Mini Protean II™ (Biorad®).

Les gels de polyacrylamide ont été préparés selon le protocole fourni par Biorad®, à partir d'une solution à 30 % d'acrylamide:bis-acrylamide Sigma® (37,5:1). L'épaisseur des gels a été de 0,75 mm et la concentration totale en acrylamide (%T) de 10 % ou 12 %, dont 2,67 % de bis-acrylamide. Le tampon de migration (Tris-glycine, pH 8,3) a été préparé à partir d'une solution 5X comme indiqué par Biorad® (Tris base 15 g.L<sup>-1</sup>; glycine 72 g.L<sup>-1</sup>; SDS 5 g.L<sup>-1</sup>). Dans les conditions réduites, les protéines ont été traitées avant utilisation pendant 3 min à 100 °C dans du tampon d'échantillon contenant 1 mL de solution mère A et 200 µL de solution mère B de dithiotréitol (1 M) comme agent réducteur (Tableau II.6). Dans les conditions non-réduites ou natives, les protéines ont été placées dans du tampon d'échantillon constitué uniquement de solution A sans DTT et sans chauffage. Les migrations ont été réalisées à la température de la pièce pendant 45 min et sous voltage constant (200 V). Les masses moléculaires des protéines contenues dans les échantillons ont été estimées

## Chapitre II Matériel et Méthodes

par comparaison à un mélange de standards (Low Range SDS-PAGE Standards, Biorad®) appliqué sur le même gel et migrant dans les mêmes conditions.

Tableau II.6 Solutions mères pour la préparation du tampon d'échantillon utilisé pour les électrophorèses SDS-PAGE dans les conditions réduites.

Solution A (conservée à T° ambiante)		Solution B (conservée à -20 °C)	
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1 mL	DTT	154,2 mg
SDS 10 % (m/v)	4 mL	Eau	1 mL
Glycérol	2 mL		
Bleu de bromophénol 1 % (m/v)	2 mL		
Eau	1 mL		

### II.3.6.2 ISOÉLECTROFOCALISATION

Utilisée pour comparer et déterminer les points isoélectriques des protéines, cette technique a été réalisée sur mini-gel (8 x 12 mm) en utilisant un appareil Mini Protean II™ obtenu chez Biorad® (Robertson *et al* 1987). Elle consiste à faire migrer les protéines au sein d'un gel dans lequel un gradient de pH a été réalisé à l'aide d'ampholytes. Quand les protéines atteignent le pH correspondant à leur pI, elles ne migrent plus car leurs charges nettes s'annulent.

Tableau II.7 Composition de la solution servant à la préparation des mini-gels pour la réalisation d'isoélectrofoocalisation selon Robertson et al. (1987). Q.s.p. 1 gel de 1 mm d'épaisseur.

Composants	Quantité
Eau	3,77 mL
Acrylamide/bis-acrylamide (19:1) 30 %	1,077 mL
Glycérol 50 % (v/v)	1,292 mL
Biolyte™ 40 %	0,323 mL
APS <sup>1</sup> 10 % (m/v)	27 µL
TEMED <sup>2</sup>	11 µL

<sup>1</sup> Ammonium persulfate

<sup>2</sup> N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

Les gels d'IEF ont été préparés à partir d'une solution à 30 % d'acrylamide:bis acrylamide (19:1) et de solutions de Biolytes™ Biorad® (Tableau II.7). Pour obtenir une meilleure résolution des protéines ayant un pI compris entre 7 et 9, le gradient de pH a été ajusté en associant dans la proportion 40:60 une solution de Biolyte™ 3/10 couvrant les pH 3 à 10 et une solution de Biolyte™ 7/9 cou-

## Chapitre II Matériel et Méthodes

vrant les pH 7 à 9. L'épaisseur des gels a été de 1 mm et la concentration totale en acrylamide (%T) de 5 % dont 5 % d'agent de pontage. Avant application, les échantillons ont été mélangés à part égale dans du tampon d'échantillon contenant un mélange de Biolyte™ dans les mêmes proportions que le gel (Tableau II.8). Avant migration la chambre supérieure, coté cathode, a été remplie d'une solution de NaOH 25 mM, et la chambre inférieure, coté anode, d'une solution d'acide acétique 20 mM. Ces deux solutions ont été préalablement dégazées et maintenues au froid (4 °C). La migration a été réalisée en deux temps tout en maintenant l'appareil dans un bain de glace à 200 V pendant 90 min, puis à 400 V pendant 90 min. Au terme de la migration, les gels ont été immédiatement démoulés et colorés.

Tableau II.8 Composition du tampon d'échantillon utilisé pour la réalisation d'isoélectrofocalisation selon Robertson *et al.* (1987).

Composants	Quantité
Glycérol 80 % (v/v)	375 µL
Biolyte™ 40 %	50 µL
Bleu de bromophénol 1 % (m/v)	25 µL
Rouge de méthyle 0,1 % (m/v) <sup>1</sup>	25 µL
Eau	25 µL

<sup>1</sup> dans l'éthanol.

### II.3.6.3 ÉLECTROÉLUTION

Les essais ont été réalisés avec le système Mini-Protean II™ Biorad™ et les accessoires qui lui sont associés. Sur un même gel d'IEF de 1,5 mm d'épaisseur comprenant 5 puits, une solution contenant le mélange des deux isoformes d'amylase de *S. melanotheron* a été appliquée dans deux puits distincts, 10 µL (4,4 µg protéines) pour le premier et 130 µL (28,6 µg) pour le second. Après IEF le gel a été scindé en deux de manière à séparer l'espace correspondant à la zone de migration des deux puits. La partie correspondant au premier puit a été colorées selon la méthode au CBB R250, puis les deux morceaux ont été juxtaposés sur une plaque de verre et les portions du morceau non coloré correspondant aux bandes observées après coloration ont été découpées et électroéluées. Les produits de l'électroélution ont été appliqués sur deux autres gels d'IEF (épaisseur 1 mm). Les protéines présentes dans le premier ont été révélées par la méthode au AgNO<sub>3</sub>, quant au second, c'est l'activité amylasique qui est mise en évidence selon la méthode habituelle.

### II.3.6.4 ANALYSE ET COLORATION DES GELS

Tous les gels ont été colorés à température ambiante sur une table d'agitation par oscillations (30 va-et-vient par minute) dans un bain de réactif d'un volume au moins égal à 20 fois celui du gel.

#### *Détection des protéines*

Deux méthodes de détection des protéines sur les gels d'électrophorèses ont été utilisées : celle au bleu de Coomassie R250 (CBB R250) permettant la détection de quantité de protéines de l'ordre du  $\mu\text{g}$  sur des mini-gels Biorad<sup>®</sup>, et celle au nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) permettant la détection de quantité de protéines de l'ordre de 10 ng.

#### *Méthode au CBB R250*

La coloration au bleu de Coomassie R250 (CBB R250, Sigma<sup>®</sup>) est réalisée selon la méthode de Thurston et Henley (1996). Dans le cas du SDS-PAGE, la coloration a été réalisée par immersion directe du gel dans la solution de CBB R250 (Tableau II.9) pendant 30 min. Les gels d'IEF ont été préalablement fixés pendant une heure dans une solution d'acide trichloroacétique (0,7 M) et d'acide sulfosalicylique (0,16 M), puis rincés à l'eau pour éliminer les ampholytes qui interagissent avec le colorant. Ensuite les gels ont été décolorés avec un mélange d'eau (500 mL), d'acide acétique (10 mL) et d'éthanol (40 mL) jusqu'à disparition du colorant teintant le fond du gel.

Tableau II.9 Composition de la solution de coloration des gels d'électrophorèse au bleu de Coomassie R 250 (CBB R250) pour la détection des protéines. Le CBB R250 est dissout d'abord dans l'éthanol, puis l'acide acétique et l'eau sont ajoutées.

Composants	Quantité
CBB R250	250 mg
Éthanol	50 mL
Acide acétique glacial	10 mL
Eau	40 mL

#### *Méthode au nitrate d'argent*

La coloration des gels d'électrophorèses au nitrate d'argent a été réalisée selon la méthode de Dunn (1989) en remplaçant le méthanol par de l'éthanol et en diminuant les temps de rinçage. Les gels ont été fixés dans une solution d'acide trichloroacétique à 12 % (m/v) pendant au moins 2 h. Ils ont été

## Chapitre II Matériel et Méthodes

lavés deux fois pendant 20 min avec de l'éthanol à 50 % (v/v) puis deux fois 15 min avec de l'eau. La coloration a été réalisée par immersion du gel pendant 15 min dans une solution d'argent ammoniacal (Figure II-3). Après deux rinçages à l'eau de 5 min chacun, la coloration est obtenue par immersion du gel dans une solution fraîche de formol (26  $\mu$ L) et d'acide citrique 1 % (250  $\mu$ L) dans 50 mL d'eau. La réaction colorante est arrêtée par ajout d'un mélange d'acide acétique (100 mL), d'éthanol (450 mL) et d'eau (450 mL), après rinçage rapide à l'eau.

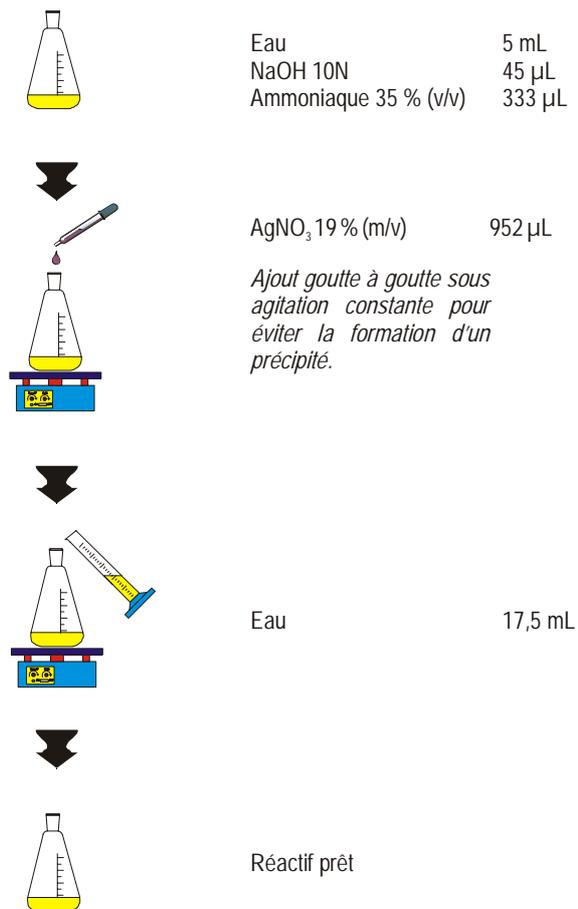


Figure II-3 Schéma de préparation du réactif à l'argent ammoniacal utilisé pour la détection des protéines sur les gels d'électrophorèse.

### Détection de l'activité amylasique

L'activité amylasique est détectée en incubant les gels d'électrophorèse à température ambiante dans une solution d'amidon, suivie d'une coloration avec un réactif iodo-ioduré (Lacks & Springhorne 1980). Après une électrophorèse SDS-PAGE, le gel est lavé deux fois pendant 10 min dans du tampon phosphate (0,5 M, pH 6,9) pour éliminer le SDS. Il est ensuite incubé dans une solution d'amidon soluble à 5  $\text{g.L}^{-1}$  préparée dans du tampon phosphate (20 mM, pH 6,9 + NaCl 6 mM).

## Chapitre II Matériel et Méthodes

L'ensemble est maintenu pendant 10 min sous agitation à température ambiante et après un lavage rapide à l'eau, le gel est coloré par ajout de réactif iodo-ioduré. La présence d'activité amylasique est alors identifiée par des zones claires marquant l'absence d'amidon. Les gels ont été photographiés ou traités à l'acide trichloroacétique 12 % (m/v) pour fixer pendant plusieurs jours cette coloration instable.

### *Test de glycosylation*

Le test de glycosylation sur gel de polyacrylamide a été effectué par la méthode de Møller et Poulsen (1996) qui utilise une coloration conjointe au nitrate d'argent et au bleu alcyan. Le test a été réalisé sur un gel d'IEF, avec de la fétuine (80 ng) comme témoin de réaction positive. L'évolution de la coloration a été suivie pas à pas en photographiant le gel après 2, 5 et 10 min de développement. Dans ces conditions, les bandes correspondants aux protéines glycosylées apparaissent précocement et conservent une teinte sombre caractéristique.

### II.3.7 Détermination de la masse moléculaire

Elle a été déterminée par spectrométrie de masse à l'aide d'un spectromètre de type Voyager DE-RP, en utilisant la méthode LDE 1002. Ces analyses ont été réalisées au laboratoire BIP, CNRS Marseille, par M. Jacques Bonicel.

### II.3.8 Détermination du point isoélectrique

Le point isoélectrique (pI) des amylases a été déterminé par IEF, en comparaison avec un mélange de marqueurs fournis par Sigma<sup>®</sup> (Tableau II.10), placés dans les mêmes conditions.

Tableau II.10 Composition du mélange de protéines utilisé comme standard d'IEF. Le mélange est conservé à -20 °C.

Protéines	Réf. Sigma®	pI	VOLUME (µL)	Masse (µg env.)
Trypsinogène	T1146	9,3	10	40
Lectines de lentille	L1277	8,8	30	40
		8,6		40
		8,2		40
Myoglobines	M9267	7,2	20	40
		6,8		40
Eau			15	
Glycérol 80 % (v/v)			125	

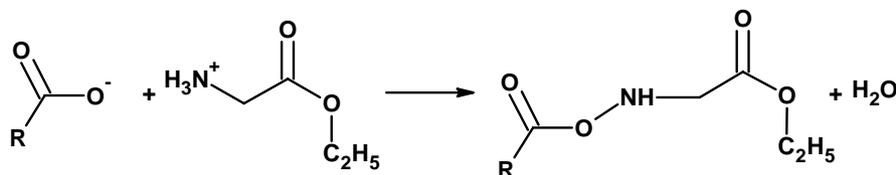
### II.3.9 Composition en acides aminés et séquence

La composition globale en acides aminés des protéines a été déterminée selon la méthode dite des « Pico-Tag » (Bidlingmeyer *et al* 1984) à partir d'un échantillon de la protéine pure obtenu par électrophorèse en SDS-PAGE et transfert sur une membrane de PVDF (Biorad™). Ces analyses ont été réalisées au LBBN, Faculté de St Jérôme Marseille, par M. Claude Villard.

Les séquences N-terminales ont été déterminées à l'aide d'un séquenceur automatique à partir du transfert réalisé sur membrane de PVDF d'un gel d'IEF selon la procédure de la dégradation d'Edman (Hewik *et al* 1981). Ces analyses ont été réalisées à la fois au laboratoire BIP, CNRS Marseille, par M. Jacques Bonicel et au IPMC, CNRS Nice, par Mme Danielle Moinier.

### II.3.10 Amidation des carboxylates

Les groupes carboxyliques libres sont amidés avec de l'ester éthylique de glycine (EEG) en présence de 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide ou EDC (Tawfik 1996). Cette technique permet d'annuler la charge des groupes carboxyliques de la protéine selon la réaction suivante.



Pour réaliser l'amidation, 20 à 50 µg de protéines ont été diluées dans du tampon MES 0,1M, pH 5,5 pour un volume total de 1,7 mL et 100 µL d'EEG 1M sont ensuite ajoutés. La réaction a été déclenchée par ajout de 200 µL d'EDC 0,1M, provenant d'aliquotes maintenues à -20 °C (corres-

## Chapitre II Matériel et Méthodes

pendant à un milieu final, pH 5,5, EEG 50mM, EDC 10mM). Après une heure à température ambiante, la réaction a été arrêtée par ajout de 2 mL de tampon acétate 0,1M à pH 5,0. Les produits de la réaction ont été dialysés contre de l'eau puis concentrés par évaporation centrifuge jusqu'à obtention d'un volume final de l'ordre de 1 ml. La concentration en protéines a été alors mesurée pour chaque tube par la technique de Bradford. Les tubes ont ensuite été fermés hermétiquement et conservés à 4 °C. Les échantillons ainsi traités ont été comparés à des amylases non traitées servant de contrôle et à un témoin constitué d'amylase ayant subi le même traitement mais pour lequel la réaction n'a pas été déclenchée par ajout d'EDC. Les produits de l'amidation ont été analysés en SDS-PAGE et en IEF. Pour chacune de ces analyses les puits ont été chargés d'une quantité de protéines équivalente, quel que soit le traitement subi par l'échantillon.

## Chapitre III RÉSULTATS

Les expériences ont eu pour but : de suivre sur différentes espèces de poissons tropicaux l'influence de la nature et de la qualité de l'aliment sur la croissance, ainsi que l'évolution de la composition corporelle et le métabolisme, lors d'études zootechniques, et d'étudier les propriétés des amylases de deux espèces de tilapias, sur le plan biochimique.

### *III.1 Études zootechniques*

#### III.1.1 Estimation des besoins alimentaires en énergie

Les besoins en énergie des espèces tropicales sont généralement méconnus, la plupart des travaux portant préférentiellement sur la détermination des besoins en protéines. Les approches expérimentales sont le plus souvent très disparates et rendent difficiles à la fois les comparaisons interspécifiques ou intraspécifiques. Nous chercherons donc à proposer une méthode universelle de détermination des besoins en énergie pour des espèces de poissons à vocation aquacole sans aucun a priori sur la connaissance de leurs besoins nutritionnels.

##### **III.1.1.1 PRINCIPE EXPÉRIMENTAL**

L'un des points les plus importants dans la couverture des besoins alimentaires en énergie est la fourniture d'un aliment dont le rapport contenu énergétique/protéines permet d'obtenir une croissance maximale avec un rendement optimal de l'aliment. Pour définir les conditions d'une alimentation optimale, il est nécessaire de tenir compte de la teneur en protéines de l'aliment, de son contenu énergétique et de la ration alimentaire. Le plan expérimental correspondant peut être réduit à deux facteurs en tenant compte des apports journaliers en protéines et énergie.

L'utilisation d'une source alimentaire capable de couvrir, sans limite et sans biais, à la fois les apports en protéines et ceux en énergie permettrait de réduire le plan expérimental à un seul facteur. Potentiellement, les protéines peuvent être utilisées comme source d'énergie pour le métabolisme et comme éléments pour la croissance. Chez les Poissons, l'utilisation des protéines comme source d'énergie se fait naturellement sans limite et sans augmentation importante de la dépense énergétique

### Chapitre III Résultats

liée à une nécessaire détoxification des produits de désamination par la synthèse d'acide urique ou d'urée avant excrétion. Un plan d'expérience à un seul facteur dans lequel la seule variable est l'apport en protéines peut donc permettre de contrôler à la fois les apports protéiques pour couvrir les besoins en acides aminés et les apports aptes à couvrir les besoins en énergie du poisson. La part des protéines ingérées contribuant à l'accroissement de poids (protéines fixées) et celles des protéines contribuant à la couverture des besoins énergétiques (protéines non-fixées) peuvent alors être déterminées à partir de l'analyse des carcasses en début et en fin d'expérience. Les besoins en énergie seront estimés par comparaison entre les éléments ingérés et les éléments fixés.

L'estimation des besoins alimentaires en énergie a été réalisée avec un protocole expérimental n'utilisant qu'un seul aliment où l'essentiel de l'énergie est apporté par des protéines. Cet aliment a été distribué en quantité croissante à plusieurs lots de poissons, de façon à couvrir une gamme de conditions d'alimentation permettant d'observer une croissance nulle et une croissance maximale. La croissance et l'évolution de la composition corporelle des poissons ont été suivies. L'estimation des besoins totaux en source d'énergie alimentaire d'origine protéique et non-protéique a été obtenue en plusieurs étapes. Les conditions pour lesquelles la croissance a été optimale, avec un rendement maximal, ont été identifiées. Les quantités de protéines brutes fixées dans ces conditions ont été mesurées et leur équivalent en protéines ingérées a été calculé en tenant compte de la digestibilité des protéines brutes contenues dans l'aliment. Le total des besoins alimentaires en énergie nécessaire au catabolisme a été calculé par différence entre l'énergie ingérée et l'énergie fixée sur la base des équivalents énergétiques. Quant aux conditions pour lesquelles la croissance a été nulle, elles ont été utilisées pour estimer les besoins métaboliques en énergie protéique liés à l'entretien de l'organisme. Les quantités de protéines brutes ingérées correspondantes ont été calculées et rapportées à la masse du poisson. L'estimation des besoins alimentaires en sources d'énergie non-protéique nécessaire au catabolisme a été calculée par différence entre le total des besoins pour le catabolisme et l'équivalent énergétique de la quantité de protéines brutes ingérées à croissance nulle.

## Chapitre III Résultats

### III.1.1.2 POISSONS ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Pour cette étude, toutes les espèces de poissons étudiées (cf. II.1.1) ont fait l'objet d'une expérimentation à l'exception de l'atipa, *H. littorale*. Les tests ont été réalisés dans les structures du GAG-MET (Montpellier).

Pour l'estimation des besoins alimentaires en énergie, une expérience a été réalisée sur chacune des espèces en utilisant un seul aliment, distribué en quantité croissante à plusieurs lots d'animaux. Les poissons de chaque espèce étudiée ont été sélectionnés pour constituer un nombre suffisant de lots et leur composition corporelle déterminée. L'aliment a été préparé pour être le plus riche possible en protéines. Six taux ont été calculés pour fournir des rations quotidiennes correspondant à environ 0, 5, 15, 25, 35 et 45 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Par commodité, ces taux ont été appelés TR0, TR5, TR15, TR25, TR35 et TR45 pour toutes les espèces de poissons étudiées. Les conditions d'élevages ont été choisies pour réaliser les expériences dans un environnement contrôlé. Une pesée de contrôle a été réalisée tous les 7 jours pour ajuster les rations. En fin d'expérience, la composition corporelle des poissons a été déterminée et des indices ont été calculés pour décrire la réponse des différents lots en fonction des quantités d'aliment reçu, et pour permettre le calcul de l'estimation des besoins en énergie.

Tableau III.1 Noms abrégés et conditions expérimentales initiales de l'estimation des besoins en protéines et en énergie pour chaque espèce de poissons étudiée.

<b>Espèces de poissons</b>	<b>Abrév.</b>	<b>Masse moyenne (g ±SE)</b>	<b>Nb. par lot</b>	<b>Nb. de lots</b>	<b>Durée (jours)</b>
<i>Colossoma macropomum</i>	CMA	2,05 ±0,02	10	3	28
<i>Oreochromis niloticus</i>	ONI	8,64 ±0,07	10	2	21
<i>Sarotherodon melanotheron</i>	SME	7,20 ±0,07	10	2	42
<i>Heterobranchus longifilis</i>	HLO	5,97 ±0,03	12	3	35
<i>Silurus glanis</i>	SGL	8,29 ±0,04	10	3	35

Les expériences ont été réalisées sur des juvéniles de chaque espèce pour avoir des conditions de croissance optimale. En début d'expérience, les poissons ont été sélectionnés pour obtenir des lots homogènes d'au moins 10 individus d'une masse moyenne de l'ordre de 5 g, avec une erreur standard de 0,1 g (Tableau III.1). La masse moyenne initiale réelle des poissons a été imposée par les contrain-

### Chapitre III Résultats

tes locales d'approvisionnement en juvéniles de chaque espèce. Cependant elle est restée comparable d'une espèce à l'autre. La durée de l'expérience a été différente (21 à 42 jours) selon les espèces de poissons étudiées. Cependant elle a été suffisante pour avoir en final des poissons d'une masse moyenne de l'ordre de 15 g dans les conditions de croissance les plus favorables. Ceci a été choisi dans le but d'obtenir pour chaque espèce des données comparables entre elles et couvrant pour chacune d'elles un même intervalle de croissance.

La formule de l'aliment, établie pour obtenir une teneur maximale en protéines, contient principalement de la farine de poisson d'origine islandaise, Islande 70™ (SANOFI®). À cet élément de base, les acides gras essentiels, les vitamines et les minéraux ont été apportés sous forme d'huile de soja et de prémélanges (Tableau III.2).

Tableau III.2 Formule de préparation de l'aliment utilisé pour l'estimation des besoins énergétiques et protéiques

<b>Ingrédients</b>	<b>g pour 100 g de matière sèche</b>
Farine de poisson	91
Huile de soja	3
Mélange vitaminique <sup>1</sup>	1
Mélange minéral <sup>1</sup>	4
Sodium alginate	1

<sup>1</sup> cf. Tableau I.1

L'ensemble des expériences n'ayant pu être mené simultanément, l'aliment a été préparé à partir de plusieurs mélanges de matières premières suivant la même formule. Ces multiples fabrications pouvant entraîner des variations, la composition de l'aliment utilisé pour chacune des espèces a été déterminée (Tableau III.3). Les teneurs en protéines brutes, en lipides totaux et en cendres brutes ont été mesurées, et les valeurs d'énergie brute et d'énergie digestible calculées, selon les méthodes préalablement définies (cf. II.2.1.2). La composition de l'aliment différant sensiblement d'une espèce à l'autre (Tableau III.3), les apports journaliers en aliment, protéines brutes, énergie brute ou digestible correspondant à chaque ration distribuée ont été calculés pour chacune des expérimentations réalisées

### Chapitre III Résultats

(Tableau III.4). Les aliments ont été conservés à -20 °C et utilisés en suivant la méthode préalablement définie pour l'ensemble des aliments.

Tableau III.3 Compositions de chaque aliment utilisé pour chacune des espèces de poissons. Valeurs pour 100 g de matière sèche d'aliment. PB, protéines brutes ; LT, lipides totaux, CB, cendres brutes ; EB, énergie brutes ; ED, énergie digestibles.

<b>Espèces de poissons</b>	<b>PB (g)</b>	<b>LT (g)</b>	<b>CB (g)</b>	<b>EB<sup>1</sup> (kJ)</b>	<b>ED<sup>2</sup> (kJ)</b>
<i>C. macropomum</i>	69,9	10,5	13,0	2 064	1 954
<i>O. niloticus</i>	67,7	12,1	16,8	2 076	1 854
<i>S. melanotheron</i>	68,2	12,8	16,5	2 115	1 975
<i>H. longifilis</i>	67,7	12,1	16,8	2 076	1 882
<i>S. glanis</i>	68,2	12,8	16,5	2 115	1 880
Moyenne	67,1	11,7	16,2	2 044	1 854
Min. – Max.	62,2 - 69,9	10,4 - 12,8	13,0 - 17,2	1 879 – 2 115	1 671 – 1 975

<sup>1</sup> obtenue par calcul (cf. texte). <sup>2</sup> obtenue par calcul en tenant compte des CUDa observés.

Les résultats des expérimentations menées pour estimer les besoins alimentaires en énergie sont présentés. Ces expérimentations ayant fait l'objet du développement d'un nouveau protocole, les résultats de l'expérience réalisée sur le tambaqui, *C. macropomum*, seront utilisés pour présenter et tester la méthode. Le protocole a ensuite été appliqué à l'ensemble des autres espèces étudiées pour valider la méthode sur un ensemble de poissons élevés en eaux chaudes et appartenant à des groupes taxonomiques différents.

### Chapitre III Résultats

Tableau III.4 Apports journaliers en aliment, protéines brutes, énergie brute et digestible pour chaque espèce de poissons étudiée en fonction de la ration, TRx. Ms, matière sèche ; PB, EB & ED, cf. tableau III.3.

Espèces de poissons	Unité	Apports journaliers / TR					
		TR0	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<b><i>C. macropomum</i></b>							
MS	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	7,9	23,8	39,7	55,6	71,4
PB	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	5,5	16,6	27,8	38,9	49,9
EB <sup>1</sup>	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	163	491	820	1 148	1 474
ED <sup>2</sup>	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	154	465	776	1 086	1 395
<b><i>O. niloticus</i></b>							
MS	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	7,9	23,8	39,7	55,6	71,4
PB	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	5,3	16,1	26,9	37,6	48,3
EB	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	164	494	824	1 154	1 482
ED	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	146	441	736	1 031	1 324
<b><i>S. melanotheron</i></b>							
MS	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	7,3	21,8	36,4	51	65,5
PB	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	5,4	16,2	27,1	37,9	48,7
EB	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	167	503	840	1 176	1 510
ED	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	156	470	784	1 098	1 410
<b><i>H. longifilis</i></b>							
MS	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	7,2	21,7	36,2	50,6	65,1
PB	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	5,3	16,1	26,9	37,6	48,3
EB	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	164	494	824	1 154	1 482
ED	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	149	448	747	1 047	1 344
<b><i>S. glanis</i></b>							
MS	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	7,3	21,8	36,4	50,9	65,5
PB	g.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	5,4	16,2	27,1	37,9	48,7
EB	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	167	503	840	1 176	1 510
ED	kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	0	149	448	747	1 046	1 343

<sup>1</sup> obtenue par calcul (cf. texte). <sup>2</sup> obtenue par calcul en tenant compte des CUDa observés.

#### III.1.1.3 L'EXEMPLE DU TAMBAQUI, *C. MACROPOMUM*

Cette espèce a été choisie pour sa croissance élevée et son régime granivore habituellement faible en protéines (Roubach & Saint-Paul 1994). L'expérience a été réalisée sur des groupes de trois lots de 10 poissons de masse moyenne 2,05 g (Tableau III.1), chacun recevant une ration, TR0, TR5,

### Chapitre III Résultats

TR15, TR25, TR35 à TR45, d'un même aliment qui correspond à des apports journaliers de 0, 5,6, 16,6, 27,7 38,8 et 49,9 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. L'expérience s'est déroulée sur 28 jours. Les résultats de croissance et de modification du contenu corporel seront d'abord présentés pour vérifier que le protocole proposé permet bien d'agir sur la croissance du poisson et d'obtenir des conditions maximales de modification du contenu corporel. Ensuite, les indices permettant d'évaluer la qualité d'utilisation de l'aliment seront calculés pour définir les conditions dans lesquelles le rendement est maximal et la croissance optimale.

#### *Croissance et modification du contenu corporel*

La croissance des jeunes tambaquis a été suivie en mesurant chaque semaine les masses corporelles des individus de chacun des lots de 10 poissons. La figure III-1 montre l'évolution de la croissance des juvéniles au cours des 28 jours d'expérimentation en fonction de la ration reçue. La variation de masse corporelle a été plus importante pour les animaux recevant les rations les plus élevées, alors que pour les rations les plus faibles, les modifications de masse ont été moins importantes. Une

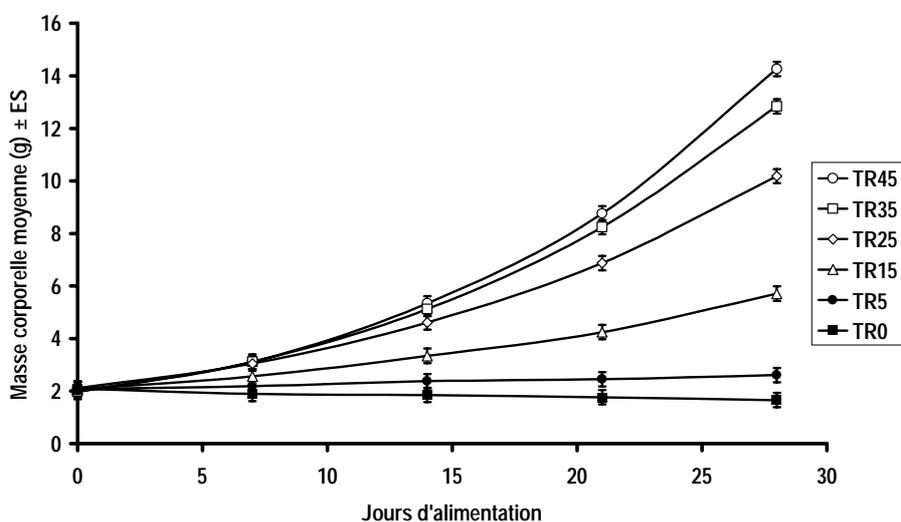


Figure III-1 Croissance des juvéniles de tambaqui, *C. macropomum*, en fonction de la ration distribuée sur une période de 28 jours.

perte de masse n'a été observée qu'avec les individus maintenus à jeun, ration TR0 (Tableau III.5). Avec le traitement TR5, correspondant à un apport journalier aussi faible que 5,6 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, la croissance a été plus limitée mais significative, alors que les taux de croissance spécifiques les plus

### Chapitre III Résultats

élevés ont été obtenus avec les apports en protéines les plus importants 38,8 (TR35) ou 49,9 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (TR45).

Tableau III.5 Masse corporelle moyenne initiale et finale, taux de croissance spécifique (TCS) et modification du contenu corporel observés chez des juvéniles de tambaqui, *C. macropomum*, en fonction de la ration distribuée pendant les 28 jours d'expérimentation. Les différences significatives entre les valeurs d'une même colonne sont indiquées par des lettres différentes (Test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ). Les astérisques signalent les valeurs non significativement différentes de zéro. Abréviations cf. tableau III.3.

TR	Masse corporelle (g)		TCS	Accrétion corporelle (g)			
	Initiale	Finale	(%)	MF	MS	PB	LT
TR0	2,09 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>	-0,8 % <sup>a</sup>	-0,43 <sup>a*</sup>	-0,03 <sup>a*</sup>	-0,09 <sup>a*</sup>	-0,02 <sup>a*</sup>
TR5	2,08 <sup>a</sup>	2,61 <sup>a</sup>	0,8 % <sup>b</sup>	0,53 <sup>b*</sup>	0,10 <sup>b*</sup>	0,08 <sup>b*</sup>	-0,02 <sup>a*</sup>
TR15	2,07 <sup>a</sup>	5,71 <sup>b</sup>	3,6 % <sup>c</sup>	3,64 <sup>c</sup>	0,71 <sup>c</sup>	0,46 <sup>c</sup>	0,02 <sup>b*</sup>
TR25	2,11 <sup>a</sup>	10,18 <sup>c</sup>	5,6 % <sup>d</sup>	8,08 <sup>d</sup>	1,69 <sup>d</sup>	1,28 <sup>d</sup>	0,14 <sup>c</sup>
TR35	1,99 <sup>a</sup>	12,84 <sup>d</sup>	6,7 % <sup>e</sup>	10,85 <sup>e</sup>	2,62 <sup>e</sup>	1,71 <sup>e</sup>	0,21 <sup>d</sup>
TR45	1,97 <sup>a</sup>	14,26 <sup>e</sup>	7,1 % <sup>e</sup>	12,29 <sup>e</sup>	2,75 <sup>e</sup>	1,85 <sup>e</sup>	0,34 <sup>e</sup>

Les accrétions corporelles en matière sèche, protéines brutes et lipides ont été plus importantes avec les rations les plus élevées (Figure III-2). Les gains en matière sèche et protéines brutes ont été fortement accrus quand le taux de rationnement a varié de TR5 à TR35. Au delà, le traitement TR45 n'a pas entraîné de modifications importantes des accrétions en matière sèche et en protéines brutes par rapport au traitement TR35. Pour les lipides totaux, les accrétions corporelles ont augmenté linéairement avec la ration.

Pour les traitements TR0 et TR5, les gains en masse sèche, protéines brutes et lipides totaux ont été très faibles et n'ont pas été significativement différents de zéro (Tableau III.5). Les gains les plus importants ont été obtenus avec les poissons ayant reçu les traitements TR35 et TR45. Aucune différence significative n'est observable entre ces deux derniers traitements pour les gains en masse sèche et en protéines brutes. Seuls les gains en lipides totaux ont été accrus par le changement de ration entre TR35 et TR45. La croissance et l'évolution du contenu corporel ont été étroitement dépendantes du taux de rationnement appliqué à chaque lot au cours de l'expérimentation. Les modifications de masse corporelle les plus importantes ont été atteintes avec le traitement TR35, correspondant à un apport journalier de 38,9 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, alors qu'une ration alimentaire plus importante n'a pas entraîné

### Chapitre III Résultats

de modification significative. Pour décrire le mode d'utilisation de l'aliment par les poissons et la contribution des protéines à la fourniture des besoins énergétiques, les résultats obtenus ont été examinés en prenant en compte l'utilisation digestive mesurée des aliments, ainsi que les quantités d'aliments, de protéines brutes et d'énergie reçues correspondant à chaque taux de rationnement.

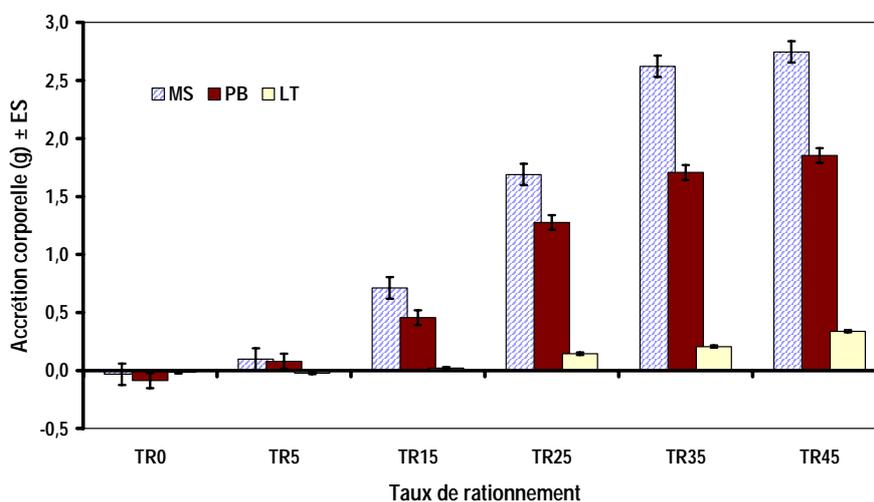


Figure III-2 Modification du contenu corporel en matière sèche (MS), protéines brutes (PB) et lipides totaux (LT) des juvéniles de tambaqui, *C. macropomum*, en fonction de la ration distribuée sur une période de 28 jours.

#### **Utilisation de l'aliment**

Les coefficients d'utilisation digestive apparents de la matière sèche et des protéines brutes ont respectivement de 90,0 % et 94,6 %. Les quantités retrouvées dans les fèces ont été trop faibles pour être mesurables, un CUDa de 95 % a été retenu par défaut pour les lipides totaux. Les indices usuels servant à décrire la qualité et l'utilisation de l'aliment, IC et CEP, ont été calculés à partir des accrétions corporelles observées (Tableau III.5) et des quantités d'aliments reçues (Tableau III.4). De même, les différents coefficients d'utilisation pratique correspondants ont, eux aussi, été calculés pour déterminer le devenir de chacun des éléments ingérés par les poissons au cours des 28 jours d'expérimentation. Les IC et les CEP observés chez les juvéniles de tambaqui en fonction des taux de rationnement sont indiqués dans le tableau III.6. Pour les deux derniers traitements TR35 et TR45, la valeur de l'IC n'a pas été optimale (respectivement 0,52 et 0,61) mais est restée meilleure que celle obtenue avec le traitement TR5 (0,75). Les IC les plus faibles, donc les meilleurs, ont été observés pour les traitements TR15 et TR25. Les meilleurs CEP ont été obtenus avec les mêmes traitements.

### Chapitre III Résultats

Même si le CEP a été légèrement supérieur avec TR15, le traitement TR25 a donné globalement de meilleurs résultats pour les deux indices IC et CEP, la croissance étant plus élevée avec ce taux de rationnement (Tableau III.5).

Tableau III.6 Indices déterminés chez des juvéniles de tambaqui, *C. macropomum*, en fonction de la ration distribuée pendant les 28 jours d'expérimentation. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Indices	Valeurs / TR				
	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
IC	0,74 <sup>c</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,52 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>b</sup>
CEP	1,94 <sup>a</sup>	3,26 <sup>d</sup>	3,18 <sup>cd</sup>	2,75 <sup>bc</sup>	2,34 <sup>ab</sup>
CUP <sub>S</sub>	24,4 % <sup>a</sup>	44,4 % <sup>b</sup>	46,6 % <sup>b</sup>	46,3 % <sup>bc</sup>	36,6 % <sup>ab</sup>
CUP <sub>P</sub>	28,8 % <sup>a</sup>	40,6 % <sup>ab</sup>	50,1 % <sup>b</sup>	43,2 % <sup>ab</sup>	35,3 % <sup>ab</sup>
CUP <sub>L</sub>	-56,9 % <sup>a</sup>	12,0 % <sup>b</sup>	38,3 % <sup>cd</sup>	34,8 % <sup>bc</sup>	42,8 % <sup>c</sup>

L'utilisation de chaque constituant de l'aliment, indiquée par son coefficient d'utilisation pratique, a été dépendante du taux de rationnement (Figure III-3). Pour les poissons à jeun, aucun coefficient d'utilisation pratique ne peut être calculé. Les coefficients d'utilisation pratique ont tous été positifs, à l'exception de celui concernant les lipides totaux pour le taux de rationnement TR5. Le CUP<sub>P</sub> a été maximal avec le taux de rationnement TR25 (Tableau III.6). Le CUP<sub>L</sub> a augmenté avec le taux de rationnement jusqu'à des apports journaliers de 27,7 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Au-delà, l'augmentation du taux de rationnement n'a pas entraîné de modification du CUP<sub>L</sub>, alors que le CUP<sub>P</sub> a diminué. Le CUP<sub>S</sub> a suivi la même tendance que le CUP<sub>P</sub>, mais l'infléchissement observé avec les taux de rationnement les plus élevés a été moins prononcé. La valeur du CUP<sub>S</sub> intégrant la valeur du CUP<sub>P</sub> et du CUP<sub>L</sub>, les diminutions observées pour les taux de rationnement élevés ont été compensés par le maintien du CUP<sub>L</sub>. Avec le taux de rationnement le plus faible, correspondant à 5,6 g PB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, le CUP<sub>L</sub> observé a été négatif ce qui indique que les poissons ont utilisé plus de lipides pour leur catabolisme qu'ils n'en ont consommé.

Si le rendement des protéines ingérées a été optimal pour le taux de rationnement TR25, la croissance et l'accrétion protéique observées avec le taux de rationnement TR35 ont été les meilleures. Aucune différence significative n'a été observée pour le CUP<sub>P</sub> entre les traitements TR25 et TR35, ce

## Chapitre III Résultats

dernier taux de rationnement semble donc remplir les conditions d'un rendement maximal des protéines ingérées avec une croissance optimale des juvéniles de tambaqui.

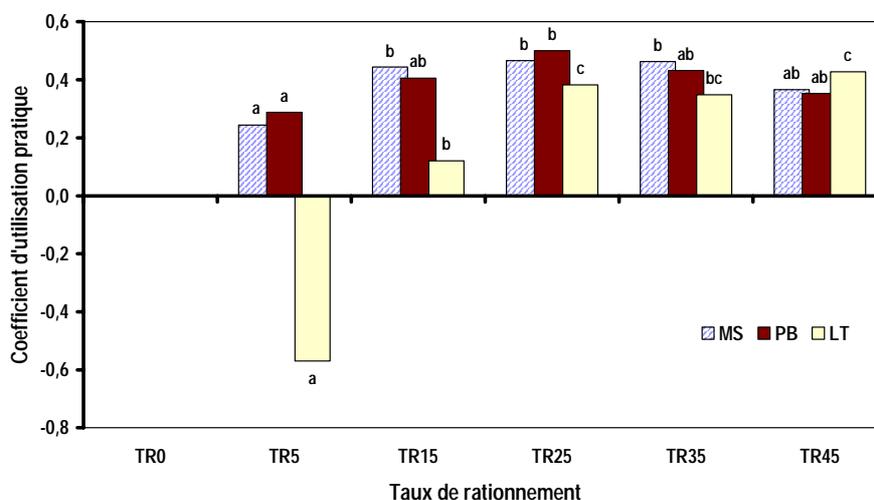


Figure III-3 Coefficients d'utilisation pratique de la matière sèche (MS), des protéines brutes (PB) et des lipides totaux (LT) obtenus pour les juvéniles de tambaqui, *C. macropomum*, en fonction des taux de rationnement sur une période de 28 jours.

### Bilan énergétique

Le protocole utilisé pour estimer les besoins alimentaires en énergie a permis de définir les conditions d'alimentation de juvéniles de tambaqui permettant une croissance optimale avec une accretion protéique maximale. Les conditions d'alimentation optimale ont été obtenues avec le traitement TR35, correspondant à un apport journalier de  $38,9 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $1\,148 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  dont  $917 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  provenant des protéines brutes. Avec ce taux de rationnement, 43,2 % des protéines ingérées ont été fixées ( $\text{CUP}_p$ ), soit  $16,8 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ou  $396 \text{ kJ ED.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ; alors que les apports énergétiques fournis par le taux de rationnement TR35 ont couvert l'ensemble des besoins associés à la croissance observée. Avec un  $\text{CUDA}$  de 94,6 % observé pour les protéines, l'équivalent en ingéré de la quantité de protéines fixées est estimé à  $17,8 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  (16,8/94,6 %), soit  $420 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . La quantité ingérée de protéines, qui n'a pas été fixée, a été de  $21,1 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , correspondant à  $391 \text{ kJ EM.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Parallèlement, sur les  $5,83 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  des lipides brutes ingérés,  $2,03 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ont été fixés et  $3,80 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ont été brûlés, soit respectivement l'équivalent de  $80 \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  d'énergie brute

### Chapitre III Résultats

ingérée et de  $139 \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  d'énergie métabolisable consommée. Le modèle de bilan énergétique correspondant à ce taux de rationnement est illustré dans la figure III-4.

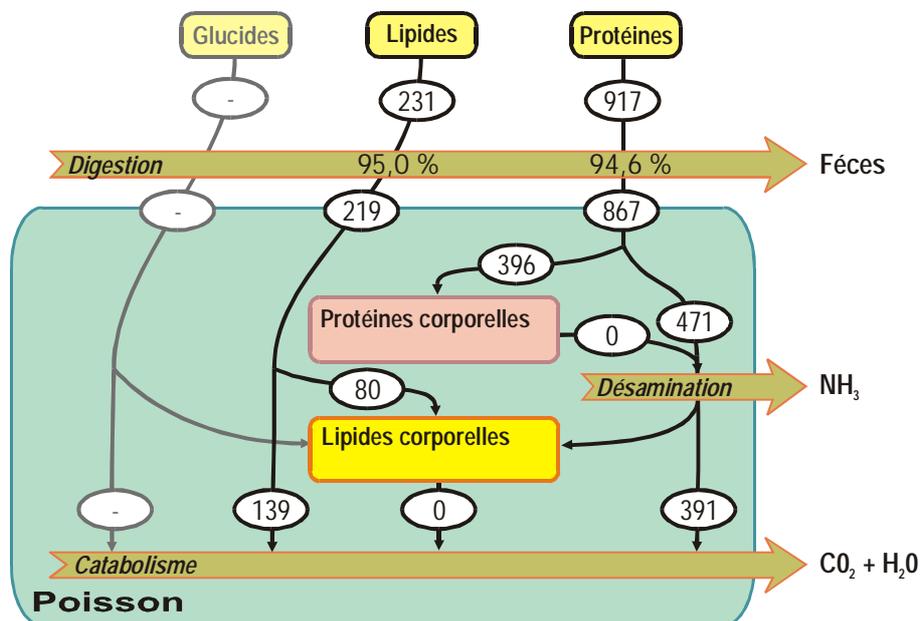


Figure III-4 Modèle de représentation de l'utilisation de l'énergie alimentaire chez de jeunes *C. macropomum* ayant reçu le taux de rationnement TR35 correspondant à  $38,9 \text{ g CP.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Les valeurs sont indiquées en  $\text{kJ.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ .

Les apports alimentaires en énergie sous forme de protéines brutes nécessaires au besoin du catabolisme et à la couverture des pertes incompressibles en azote (mucus, etc..) peuvent être estimés par la fourniture d'un aliment dépourvu de protéines, mais peuvent aussi être estimés par la mesure de la quantité de protéines utilisées par le métabolisme nécessaire au maintien de l'état corporel du poisson, c'est à dire pour une accréation protéique nulle. Dans cette expérimentation, la croissance nulle n'a pas été observée, mais elle aurait été obtenue pour un taux de rationnement inférieur à TR5. Les conditions d'une croissance nulle pourraient être estimées par interpolation linéaire entre le traitement TR0 et TR5, cependant aucune connaissance actuelle ne permet de supposer que la réponse du poisson à des taux de rationnement faibles soit linéaire. De plus, les modèles utilisés pour la description de la réponse du poisson à la quantité d'aliment ingéré ne suivent pas une fonction linéaire quand la réponse est proche de la croissance nulle (Robbins *et al* 1979 ; Mercer 1982). En fait, les quantités de protéines utilisées pour une croissance nulle sont une estimation par défaut de la quantité correspondant aux pertes inhérentes liées à l'utilisation métabolique des acides aminés à croissance optimale. Il est donc possible d'utiliser comme estimation, seulement, les quantités de protéines ingérées et non fixées dans

## Chapitre III Résultats

le cas d'une croissance légèrement supérieure à zéro même si cette quantité constitue un valeur par excès des besoins à l'entretien. Pour le taux de rationnement TR5, l'apport journalier a été de  $5,5 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et le  $\text{CUP}_p$  de 28,8 % (Tableau III.4, Tableau III.6). La quantité de protéines ingérées correspondant aux protéines non fixées a donc été de  $3,8 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ( $5,5 \times (1-28,8 \%/94,6 \%)$ ) soit  $90 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ou  $71 \text{ kJ EM.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Les apports journaliers en source d'énergie protéique permettant d'obtenir les conditions de croissance observées avec le taux de rationnement TR35 peuvent être estimés à  $510 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ( $420 + 90$ ) ou  $482 \text{ kJ ED.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Les apports associés en source d'énergie non protéique doivent être équivalents à ceux reçus par les jeunes tambaquis pour le même taux de rationnement, soit  $539 \text{ g ED.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  ( $139 + 80 + 391-71$ ) ou  $567 \text{ kJ EB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  quand les matières premières ont un CUDa de l'énergie analogue à celui observé dans cette expérimentation. Pour les jeunes tambaquis, les besoins totaux en énergie alimentaire sont donc estimés à  $1\,021 \text{ kJ ED.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , dont 47,2 % doivent être fournis sous forme de protéines de qualité analogue à celle contenue dans la farine de poisson utilisée dans cette expérimentation. Le même protocole a été validé par son application aux autres espèces de poissons étudiées.

### III.1.1.4 APPLICATION AUX AUTRES ESPÈCES

Pour l'estimation de leurs besoins alimentaires en énergie, une expérience a été réalisée pour chacune des cinq espèces de poissons étudiées selon le protocole préalablement décrit. Toutes espèces confondues, les mortalités observées à l'issue des expérimentations ont été très limitées (Tableau III.7). Les mortalités les plus importantes ont été rencontrées pour les lots d'animaux à jeun, traitement TR0 du silure africain et du silure glane.

### Chapitre III Résultats

Tableau III.7 Mortalités moyennes observées à l'issue de l'expérimentation sur des juvéniles de chaque espèce de poisson étudiée ayant reçu les 6 différents taux de rationnement.

Espèces	Mortalité (%) / TR					
	TR0	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<i>C. macropomum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>O. niloticus</i>	0	0	0	0	5	5
<i>S. melanotheron</i>	0	0	0	0	0	0
<i>H. longifilis</i>	8,3	0	2,8	5,6	2,8	2,8
<i>S. glanis</i>	26,7	6,7	3,3	0	3,3	3,3

L'ensemble des résultats obtenus sur les cinq espèces de poissons étudiées, sont compilés dans les Tableaux III.8, pour les masses corporelles moyennes initiales et finales correspondant à chaque taux de rationnement ; III.9, pour les TCS observés de chaque taux de rationnement ; III.10, pour les accrétions corporelles des différents éléments considérés en fonction des taux de rationnement ; III.11, pour les CUDa des éléments contenus dans les aliments expérimentaux ; III.12, pour les valeurs calculées des indices IC et CEP de chacun des taux de rationnement ; et III.13, pour les valeurs des coefficient d'utilisation pratique calculés pour la matière sèche, les protéines brutes et les lipides totaux de chacun des taux de rationnement.

### Chapitre III Résultats

Tableau III.8 Masse initiale moyenne des juvéniles de chaque espèce étudiée et masse finale moyenne au terme d'une expérimentation avec 6 taux de rationnement différents. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Espèces	Masse (g) ; / TR					
	TR0	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<b><i>C. macropomum</i></b>						
Masse initiale (g)	2,09 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	2,11 <sup>a</sup>	1,99 <sup>a</sup>	1,97 <sup>a</sup>
Masse finale (g)	1,66 <sup>a</sup>	2,61 <sup>a</sup>	5,71 <sup>b</sup>	10,18 <sup>c</sup>	12,84 <sup>d</sup>	14,26 <sup>d</sup>
<b><i>O. niloticus</i></b>						
Masse initiale (g)	8,77 <sup>a</sup>	8,85 <sup>a</sup>	8,25 <sup>a</sup>	8,57 <sup>a</sup>	8,40 <sup>a</sup>	9,01 <sup>a</sup>
Masse finale (g)	7,98 <sup>a</sup>	9,77 <sup>b</sup>	12,42 <sup>c</sup>	16,23 <sup>de</sup>	17,83 <sup>e</sup>	21,48 <sup>f</sup>
<b><i>S. melanotheron</i></b>						
Masse initiale (g)	7,12 <sup>a</sup>	7,15 <sup>a</sup>	7,03 <sup>a</sup>	7,06 <sup>a</sup>	7,33 <sup>a</sup>	7,15 <sup>a</sup>
Masse finale (g)	6,15 <sup>a</sup>	8,52 <sup>a</sup>	13,56 <sup>b</sup>	12,53 <sup>cd</sup>	17,24 <sup>cd</sup>	19,29 <sup>d</sup>
<b><i>H. longifilis</i></b>						
Masse initiale (g)	5,95 <sup>a</sup>	6,02 <sup>a</sup>	5,88 <sup>a</sup>	6,06 <sup>a</sup>	5,94 <sup>a</sup>	5,95 <sup>a</sup>
Masse finale (g)	4,64 <sup>a</sup>	6,83 <sup>b</sup>	12,47 <sup>c</sup>	17,41 <sup>cd</sup>	20,04 <sup>d</sup>	26,75 <sup>e</sup>
<b><i>S. glanis</i></b>						
Masse initiale (g)	8,25 <sup>a</sup>	8,20 <sup>a</sup>	8,08 <sup>a</sup>	8,27 <sup>a</sup>	8,38 <sup>a</sup>	8,54 <sup>a</sup>
Masse finale (g)	7,46 <sup>a</sup>	10,95 <sup>a</sup>	18,74 <sup>b</sup>	20,89 <sup>bc</sup>	23,17 <sup>bc</sup>	25,22 <sup>c</sup>

Tableau III.9 Taux de croissance spécifique (TCS) observés en fonction des taux de rationnement dans des lots homogènes de juvéniles de chaque espèce étudiée au terme de l'expérimentation. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Espèces	TCS (%) / TR					
	TR0	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<i>C. macropomum</i>	-0,8 <sup>a</sup>	0,8 <sup>b</sup>	3,6 <sup>c</sup>	5,6 <sup>d</sup>	6,7 <sup>e</sup>	7,1 <sup>e</sup>
<i>O. niloticus</i>	-0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1,9 <sup>c</sup>	3,1 <sup>d</sup>	3,6 <sup>e</sup>	4,1 <sup>f</sup>
<i>S. melanotheron</i>	-0,3 <sup>a</sup>	0,3 <sup>b</sup>	1,6 <sup>c</sup>	2,1 <sup>cd</sup>	2,0 <sup>cd</sup>	2,4 <sup>d</sup>
<i>H. longifilis</i>	-0,7 <sup>a</sup>	0,4 <sup>b</sup>	2,1 <sup>c</sup>	3,0 <sup>cd</sup>	3,4 <sup>de</sup>	4,3 <sup>e</sup>
<i>S. glanis</i>	-0,4 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>	3,6 <sup>c</sup>	3,9 <sup>c</sup>

### Chapitre III Résultats

Tableau III.10 Accrétion corporelle en matière fraîche (MF), matière sèche (MS), protéines brutes (PB) et lipides totaux (LT) de juvéniles de chaque espèce étudiée ayant reçu 6 taux de rationnement différents. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Espèces	Accrétion corporelle (g) / TR					
	TR0	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<b><i>C. macropomum</i></b>						
MF	-0,43 <sup>a*</sup>	0,53 <sup>b*</sup>	3,64 <sup>c</sup>	8,08 <sup>d</sup>	10,85 <sup>e</sup>	12,29 <sup>e</sup>
MS	-0,03 <sup>a*</sup>	0,10 <sup>b*</sup>	0,71 <sup>c</sup>	1,69 <sup>d</sup>	2,62 <sup>e</sup>	2,75 <sup>e</sup>
PB	-0,09 <sup>a*</sup>	0,08 <sup>b*</sup>	0,46 <sup>c</sup>	1,28 <sup>d</sup>	1,71 <sup>e</sup>	1,85 <sup>e</sup>
LT	-0,02 <sup>a*</sup>	-0,02 <sup>a*</sup>	0,02 <sup>b*</sup>	0,14 <sup>e</sup>	0,21 <sup>d</sup>	0,34 <sup>e</sup>
<b><i>O. niloticus</i></b>						
MF	-0,79 <sup>a</sup>	0,92 <sup>b</sup>	4,17 <sup>c</sup>	7,72 <sup>d</sup>	9,41 <sup>e</sup>	12,50 <sup>f</sup>
MS	-0,25 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a*</sup>	0,95 <sup>b</sup>	1,85 <sup>c</sup>	2,50 <sup>d</sup>	3,55 <sup>e</sup>
PB	-0,05 <sup>a*</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,67 <sup>c</sup>	1,44 <sup>d</sup>	1,63 <sup>d</sup>	2,04 <sup>e</sup>
LT	-0,19 <sup>a</sup>	-0,18 <sup>a</sup>	-0,08 <sup>ab*</sup>	0,11 <sup>bc</sup>	0,19 <sup>c</sup>	0,64 <sup>d</sup>
<b><i>S. melanotheron</i></b>						
MF	-0,97 <sup>a*</sup>	1,14 <sup>a*</sup>	6,53 <sup>c</sup>	9,99 <sup>bc</sup>	9,91 <sup>bc</sup>	12,14 <sup>c</sup>
MS	-0,39 <sup>a*</sup>	0,23 <sup>ab*</sup>	1,84 <sup>bc</sup>	2,85 <sup>c</sup>	2,67 <sup>c</sup>	3,55 <sup>c</sup>
PB	-0,16 <sup>a*</sup>	0,23 <sup>ab*</sup>	0,89 <sup>bc</sup>	1,61 <sup>cd</sup>	1,53 <sup>cd</sup>	2,16 <sup>d</sup>
LT	-0,36 <sup>a*</sup>	-0,33 <sup>a*</sup>	-0,08 <sup>a*</sup>	0,32 <sup>a*</sup>	0,45 <sup>a*</sup>	0,71 <sup>a</sup>
<b><i>H. longifilis</i></b>						
MF	-1,30 <sup>a*</sup>	0,81 <sup>ab*</sup>	6,59 <sup>bc</sup>	11,35 <sup>cd</sup>	14,11 <sup>d</sup>	20,84 <sup>e</sup>
MS	-0,45 <sup>a*</sup>	0,05 <sup>a*</sup>	1,29 <sup>b</sup>	2,35 <sup>bc</sup>	3,04 <sup>c</sup>	4,66 <sup>d</sup>
PB	-0,29 <sup>a*</sup>	0,13 <sup>ab*</sup>	0,88 <sup>bc</sup>	1,37 <sup>cd</sup>	2,24 <sup>de</sup>	3,10 <sup>e</sup>
LT	-0,04 <sup>a*</sup>	-0,01 <sup>a*</sup>	0,01 <sup>a*</sup>	0,04 <sup>a*</sup>	0,05 <sup>a*</sup>	0,20 <sup>a</sup>
<b><i>S. glanis</i></b>						
MF	-0,79 <sup>a*</sup>	2,74 <sup>a</sup>	10,60 <sup>b</sup>	12,61 <sup>bc</sup>	14,72 <sup>bc</sup>	16,66 <sup>c</sup>
MS	-0,32 <sup>a*</sup>	0,56 <sup>a</sup>	2,32 <sup>b</sup>	2,77 <sup>bc</sup>	3,17 <sup>bc</sup>	3,61 <sup>c</sup>
PB	-0,10 <sup>a*</sup>	0,29 <sup>a*</sup>	1,73 <sup>b</sup>	2,08 <sup>bc</sup>	2,68 <sup>bc</sup>	2,96 <sup>c</sup>
LT	-0,14 <sup>a</sup>	-0,09 <sup>a*</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>

### Chapitre III Résultats

Tableau III.11 Coefficients d'utilisation digestive apparents de la matière sèche (MS), des protéines brutes (PB) et des lipides totaux (LT) contenus dans les aliments expérimentaux, mesures pour chaque espèce étudiée. Pour les lipides de totaux, le CUDa a été estimé à 100 % quand la teneur en lipides totaux des fèces était trop faible pour être mesurée.

Espèces	CUDa (%) / TR		
	MS	PB	LT
<i>C. macropomum</i>	90,0	94,6	100
<i>O. niloticus</i>	84,2	87,0	97,2
<i>S. melanotheron</i>	76,9	92,9	100
<i>H. longifilis</i>	76,7	89,4	100
<i>S. glanis</i>	73,5	86,2	97,4

Tableau III.12 Indice de consommation (IC) et coefficient d'efficacité protéique (CEP) observés en fonction des taux de rationnement dans des lots homogènes de juvéniles de chaque espèce étudiée au terme de l'expérimentation. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Espèces	Indices	Valeur / TR				
		TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<b><i>C. macropomum</i></b>						
	IC	0,74 <sup>c</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,52 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>b</sup>
	CEP	1,94 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup>	3,18 <sup>d</sup>	2,75 <sup>cd</sup>	2,34 <sup>ab</sup>
<b><i>O. niloticus</i></b>						
	IC	1,29 <sup>c</sup>	0,90 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	1,15 <sup>bc</sup>
	CEP	1,14 <sup>a</sup>	1,65 <sup>c</sup>	1,63 <sup>c</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,28 <sup>ab</sup>
<b><i>S. melanotheron</i></b>						
	IC	1,66 <sup>abc</sup>	1,02 <sup>a</sup>	1,27 <sup>ab</sup>	1,80 <sup>bc</sup>	2,00 <sup>c</sup>
	CEP	0,89 <sup>ab</sup>	1,44 <sup>c</sup>	1,18 <sup>bc</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	0,74 <sup>a</sup>
<b><i>H. longifilis</i></b>						
	IC	1,56 <sup>b</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,84 <sup>ab</sup>	1,06 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>a</sup>
	CEP	0,97 <sup>a</sup>	2,04 <sup>c</sup>	1,78 <sup>bc</sup>	1,43 <sup>ab</sup>	1,41 <sup>ab</sup>
<b><i>S. glanis</i></b>						
	IC	0,55 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,83 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,26 <sup>c</sup>
	CEP	2,71 <sup>b</sup>	2,70 <sup>b</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,43 <sup>a</sup>	1,17 <sup>a</sup>

À partir de ces résultats, une estimation des besoins alimentaires en énergie a pu être calculée en suivant la méthode de calcul exposé préalablement pour le tambaqui. Les conditions d'une croissance optimale avec un rendement maximal ont été identifiées pour chaque espèce en sélectionnant

### Chapitre III Résultats

les traitements permettant d'obtenir des valeurs optimales pour l'accrétion en protéine brute, la croissance et le CUP<sub>P</sub> (Tableau III.14). Pour l'ensemble des espèces de poissons étudiées, les conditions optimales ont été obtenues avec le taux de rationnement TR35, à l'exception du tilapia, *S. melanotheron*, à croissance plus lente et du tilapia du Nil, *O. niloticus*, pour lequel les conditions les plus favorables ont été observées pour le taux de rationnement le plus élevé.

Tableau III.13 Coefficient d'utilisation pratique de la matière sèche (CUP<sub>S</sub>), des protéines brutes (CUP<sub>P</sub>) et des lipides totaux (CUP<sub>L</sub>) observés en fonction des taux de rationnement chez des lots homogènes de juvéniles de chaque espèce étudiée au terme de l'expérimentation. Les différences significatives entre les valeurs d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

Espèces	CUP <sub>x</sub> (%) / TR				
	TR5	TR15	TR25	TR35	TR45
<b><i>C. macropomum</i></b>					
CUP <sub>S</sub>	0,24 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,37 <sup>ab</sup>
CUP <sub>P</sub>	0,29 <sup>a</sup>	0,41 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>ab</sup>
CUP <sub>L</sub>	-0,57 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,38 <sup>c</sup>	0,35 <sup>bc</sup>	0,43 <sup>c</sup>
<b><i>O. niloticus</i></b>					
CUP <sub>S</sub>	0,08 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>
CUP <sub>P</sub>	0,32 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>
CUP <sub>L</sub>	-1,27 <sup>a</sup>	-0,17 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>
<b><i>S. melanotheron</i></b>					
CUP <sub>S</sub>	0,11 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>
CUP <sub>P</sub>	0,17 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>
CUP <sub>L</sub>	-1,36 <sup>a</sup>	-0,10 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>
<b><i>H. longifilis</i></b>					
CUP <sub>S</sub>	0,04 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>
CUP <sub>P</sub>	0,16 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>
CUP <sub>L</sub>	-0,08 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
<b><i>S. glanis</i></b>					
CUP <sub>S</sub>	0,38 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>
CUP <sub>P</sub>	0,29 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>
CUP <sub>L</sub>	-0,48 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,14 <sup>b</sup>

### Chapitre III Résultats

Tableau III.14 Identification du taux de rationnement aboutissant à une croissance optimale avec un rendement maximal en prenant en compte, successivement pour chaque espèce étudiée, l'accrétion protéique, la croissance puis le CUP<sub>p</sub> comme critère d'évaluation.

Espèces	Taux de rationnement optimal			
	Accrétion protéique	Croissance	CUP <sub>p</sub>	Retenu
<i>C. macropomum</i>	TR35	TR35	TR35	<b>TR35</b>
<i>O. niloticus</i>	TR45	TR45	TR45	<b>TR45</b>
<i>S. melanotheron</i>	TR25	TR25	TR25	<b>TR25</b>
<i>H. longifilis</i>	TR35	TR35	TR35	<b>TR35</b>
<i>S. glanis</i>	TR35	TR25	TR25	<b>TR35</b>

Les données obtenues en utilisant le TR5 ont servi de référence pour l'estimation des conditions d'une accrétion protéique nulle. Les besoins alimentaires en énergie ont été calculés pour chaque espèce de poissons étudiée sur la base des apports en énergie brute ou en énergie digestible et de la contribution minimale des protéines à ces besoins (Tableau III.15).

Tableau III.15 Estimation des besoins alimentaires en énergie et contribution des protéines à ces besoins pour chaque espèce de poissons étudiées obtenus avec le protocole expérimental proposé.

Espèces	Besoins totaux		Besoins sous forme de protéine	
	(kJ.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )			
	EB	ED	% EB	% ED
<i>C. macropomum</i>	1 077	1 021	47	47
<i>O. niloticus</i>	1 280	1 208	28	25
<i>S. melanotheron</i>	963	911	21	21
<i>H. longifilis</i>	939	875	32	31
<i>S. glanis</i>	946	885	35	32

Toutes espèces confondues, les besoins alimentaires en énergie sont compris entre 900 et 1 300 kJ EB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ou 850 et 1 200 kJ ED.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Les besoins les plus importants sont obtenus pour les espèces à forte croissance, *C. macropomum* et *O. niloticus*. La contribution des protéines à ces besoins représente entre 25 et 47 % de l'énergie digestible, pour les espèces à plus fort potentiel économique. Un apport minimal en matière grasse de l'ordre de 5 g LT.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, représente 14 à 20 % de l'énergie digestible. Ceci indique que la contribution des autres sources d'énergie doit être comprise

## Chapitre III Résultats

entre 33 et 60 % de l'énergie digestible, soit entre 1 et 2 fois l'équivalent en énergie des apports en protéines.

### III.1.2 Détermination des substrats métabolisables

La détermination et la quantification des substrats utilisés par le poisson, pour la couverture de ses besoins énergétiques, ont été obtenues en utilisant la technique de la calorimétrie indirecte. Les tests ont été réalisés sur deux espèces de poissons, l'atipa, *H. littorale*, espèce néotropicale avec une capacité de respiration aérienne (Kramer *et al* 1978), et un tilapia, *S. melanotheron*, espèce tropicale à respiration branchiale essentiellement aquatique. Pour ces deux espèces un dispositif permettant la mesure en continu des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée a du être mis au point.

#### III.1.2.1 MISE AU POINT DES RESPIROMÈTRES

La technique de la calorimétrie indirecte repose sur la mesure des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée. Chez les poissons comme chez les autres animaux, ces mesures sont réalisés à l'aide d'un dispositif expérimental, un respiromètre, permettant de suivre l'évolution dans l'eau de la concentration en oxygène, en dioxyde de carbone, bicarbonates et carbonates ( $\text{CO}_2\text{tot}$ ), ainsi que l'apparition des produits de l'excrétion azotée, principalement l'azote ammoniacal ( $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$ ). Les deux grands types d'appareil utilisés sont les respiromètre clos et les respiromètre ouverts. Dans le premier cas, les animaux sont placés dans un environnement hermétique, sans échange avec l'extérieur, et les mesures sont réalisées en suivant l'évolution des concentrations dans le milieu. Dans le second cas, les animaux sont placés dans un environnement ouvert dont les échanges continus avec l'extérieur sont contrôlés, et les mesures sont alors réalisées en suivant simultanément les concentrations à l'entrée et à la sortie du milieu. Le système ouvert à l'avantage de maintenir l'animal dans un environnement stable et permet un enregistrement en continu sur de longues périodes, alors que pour le système clos les conditions du milieu évoluent rapidement et les mesures ne peuvent être réalisées que sur de courtes périodes entre chaque renouvellement du milieu.

Avec un poisson à respiration aérienne tel que l'atipa, le suivi des concentrations doit être fait à la fois dans l'air et dans l'eau. L'utilisation du système de respiromètre ouvert nécessite le contrôle

## Chapitre III Résultats

de deux entrées et deux sorties, ainsi que celui des échanges entre l'eau et l'air dans le milieu, ce qui devient alors difficilement réalisable d'un point de vue technique. Pour l'atipa, le choix de la mise au point du respiromètre s'est donc porté sur le principe d'un système clos, avec la possibilité d'un renouvellement aisé du milieu. Pour une espèce sans respiration aérienne comme le tilapia, le suivi des concentrations ne doit être fait que dans l'eau et peut facilement être réalisé en suivant la qualité de l'eau en entrée et en sortie. Un système de respiromètre ouvert a donc été retenu avec un dispositif permettant le suivi en continu des concentrations ou la collecte en continu d'échantillon en vue d'analyses ultérieures.

### *Respiromètre pour la mesure des échanges dans l'eau et l'air*

Pour l'atipa, un respiromètre clos renfermant un milieu aquatique et un ciel gazeux a été mis au point (Figure III-5). Ce respiromètre est composé d'une chambre expérimentale (1) constitué d'une bonbonne de verre de 21 cm de diamètre. La chambre, hermétiquement close, renferme 10 L d'eau et 1,5 L d'air. Les variations de pression dans la phase gazeuse sont mesurées à l'aide d'un manomètre à eau (3) par référence à un vase placé dans les mêmes conditions que la chambre expérimentale (2). Pour l'atipa, si l'oxygène est bien consommé à la fois dans l'eau et dans l'air, le CO<sub>2</sub> et les composés azotés sont principalement excrétés dans l'eau. Pour confirmer cette hypothèse, les variations du contenu en CO<sub>2</sub> du ciel gazeux ont été mesurées à l'aide d'un analyseur de gaz IR (Licor 6200). Les quantités de CO<sub>2</sub> correspondant à l'excrétion dans l'air ont toujours représenté moins de 1 % de celles excrétées dans l'eau. Par la suite, les échanges respiratoires dans l'air ont été considérés comme limités à la consommation d'oxygène, et les quantités d'oxygène consommé dans l'air sont mesurées en suivant les variations de pression dans la chambre. Le système est placé dans un bain (8) doté d'un contrôle de température (9) pour maintenir l'homogénéité du système.

Avant chaque essai, le bain externe (8) est rempli avec de l'eau de ville (10) et laissé à reposer pendant au moins une nuit. Au début de l'expérience, la chambre est complètement remplie à partir de l'eau contenu dans le bain externe, à l'aide de la vanne de remplissage et d'échantillonnage (7). Les poissons sont introduits par la large ouverture située en haut de la chambre, qui est ensuite scellée hermétiquement à l'aide d'un couvercle en plexiglas. Un premier échantillonnage est réalisé par aspi-

### Chapitre III Résultats

ration d'environ 100 mL à partir du fond de la chambre (7), le manomètre étant déconnecté du système et la vanne d'arrivée d'air (6) maintenue ouverte. Le niveau d'eau de la chambre est ensuite réajusté, toutes les vannes closes et le manomètre connecté. Deux heures plus tard, la dépression du ciel gazeux est mesurée sur le manomètre et la température de l'eau enregistrée. Le manomètre est ensuite déconnecté du système, et la chambre partiellement vidée par injection d'air saturée en vapeur d'eau à l'aide de la pompe (5). Cette vidange partielle est réalisée en quelques minutes et permet un bon renouvellement de l'eau à l'intérieur de la chambre. Un échantillon d'eau est à nouveau collecté pendant cette vidange. Aucune gêne particulière n'a été observée chez les poissons pendant cette manipulation. Pour éviter tout stress, le niveau d'eau dans la chambre a toujours été maintenu supérieur ou égal à 5 cm. La chambre est ensuite remplie de nouveau et le système mis en fonction pour de nouvelles étapes successives de deux heures.

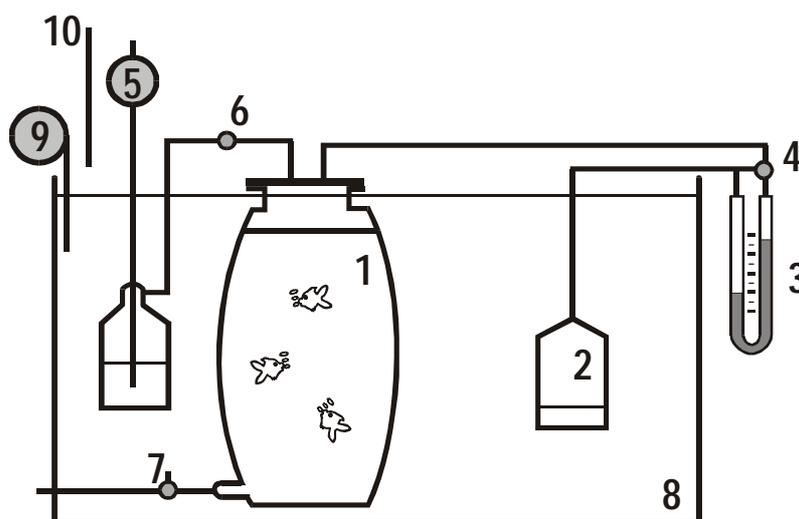


Figure III-5 Schéma du respiromètre utilisé pour la mesure des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée chez l'atipa. 1, chambre ; 2, vase de référence ; 3, manomètre à eau ; 4, shunt de manomètre ; 5, pompe à air ; 6, vanne d'entrée d'air ; 7, vanne de remplissage et d'échantillonnage ; 8, bain thermostaté ; 9, thermostat ; 10, robinet d'arrivée d'eau.

Les analyses de l'eau sont réalisées selon les méthodes décrites. Pour la mesure de la consommation d'oxygène dans l'air, les variations de pression sont converties en quantité d'oxygène consommé en utilisant la loi de Henry (Dejours 1981). La précision du manomètre à eau pour la mesure de la pression dans le ciel gazeux est de 1 mm H<sub>2</sub>O (0,0073 Torr) soit 3,9 moles O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> à 28 °C. La précision de chacune des analyses a pu être calculée à partir des informations fournies par les constructeurs dans les conditions expérimentales pour une température de 28 °C (Tableau III.16). L'azote

### Chapitre III Résultats

ammoniacal est considéré comme le seul produit d'excrétion du catabolisme des composés azotés. Les tests pour vérifier la présence d'urée dans l'eau sont toujours restés négatifs ( $< 1 \mu\text{moles N-Urée.L}^{-1}$ ).

Tableau III.16 Précision des mesures réalisés avec le respiromètre permettant le mesure des échanges dans les deux milieux, eau et air. Valeur en concentration, A et B, et en quantité, C.

Milieu et composé	A <i>mg.L<sup>-1</sup></i>	B <i><math>\mu\text{moles.L}^{-1}</math></i>	C <i><math>\mu\text{moles}</math></i>
<b>Air</b>			
O <sub>2</sub>	1,25	3,90	5,85
<b>Eau</b>			
O <sub>2</sub>	0,05	1,56	15,6
CO <sub>2</sub>	0,27	6,14	61,4
N-NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,035	0,25	2,50

#### *Respiromètre pour la mesure des échanges dans l'eau seule*

Le tilapia, *S. melanotheron*, ayant un mode de respiration uniquement aquatique, un respiromètre de type ouvert a été conçu et utilisé. Le système est constitué de trois bacs rectangulaires de 60 litres avec un fond en pyramide inversée permettant la sédimentation et l'évacuation rapide des fèces. Les trois bacs sont intégrés à un petit circuit fermé autonome et thermorégulé, assurant le contrôle de la qualité d'eau. Pour garantir un débit constant à l'entrée des bacs, l'alimentation en eau a été assurée par gravité. Pour l'ensemble des expériences, deux des bacs contenant des poissons servent de test alors qu'un bac de contrôle est sans poisson. Le rôle de chaque bac a été déterminé au hasard à la mise en place de l'expérimentation. Un dispositif de suivi automatique de la concentration d'oxygène, de la température et de collecte d'échantillon a été placé à la sortie de chaque bac, le tout étant piloté par un micro-ordinateur. Toutes les mesures ont été réalisées en utilisant la sortie du bac de contrôle comme élément de référence (Figure III-6).

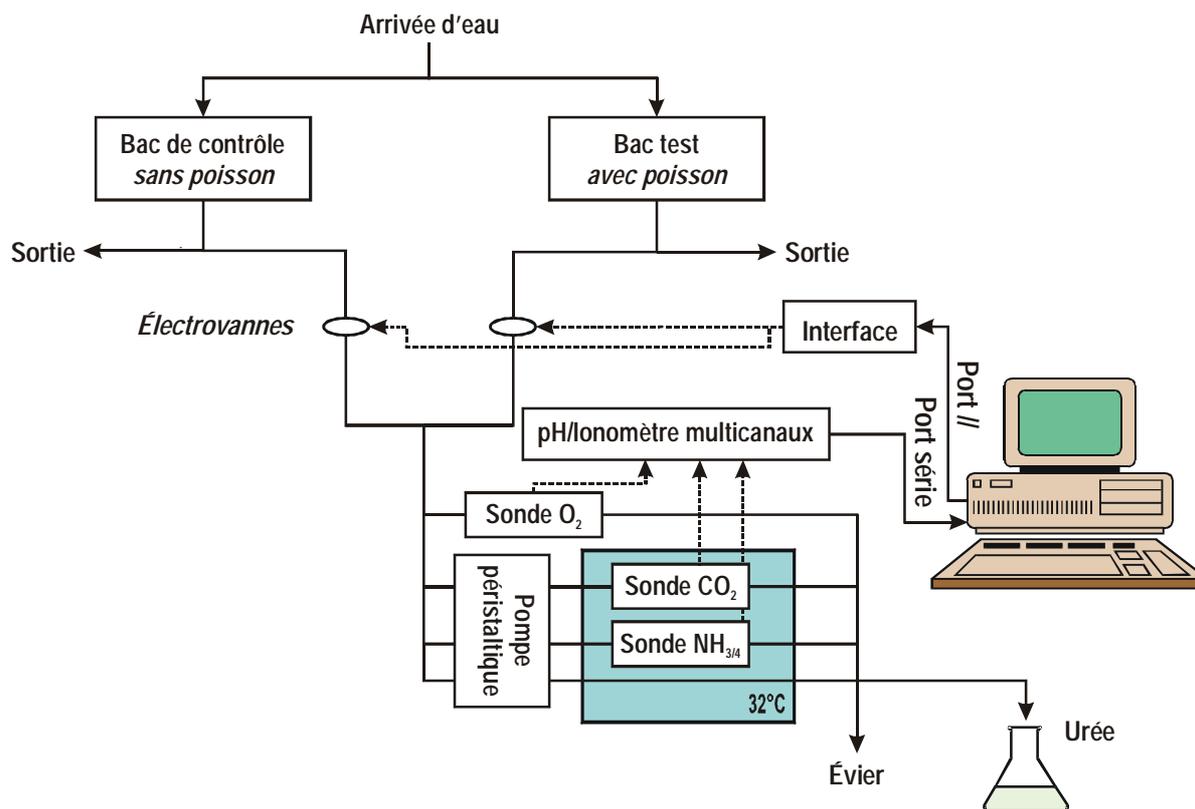


Figure III-6 Schéma du respiromètre utilisé pour la mesure en continu des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée chez le tilapia.

### III.1.2.2 POISSONS ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les tests ont été réalisés avec des atipas et des tilapias bleus de la station expérimentale de Layo (Côte d'Ivoire). Pour les atipas, les tests ont été pratiqués sur des lots de 5 poissons d'une masse moyenne de 25,6 g. Les poissons ont été soumis à la photopériode naturelle du lieu d'expérimentation (Kourou, Guyane française, 5°10' N) avec un éclairage rouge de faible intensité allumé en continu pour permettre les prélèvements la nuit. Les mesures ont été effectuées toutes les deux heures pendant plusieurs périodes de 48 heures. Pour les tilapias, les tests ont été pratiqués sur des lots de 30 poissons d'une masse moyenne de 15,4 g. Les poissons ont eux aussi été soumis à la photopériode naturelle du lieu d'expérimentation (Abidjan, RCI, 5°16' N). Le dispositif utilisé permettant un enregistrement en continu des échanges respiratoires et de l'excrétion, aucun éclairage n'a été nécessaire la nuit. Les mesures ont été enregistrées sur plusieurs périodes de 24 heures.

### Chapitre III Résultats

Tableau III.17 Formulation, composition et rationnement des aliments utilisés pour l'étude sur *S. melanotheron* en calorimétrie indirecte.

Intitulés	Formule, composition et ration				
	R0	R1	R2	R3	R4
<b>Ingrédients (g pour 100g)</b>					
Farine de poisson	90,0	80,5	72,9	66,6	61,3
Amidon	0,0	10,1	18,2	25,0	30,6
Huile	5,2	4,6	4,2	3,8	3,5
Prémélange <sup>1</sup>	0,8	0,8	0,7	0,6	0,6
Marqueur	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Liant <sup>é</sup>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Composants (pour 100g)</b>					
PB (g)	61,2	48,6	44,5	41,0	37,9
LT <sup>3</sup> (g)	13,3	11,9	10,8	9,8	9,1
Amidon (g)	2,1	9,0	14,2	21,7	25,7
CB (g)	20,3	19,0	16,9	15,5	14,3
EB (kJ)	2 004	1 770	1 719	1 729	1 694
ED (kJ)	1 634	1 460	1 428	1 451	1 431
<b>Ration (par kg et par j)</b>					
MS (g)	16,3	27,3	38,3	49,2	60,2
PB (g)	10,9	13,7	17,2	20,1	22,5
Amidon (g)	0,4	2,5	5,5	10,6	15,3
EB (kJ)	356	499	663	847	1 007
ED (kJ)	290	411	551	711	850

<sup>1</sup> Prémix commercial, Zoodry<sup>®</sup> préparé selon les recommandations pour les poissons tropicaux (N.R.C. 1983).

<sup>2</sup> Empois réalisé à partir de Maizena<sup>TM</sup>.

<sup>3</sup> Estimés à partir de la composition des matières premières.

Un aliment de type commercial (Aqualim, 45 % protéines) a été utilisé lors des études sur l'atipa et distribué à raison de 3 % de la biomasse. Différents aliments ont été utilisés pour les études sur le tilapia (Tableau III.17). Les rations ont été calculées de manière à fournir des quantités croissantes d'énergie avec une contribution plus importante de l'amidon. Afin de respecter le rythme d'alimentation naturel de ces animaux, les atipas ont reçu un repas journalier en fin de nuit et les tilapias un repas en fin de journée. Pour *S. melanotheron*, les CUDa de la matière sèche, des protéines brutes et de l'amidon ont pu être mesurés. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents

## Chapitre III Résultats

régimes. Les valeurs mesurées ont été de 0,71 pour la matière sèche, 0,80 pour les protéines brutes et 0,93 pour l'amidon.

### III.1.2.3 ANALYSE POSTPRANDIALE DES ÉCHANGES ET DE L'EXCRÉTION

Les dispositifs mis au point ont permis la mesure des échanges respiratoires en continu après la prise d'un repas pour les deux espèces (Figure III-7). Quelle que soit l'espèce et la qualité d'aliment offert aux poissons, l'amplitude des échanges respiratoires a diminué progressivement avec le temps de manière exponentielle. Pour permettre le calcul de l'évolution des valeurs moyennes, un modèle de type,  $y = b_0 + b_1 \cdot e^{-aT}$ , a été ajusté aux valeurs observées. Ce modèle a été choisi pour décrire le niveau de base ( $b_0$ ) des échanges respiratoires, et la diminution exponentielle des échanges ( $b_1$ ), associée à la prise d'un repas.

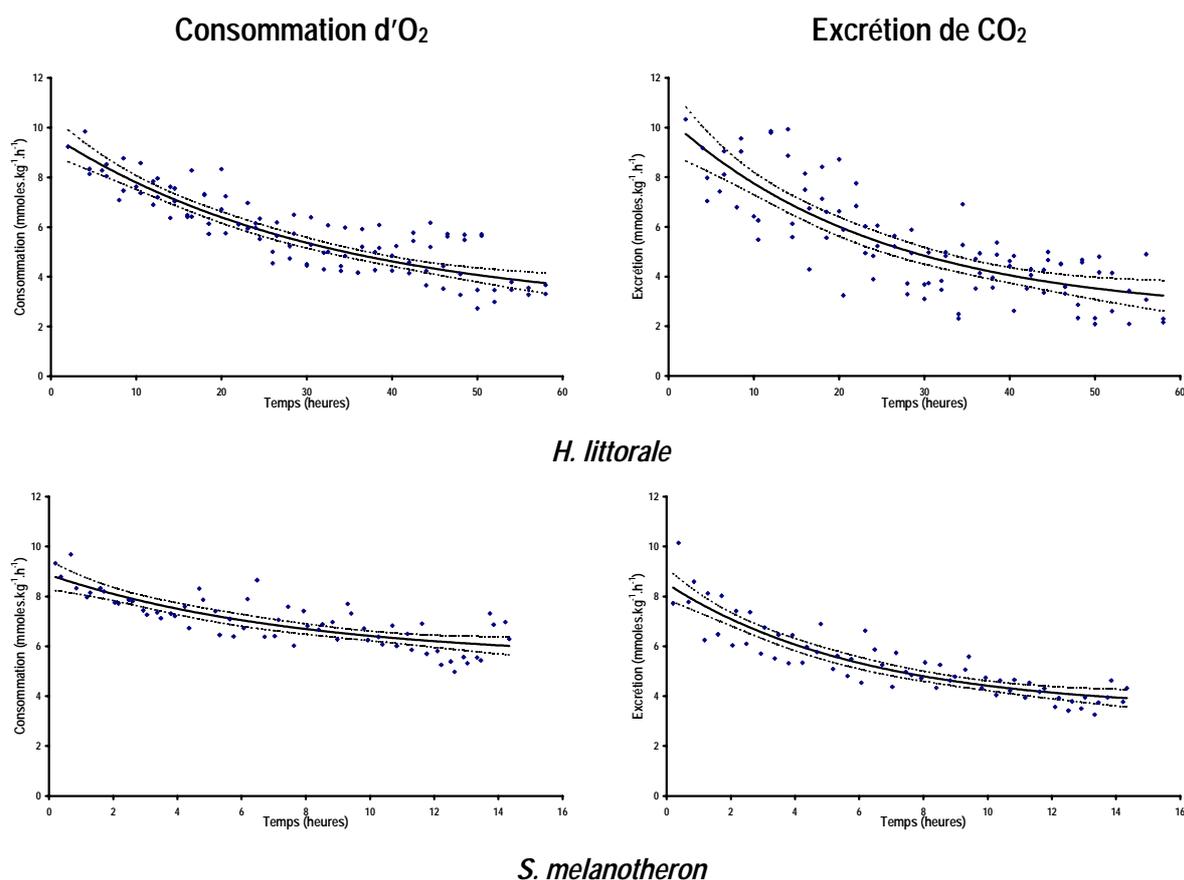


Figure III-7 Évolution des échanges respiratoires chez l'atipa, *H. littorale*, et le tilapia, *S. melanotheron*, dans les heures qui suivent la prise d'un repas. Valeurs mesurées, ajustées à un modèle ( $y = a + b e^{-aT}$ ) et intervalle de confiance ( $\alpha = 0,05$ ).

Pour l'atipa et le tilapia, un modèle identique a été utilisé pour l'excrétion de l'ammoniaque. Si dans le cas de l'atipa, l'excrétion d'urée est toujours restée dans les limites de détection de

### Chapitre III Résultats

l'analyse, une quantité détectable d'urée a été constatée avec le tilapia. L'excrétion d'urée ne pouvant être mesurée en continu avec le dispositif utilisé pour le tilapia, la détermination des quantités de substrats oxydés n'a pu être réalisée qu'au terme de chaque expérience.

La figure III-8 représente les quantités de substrats qui ont été utilisées par l'atipa pour la couverture de ses besoins énergétiques, dans les heures qui ont suivi la prise d'un repas. Les quantités de substrats catabolisés ont décru de manière exponentielle avec l'éloignement de la dernière prise d'aliment, pour rejoindre un niveau de base où seuls les lipides et les protéines ont été utilisés. Le catabolisme protéique a constitué la source préférentielle d'énergie, quelle que soit l'heure séparant la mesure du repas. Une contribution importante des glucides a pu être observée dans les premières heures, alors que l'utilisation des lipides n'est apparue que 13 heures après le repas. Durant les toutes premières heures qui suivent le repas, une utilisation apparente négative des lipides a été constatée. Une telle observation est généralement assimilée à une synthèse de lipides.

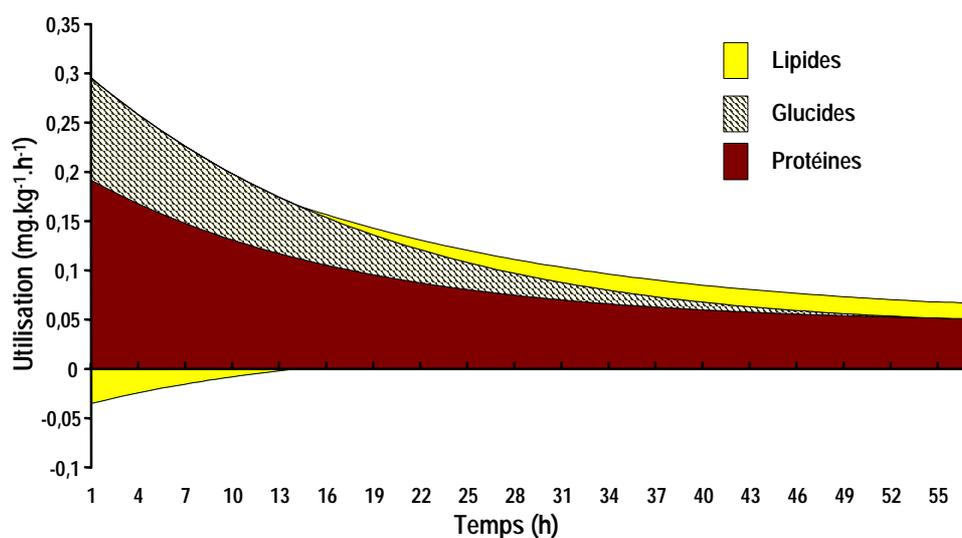


Figure III-8 Utilisation des substrats énergétiques par l'atipa, *H. littorale*, pour la couverture de ses besoins énergétiques dans les heures qui suivent la prise d'un repas.

#### III.1.2.4 BILAN SUR LES 13 HEURES SUIVANT LE REPAS.

La présence d'urée dans les produits d'excrétion azotée du tilapia n'a pas permis, chez cette espèce, d'établir un suivi des quantités de substrats utilisés à la manière de celui calculé précédemment pour l'atipa. Avec le tilapia, le bilan a été fait sur les 13 à 14 heures correspondant à la période de temps pour laquelle le prélèvement d'eau a été réalisé en continu en vue d'analyser l'urée. Des tests

### Chapitre III Résultats

ont aussi été effectués en vue de déterminer la présence d'éthanol ou d'acide lactique dans ces mêmes prélèvements. Ces derniers tests se sont toujours révélés négatifs. Les quantités moyennes des échanges respiratoires et de l'excrétion ammoniacale ou uréique ont été calculées par kg de biomasse à partir des concentrations mesurées et de la période de prélèvement pour chaque type de régime reçu par les tilapias (Tableau III.18). Ces valeurs correspondent à la moyenne obtenue sur deux lots de poissons différents. À l'exception du régime R0, les quantités d'oxygène consommées ont peu varié d'un régime à l'autre pour des apports en énergie brute allant de 500 à 1 000 kJ.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Les variations les plus importantes ont été observées pour l'excrétion d'ammoniaque avec des apports en protéines brutes allant de 11 à 22 g CP.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>.

Tableau III.18 Valeurs moyennes et erreur standard des échanges respiratoires et de l'excrétion azotée chez des tilapias, *S. melanotheron*, pour chaque régime testé.

Régime	Heures	mmoles.kg <sup>-1</sup>		mmoles N.kg <sup>-1</sup>	
		O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Urée
R0	13,8 (0,1)	111,3 (2,5)	86,2 (4,4)	14,8 (0,7)	0,8 (0,2)
R1	13,8 (0,1)	84,8 (2,5)	91,2 (4,4)	4,8 (0,7)	1,1 (0,2)
R2	13,7 (0,1)	94,7 (2,5)	89,1 (4,4)	8,3 (0,7)	1,8 (0,2)
R3	14,6 (0,1)	88,3 (2,5)	71,0 (4,4)	2,6 (0,7)	1,0 (0,2)
R4	13,9 (0,1)	89,0 (2,5)	68,7 (4,4)	2,1 (0,7)	0,9 (0,2)

À partir des résultats obtenus sur les échanges respiratoires et l'excrétion azotée, les quantités de substrats utilisées ont été calculées pour chaque régime en appliquant les formules décrites (cf. § I.1.3.1). Pour tous les régimes, les protéines ont été utilisées pour la fourniture d'énergie ou d'éléments nécessaires à la synthèse apparente de substrat (Figure III-9). En absence d'amidon dans la ration (régime R0), seuls les protéines et les lipides ont été utilisés pour la fourniture d'énergie. Pour ce régime, les résultats obtenus ont indiqués la synthèse de glucides. Pour les autres régimes, les glucides ont contribué dans tout les cas à la production d'énergie ou d'élément carbonés dans le cas de synthèse de lipides (régime R1). Avec ce régime R1 apportant une faible quantité d'amidon, les glucides ont contribué de façon importante à la fourniture d'énergie. Entre les régimes R2 et R4, la contribution des lipides a été plus importante, alors que celle des glucides et des protéines a diminué.

### Chapitre III Résultats

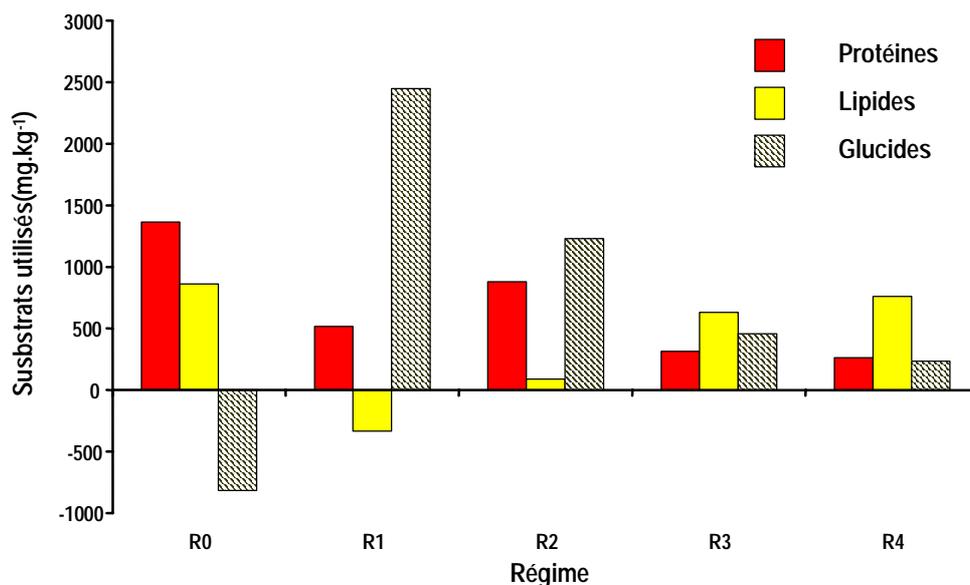


Figure III-9 Quantités de substrats énergétiques utilisés calculées à partir des échanges respiratoires et l'excrétion azotée mesurées chez des tilapias, *S. melanotheron*, recevant différents régimes.

Pendant la même période de 14 heures suivant la prise du repas, le bilan de l'utilisation des substrats par l'atipa a été de 2,1 g.kg<sup>-1</sup> pour les protéines, 1,1 g.kg<sup>-1</sup> pour les glucides avec une synthèse apparente en lipides de 0,3 g.kg<sup>-1</sup>.

#### III.1.3 Effet de l'incorporation de l'amidon sur la croissance

De nombreuses études ont été réalisées sur les effets de l'incorporation de glucides dans l'aliment des poissons tropicaux, notamment chez le tilapia du Nil, *O. niloticus* (cf. § I.1.3.3). De tous les glucides aptes à servir de source d'énergie alimentaire, l'amidon constitue un élément de choix par sa disponibilité, son coût et ses potentialités reconnues chez les poissons tropicaux. Pour la seconde espèce de tilapia étudiées, *S. melanotheron*, aucune information n'est disponible quant aux potentialités d'utilisation de l'amidon dans son alimentation. De plus, si l'amidon peut être incorporé dans l'aliment des autres tilapias sans impact sur la croissance, son rôle potentiel sur l'épargne protéique reste quelquefois controversé. Une expérimentation a donc été réalisée pour déterminer l'impact de l'incorporation de l'amidon chez la seconde espèce de tilapia étudiée, *S. melanotheron*, sur la croissance et la fixation des protéines.

## Chapitre III Résultats

### III.1.3.1 POISSONS ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

L'expérience a été réalisée sur une des espèces de tilapias étudiées, *S. melanotheron*. Les poissons obtenus à partir de géniteurs originaires de la Lagune Ébrié (RCI), ont été préalablement élevés dans les structures expérimentales du Centre de Recherche Océanologique d'Abidjan. Cinq jours avant le début de l'expérimentation, les poissons ont été répartis au hasard en dix lots homogènes de 12 individus par bac. La masse moyenne initiale des poissons a été de  $4,05 \text{ g} \pm 0,7$ . Les deux réplicats des cinq régimes testés ont été attribués aléatoirement à chaque lot. Les poissons ont été pesés individuellement chaque semaine pour l'ajustement des rations en fonction de la croissance. Au terme de quatre semaines, les poissons ont été pesés individuellement, sacrifiés et regroupés par lots en vue de déterminer leur composition corporelle. Avant analyse, tous les échantillons ont été conservés à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Aucune mortalité n'a été observée au cours de l'expérience. La température est restée comprise entre  $28$  et  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . La qualité de l'eau, suivie chaque semaine, a toujours été dans les limites acceptables par l'espèce, oxygène dissous supérieur à  $5 \text{ g.L}^{-1}$  et azote ammoniacal inférieur à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

### III.1.3.2 L'ALIMENT

Pour savoir si le poisson est capable d'utiliser l'amidon contenu dans la ration, cinq aliments ont été confectionnés (Tableau III.19) dans le but de fournir un apport journalier constant en protéines ( $15 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) avec des apports croissants en amidon ( $0$  à  $40 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ), soit AM0/14, AM10/15, AM20/15, AM30/15 et AM40/15. Les protéines ont été apportées par de la farine de poisson de bonne qualité (Type CORPESCA, origine Chili) et l'amidon par des résidus de fabrication de farine de manioc (usine de Toumodi, RCI). Ces résidus, très riche en amidon ( $76 \text{ } \%$  MS), sont des déchets plus ou moins fibreux obtenus après extraction à l'eau de la fécule des tubercules de manioc doux, et séchés à chaud. Dans chaque aliment, les apports en vitamines et minéraux par un prémix, et en acides gras essentiels par de l'huile de soja ont été définis pour être constants en quantité, quel que soit le régime. Ces apports ont été choisis pour correspondre aux quantités préconisées pour les autres espèces de tilapias.

## Chapitre III Résultats

Tableau III.19 Formule et composition des aliments, rations distribuées pour chacun des régimes testés pour l'étude de l'utilisation de l'amidon par *S. melanotheron*.

Régime	AM0/15	AM10/15	AM20/15	AM30/15	AM40/15
<b>Formulation (g pour 100g)</b>					
Farine de poisson	90,7	62,2	47,3	38,2	32,0
Amidon	0,0	29,8	45,4	55,0	61,4
Huile	3,7	2,6	1,9	1,6	1,3
Prémix vitamines & minéraux <sup>1</sup>	0,6	0,4	0,3	0,3	0,2
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Liant <sup>2</sup>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Composition (pour 100g)</b>					
PB (g)	61,2	43,5	33,0	26,1	22,7
LT (g)	10,1	7,2	5,2	4,3	3,7
Amidon (g)	2,7	23,5	35,2	44,5	49,5
CB (g)	17,1	12,4	9,9	8,6	7,9
EB (kJ)	1 890	1 715	1 590	1 551	1 533
EM (kJ)	1 358	1 439	1 464	1 530	1 566
<b>Ration (kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>					
Matière sèche (g)	24,2	35,3	46,4	57,4	68,5
Protéine brute (g)	14,8	15,3	15,3	15,0	15,6
Amidon (g)	0,7	8,3	16,3	25,6	33,9
EB (kJ)	458	605	737	891	1 051
EM (kJ)	329	508	679	879	1073

<sup>1</sup> Prémix commercial obtenu auprès de la Société Zoodry (Tableau III.17). <sup>2</sup> Empois réalisé à partir de fécule de maïs (Maïzena™).

Les rations journalières ont été distribuées en trois repas égaux à 7h00, 12h00 et 18h00. Le jour de la pesée (1 jour sur 7) les poissons n'ont pas été nourris à 7h00 pour permettre l'anesthésie. Les valeurs de CUDa obtenues pour la matière sèche, les protéines brutes et l'amidon sur des aliments analogues (cf. III.1.2.2) ont été retenus pour le calcul des équivalents énergétiques. Pour les lipides totaux, un CUDa de 0,85 a été retenu par défaut.

### III.1.3.3 CROISSANCE ET FIXATION DES PROTÉINES

Le tableau III.20 reprend l'ensemble des valeurs moyennes observées pour les masses des poissons et leurs taux de croissance spécifique. Au terme des 28 jours d'expérimentation, la masse moyenne finale et la croissance des *S. melanotheron* a été dépendante du régime. L'addition d'amidon

### Chapitre III Résultats

dans les apports journaliers a permis d'obtenir une augmentation significative de la masse finale et du taux de croissance spécifique. La croissance la plus importante a été obtenue avec le régime AM20/15. Avec des apports journaliers plus importants en amidon, la croissance observée a été moindre et significativement plus faible avec le régime AM40/15.

Tableau III.20 Masse moyenne initiale et finale et taux de croissance spécifique déterminés chez des *S. melanotheron* recevant des quantités croissantes d'amidon avec un apport protéique constant ( $15 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) pendant 28 jours.

Indices	Régime				
	AM0/15	AM10/15	AM20/15	AM30/15	AM40/15
Masse (g)					
initiale	4,26 <sup>a</sup>	3,95 <sup>a</sup>	4,08 <sup>a</sup>	3,94 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>
Finale	7,49 <sup>ab</sup>	7,93 <sup>a</sup>	8,02 <sup>a</sup>	7,40 <sup>ab</sup>	6,79 <sup>b</sup>
TCS (%)	2,02 <sup>ab</sup>	2,49 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>	2,25 <sup>ab</sup>	1,86 <sup>b</sup>

L'addition d'amidon dans les apports alimentaires journaliers a aussi agi sur l'évolution de la composition corporelle des poissons et sur la qualité de l'utilisation des aliments indiqués par les différents indices : IC, CEP, CUP<sub>p</sub> et CUP<sub>L</sub> (Tableau III.21). L'ajout d'amidon dans le régime a permis une augmentation des quantités de protéines fixées avec un apport en protéines constant. L'accrétion protéique maximale par poisson a été observée avec le régime AM20/15. Un apport plus important en amidon n'a pas entraîné d'augmentation comparable de la quantité de protéine fixée, qui a été significativement plus faible pour les poissons ayant reçu le régime AM40/15. Parallèlement, la fixation des lipides a été plus importante chez les poissons recevant de l'amidon. L'accrétion en lipides la plus élevée a été observée avec les régimes AM20/15, AM30/15 et AM40/15. Avec ces deux derniers régimes, les lipides ont représenté une part plus importante de l'accroissement corporel, respectivement 30 et 28 % de l'accrétion en matière sèche contre 20 % avec le régime AM20/15. Tous les indicateurs de la qualité de l'utilisation de l'aliment ont été fortement dépendants de la nature de la ration journalière. Les indices de consommation sont restés élevés dans cette expérience. Le meilleur résultat (2,3) a été obtenu avec le régime sans amidon (AM0/15), alors que l'utilisation du régime AM40/15 a abouti à une indice de consommation extrêmement élevé (7,2). Le CEP le plus élevé (0,84) a été obtenu avec le régime AM10/15. Le meilleur CUP<sub>p</sub> (0,16), illustrant le pourcentage de rétention protéique, a été obtenu avec les régimes AM10/15 et AM20/15. Avec l'augmentation des apports alimentaires

## Chapitre III Résultats

journaliers en amidon, une diminution significative du  $CUP_P$  a été constatée. Aucun effet apparent significatif n'a été remarqué en ce qui concerne le  $CUP_L$ , si ce n'est une légère augmentation avec le régime AM30/15. Si une augmentation des apports en amidon a induit une augmentation de la contribution des lipides dans le gain de masse du poisson, il n'y a pas eu de modification dans l'utilisation par le poisson des lipides alimentaires.

Tableau III.21 Accrétions corporelles moyennes et indices d'utilisation des aliments observés chez des *S. melanotheron* ayant reçus des régimes correspondant à des apports croissants en amidon avec un apport protéique constant ( $15 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) pendant 28 jours.

Indices	Régime				
	AM0/15	AM10/15	AM20/15	AM30/15	AM40/15
<b>Accrétion (g)</b>					
MF	3,24 <sup>ba</sup>	4,00 <sup>a</sup>	3,95 <sup>a</sup>	3,46 <sup>ba</sup>	2,76 <sup>b</sup>
MS	0,84 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>	1,01 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>
PB	0,53 <sup>b</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>	0,45 <sup>cb</sup>	0,31 <sup>c</sup>
LT	0,14 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>
<b>IC</b>	2,29 <sup>d</sup>	2,76 <sup>dc</sup>	3,65 <sup>c</sup>	4,89 <sup>b</sup>	7,19 <sup>a</sup>
<b>CEP</b>	0,71 <sup>ba</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	0,61 <sup>b</sup>
<b>CUP<sub>P</sub></b>	0,12 <sup>bc</sup>	0,16 <sup>ba</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,10 <sup>dc</sup>	0,07 <sup>d</sup>
<b>CUP<sub>L</sub></b>	0,18 <sup>b</sup>	0,30 <sup>ba</sup>	0,31 <sup>ba</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,34 <sup>ba</sup>

### III.2 Études biochimiques

Les amylases digestives constituent un point clé permettant ou limitant l'utilisation de l'amidon comme source d'énergie alimentaire. Deux questions peuvent être posées : existe-t-il des  $\alpha$ -amylases chez ces poissons et y a-t-il des isoformes, compte tenu de la nature des  $\alpha$ -amylases décrites chez les autres espèces de Vertébrés ? Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats obtenus sur les amylases digestives de deux espèces de tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Tout d'abord, un protocole de purification a dû être mis au point pour identifier et caractériser ces enzymes. Ensuite, des études ont été réalisées pour déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ces enzymes, notamment vis à vis de différentes sources d'amidon. Enfin, l'effet de la nature et de la composition du régime alimentaire sur la production de ces enzymes a été étudiée.

### III.2.1 Purification des amylases de tilapias

Chez les tilapias comme chez la plupart des autres poissons Téléostéens, le pancréas ne constitue pas un organe isolé facilement identifiable. Pour localiser les tissus susceptibles de contenir le maximum d'enzyme, l'activité amylasique a donc été mesurée, en utilisant l'apparition des sucres réducteurs avec l'amylose comme substrat, dans les différents organes de la cavité abdominale. Une méthode de purification des amylases, à partir d'extrait brut de ces tissus, a ensuite été élaborée et l'homogénéité des enzymes purifiées établie.

#### III.2.1.1 LOCALISATION ET IDENTIFICATION DE L'ACTIVITÉ AMYLASIQUE

Les organes (foie, mésentère, tube digestif) de la cavité abdominale ont été prélevés sur huit spécimens de *S. melanotheron*, en espérant pouvoir collecter le tissu pancréatique exocrine. Les mesures ont été réalisées sur des extraits obtenus après broyage dans le tampon d'extraction phosphate de Na (20 mM pH 6,9 + NaCl 6 mM), centrifugation (15', 10 000 g, 4 °C) et prélèvement du surnageant. La contribution relative de chacun de ces organes à la totalité de l'activité amylasique présente dans le surnageant est très variable d'un poisson à l'autre (Figure III-10). L'activité amylasique est à peu près également répartie dans les viscères testés.

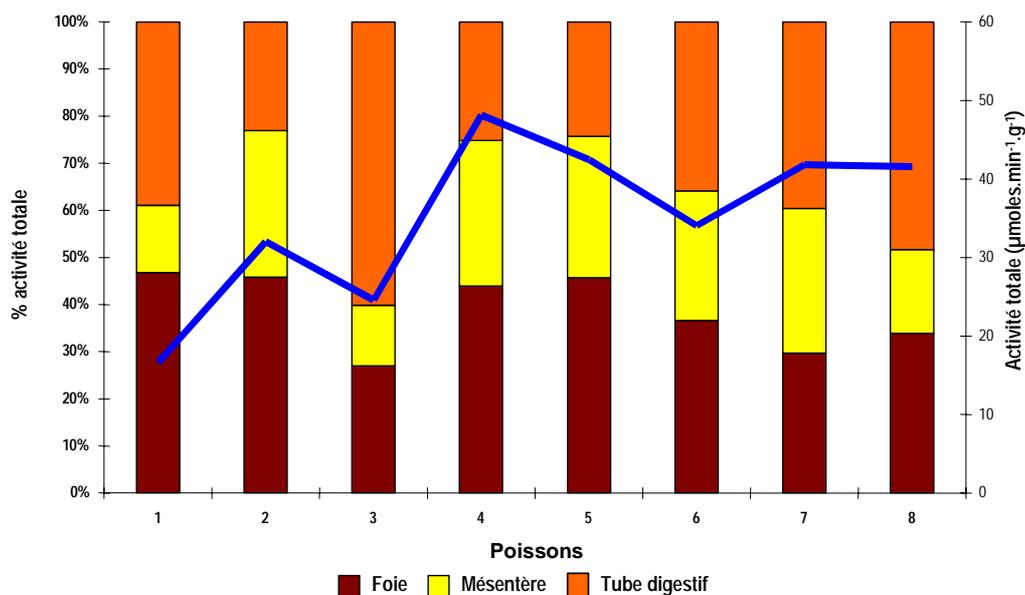


Figure III-10 Contribution relative des différents organes de la cavité abdominale à l'activité amylasique totale présente chez des tilapias, *S. melanotheron* (n=8).

### Chapitre III Résultats

L'activité amylasique a aussi été mesurée dans les heures qui suivent la prise d'un repas, dans l'estomac et dans les moitiés antérieure et postérieure de l'intestin. Aucune activité amylasique n'a été décelable dans les extraits obtenus à partir de l'estomac. L'activité amylasique n'a été identifiable que dans l'intestin où elle est répartie à peu près également dans les moitiés antérieure et postérieure. La contribution de chaque portion de l'intestin à l'activité totale a été équivalente, quelle que soit l'heure séparant le prélèvement de la prise du repas. Aucun organe spécifique n'a pu être reconnu comme contenant l'essentiel du tissu pancréatique exocrine, c'est pourquoi l'ensemble des viscères contenu dans la cavité abdominale à l'exception des gonades et de la rate a été considéré comme susceptible de renfermer du tissu pancréatique exocrine. Ces viscères ont servi de base à la préparation de l'extrait brut utilisé pour la purification. Les activités amylasiques présentes dans le tube digestif des deux espèces de tilapias étudiées ont été identifiées par IEF suivie d'une révélation dans le gel de l'activité amylasique (Figure III-11). Deux bandes d'activité amylasique sont présentes chez les deux espèces, dont une seule semble être commune à chacune d'elle. Chez chacune des deux espèces étudiées, la forme correspondant au pI le plus élevé apparaît dominante. Le pI apparent des amylases provenant des tissus prélevés chez *S. melanotheron* est plus élevé que celui des amylases obtenues à partir d'*O. niloticus*.

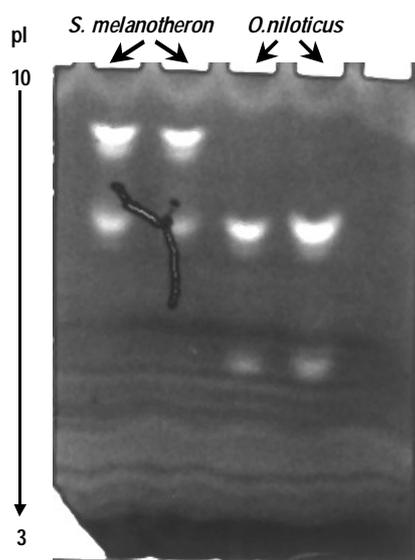


Figure III-11 Analyse par isoélectrofocalisation d'extraits bruts de tube digestif de tilapias, *S. melanotheron* et *O. niloticus*. Chaque puits correspond à un individu. Révélation des activités amylasiques présentes à l'amidon et à l'iode.

## Chapitre III Résultats

### III.2.1.2 MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET PRÉPARATION DE L'EXTRAIT BRUT

Les échantillons ont été prélevés chez des poissons d'environ 50 g (*O. niloticus* ou *S. melanotheron*) fraîchement abattus. Le contenu de la cavité abdominale a été disséqué et conservé à -20 °C après élimination de la rate et des gonades. Les tissus congelés ont été homogénéisés à 0 °C avec un broyeur ménager à couteaux (hachoir Moulinex®) dans une quantité d'eau représentant au moins deux fois la masse fraîche initiale du tissu. L'homogénat a été ensuite centrifugé (10 000 g, 4 °C, 15 min). Seule la phase aqueuse a été recueillie en prenant soin d'éviter toute contamination par la phase lipidique, puis lyophilisée et conservée dans un flacon hermétique maintenu à -20 °C.

### III.2.1.3 PURIFICATION

Un protocole de purification en trois étapes de l' $\alpha$ -amylase a été mis au point chez les deux espèces de tilapias étudiées, *O. niloticus* et *S. melanotheron* (Figure III-12), et a permis de purifier deux  $\alpha$ -amylases AMY-I et AMY-II pour chaque espèce.

Environ 1g d'extrait brut a été repris dans 15 ml de tampon phosphate de Na (50 mM pH 6,9), puis homogénéisé et centrifugé (10 000g 10 min), et le surnageant (I) récupéré pour réaliser la première étape de précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium à 30 % et 60 % de la saturation. L'activité amylasique est majoritairement présente dans le culot à 60 % (C60), qui est repris dans 10 mL de tampon d'équilibrage pour l'étape suivante (phosphate de Na 20 mM pH 6,9 + CaCl<sub>2</sub> 1mM), puis dialysée (2 x 2 L pendant 16 h) contre le tampon en chambre froide.

Dans l'étape suivante, la solution est appliquée sur une colonne d'affinité Sepharose 6B- $\alpha$ CD. Après élimination de la fraction qui n'a pas été retenue (NR) avec du tampon d'équilibrage, l'élution de la fraction retenue (R) est obtenue par de la  $\beta$ -cyclodextrine (10 g.L<sup>-1</sup>) en solution dans le tampon d'équilibrage à raison de 1,5 fois le volume de la colonne. Les profils de chromatographie sont semblables quelle que soit l'espèce (Figure III-13). L'activité amylasique n'est présente que dans la fraction retenue (R).

### Chapitre III Résultats

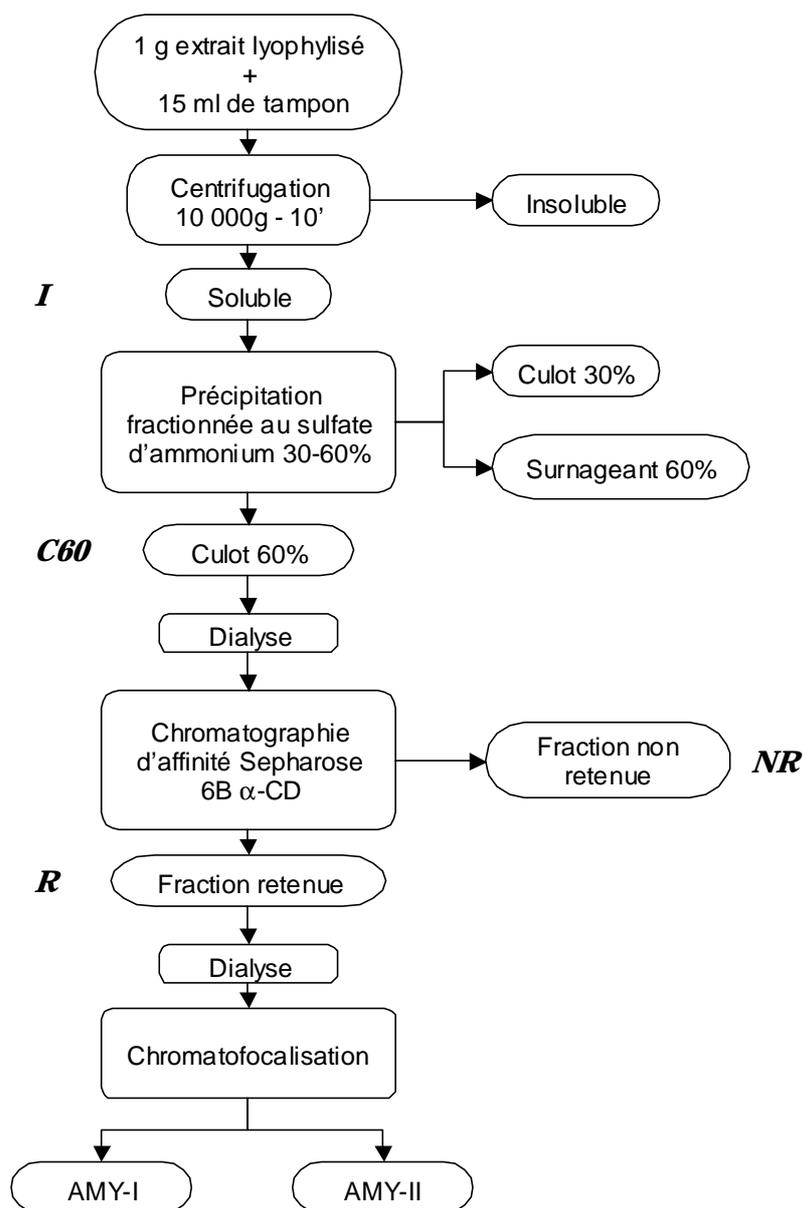


Figure III-12 Schéma de purification de l' $\alpha$ -amylase des deux espèces de tilapias. Toutes opérations sont effectuées à froid (env. 4 °C)

Dans l'étape ultime de la purification, l'échantillon a été appliqué sur une colonne de chromatofocalisation PBE 94, équilibrée avec du tampon Tris-acétate (25 mM pH 8,5) pour *O. niloticus* et du tampon éthanolamine-HCl (25 mM pH 9,4) pour *S. melanotheron*. Avant application sur la colonne, la fraction retenue (R), d'environ 20 mL, est dialysée contre le tampon d'équilibrage correspondant (2 x 2 L pendant 16 h). Pour les extraits provenant de l'espèce *O. niloticus*, l'élution est réalisée avec un mélange de Polybuffer 96, de Polybuffer 74 et d'eau (3:7:90) ajusté à pH 5,0 avec de l'acide acétique 5 M. Pour les extraits provenant de *S. melanotheron*, l'élution est réalisée avec une solution de Poly-

### Chapitre III Résultats

buffer 96 à 10 % (v:v) ajustée à pH 7,5 avec de l'acide chlorhydrique 6 M. Cette dernière étape permet de séparer deux fractions actives (AMY-I et AMY-II), la première correspondant au pH d'élué le plus basique et la seconde au plus acide (Figure III-14). L'importance relative de chacun de ces deux pics n'a pas été constante et varie selon les préparations. Les deux fractions sont éluées à un pH de 7,4 et 7,2 pour *O. niloticus*, et de 8,5 et 8,3 pour *S. melanotheron*.

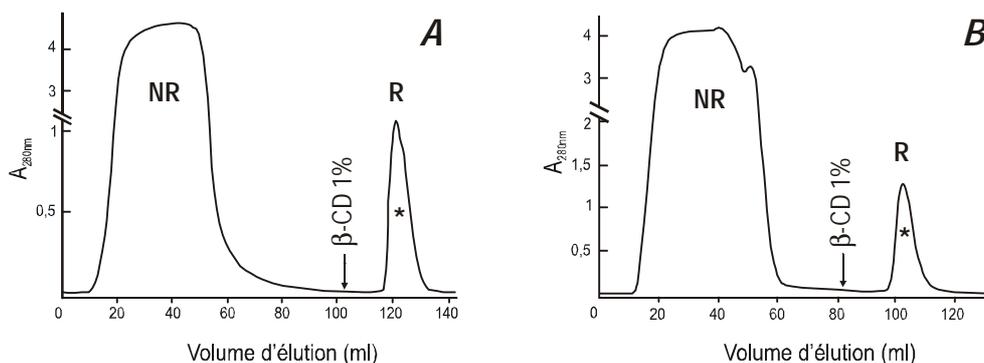


Figure III-13 Profil d'élué obtenu sur Sepharose 6B- $\alpha$ CD après application de la fraction C60 de tilapia, *O. niloticus* (A) ou *S. melanotheron* (B). L'activité est dans la fraction R indiquée par un astérisque (\*). Conditions : colonne h=110 mm, d =16 mm ; charge 171 mg (A) et 47 mg (B) ; débit 0,4 mL.min<sup>-1</sup> ; tampon d'équilibrage, 20 mM Na phosphate pH 6,9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub> ; tampon d'élué 20 mL 1 %  $\beta$ -CD dans le tampon d'élué comme indiqué par la flèche.

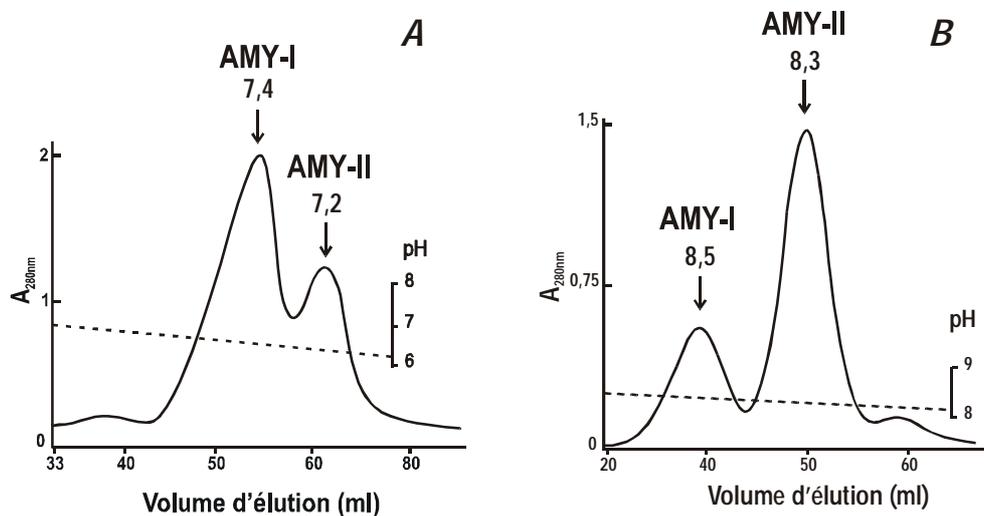


Figure III-14 Profil d'élué obtenu par chromatofocalisation sur PBE 94 de tilapia, *O. niloticus* (A) ou *S. melanotheron* (B). Conditions : colonne h=300 mm, d =10 mm ; charge 22 mg (A) et 2,2 mg (B) ; débit 0,3 mL.min<sup>-1</sup> ; tampon d'équilibrage, 25 mM Tris-acétate pH 8,5 (A) 25 mM éthanolamine-HCl pH 9,4 (B) ; tampon d'élué, 3 % PolyBuffer™ 96 + 7 % Polybuffer™ 74 pH 5,0 (A) 10 % Polybuffer™ 96 pH 7,5 (B).

### III.2.1.4 ANALYSE DE LA PURETÉ

Dans un premier temps, la pureté des fractions obtenues à chaque étape a été contrôlée par analyse en SDS-PAGE. Pour les deux espèces, la fraction recueillie après chromatographie d'affinité (R) a donné une bande majoritaire avec une vitesse de migration correspondant à une masse moléculaire de l'ordre de 55 kDa (Figure III-15). Cependant, quelques produits de plus faible masse moléculaire ont été toujours observables. Après chromatofocalisation, dans les pistes AMY-I et AMY-II, une seule bande correspondant à une protéine de masse moléculaire d'env. 55 kDa a été décelable, quelle que soit la fraction ou l'espèce.

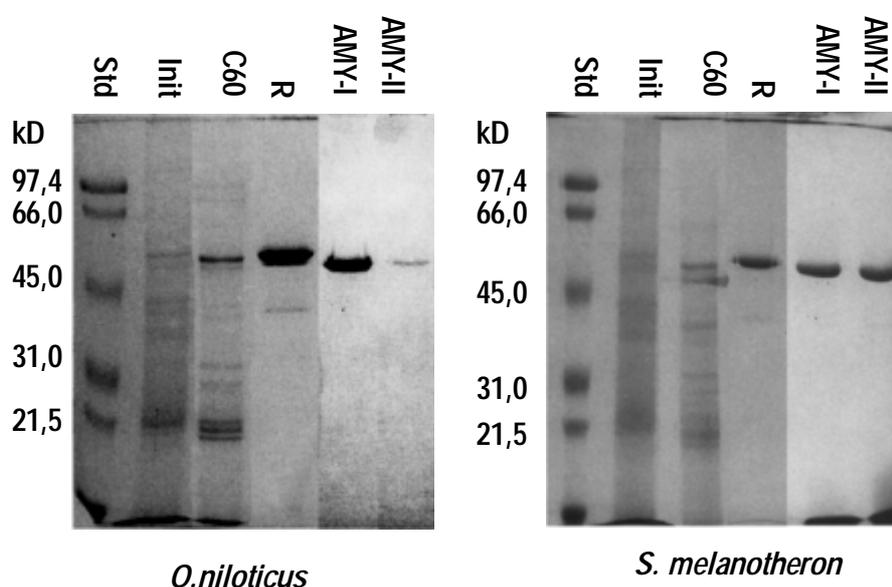


Figure III-15 Analyse par électrophorèse en SDS-PAGE, sur gel 10 % et en condition réduite, des fractions obtenues à chaque étape de la purification des amylases de deux tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Std, standard de masse moléculaire ; Init, extrait brut ; C60, culot de précipitation au  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  60 % ; R, fraction retenue par la colonne d'affinité Sepharose 6B- $\alpha$ CD ; AMY-I et AMY-II, fractions finales obtenues après chromatofocalisation. Coloration du gel au CBB R250.

Dans un second temps, les fractions ont été analysées par IEF. Après chromatographie d'affinité, deux bandes majoritaires sont visibles pour les fractions provenant de chacune des deux espèces. Les pI correspondants ont été de 8,2 et 7,8 pour *O. niloticus* et de 8,8 et 8,2 pour *S. melanotheron*. Après la chromatofocalisation, si l'analyse de la fraction AMY-II de chaque espèce n'a donné que la bande de pI le plus acide, de façon surprenante la fraction AMY-I a toujours donné deux bandes correspondant à chacun des pI obtenus au terme de l'étape précédente (Figure III-16). Si l'étape de chromatofocalisation a permis l'élimination des traces d'impuretés de plus faible masse

### Chapitre III Résultats

moléculaire observées quelquefois après la chromatographie d'affinité, elle n'a pas permis de séparer les formes selon leur pI. Il est vraisemblable qu'une partie de AMY-I se transforme en AMY-II.

L'analyse de l'amylase AMY-I purifiée de *O. niloticus* par HPLC sur colonne C<sub>18</sub> ne donne qu'un seul pic.

Pour les deux espèces de tilapias étudiées, la purification a conduit à une  $\alpha$ -amylase homogène du point de vue de la masse moléculaire, mais contenant deux constituants de pI différents, caractéristiques de l'espèce. Le produit de plus faible pI (A) a été isolé à l'inverse du plus basique (B), vraisemblablement parce que AMY-B donne AMY-A.

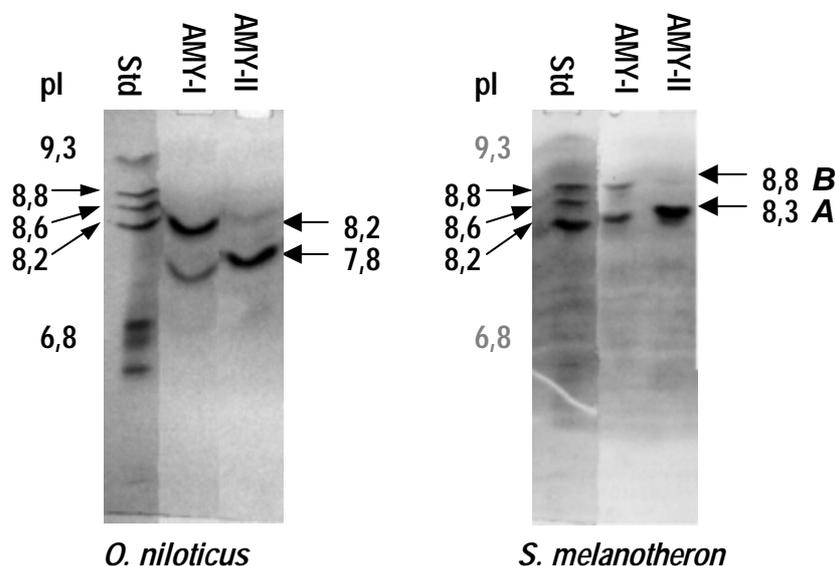


Figure III-16 Analyse par IEF des fractions obtenues après chromatofocalisation lors de la purification des amylases de deux tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Std, standard de point isoélectrique (pI) ; AMY-I et AMY-II, fractions finales obtenues après chromatofocalisation. Coloration du gel au CBB R250.

#### III.2.1.5 BILAN

Le bilan des diverses étapes des purifications réalisées sont présentés dans le Tableau III.22. Les extraits ont été obtenus à partir de 60,4 g de viscères pour *O. niloticus* et 30,4 g de viscères pour *S. melanotheron*. Ces résultats ne sont donnés qu'à titre indicatif, car la proportion relative des fractions finales, AMY-I et AMY-II, peut varier d'une préparation à l'autre, et la quantité totale d'activité recueillie par gramme de tissu est dépendante du contenu en graisse de la cavité abdominale. Ce dernier point est lié au fait que les préparations ne sont pas réalisées à partir d'un tissu pancréatique bien

## Chapitre III Résultats

isolé. Deux  $\alpha$ -amylases, AMY-I et AMY-II, ne différant que par leur pI ont été isolées des viscères de chacun des deux tilapias. Des variations similaires sur l'importance relative de chaque isoforme ont aussi été observées lors de la purification de l'amylase pancréatique de porc à partir de pancréas individualisé (Desseaux, *comm. pers.*).

Tableau III.22 Bilan de purification de l'amylase chez les deux espèces de tilapias étudiées. Exemples obtenus à partir d'extrait brut correspondant à 62,4 g de tissu frais pour *O. niloticus* et à 30,4 g de tissu frais pour *S. melanotheron*. Une unité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1  $\mu$ mole de liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) par minute.

Étapes	<i>O. niloticus</i>				<i>S. melanotheron</i>			
	Activité totale (U)	Prot. totales (mg)	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	Rd <sup>t</sup> . (%)	Activité totale (U)	Prot. totales (mg)	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	Rd <sup>t</sup> . (%)
Extrait brut	34 710	1 842	19	-	5 753	753	8	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60 %	28 094	171	164	80,9	2 692	47	57	46,8
Affinité $\alpha$ -CD	21 965	22	1 003	63,3	2 199	2,2	999	38,2
AMY-I (B+A)	8 610	5,88	1 464	24,8	396	0,25	1 589	6,7
AMY-II (A)	2 805	1,83	1 530	8,1	773	0,57	1 356	13,4

Pour chacune des espèces de tilapias, le rendement total est de l'ordre 20 %. Les activités spécifiques des amylases de tilapias sont de l'ordre de 1 400 U.mg<sup>-1</sup>. Le taux de purification est de 80 fois environ avec un rendement de 20 à 30 %. Quand l'isolement de deux composants des amylases n'est plus recherché, une étape de chromatographie sur échangeurs d'anions (cf. § II.3.5.2) a été substituée à l'étape de chromatofocalisation. Cette dernière étape, moins onéreuse et plus facile de mise en œuvre, a permis l'élimination des légères impuretés présentes après la chromatographie d'affinité et a abouti à de meilleurs rendements (jusqu'à 44 % pour les deux espèces).

### III.2.2 Étude structurale des amylases de tilapias

#### III.2.2.1 MASSE MOLÉCULAIRE ET PI

La masse moléculaire a été déterminée par spectrométrie de masse pour les protéines contenues dans la fraction AMY-I rassemblant les deux isoformes de même masse moléculaire si l'on en juge les résultats en SDS-PAGE. Un seul pic a été obtenu pour chacune des deux espèces qui correspond à une masse de 56,6 kDa pour *O. niloticus* et de 55,5 kDa pour *S. melanotheron* (Figure III-17). Déterminés par IEF, les points isoélectriques (pI) des composants AMY-B et AMY-A sont respecti-

### Chapitre III Résultats

vement 8,2 et 7,8 pour *O. niloticus*, 8,8 et 8,3 pour *S. melanotheron*. Pour chacune des espèces, ces composants ont la même masse moléculaire.

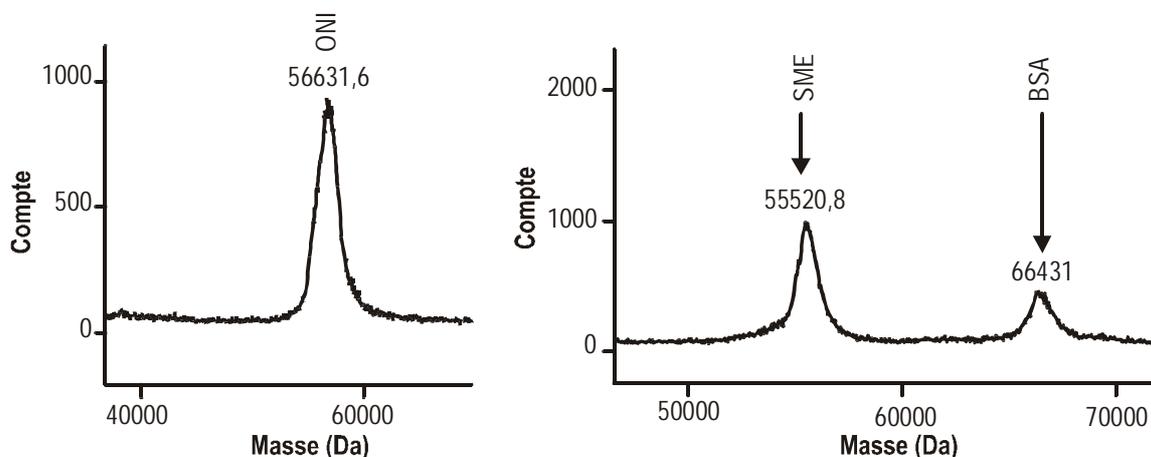


Figure III-17 Détermination de la masse moléculaire des  $\alpha$ -amylases purifiées chez deux tilapias contenant pour chaque espèce le mélange des deux composants de pI différents, A et B. ONI, extrait d'*O. niloticus* ; SME, extrait de *S. melanotheron* ; BSA, albumine sérique de bœuf utilisée comme témoin.

#### III.2.2.2 COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET SÉQUENCE

La composition globale en acides aminés de la fraction AMY-I a été déterminée à partir du gel SDS-PAGE après transfert. Une évaluation de la composition stœchiométrique de chaque enzyme a pu être calculée avec la méthode des plus grand commun diviseur (Delaage 1968) en utilisant la masse moléculaire obtenue par spectrophotométrie de masse comme référence (Tableau III.23) et un nombre moyen de 12 cystéines. Les différences de compositions en acides aminés des amylases des deux espèces de tilapias étudiées sont mineures : Pro (34-31), Val (36-34), Ile (27-23), Phe (21-19).

Pour les deux espèces, aucune séquence d'acides aminés n'a pu être obtenue par la dégradation d'Edmann, indiquant probablement que les  $\alpha$ -amylases de tilapias sont N- bloquées comme celle du pancréas de porc.

Connaissant les quantités initiales de protéines utilisées pour l'analyse des acides aminés et la molarité calculée à partir des résultats obtenus au terme de ces analyses, un contrôle des valeurs de références utilisés pour la détermination de la concentration en protéines des solutions d'amylase a pu être établi. Compte tenu des erreurs d'analyse, la concentration en protéine estimée à partir des quantités d'acides aminés présents ne diffère pas significativement de celle préalablement mesurées selon les

### Chapitre III Résultats

deux méthodes utilisées (cf. § II.3.1). L'usage d'un coefficient d'extinction spécifique ( $\epsilon$ ) de 2,5  $\text{mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour la détermination à 280 nm, ou l'utilisation d'une courbe de référence établie avec de la BSA pour la détermination selon Bradford, donnent donc de bonnes indications des concentrations effectivement présentes dans les solutions d' $\alpha$ -amylase purifiée de chacun des deux tilapias.

Tableau III.23 Composition en acides aminés obtenus à partir de 28  $\mu\text{g}$  d' $\alpha$ -amylase d'*O. niloticus* et de 21,5  $\mu\text{g}$  d' $\alpha$ -amylase de *S. melanotheron*, masse moléculaire calculée et nombres de résidus par molécule pour la masse calculée.

Acides aminés	Composition		Composition	
	(pmoles)		(résidus par molécule)	
	<i>O. niloticus</i>	<i>S. melanotheron</i>	<i>O. niloticus</i>	<i>S. melanotheron</i>
Ac. Aspartique ou Asparagine	2 530	2 310	76	74
Ac. Glutamique ou Glutamine	1 470	1 350	44	43
Sérine	870	980	26	31
Glycine	2 470	2 170	74	69
Histidine	350	340	17	11
Arginine	890	860	27	28
Thréonine	570	640	11	20
Alanine	960	890	29	28
Proline	1 130	970	34	31
Tyrosine	580	530	11	17
Valine	1 190	1 050	36	34
Méthionine	380	350	11	11
Isoleucine	890	720	27	23
Leucine	1 020	960	37	31
Phénylalanine	700	600	21	19
Lysine	460	400	14	13
<i>Masse moléculaire calculée</i> <sup>1</sup>	53 000	51 700		

<sup>1</sup> selon Delaage (1968).

#### III.2.2.3 ÉTUDE DES ISOFORMES DES AMYLASES DES DEUX TILAPIAS

Au cours de la purification de l'amylase des deux espèces de tilapias étudiées, *O. niloticus* et *S. melanotheron*, deux composants de même masse moléculaire ont été observés pour chaque espèce. Les différences de pI de ces composants et la masse moléculaire permettent de distinguer les  $\alpha$ -amylases de ces deux espèces, mais aucune différence autre que leur pI n'a pu être observée. Il est

### Chapitre III Résultats

vraisemblable qu'il s'agisse d'isoformes et non d'isoenzymes qui différeraient par leur structure et leur masse moléculaire.

Dans l'interprétation des résultats d'analyse des gels d'électrophorèse montrant la présence de plusieurs bandes (ou isoformes) pour une même enzyme, la glycosylation est généralement avancée comme un élément important susceptibles de modifier la masse moléculaire de l'enzyme. Pour les amylases, la possibilité d'un effet de ce type a été plusieurs fois avancée pour expliquer la présence de plusieurs isoformes dans la salive ou le suc pancréatique (Al Kazaz *et al* 1998). Pour les amylases de tilapias, un test de glycosylation a été réalisé à partir d'un gel d'IEF (Møller & Poulsen 1996). Il n'a pas permis de conclure à l'existence de forme glycosylée dans les enzymes purifiées. Les chaînes latérales des résidus asparagine (Asn) et glutamine (Gln) d'une protéine peuvent être désamidées pour donner un groupement carboxylique libre ou former un cycle imide (Reubsæet *et al* 1998), et le résidu N-terminal peut aussi perdre sa charge par acétylation. Un tel phénomène aboutit à une modification de l'équilibre des charges de la protéine, en conséquence, de son pI. L'intervention d'une désamidation a déjà été évoquée pour expliquer la présence de plusieurs isoformes d'amylases salivaires chez l'homme, ainsi que dans celles du pancréas de rat (Karn & Malacinski 1978) ou du pancréas de porc (Al Kazaz *et al* 1996 ; Darnis *et al* 1999). L'action de l'ester éthylique de glycine en présence de EDC (cf. II.3.10) a été appliquée pour uniformiser par amidation les groupements carboxyliques libres des deux isoformes d'amylase de tilapia. Elle aboutit à l'apparition de plusieurs formes actives, mais aussi à la disparition de l'isoforme AMY-A (Figure III-18).

L'existence de deux isoformes peut aussi être le résultat d'une dégradation de la chaîne polypeptidique par des protéases contaminantes. Malgré l'obtention de deux pics en chromatofocalisation, l'analyse du contenu du pic correspondant à AMY-I, avec le pI le plus élevé, donne toujours deux isoformes en IEF. Une dégradation de l'isoforme de pI le plus élevé, isoforme B, conduisant à l'isoforme A pourrait en être l'explication. Afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse, la séparation des deux isoformes de l'amylase par IEF a été contrôlée après électroélution, afin de reproduire en IEF une séparation du même type que celle réalisée par chromatofocalisation. Le suivi de l'état d'une

### Chapitre III Résultats

préparation d'amylase après « vieillissement » à 4 °C et la purification de l'enzyme en présence d'un mélange d'inhibiteur de protéases ont été également réalisés.

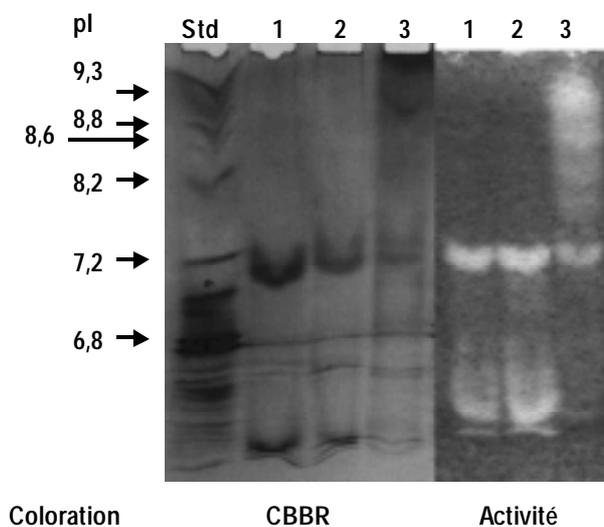


Figure III-18 Analyse en IEF des produits d'amidation de l'amylase de tilapia, *O. niloticus*. Correspondance des puits : Std, standard de pI ; 1, contrôle : amylase non traitée ; 2, témoin non amidé : amylase traitée sans EDC ; 3, produit amidé : amylase traitée en présence d'EDC (cf. texte). Révélation des protéines au CBBR 250 et des activités amyliques à l'amidon et à l'iode.

Les rendements d'électroélution après IEF ont toujours été faibles, mais par une seconde IEF des deux fractions électroéluées a révélé la présence d'une majorité d'isoforme A, quelle que soit l'isoforme d'origine (Figure III-19). Tout comme pour la chromatofocalisation, le produit correspondant à la purification de l'isoforme B (pI le plus élevé) a donné à nouveau les deux isoformes par IEF. L'isoforme B ne semble donc pas très stable.

Après quatre mois de stockage des fractions AMY-I et AMY-II d'amylase de *S. melanotheron* dans des fioles de verre à 4 °C, en solution dans du tampon Tris/HCl (20mM pH 8,2 + NaN<sub>3</sub> 1mM), la concentration en protéine de chacune des préparations n'a pas varié de manière significative, mais l'analyse par IEF montre dans les deux cas la disparition de l'isoforme B et le maintien de l'isoforme A (Figure III-20). Aucune modification sur la nature et la répartition des isoformes n'a été constatée quand la purification est réalisée en présence d'inhibiteurs de protéase.

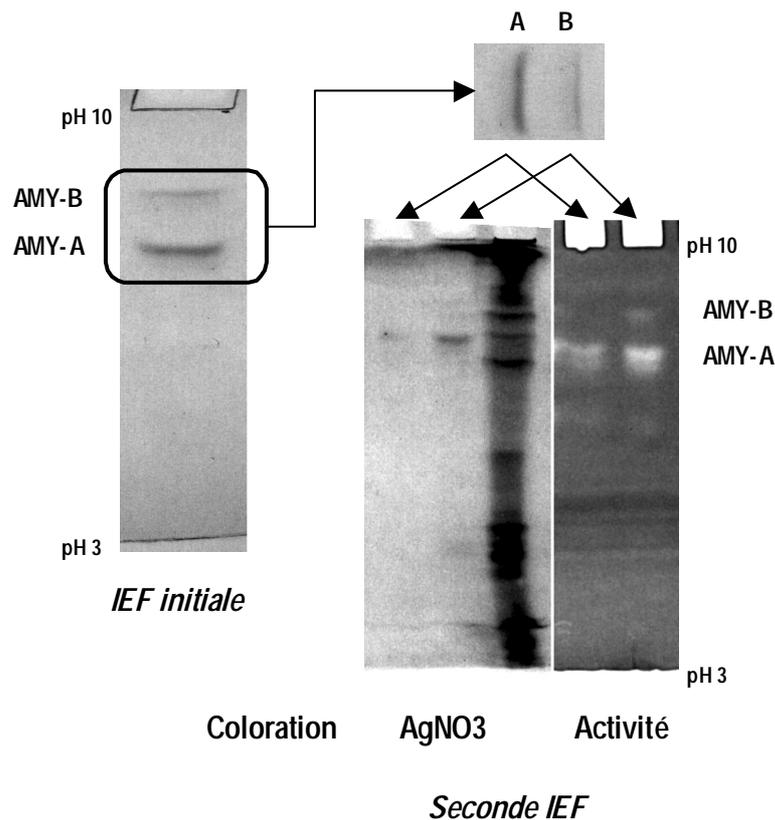


Figure III-19. Analyse par une seconde IEF des deux isoformes (AMY-A et AMY-B) de *S. melanotheron* séparées par électroélution après une première IEF. Pour la seconde IEF, les gels ont été traités soit au  $\text{AgNO}_3$  pour les protéines, soit à l'iode pour la révélation de l'activité amylasique. Gels : 5 %T / 5 %C.

Des hybrides des deux espèces de tilapias ayant été obtenus au GAMET (Montpellier) par fécondation artificielle, une préparation d'amylase a été réalisée à partir de tissu prélevés chez des individus issus du croisement ♂ *O. niloticus* x ♀ *S. melanotheron*. La purification de l' $\alpha$ -amylase a abouti à trois fractions distinctes. Analysés par IEF, l'amylase des hybrides contient trois formes, AMY-A, AMY-B et AMY-C correspondant respectivement à la forme AMY-A de *O. niloticus*, aux formes AMY-B de *O. niloticus* et AMY-A de *S. melanotheron*, et à la forme AMY-B de *S. melanotheron*. La fraction correspondant aux formes AMY-B de *O. niloticus* et AMY-A de *S. melanotheron* est homogène en chromatofocalisation et en IEF.

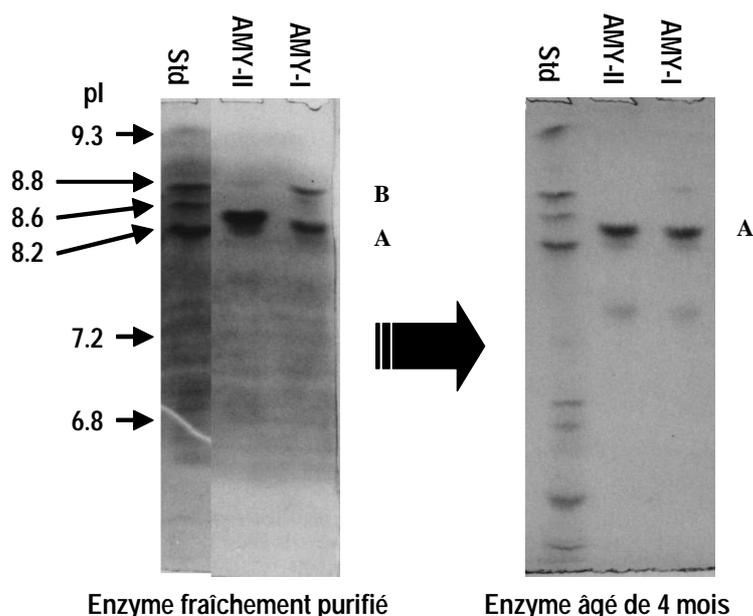


Figure III-20 Analyse par IEF de l'évolution du profil des isoformes après quatre mois de stockage d'amylase purifiée de *S. melanotheron* à 4 °C dans un tampon de conservation (Tris/HCl 20 mM pH 8,2 + NaN<sub>3</sub> 1 mM). Les quantités de protéines chargées par puits sont équivalentes d'un gel à l'autre.

Au terme de l'hybridation, les formes d' $\alpha$ -amylase des souches parentales sont présentes à la première génération et les hybrides semblent donc capables d'exprimer les gènes correspondant aux formes parentales. Si pour les isoformes, la présence de plusieurs gènes ne peut être confirmée, il est vraisemblable que les différences de masse moléculaire observées entre les deux espèces soient bien le reflet de l'expression de gènes différents.

### III.2.3 Caractérisation fonctionnelle des amylases de tilapias

#### III.2.3.1 PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'AMIDON

L'analyse des produits d'hydrolyse d'un amidon de maïs insoluble (Merck, réf. 11686) par les amylases des deux espèces de tilapia a été réalisée par HPAEC-PAD (Figure III-21). À 10 mL d'une suspension contenant 25 g.L<sup>-1</sup> d'amidon dans du tampon phosphate (20 mM pH 6,9 + NaCl 1 mM + NaN<sub>3</sub> 1mM), placés dans un erlen de 100ml clos sous agitation (va-et-vient), on ajoute une quantité d'enzyme correspondant à 6,7  $\mu$ Kat.g<sup>-1</sup> amidon (ou 402 U.g<sup>-1</sup> amidon). Après une heure à 30 °C, un échantillon de la suspension est prélevé et centrifugé à 5 000 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant ainsi obtenu est chauffée à 100 °C pendant 5 min pour stopper la réaction, puis conservé à -20 °C avant analyse. Quelle que soit la préparation enzymatique utilisée, le principal produit formé est du

### Chapitre III Résultats

maltose (G2) avec du glucose (G1) et du maltotriose (G3), la spécificité des enzymes concernées correspond donc bien à celle d'une  $\alpha$ -amylase.

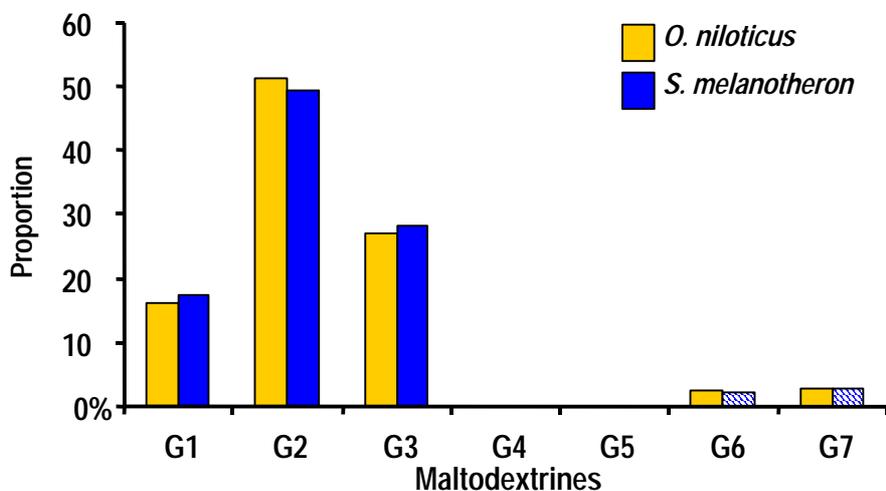


Figure III-21 Composition des produits d'hydrolyse formés en une heure par l'action des amylases de tilapia, *O. niloticus* et *S. melanotheron*, sur un amidon de maïs insoluble. G1, glucose ; G2, maltose ; G3, maltotriose ; G4, maltotetraose ; G5, maltopentaose ; G6, maltohexaose et G7, maltoheptaose.

#### III.2.3.2 TEMPÉRATURE ET PH OPTIMAUX

L'activité de chacune des fractions, AMY-I (B+A) et AMY-II (B), a été mesurée à différentes températures dans les conditions standards (tampon phosphate 20 mM, pH 6,9) en utilisant l'amylose comme substrat à la concentration saturante de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Pour les deux espèces de tilapias, les profils d'activité en fonction de la température sont très comparables (Figure III-22). La température optimale est d'environ 35 °C et l'activité totalement inhibée au delà de 55 °C. À 20 °C, en accord avec les conditions de vie de ces poissons, l'activité des amylases ne dépasse pas 40 % de la valeur maximale.

L'activité de chacune des isoformes a aussi été mesurée à différents pH et à 30 °C, dans les mêmes conditions que précédemment. Une gamme de pH, allant de 4 à 9, a été réalisée avec les tampons appropriés à la concentration de 20 mM : citrate/phosphate, pH 4 – 8 ; phosphate, pH 6 – 8 ; Tris, pH 6,5 – 9. Les profils obtenus sont très voisins et le pH optimal de 7,0, quelle que soit l'isoforme considérée (Figure III-23). À pH 5, les amylases des deux espèces considérées n'ont plus que 10 % de l'activité maximale, et à pH 8,5 environ 40 %.

## Chapitre III Résultats

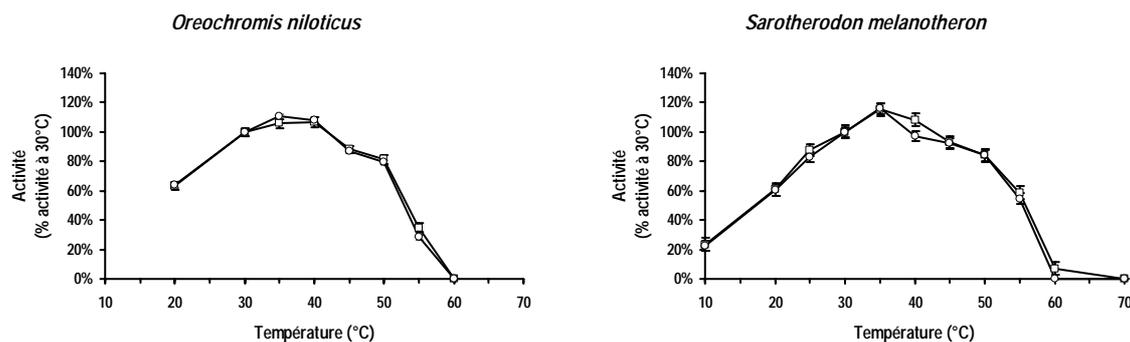


Figure III-22 Influence de la température sur l'activité des  $\alpha$ -amylases purifiées chez les deux tilapias étudiés. AMY-I (B+A), □ ; AMY-II (B), ○. Les activités sont exprimées en pourcentage de l'activité mesurée à 30 °C. Valeurs moyennes  $\pm$  SE.

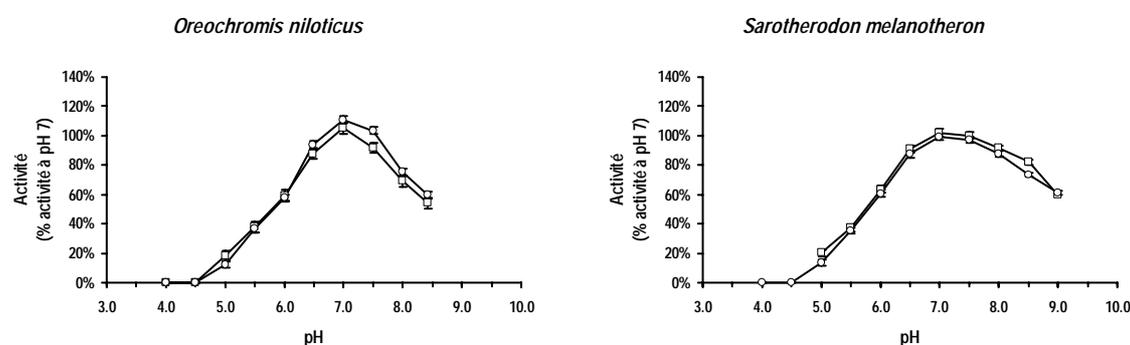


Figure III-23 Influence du pH sur l'activité des  $\alpha$ -amylases purifiées chez les deux tilapias étudiés. AMY-I (B+A), □ ; AMY-II (B), ○. Les activités sont exprimées en pourcentage de l'activité mesurée à 30 °C dans le tampon phosphate pH 7.

Entre les deux espèces, les différences observées sont réellement mineures, peut-être un optimum de température un peu plus marqué et d'une meilleure conservation de l'activité à pH 8,5 pour l'amylase de *S. melanotheron*. À la température de 35 °C et à pH 7, les conditions sont optimales pour l'activité des amylases des deux espèces de tilapia étudiées. Les conditions habituelles d'action de l'enzyme *in vivo* chez ces animaux poïkilothermes se situent plutôt entre 28 et 32 °C. Il n'y a vraisemblablement pas de différence entre les isoformes A et B de chaque espèce sur ce plan là non plus.

### III.2.3.3 ÉTUDE CINÉTIQUE ET INHIBITION PAR LES CYCLODEXTRINES

Pour chacune des deux espèces de tilapias étudiées, les paramètres cinétiques des amylases ont été déterminés en utilisant de l'amylose et de l'amylopectine comme substrat dans du tampon phosphate (20 mM pH 6,9) à 30 °C. Au moins huit concentrations en substrats comprises entre 0,05 et 1,6 g.L<sup>-1</sup> ont été utilisées chaque fois et, dans le cas de *S. melanotheron*, les mêmes tests ont été réali-

### Chapitre III Résultats

sés avec de l'amidon soluble. Le mélange des deux isoformes donne des valeurs de  $K_m$  de 0,16 à 0,45 g.L<sup>-1</sup> (Tableau III.24).

Tableau III.24  $K_m$  des amylases de tilapias vis à vis de ses substrats naturels.

Substrat	$K_m \pm SE$ (g.L <sup>-1</sup> )	
	<i>O. niloticus</i>	<i>S. melanotheron</i>
Amylose	0,16 (0,01)	0,20 (0,01)
Amylopectine	0,18 (0,02)	0,16 (0,01)
Amidon soluble	-	0,45 (0,04)

L'effet des  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines sur l'hydrolyse de l'amylose catalysée par les  $\alpha$ -amylases de tilapia a été étudiée dans du tampon phosphate (20 mM pH 6,9) à 30 °C, avec pour chaque cyclodextrine avec au moins huit concentrations de substrat, [S] comprises entre 0,05 et 1,6 g.L<sup>-1</sup>, et cinq concentrations de cyclodextrine, [I]. En considérant que le système atteint rapidement l'état d'équilibre, les vitesses initiales des réactions d'hydrolyses doivent suivre une équation du type :

$$v/[E_0] = k_{cat} [S] / (K_m(1+[I]/K_{i1})+[S](1+[I]/L_{i1}))$$

avec  $K_m$  et  $k_{cat}$ , les paramètres usuels du modèle de Michaelis-Menten, et  $K_{i1}$  et  $L_{i1}$ , les constantes respectives de dissociation des complexes enzyme-inhibiteur (EI) et enzyme-substrat-inhibiteur (ESI). Si l'équilibre est atteint, cette équation correspond à un modèle impliquant la formation de complexes abortifs ou à un modèle de type aléatoire (Figure III-24). Dans le cas du porc, le modèle aléatoire a pu être exclu car l'inhibiteur ne peut se fixer sur le site actif du complexe EI (Koukiekolo *et al* 1999). Même si aucune évidence ne permet de choisir entre les deux modèles, il est fort probable que l'amylase de tilapia se comporte comme celle de porc pour laquelle l'analyse aux rayons X du complexe EI montre la fixation de l' $\alpha$ -CD au site actif (Larson *et al* 1994).

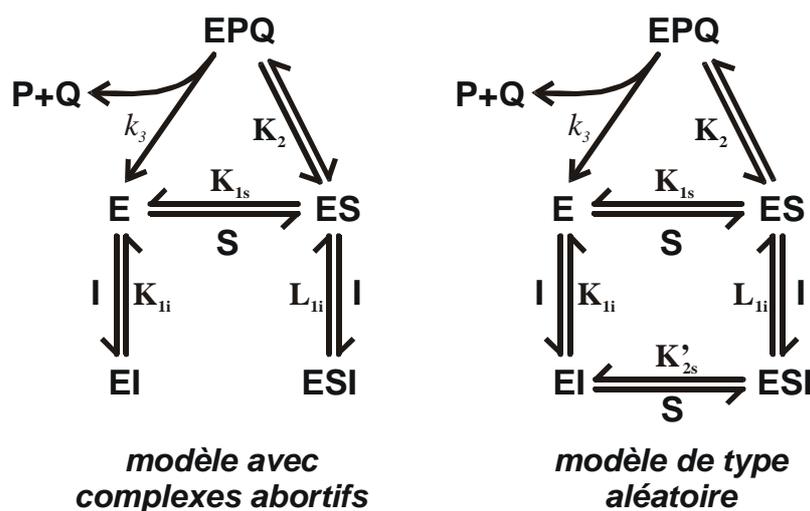


Figure III-24 Modèles d'action de l'enzyme sur le substrat en présence d'inhibiteur selon l'équation ci-dessus.

Pour l'analyse statistique, l'équation a été simplifiée en utilisant les constantes d'association des réactions correspondantes,  $K'_{1i}$  et  $L'_{1i}$ . L'utilisation de l'équation a permis un bon ajustement des résultats et aucune amélioration substantielle n'a été observée en supprimant des paramètres ou en utilisant une équation faisant intervenir des termes en  $[I]^2$ . Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour les deux amylases,  $k_{cat} = 1,20 \cdot 10^3 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 0,15 - 0,21 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$  pour *O. niloticus* et  $k_{cat} = 0,88 \cdot 10^3 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 0,16 - 0,25 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$  pour *S. melanotheron*, et les valeurs des constantes d'association  $K'_{1i}$  et  $L'_{1i}$  calculées pour chaque cyclodextrine (Tableau III.25).

Tableau III.25 Paramètres de l'hydrolyse de l'amylose par les amylases d'*O. niloticus* (*ONI*) et de *S. melanotheron* (*SME*) en présence de cyclodextrines. Erreurs standards entre parenthèses.

Inhibiteur	$K'_{1i}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )		$L'_{1i}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	
	<i>ONI</i>	<i>SME</i>	<i>ONI</i>	<i>SME</i>
$\alpha$ -CD	0,33 (0,04)	0,42 (0,07)	0,03 (0,01)	0,05 (0,01)
$\beta$ -CD	1,82 (0,21)	2,86 (0,52)	0,18 (0,03)	0,41 (0,09)
$\gamma$ -CD	5,52 (0,36)	6,23 (0,91)	0,27 (0,07)	0,64 (0,13)

D'une espèce à l'autre, les paramètres d'hydrolyse de l'amylose sont très proches, et aucune différence n'a été observée entre les paramètres obtenus avec l'amylose et l'amylopectine. Les trois cyclodextrines ont un effet inhibiteur sur l'hydrolyse de l'amylose par l'amylase de tilapia. Les para-

## Chapitre III Résultats

mètres d'inhibition dépendent de la nature des cyclodextrines, l'effet inhibiteur est positivement corrélé au degré de polymérisation des trois cyclodextrines testées ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD).

### III.2.3.4 DIGESTION *IN VITRO* DE DIFFÉRENTES SOURCES D'AMIDON D'ORIGINE TROPICALE

Par son abondance et son faible coût, l'amidon est une source d'énergie alimentaire de choix pour la plupart des animaux, mais l'efficacité de son utilisation alimentaire est étroitement dépendante de sa nature et de sa présentation (natif, gélatinisé, empois, etc.). Si la comparaison des résultats obtenus avec des substrats synthétiques n'a pas permis de mettre en évidence des différences fonctionnelles importantes entre les amylases des deux espèces de tilapia étudiées, il convient d'étudier leur comportement vis-à-vis de substrat naturel, l'amidon, et d'analyser les produits formés au cours de son hydrolyse. L'action des deux types d'amylase a donc été comparée pour les principales sources d'amidon disponibles dans les régions habituelles d'élevage des tilapias, la ceinture intertropicale.

#### *Matériel biologique*

Les tests de digestion *in vitro* ont été réalisés sur le mélange des deux isoformes d'amylases des tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*, avec trois sources différentes d'amidon n'ayant pas subi de traitement améliorant leur solubilité, un amidon de maïs pur et deux amidons d'origine tropicale, de l'amidon de manioc et de l'amidon de riz obtenus au Viêt-Nam. L'amidon de manioc correspond à une préparation artisanale résultant du séchage d'un extrait de tubercule de manioc broyé et pressé. La farine basse de riz correspond aux résidus de polissage des grains de riz après élimination du son et provient directement dans une usine de polissage du Delta du Mékong. Seule la partie la plus blanche a été prélevée afin d'avoir moins de fibres issues de l'enveloppe du grain et plus d'en endosperme, c'est à dire d'amidon. La teneur en amidon de chaque produit, déterminée à l'aide d'un kit enzymatique (cf. § II.3.3.1), et indiquée dans le tableau III.26.

Tableau III.26 Teneur en amidon des sources commerciales utilisées.

Source	Amidon (% matière sèche)
Amidon de maïs	99,6
Amidon de manioc	67,3
Farine basse de riz	54,5

### ***Conditions d'incubation***

La digestion *in vitro* a été faite dans les mêmes conditions que pour la détermination des produits d'hydrolyse (cf. § III.2.3.1), sur des suspensions d'amidon à 25 g.L<sup>-1</sup>. Des parties aliquotes de 250 µL ont été prélevées à 0h, 0h30, 1h, 2h, 3h40, 5h50, 9h et 24h. Des essais en présence de NaN<sub>3</sub> 10 mM en final ont permis de vérifier l'absence d'activité amylasique pouvant provenir d'un développement bactérien. Pour chaque échantillon, les contenus en groupement réducteurs, en résidus de glucose et en maltodextrines ont été déterminés (cf. § II.3.2).

### ***Efficacité d'hydrolyse***

Avec l'amidon de maïs cru et insoluble, l'hydrolyse des amylases a été suivie, en quantifiant, après centrifugation du milieu d'incubation hétérogène les groupements réducteurs et les résidus d'équivalents glucose solubilisés (Figure III-25). Les résultats sont exprimés en concentration et en pourcentage des quantités initiales d'amidon. Pour les résidus ou équivalents glucoses, les concentrations en produits solubles ont été rapportés à la masse d'amidon mise en suspension, alors que pour les réducteurs, les concentrations ont été rapportées au nombre total estimé de liaisons  $\alpha$ -(1→4) présentes dans l'amidon en début d'expérience. Cette estimation a été obtenue en assimilant l'amidon à un polymère anhydre simple de glucoses liés en  $\alpha$ -(1→4) selon la formule : nombre de liaisons  $\alpha$ -(1→4) = masse d'amidon (g) / (180-18). Ce mode de calcul conduit à une estimation par excès qui ne tient pas compte de la présence de structures ramifiées dans l'amidon, ni du nombre de molécules effectivement présentes. L'efficacité d'hydrolyse ainsi calculée aboutie donc à une estimation par défaut de l'efficacité d'hydrolyse réelle.

### Chapitre III Résultats

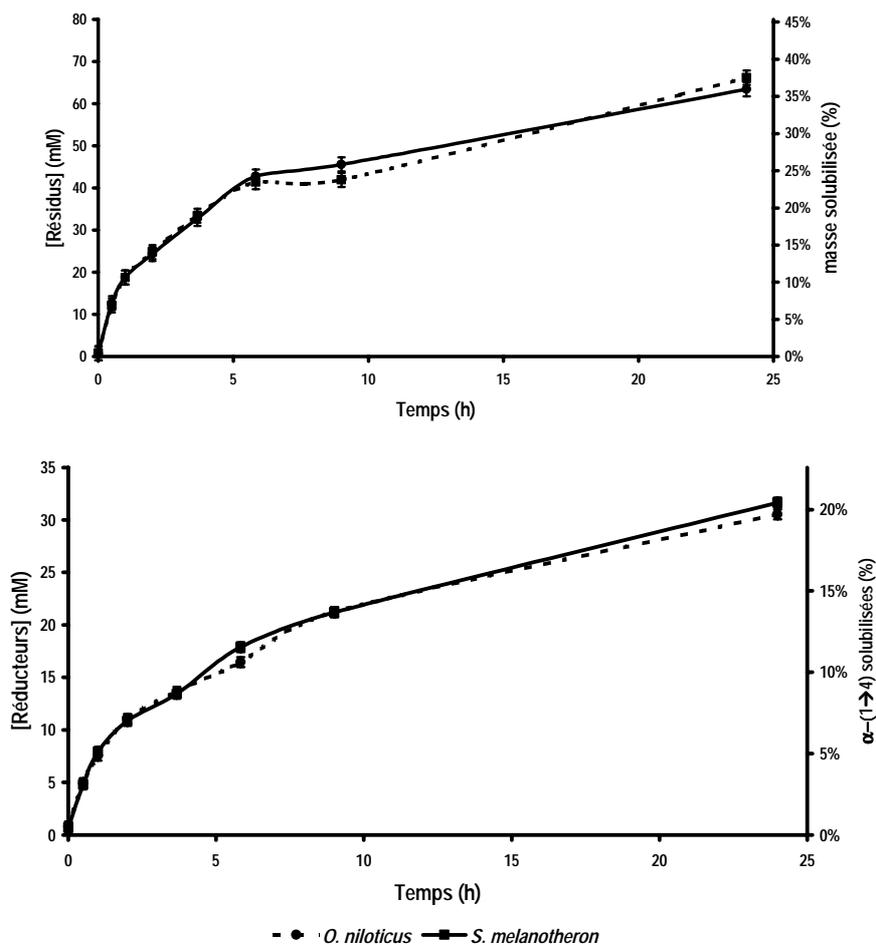


Figure III-25 Hydrolyse de l'amidon de maïs purifié par les amylases de tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Nombre de résidus, ou équivalents glucose (haut) et réducteurs (bas) libérés en solution. Suivi des concentrations et des pourcentages d'hydrolyse (cf. texte). Moyenne  $\pm$  IC (95 %).

Les quantités de produits solubles libérées par l'action des amylases ont rapidement augmenté durant les premières heures d'incubation, pour s'infléchir fortement après 9 heures. La même observation, parfois plus marquée, a aussi été faite avec les deux autres sources d'amidon. Au bout de 9 heures d'incubation, un bilan sur les produits d'hydrolyse a été fait pour chaque amidon (Tableau III.27). En absence d'enzyme, les produits solubles sont faibles à l'exception de ceux issus de la farine basse de riz. Le pourcentage d'hydrolyse dépend de la source d'amidon, mais l'action des  $\alpha$ -amylases de *O. niloticus* et *S. melanotheron* ne diffère pas de façon significative (Figure III-26). La meilleure hydrolyse est observée avec l'amidon de la farine basse de riz, alors qu'avec le manioc moins de 10 % de l'amidon est transformé en produits solubles. Le nombre des groupements réducteurs mis en solution représente, dans le meilleur des cas, près de 20 % du nombre total estimé de liaisons présentes dans les amidons. Près de la moitié du substrat restant sous forme insoluble, il est probable qu'une quantité

### Chapitre III Résultats

importante de groupements réducteurs ait échappé à l'analyse. Sous réserve qu'aucune hydrolyse n'ait eu lieu après libération des composés dans la phase soluble, le nombre de groupements réducteurs associés à la phase insoluble serait au plus égal au nombre de groupements apparus dans la phase soluble. Ces derniers représenteraient donc une estimation par excès du nombre de groupements réducteurs initialement présents dans la phase insoluble. Dans ces conditions, le nombre total initial de liaisons  $\alpha$ -(1→4) doit être corrigé, et l'estimation par excès du pourcentage de coupure devient :  $20 / (100 - (20 * 180 / 162)) = 26$  % des liaisons  $\alpha$ -(1→4) initialement présentes. Le nombre réellement observé de liaisons  $\alpha$ -(1→4) hydrolysées correspond donc à  $20 - 26$  % du total des liaisons initialement présentes, dans le meilleur des cas.

Tableau III.27 Quantité de réducteurs et de résidus (équivalents glucose) présents en solution après 9 heures d'incubation à 30 °C de trois origines d'amidon sous l'action des différentes sources d'amylases étudiées. Concentration  $\pm$  SE, et pourcentage du contenu initial mis en suspension.

Amidon	Source d'amylase					
	<i>O.niloticus</i>		<i>S.melanotheron</i>		Aucune	
<b>Réducteurs</b>						
	mM $\pm$ SE	%	mM $\pm$ SE	%	mM $\pm$ SE	%
Mais	21,2 $\pm$ 0,2	13,8	21,2 $\pm$ 0,2	13,7	-	-
Manioc	4,1 $\pm$ 0,2	2,7	3,6 $\pm$ 0,2	2,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,2
Riz	31,4 $\pm$ 0,2	20,4	31,6 $\pm$ 0,2	20,5	13,3 $\pm$ 0,2	8,6
<b>Résidus</b>						
	mM $\pm$ SE	%	mM $\pm$ SE	%	mM $\pm$ SE	%
Mais	45,6 $\pm$ 0,8	29,5	41,9 $\pm$ 0,8	27,2	0,6 $\pm$ 0,8	0,4
Manioc	13,5 $\pm$ 1,5	8,7	11,3 $\pm$ 1,5	7,3	8,6 $\pm$ 1,5	5,6
Riz	64,1 $\pm$ 1,5	41,5	74,7 $\pm$ 1,5	48,4	40,1 $\pm$ 1,5	26,0

#### *Nature des produits formés*

La composition en maltodextrines des produits solubilisés a été déterminée pour chaque type d'amidon, avant et après addition des amylases (Figure III-26). Avec l'amidon de maïs purifié, les quantités de produits solubles sont négligeables en absence d'enzyme. Pour les amidons de manioc et de riz, le principal composé présent dans la phase soluble en absence d'enzyme est le maltose, y compris dans le cas de l'amidon de manioc pour lequel la fraction solubilisée est très faible, soit 5,6 % après 9 heures d'incubation (Tableau III.27).

### Chapitre III Résultats

En présence d'enzyme, on trouve surtout en solution du glucose, maltose et maltotriose, et les différences observées les plus importantes sont davantage liées à la nature des amidons qu'à la source d'amylase. Pour tous les amidons, le maltose est le produit majeur d'hydrolyse apparaissant dans la phase soluble. Les teneurs relatives en glucose et en maltotriose évoluent avec le temps d'incubation, mais les variations sont plus limitées dans le cas du manioc. Avec les amidons de maïs et de riz, les quantités de maltotriose solubilisées diminuent au cours de l'incubation, alors que le phénomène inverse a été observé pour le glucose. Cette situation est plus évidente avec l'amidon de riz pour lequel la proportion de maltose est restée plus stable qu'avec l'amidon de maïs purifié. Après 9 heures d'incubation, la source d'amidon donnant les produits solubles les plus riches en glucose a été la farine basse de riz.

En absence d'enzyme, une variation importante de la teneur en sucres dans la phase soluble a été observée avec la farine basse de riz. Le traitement préalable à l'azoture de sodium éliminant l'hypothèse d'un développement bactérien, une activité amylasique intrinsèque est donc présente dans les farines. Avec la farine basse de riz, l'activité amylasique dosée dans la phase soluble a été très largement supérieure à celle observée avec l'amidon de manioc. L'activité amylasique de la farine basse de riz représente 70 % de celle aux amylases de tilapia au cours de la digestion *in vitro* (Tableau III.28).

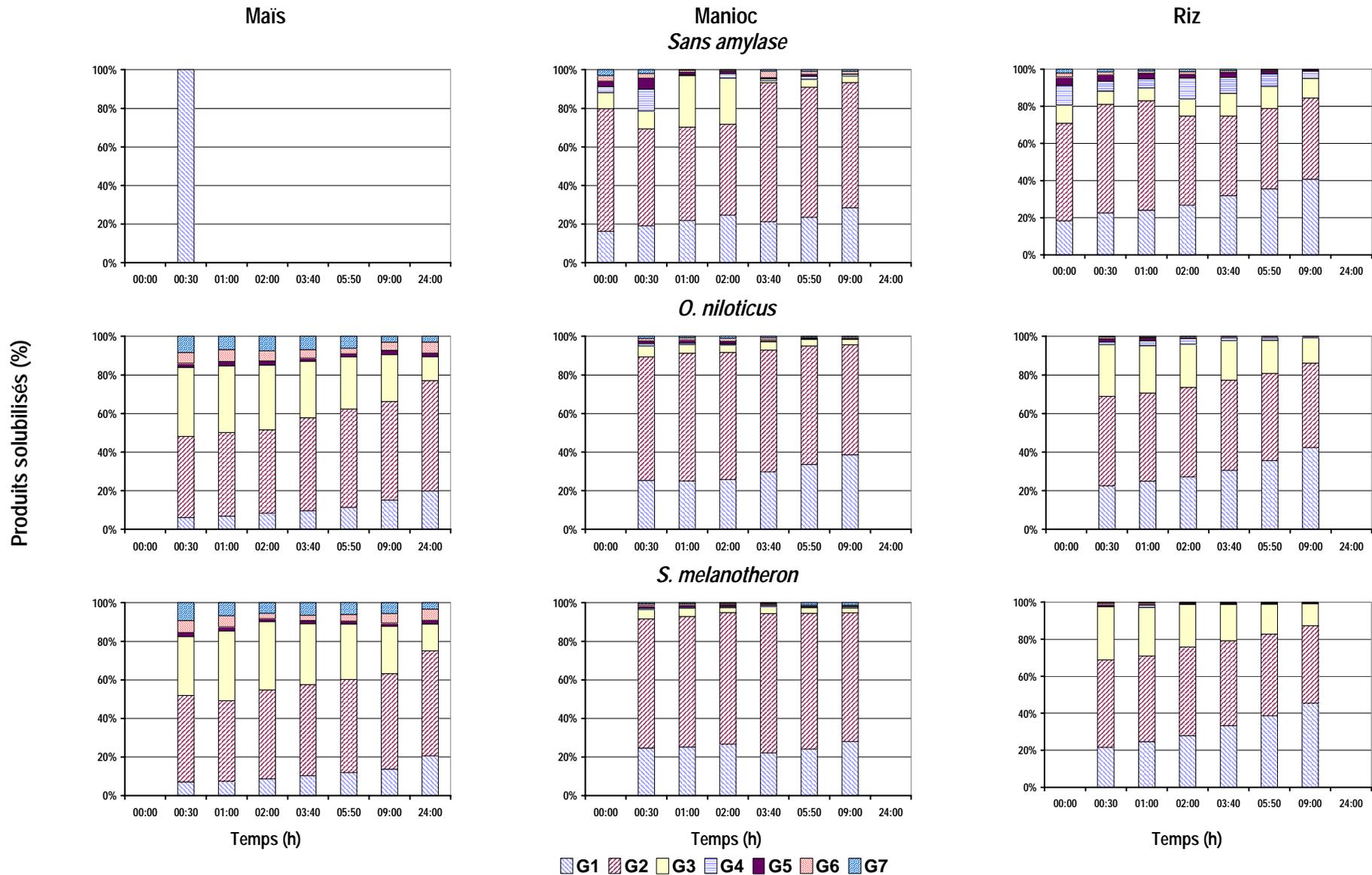


Figure III-26 Nature en maltodextrines des produits libérés en absence d'amylase ou sous l'action d'amylase de tilapias dans des suspension de maïs, de manioc et de riz. G1 : glucose, G2 : maltose, G3-G7 : maltotriose, -tétraose, -pentaose, -hexapose, -heptose.

### Chapitre III Résultats

Tableau III.28 Activité amylasique mesurée dans la phase soluble des suspensions réalisées à partir des deux sources d'amidons commerciales utilisées.

Activité	Source d'amidon		Unités
	Farine basse de riz	Amidon de manioc	
Totale	175	50	U.g <sup>-1</sup> de farine
Relative	70	16	% activité introduite

Les quantités de produits présents en solution ont donc été recalculées pour déterminer la part des produits effectivement libérée par l'action des amylases de tilapias (Figure III-27). Aucune différence sur la nature et la composition des produits formés n'a été observée entre les amylases des deux espèces de tilapia. Le maltose a été le principal produit d'hydrolyse formé à partir de l'amidon de manioc, la proportion de maltotriose libéré demeurant très faible. Pour la farine basse de riz, trois produits d'hydrolyse ont été formés avec par ordre d'importance, le maltose, le glucose et le maltotriose. Au cours de l'incubation, la proportion de maltotriose a diminuée au profit de celle en glucose. Pour chacune des deux sources d'amidon, une diminution des concentrations relatives a été observée pour les maltodextrines de degré de polymérisation supérieur à 3.

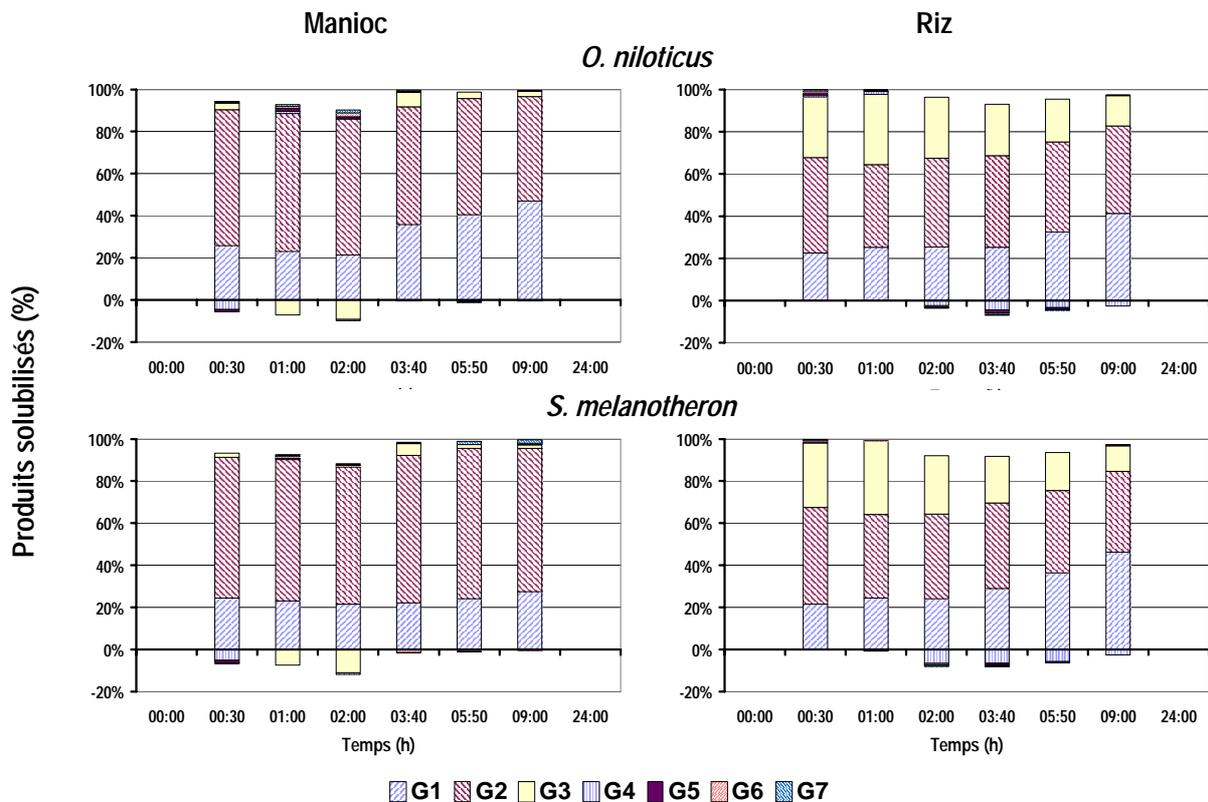


Figure III-27 Composition en maltodextrines des sucres solubles apparus suite à l'action des amylases de tilapia sur les deux types d'amidons commerciaux étudiés. Valeurs exprimées en pourcentage des sucres réducteurs totaux. Abréviations, voir Figure III-26.

### III.2.4 Adaptation au régime alimentaire

Dans le souci de déterminer l'importance du rôle des amylases dans la régulation de la digestion et de l'assimilation des amidons, des tests ont été réalisés pour vérifier si une réponse adaptative de l'enzyme à la composition du régime est observée chez le tilapia, *S. melanotheron*. L'objectif de l'étude concernant uniquement l'amylase, les essais ont été réalisés en maintenant les apports protéiques constants et en modifiant seulement les apports en amidon. Les tests ont été réalisés sur trois lots de 35 individus choisis au hasard (masse corporelle moyenne  $18,9 \text{ g} \pm 5,6$ ). Avant l'expérience proprement dite, les poissons ont été acclimatés aux structures et nourris avec un aliment commercial (Ecolife, Aquamer<sup>®</sup>, 46,8 % PB). Après une semaine, trois régimes ont été distribués : l'aliment de contrôle 'Ecolife', un aliment AM0/15 n'apportant que des protéines et pas d'amidon, et un aliment AM30/15 apportant une quantité d'amidon égale au double de celle en protéines. Tout au long de l'expérience, les rations, ajustées pour fournir  $15 \text{ g PB.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , ont été distribuées en deux repas quotidiens de masse équivalente à 8h00 et 17h00. Cinq poissons ont été prélevés avant la distribution du

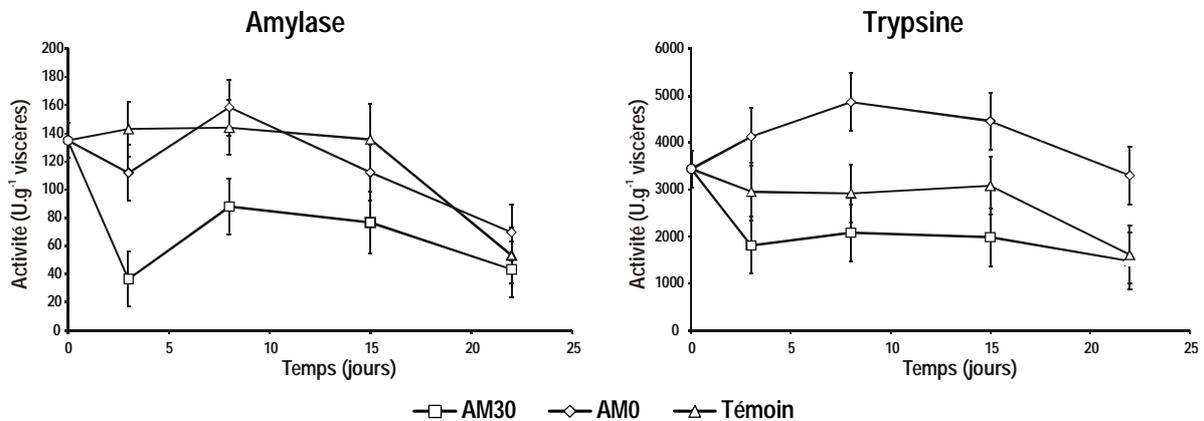


Figure III-28 Évolution des activités amylasiques et trypsiques présentes par g de viscères chez *S. melanotheron* après changement du régime alimentaire. Une unité correspond à une unité pNPG7 pour l'amylase et à l'hydrolyse d'une  $\mu\text{moles}$  de L-BApNA par minute pour l'activité trypsique.

premier repas le jour de l'application des nouveaux régimes (J0), puis 3, 8, 15 et 22 jours après (J3, J8, J15 et J22). À chaque échantillonnage, les poissons ont été anesthésiés, pesés individuellement et abattus. Le contenu abdominal de chaque poisson a été prélevé, pesé puis conservé à  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Avant analyse, les viscères ont été broyés à l'aide d'un Ultra-Turrax avec 5 mL d'eau. L'homogénat a été centrifugé (15 min, 8000 g,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) et le surnageant récupéré pour la détermination des activités amylasiques à

### Chapitre III Résultats

l'aide du kit pNPG7 et trypsiques par la méthode au BApNA. L'ensemble des données a été analysé en suivant un modèle d'analyse de variance avec les procédures MIXED et GLM du logiciel SAS/STAT (SAS Institute Inc. 1989). Les tests ont été réalisés avec un seuil de rejet de 5 %.

Aucune mortalité n'a été observée au cours de l'expérience, les poissons ont eu une croissance normale. Quel que soit le régime reçu, les activités amylasique et trypsiques mesurées dans les viscères sont très variables d'un jour à l'autre (Figure III-28). Aucune tendance particulière associée au temps n'a pu être discernable à partir du troisième jour, mais des variations par unité de masse corporelle des activités amylasique et trypsiques, liées au régime, ont pu être observées. Les activités amylasiques moyennes ont été significativement plus faibles chez les poissons recevant un régime sans amidon, AM0/15, mais aucune différence n'a été perceptible entre les animaux témoins et ceux nourris avec de l'amidon, AM30/15 (Figure III-29).

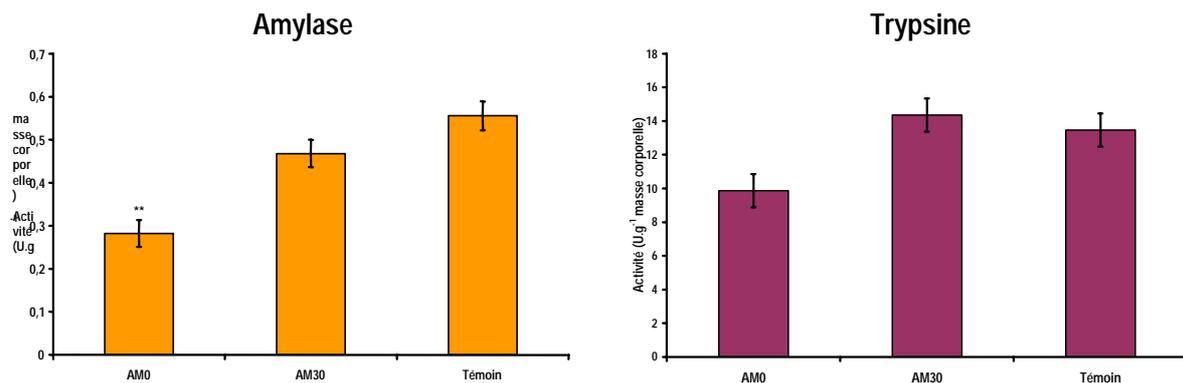


Figure III-29 Influence du régime alimentaire sur les activités amylasiques et trypsiques par unité de masse corporelle chez *S. melanotheron*. Une unité correspond à une unité pNPG7 pour l'amylase et à l'hydrolyse d'une  $\mu$ mole de L-BApNA par minute pour l'activité trypsi- que. Les astérisques indiquent les valeurs pour lesquels une différence significative ( $\alpha = 0,05$ ) a été observée.

## Chapitre IV DISCUSSION GÉNÉRALE

### IV.1 Études zootechniques

#### IV.1.1 La détermination des besoins énergétiques

Le premier protocole réalisé, dont l'objectif est de déterminer les besoins alimentaires en énergie pour chacune des espèces de poisson étudiées, a été défini sur la base de la distribution d'un aliment *totipotent* dans lequel l'essentiel des apports alimentaires en énergie est d'origine protéique. Cet aliment a permis de définir les conditions d'une alimentation de juvéniles de tambaqui, qui permet une croissance optimale et une accrétion protéique maximale. Le contenu en protéine de l'aliment n'étant pas limitant, le plafonnement observé des performances, pour le taux de rationnement le plus élevé, ne peut être lié à la régulation naturelle de la quantité maximale ingérée en fonction du contenu énergétique de l'aliment, habituellement observée chez le poisson (Boujard 1999). Le taux de rationnement le plus élevé n'a pas permis d'augmenter le rendement des protéines ingérées, mais a seulement induit une augmentation de l'accrétion lipidique, ce qui permet de conclure que les conditions maximales d'accrétion protéique ont été atteintes. Une ration plus importante, et de ce fait un apport énergétique supplémentaire, n'aboutirait qu'à une augmentation de la fixation lipidique et entraînerait une perte de rendement de l'aliment ingéré, notamment vis-à-vis des protéines. Dans ce protocole les conditions d'un rendement maximal avec une croissance optimale se sont trouvées réunies et ont donc permis d'estimer les besoins alimentaires en énergie des juvéniles de tambaqui.

Quelle que soit l'espèce de poissons étudiée dans ce travail, aucun effet négatif n'a été observé en liaison avec l'utilisation de l'aliment. Les taux de croissance obtenus ont été corrélés positivement avec la quantité d'aliment distribuée et sont comparables à ceux déjà mesurés sur les mêmes espèces ou des espèces voisines (Tableau IV.1). Si les informations disponibles sur les mêmes espèces ont été obtenues avec des aliments dont le contenu énergétique a été du même ordre que celui de l'aliment utilisé dans le présent travail (19,2 – 20,3 kJ.g<sup>-1</sup> EB), les expériences ont le plus souvent été réalisées avec des taux de rationnement *ad libitum*. Cette différence de méthode ne permet malheureusement pas de comparer les résultats en tenant compte des quantités d'aliments effectivement distribués. Hor-

## Chapitre IV Discussion générale

mis le tabaqui pour lequel des mesures n'ont pas été réalisées à taille strictement analogue, et la comparaison entre les deux silures africains, *H. longifilis* et *C. gariepinus*, les taux de croissance spécifiques en masse fraîche et en masse protéique publiés et ceux observés dans ce travail sont voisins.

Tableau IV.1 Taux de croissance spécifique en masse fraîche et en masse protéique observée chez les différentes espèces étudiées dans les conditions optimales de croissance. Les valeurs observées pour *C. gariepinus* sont donnés à titre indicatif pour comparaison avec les deux silures étudiés dans ce travail.

Espèce	Masse initiale (g)	Durée (jours)	TCS corporel (%.jour <sup>-1</sup> )	TCS protéique (%.jour <sup>-1</sup> )	Références
<i>C. macropomum</i>	2,0	28	6,7	6,8	<i>ce travail</i>
	1,0	44	7,4	8,2	233
	8,4	18	5,5	5,5	95
<i>O. niloticus</i>	8,9	21	4,1	4,8	<i>ce travail</i>
	8,0	49	3,3	-	111
<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	4,6	56	2,6	2,5	228
<i>S. melanotheron</i>	7,3	42	2,1	2,0	<i>ce travail</i>
<i>H. longifilis</i>	6,0	35	4,3	4,1	<i>ce travail</i>
<i>C. gariepinus</i>	6,8	28	6,9	7,2	102
<i>S. glanis</i>	8,5	35	3,6	4,0	<i>ce travail</i>

D'une espèce à l'autre, nourries avec un même aliment, les différences portent à la fois sur le taux de croissance spécifique en masse fraîche et celui en protéines. Pour les espèces considérées, la relation entre le taux de croissance spécifique en protéines et celui en énergie est quasiment linéaire (Figure IV-1). Ceci indique une augmentation concomitante de la masse protéique et de l'ensemble des dépôts énergétiques corporels. Les résultats de taux de croissance spécifique du contenu énergétique publiés sur les mêmes espèces ou des espèces voisines sont plus importants pour un même taux de croissance spécifique de la masse protéique. Cette différence ne peut être associée qu'à un dépôt d'énergie non-protéique plus important indiquant une mauvaise utilisation de l'énergie d'origine non-protéique fourni dans l'aliment (Luquet & Moreau 1989).

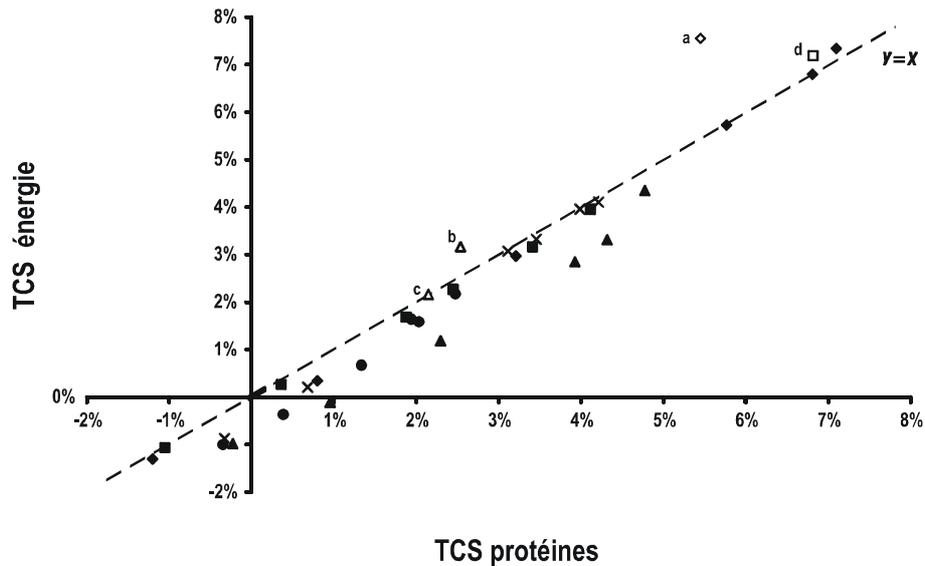


Figure IV-1 Relation entre le taux de croissance spécifique en protéines et en contenu énergétique observée pour chacune des espèces étudiées (motifs pleins) et décrite pour ces mêmes espèces ou des espèces voisines (motifs ouverts) : *C. macropomum* (losange), *O. niloticus* (triangle), *S. melanotheron* (rond), *H. longifilis* (carré) et *S. glanis* (croix). Données publiées pour : **a** *C. macropomum* (Hernández *et al* 1995), **b** *O. niloticus* x *O. aureus* (Tung & Shiau 1993), **c** idem (Chou & Shiau 1996) et **d** *C. gariepinus* (Hogendoorn 1983). La ligne médiane est la droite d'équation  $y=x$ .

L'utilisation d'un même aliment avec des taux de rationnements différents conduit à une modification des apports en vitamines, minéraux et acides gras essentiels qui peuvent limiter la croissance pour les taux de rationnement les plus faibles ou de lipides qui peuvent favoriser l'engraissement pour les taux de rationnement les plus importants. Chez un silure du Viêt-nam, un test a été réalisé en doublant ces apports pour un taux de rationnement correspondant à TR5, aucune différence significative entre la croissance et la fixation de protéines n'a été observée (Hùng 1999). Chez le tilapia du Nil, des altérations de la croissance associées à des apports lipidiques trop importants (env. 25 %) ont été mentionnées pour des apports en énergie alimentaire exclusivement constitués de protéines et de lipides (Shimeno *et al* 1993). La teneur en lipides (env. 12 %) de l'aliment utilisé dans ce travail peut paraître élevée et être à l'origine de l'augmentation de dépôts lipidiques pour les taux de rationnement les plus importants. Chez le tilapia hybride, *O. niloticus* x *O. aureus*, le contenu optimal de lipides conseillé pour l'aliment est de 12 % (Chou & Shiau 1996). Shimeno *et al.* (1993) n'ont observé de différence significative que pour des apports lipidiques plus élevés, environ 25 %, et il est donc peu probable que la teneur en lipides de l'aliment utilisé dans ce travail a eu un effet, alors qu'aucune chute de crois-

## Chapitre IV Discussion générale

sance n'a été observée aux taux de rationnement les plus importants. Les teneurs en micro-nutriments et en graisse de l'aliment utilisé dans cette expérimentation ne peuvent être à l'origine d'un biais dans les variations de croissance ou de dépôts lipidiques constatés chez les poissons, par contre le développement d'études portant sur le contrôle alimentaire des dépôts lipidiques nécessiterait l'utilisation d'un aliment composé à base de farine de poisson dégraissée.

La méthode utilisée ici repose sur l'utilisation des protéines comme seule source de substrat énergétique, mais doit néanmoins tenir compte de l'impact de ce choix sur les dépenses énergétiques associées à la prise d'aliment, c'est à dire l'extrachaleur. Si pour les Mammifères et les Oiseaux, l'extrachaleur est plus importante quand la quantité de protéines ingérée augmente, chez la truite cette dépense est beaucoup plus faible et aucune différence n'a été observée entre l'ingestion de protéines ou celle de glucides, seule l'ingestion plus importante de lipides a entraîné une diminution sensible de cette dépense (Smith *et al* 1978). Les résultats obtenus par cette méthode sont donc comparables à ceux qui ont pu être obtenus sur la base de la distribution d'un aliment de type commercial dont le contenu énergétique est fourni par un mélange de protéine, de lipides et de glucides, avec une teneur en lipides d'environ 10 %, telle que préconisée pour ces espèces (N.R.C. 1993). Des expérimentations analogues ont été réalisées sur des espèces de poissons d'eaux chaudes, le poisson-chat américain, le tilapia ou l'ombrine, *Sciaenops ocellatus* (Gatlin III *et al* 1986 ; Belal *et al* 1992 ; Mc Googan & Gatlin III 1998). Ces auteurs ont observé une réponse saturante en terme de dépôts protéique et énergétique chez les poissons. Utilisant un aliment avec un rapport protéino-énergétique convenable, ils ont abouti à une estimation des besoins en protéines et énergie en accord avec les valeurs préconisées pour ces espèces. Avec 958 kJ ED.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour des ombrines de 5,5 g, les données obtenues par McGoogan *et al.* (1998) sont comparables aux résultats obtenus dans le présent travail.

Toutes espèces confondues, les besoins alimentaires en énergie sont compris entre 900 et 1300 kJ EB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ou 850 et 1200 kJ ED.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, avec une contribution des protéines représentant 21 à 47 % de l'énergie digestible. Si les besoins énergétiques les plus importants sont obtenus pour le tambaqui dont le taux de croissance spécifique a été le plus élevé (7,10 %.jour<sup>-1</sup>), ces besoins diffèrent sensiblement entre des espèces dont les taux de croissances mesurés sont très proches, comme c'est le

cas du tilapia du Nil et des deux espèces de silure *H. longifilis* et *S. glanis*. Chez ces derniers, les taux de croissances spécifiques en masse protéique, sont du même ordre que pour le tilapia du Nil. Il semble donc, qu'à apport protéique équivalent, le rendement en protéines des silures soit meilleur que celui du tilapia. Entre les deux espèces de tilapia dont les taux de croissance diffèrent de près de 30 %, on constate logiquement une différence entre les besoins, mais seulement de 25 % alors que les différences de taux de croissance en masse protéique sont plus élevés. À croissance protéique équivalente les besoins énergétiques du tilapia du Nil sont plus faibles, ce qui se traduit notamment par une fixation moins importante de lipides corporels (Figure IV-2). D'une espèce à l'autre les besoins énergétiques semblent donc étroitement dépendants de leur rendement pour la fixation des protéines ingérées et de leur aptitude à fixer simultanément plus ou moins de graisses.

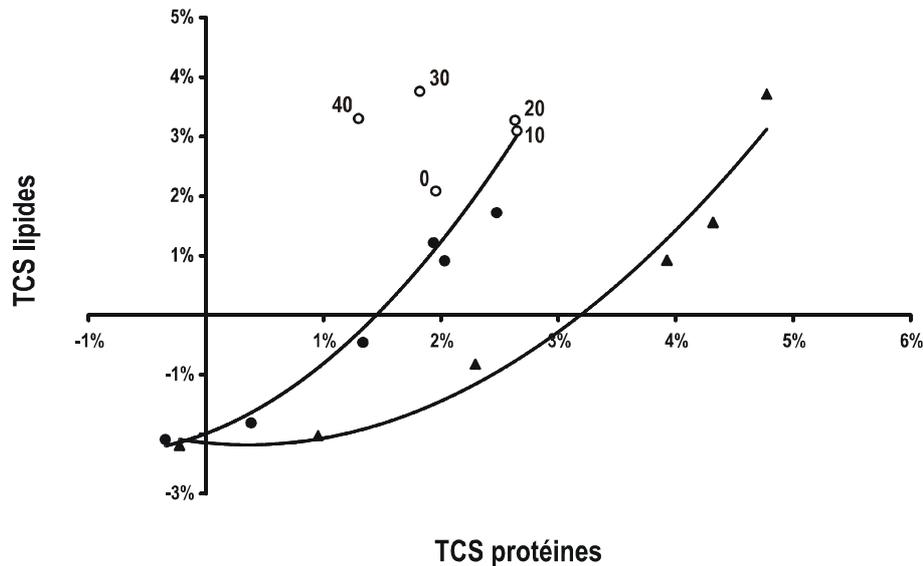


Figure IV-2 Relation observée entre taux spécifique de croissance le masse protéique et lipidiques chez le tilapias, *O. niloticus* (triangle) et *S. melanotheron* (cercle) avec une alimentation sans amidon (formes pleines) et avec amidon (formes creuses). Les nombres, 0 à 40, indiquent les apports en amidons ( $\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) correspondants à chaque point.

#### IV.1.2 Détermination des substrats métabolisables

L'analyse en calorimétrie indirecte a permis la détermination et la quantification des substrats énergétiques susceptibles d'être utilisés par les poissons. Pour les deux espèces étudiées, les protéines sont toujours utilisées pour la fourniture d'énergie, mais une utilisation apparente des glucides a aussi été observée. Pour l'atipa comme pour le tilapia, l'utilisation des glucides peut être associée à une

## Chapitre IV Discussion générale

synthèse apparente des lipides, car les quantités de carbone nécessaires à la synthèse de ces lipides sont très inférieures à celles correspondant aux glucides « consommés ». Ceci confirme la contribution active des glucides à la fourniture d'énergie et non une simple transformation de l'amidon ingéré en matière grasse. Pour le tilapia, la contribution des glucides est étroitement dépendante des apports alimentaires en lipides. Ces dernières observations indiquent l'existence, chez les poissons comme chez d'autres animaux, d'une relation étroite entre le métabolisme des glucides et celui des lipides. De telles interrelations ont été observées chez la carpe (Shimeno *et al* 1995), la truite (Brauge *et al* 1994) ou des hybrides de tilapias (Lin & Shiao 1995). Chez le tilapia du Nil comme chez d'autres espèces, l'activité des enzymes de la glycolyse est inversement corrélée au rapport lipides/glucides de l'aliment, mais aucun effet dépressif supplémentaire n'est observé avec des aliments exempt de glucides (Shimeno *et al* 1993). Les résultats obtenus chez *S. melanotheron* montrent une diminution de la contribution des glucides avec l'augmentation des lipides ingérés et une forte synthèse apparente de glucides quand aucun complément en lipides n'est présent dans l'aliment, en accord avec les observations de Shimeno et al. (1993). Pour *S. melanotheron* comme pour *O. niloticus*, les glucides peuvent constituer un substrat de choix pour la fourniture d'énergie, mais leur utilisation peut être fortement altérée quand les apports lipidiques sont trop élevés. L'effet négatif d'une alimentation trop riche en lipides n'a malheureusement pas pu être confirmé par notre étude.

À l'inverse de l'atipa, une partie de l'azote excrété par l'espèce, *S. melanotheron*, a été éliminée sous forme d'urée. Pour un autre tilapia du même genre, *S. mossambicus*, les quantités d'azote excrétées sous forme d'urée ont été estimées comme insignifiante (Brafeld 1985). Chez *O. niloticus*, Kaushik et al. (1995) prennent en compte l'urée dans l'estimation de l'excrétion azotée sans toutefois donner d'indication sur la proportion de l'urée dans le total de l'azote excrété. Pour *S. melanotheron*, l'urée représente, selon le régime reçu, entre 5 et 30 % de la quantité totale d'azote excrétée dans les 13-14 heures qui suivent la prise du repas. Si l'incidence de la formation d'urée sur la production d'énergie à partir du catabolisme protéique est négligeable (0,3 à 1,8 % de l'énergie produite), la non-prise en compte de l'urée dans le calcul des quantités de lipides oxydés peut par contre entraîner une erreur de 2 à 12 % qui est de l'ordre de la qualité des estimations que l'on peut attendre en utilisant la

méthode de la calorimétrie indirecte. Avec *S. melanotheron*, aucune tendance sensible n'a été observée entre la quantité d'urée excrétée et le régime, et donc la quantité de protéines qui a été reçue par l'animal. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées chez la truite, espèce pour laquelle le niveau d'excrétion de l'urée est indépendante des repas (Kaushik 1980), ou les résultats obtenus sur le flet (Kikuchi *et al* 1992).

### IV.1.3 Effet de l'incorporation d'amidon dans l'aliment

Les données de calorimétrie ont indiqué que les glucides peuvent être utilisés par le métabolisme oxydatif pour la production d'énergie, que ce soit chez l'atipa ou le tilapia. Les quantités utilisées sont très largement supérieures à celle de lipides qui a pu être synthétisée dans certains cas. Les glucides ingérés contribuent donc à la couverture des besoins énergétiques chez ces poissons.

L'addition d'amidon dans les apports alimentaires journaliers a permis d'augmenter la croissance des poissons recevant un apport fixe en protéines. Cet effet a été maximal avec des apports en amidon correspondant à  $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Au-delà, l'incorporation d'amidon dans la ration a eu des effets néfastes, qui se sont traduits par une diminution significative de la croissance, une augmentation importante de la proportion des lipides dans l'accroissement de masse et une altération des coefficients d'utilisation des protéines alimentaires. Par contre l'absence de modification dans l'utilisation des lipides alimentaires permet de conclure que l'augmentation du dépôt lipidique est principalement liée à la quantité d'amidon reçu. Des effets analogues de l'incorporation d'amidon dans l'aliment sur les dépôts lipidiques corporels ont été observés chez de nombreuses espèces d'eaux froides, mais aussi d'eaux chaudes comme les tilapias (De Silva *et al* 1991 ; Shiao & Chuang 1995), les silures (Hùng 1999) ou la carpe (Shimeno *et al* 1995). Cependant, ces observations peuvent être masquées par l'utilisation des lipides en substitution à l'amidon dans un régime isoprotéique (Erfanullah & Jafri 1998). Chez les larves de tilapias (460 mg), ce phénomène est beaucoup plus marqué avec une incorporation de glucides sous forme d'amidon que sous forme de glucose moins bien utilisé par le poisson (Tung & Shiao 1991). L'induction des enzymes de la lipogenèse a aussi été observée chez le tilapia et la carpe suite à l'ingestion de quantité croissante de glucides (Shimeno *et al* 1995).

## Chapitre IV Discussion générale

Sur l'ensemble des expériences de croissance réalisées chez les deux espèces de tilapias, des taux de croissance en masse protéique analogues ont été observés et comparés aux taux de croissance en lipides mesurés simultanément (Figure IV-2). À jeun, les pertes en protéines et lipides sont identiques pour les deux espèces, alors que chez les animaux nourris, les taux de croissances en protéines les plus élevés ont été obtenus avec *O. niloticus* et des taux identiques chez *S. melanotheron*, recevant ou non de l'amidon. En présence d'amidon dans la ration, le taux de croissance en lipides des *S. melanotheron* est plus important pour un même taux de croissance en protéines. Cependant, des apports en amidon limités à  $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , soit 87 % de l'énergie digestible fournie sous forme de protéines, permettent de maintenir un taux de croissance en protéines optimal analogue à celui observé avec l'aliment plus riche en protéines chez la même espèce.

Le choix de la qualité des protéines joue aussi un rôle primordial dans l'estimation des besoins en protéines. La fourniture d'une source de protéine de meilleure qualité peut conduire à une diminution sensible des besoins apparents, hormis les problèmes liés à des effets anti-nutritionnels connus comme pour le tourteau de soja. Chez *C. gariiepinnus*, Stibranyiová et Párová (1996) n'observent plus de différence de croissance entre deux régimes à 45 et 35 % de protéines brutes si, dans le dernier régime, la qualité des protéines est améliorée par un ajout d'acides aminés. Ainsi, la comparaison *sensu stricto* des résultats obtenus entre différentes expérimentations n'est possible que pour des expérimentations dans lesquelles les apports en protéines sont de même qualité.

Avec un apport constant en protéines, l'ajout d'amidon dans la ration a permis d'accroître les quantités de protéines fixées chez *S. melanotheron*. L'incorporation d'amidon dans la ration a donc un effet d'épargne protéique. Pour des apports en amidon limités, représentant 1,3 à 2 fois la quantité de protéines ingérées, l'amidon peut donc contribuer à l'amélioration de l'utilisation de l'aliment.

### ***IV.2 Comparaison des amylases de tilapias***

#### **IV.2.1 Purification et caractérisation**

Le protocole proposé a permis la purification des amylases pancréatiques chez deux espèces tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Le tissu pancréatique ne constituant pas un organe isolé,

## Chapitre IV Discussion générale

l'activité amylasique correspondant à l'enzyme secrétée par ce tissu a été extraite à partir de viscères de la cavité abdominale regroupant le tube digestif, le foie et la masse adipo-mésentérique péri-intestinale. Dans tous ces « organes », la nature des activités amylasiques correspond à celle observée dans la lumière intestinale. Dans le présent travail, aucune activité amylasique significative n'a été observée dans l'estomac de chacun des deux tilapias. Pour d'autres auteurs, une activité amylasique a été détectée dans l'estomac du tilapia, *O. mossambicus*, mais pas dans celui de la perche (Fish 1960 ; Nagase 1964). Chez *O. niloticus*, la purification de l'amylase aboutit à une molécule de plus petite taille que celle de l'intestin (Yamada *et al* 1996). Ces observations sur une amylase stomacale pourrait être dues à une contamination de la cavité de l'estomac par du suc intestinal en raison d'un moins bon isolement des cavités gastriques et intestinales chez ces espèces qui, pendant longtemps ont été considérées comme n'ayant pas d'estomac (Fänge & Grove 1979). L'enzyme amylasique décrite par Yamada *et al.* (1996) serait un produit d'hydrolyse partielle et toujours actif de l'amylase pancréatique secrétée dans l'intestin. La connaissance complète de la séquence de ces enzymes devrait permettre de conclure à cet égard.

Tableau IV.2 Tableau synoptique des principales caractéristiques des  $\alpha$ -amylases purifiées à partir des viscères de deux tilapias, *O. niloticus* et *S. melanotheron*.

Caractéristiques	<i>O. niloticus</i>		<i>S. melanotheron</i>	
	Isoforme A	Isoforme B	Isoforme A	Isoforme B
Masse moléculaire (kDa)	56,6		55,5	
pI	7,8	8,2	8,3	8,8

Deux formes d'activité amylasique d'origine pancréatique sont identifiables par isoélectrofo-calisation chez les deux espèces de tilapias étudiées. Cependant, aucune méthode de purification n'a permis un isolement irréversible de chacune de ces « isoformes ». Pour une même espèce, les isoformes ne sont différenciables ni par leur masse moléculaire ni par leur propriété hydrophobe en HPLC sur résine de C<sub>18</sub>. Le tableau IV.2 rassemble les caractéristiques structurales des amylases purifiées. La masse moléculaire des amylases de tilapia est voisine de celles des autres amylases animales (Marchis-Mouren & Paséro 1967 ; Buonocore *et al* 1977 ; Ferey-Roux *et al* 1998). Cependant le pI des amylases de tilapia est plus élevé (>7), alors que les amylases décrites à ce jour, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes ont dans l'ensemble un pI inférieur à 7 à l'exception d'une des isoformes

## Chapitre IV Discussion générale

de l'amylase pancréatique humaine. Le pH optimal des amylases de tilapia est de l'ordre du pH de la lumière intestinale. La température optimale est apparemment plus basse que celle trouvée chez le porc mais plus proche de la température de l'espèce *in vivo*.

Pour chacune des amylases, le produit d'hydrolyse est principalement le maltose qui apparaît en même temps que le glucose et le maltotriose. Le maltose n'étant pas le seul produit d'hydrolyse, ces amylases peuvent être considérées comme des  $\alpha$ -amylases, ce qui est confirmé par leur aptitude à réagir sur les substrats spécifiques de ces enzymes tels que ceux fournis dans les tests Sigma (Amylase Sigma Diagnostics N° 577) qui offrent des extrémités non réduites bloquées et inaccessibles aux  $\beta$ -amylases. Le profil en acides aminés des amylases de tilapia a été comparé à celui des amylases purifiées chez d'autres vertébrés, et par une analyse en composante principale sans tenir compte des teneurs préalablement décrites en cystéine et en tryptophane (Figure IV-3). Les amylases de tilapias se distinguent des autres amylases essentiellement par leur teneur en proline et en leucine. Si les teneurs en acide glutamique ou glutamine des amylases de tilapia sont élevées, comme pour les amylases pancréatiques de porc, les amylases de tilapias s'opposent à celles du porc par une plus faible teneur en arginine, tyrosine et phénylalanine.

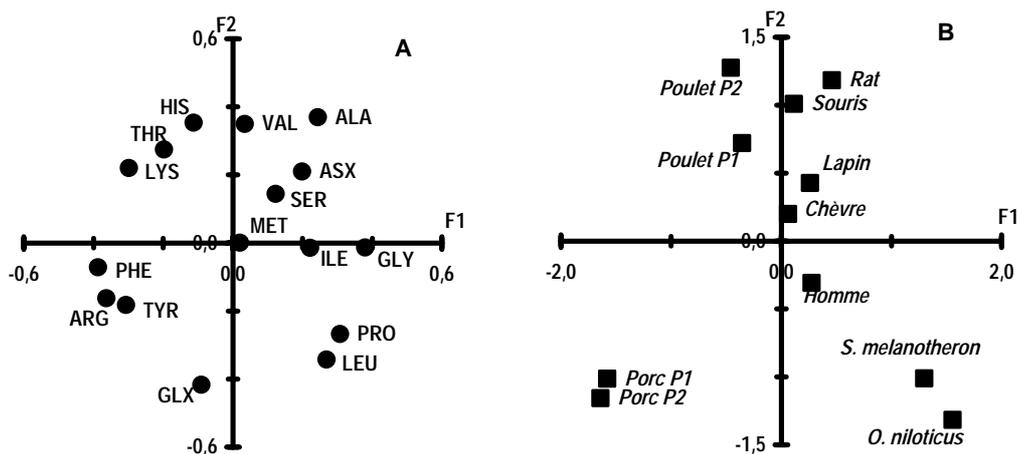


Figure IV-3 Comparaison des profils de composition en acides aminés des amylases de différents vertébrés par analyse en composante principale. Projection des variables (A) et des observations (B) sur les deux premiers facteurs représentant 64 % de la variance observée.

## Chapitre IV Discussion générale

Comme pour les amylases de porc et les amylases humaines, les  $\alpha$ -amylases de tilapia sont bloquées à leur extrémité N-terminale. Si aucune information n'est disponible pour ces dernières, il est probable que cette caractéristique soit liée à la même cause que celle retenue pour l'amylase pancréatique de porc, c'est à dire la présence d'un résidu pyroglutamique à l'extrémité N-terminale de la protéine (Darnis *et al* 1999).

Malgré toutes les tentatives réalisées, il n'a pas été possible d'isoler de façon définitive les deux isoformes de l'amylase des deux espèces de tilapias étudiées. Seules les isoformes ayant le pI le plus bas ont pu être isolées, et la comparaison des caractéristiques de ces formes pures au mélange des deux isoformes, n'a pas montré de différence en ce qui concerne la température et le pH optimal d'action. La même observation s'applique à l'analyse par spectrométrie de masse du mélange des deux isoformes, qui sont considérés comme étant des monomères, comme chez le porc. L'existence d'une éventuelle glycosylation peut être écartée ainsi qu'une protéolyse partielle lors de la purification.

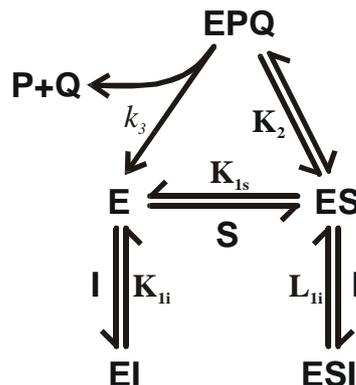
L'amidation des préparations d'amylase conduit à la disparition de l'isoforme A, ainsi qu'une perte des charges négatives associées aux groupements carboxyliques libres et donc une augmentation du pI des protéines. Ce fait est confirmé par les résultats obtenus avec les préparations d'amylase purifiée, montrant l'apparition d'isoformes de pI plus élevé que celui de l'isoforme B. Les formes multiples ainsi générées peuvent s'expliquer par des différences dans le nombre de groupements carboxyliques ayant effectivement réagi. Toutes ces formes sont encore plus ou moins actives sur l'amidon, contrairement à ce qui avait été déjà décrit (Kochhar & Dua 1984), probablement en raison des conditions expérimentales moins dures utilisées dans ce travail.

Le vieillissement de l'isoforme B se traduit par sa transformation en isoforme A, voire même l'apparition d'autres formes de pI plus bas. Que l'isolement de la fraction correspondant au pI le plus élevé soit réalisé par chromatofocalisation ou IEF, l'isoforme B conduit toujours à l'apparition de l'isoforme A. Ce phénomène semble « naturel » et produit de manière spontanée. Aucune transformation de l'isoforme A en isoforme B n'a pu être décelée. Ces observations sont en faveur de l'implication de processus aboutissant à une perte de charge positive, telle qu'une déamidation spontanée (Reubsæet *et al* 1998), lors de l'apparition des isoformes.

## Chapitre IV Discussion générale

Aucune information, cependant, n'a permis de retenir de manière formelle que l'existence des isoformes trouvées corresponde à une réalité *in vivo*. Si chez les poissons, aucune information précise n'est disponible, la présence de deux isoformes a été observée chez le porc (Marchis-Mouren & Paséro 1967), mais l'analyse des ARN messagers n'a permis de mettre en évidence qu'une seule forme codant pour l'amylase (Darnis *et al* 1999). L'existence d'isoformes n'est donc liée qu'à des modifications post-traductionnelles, comme l'amidation ou la décarboxylation de résidu d'acides aminés de la protéine. Les observations faites sur les amylases de tilapias sont apparemment en accord avec cette hypothèse.

L'équation qui permet le meilleur ajustement des résultats obtenus dans l'étude de l'hydrolyse de l'amylose et de l'inhibition de l'amylase de tilapia par les cyclodextrines correspond à un modèle simple ne faisant intervenir qu'une molécule d'inhibiteur.



L'effet des cyclodextrines sur l'hydrolyse de l'amylose correspond à une inhibition de type non-compétitif. L'effet inhibiteur dépend du degré de polymérisation des cyclodextrines avec par ordre d'importance l' $\alpha$ -CD (60 % à 5 mM) la  $\beta$ -CD (60 % à 1mM) et la  $\gamma$ -CD (50 % à 0,2 mM). Ces résultats sont du même ordre que ceux obtenus avec l'amylase pancréatique de porc (Koukiekolo *et al* 2001).

### IV.2.2 Digestion *in vitro* de l'amidon

La stabilité des amylases purifiées de tilapias a permis la réalisation d'un protocole de digestion *in vitro* avec un suivi sur 24 heures. Quelle que soit la source d'amidon, le produit d'hydrolyse

## Chapitre IV Discussion générale

apparaissant dans la phase soluble est majoritairement du maltose, mais avec des quantités non négligeables de glucose et de maltotriose. Ces observations confirment que les amylases purifiées dans cette étude sont bien des  $\alpha$ -amylases.

En l'absence de moyen permettant l'élimination des produits formés, la vitesse de la réaction d'hydrolyse *in vitro* s'infléchit fortement après 9 heures. Dans cette étude, la concentration en substrat a été saturante et la concentration en enzyme telle que l'équilibre de la réaction a été pratiquement atteint après 9 heures d'incubation. Dans les conditions saturantes, le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre ne dépend que du rapport de concentration entre l'enzyme et son substrat et, quel que soit ce rapport, les conditions de l'équilibre sont identiques, notamment le pourcentage d'hydrolyse de l'amidon. *In vivo* dans le contenu intestinal, la concentration substrat est toujours saturante (Dabrowski 1983). La quantité d'enzyme présente dans le tube digestif a été déterminée chez des poissons recevant  $30 \text{ g d'amidon.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , le rapport de concentration entre l'enzyme et le substrat est de l'ordre de  $2,19 \text{ U.mg}^{-1}$  d'amidon, soit plus de 5 fois le rapport utilisé dans l'étude *in vitro*. Si l'ensemble de l'amylase présente dans l'organisme est secrétée *in vivo*, le maximum d'hydrolyse de l'amidon contenu dans le tube digestif serait atteint en moins de 9 heures, ce qui est de l'ordre de l'évaluation du temps de transit mesuré chez le tilapia du Nil ou d'autres espèces de tropicales (Moreau 1988a ; Moreau 1996).

Dans l'expérience de digestion *in vitro*, où les produits formés ne sont ni éliminés ni transformés, le pourcentage d'hydrolyse observé à l'équilibre ne dépend pas de la concentration de l'enzyme, mais de la nature du substrat et de la concentration des produits formés. Entre les amidons de maïs et de manioc, l'hydrolyse à l'équilibre est plus importante avec le maïs, alors que les compositions relatives des produits formés sont différentes. Cependant, la concentration de chaque produit d'hydrolyse à l'équilibre est beaucoup plus faible avec le manioc qu'avec le maïs. La différence de pourcentage d'hydrolyse atteint à l'équilibre pour ces deux amidons ne peut être assimilée à la nature et à la quantité des produits formés mais plutôt à la nature du substrat. Des taux croissants d'hydrolyse ont été observés avec les amidons de farine basse de riz, de maïs et de manioc. Aucune différence significative n'a pu être trouvée entre les deux sources d'amylase et, bien que différentes par leur masse moléculaire,

## Chapitre IV Discussion générale

laire et vraisemblablement leur composition en acides aminés, ces deux enzymes ont donc des propriétés cinétiques très proches.

Avec l'amidon de la farine basse de riz, le taux d'hydrolyse à l'équilibre a été beaucoup plus important que pour les autres sources d'amidon. Cette observation a été associée à la mise en évidence d'une activité amylasique intrinsèque présente dans cette farine à l'état initial. Dans cette étude de digestion *in vitro*, la nécessité de ne pas altérer l'état de l'amidon n'a pas permis d'envisager un traitement permettant d'obtenir la suppression de l'activité résiduelle par dénaturation chimique ou thermique des enzymes responsables. Aucun test n'a donc pu être réalisé afin de déterminer le rôle de cette activité dans le déroulement de l'hydrolyse. Cependant, la farine basse de riz a toujours été considérée comme une matière première de bonne qualité permettant une bonne croissance des poissons par rapport à d'autres issues de céréales. Cette qualité particulière peut être associée à l'existence d'une activité amylasique intrinsèque dans le produit, ce qui en améliore l'utilisation digestive. Dans ce cas, les enzymes responsables de cette activité pourraient être considérés comme des facteurs probiotiques qui auraient la particularité de résister aux premières étapes de la digestion pour agir en synergie avec les amylases secrétées par le poisson. Une étude plus précise de ce phénomène serait souhaitable car elle pourrait permettre de définir des critères d'incorporation d'enzyme dans les aliments de poisson agissant comme probiotique dans le but d'en améliorer l'utilisation digestive.

### IV.2.3 Adaptation au régime

Dès le 3<sup>ème</sup> jour qui suit le changement de régime, les quantités d'amylases présentes dans les viscères de *S. melanotheron* sont le reflet de la modification des apports alimentaires. Ces observations sont en accord avec les résultats observés chez un autre tilapia, *O. mossambicus*, ou chez la carpe, *C. carpio* (Nagase 1964). Chez *S. melanotheron*, ce phénomène d'adaptation est plus rapide que celui observé chez d'autres animaux tel que le rat pour lequel le temps d'adaptation est d'au moins une semaine (Puigserver *et al* 1986). Chez la carpe, Kawai et Ikeda (1972) observent une adaptation dès le 5<sup>ème</sup> jour qui suit le changement d'aliment. Les résultats obtenus avec *S. melanotheron* sont aussi en accord avec le temps minimal d'adaptation à un nouveau régime d'une journée, requis pour la mesure des coefficients d'utilisation digestive chez le tilapia du Nil (Moreau 1996).

## Chapitre IV Discussion générale

Avec un régime alimentaire sans amidon, les quantités d'amylase produites par le tilapia ont été moins importantes. Aucune différence n'a pu être observée entre les animaux témoins et ceux recevant 30 g d'amidon.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Compte tenu de la composition des aliments, les apports en amidon diffèrent principalement entre le régime AM0 et les deux autres. Ainsi, l'absence de différence entre le régime AM30 et le régime témoin peut être liée à la similitude apparente des deux régimes quant à la quantité d'amidon fournie par chacun d'eux. Pour ce qui concerne l'adaptation de la production d'amylase en fonction du régime reçu, les observations réalisées sur *S. melanotheron* concordent avec celles obtenus chez d'autres animaux pour lesquels on observe une corrélation positive entre la teneur en amidon de l'aliment et la sécrétion ou la production d'amylase pancréatique. Pour les activités tryptiques, aucune différence associée au régime n'a pu être observée. Ce résultat n'est pas en accord avec les observations faites préalablement chez d'autres poissons pour lesquels l'augmentation de la teneur en protéine de l'aliment entraîne une augmentation de la sécrétion ou de la production de trypsine (Nagase 1964 ; Kawai & Ikeda 1972 ; Kawai & Ikeda 1973a ; Péres *et al* 1996). Dans cette étude, si la composition en protéines des aliments n'a pas été identique d'un régime à l'autre, les apports en protéines ont été maintenus constants quel que soit le traitement. Chez les autres animaux, tous les aliments ont été distribués à ration équivalente et l'apport protéique n'a donc pas été équivalent d'un régime à l'autre. L'adaptation de la production de trypsine pourrait donc être le reflet de la modification des apports en protéines plutôt que de la teneur en protéines dans les aliments. Des tests complémentaires devraient être réalisés afin de déterminer la part de l'effet de la composition en protéines de l'aliment et celle de l'apport protéique journalier dans la régulation de la production de trypsine par l'organisme.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les besoins énergétiques alimentaires ont pu être déterminés chez cinq espèces de poissons tropicaux sur la base de la fourniture d'un aliment totipotent dans lequel l'essentiel de l'énergie a été fourni sous forme de protéines. Toutes espèces confondues, les besoins alimentaires en énergie sont compris entre 900 et 1300 kJ EB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ou 850 et 1200 kJ ED.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Sur ces besoins, la contribution des protéines représente entre 20 et 40 % de l'énergie digestible fournie. Les différences entre les besoins alimentaires en énergie sont liées à la capacité de fixation de protéines de chaque espèce et à leur aptitude à fixer plus ou moins de graisse.

La méthodologie utilisée dans le présent travail pour déterminer les besoins énergétiques alimentaires repose notamment sur un impact très faible de la croissance sur la dégradation des acides aminés. Afin de pouvoir contrôler la pertinence de cette hypothèse, une étude pourrait être réalisée en mesurant dans des conditions différentes d'apports protéiques constant, l'impact de la croissance observée sur l'excrétion azotée.

L'utilisation de la technique de calorimétrie indirecte a permis de déterminer et de quantifier les substrats énergétiques utilisés par les poissons. Chez l'atipa, *H. littorale*, et le tilapia, *S. melanotheron*, les glucides alimentaires peuvent être utilisés par le métabolisme oxydatif pour la couverture des besoins énergétiques. Chez le tilapia, l'utilisation des glucides est étroitement dépendante des quantités de lipides ingérées.

L'incorporation d'amidon dans l'aliment du tilapia permet une augmentation significative de la fixation des protéines à apport en protéines alimentaires équivalents. L'amidon a un rôle d'épargne protéique chez cette espèce. Incorporé à l'aliment destiné aux tilapias, dans une proportion représentant 87 % de l'énergie digestible proposée sous forme de protéines, l'amidon permet de maintenir un taux de fixation optimal des protéines.

Chez chacune des deux espèces de tilapias étudiées, une  $\alpha$ -amylase a pu être purifiée à partir des organes de la cavité abdominale susceptibles de contenir du tissu pancréatique exocrine. Comme chez la plupart des espèces animales pour lesquelles les amylases pancréatiques ont pu être purifiées,

## Conclusion générale et perspectives

deux isoformes ont été trouvées chez les deux espèces. À l'exception de leur pI, aucune autre différence n'a pu être mise en évidence entre les isoformes. D'une espèce à l'autre, les propriétés des  $\alpha$ -amylases de tilapias sont très voisines. Elles se distinguent par leur masse moléculaire, leur pI et leur composition en acides aminés. Voisine de 55 kDa, la masse moléculaire des amylases de tilapias est très proche de celles des autres Vertébrés. Le pH optimal des amylases de tilapia est de l'ordre de celui de la lumière intestinale des poissons et comparable à celui des amylases pancréatiques de Mammifères. La température optimale est apparemment plus basse que chez le porc mais plus proche de la température *in vivo*.

Aucune information n'a permis de montrer de manière formelle que l'existence des isoformes observées en laboratoire par IEF ou par chromatofocalisation corresponde à une réalité physiologique, et les études ultérieures sur les  $\alpha$ -amylases de tilapias pourront être réalisées à partir de préparation renfermant les deux isoformes de chaque espèce.

Les études cinétiques réalisées sur les  $\alpha$ -amylases des deux tilapias ont donné les mêmes résultats. L'hydrolyse de l'amylose catalysée par les deux amylases est inhibée par les cyclodextrines au même degré. L'inhibition est de type non compétitif. L'effet inhibiteur des cyclodextrines est corrélé positivement à leur degré de polymérisation. Le comportement des  $\alpha$ -amylases de tilapias en présence de cyclodextrines est similaire à celui de l' $\alpha$ -amylase pancréatique de porc.

Le taux maximal d'hydrolyse des amidons de maïs et de riz par les amylases de tilapia est proche de 50 %. Cependant pour celui de manioc, l'extension du niveau d'hydrolyse reste très limitée. Une activité amylasique intrinsèque a été observée dans la farine basse de riz. Celle-ci, active dans les conditions physiologiques, peut contribuer à la bonne utilisation de ce type de denrée alimentaire par les poissons tropicaux.

Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les propriétés fonctionnelles des  $\alpha$ -amylases issues des deux espèces de tilapias, que ce soit dans le cas de l'hydrolyse de substrat purifié ou de l'amidon contenu dans des produits commerciaux destiné à l'alimentation.

## Conclusion générale et perspectives

Les tilapias comme les autres animaux, sont capables d'ajuster la production d'amylase en fonction de la quantité d'amidon fourni par l'aliment. Le processus est achevé en moins de trois jours. Cette régulation apparente indique que la production d'amylase digestive chez ces poissons est le produit de processus physiologiques associés à l'utilisation de l'amidon et que l'amylase ne peut être considérée comme un agent d'hydrolyse passif, non contrôlé par l'organisme. Pour la trypsine, la production d'enzyme par le poisson semble plus dépendante des apports protéiques journaliers que de la teneur en protéines de l'aliment.

Les besoins énergétiques alimentaires des poissons tropicaux peuvent être couverts pour partie par de l'amidon. Les limites d'utilisation de l'amidon correspondent plus à une adéquation des apports énergétiques aux besoins réels qu'à une limitation physiologique de ce substrat. L'origine de l'amidon a plus d'importance que l'espèce à laquelle il est destiné pour son utilisation comme source d'énergie alimentaire. Les tilapias sont dotés d'un équipement enzymatique ayant des propriétés proches de celui des Mammifères, qui permettant une bonne digestion de l'amidon ingéré.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abaurrea Equisoain MA, Ostos Garrido MV. 1996. Enterocytes in the anterior intestine of *Oncorhynchus mykiss*: Cytological characteristics related to osmoregulation. *Aquaculture* 139: 109-116.
2. Al Hussaini AH, Kholy AA. 1953. On the functional morphology of the alimentary tract of some omnivorous teleost fish. *Proc. Egypt. Acad. Sci.* 9: 17-39.
3. Al Kazaz M, Desseaux V, Marchis-Mouren G, Payan F, Forest E, Santimone M. 1996. The mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Kinetic evidence for two additional carbohydrate-binding sites. *Eur. J. Biochem.* 241: 787-796.
4. Al Kazaz M, Desseaux V, Marchis-Mouren G, Prodanov E, Santimone M. 1998. The mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. *Eur. J. Biochem.* 252: 100-107.
5. Alliot E, Febvre A, Métailler R. 1974. Les protéases digestives chez un téléostéen carnivore, *Dicentrarchus labrax*. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 14: 229-237.
6. Aminot A, Chaussepied M, Eds. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, France. 395 pp.
7. Arzel J, Metailler R, LeGall P, Guillaume J. 1998. Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162: 259-268.
8. Ásgeirson B, Bjarnason JB. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99B: 327-335.
9. Ásgeirson B, Fox JW, Bjarnason JB. 1989. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.* 180: 85-94.
10. Bastrop R. 1991. Biochemical adaptation of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) to food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 98A: 143-149.
11. Beirao LH, Mackie IM. 1994. Purification and partial characterization of trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod (*Gadua morhua*). *Arq. Biol. Tecnol.* 37: 763-773.
12. Belal IEH, Garling DL, Assem H. 1992. Evaluation of a practical tilapia feed using a saturation kinetic model. *Comp. Biochem. Physiol. A* 102: 785-790.

## Références bibliographiques

13. Benitez LV, Tiro LB. 1982. Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. Mar. Biol. 71: 309-315.
14. Bergmeyer J, Graßl M, eds. 1988 . Enzymes 3: peptidases, proteinases and their inhibitor, 3rd ed. Methods of enzymatic analysis vol. 5, Bergmeyer H-U, ed. in chief. VCH, Weinheim, Germany. 558 pp.
15. Bergot F, Brecque J. 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. Aquaculture 34: 203-212 .
16. Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivation. J. Chromatogr. 336: 93-104.
17. Bomgren P, Jonsson AC. 1996. Basal H-2-receptor stimulated and pH-dependent acid secretion from an isolated stomach mucosa preparation of the cod, *Gadus morhua*, studied using a modified pH-static titration method. Fish Physiol. Biochem. 15: 275-285.
18. Boujard T. 1999. Comportement alimentaire et régulation de l'ingestion. In: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 43-50.
19. Brafield AE. 1985. Laboratory studies of energy budgets. In: Fish Energetics: New Perspectives. Tytler P, Calow P, Eds. Croom Helm, London & Sydney. p 257-281.
20. Brauge C, Médale F, Corraze G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. Aquaculture 123: 109-120.
21. Brett JR. 1979. Environmental factors and growth. In: Bioenergetics and growth. Hoar WS, Randall DJ, Brett JR, Eds. Fish physiology vol. VIII, Hoar WS, Ed. Academic Press, New York. p 599-675.
22. Brett JR, Groves TDD. 1979. Physiological energetics. In: Bioenergetics and growth. Hoar WS, Randall DJ, Brett JR, Eds. Fish physiology vol. VIII, Hoar, W. S. , Ed. Academic Press, New York. p 279-352.
23. Bruslé J, González i Anadon G. 1996. The structure and function of fish liver. In: Fish morphology. Munshi JSD, Dutta HM, Eds. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India. p 77-93.
24. Buonocore V, Deponte R, Gramenzi F, Petrucci T, Poerio E, Silano V. 1977 . Purification and properties of alpha-amylase from chicken (*Gallus gallus* L.) pancreas. Mol. Cell. Biochem. 17: 11-6.

## Références bibliographiques

25. Caceci T, ElHabback HA, Smith SA, Smith BJ. 1997. The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions. *J. Fish Biol.* 50: 939-952.
26. Cahu CL, Zambonino Infante JL. 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.
27. Carter CG, Houlihan DF, Brechin J, Mccarthy ID. 1993. The relationships between protein intake and protein accretion, synthesis, and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Can. J. Zool.* 71: 392-400.
28. Cheftel J-C, Cuq J-L, Lorient D. 1985. Protéines alimentaires. Biochimie - Propriétés fonctionnelles - Valeur nutritionnelles - Modifications chimiques. Technique et documentation, Lavoisier, Paris. 309 pp.
29. Chiou JY, Ogino C. 1989. Digestibility of starch in carps. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41: 465-466.
30. Cho CY. 1993. Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. *In: Kaushik SJ, Luquet P, Eds. Fish nutrition in practice. VIth International Symposium on Finfish Nutrition. Les Colloques de l'INRA; Biarritz, France. Paris: INRA Editions. p 365-374.*
31. Cho CY, Kaushik SJ. 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.* 61: 132-172.
32. Chou BS, Shiau SY. 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 143: 185-195.
33. Clements KD, Choat JH. 1995. Fermentation in tropical marine herbivorous fishes. *Physiol. Zool.* 68: 355-378.
34. Cockson A, Bourne D. 1972. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 41A: 715-718.
35. Cockson A, Bourne D. 1973. Protease and amylase in the digestive tract of *Barbus paludinosus*. *Hydrobiologia* 43: 357-363.
36. Cowey CB. 1979. Protein and amino acid requirements of finfish. *In: Finfish nutrition and fishfeed technology. Halver JE, Tiews K, Eds. Heenemann Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg. p 3-16.*
37. Cowey CB, Luquet P. 1983. Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowance. *in. IVth Int. symp. protein metabolism and nutrition. Les colloques de l'INRA; Clermont Ferrand, France. Paris: INRA Éditions. p 365-384.*

## Références bibliographiques

38. Cowey CB, Sargent JR. 1972. Fish nutrition. *Adv. Mar. Biol.* 10: 383-492 .
39. Cowey CB, Sargent JR. 1979. Nutrition. *In: Fish Physiology. Fish Physiology vol. Tome VIII*, Hoar WS, Randall DJ, Eds. Academic Press, New York. p 1-69.
40. Creac'h PV. 1963. Les enzymes protéolytiques des poissons. *Ann. Nutr. Alim.* 17: A375-A471.
41. Croston CB. 1965. Endopeptidases of salmon ceca: chromatography separation and some properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 112: 218-223.
42. Dabrowski KR. 1983. Comparative aspects of protein digestion and amino-acid absorption in fish and other animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 417-425.
43. Darnis S, Juge N, Guo X-J, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Chaix J-C. 1999. Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1430: 281-289.
44. Dawson RMV, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM. 1986. *Data for biochemical research*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK. 580 pp.
45. De Groot SJ. 1971. On the interrelationships between morphology of the alimentary tract, food and feeding behaviour in flatfishes (Pisces : Pleuronectiformes). *Neth. J. Sea. Res.* 5: 121-196.
46. De Silva SS, Gunasekera RM, Shim KF. 1991. Interactions of varying dietary protein and lipid levels in young red tilapia - Evidence of protein sparing. *Aquaculture* 95: 305-318.
47. De Silva SS, Perera MK. 1985. Effects of dietary protein level on growth, food conversion, and protein use in young *Tilapia nilotica* at four salinities. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114: 584-589.
48. Dejours P. 1981. *Principles of comparative respiratory physiology*, 2nd ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, NL. 265 pp.
49. Delaage M. 1968. Sur la recherche du poids moléculaire le plus cohérent avec l'analyse des acides aminés d'une protéine. *Biochim. Biophys. Acta* 168: 573-575.
50. Dhage KP, Mohamed OMMJ. 1977. Study of amylase activity in mudskipper *Periophthalmus koelreuteri* (Pallas). *Indian J. Fish.* 24: 129-134.
51. Diaz JP, Maniponset L, Guyot E, Connes R. 1994. Assimilation of dissolved glucose from sea water by the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the sea bream *Sparus aurata*. *Mar. Biol.* 120: 181-186.

## Références bibliographiques

52. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 .
53. Dunn MJ. 1989. Electrophoretic analysis methods. *In: Protein purification methods.* Harris ELV, Angal S, Eds. The practical approach series, Rickwood D, Hames BD, Eds. IRL Press at Oxford University Press , Oxford. p 18-39.
54. Dygert S, Li LH, Florida D, Thoma JA. 1965. Determination of reducing sugar with improved precision. *Anal. Biochem.* 13: 367-374.
55. Eienthal R, Danson MJ, Eds. 1993. *Enzyme assays. A Practical approach .* IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 351 pp.
56. Elliott JM, Davison W. 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia* 19: 195-201.
57. Erfanullah, Jafri AK. 1998. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). *Aquaculture* 161: 159-168.
58. Eriksen N. 1945. Purification and properties of halibut pepsin [M.Sc. Thesis]. University of Washington, Seattle, USA.
59. Eshel A, Lindner P, Smirnoff P, Newton S, Harpaz S. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106: 627-634.
60. Etheridge RD, Pesti GM, Foster EH. 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Anim. Sci. Technol.* 73: 21-28.
61. Fänge R, Grove D. 1979. Digestion. *In: Bioenergetics and growth.* Hoar WS, Randall DJ, Brett JR, eds. *Fish physiology* vol. 8, Hoar WS, ed. Academic Press, New York, USA. p 161-260.
62. Farmer GJ, Beamish FWH. 1969. Oxygen consumption of *Tilapia nilotica* in relation to swimming speed and salinity. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26: 2807-2821.
63. Ferey-Roux G, Perrier J, Forest E, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Santimone M. 1998. The human pancreatic  $\alpha$ -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 10-20.
64. Ferraris RP, Ahearn GA. 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 77A: 397-413.

## Références bibliographiques

65. Fineman-Kalio AS, Camacho AS. 1987. The effect of supplemental feeds containing different protein:energy ratios on the growth and survival of *Oreochromis niloticus* (L.) in brackishwater ponds. *Aquacult. Fish. Manag.* 18: 139.
66. Fish GR. 1960. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch. *Hydrobiologia* 15: 161-178.
67. Flik G, Vandervelden JA, Dechering KJ, Verbost PM, Schoenmakers TJM, Kolar ZI, Bonga SEW. 1993. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus* - a review. *J. Exp. Zool.* 265: 356-365.
68. Flik G, Verbost PM. 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. *J. Exp. Biol.* 184: 17-29.
69. Fry FEJ. 1970. The effect of environmental factors on the physiology of fish. *In: The nervous system, circulation and respiration, Volume 4.* Hoar WS, ed. *Fish Physiology* vol. 4, Hoard WS, Randall DJ, eds. New York, USA, Academic Press. p 1-98.
70. Galis F. 1993. Interactions between the pharyngeal jaw apparatus, feeding behaviour, and ontogeny in the cichlid fish, *Haplochromis piceatus* - a study of morphological constraints in evolutionary ecology. *J. Exp. Zool.* 267: 137-154.
71. Gargiulo AM, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V. 1997. Ultrastructural study on the stomach of *Tilapia* spp (Teleostei). *Anat. Histol. Embryol.* 26: 331-336.
72. Gargiulo AM, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V. 1998. Histology and ultrastructure of the gut of the tilapia (*Tilapia* spp.), a hybrid teleost. *Anat. Histol. Embryol.* 27: 89-94.
73. Gargiulo AM, Dall'Aglio C, Tsoku Z, Ceccarelli P, Pedini V. 1996. Morphology and histology of the oesophagus in a warmwater tilapiine fish (Teleostei). *J. Appl. Ichthyol.* 12: 121-124.
74. Garling Jr. DL, Wilson RP. 1976. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerling, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.* 106: 1368-1375.
75. Garrido MVO, Torres MVN, Equisoain MAA. 1993. Lipid absorption by enterocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* - diet-induced changes in the endomembranous system. *Aquaculture* 110: 161-171.
76. Gas N, Noillac-Depeyre J. 1981. Structure de l'appareil digestif. I - Organisation, ultrastructure et fonction du tube digestif des Téléostéens d'eau douce. *In: Nutrition des poissons.* Fontaine M, Ed. CNRS, Paris. p 19-44.
77. Gas N, Noillac-Depeyre J. 1978. Types cellulaires de l'estomac, assurant la production du suc gastrique chez *Ameiurus nebulosus* L. *Biol. Cell.* 31: 81-190.

## Références bibliographiques

78. Gatlin III DM, Poe WE, Wilson RP. 1986. Protein and energy requirements of fingerling channel catfish for maintenance and maximum growth. *J. Nutr.* 116: 2121-2131.
79. Gaylord TG, Gatlin III DM. 2000. Dietary lipid level but not L-carnitine affects growth performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ X *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture* 190: 237-246.
80. Geiger R, Fritz H. 1988. Trypsin. *In: Enzymes 3: peptidases, proteinases and their inhibitor*, 3rd ed. Bergmeyer J, Graßl M, eds. *Methods of enzymatic analysis* vol. 5, Bergmeyer, H.-U., ed. in chief. VCH, Weinheim, Germany. p 119-128.
81. Gnaiger E. 1983. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. *In: Polarographic oxygen sensors*. Gnaiger E, Forstner H, eds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. p 337-345.
82. Gnaiger E. 1989. Metabolic microcalorimetry and respirometry of aquatic animals. *In: Techniques in comparative respiratory physiology: An experimental approach*. Bridges CR, Butler PJ, eds. Cambridge University Press, Cambridge. p 113-135.
83. Gnaiger E, Forstner H, eds. 1983. *Polarographic oxygen sensors*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 107 pp.
84. Goto T, Ui T, Une M, Kuramoto T, Kihira K, Hoshita T. 1996. Bile salt composition and distribution of the D-cysteinolic acid conjugated bile salts in fish. *Fisheries Science* 62: 606-609.
85. Guillaume J, Choubert G. 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments. *In: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés*. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 51-86.
86. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. 1999. *Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. Du labo au terrain*. INRA - IFREMER, Paris, France. 489 pp.
87. Guizani N, Rolle RS, Marshall MR, Wei CI. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 100B: 517-521.
88. Gunasekera RM, Shim KF, Lam TJ . 1996a. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 146: 121-134.
89. Gunasekera RM, Shim KF, Lam TJ . 1996b. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Aquaculture* 146: 245-259.

## Références bibliographiques

90. Guncaga J, Lentner C, Haas HG. 1974. Determination of chromium in feces by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chim. Acta* 57: 77-81.
91. Gutierrez J, Asgard T, Fabbri E, Plisetskaya EM. 1991. Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 351-360.
92. Halver JE, Ed. 1972. *Fish nutrition*. Academic Press, New York, USA.
93. Hart FL, Fisher HJ. 1971. *Modern food analysis*. Springer-Verlag, New York, USA. 519 pp.
94. Henken AM, Machiels MAM, Dekker W, Hogendoorn H. 1986. The effect of dietary protein and energy content on growth rate and feed utilization of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture* 58: 55-74.
95. Hernández M, Takeuchi T, Watanabe T. 1995. Effect of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. *Fisheries Science* 61: 507-511.
96. Herold MA, Hung SSO, Fynn-Aikins K. 1995. Apparent digestibility coefficients of carbohydrates for white sturgeon. *Prog. Fish-Cult.* 57: 137-140.
97. Hewik RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ. 1981. A gas-liquid solid phase and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256: 7990-7997.
98. Hirji KN, Courtney WAM. 1982. Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Biol.* 21: 615-622.
99. Hofer R. 1979. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L., and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L.: 1. Amylase. *J. Fish Biol.* 14: 565-572.
100. Hofer R, Schiemer F. 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia* 48: 342-345.
101. Hofer R, Schiestl W, Gattringer A, Ladurner H, Wieser W. 1975. Trypsin isozymes of some ectothermic vertebrates. *J. Comp. Physiol.* 101: 111-119.
102. Hogendoorn H. 1983. Growth and production of the african catfish, *Clarias gariepinus* (C.& V.). III. Bioenergetic relations of body weight and feeding level. *Aquaculture* 35: 1-17.
103. Hossain AM, Dutta HM. 1996. Phylogeny, ontogeny, structure and function of digestive tract appendages (caeca) in teleost fish. *In: Fish morphology. Horizon of new research*. Datta Munshi J. S., Dutta HM, Eds. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India. p 59-76.

## Références bibliographiques

104. Hùng LT. 1999. Contribution à l'étude de l'élevage larvaire et de la nutrition des juvéniles de deux poissons-chats du Mékong, *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) et *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) [Ph.D. Thesis]. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France. 161 pp.
105. Jany KD. 1976. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* (Bloch): endopeptidases. *Comp. Biochem. Physiol. B* 53: 445-556.
106. Jauncey K, Ross B. 1982. A guide to tilapia feeds and feeding. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland. 111 pp.
107. Karn RC, Malacinski GM. 1978. The comparative biochemistry, physiology, and genetics of animal  $\alpha$ -amylases. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.* 7: 1-103.
108. Kaushik SJ. 1980. Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1751-1765.
109. Kaushik SJ. 1995. Nutrient requirements, supply and utilization in the context of carp culture. *Aquaculture* 129: 225-241.
110. Kaushik SJ. 1999. Nutrition glucidique : intérêt et limites des apports glucidiques. *In: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés.* Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 171-186.
111. Kaushik SJ, Doudet T, Médale F, Aguirre P, Blanc D. 1995. Protein and energy needs for maintenance and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) . *J. Appl. Ichthyol.* 11: 290-296.
112. Kawai S, Ikeda S. 1971. Studies on digestive enzymes of fishes. I. Carbohydrases in digestive organs of several fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 37: 333-337.
113. Kawai S, Ikeda S. 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. II. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 38: 265-270.
114. Kawai S, Ikeda S. 1973a. Studies on digestive enzymes of fishes. III. Development of the enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in juvenile stage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 39: 819-823.
115. Kawai S, Ikeda S. 1973b. Studies on digestive enzymes of fishes. IV. Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. *Nippon Suisan Gakkaishi* 39: 877-881.

## Références bibliographiques

116. Keddiss MN. 1956. On the intestinal enzymes of *Tilapia nilotica* Boulenger. Proc. Egypt. Acad. Sci. 12: 21-37.
117. Kikuchi K, Takeda S, Honda H, Kiyono M. 1992. Nitrogenous excretion of juvenile and young Japanese flounder. Nippon Suisan Gakkaishi 58: 2329-2333.
118. Kochhar S, Dua RD. 1984. An active-site carboxyl group in liquefying  $\alpha$ -amylase: specific chemical modification. Biosci. Rep. 4: 613-619.
119. Koukiekolo R, Desseaux V, Moreau Y, Marchis-Mouren G, Santimone M. 2001. Mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase: Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins. Eur. J. Biochem. 268: 841-848.
120. Koukiekolo R, Le Berre-Anton V, Desseaux V, Moreau Y, Rouge P, Marchis-Mouren G, Santimone M. 1999. Mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. Eur. J. Biochem. 265: 20-6.
121. Koven WM, Henderson RJ, Sargent JR. 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*). 1. Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. Fish Physiol. Biochem. 13: 69-79.
122. Kramer DL, Bryant MJ. 1995a. Intestine length in the fishes of a tropical stream. 1. Ontogenetic allometry. Environ. Biol. Fish. 42: 115-127.
123. Kramer DL, Bryant MJ. 1995b. Intestine length in the fishes of a tropical stream. 2. Relationships to diet - The long and short of a convoluted issue. Environ. Biol. Fish. 42: 129-141.
124. Kramer DL, Lindsey CC, Moodie GEE, Stevens ED. 1978. The fishes and aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. Can. J. Zool. 56: 717-729.
125. Kritjansson MM. 1991. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Agric. Food Chem. 39: 1738-1742.
126. Kritjansson MM, Nielsen HH. 1992. Purification and characterization of two chymotrypsin-like proteases from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. B 101B: 247-253.
127. Krzyzosiak J, Daniel RM. 1997. Isolation and characterisation of two chymotrypsins from *Alloctytus niger* (black oreo dory) viscera. NZ J. Mar. Freshwat. Res. 31: 497-504.
128. Kurokawa T, Suzuki T. 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): Immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. J. Fish Biol. 46: 292-301.

## Références bibliographiques

129. Kurokawa T, Suzuki T. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 141: 267-276.
130. Kurokawa T, Suzuki T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 162: 113-124.
131. Kurokawa T, Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. 1996. Absorption of protein molecules by the rectal cells in eel larvae *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 62: 832-833.
132. Kuzmina VV. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture* 148: 25-37.
133. Lacks SA, Springhorne SS. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255: 7467-7473.
134. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
135. Larson SB, Greenwood A, Cascio D, Day J, Mc Pherson A. 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 235: 1560-1584.
136. Le Bail PY, Sire MF, Vernier JM. 1989. Intestinal transfer of growth hormone into the circulatory system of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Interference by granule cells. *J. Exp. Zool.* 251: 101-107.
137. Léger C. 1981. Enzymologie digestive. I. La lipase pancréatique. *in*: Fontaine M, ed. *Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERNA*; Paris. Paris: Editions du CNRS. p 69-77.
138. Legouis P. 1873. Recherche sur les tubes de Weber et sur le pancréas des poissons osseux. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 17 & 18.
139. Legrow SM, Beamish FWH. 1986. Influence of dietary protein and lipid on apparent heat increment of feeding of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 19-25.
140. Lesel R. 1981. Microflore bactérienne du tractus digestif Fontaine M, ed. *Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERMA*; Paris. Paris: Editions du CNRS. p 89-99.
141. Li MH, Robinson EH. 1998. Effects of supplemental lysine and methionine in low protein diets on weight gain and body composition of young channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 163: 297-307.
142. Likongwe JS, Stecko TD, Stauffer JR, Carline RF. 1996. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture* 146: 37-46.

## Références bibliographiques

143. Lin JH, Shiau SY. 1995. Hepatic enzyme adaptation to different dietary carbohydrates in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish Physiol. Biochem. 14: 165-170.
144. Lloyd LE, McDonald BE, Crampton EW. 1978. Fundamentals of nutrition. W.H.Freeman and Company, USA San Francisco.
145. Luquet P, Moreau Y. 1989. Energy - protein management by some warmwater finfishes. *In*. Advances in tropical aquaculture. Actes de Colloques; Tahiti. Paris: AQUACOP, IFREMER. p 751-755.
146. Mambrini M, Guillaume J. 1999. Nutrition protéique. *In*: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 113-146.
147. Marchis-Mouren G, Paséro L . 1967. Isolation of two amylases in porcine pancreas. Biochim. Biophys. Acta 140: 366-368.
148. Marcotte G, de la Noüe J. 1984. *In vitro* intestinal absorption of glycine and L-alanine by rainbow trout, *Salmo gairnderi*. Comp. Biochem. Physiol. 79A: 209-213.
149. Masser MP, Grant WE, Neill WH, Robinson EH. 1991. A simulation model representing effects on dietary energy protein ration and water temperature on growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Ecol. Model. 54: 17-35.
150. Mc Googan BB, Gatlin III DM. 1998. Metabolic requirements of red drum, *Sciaenops ocellatus*, for protein and energy based on weight gain and body composition. J. Nutr. 128: 123-129.
151. Médale F. 1999. Nutrition énergétique. *In*: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R, eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 87-112.
152. Médale F , Kaushik SJ. 1989. Energy utilization by farmed siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) from 3 age classes. Williot P, Ed. Proceedings of the first international symposium on sturgeon; Bordeaux, France. p 13-23.
153. Mercer LP. 1982. The quantitative nutrient-response relationship. J. Nutr. 112: 560-566.
154. Métailler R, Guillaume J. 1999. Matières premières et additifs utilisés dans l'alimentation des poissons. *In*: Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. Guillaume J, Kaushik SJ, Bergot P, Métailler R , eds. Du labo au terrain. INRA - IFREMER, Paris, France. p 345-364.

## Références bibliographiques

155. Meyer-Burgdorff KH, Rosenow H . 1995. Protein turnover and energy metabolism in growing carp. 2. Influence of feeding level and protein:energy ratio. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 73: 123-133.
156. Moitra SK, Das KM. 1967. Influence of environment on the digestive enzymes of a fish, *Tilapia mossambica* (Peters). *Curr. Sci.* 36: 381-382.
157. Møller HJ, Poulsen JH. 1996. Staining of glycoproteins/proteoglycans on SDS-gels. *In: The protein protocols handbook.* Walker JM, ed. Humana Press Inc., Totowa, N.J. p 627-631.
158. Mommsen TP, Plisetskaya EM. 1991. Insulin in fishes and agnathans - History, structure, and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.* 4: 225-259.
159. Moreau Y. 1988a. Physiologie de la nutrition. *In: Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains.* Lévêque C, Bruton MN, Ssentongo GW, eds. Editions de l'ORSTOM, Paris. p 137-152.
160. Moreau Y. 1988b. Physiologie de la respiration. *In: Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains.* Lévêque C, Bruton MN, Ssentongo GW, eds. Editions de l'ORSTOM, Paris. p 113-135.
161. Moreau Y. 1996. Measurement of the apparent digestibility coefficients for *Oreochromis niloticus* of agro-industrial by-products available in Côte d'Ivoire. *in: Pullin RSV, Lazard J, Legendre M, Amon-Kothias JB, Pauly D, eds. The third international symposium on tilapia aquaculture. ICLARM Conference Proceedings; Abidjan, Côte d'Ivoire .* p 204-210.
162. Moreau Y, Médale F, Boujard T, Luquet P. 1991. Indirect calorimetry method to study energy metabolism of an air-breathing fish, *Hoplosternum littorale* (Siluriform, Callichthyidae). *J. Aquacult. Trop.* 6: 193-199.
163. Morgan JD, Sakamoto T, Grau EG, Iwama GK. 1997. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 117: 391-398.
164. Moriarty DJW. 1973. The physiology of digestion of blue green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *J. Zool., L.* 171: 25-39.
165. N.R.C. 1983. Nutrients requirements of warmwater fishes and shellfishes. National Academy Press, New York. 102 pp.
166. N.R.C. 1993. Nutrients requirements of fish. National Academy Press, New York, USA. 114 pp.

## Références bibliographiques

167. Nagase G. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitsch. Vergl. Physiol.* 49: 270-284.
168. Naguib M. 1958. On the structure of the pancreas in *Tilapia nilotica* Boulenger. *Zoologischer Anzeiger* 161: 47-54.
169. Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Luchbenko J, Mooney H, Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.
170. Niederholzer R, Hofer R. 1979. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach *Rutilus rutilus* L., and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. cellulase. *J. Fish Biol.* 15: 411-416.
171. Norris ER, Elam DW. 1940. Preparation and properties of crystalline salmon pepsine. *J. Biol. Chem.* 134: 443-454.
172. Norris ER, Mathies JC. 1953. Preparation and properties of tuna pepsine. *J. Biol. Chem.* 204: 673-686.
173. Oteng-Gyang K. 1979. Étude de levures amylolytiques en vue de production de protéines d'organisme unicellulaires. [Ph.D. Thesis]. Université de Montpellier II, Montpellier, France. 120 pp.
174. Overnell J. 1973. Digestive enzymes of the pyloric caeca and of their associated mesentery in the cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 46: 519-531.
175. Péres A, Cahu CL, Zambonino Infante JL, LeGall MM, Quazuguel P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15: 237-242.
176. Pérès G. 1981. Enzymologie digestive. I. Les protéases - l'amylase - les enzymes chitinolytiques - les laminarinases. *In*: Fontaine M, ed. *Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERMA*; Paris. Paris: Editions du CNRS. p 55-67.
177. Pfeffer E. 1995. Carbohydrate utilization and its determination. *J. Appl. Ichthyol.* 11: 175-182.
178. Piavaux A. 1977. Distribution and localisation of the digestive laminarinases in the animals. *Biochem. System. Ecol.* 5: 231-239.
179. Podoskina TA, Podoskin AG, Bekina EN. 1997. Efficiency of utilization of some potato starch modifications by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 152: 235-248.

## Références bibliographiques

180. Puigserver A, Wickler C, Gaucher C. 1986. Adaptation of pancreatic and intestinal hydrolases to dietary changes. *In: Molecular and cellular basis of digestion.* Desnuelle P, Sjöström H, Norén O, eds. Elsevier, Amsterdam. p 113-124.
181. Rana KJ. 1997. Aquatic environments and use of species groups. *In: FAO, Review of the state of world aquaculture.* Rome: FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division . FIRI/C886(Rev.1) . 163pp.
182. Rauscher E, Bulow S, Hägele EO, Neumann U, Schaich E. 1986. Ethylidene protected substrate for the assay of human  $\alpha$ -amylase. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 324: 304.
183. Reshkin SJ, Grover ML, Howerton RD, Grau EG, Ahearn GA. 1989. Dietary hormonal modification of growth, intestinal ATPase, and glucose transport in tilapia. *Am. J. Physiol.* 256: E610-E618.
184. Reubsaet JLE, Beijnen JH, Bult A, van Maanen RJ, Marchal JAD, Underberg WJM. 1998. Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17: 955-978.
185. Robbins KR, Norton HW, Baker DH. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutr.* 109: 1710-1714.
186. Robertson DR. 1993. Comparative aspects of intestinal calcium transport in fish and amphibians. *Zoolog. Sci.* 10: 223-234.
187. Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* 167: 290-294.
188. Robinson EH, Lovell RT. 1986. Nutrition and feeding of channel catfish (Revised). Southern Cooperative Series Bulletin. vol. 296. Southern Cooperative, USA. 56 pp.
189. Robinson EH, Wilson RP, Poe WE. 1980. Re-evaluation of the lysine requirement and lysine utilization by fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 110: 2313-2316.
190. Roubach R, Saint-Paul U. 1994. Use of fruits and seeds from Amazonian inundated forests in feeding trials with *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). *J. Appl. Ichthyol.* 10: 134-140 .
191. Rumsey GL. 1994. History of early diet development in fish culture, 1000 B.C. To A.D. 1955. *Prog. Fish-Cult.* 56: 1-6.
192. Saad CRB. 1989. Carbohydrate metabolism in channel catfish [Ph.D. Thesis]. Auburn University, Auburn, AL, USA. 69 pp.
193. Sabapathy U, Teo LH. 1994. Some kinetics properties of amylase from the intestine of the rabbitfish, *Siganus canalicatus* (Park). *Comp. Biochem. Physiol. B* 109B: 139-144.

## Références bibliographiques

194. SaloVaananen PP, Koivistoinen PE. 1996. Determination of protein in foods: Comparison of net protein and crude protein (N x 6.25) values. *Food Chem.* 57: 27-31.
195. SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT<sup>®</sup> User's Guide, Version 6, 4th ed. Sas Institute Inc., Cary, NC, USA. 1686 pp.
196. Satora L. 1998. Histological and ultrastructural study of the stomach of the air-breathing *Ancistrus multispinnis* (Siluriformes, Teleostei). *Can. J. Zool.* 76: 83-86.
197. Sheridan MA. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 90B: 679-690.
198. Sheridan MA, Eilerston CD, Plisetskaya EM. 1991. Radio-immunoassay for salmon pancreatic somatostatin-25. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 365-372.
199. Shiao SY. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 151: 79-96.
200. Shiao SY, Chin YH. 1999. Estimation of the dietary biotin requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 170: 71-78.
201. Shiao SY, Chuang JC. 1995. Utilization of disaccharides by juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O-aureus*. *Aquaculture* 133: 249-256.
202. Shiao SY, Hsieh HL. 1997. Vitamin B-6 requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O.aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fisheries Science* 63: 1002-1007.
203. Shiao SY, Huang SL. 1989. Optimal dietary protein level for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture* 81: 119-127 .
204. Shiao SY, Hwang JY. 1993. Vitamin-D requirements of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 553-558.
205. Shiao SY, Jan FL. 1992. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 671-675.
206. Shiao SY, Lung CQ. 1993. No dietary vitamin B12 required for juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 105: 147-150.
207. Shiao SY, Peng CY. 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 117: 327-334.
208. Shiao SY, Suen GS. 1992. Estimation of the niacin requirements for tilapia fed diets containing glucose or dextrin. *J. Nutr.* 122: 2030-2036.
209. Shick JM, Widdows J, Gnaiger E. 1988. Calorimetric studies of behavior, metabolism and energetics of sessile intertidal animals. *Am. Zool.* 28: 161-181 .

## Références bibliographiques

210. Shimeno S, Kheyyali D, Shikata T. 1995. Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp. *Fisheries Science* 61: 277-281.
211. Shimeno S, Ming DC, Takeda M. 1993. Regulation of carbohydrate metabolism. 16. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 827-833.
212. Sire MF, Vernier JM. 1992. Intestinal absorption of protein in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 103: 771-781.
213. Smith LS. 1980. Digestion in teleost fishes. *In: Fish Feed Technology. Lectures presented at the FAO/UNDP training course in Fish Feed Technology, held at the College of Fisheries, Univ. of Washington, Seattle WA., U. S. A. 9 Oct.-15 Dec. 78. UNDP/FAO, Roma. p 3-18.*
214. Smith MW. 1983. Membrane transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 75 A: 325-335.
215. Smith RR, Rumsey GL, Scott ML . 1978. Heat increment associated with dietary protein, fat, carbohydrate and complete diets in salmonids: comparative energetics efficiency. *J. Nutr.* 108: 1025-1032.
216. Smith RW, Houlihan DF. 1995. Protein synthesis and oxygen consumption in fish cells. *J. Comp. Physiol. [B]* 165: 93-101.
217. Steffens W. 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood, Chichester, England. 384 pp.
218. Stevenson AE, Clare NT. 1963. Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. IX. Determination of chromic oxide in faeces using an Autoanalyzer. *NZ J. Agric. Res.* 6: 121-126.
219. Stibranyiova I, Parova J. 1996. The effect of protein sparing and amino acid application in African catfish (*Clarias gariepinus*) diet on growth rate and water pollution by nitrogen. *Zivocisna Vyroba* 41: 271-276.
220. Sturmbauer C, Mark W, Dallinger R. 1992. Ecophysiology of aufwuchs-eating cichlids in lake Tanganyika - Niche separation by trophic specialization. *Environ. Biol. Fish.* 35: 283-290.
221. Sugita H, Enomoto E, Deguchi Y. 1982. Intestinal microflora in the fry of *Tilapia mossambica*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48: 875-876 .
222. Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* 24: 105-108.
223. Tacon AGJ, Cowey CB. 1985. Protein and amino acid requirement. *In: Fish energetics. New perspectives.* Tytler P, Calow P, Eds. Croom Helm, London. p 155-183 .

## Références bibliographiques

224. Takeuchi T, Hernández M, Watanabe T. 1994. Nutritive value of gelatinized corn meal as a carbohydrate source to grass carp and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fisheries Science* 60: 573-577.
225. Tawfik DS. 1996. Amidation of carboxylic group. *In: The protein protocols handbook*. Walker JM, ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. p 361-362.
226. Thurston CF, Henley LF. 1996. Isoelectric focusing under denaturing conditions. *In: The protein protocols handbook*. Walker JM, ed. Humana Press Inc., Totowa, N.J. p 115-119.
227. Torrissen KR, Lied E, Espe M. 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. *J. Fish Biol.* 45: 1087-1104.
228. Tung PH, Shiau SY. 1991. Effects of meal frequency on growth performance of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, fed different carbohydrates diets. *Aquaculture* 92: 343-350.
229. Tung PH, Shiau SY. 1993. Carbohydrate utilization versus body size in tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 104: 585-588.
230. Twibell RG, Brown PB. 1998. Optimal dietary protein concentration for hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *O-aureus* fed all-plant diets. *J. World. Aquacult. Soc.* 29: 9-16.
231. Ugwumba AAA. 1993. Carbohydrases in the digestive tract of the african bony-tongue *Heterotis niloticus* (Pisces, Osteoglossidae). *Hydrobiologia* 257: 95-100.
232. Uys W, Hecht T. 1987. Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Aquaculture* 63: 301-313.
233. van der Meer MB, Faber R, Zamora JE, Verdegem MCJ. 1997. Effect of feeding level on feed losses and feed utilization of soya and fish meal diets in *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.* 28: 391-403.
234. van der Meer MB, Machiels MAM, Verdegem MCJ. 1995. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.* 26: 901-909.
235. van Waverveld J, Addink ADF, van den Thillart G. 1989. Simultaneous direct and indirect calorimetry on normoxic and anoxic goldfish. *J. Exp. Biol.* 142: 325-335.
236. van Waverveld J, Addink ADF, van den Thillart G, Smit H. 1988. Anaerobic heat production measurements: a new perspective. *J. Exp. Biol.* 138: 529-533.
237. Van Waverveld J, Addink ADF, Van den Thillart G, Smit H. 1989. Heat production of fish: a literature review. *Comp. Biochem. Physiol. A* 92A: 159-162.

## Références bibliographiques

238. Vellas F. 1981. Métabolisme des composés azotés. II. L'excrétion azotée. *In*: Fontaine M, ed. Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERMA; Paris. Paris: Editions du CNRS. p 149-161.
239. Viola S, Angeoni H, Gur N, Lahav E. 1994a. Growth performance, protein and energy balances of hybrid tilapia fed two levels of lysine at three levels of protein. *Bamidgeh* 46: 212-222.
240. Viola S, Angeoni H, Lahav E. 1994b. Present limits of protein sparing by amino acid supplementation of practical carp and tilapia feeds. *Bamidgeh* 46: 203-211 .
241. Viola S, Mokady S, Arieli Y. 1983. Effects of soybean processing methods on the growth of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 32: 27-38.
242. Vollenweider RA, Ed. 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments, 2nd ed. Blackwell , Oxford, UK. 226 pp.
243. Watanabe WO, Ernst DH, Chasar MP, Wicklund RI, Olla BL. 1993. The effects of temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile, sex-reversed male florida red tilapia cultured in a recirculating system. *Aquaculture* 112: 309-320.
244. Wilkie MP. 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118A: 39-50.
245. Wilson RP, ed. 1991. Handbook of nutrient requirements of finfish. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 196 pp.
246. Wilson RP. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124: 67-80.
247. Wilson RP, Harding DE, Garling Jr DL. 1977. Effect of dietary pH on amino acid utilization and the lysine requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 107: 166-170.
248. Wilson RP, Moreau Y. 1996. Nutrient requirements of catfishes (Siluroidei). *Aquat. Liv. Resour.* 9: 103-111.
249. Wilson RP, Poe WE. 1985. Apparent digestible protein and energy coefficients of common feed ingredients for channel catfish. *Prog. Fish-Cult.* 47: 154-158 .
250. Wilson RW, Gilmour KM, Henry RP, Wood CM. 1996. Intestinal base excretion in the seawater-adapted rainbow trout: A role in acid-base balance? *J. Exp. Biol.* 199: 2331-2343.
251. Winberg GG. 1960. Rate of metabolism and food requirements of fishes. Translation Series vol. 194. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada. 240 pp.
252. Xie SQ, Cui YB, Yang YX, Liu JK. 1997. Effect of body size on growth and energy budget of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 157: 25-34.

## Références bibliographiques

253. Yamada A, Takano K, Kamoi I. 1991a. Purification and properties of protease from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1551-1557.
254. Yamada A, Takano K, Kamoi I. 1991b. Purification and properties of amylases from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1903-1909.
255. Yamada A, Takano K, Kamoi I. 1992. Purification and Properties of alpha-Glucosidases from Tilapia Intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2189-2195.
256. Yamada A, Takano K, Kamoi I. 1993. Purification and properties of protease from tilapia stomach. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1903-1908.
257. Yamada A, Takano K, Kamoi I. 1996. Purification and properties of amylase from tilapia stomach. *Nippon Suisan Gakkaishi* 62: 269-274.
258. Yamane S. 1973. Localization of amylase activity in the digestive organs of the Mozambique mouthbrooder, *Tilapia mossambica*, and bluegill, *Lepomis macrochirus*, determined by a starch substrate film method. *Nippon Suisan Gakkaishi* 39: 595-603.
259. Yardley DG. 1988. The amylase gen-expression system of fishes. I. Developmental expression of amylase in the mosquitofish. *J. Exp. Zool.* 245.
260. Yoshimatsu T, Furuichi M, Kitajima C. 1992. Optimum level of protein in purified experimental diets for redlip mullet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2111-2117.

## ANNEXES

### *TEXTES DES PUBLICATIONS*

1. Indirect calorimetry method to study energy metabolism of an air-breathing fish, *Hoplosternum littorale* (Siluriform, Callichthyidae).
2. Postprandial utilization of energy substrates by a tropical catfish, *Hoplosternum littorale*: indirect calorimetry analysis.
3. Absolute feeding design, a realistic way for fish nutrient requirement determination.
4. Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of  $\alpha$ -amylases from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*.



# INDIRECT CALORIMETRY METHOD TO STUDY ENERGY METABOLISM OF AN AIR-BREATHING FISH, *HOPLOSTERNUM LITTORALE* (SILURIFORM, CALLICHTHYIDAE)

Y. MOREAU,\* F. MEDALE,\*\* T. BOUJARD and P. LUQUET

Laboratoire d'Hydrobiologie, INRA, BP 709, 97387 KOUROU Cedex, French Guiana

\*Present Address: CRO, BP V18, Abidjan, Ivory Coast

\*\*Laboratoire de Nutrition des Poissons, INRA, BP 3, 64310 St Pée sur Nivelle, France

## ABSTRACT

The aim of the present work was to implement indirect calorimetry method to study energy metabolism of an air-breathing neotropical fish, *Hoplosternum littorale*. A closed respirometer was designed to measure the gas exchanges of this air-breathing fish in both aerial and aquatic media. The accuracy and the validity of the method were tested. The energy expenditure of fish fasted for 10 days and the involvement of energy-yielding body stores were calculated from the measurements of O<sub>2</sub> uptake, CO<sub>2</sub> output, and the nitrogen excretion of fasted Atipas. The average energy expenditure was 1.58 kJ/kg/hr and endogenous lipids were the main energy purveyor.

Atipa (*Hoplosternum littorale* Hancock, 1828) is an air-breathing siluriform fish of the Callichthyidae family living in the marshy areas of northern South America. To date, knowledge of this species concerned mainly its respiratory system (Carter and Beadle, 1931; Gee and Graham, 1978) and its behaviour (Winemiller, 1987; Boujard *et al.*, 1990). No data on its nutrition physiology are available. The present work is the first step to obtain basic knowledge in this area.

Energy requirements and the mode of substrates utilization to meet such needs take on a special dimension with tropical species, which are assumed to make better use of available energy than cold-water fish (Luquet and Moreau, 1989).

Indirect calorimetry allows qualitative and quantitative evaluation of the energy substrates used by fish (Gnaiger, 1983; Van Waversveld *et al.*, 1988). In this method, the calculation of heat production is based on respiratory gas exchanges which reflect cellular oxidation of energy-supplying substrates and on nitrogen excretion arising from catabolism of nitrogen compounds. One of the first trials in this line was made by Kutty (1972) to study metabolic rate associated to swimming activity in *Oreochromis mossambicus*. The attraction of this method in evaluating the standard metabolic rate of fish has recently been pointed

out by Brafield (1985), and compared to direct calorimetry by Van Waversveld *et al.* (1989). Indirect calorimetry was also used in the context of a study on the nutrition of the trout and the siberian sturgeon (Medale and Kaushik, 1991). But to our knowledge such measurements have never been taken on an air-breathing fish although a respirometer for *Clarias lazera* had been described by Hogendoorn *et al.* (1981). The aim of this study was to implement a simple system to carry out indirect calorimetric measurements with this warm water bi-modal breathing fish.

## MATERIALS AND METHODS

### Respirometer

Atipa being a bi-modal breather, the respirometer had to deal with both aquatic and aerial media. The closed respirometer designed with this aim is shown in Fig. 1. The inner chamber (1) was a 0.21 m diameter glass barrel containing 10 l water and 1.5 l gas. Gas pressure

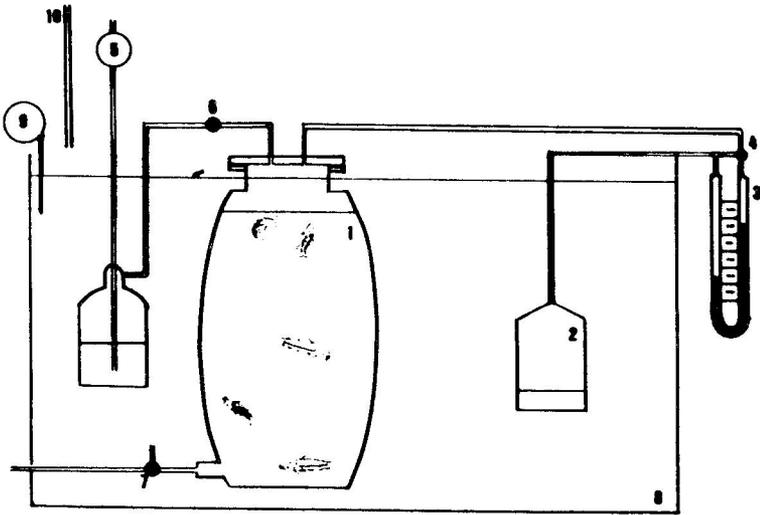


Fig. 1. Diagram of the closed respirometer system. 1—chamber, 2—reference bottle, 3—manometer, 4—shunt manometer valve, 5—air pump, 6—air inlet valve, 7—filling/sampling valve, 8—water bath, 9—temperature controller, 10—laboratory circuit water inlet.

variations were measured by means of a water U manometer (3) against a reference bottle (2) containing air and distilled water. According to Carter and Beadle (1931), oxygen uptake of this fish occurs in both media, while CO<sub>2</sub> and nitrogen wastes are mainly excreted in water. In order to confirm this assumption, the CO<sub>2</sub> variations in the air above the fishes were evaluated during preliminary trials with an IR gas analyser (Licor 6200). The values of CO<sub>2</sub> excretion in air were less than 1% of the total CO<sub>2</sub> excretion of the fish. Therefore,

analyses of air were limited to oxygen measurements. The oxygen depletion in air was estimated by manometric method. The chamber and the reference bottle were both immersed in a water bath (8) in order to control the temperature homogeneity of the system (9).

Prior to each trial, the external water bath (8) was filled with water from the laboratory recirculated water system (10) and allowed to stand overnight. At the beginning of the experiment, the inner chamber was completely filled from the external water bath by means of the three-way valve at the bottom of the chamber (7). Fish were introduced through the large aperture at the top of the chamber. The chamber was closed with a Plexiglas airtight lid. An initial water sample was taken by aspiration through the bottom outlet, the air inlet valve (6) open and the manometer disconnected. The water level in the chamber was adjusted to 10 l and all valves closed before connecting the manometer. Two hours later, the air depression in the chamber was read on the manometer and the bath temperature was recorded. The manometer was disconnected and the chamber carefully emptied by air injection (5). Emptying time only took a few minutes, which avoided any fish disturbance. The final water sample was collected during emptying time. Furthermore, to avoid excessive fish disturbance, the water level of the chamber was not allowed to fall under 5 cm. Then the chamber was refilled for the next two-hour step of measurement.

## Analyses

The precision of the manometer used for air pressure measurement was of 1 mm H<sub>2</sub>O (0.073 Torr). The manometric readings were converted into oxygen quantity equivalents using capacitance tables given by Dejours (1981). The dissolved oxygen level was measured with a Clark type electrode (Orion 9708) standardized on air according to the manufacturer's recommendations. A CO<sub>2</sub> ion-selective probe (Orion 9502) was used for the determination of the CO<sub>2</sub> concentration in water. The two electrodes were each connected to an Orion SA720 pH/Ionometer which displayed results in mg/l after suitable conversions of the signal given by the electrode. The ammonia concentration in water was analysed by colorimetric method (Golterman *et al.*, 1978). Using the accuracy specified by the manufacturers for probes, manometer, and analytical method, the expected reproducibility of all measurements was calculated for a temperature of 28°C (Table 1). Even though the measurements were

Table 1. The accuracy of measurement given by apparatus or analytical methods for concentration mg/l or  $\mu\text{mol/l}$  (a, b) and uptake (or excretion) of 100 g experimental fish biomass in  $\mu\text{mol/kg/h}$  during the two hours of measurement (c)

	mg/l (a)	$\mu\text{mol/l}$ (b)	$\mu\text{mol/kg/h}$ (c)
<i>Air</i>			
O <sub>2</sub>	1.25	3.90	30
<i>Water</i>			
O <sub>2</sub>	0.05	1.56	185
CO <sub>2</sub>	0.27	6.14	610
N-NH <sub>4</sub>	0.035	0.25	25

taken over two-hour periods with 25 g fish, the results are nevertheless expressed in  $\mu\text{mol/kg/hr}$  to allow a more convenient comparison with other sets of data. This must be kept in mind particularly when comparisons are made with fish of different weights.

Only  $\text{NH}_4$  was considered as the end product of nitrogen catabolism. While it is well known that ammonia is the major excreted nitrogen waste of teleosts (Vellas, 1981), the amount of excreted urea could be significant (Kaushik, 1980). In order to verify the importance of urea as an excretory product of *Atipa*, the urea content of final water samples was estimated according to the method described by Aminot and Kerouel (1982). The urea-N concentration was below the sensitivity threshold of the analysis, which means  $<1 \mu\text{mol N/l}$ .

### Experimental test

The tests were carried out with *Atipas* produced in our experimental fish farm (Kourou, French Guiana). Fish were fasted 15 days before the experiment. The experiment was performed with a batch of 5 fishes of 25.6 g mean weight (range: 22.0 to 28.4).

Trials were performed over 48 hours. The experimental room was submitted to the natural photoperiod. A red light of low intensity was used for night work. This red light was not switched off during the day.

Energy expenditure and body stores involves were calculated from oxygen uptake,  $\text{CO}_2$ , and ammonia excretions using formulae given by Van Waversveld *et al.* (1988).

## RESULTS

As can be seen in Fig. 2, the oxygen uptakes from air and from water did not show any specific diurnal rhythm. In this experiment, the amount of oxygen derived from air represented 36.6% (range: 23.3 to 46.3%) of the total oxygen uptake. Calculated from the

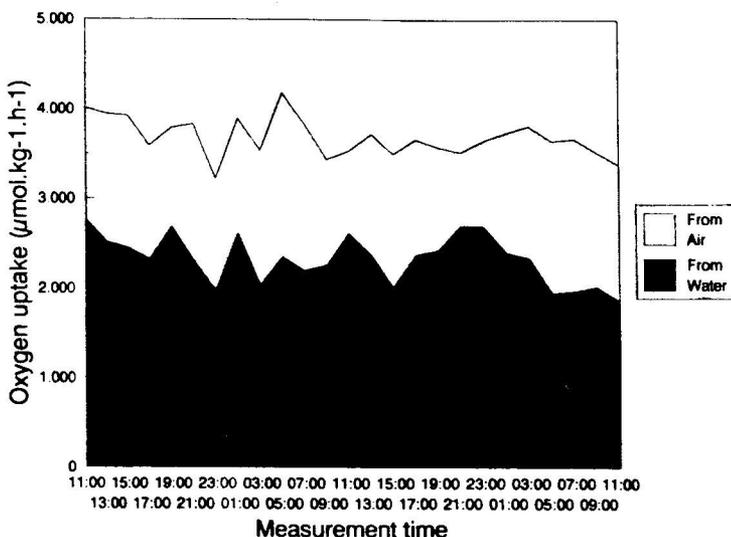


Fig. 2. Total oxygen uptake by fasted *Atipa*, *Hoplosternum littorale*, with the share between atmospheric and dissolved oxygen

Table 2. Gas exchanges and nitrogen excretion of fasted *Atipa* at 28°C. Values averaged over 48 hours, in  $\mu\text{mol/kg/h}$

	Average	SD
<i>O<sub>2</sub> uptake:</i>		
Air	1351	48.8
Water	2336	51.2
Total	3687	
<i>CO<sub>2</sub> output</i>	2836	216
<i>N-NH<sub>4</sub> excretion</i>	351	7.67

data recorded over the 48 hours, the average total oxygen uptake was 3687  $\mu\text{mol/l/hr}$  (Table 2). As was the case for oxygen, no rhythm could be noticed for  $\text{CO}_2$  output and  $\text{NH}_4$  excretion. From the data on respiratory exchanges and ammonia excretion over the trials, a respiratory quotient of 0.77 and an ammonia quotient of 0.095 were calculated.

According to these results the mean energy expenditure was 1.58 kJ/kg/hr. The quantities of oxidized proteins and lipids were similar (Table 3). Reduced to energy equivalent values, 32% of these oxidized compounds were endogenous proteins and 68% were body lipids.

Table 3. Energy metabolism of fasted *Atipa* at 28°C

Respiratory quotient	0.77
Ammonia quotient	0.095
Energy expenditure	1.58 kJ/kg/h
<i>Quantity of oxidized body reserves</i>	
Proteins	30.7 mg/kg/h
Lipids	30.1 mg/kg/h
Carbohydrates	-10.9 mg/kg/h

## DISCUSSION

The designed respirometer enabled measurement of the gas exchanges and the nitrogen excretion in both aquatic and aerial media. The aim of the study being the evaluation of the *total* oxygen uptake, the possible  $\text{O}_2$  equilibration between the air and the water compartments (which could influence the share of the partition between water and air oxygen uptake) was not to be taken into account. The use of the present manometer led to a measurement accuracy of aerial  $\text{O}_2$  uptake similar to that of dissolved oxygen consumption measured by the oxygen probe. But it required the use of a closed system. Consequently, a particular attention should be paid to avoid adverse values of  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , or nitrogen wastes. As recommended by Van Waversveld *et al.* (1989), the measurements had to be performed with a group of fish and not with a single fish. In this way, the two-hour step was chosen as not too long but still allowing an acceptable precision for all measured parameters. During this experiment the oxygen level in the water did not fall under 3.15 mg/l (62 Torr or 41% of the saturation at 28°C) and  $\text{NH}_4$  concentration was never higher than 0.2 mg/l at the end of any two-hour trial. *Hoplosternum littorale* being an air breather, no attention has been given to

the dissolved oxygen level under which *H. littorale* would become an oxygen conformer. Some available data are related to dissolved oxygen level under which facultative air-breathing species such as *Hypostomus plecostomus* or *Ancistrus chagresi* begin to take oxygen from the air. For both species this threshold is under 60 Torr (Graham and Baird, 1982). In fact, no increase in fish activity or abnormal behaviour (manifesting stress due to a dissolved oxygen deficiency) was registered at the end of each trial.

As the fish were fasted and no rhythm was noticed, each set of 25 values for gas exchanges and nitrogen excretion was averaged (Table 2). In fact, for indirect calorimetric procedure, one needs to know the quantity of the exchange as a whole. These averages can be used in the description of the general nutritional status of fish. The reliability of CO<sub>2</sub> output measurement must be borne in mind as its value strongly influences the results, i.e. the calculation of the distribution of non-protein energy sources.

In the present experiment, the negative oxidation value for carbohydrates could be interpreted as neoglucogenesis. Thus, further experiments on enzyme activity involved and direct estimation using labelled compounds (amino acids or fatty acids) might be useful to check the possible neosynthesis of carbohydrates and such nutrients' interconversion.

The measurements of gas exchanges and nitrogen excretion were carried out over a 48-hour period for two reasons: (1) Van Waversveld *et al.* (1989) recommended taking measurements during darkness for a better approximation of standard metabolism. Moreover, Boujard *et al.* (1990) reported that locomotor activity and air breathing of starved *Atipa* were increased in the light phase. (2) If the fishes were disturbed by handling, a long period of measurement allows for possible effects of handling stress.

In fact, in the present experiment, we did not notice any difference in parameters either between the dark and light phases or between the beginning and the end of the 48-hour measurement period. Furthermore, the standard metabolism of *Atipa* at a temperature of 28°C was similar to those of *Tilapia rendalli* (Caulton, 1978) at 23°C, of *Oreochromis mossambica* (Sukumaran, 1986), and of *Rhinomugil corsula* (Peer-Mohammed and Kutty, 1986) at 30°C. The standard metabolic rate of these fishes was respectively 1.88, 1.37, and 1.89 kJ/kg/hr.

When compared to data on endogenous protein and energy losses from body composition analyses data, the results obtained by the indirect calorimetry method were similar for fish starved from 10 to 50 days (Luquet *et al.*). The indirect calorimetry method turned out to be effective with a bi-modal breathing fish.

Trials are under way to study energy metabolism associated with the feeding of *Atipa*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by GCS/BBA. The authors want to thank S.J. Kaushik (INRA, St Pee s/Nivelle) for his contribution, A. Malan (LPR, CNRS, Strasbourg) for his advice and A. Hutchinson for the English.

#### REFERENCES

- Aminot, A., and Kerouel, R. (1982). Dosage automatique de l'urée dans l'eau de mer: une méthode très sensible à la diacétylmonoxime. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 174-183.

- Boujard, T., Keith, P., and Luquet, P. (1990). Diel cycle in *Hoplosternum littorale* (Teleostei): Evidence for synchronization of locomotor, air breathing and feeding activity by circadian alternation of light and dark. *J. Fish Biol.* **36**: 133–140.
- Brafield, A.E. (1985). Laboratory studies of energy budget. In P. Tytler and P. Calow (eds.) *Fish Energetics*, New Perspectives. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 350 pp.
- Carter, G.S., and Beadle, L.C. (1931). The fauna of the swamps of Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in fishes. *Linn. J. Zool.* **37**: 327–368.
- Caulton, M.S. (1978). Tissue depletion and energy utilisation during routine metabolism by sub-adult *Tilapia rendalli* Boulenger. *J. Fish Biol.* **13**: 1–6.
- Dejours, P. (1981). *Principles of Comparative Respiratory Physiology*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam. 265 pp.
- Gee, J.H., and Graham, J.B. (1978). Respiratory and hydrostatic function of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). *J. Exp. Biol.* **74**: 1–16.
- Gnaiger, E. (1983). Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In E. Gnaiger and Forstner (eds.). *Polarographic Oxygen Sensors*. Springer-Verlag, Berlin.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S., and Ohnstad, M.A.M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of freshwaters. IBP Handbook No. 8, 2nd ed. Blackwell, Oxford. 213 pp.
- Graham, J.B., and Baird, T.A. (1982). The transition to air breathing in fishes. I. Environmental effects on the facultative air breathing of *Ancistrus chagresi* and *Hypostomus plecostomus* (Loricariidae). *J. Exp. Biol.* **96**: 53–67.
- Hogendoorn, H., Van Korlaar, F., and Bosh, H. (1981). An open circuit balance respirometer for bioenergetic studies of fish growth. *Aquaculture* **26**: 183–187.
- Kaushik, S.J. (1980). Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Dev.* **20**: 1751–1765.
- Kutty, M.N. (1972). Respiratory quotient and ammonia excretion in *Tilapia mossambica*. *Mar. Biol.* **16**: 126–133.
- Luquet, P., and Moreau, Y. (1989). Energy-protein management by some warmwater finfishes. Presented at *Advances in Tropical Aquaculture*, Feb. 22–Mar. 4, 1989, Tahiti.
- Luquet, P., Moreau, Y., Medale, F., and Kaushik, S.J. Utilization of the principal nutrients for routine metabolism in *Atipa* (*Hoplosternum littorale*) during starvation. *J. Aqua. Trop.* **6**: 69–78.
- Medale, F., and Kaushik, S.J. (1991). Energy utilization by farmed siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) from 3 age classes. Proc. Internat. Symp. Acipenser, Bordeaux, 1989.
- Peer-Mohammed, M., and Kutty, M.N. (1986). Influence of ambient oxygen and random swimming activity on metabolic rates and quotients in the freshwater mullet *Rhinomugil corsula* (Hamilton). *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* **95**(2): 67–76.
- Sukumaran, N. (1986). Oxygen consumption, carbon dioxide output and nitrogen excretion in cichlid fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters), with special reference to swimming speed. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* **95**(2): 215–222.
- Van Waversveld, J., Addink, A.D.F., Van den Thillart, G., and Smit, H. (1988). Anaerobic heat production measurements: A new perspective. *J. Exp. Biol.* **138**: 529–533.
- Van Waversveld, J., Addink, A.D.F., Van Den Thillart, G., and Smit, H. (1989). Heat production of fish: A literature review. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**(2): 159–162.
- Vellas, F. (1981). L'excrétion azotée. In M. Fontaine (ed.). *Nutrition des Poissons*. Editions du CNRS, Paris, 377 pp.
- Winemiller, K.O. (1987). Feeding and reproductive biology of the currito, *Hoplosternum littorale*, in the Venezuelan llanos with comments on the possible function of the enlarged male pectoral spines. *Environ. Biol. Fish.* **20**(3): 219–227.

# POSTPRANDIAL UTILIZATION OF ENERGY SUBSTRATES BY A TROPICAL CATFISH, *HOPLOSTERNUM LITTORALE*: INDIRECT CALORIMETRY ANALYSIS

Y. MOREAU,\* F. MEDALE,\*\* T. BOUJARD and P. LUQUET

Laboratoire d'Hydrobiologie, INRA, BP 709, 97387 Kourou Cedex, Guyane française

\* Present address: Centre de Recherches Océanographiques, BP V18, Abidjan 01, Ivory Coast

\*\* Laboratoire de Nutrition des Poissons, INRA, BP 3, 64310 St Pée sur Nivelle, France

## ABSTRACT

Indirect calorimetry method was used to measure postprandial utilization of energy substrates by atipa, *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae, Siluriform). A model was adjusted to the data on respiratory exchanges and nitrogen excretion for this purpose. As for other fish species, protein was actively catabolized after feeding during the 60 hr measurement time. As long as carbohydrates were available, atipa was also able to use these substrates for its energy metabolism. A gradual increase of contribution of lipids was then noticed. Over a 24 hr period following the food intake, a 30 g fish catabolized 90 mg of proteins and 43 mg of carbohydrates. At the same time, the results led to a synthesis of 3.7 mg of fat. An estimation of the increase of the global metabolism associated to food intake was obtained from integration of the exponential terms of the model.

In fish, as in other animals, necessary nutrients for growth are provided by food. But food also provided fuels required by the energy metabolism. Among the three different energy substrates (proteins, lipids, and carbohydrates) which could be used by living beings, fish are reported to mainly use proteins even if they can burn fat too.

Referring to their final destiny, the best energy substrates must be those which are not concrete parts of growth products. In this way, non-protein energy substrate, such as fat and carbohydrates, should be more adequate. The apparent poor retention of non-protein substrates, observed among tropical fish, indicates their better utilization for energy needs (Luquet and Moreau, 1989). As they disappear, they are not misused by transformation into body fat for example.

To obtain both qualitative and quantitative evaluations of energy substrates utilization by fed animals, indirect calorimetry is the only available method. This method was already applied to several fish species (Gnaiger, 1983; Van Waverveld *et al.*, 1988; Kaushik *et al.*, 1989; Médale and Kaushik, 1991). It is based

on respiratory gas exchanges which reflect cellular oxidation of energy-supplying substrates, and on nitrogen excretion arising from catabolism of nitrogen compounds. One of the first trials in this line was made by Kutty (1972) to study the metabolic rate associated with swimming activity in *Oreochromis mossambicus*. The attractions of this method in evaluating the standard metabolic rate of fish have been underlined by Brafield (1985) and compared to direct calorimetry by Van Waversveld *et al.* (1989).

*Atipa* (*Hoplosternum littorale*, Hancock 1828) is an air-breathing siluriform fish of the Callichthyidae family living in the marshy areas of northern South America. So far, the data on this species mainly dealt with its respiratory system (Carter and Beadle, 1931; Gee and Graham, 1978), its behaviour (Winemiller, 1987; Gautier *et al.*, 1988; Boujard *et al.*, 1990, Boujard and Meunier, 1991), its rearing, and its feeding (Luquet *et al.*, 1989; Moreau and Luquet, 1991). In earlier studies, the utilization of endogenous substrates was observed following body losses during starvation (Luquet *et al.*, 1991) or using the indirect calorimetry method (Moreau *et al.*, 1991). The aim of the present work is to identify and quantify the energy substrates supplied by food and used by this tropical catfish.

## MATERIALS AND METHODS

One month before trials, fish reared in our experimental fish farm (Kourou, French Guiana) were transferred to the laboratory in a close circuit system. Trials were performed on five batches of five fish (31.8 g mean weight). Each batch was kept in 200 l tanks and submitted to natural photoperiod. Fish were fed daily with commercial food pellets at 3% of their body weight (Aqualim, 45% crude protein). The food was given at the end of the night, in accordance with their natural rhythm of food intake (Boujard *et al.*, 1990). To be sure of a good food consumption, the fish were kept for at least 1 hr in contact with food. They were then carefully transferred into a respirometer which allowed the measurement of exchanges occurring in water and in air, as previously described by Moreau *et al.* (1991). Ammonia excretion was used to determine total nitrogen excretion since urea excretion was found negligible. Oxygen uptake (from air and water), carbon dioxide, and ammonia excretion were measured, every 2 hr for 48 hr. The postprandial 60 hr period was covered by selecting the time of transfer for each fish group (Feeding time + 1 hr, batch 1; FT + 3 hr, batch 2 and 3; FT + 12 hr, batch 4 and 5).

If calculations are made from a set of uptake or excretion data observed at the same time, some discrepancies can occur. As exchanges do not necessarily take place at the same time, a model was adjusted to the data to describe the general tendency of uptake and excretion during the whole measurement period. A delay between O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> excretion might result from an increase in fish activity (Wood and Perry, 1985, cit. in Playle *et al.*, 1990) as during bursts through the surface for air breathing or from the air breathing itself, some of the oxygen measured as uptake being trapped in air bubbles before their use.

Food intake induces a large income of metabolites, which are gradually absorbed by metabolism. An exponential model is often used to describe this kind of process involving a steady treatment (or utilization) of products. But, as this formulation tends towards zero, it does not take into account a routine level reached at the end of the process. The model designed to adjust the data was then as follows:

$$y = b_0 + b_1 e^{-rt},$$

where  $y$  is the expected value of oxygen uptake, carbon dioxide, or ammonia excretion, and  $t$  the time in hours.  $b_0$  can be assimilated to the routine metabolism rate,  $b_1$  to the income associated to feed intake, and  $r$  to the rate of the different metabolism processes.

The analytical methods were the same as those described in Moreau *et al.* (1991). Energy expenditure and quantity of oxidized substrates were calculated according to Van Waversveld *et al.* (1988). The SAS statistics software package has been used for statistical inference.

## RESULTS AND DISCUSSION

Postprandial gas exchanges and ammonia excretion are plotted on Fig. 1. The postprandial increase of oxygen uptake and ammonia excretion usually described (Brett and Groves, 1979; Vellas, 1981) was not observed. This step should be missing as the first observations were made in fact 3 hr after feeding, i.e., sooner transfer time + 2 hr. All exchanges were only decreasing steadily over the measuring period to level off at the routine metabolism rate.

The equations obtained for the different models are reported in Table 1. From these three equations, the types and amounts of energy substrates used by fish have been calculated (Fig. 2). Just after feeding, proteins are actively catabolized and their utilization decreases during the entire period of measurement to reach a level of about 50 mg/kg/hr after 58 hr. During the first 14 hr after feeding, a large amount of carbohydrates is also catabolized. At the same time, the observed RQ values come to a negative value for lipids which could be interpreted as a synthesis. Afterwards the lipids begin to be involved in the energy metabolism and their contribution increases as the involvement of carbohydrates tends to disappear. Fifty-five hours later, the carbohydrates are no longer used and lipids contribution represents about 16 mg/kg/hr. The amounts of substrate oxidized by a fish during the post-feeding periods can be calculated from the integration of the equations obtained for O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> excretion (Table 2). Furthermore, the contribution of each substrate to the total energy expenditure is deduced using the heat of combustion given for them (Brafeld, 1985).

Proteins are an important source of energy for atipa, as for other species. But this species is also able to burn carbohydrates. As carbohydrates are nearly absent from the whole body composition (Luquet *et al.*, 1991), carbohydrates utilization must be related to their availability from feed. Increase in the carbohydrates level of feed is generally associated with a high body fat deposition

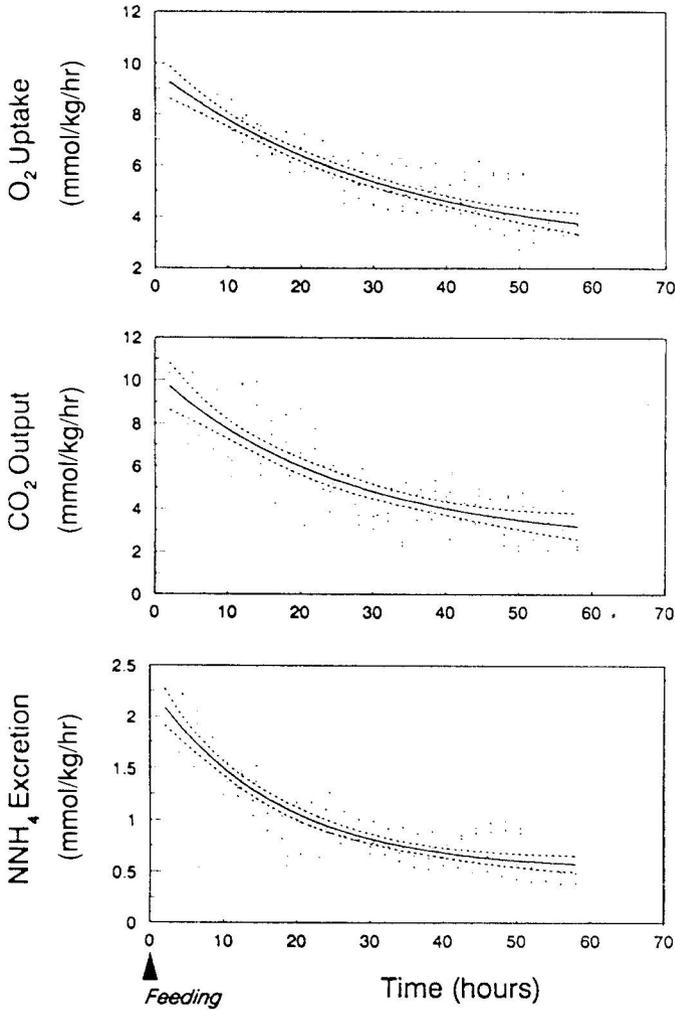


Fig. 1. Evolution of oxygen uptake, carbon dioxide and ammonia excretion in *H. littorale* during the hours following food intake. The solid lines represent the adjustment of the data to a model,  $y = b_0 + b_1e^{-rt}$ , and the broken lines are the 95% confidence levels of the means.

Table 1. Values obtained after adjustment of gas exchange and nitrogen (in  $\mu\text{mol/kg/hr}$ ) to a model,  $y = b_0 + b_1e^{-rt}$  (with  $t$  in hours).  $n$  is the number of observations. Significance is given by the probability of finding an  $F$  statistic greater to  $f$  calculated between mean squares explained by the model and residuals mean squares

	$b_0$	$b_1$	$r$	$n$	Prob ( $F > f$ )
O <sub>2</sub> uptake	2,591	7,114	0.03	100	< 0.001
CO <sub>2</sub> excretion	2,454	7,893	0.04	96	< 0.001
NH <sub>3</sub> excretion	524	1,772	0.06	97	< 0.001

(Steffens, 1989). In this way carbohydrates will not be consumed as a fuel but

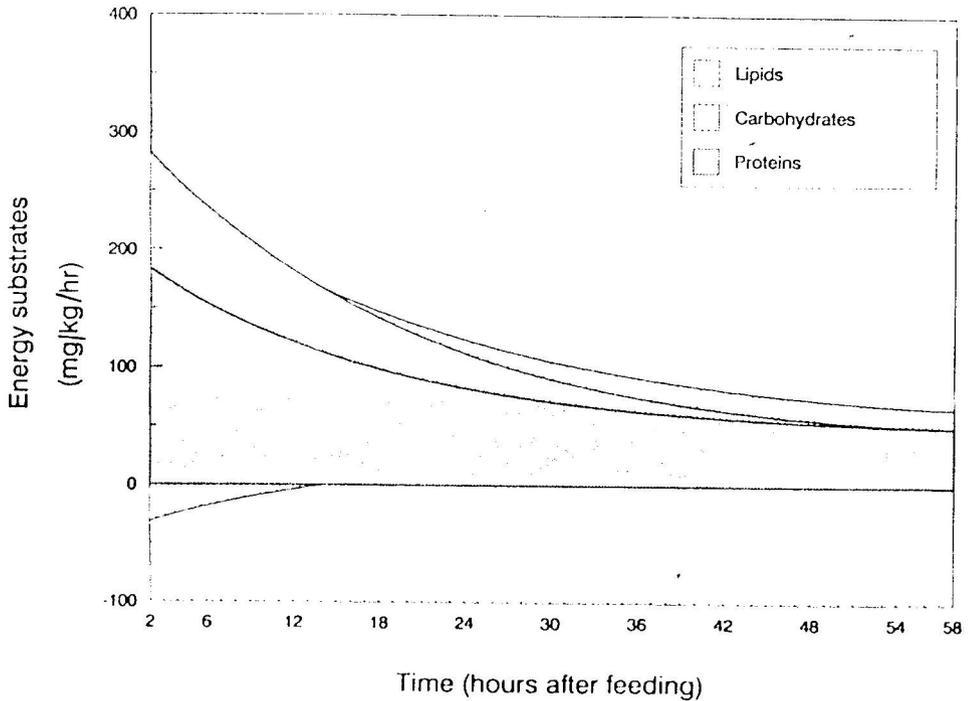


Fig. 2. Utilization of different energy substrates by *H. littorale* during the hours following food intake.

Table 2. Utilization of different substrates and their contributions to the total energy expenditure by *H. littorale*, after a meal. The values are given for 30 g fish. Energy equivalents are calculated from the heat of combustion values given by Brafield (1985): 19.67 kJ/g for proteins to ammonia, 39.5 kJ/g for lipids and 17.2 kJ/g for carbohydrates.

Hours after feeding	Substrates	Oxidized amount (mg)	Energy contribution (% of total)
1-14	Proteins	57.6	69
	Lipids	(6)	
	Carbohydrates	30	31
15-54	Proteins	84.6	62
	Lipids	16.8	25
	Carbohydrates	21	13
55-60	Proteins	7.5	61
	Lipids	2.4	39
	Carbohydrates	(.09)	

transformed as fat. Based on one meal per day, total amounts of involved carbohydrates and lipids can be evaluated from integration over 24 hr. For a 30 g fish, this will give 43 mg of catabolized carbohydrates and simultaneously 3.7 mg of

produced fat. If all food was ingested and fish fed twice daily, the values would correspond to the post-feeding period of 1–14 hr (Table 2).

The amount of carbohydrates needed to produce such an amount of fat can be estimated from metabolic fatty acid synthesis pathway. Three moles of carbohydrates carbon are necessary to obtain 2 mol of fatty acid carbon (Stryer, 1988). Using the global formulas given by Gnaiger (1983) for carbohydrates and fat, 1 g of carbohydrate is required to make 380 mg of lipids. Even if fish were becoming more fatty, this could not be a simple transfer from carbohydrates. If so, the amount of deposit would be much higher. Thus, carbohydrates are used as energy supply.

Over a 24 hr period, the amount of catabolized protein is near 90 mg for a 30 g fish. This value represents about 22% of the protein supplied in the food, which is much less than the value previously reported on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed at a lower rate (Kaushik *et al.*, 1989), or those given for eel (*Anguilla anguilla*) or catfish (*Clarias gariepinus*) fed at a close level but continuously (Heinsbroek *et al.*, 1989).

Integration of the model for nitrogen excretion gives an estimation of the amount of catabolized proteins. For five days, a 100 g fish would use approximately 800 mg of proteins. This is close to the values of endogenous losses reported for the same species (Luquet *et al.*, 1991). Conversely, estimates for lipids are not consistent. This could largely result from differences in the general state of the studied fish. For the former fasting experiment, fish were taken directly from the rearing pond, whereas those of the present study stayed one month in tanks. Nevertheless, the great similarity between the estimates of protein utilization seems to indicate that this is quite reliable.

Studies on fasted fish show that the nature and amount of catabolized substrates were not constant over the fasting period (Luquet *et al.*, 1991). So, the metabolism of starving fish changes as fasting time increases. Therefore, metabolism of starved fish could not be strictly taken as an estimate of standard or routine metabolism. Thus, specific dynamic action, or more precisely metabolism rate associated with feeding (including rise of activity), cannot be calculated by the difference between fed and unfed fish. In the model used for the present study, the exponential term corresponds to the overall process of ingested food, whereas the constant term could be assumed as the routine metabolism of fed fish. In fact these values are much higher than those found in fish fasted for 10 days, as routine metabolism of fish had certainly changed during the fasting period. Moreover, the increase in metabolism resulting from food intake can be evaluated by the integration of the exponential term of the adjusted models. This leads to an energy expenditure of 2.97 kJ for a 30 g fish provided by utilization of 77.8 mg of proteins (52% of supplied energy), 27.6 mg of lipids (37%), and 19.6 mg of carbohydrates (11%). At the same time, 80% of the energy expenditure for routine metabolism (0.034 J/hr) came from protein catabolism.

In summary, these results confirm the main role of protein as energy-yielding substrate for fed *Hoplosternum littorale*, as for starved ones. In this regard, atipa does not seem to be mainly different from other species (Cho and Kaushik, 1990).

Besides, the effective contribution of carbohydrates to energy metabolism indicates that the metabolism of carbohydrate is active in this species.

## REFERENCES

- Boujard, T., and Meunier, F. (1991). Croissance de l'épine pectorale, histologie osseuse et dimorphisme sexuel chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancox, 1828 (Callichthyidae, Siluriforme). *Cybium* **15**: 55–68.
- Boujard, T., Keith, P., and Luquet, P. (1990). Diel cycle in *Hoplosternum littorale* (Teleostei): Evidence for synchronization of locomotor, air breathing and feeding activity by circadian alternation of light and dark. *J. Fish Biol.* **36**: 133–140.
- Boujard, T., Moreau, Y., and Luquet, P. (1991). Entrainment of the circadian rhythm of food demand by infradian cycles of light/dark alternation on *Hoplosternum littorale* (Teleostei). *Aquat. Living Resources* **4**: 221–225.
- Brafield, A.E. (1985). Laboratory studies of energy budgets. In P. Tyler and P. Calow (eds.) *Fish Energetics, New Perspectives*. Croom Helm, London, Sydney. 349 pp.
- Brett, J.R., and Groves, T.D.D. (1979). Physiological energetics. In W.S. Holar, D.J. Randall and J.R. Brett (eds.) *Fish Physiology*, Vol. VIII. Academic Press, London. 786 pp.
- Carter, G.S., and Beadle, L.C. (1931). The fauna of the swamps of Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in fishes. *Linn. J. Zool.* **37**: 327–368.
- Cho, C.Y., and Kaushik, S.J. (1990). Nutritional energetics in fish, energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.* **61**: 132–172.
- Gautier, J.Y., Planquette, P., and Rouger, Y. (1988). Etude éthologique de la relation mâle-femelle au cours du cycle de reproduction chez *Hoplosternum littorale*. *Rev. Ecol. (Terre & Vie)* **43**: 389–398.
- Gee, J.H., and Graham, J.B. (1978). Respiratory and hydrostatic function of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). *J. Exp. Biol.* **74**: 1–16.
- Gnaiger, E. (1983). Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In E. Gnaiger and Forstner (eds.). *Polarographic Oxygen Sensors*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 337–345.
- Heinsbroek, L.T.N., van Thoor, R.M.H., and Elizondo, L.J. (1989). The effects of feeding level on the apparent digestibilities of nutrients and energy of a reference diet for the european eel, *Anguilla anguilla* L. and the african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Proc. Third int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish., Toba Aug. 28 to Sept. 1, Japan, 1989. pp. 175–188.
- Kaushik, S.J., Médale, F., Fauconneau, B., and Blanc, D. (1989). Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* **79**: 63–74.
- Kutty, M.N. (1972). Respiratory quotient and ammonia excretion in *Tilapia mossambica*. *Mar. Biol.* **16**: 126–133.
- Luquet, P., and Moreau, Y. (1989). Energy-protein management by some warmwater finfishes. In *Advances in Tropical Aquaculture*. Tahiti, Feb. 20 to March 4, 1989, AQUACOP, IFREMER. *Actes de Colloque* **9**: 751–755.
- Luquet, P., Boujard, T., Planquette P., Moreau, Y., and Hostache, G. (1989). The culture of *Hoplosternum littorale*: State of the art and perspectives. In *Advances in Tropical Aquaculture*. Tahiti, Feb. 20 to March 4, 1989, AQUACOP, IFREMER. *Actes de Colloque* **9**: 551–516.
- Luquet, P., Moreau, Y., Médale, F., and Kaushik, S.J. (1991). Utilization of the principal nutrients for routine metabolism in atipa (*Hoplosternum littorale*) during starvation. *J. Aqua. Trop.* **6**: 69–78.
- Médale, F., and Kaushik, S.J. (1991). Energy utilization by farmed siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) from 3 age classes. Proc. Internat. Symp. Acipenser, Bordeaux, 1989, pp. 13–23.
- Moreau, Y., and Luquet, P. (1991). Etude du transit digestif chez un poisson-chat, l'atipa (*Hoplosternum littorale*). Influence de repas successifs. *Rev. Hydrobiol. Trop.* **24**: 349–355.
- Moreau, Y., Médale, F., Boujard, T., and Luquet, P. (1991). Indirect calorimetry method to study energy metabolism of an air-breathing fish, *Hoplosternum littorale* (Siluriform, Callichthyidae). *J. Aqua. Trop.* **6**: 193–199.

- Playle, R.C., Munger, R.S., and Wood, C.M. (1990). Effects of catecholamines on gas exchange and ventilation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* **152**: 353–367.
- Steffens, W. (1989). Principles of Fish Nutrition. Ellis Horwood Series in Aquaculture and Fisheries Support. John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 384 pp.
- Stryer, L. (1988). Biochemistry, 3rd ed. W.H. Freeman and Co., New York. 1089 pp.
- Van Waversveld, J., Addink, A.D.F., and van den Thillart, G. (1989). Simultaneous direct and indirect calorimetry on normoxic and anoxic goldfish. *J. Exp. Biol.* **142**: 325–335.
- Van Waversveld, J., Addink, A.D.F., van den Thillart, G., and Smit, H. (1988). Anaerobic heat production measurements: A new perspective. *J. Exp. Biol.* **138**: 529–533.
- Vellas, F. (1981). L'excrétion azotée. In M. Fontaine (ed.). Nutrition des Poissons. Editions du CNRS, Paris. 377 pp.
- Winemiller, K.O. (1987). Feeding and reproductive biology of the currito, *Hoplosternum littorale*, in the Venezuelan llanos with comments on the possible function of the enlarged male pectoral spines. *Env. Biol. Fish.* **20**: 219–227.
- Wood, C.M., and Perry, S.F. (1985). Respiratory, circulatory and metabolic adjustments to exercise in fish. In R. Gilles (ed.). Circulation, Respiration, Metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 2–22.

## Short Communication

# Absolute feeding design, a realistic way for fish nutrient requirement determination

By Y. MOREAU<sup>1</sup>, A. CISSE and P. LUQUET

ORSTOM/CRO, 01 BP V 18, ABIDJAN 01, Côte d'Ivoire, <sup>1</sup>Present address: ORSTOM – HOT, BP 5045, F-34032 Montpellier, France

### Summary

The feeding experiment was designed on the basis of food allowance rather than on feed formulation. Food allowances are fixed in an attempt to provide the desired amount of nutrients per body mass of fish per day ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  or  $\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Therefore, the initial determination of optimum feeding ration is not required, and utilization of neutral feed complement (e.g. cellulose) is unnecessary. Data interpretation for such a design study is presented by a sample experiment for protein-energy requirements of a tilapia species, *Sarotherodon melanotheron*. The interrelationships of commonly used indices for growth and nutritional efficiency are discussed.

### Introduction

The determination of optimum nutrient requirements for fish farming and its scientific study is often painful because of the discrepancy of results reported by different authors, especially for optimum protein/energy requirements. This is mainly the result of differences in the experimental procedure and, first of all, the choice of the feeding rate which could vary from a specific percentage of biomass to ad libitum feeding strategy. To avoid this disagreement, protein/energy needs are no longer recommended as optimum protein and energy contents of the food, but rather as optimum protein/energy ratio in the feed (e.g. GARLING and WILSON 1976). Furthermore, multispecies comparison studies on nutrient requirements forced scientists to standardize the data. Results were then presented in terms of feeding allowance (nutrient amount per fish biomass per day) which in fact does not consider the nutrient concentration in the feed (COWEY and LUQUET 1983; TACON and COWEY 1985). The identification of nutrient requirements attempted in this study is more equivalent to the 'specific feeding rate' used in trophic relationship studies, and will provide much more homogeneous results (LUQUET and MOREAU 1990).

In an attempt to elude the interaction between chosen feeding rates and nutrient concentrations in feeds, we would like to propose an experimental design based on feeding allowance.

### Materials and methods

#### Composition of diets and rations calculation

As feeding experiments are designed on the basis of food allowances rather than food formulation, no care is needed in the overall composition of the food. So far, experimental diets should be regarded as the sum of different feeding ingredients, rather than a mix of

**Table 1. Sample of a complete feeding design: Feed compositions and feeding rates [% body weight] are calculated to provide 15 g protein per kg body weight per day (68% CP fish meal) associated with increasing amount of cassava meal as starch from 0 to 40 g \* kg<sup>-1</sup> \* day<sup>-1</sup>. \* Premix = vitamin's and minerals**

Feed name	AM0	AM10	AM20	AM30	AM40
<b>Ingredients (in parts)</b>					
Fish meal	21.95	21.95	21.95	21.95	21.95
Cassava meal	0.00	10.53	21.05	31.58	42.11
Soybean Oil	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Premix*	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Digestibility marker	0.48	0.71	0.93	1.15	1.37
Binder	0.73	1.06	1.39	1.72	2.06
<b>Total</b>	<b>24.21</b>	<b>35.29</b>	<b>46.37</b>	<b>57.45</b>	<b>68.53</b>
Feeding rate [%]	2.4	3.5	4.6	5.7	6.9

ingredients. The more practical way to calculate the contribution of each ingredient to the different diets is then to build them in terms of parts, even if the sum of the parts is not constant over all diets. Table 1 provides an example of five diets designed to give increasing amounts of starch associated to a fixed allowance of protein. Fish meal was used as protein supply, and cassava meal as the starch one. Parts were calculated to satisfy the desired pattern of daily allowances in grams per kg of fish. As protein allowance must be the same for all diets, the proportion of fish meal will remain constant, when cassava meal addition changes from one diet to another. Daily allowances for other nutrients (oil, vitamin and minerals) were calculated to agree with conventional or recommended use. Thus, even if their concentration in the diets varies from one to another, the amount provided each day (i.e. product of concentration and feeding rate) will be the same. This procedure agrees with the concept of daily requirements used by human nutritionists. However, special care was taken to incorporate digestibility markers (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) for subsequent determination of digestibility and binder in an attempt to obtain the same density and texture for all diets. Thus, contributions of marker and binder were calculated as a percentage of total parts in each diets.

Total parts for each diet give the daily amounts of food which must be distributed for the biomass of fish considered as a basis of the daily allowance calculation. Therefore, a specific ration was obtained for each diet. This 'one diet – one feeding rate' rule is certainly one of the main characteristics of this kind of design.

### Scheme of interpretation of anticipated results

Table 2 presents a brief summary of results which could be expected from the above described experimental design.

Growth should be impaired by restrained supply in both protein or energy, but excess of both can also induce growth restriction. If the protein allowance is above optimum level, growth will not be limited as long as full ingestion or assimilation of food is not damaged by excessive levels of energy. Assuming that voluntary consumption of food is monitored by energy content, allowance of a surplus of energy will induce a restriction of food intake involving a deficient net protein ingestion/assimilation even if the protein allowance is in excess. Furthermore, as the protein allowance nears optimum level, growth becomes more sensitive to total energy allowance.

If protein and/or energy allowances are below the optimum level, growth will be limited.

**Table 2. Anticipated results of qualitative comparisons of commonly used indices for growth and nutrition efficiency. Grade (0 to 3) refers to the quality of expected results for Growth (1st row, bold), Food Conversion Ratio (2nd row, roman) and Net Protein Utilization (3rd row, italic)**

Protein allowance		Energy allowance		
		Weak	Optimum	Excess
<b>Weak</b>	<b>Growth</b>	0	2	0
	FCR	1	2	0
	<i>NPU</i>	0	2	1
<b>Optimum</b>	<b>Growth</b>	0	3	1
	FCR	2	3	0
	<i>NPU</i>	0	3	1
<b>Excess</b>	<b>Growth</b>	0	3	2
	FCR	2	2	0
	<i>NPU</i>	0	2	2

With a restrained protein allowance, the best growth will be obtained when protein catabolism could be spared by non-protein energy allowance and when excessive energy allowance does not restrict protein ingestion.

Food conversion ratio, FCR, will be reduced with lowered growth. In addition, results for FCR will decline drastically when food ingestion/assimilation falls under excess supply of energy. Inversely, rather good FCRs may be obtained when energy allowance is weak and that for protein is high, as the expected poor growth will be associated with a small quantity of food with a high growth potential value.

Besides, net protein utilization index (NPU) will be very sensitive to the participation of protein in the catabolism, and the worst score will be obtained under weak non-protein energy allowance. On the other hand, a high energy allowance must maintain a good NPU as long as the protein ingestion/assimilation is not impaired.

### Example for an absolute feeding design

A trial experiment was performed with a native tilapia of Côte d'Ivoire (West Africa), *Sarotherodon melanotheron*, providing an increasing amount of starch (from 0 to 40 g per kg of fish per day) which was associated with a fixed protein allowance (15 g per kg fish per day). The five previously calculated diets were used. Table 3 provides their proximate analysis, and the corresponding protein, energy and lipid allowances.

Fish were produced in the rearing facility of our laboratory, a closed cycle freshwater system consisting of 10 110 l round and conic fibreglass tanks. Five days before the beginning of the experiment, fish were randomly distributed in 10 batches of 12 fish each, and individual weights were determined ( $4.05 \text{ g} \pm 0.7$ ). Prior to handling, water level was lowered and fish were anaesthetized (2-phenoxyethanol, 1.5 ml/10 l). A very good recovery was observed as restart of feeding occurred in a few hours. Ten fish were frozen for later determination of body composition. Two replicates of five treatments were randomly assigned. Individual weights were followed weekly and feeding rates were adjusted at this time.

After 4 weeks, fish were killed, individually weighed, and body compositions were determined from pooled fish stocks. During the experiment no mortality was recorded,

**Table 3.** Proximate analysis of diets, and corresponding daily allowances for protein, energy and lipids. Analytical methods: Kjehldahl ( $N \times 6.25$ ) for protein, calorimetric bomb for energy, enzymatic determination for starch (BEUTLER 1988) and Soxhlet (Hexan extract) for lipids

Feed name	AM0	AM10	AM20	AM30	AM40
Components [% of DM]					
Crude proteins	61.2	43.5	33.0	26.1	22.7
Energy [ $\text{kJ} \times \text{g}^{-1}$ ]	21.1	19.9	19.2	18.7	18.5
Starch	2.73	23.5	35.2	44.5	49.5
Lipids	10.1	7.2	5.2	4.3	3.7
Daily allowances [ $\text{g}$ or $\text{kJ} \times \text{kg}^{-1} \times \text{day}^{-1}$ ]					
Crude proteins	14.8	15.3	15.3	15.0	15.6
Energy	512	702	890	1073	1265
Starch	0.7	8.2	16.2	25.4	34.2
Lipids	2.4	2.6	2.4	2.5	2.6

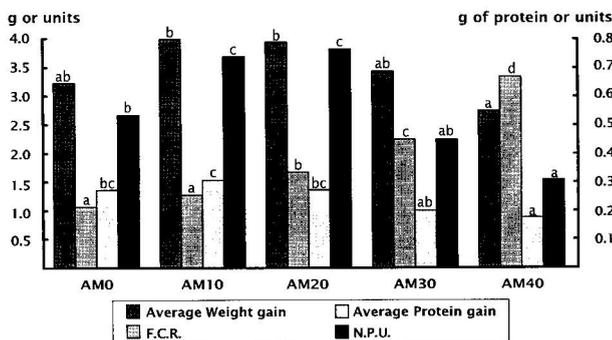
water temperature was maintained between 28 and 30°C, and no adverse water conditions were observed (oxygen or total ammonia).

## Results

Figure 1 summarizes the results obtained for growth (weight gain and protein gain), food conversion ratio and net protein utilization. All growth data and indices were affected when daily allowance of starch increased to and above 25.4  $\text{g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{day}^{-1}$ . These worst findings are specially pronounced for FCR and body protein gain ( $P < 0.05$ ). Similar growth results were obtained for starch allowance of 8.2 and 16.2  $\text{g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{day}^{-1}$ . Total body weight gain of fish receiving no starch was similar to those receiving starch supplemented diet, simultaneously, fixation of protein was lower, and FCR and NPU were slightly worsened. Protein allowance seems to be sufficient to sustain growth close to the best of them, but significantly lower protein fixation implies a greater participation of protein to catabolism which could be spared by an additional small amount of starch.

## Discussion and conclusion

The unsatisfactory results obtained with diet AM30 suggest that food ingestion is impaired by such high energy allowances. Cassava meal is reported to be well utilized by tilapia at



**Fig. 1.** Average body weight increase and food conversion ratio, FCR (left Y axis), body protein increase and net protein utilization, NPU (right Y axis) obtained for fish ( $4.05 \text{ g} \pm 0.7$  initial body weight) fed with five different starch allowances (0, 10, 20, 30, 40  $\text{g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{day}^{-1}$ ) associated with a fixed protein allowance (15  $\text{g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{day}^{-1}$ ) for 4 weeks. Similar letters above bars indicate homogeneous groups at  $P < 0.05$  (Duncan test, Stat-graphics® v. 5.0 software package)

inclusion rates as high as 30% to 60% (WEE and NG 1986). Therefore, substituting starch by other energy yielding substrates such as lipids will not improve performance. This assumption has recently been confirmed by results obtained on *Oreochromis niloticus* for which carbohydrates appear to be a better energy supply than lipids (SHIMENO et al. 1993). Therefore, energy allowance corresponding to diet AM30 was certainly a supply above the optimal level.

From this limited 'one way trial', with no modification of protein allowance, we conclude a maximum sustainable energy allowance ( $890 \text{ kJ} * \text{kg}^{-1} * \text{day}^{-1}$ , diet AM20) supported by the species and a minimum protein allowance required ( $15 \text{ g} * \text{kg}^{-1} * \text{day}^{-1}$ ).

One of the immediate advantages of such an absolute feeding design is that it does not require an initial determination of the optimal feeding rate. On the other hand, the utilization of fillers (e.g. cellulose), which could present controversial guarantees of neutrality, is not necessary. Furthermore, the approach taken can largely meet the suggestions made to optimize feed composition while also limiting waste effluents from fish farms (CHO 1993).

Referring to the means of calculating the diet, an absolute feeding design seems to induce easier methods to obtain experimental feed composition. However, for feed manufacturers this may not be agreeable with their linear programming procedure used to compute formulations cost effectively. In fact, the food allowance concept may be operated with the disappearance of the constraint which required that the sum of all components must be equal costwise. This could lead to a reduction of the cost of feed per amount of protein given. Nevertheless, as a specific feeding rate is not definitively recommended by this method for all kinds of feed, this could induce some disagreement in the feeding practice for the fish farmer.

In summary, the proposed absolute feeding design appears to be suitable for protein/energy requirement determinations. However, special attention should be paid to some nutrients whose proportion in the feed is important. This can be the case for amino acids, where catabolic or anabolic utilization of essential amino acids is related to their pattern and their availability in the feed (ROBINSON et al. 1980, 1984)

## References

- BEUTLER, H.O., 1988: Stach. In: BERGMAYER, J.; GRASSL M. (eds), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Edn, Vol. 6. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- CHO, C.Y., 1993: Digestion of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. In: *Fish Nutrition in Practice*, pp. 365–374. Biarritz, France, June 24–27 1991. Eds INRA, Paris, Les Colloques no. 61.
- COWEY, C.B.; LUQUET, P., 1983: Physiological basis of protein requirements of fishes. In: ARNAL, M.; PION, R.; BONIN, D. (ed.), *Protein Metabolism and Nutrition*, Vol. 1, pp. 365–384. INRA, Paris.
- GARLING, D.L. JR.; WILSON, R.P., 1976: Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerling, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.* **106**: 1368–1375.
- LUQUET, P.; MOREAU, Y., 1990: Energy-protein management by some warmwater finfishes. In: *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti, February 20–March 4 1989, AQUACOP. IFREMER, Actes de Colloque, **9**: 751–755.
- ROBINSON, E. H.; WILSON, R.P.; POE, W.E., 1980: Re-evaluation of the lysine requirement and lysine utilisation by fingerling channel catfish. *J. Nutr.* **110**: 2313–2316.
- ROBINSON, E. H.; POE, W.E.; WILSON, R.P., 1984: Effects of feeding diets containing an imbalance branched-chain amino acids on fingerling channel catfish. *Aquaculture*, **37**: 51–62.
- SHIMENO, S.; MING, D.C.; TAKEDA, M., 1993: Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**: 827–833.
- TACON, G.J.; COWEY, C.B., 1985: Protein and amino acid requirements. In: TYTLER, P.; CALOW, P. (eds), *Fish Energetic: New Perspectives*, pp. 155–183. Croom Helm, London.
- WEE, K.L.; NG, L.T., 1986: Use of cassava as an energy source in a pelleted feed for tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture and Fisheries Management* **17**: 129–138.

# Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of $\alpha$ -amylases from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*

Yann Moreau<sup>a,\*</sup>, Véronique Desseaux<sup>b</sup>, Roger Koukikolo<sup>b</sup>,  
Guy Marchis-Mouren<sup>b</sup>, Marius Santimone<sup>b</sup>

<sup>a</sup>IRD, Institut de Recherche pour le Développement c / o Institut Méditerranéen de Recherche en Nutrition, Faculté de Sciences et Techniques de St Jérôme, Université d'Aix-Marseille, av. Escadrille Normandie-Niemen, F-13397, Marseille cedex 20, France

<sup>b</sup>Institut Méditerranéen de Recherche en Nutrition, Faculté de Sciences et Techniques de St Jérôme, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France

Received 1 August 2000; received in revised form 20 November 2000; accepted 4 December 2000

---

## Abstract

$\alpha$ -Amylases from the intestinal cavity of two tilapia species, *Oreochromis niloticus* (ONI-AMY) and *Sarotherodon melanotheron* (SME-AMY), were purified using ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography and chromatofocusing procedures. The purification was approximately 100-fold. The amylolytic activity, specific activity, product distribution, pH and temperature profile of ONI-AMY and SME-AMY are quite similar. The molecular mass differs slightly: 56 600 (ONI-AMY) vs. 55 500 (SME-AMY). As shown by isoelectric focusing analysis, both amylases contain two isoforms A and B with distinct pI: 7.2 (A) and 7.8 (B), vs. 8.3 (A) and 8.8 (B), respectively. It was not possible to isolate B, since B converts into A with time. The kinetics of the inhibition of ONI-AMY and SME-AMY activity by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD) were investigated using amylose as the substrate. Statistical analysis of the kinetic data expressed using a general velocity equation and assuming rapid equilibrium showed that the inhibition is of the mixed noncompetitive type. Similar results were obtained with ONI-AMY and SME-AMY.  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD are stronger inhibitors than  $\alpha$ -CD. ONI-AMY and SME-AMY are then closely related and show the general features common to the members of the  $\alpha$ -amylase class (family 13). They enable ONI and SME tilapias to digest starch in food. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Tilapia; *Oreochromis niloticus*; *Sarotherodon melanotheron*;  $\alpha$ -Amylase; Kinetics; Cyclodextrin; Starch; Nutrition; Digestion

---

**Abbreviations:** SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; IEF, isoelectric focusing; Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane; HPAEC-PAD, high performance anionic exchange chromatography with pulse amperometric detector;  $\alpha$ -CD,  $\alpha$ -cyclodextrin or cyclohexaamylose;  $\beta$ -CD,  $\beta$ -cyclodextrin or cycloheptaamylose;  $\gamma$ -CD,  $\gamma$ -cyclodextrin or cyclooctaamylose; ONI, *Oreochromis niloticus*; SME, *Sarotherodon melanotheron*; AMY,  $\alpha$ -amylase

\* Corresponding author. Tel.: +33-4-9128-8136; fax: +33-4-9128-8440.

E-mail address: yann.moreau@mpl.ird.fr (Y. Moreau).

## 1. Introduction

Fish farming is of special interest as a means of food production, especially in developing countries, where animal proteins are urgently needed. The general aim of our study is to determine which diet yields optimum fish growth and to what extent carbohydrate, in the form of starch in particular, can be used to replace protein in the diet as an energy source (Luquet and Moreau, 1989; Moreau et al., 1993). In the present study, we addressed the following question: Do fishes, especially tropical ones such as *Oreochromis niloticus* (ONI) and *Sarotherodon melanotheron* (SME), contain  $\alpha$ -amylase (AMY) which is active enough to ensure dietary starch digestion in conjunction with other digestive enzymes? In the present work, amylose, which contains only  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) bonds, was used instead of starch as a substrate to check amylase activity. Amylase activity was first determined in the various organs of the intestinal cavity. An extraction method was developed and ONI-AMY and SME-AMY were purified in various stages. The results of a preliminary study on the purification of the ONI amylase have been previously published (Yamada et al., 1991). The results of some structural and kinetic studies, especially on the inhibition by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin, were used to further characterize and compare the  $\alpha$ -amylases of these two species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Tilapias from the Centre de Recherches Océanologiques in the Ivory Coast (Abidjan) were used: *O. niloticus*, Bouaké strain, and *S. melanotheron*, lagune Ébrié strain (Pouyaud and Agnese, 1995). They were bred in aquariums and fed a commercial diet (Aqualim<sup>®</sup>, 45% crude protein) for several weeks until reaching an average mass of 50 g. The contents of their intestinal cavity, except for the spleen and gonads, were collected, frozen and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  before use. The Waring blender was purchased from Moulinex<sup>®</sup>. Either Minisart<sup>®</sup> or Sartorius<sup>®</sup> membranes were used for the filtration steps. Sepharose<sup>®</sup> 6B epoxy activated gel was from Pharmacia<sup>®</sup>. The affinity gel Sepharose<sup>®</sup> 6B- $\alpha$  CD was prepared according to the manufacturer's instructions (Silvanovich

and Hill, 1976). Biolyte<sup>®</sup> was from Biorad<sup>®</sup>.  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin were from Sigma<sup>®</sup>. Analysis of these compounds by HPAEC-PAD (Dionex system) showed the presence of no significant impurities. Amylose (Type III, potato) was purchased from Sigma<sup>®</sup>, and its degree of polymerization, DP 4900, was determined on the basis of the intrinsic viscosity (Chen et al., 1997). Soluble potato starch (ref. 101257) and insoluble maize starch (ref. 11686) were from Merck<sup>®</sup>. The protein Bioassay<sup>®</sup> was obtained from Biorad<sup>®</sup>. Polybuffer<sup>®</sup> anion exchange gel 94, Polybuffer<sup>®</sup> 96 and Polybuffer<sup>®</sup> 74 were purchased from Pharmacia<sup>®</sup>. The protease inhibitor cocktail was from Sigma<sup>®</sup> (ref. P8340).

### 2.2. Methods

Protein concentration was measured using either Bradford's method (Bradford, 1976) or absorbance at 280 nm ( $\epsilon_{280}^{1\%} = 25$ ). SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) using the Mini Protean II<sup>®</sup> apparatus from Biorad<sup>®</sup>. The acrylamide concentration was 10% w/v, bis-acrylamide was 2.67% w/v, and the protein migration was performed for 45 min at 200 V in the running buffer previously cooled to  $4^{\circ}\text{C}$ . The gels were stained with Coomassie Blue CBBR-250 reagent and destained in 10% acetic acid/25% ethanol/65% water (Thurston and Henley, 1996). Isoelectric focusing analyses were carried out using the same apparatus as for the SDS-PAGE procedure, with the protocol described by Robertson et al. (1987). The appropriate pH gradient was obtained by mixing two solutions, Biolyte<sup>®</sup> 3/10 and Biolyte<sup>®</sup> 7/9, in a 40:60 v/v proportion. Isoelectric focusing gels were stained in the same way as the SDS-PAGE gels after washing them in order to remove the ampholytic compounds. The N-terminal sequence was analysed and the amino acid composition determined after blotting the gel onto a PVDF membrane (Biorad<sup>®</sup>). The amino acid sequence was determined according to Edman degradation which was carried out on an Applied Biosystems Sequencer<sup>®</sup> model 470 according to Hewik et al. (1981). The amino acid composition was determined using the PICOTAG method (Bidingmeyer et al., 1984). The molecular mass was determined by MALDI mass spectrophotometry using the Voyager DE-RP spectrometer (Percep-

tive Biosystems Inc.). The sample (0.7  $\mu\text{l}$  in 50% v/v acetic acid) was directly mixed on the plate with an equal volume of sinapinic acid. The molecular mass was also calculated from the amino acid composition as described by Delaage (1968).

Kinetic experiments were performed at 30°C in 20 mM sodium phosphate pH 6.9 containing 6 mM NaCl and 1 mM sodium azide. More than 10 concentrations of amylose were used (0.06–1.5  $\mu\text{M}$ ; or 0.05–1.6  $\text{g l}^{-1}$ ). Reactions were initiated by adding 0.3 nM  $\alpha$ -amylase with or without cyclodextrin (5–40 mM) to the above medium. The final volume was 0.5 ml. The reactions were stopped at appropriate time intervals (2, 4 and 6 min) by mixing the preparations immediately with 0.5 ml chilled 0.38 mM sodium carbonate containing 1.8 mM cupric sulfate and 0.2 M glycine, and the medium was kept on ice. The reducing power was determined by reductometry (Dyger et al., 1965). Appropriate blanks were prepared at zero time. All the experiments were repeated three or four times. The initial velocity was determined from the slope of the linear part of the kinetic curves, as calculated by linear regression, which may be limited to 4 min in a few cases (nine experimental points).

All the statistical analyses were performed using either the REG, NLIN or GLM procedure from the SAS/STAT software package (SAS Institute Inc., 1989).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Tissue localization of amylase activity

Amylolytic activity was checked in several tissues. Each of the organs collected from the intestinal cavity of tilapia was homogenized at 4°C in a Waring blender ( $3 \times 1$  min) with two volumes of the extraction buffer (20 mM sodium phosphate pH 6.9 containing 6 mM NaCl). The homogenate was centrifuged for 10 min at  $10000 \times g$  and at 4°C, and the supernatant assayed to determine the amylase activity. Only three tissues (liver, mesenteric tissue and intestine) were found to contain any significant amount of amylase. No activity was recovered from the stomach. Although large inter-individual differences in the total activity (15–48  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) were observed, the activity was found to be distributed in roughly equal amounts among all the tissues from the eight SME fishes studied (Fig. 1). In addition, when the intestine was cut into two halves, similar activity was found to occur in both parts and no differences were observed depending on whether the intestinal contents were collected before or after a meal. No significant differences were found to exist between SME and ONI organs.

The IEF analysis and subsequent iodine staining procedures which were carried out on intestine extract, showed that two active compounds (possibly isoforms) are present in ONI-AMY and

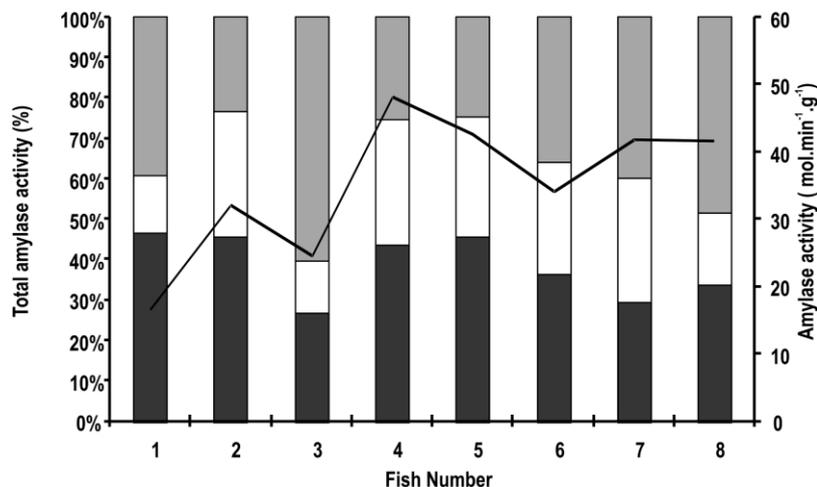


Fig. 1. Distribution histogram of amylase activity between liver, intestine and mesenteric tissue from 8 tilapias (*Sarotherodon melanotheron*). (■) Liver, (□) intestine, (grey box) mesenteric tissue. The solid line indicates the total activity in each fish. Activities are given per gram of fresh tissue.

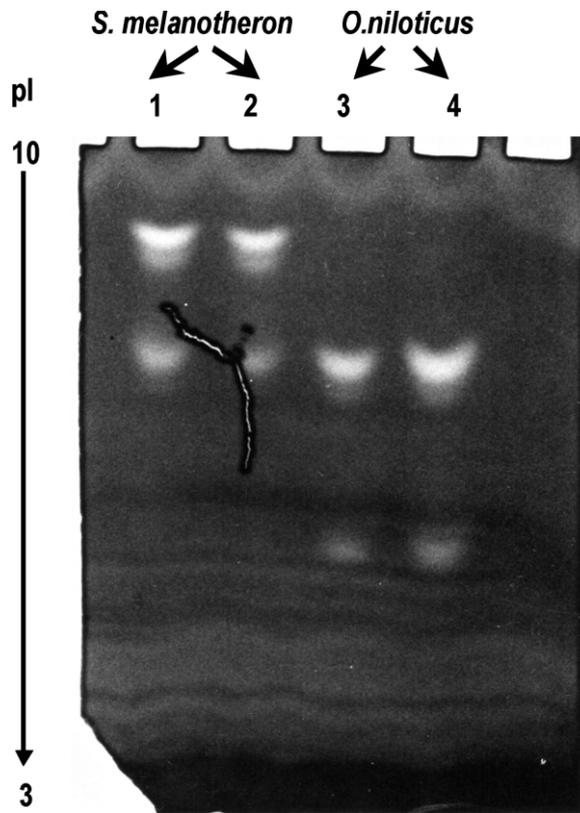


Fig. 2. Isoelectrofocalization analysis and iodine staining of *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* intestinal extracts. Prior to the amylase detection procedure, the gel was soaked in 1% starch solution for 12 min at room temperature. Activity showed up in the form of a clear zone after subsequent soaking in 1.3%  $I_2/3\%$  KI (w/v) according to Lacks and Springhorne (1980). Lane 1, *S. melanotheron*; lane 2, *S. melanotheron*; lane 3, *O. niloticus*; lane 4, *O. niloticus*. The amount of sample was adjusted in order to analyze an  $\alpha$ -amylase activity equivalent to  $5 \text{ nmol min}^{-1}$ .

SME-AMY, the major one of which, B, is more basic than the minor one, A (Fig. 2). The major ONI-AMY component and the minor SME-AMY component migrate at approximately the same position in the gel.

### 3.2. Purification of $\alpha$ -amylases (ONI-AMY and SME-AMY)

All the experiments were carried out at  $4^\circ\text{C}$ . Frozen tissue (liver, mesenteric tissue and intestine) was suspended in the extraction buffer (1:2, v/v) and homogenized in a Waring blender as above. The homogenate was centrifuged for 15 min at  $10\,000 \times g$  and at  $4^\circ\text{C}$ . The pellet containing no amylase activity and the lipid upper phase

were discarded and the aqueous phase was collected and lyophilized. The powder thus obtained was kept at  $-20^\circ\text{C}$ . In the next step, 500 mg of lyophilizate were dissolved in 15 ml of 20 mM sodium phosphate (pH 6.9) containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , and then filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  membrane. The insoluble fraction on the filter containing no activity was discarded. The filtrate was subjected to ammonium sulfate fractionation. Supernatant showing amylase activity was separated from the 30% ammonium sulfate precipitate and finally the enzyme was salted out at 60% saturation and centrifuged (15 min,  $10\,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ ). The pellet was solubilized in 5 ml of the above buffer and dialyzed overnight against 2 l of this buffer (C60). In the next step, this fraction was loaded onto a Sepharose® 6B  $\alpha$ -CD column equilibrated with the same buffer. The column washed with this buffer elutes a wide peak (fraction I). No amylase activity was present in this fraction.  $\alpha$ -Amylase (fraction II) was eluted by running the column with 20 ml of the equilibration buffer containing 1% (w/v)  $\beta$ -CD (Fig. 3). A similar elution pattern was obtained with ONI and SME samples. The last step consisted of chromatofocusing fraction II. ONI fraction II and SME fraction II were dialyzed for 36 h against the equilibration buffer ( $3 \times 2 \text{ l}$ , see legend Fig. 4) and loaded onto the chromatofocusing column. The column was developed with Polybuffer®, yielding a pH gradient as indicated in Fig. 4. The elution pattern contains two active peaks ONI-1 and ONI-2 (Fig. 4a), SME-1 and SME-2 (Fig. 4b), eluting at pH 7.2 and 7.4, pH 8.2 and 8.5, respectively. The amount of each collected fraction as indicated by the vertical bar depends on the preparation. The specific activity does not differ significantly between ONI-AMY fraction 1 (1360), ONI-AMY fraction 2 (1530), SME-AMY fraction 1 (1400) and SME-AMY fraction 2 (1600). The purification factor is 75-fold with a 33% yield in the case of ONI-AMY and 150-fold with a 21% yield in that of SME-AMY (Table 1).

### 3.3. Comparison of *O. niloticus* and *S. melanotheron* $\alpha$ -amylase: the isoform status

The following two questions were next addressed in the present study: In what respects do ONI-AMY and SME-AMY differ? And can we isolate and characterize A and B isoforms?

SDS-PAGE analysis of fraction ONI-II, ONI-1,

ONI-2, SME-II, SME-1 and SME-2 showed the existence of a single major component with a molecular weight of approximately 55 kDa (Fig. 5a lane 3, 4, 6, 7). The amino acid compositions of ONI(1+2)-AMY and SME(1+2)-AMY show some differences as regards Pro (34-31), His (17-11), Tyr (11-7), Leu (37-31), Ile (27-23), see Table 2. Ser and Thr which are in part degraded during acid hydrolysis were not considered. The protein molecular mass calculated from the amount of each amino acid worked out at 53.0 kDa (ONI-AMY) and 51.7 kDa (SME-AMY). A more exact value was obtained by performing mass spectrometry analysis, where a narrow peak was obtained, which reflected the mass homogeneity of the samples (not shown). The value of the ONI-AMY molecular mass (56 600 Da) is approximately 1 kDa higher than that of SME-AMY (55 500 Da). This very closed value show than no

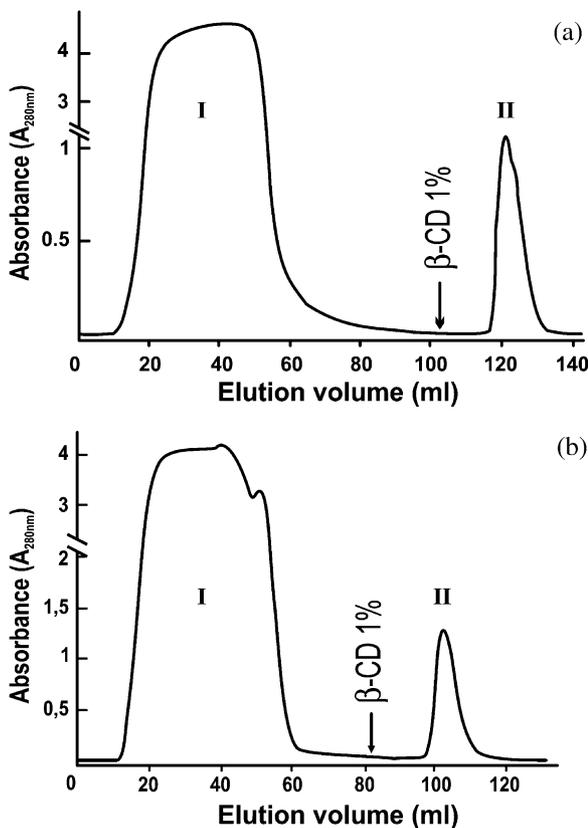


Fig. 3. Affinity chromatography pattern of ONI  $\alpha$ -amylase (a) and SME  $\alpha$ -amylase (b). 6B  $\alpha$ -CD Sepharose<sup>®</sup> column: h = 110 mm,  $\varnothing$  = 16 mm; sample: 171 mg in 31 ml; equilibration buffer: 20 mM sodium phosphate pH 6.9 containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; elution buffer: 20 ml  $\beta$ -CD 1% in equilibration buffer when indicated; flow rate: 0.4 ml  $\text{min}^{-1}$ .

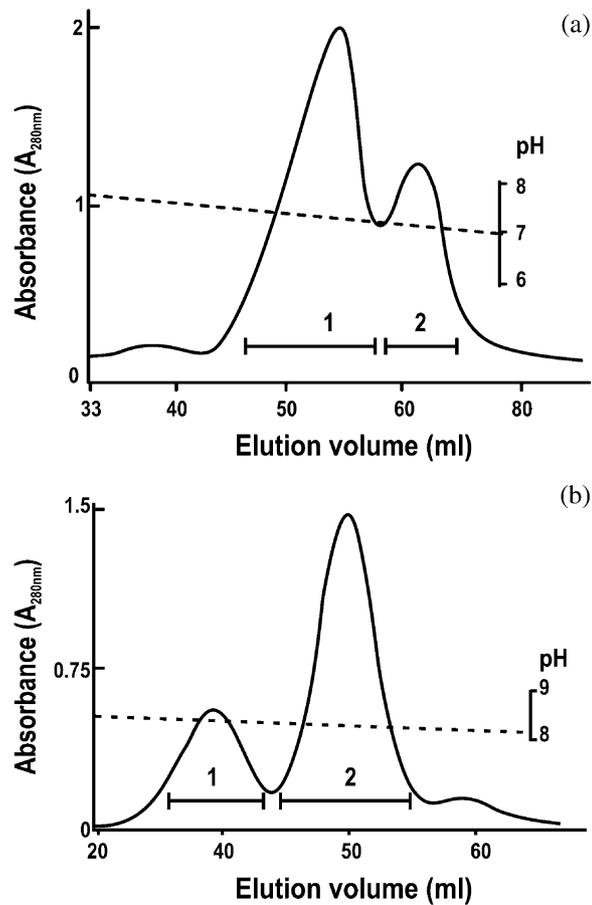


Fig. 4. Chromatofocusing pattern of fraction ONI-II (a) and SME-II (b) (a) PBE 94 column: h = 300 mm,  $\varnothing$  = 10 mm; sample: 22 mg in 11 ml equilibration buffer; equilibration buffer: 25 mM Tris-acetate pH 8.5; elution buffer: PB 96, PB 74 and water (3:7:90) with acetic acid (pH 5); flow rate: 0.3 ml  $\text{min}^{-1}$ . Dashed line: pH gradient. Horizontal bars indicate the collected fraction. (b) Same legend as for ONI-II except: sample: 2.2 mg in 5 ml equilibration buffer; equilibration buffer: 25 mM ethanolamine-HCl buffer pH 9.4; elution buffer: PB96 and water (10:90) with HCl pH 7.5.

non-protein moiety (glycosyl,...) is present. The N-terminal residue is blocked in all the isoforms of both species.

The isoelectric point of ONI-AMY and SME-AMY was determined exactly using isoelectric focusing procedures. Two components, A and B, with  $pI$  values of 7.8 and 8.2, respectively, were found to be present in fraction ONI-1. The SME-1 values obtained were 8.2 and 8.8 (Fig. 5b). In fraction ONI-2 and SME-2, a single acidic form (A), was present ( $pI$  7.8 and 8.2). It emerges that in both tilapia species, two isoforms A and B are present, in line with what was found to occur in

Table 1  
Purification of tilapia  $\alpha$ -amylases

Purification steps	Protein (mg)	Activity ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Yield (%)	Specific activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Purification factor
<b>ONI-AMY</b>					
Crude extract <sup>a</sup>	1840	34 700	–	20	–
C60 <sup>b</sup>	171	28 100	80	160	8
Affinity	22	22 000	63	1000	50
<b>Chromatofocusing</b>					
Fraction 1	5.9	8600	25	1460	75
Fraction 2	1.8	2800	8	1530	75
<b>SME-AMY</b>					
Crude extract <sup>c</sup>	750	5700	–	10	–
C60	47	2700	47	60	6
Affinity	2.2	2200	39	1000	100
<b>Chromatofocusing</b>					
Fraction 1	0.6	800	14	1400	140
Fraction 2	0.25	400	7	1600	160

<sup>a</sup>63 g of fresh tissue.

<sup>b</sup>60% ammonium sulfate pellet.

<sup>c</sup>30 g of fresh tissue were used.

the crude extract (Fig. 2). It seems most likely that this two forms A and B are coded by a single gene as described for another fish species, the winter flounder (Douglas et al., 2000). Adding a protease-inhibitor cocktail ( $100 \mu\text{l g}^{-1}$  fresh tissue) throughout the purification steps did not affect the isoform pattern. A and B have the same molecular mass and functional properties, and they are distinguishable only by their *pI*. In addition, isoform A is stable, whereas during the experiment a part of B was very probably converted into A in order to reach an equilibrium, this would explain why A is present in ONI-1 and SME-1. In ageing experiments lasting for within 2 months, fraction ONI-1 and SME-I were maintained in the equilibrium buffer at  $4^\circ\text{C}$ , IEF analysis at the end shows that no B was present any more. We concluded that in this period of time all B was converted to A. However, the *pI* difference between B and A and the biological significance of this difference, if any, still remain to be explained.

### 3.4. Functional characterization

Insoluble maize starch was digested for 60 min at  $30^\circ\text{C}$  in the extraction buffer ( $25 \text{ g l}^{-1}$ ) with 5 nM ONI-AMY (fraction 1 + 2) under constant gentle agitation. A  $200\text{-}\mu\text{l}$  sample was taken at the time indicated, transferred onto ice, centrifuged (5 min,  $5000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ ) to eliminate the

insoluble starch and high molecular weight maltodextrins and finally heated for 5 min at  $100^\circ\text{C}$  to eliminate any residual amylolytic activity. Solubilized carbohydrate was analysed by HPAEC-PAD (Al Kazaz et al., 1998). Glucose (18%), maltose (50%) and maltotriose (28%) were the main oligosaccharides detected. The same products were present, respectively 17%, 49% and 28%, when starch was digested with SME-AMY.

The amylase activity (initial velocity) was measured at various pH levels, in the pH 4 to 9 range, using citrate (pH 4–8), phosphate (pH 6–8) and Tris-HCl buffer (pH 6.5–9), and at saturated amylose concentration ( $1.2 \mu\text{M}$ ). ONI-AMY (fraction 1 + 2) and SME-AMY (fraction 1 + 2) give similar bell shaped profiles. The optimum pH was found to be 7.0. Still the SME-AMY activity decreased more slowly, however, with increasing pH levels. The effects of the temperature on the two AMY activities were also determined (not shown). The optimum temperature ( $35^\circ\text{C}$ ) is identical for ONI-AMY and SME-AMY (fraction 1 + 2). No activity was observed at temperatures above  $55^\circ\text{C}$ , and 40% of maximal activity was still determined at  $20^\circ\text{C}$ .

### 3.5. Kinetics of inhibition

The effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin on the ONI-AMY and SME-AMY catalyzed hydrolysis

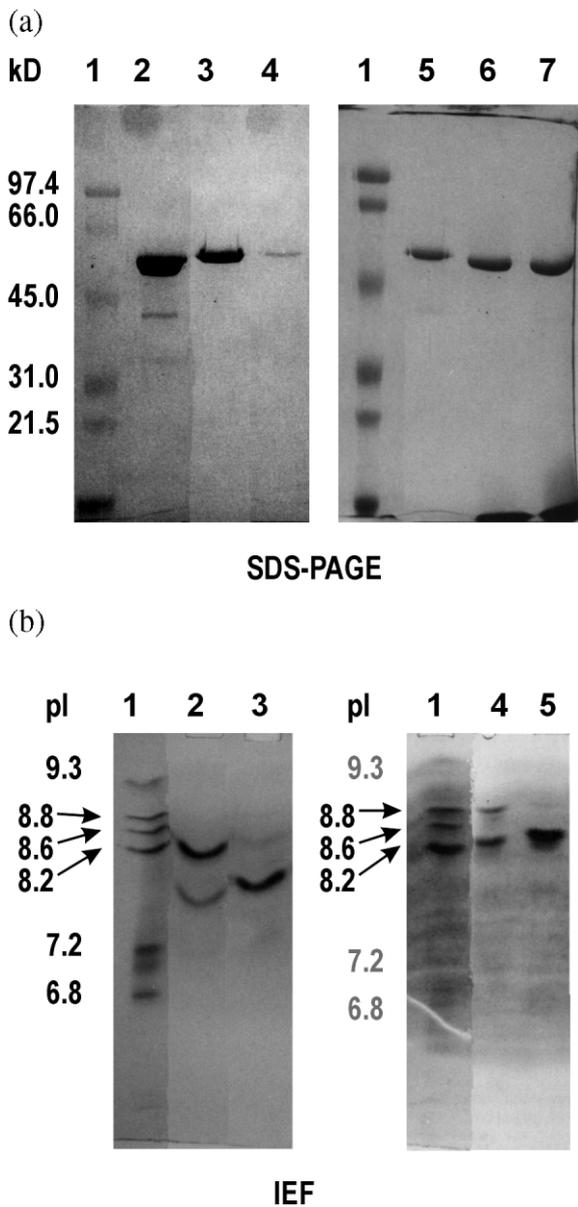


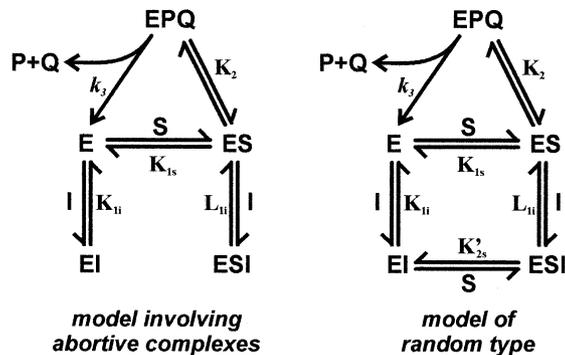
Fig. 5. Electrophoretic analysis of ONI and SME fractions. (a) SDS-PAGE analysis of fraction ONI-II (affinity chromatography), ONI-1 and ONI-2 (chromatofocusing), and of fraction SME-II, SME-1 and SME-2. Lane 1, protein markers; lane 2, fraction ONI-II; lane 3, fraction ONI-1; lane 4, fraction ONI-2; lane 5, fraction SME-II; lane 6, fraction SME-1; lane 7, fraction SME-2. (b) IEF analysis of fraction ONI-1 and ONI-2 and SME-1 and SME-2. Lane 1, pI markers; lane 2, ONI-1; lane 3, ONI-2; lane 4, SME-1; lane 5, SME-2. One microgram of each pooled fraction was analysed. The gel (1 mm) and the solution were prepared according to Robertson (Robertson et al., 1987) using a mixture of Biolyte 3/10 and Biolyte 7/9 (40:60) to establish a pH gradient from 3 to 10 with an higher resolution between 7 and 9.

of amylose were studied in parallel. The initial velocity was measured at various substrate con-

centrations ( $[S] = 0.06\text{--}1.5 \mu\text{M}$ ) in the absence and presence of inhibitor,  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrin, at fixed concentrations ( $[I] = 5\text{--}40 \text{ mM}$  for  $\alpha$ -CD,  $1\text{--}10 \text{ mM}$  for  $\beta$ -CD and  $0.1\text{--}3 \text{ mM}$  for  $\gamma$ -CD). The initial velocity fits the following equation 1 (Al Kazaz et al., 1996), assuming rapid equilibrium to occur:

$$v/[E]_0 = \frac{k_{\text{cat}}[S]}{K_m(1 + [I]/K_{1i}) + [S](1 + [I]/L_{1i})} \quad (1)$$

In this equation,  $K_{1i}$  and  $L_{1i}$  are dissociation constants. Equations with  $[I]^2$ ,  $[I]^3$  do not improve the fit between the data and the model described by Eq. (1), whose denominator is of the first order with respect to  $[I]$ . This equation corresponds to the following simplest models, which either involve abortive complexes or are of the random type (Al Kazaz et al., 1996):



We have no direct evidence showing the validity of either model, but it seems most likely that tilapia AMY behaves like porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, which was found upon performing X-ray analysis on the complex to bind  $\alpha$ -CD at the active site (Larson et al., 1994). The random type model has to be excluded, since this model predicts that the inhibitor,  $I$ , cannot bind at the active site in the  $EI$  complex. The kinetic parameters determined for ONI-AMY were as follows:  $k_{\text{cat}} = 1.20 \times 10^3 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 0.15\text{--}0.21 \pm 0.02 \mu\text{M}$  ( $0.12\text{--}0.17 \text{ g l}^{-1}$ ). The  $K_{1i}$  values obtained were  $3.03 \pm 0.37 \text{ mM}$ ,  $0.55 \pm 0.06 \text{ mM}$  and  $0.18 \pm 0.01 \text{ mM}$  for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD respectively. The  $L_{1i}$  values obtained were  $33.3 \pm 8.9 \text{ mM}$ ,  $5.56 \pm 0.93 \text{ mM}$  and  $3.70 \pm 0.96 \text{ mM}$  for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD, respectively. The parameter values obtained with SME-AMY were similar,  $k_{\text{cat}} =$

Table 2  
Amino acid composition of ONI-AMY and SME-AMY<sup>a</sup>

Amino acids	Amino acid composition (pmol)		Number of residues in the calculated molecular mass	
	<i>O. niloticus</i>	<i>S. melanotheron</i>	<i>O. niloticus</i>	<i>S. melanotheron</i>
Aspartic acid or Asparagine	2530	2310	76	74
Glutamic acid or Glutamine	1470	1350	44	43
Serine	870	980	26	31
Glycine	2470	2170	74	69
Histidine	350	340	17	11
Arginine	890	860	27	28
Threonine	570	640	11	20
Alanine	960	890	29	28
Proline	1130	970	34	31
Tyrosine	580	530	11	17
Valine	1190	1050	36	34
Methionine	380	350	11	11
Isoleucine	890	720	27	23
Leucine	1020	960	37	31
Phenylalanine	700	600	21	19
Lysine	460	400	14	13
Calc. molecular mass	51 000	51 700		

<sup>a</sup>Compositions were determined in 28  $\mu\text{g}$  for *Oreochromis niloticus*  $\alpha$ -amylase and 21.5  $\mu\text{g}$  for *Sarotherodon melanotheron*, and molecular and the number of residues calculated according to Delaage (1968).

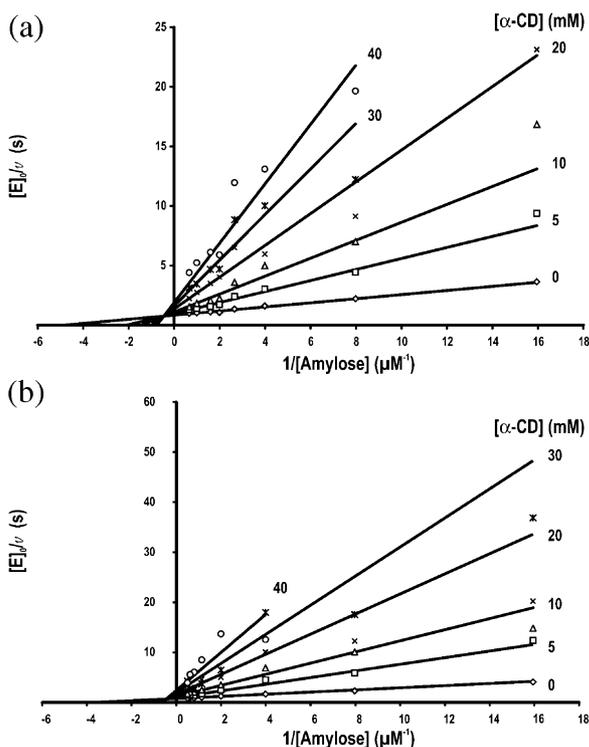


Fig. 6. Lineweaver–Burk plots obtained for ONI-AMY (a) and SME-AMY (b). Reciprocal plots obtained with variable amylose concentrations at a fixed  $\alpha$ -CD concentration as indicated in the right part of the graph. This plot was calculated from  $\alpha$ -CD data. The experimental values are averages of three sets of data.

$0.88 \times 10^3 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 0.16\text{--}0.25 \pm 0.02 \mu\text{M}$  ( $0.13\text{--}0.20 \text{ g l}^{-1}$ ). The  $K_{i1}$  values obtained with SME-AMY were  $2.40 \pm 0.43 \text{ mM}$ ,  $0.35 \pm 0.06 \text{ mM}$  and  $0.16 \pm 0.02 \text{ mM}$  for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD, respectively, whereas  $L_{i1}$  values obtained were  $19.4 \pm 4.8 \text{ mM}$ ,  $2.44 \pm 0.54 \text{ mM}$  and  $1.55 \pm 0.32 \text{ mM}$ , respectively. The inhibition is of the mixed noncompetitive type and two types of inhibitory complexes, EI and ESI, are present. The Lineweaver–Burk plots drawn up according to the model based on Eq. (1) and thus on statistical analysis corroborate this conclusion. Straight lines were obtained with slopes increasing with the inhibitor concentration ( $[I] = 0\text{--}40 \text{ mM}$ ). These lines intersect at a single point located in the second quadrant (Fig. 6a).  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD, each give similar plots. The secondary plots, slopes and intercept vs. inhibitor concentrations, were also linear (not shown). Similar plots were obtained with SME-AMY (Fig. 6b).

The effects of the inhibitor concentration on the catalytic efficiency of ONI-AMY are given in Table 3.  $\beta$ -CD (1 mM) inhibits ONI-AMY by 68%, and  $\gamma$ -CD inhibits ONI-AMY catalyzed amylose hydrolysis to roughly the same extent.  $\alpha$ -CD is about five times less efficient than  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD. The results obtained with SME-AMY are quite similar (Table 3). The inhibition of porcine

Table 3  
Effects of the inhibitor concentrations on catalytic efficiencies of ONI-AMY and SME-AMY

Inhibitor	Inhibitor concentration (mM)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ )	Inhibition rate (%)
ONI-AMY			
No	0	4.62	0
$\alpha$ -CD	5	1.29	72
$\beta$ -CD	1	1.47	68
$\gamma$ -CD	0.2	3.00	35
SME-AMY			
No	0	3.0	0
$\alpha$ -CD	5	0.90	70
$\beta$ -CD	1	0.83	72
$\gamma$ -CD	0.2	1.22	59

pancreatic  $\alpha$ -amylase occurs within approximately the same concentration range of cyclodextrins (Koukiekolo et al., 2001). Although in certain conditions, cyclodextrins might be hydrolyzed by porcine  $\alpha$ -amylase, in our experiment as shown by HPAEC-PAD analysis no cyclodextrin hydrolysis may be observed.

In conclusion, ONI-AMY and SME-AMY from tilapia are active  $\alpha$ -amylases with similar  $k_{\text{cat}}$  values to those of human and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (Al Kazaz et al., 1996; Ferey-Roux et al., 1998). These fishes, which were previously known to be able to be fed with a high carbohydrate content diet (Shimeno et al., 1993; Shiao, 1997), are certainly able to digest dietary starch by their own. The present comparisons between ONI-AMY and SME-AMY showed that although they differ in their amino acid compositions, molecular masses and  $pI$ , they behave quite similarly from the biochemical point of view.

### Acknowledgements

We are grateful to Mr C. Villard and J. Bonicel for their excellent technical assistance and contribution, and to Professor A. Puigserver for stimulating discussion. This work has been partially realized with the support, of the ATP program HIT, 'Hybridation interspécifique des tilapias', of CIRAD (France).

### References

Al Kazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Payan, F., Forest, E., Santimone, M., 1996. The mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Kinetic

evidence for two additional carbohydrate-binding sites. *Eur. J. Biochem.* 241, 787–796.

- Al Kazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Prodanov, E., Santimone, M., 1998. The mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. *Eur. J. Biochem.* 252, 100–107.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivation. *J. Chromatogr.* 336, 93–104.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chen, Y., Fringant, C., Rinaudo, M., 1997. Molecular characterization of starch by SEC: dependence of the performances on the amylopectin content. *Carbohydrate Polymers* 33, 73–78.
- Delaage, M., 1968. Sur la recherche du poids moléculaire le plus cohérent avec l'analyse des acides aminés d'une protéine. *Biochim. Biophys. Acta* 168, 573–575.
- Douglas, S.E., Mandla, S., Gallant, J.W., 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190, 247–260.
- Dyger, S., Li, L.H., Florida, D., Thoma, J.A., 1965. Determination of reducing sugar with improved precision. *Anal. Biochem.* 13, 367–374.
- Ferey-Roux, G., Perrier, J., Forest, E., Marchis-Mouren, G., Puigserver, A., Santimone, M., 1998. The human pancreatic  $\alpha$ -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 10–20.
- Hewik, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J., 1981. A gas-liquid solid phase and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256, 7990–7997.
- Koukiekolo, R., Desseaux, V., Moreau, Y., Marchis-Mouren, G., Santimone, M., 2001. Mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase: Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins, *Eur. J. Biochem.*, in press.
- Lacks, S.A., Springhorne, S.S., 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255, 7467–7473.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J., McPherson, A., 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 235, 1560–1584.
- Luquet, P., Moreau, Y., 1989. Energy-protein management by some warmwater finfishes. *Advances in*

- tropical aquaculture Actes de Colloques. AQUACOP, IFREMER, Paris, pp. 751–755.
- Moreau, Y., Médale, F., Boujard, T., Luquet, P., 1993. Energy resources in 'Atipa', *Hoplosternum littorale*. A neotropical air breathing catfish. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish nutrition in practice. VIth International Symposium on Finfish Nutrition. Les Colloques. INRA Editions, Paris, pp. 803–805.
- Pouyaud, L., Agnese, J.F., 1995. Phylogenetic relationship between 21 species of three tilapine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. *J. Fish Biol.* 47, 26–38.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J., Reeves, H.C., 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* 167, 290–294.
- SAS Institute Inc, 1989. SAS/STAT® User's Guide, Version 6, 4th ed Sas Institute Inc, Cary, NC.
- Shiau, S.Y., 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish — with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* 151, 79–96.
- Shimeno, S., Ming, D.C., Takeda, M., 1993. Regulation of carbohydrate metabolism. 16. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 827–833.
- Silvanovich, M.P., Hill, R.D., 1976. Affinity chromatography of cereal  $\alpha$ -amylase. *Anal. Biochem.* 73, 430–433.
- Thurston, C.F., Henley, L.F., 1996. Isoelectric focusing under denaturing conditions. In: Walker, J.M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 115–119.
- Yamada, A., Takano, K., Kamoi, I., 1991. Purification and properties of amylases from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1903–1909.

## Résumé :

La couverture des besoins énergétiques alimentaires a été étudiée chez des poissons tropicaux utilisés en aquaculture et connus pour leur meilleure utilisation de l'énergie non-protéique. Ces besoins ont été évalués, et l'utilisation de l'amidon évaluée comme source potentielle d'énergie alimentaire. Les besoins ont été déterminés en fournissant des rations croissantes d'un aliment unique, riche en protéines, ne pouvant avoir d'effet limitant. L'utilisation de l'amidon a été étudiée par calorimétrie indirecte et tests de croissance. La mise au point de la purification des amylases digestives chez 2 tilapias a permis d'étudier leurs caractéristiques et de les comparer entre elles ou à celles du pancréas de porc.

La méthode proposée a permis la détermination des besoins énergétiques chez 5 espèces : 2 silures, 2 tilapias et le tambaqui. Les besoins sont compris entre 0,9 et 1,3 MJ EB.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ou 0,85 et 1,2 MJ ED.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, avec une contribution des protéines représentant 21 à 47 % de l'énergie digestible. Des apports en énergie supplémentaire, même sous forme de protéines, ne permettent d'augmenter que l'accrétion lipidique. L'analyse par calorimétrie indirecte montre que l'amidon est effectivement utilisé comme source d'énergie, et les tests de croissance confirment son effet d'épargne protéique.

L' $\alpha$ -amylase a été purifiée chez les 2 tilapias, *Oreochromis niloticus* et *Sarotherodon melanotheron*. Leurs masses moléculaires respectives sont de 56,6 et 55,5 kD. Deux isoformes, A et B, sont présentes chez chaque espèce, avec un pI respectif de 7,8 et 8,2 chez *O. niloticus*, et de 8,2 et 8,8 chez *S. melanotheron*. L'isoforme B est instable et conduit à la formation de l'isoforme A. Les propriétés cinétiques et fonctionnelles sont très voisines pour chaque isoforme et chaque espèce : pH et température optimales (pH 7 à 35 °C), Km pour l'amylose et l'amylopectine (0,16 à 0,20 g.L<sup>-1</sup>), cinétique de l'inhibition par les cyclodextrines, produits d'hydrolyse (maltose, glucose et maltotriose) pour différents amidons de maïs, manioc ou riz.

L'ensemble des résultats obtenus indique que l'amidon peut-être utilisé comme source d'énergie alimentaires par les poissons tropicaux, dans la limite de leurs besoins énergétiques et de la nécessaire contribution des protéines à ces besoins.

## Abstract :

Dietary energy supply was studied in tropical fish used in aquaculture and known for their better utilization of non-protein energy fuel. These needs were evaluated, as well the use of the starch as potential source of dietary energy. The needs were estimated by providing increasing rations of a single high protein diet, without any limiting effect. The use of the starch was studied by indirect calorimetry and growth experiments. Development of a purification strategy for amylases of 2 tilapias allows to study their characteristics and to compare them between species or with those of pig pancreas.

The suggested method allowed to determine the energy needs for 5 species: 2 silures, 2 tilapias and the tambaqui. The needs range between 0,9 and 1,3 MJ GE.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> or 0,85 and 1,2 MJ DE.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, with a contribution of protein accounting for 21 to 47 % of digestible energy. Additional energy supply, even as proteins, will only increase lipid deposition. The analysis by indirect calorimetry shows that starch is actually used as energy fuel, and growth experiments confirm their protein sparing effect.

$\alpha$ -amylase of 2 tilapias, *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*, was purified. Their respective molecular mass is 56.6 and 55.5 kD. Two isoforms, A and B, are present in each species, with pI of 7,8 and 8,2 for *O. niloticus*, and, 8,2 and 8,8 for *S. melanotheron*, respectively. Isoform B is not stable and led to the formation of isoform A. Kinetic and functional properties are very close for each isoform and each species: optimal pH and temperature (pH 7 to 35 °C), Km for amylose and amylopectin (0,16 to 0,20 g.L<sup>-1</sup>), kinetics of inhibition by cyclodextrins, products of hydrolysis (maltose, glucose and maltotriose) from various starches, maize, manioc or rice. As a whole, results indicate that starch can be used as dietary energy source for tropical fish, within the limit of their energy needs and the necessary contribution of proteins to these needs.

**English title:** Dietary energy supply in tropical fishes used in aquaculture: Purification and comparison of amylases from two tilapias, *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*

**Mots clés :** Besoins énergétiques, Aquaculture, Tilapia, Silure, Amidon,  $\alpha$ -amylase, Purification, Inhibition.

**Keywords :** Energy requirements, Fish culture, Tilapia, Catfish, Starch,  $\alpha$ -amylase, Purification, Inhibition.