



Dynamiques du phosphore chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : impacts de la chélation intestinale et adaptations physiologiques en cas de carence

Thèse

Waly Ndianco Ndiaye

Doctorat en sciences animales

Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Waly Ndianco Ndiaye, 2020

**Dynamiques du phosphore chez la truite arc-en-ciel
(*Oncorhynchus mykiss*): impacts de la chélation intestinale et
adaptations physiologiques en cas de carence**

**Thèse
Sciences animales**

Waly Ndianco NDIAYE

Sous la direction de :

Grant William VANDENBERG, directrice de recherche
Marie-Pierre LÉTOURNEAU-MONTMINY, codirectrice de recherche

Résumé

L'aquaculture dans le monde est la production animale qui connaît la plus forte croissance ces vingt dernières années. Cependant, cette croissance est freinée par des considérations d'ordre environnementales parmi lesquelles la pollution associée au phosphore (P) occupe une place importante. L'excès de P dans les écosystèmes d'eau douce dû à l'excrétion des poissons, augmente la production primaire qui, non contrôlée, peut conduire à une eutrophisation, accélérant le processus de vieillissement des cours d'eau récepteurs. Ainsi, beaucoup d'efforts ont été déployés dans la recherche afin de réduire la pollution au P. Pour limiter les émissions de P résultant de l'alimentation des poissons, nous proposons d'incorporer des agents chélatants micro-encapsulés dans les aliments de la truite arc-en-ciel. Dans une première expérience, l'alun et le sulfate de fer ont été encapsulés dans une matrice lipidique hydrogénée par pulvérisation et refroidissement rapide « spray chilling ». Ces éléments actifs incorporés dans les aliments permettent une réduction de plus de la moitié du P inorganique remis en suspension par les fèces. L'incorporation de ces éléments actifs encapsulés n'a pas montré ni une baisse des performances de croissance avec ces aliments, ni une intoxication liée à la présence de ces métaux. Ces observations montrent la pertinence de l'utilisation de l'encapsulation comme approche visant à cibler l'endroit de libération d'un ions.

Confronté à la nécessité de déterminer la composition proximale des poissons lors des expérimentations, la précision du DXA (dual-energy X-ray absorptiometry) comme outil de mesure a été testé. Les résultats montrent une bonne précision de cet appareil pour déterminer la composition en protéines, cendre, eau, P, et en calcium (Ca) chez les truites arc-en-ciel en pré-grossissement. Il a été ainsi possible de déterminer avec précision la rétention en P pour chaque type d'aliment et évaluer les rejets pour cet élément. Pour réduire les rejets en P dans les fermes salmonicoles, le teneur en P dans les aliments a été réduite considérablement. Cette approche a peut induire des carences en P chez les truites arc-en-ciel en élevage. Ainsi, la capacité des truites arc-en-ciel carencées en P à absorber le P dans le milieu ambiant a été investiguée. Cette adaptation a été considérée comme inexistante du fait des niveaux faibles de cet élément dans le milieu naturel. En soumettant des truites arc-en-ciel carencées à des niveaux de P inorganique élevés dans l'eau, il a été mis en évidence une absorption significative corrélée à une surexpression de cotransporteurs de sodium-phosphates dans les branchies.

Les résultats présentés dans cette thèse apportent à la fois des outils pratiques dans les efforts de réduction de la pollution au P dans les fermes aquicoles et des connaissances dans la compréhension

pour l'intégration de l'ensemble des maillons entrant dans l'homéostasie de ce nutriment chez la truite arc-en-ciel.

Abstract

Aquaculture is the world's fastest growing animal production. This growth is limited by environmental concerns, among which P pollution is a major concern. Excess phosphorus (P) released into freshwater ecosystems from feeding fish increases primary production; left uncontrolled, this can lead to eutrophication, accelerating the aging process of the receiving streams. Significant research efforts have been undertaken to understand and reduce P pollution.

To limit P emissions from feeding fish, we propose incorporating microencapsulated chelating agents into rainbow-trout feed. In the first experiment, alum and iron sulfate were encapsulated by spraying a molten hydrogenated lipid matrix followed by rapid cooling (spray chilling). The active elements incorporated in fish feed resulted in a reduction by more than 50% of the soluble P released from the feces. The incorporation of these encapsulated agents did not show either a decrease in the fish growth performance or a toxic effect related to the presence of these metals. These observations demonstrate the relevance of using encapsulation as an approach to target the release of a compound of interest.

In order to have a precise and simplified tool to determine the whole-body proximal content of fish under study, the accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) was evaluated. The results revealed that DXA provided accurate estimates for protein, ash, moisture, P, and Ca content of juvenile rainbow trout carcasses. Furthermore, using the established models, it was possible to accurately determine the P and Ca retention for each diet used in the trout growth study.

Reducing P-dietary is the main approach used to reduce phosphorus pollution in fish farm sector. This strategy can lead to P-deficiency in fish. The ability of fish to absorb P from the environment is considered non-existent due to the low level of this element in freshwater systems. Our study showed that rearing P-deficient trout in water having a relatively high P_i concentration, revealed that P-deficient fish develop the ability to absorb P from the water. This regulation was highly correlated with over-expression of sodium phosphate cotransporters in gills of P-deficient trout, suggesting that fish can actively absorb P_i from their environment.

The results presented in this thesis provide both practical tools in the efforts to reduce P pollution in fish farms and knowledge in understanding for the best integration of all the links involved in the P homeostasis in rainbow trout.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	x
Liste des abréviations et sigles	xiii
Remerciements	xviii
Avant-propos	xx
Introduction générale	1
1 Revue de littérature - Phosphore (P) et pisciculture	5
1.1 Le phosphore dans la nutrition chez la truite arc-en-ciel	6
1.2 Impacts de la pisciculture sur l'environnement	18
1.3 Limitations des rejets en phosphore	24
1.4 Hypothèses et Objectifs	33
1.5 Bibliographie	34
2 <i>In situ</i> chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	47
2.1 Résumé	49
2.2 Abstract	50
2.3 Introduction	51
2.4 Materials and methods	52
2.5 Results	57
2.6 Discussion	62
2.7 Conclusion	64
2.8 Acknowledgments	64
2.9 Bibliographie	64

3	Assess body composition and dietary phosphorus retention using Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) : application on juvenile rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Galbanum)	69
3.1	Résumé	71
3.2	Abstract	72
3.3	Introduction	73
3.4	Materials and methods	74
3.5	Results and discussion	77
3.6	Conclusion	89
3.7	Acknowledgments	90
3.8	Bibliographie	90
3.9	Appendix	95
4	Phosphorus-mediated mechanisms of brachial plasticity in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) under chronic Pi-dietary restriction	97
4.1	Résumé	99
4.2	Abstract	100
4.3	Introduction	101
4.4	Materials and methods	102
4.5	Results	109
4.6	Discussion	118
4.7	Conclusion	120
4.8	Acknowledgments	120
4.9	Bibliographie	120
	Discussion générale et conclusion	125
	Réduction de la pollution piscicole : utilisation des pièges à phosphore	126
	Utilisation du DXA pour évaluer la composition proximale des truites arc-en-ciel	131
	Mécanismes de régulation de la carence alimentaire en phosphore	133
	Conclusion générale	137
A	Simulation de la digestion des matrices d'encapsulation dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	142
B	Mise au point des chirurgies avant induction de la déficience alimentaire au phosphore chez la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	154

Liste des tableaux

0.1	La pêche et l'aquaculture dans le monde : production et utilisation en millions de tonnes (FAO, 2018).	1
1.1	Origine, nature, source des rejets de polluants, ainsi que leur importance (+ ou -) dans les fermes salmiconiques (Laguerre, 2008).	19
1.2	Comparaison de la pollution au phosphore chez quelques espèces de salmonidés en élevage commercial (adapté de Kibria et al. (1995)).	23
1.3	Efficacité des techniques des traitements des effluents salmiconiques d'après Heerfordt et al. (1991) rapporté par D'Orbcastel (2008).	29
2.1	Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment ¹	53
2.2	Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment	54
2.3	Nutrient digestibility ¹ for diets used in the two experiments (g/kg or mg/kg dry basis).	54
2.4	Growth performance indicators of fish during experiment 1.	58
2.5	Growth performance indicators of fish during experiment 2.	58
2.6	Ash and P level (% , dry basis) in carcasses and scales at the beginning (0 wk) and the end (5 wk) of the Experiment 1.	59
3.1	Diet composition in ingredients and nutrients.	75
3.2	Best-fit regression equation, intercept and probability, and coefficient of determination for prediction body composition using data from fan-bean DXA for juvenile rainbow trout (n = 90) carcass frozen and thawed.	78
3.3	Regression between observed and predicted values of the equations predicting body composition based on DXA measurements showing the intercept, the slope, the relative mean square prediction error (rMSPE) divided into error in central tendency (ECT), error due to regression (ER), and error due to disturbance (ED).	86
3.4	Body mass, P content for three sampling times (0, 4 and 9 wk ; n=54) of frozen and thawed fish carcasses. For P content DXA method (valid equation of P using DXA) and chemical methods were used. Relevant data like growth parameter such standard growth rate (SGR) and feed intake (FI), and indicator of fatness (condition factor, K ^a) was provided table and footnote, respectively.	87
3.5	DXA whole-body estimates of body mass, fat mass, BMC, lean mass (mean ± sd) for three sampling times (0 wk, 4 wk, 9 wk ; n=54) of frozen and thawed fish carcasses.	96
4.1	Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment	103

4.2	Mean (n=3 tanks) wet weight, feed intake, FCR, TGC, SGR rate of rainbow trout fed with P-sufficient (P-S), and P-deficient (P-D) reared in open and recirculated (closed) aquaculture systems.	110
4.3	Relative impact on ash content (mean with pooled SEM) in scales for fish fed P-sufficient and P-deficient diets over the time ¹	111
4.4	Daily Pi (ppm) in the water tank in the two units between the non-fecal soluble accumulation trial.	111
4.5	Linear models of prediction for Pi release in tanks water after feeding according to Pi-dietary and systems. This modeling was done using data from the last 14-h accumulation trial (14 wk).	116

Liste des figures

1.1	Critères d'estimation du besoin en P chez les poissons (Kaushik, 2005)	7
1.2	Corrélation entre la minéralisation (contenu en cendres, %) des écailles et le pourcentage d'anomalies vertébrales (%) chez des truites soumises à une déficience en phosphore prolongée (Deschamps et al., 2014).	11
1.3	Principe fondamental de l'absorptiométrie à rayons X à double énergie (DXA) d'après Toombs et al. (2012) : le DXA mesure la transmission des rayons X à haute et basse énergie à travers le corps. L'énergie du faisceau de rayons X est atténué par le passage à travers les tissus.	13
1.4	Description de la trajectoire du faisceau de rayons X (flèche) à double énergie des appareils d'absorptiométrie en fonction du système (DXA) : (a) faisceau crayon, (b) faisceau éventail, et (c) faisceau étroit (modifié Toombs et al. (2012)).	13
1.5	Comparaison entre les cendres coporelles et le contenu minéral osseux chez les rats vivants d'après Nagy and Clair (2000). Le trait noir indique la droite de regression et celui en pointillé la modèle linéaire parfait ($Y=X$)	15
1.6	Accumulation de P dans les bassins d'après Sarker et al. (2011). Les bassins en sont nourris, en triplicata, par un aliment riche, très pauvre et pauvre en P (P-suffisant, P-déficient, Expérimental, respectivement). Les bassins sans poissons ont été utilisé comme témoin.	17
1.7	Bilan simplifié du P chez la truite arc-en-ciel d'après Ouellet (1999).	18
1.8	Les formes du phosphore et leurs interactions d'après Numery (2018).	21
1.9	Production piscicole annuelle au Québec depuis 1980-2018 (Adapté de Morin (2007) et (MAPAQ, 2018)).	25
1.10	Distribution des composés d'orthophosphates en solution en fonction du pH selon Sato (2003).	31
1.11	Mise en suspension du phosphore total (Pt) en fonction de la teneur en alun (encapsulé) présent dans le régime alimentaire de truite arc-en-ciel d'après Fournier (2008). . . .	32
2.1	$o\text{-PO}_4$ release over 7-day incubation by feces (expressed as DM from fish fed experimental diets at (7°C, left panel) and at (22°C, right panel). The value represents the $o\text{-PO}_4$ release (mean \pm sd, n = 3). Two ways ANOVA follows by Bonferroni pairwise comparison was used to identify the differences. The different letters indicate significantly different means ($P<0.05$).	59
2.2	Scales mineralization of graded levels of alum included : 0, 3, 6, 15 g/kg). The values represent mean \pm sd (n=3). ANCOVA followed by Tuckey pairwise comparison, was used to identify significant differences. The different letters indicate the significantly different means ($P<0.1$) : ns=not significant ; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. . .	60

2.3	Relation between o-PO ₄ feces (0, 3, 6, 15 g/kg of alum) released after 14 days and the level of encapsulated alum included in diets. The values represent mean ± sd (n=3). ANCOVA followed by Tuckey pairwise comparison, was used to identify significant differences. The different letters indicate the significantly different means ($P < 0.1$): ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	61
3.1	Relationship between balance mass and DXA mass small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	79
3.2	Relationship between crudes proteins and DXA lean small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	80
3.3	Relationship between water and DXA lean small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	81
3.4	Relationship between crude lipids and DXA fat small animal scan mode for 90 fish's carcass. The two black circles indicate the oldest trout (at 9 wk, 88 to 134 g, n = 18) for frozen and thawed showing overestimation and underestimation of DXA estimate fat for the frozen and thawed carcass, respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	82
3.5	Relationship between whole-body ash and DXA BMC small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	83
3.6	Relationship between the amount phosphorus (P) or calcium content and total DXA BMC small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$	84
3.7	Comparison of P retention (% , A) and P loading (Kg/ton of production, B) predicted (frozenP-adjusted = DXA) and chemical measurements for a growing period of feeding trial (0-9 wk). Values were means of 3 tanks per diet. Values not sharing identical letters were significantly different ($P < 0.05$).	89
4.1	Clustal alignment of NaPi-II amino acid sequences. Sequences from trout (complete from Berthelot, partial from Sugiura and Werner (1)) and from Zebrafish (Werner2) were aligned with clustalW analysis program (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) in order to validate the similitude of epitope selected (highlighted in red) compared to those from focused work done by Werner2 (highlighted in green). Highlighted in blue, the epitopes previously used by Sugiura et al. (2003) to immunolocalized the NaPi-II in trout gill cells.	106
4.2	Stacked image with ImageJ showed the procedure to use for labeling the intensity of NaPi-II. A = image of the gill was taken without green filter 465-495nm, B = image with green filter transformed, C = image adjusted to 1925, corresponding to the threshold that the pixels from the slides control, D = images in steps A and C merged.	108
4.3	Non-fecal soluble P release in tanks after feeding in the two 12-h accumulations (11 wk-above and 14 wk-below) in control tanks (grey line) and tanks fed by P-sufficient diet (black line), P-deficient (dashed line). Mean (n=3) were presented in the open (right) and closed (left) system separately. The 14 wk trials were conducted after that the Pi in the tank in the close system is increased to 4-5 mg/L daily for 2 wk by the addition of KH ₂ PO ₄ in the inflow tank. Two-way ANOVA, followed by Tukey HSD test, was performed to identify significant difference ($P < 0.05$). The analysis shows a significant difference in Pi release in-tank between treatment ($P = 0.005$) over time ($P = 0.03$), as well as their interaction (treatment*time : $P = 0.01$). Mean values with similar superscripts are not significantly different ($P > 0.05$).	113

4.4	A) NaPi-II standard range and representative western blots of gills trout, fed with a P-deficient diet (P-D) and the P-sufficient diet (P-S) among periods before (-) and after (+) Pi was added in the closed system; B) relative abundance of NaPi-II proteins in gill extract. Effect of diet and period on gill NaPi-II relative abundance using Image J processing was tested. Two-way (diet and period) ANOVA indicated a significant effect of diet ($P=0.002$) and their interaction ($P=0.030$), not for the period ($P=0.071$). HSD Tuckey test was used to compare the significant effect of diet. The asterisk indicates a significant change between the two P-dietary treatments (one-way ANOVA, $P<0.05$).	114
4.5	Relative rate of Pi release in tanks at the end of the last 12h-accumulation (14 wk) in open (dark) and closed (white) system. Means values from triplicate tanks of fish fed with P-sufficient (black point) and P-deficient (black hatched) diets were calculated by dividing Pi accumulated in the tank at the end of the trial by time (12h) and biomass using the following equation $[Pi (mg/h/kg) = Pi\ final-Pi\ initial/(12*biomass (kg))]$	115
4.6	Relative rate of Pi release in tanks at the end of the last 12h-accumulation (14 wk) in open (dark) and closed (white) system. Means values from triplicate tanks of fish fed with P-sufficient (black point) and P-deficient (black hatched) diets were calculated by dividing Pi accumulated in the tank at the end of the trial by time (12 h) and biomass using the following equation $[Pi (mg/h/kg)= Pi\ final-Pi\ initial/(12 *biomass (kg))]$	117
4.7	Pi exprimé en (mg/g de FC) relargué au bout de 7 jours d'incubation par les fèces provenant des régimes expérimentaux et incubés à pH acide (4, à gauche) et à pH basique (8, à droite). Les valeurs de Pi sont exprimées sur base de fèces sèches (FC). Les valeurs représentent les moyennes (n=3) affectées de leurs écarts types.	127
4.8	Représentation graphique de l'évolution de la solubilité du phosphate d'aluminium et de fer en fonction du pH du milieu (images tirées de Metcalf et al. (1979)).	128
4.9	Pi relargué au bout de 7 jours d'incubation par les fèces provenant des régimes expérimentaux et incubés avec mouvement (à gauche) et sans mouvement (à droite). Les valeurs de Pi sont exprimées sur base de fèces sèche (FC). Les valeurs représentent les moyennes (n=3) affectées de leurs écarts types.	129
4.10	Diagramme synthétique des éléments organes clés impliqués dans l'homéostasie du Pi adapté de Verri and Werner (2019). Stanniocalcine (SC), l'hormone parathyroïde (PTH), facteur 23 de croissance du fibroblaste (fgf23). Le grand et le petit « Pi » indiquent une hyperphosphatémie et une hypophosphatémie, respectivement. Les flèches vertes indiquent une absorption intestinale/résorption osseuse/réabsorption rénale du Pi. Celles en rouge indiquent une augmentation de l'excrétion rénale/désorption osseuse du Pi.	134
4.11	Marquage des protéines NaPi (vert) et NKA (rouge) dans une section branchiale de saumon au stade « parr ». L'image en bas montre une superposition des deux images indiquant en jaune-orange la présence de ces protéines au même endroit. Barre d'échelle = 50 μm	136

Liste des abréviations et sigles

AAQ	Association des Aquaculteurs du Québec, page 25
ADC	Apparent Digestibility Coefficient (coefficient de digestibilité apparent), page 53
ADN	Acides désoxyribonucléiques, page 6
ADP	adénosines diphosphates, page 6
AIA	Acid Insoluble Ash (Cendres Insolubles à l'Acide), page 53
Al	Aluminium, page 29
Al ₂ SO ₄	Sulfate d'aluminium, alun, page 29
ANCOVA	Analyse de covariance, page 60
ANOVA	Analyse de Variance, page 60
AOAC	Association of Official Analytical Chemists, page 59
ARN	Acides ribonucléiques, page 6
ARNm	Acide ribonucléique messenger, page 16
ATP	adénosines triphosphates, page 6
BMC	Bone Mineral Content, page 88
Ca	Calcium, page iv
Ca(OH) ₂	Chaux hydratée, page 29
CaO	Chaux vive, page 29
CMO	Contenu Minéral Osseux, page 12
CPAUL	Comité de Protection des Animaux de l' Université Laval, page 58
Ctrl	Control, page 54
Ctrl+	Control positive, page 54
CV	Coefficient de variation, page 88

CVS	Central Venous Sinus, page 139
DBO5	Demande Biochimique en Oxygène pendant cinq jours, page 29
DM	Dry matter (Matière sèche), page 61
DMO	Densité Minérale Osseuse, page 12
DXA	Dual-energy X-ray Absorptiometry, page iv
E	Energy, page 53
ECT	Error in central tendency (erreur de la tendance centrale), page 89
ED	Error due to disturbance (erreur de disturbance), page 89
ED	Mean square prediction error (erreur quadratique moyenne de prédiction), page 89
ER	Error due to regression (errur de regression), page 89
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations, page 1
FBW	Initial Body Weight (biomasse finale), page 58
FC	fèces sèches, page 156
FCR	Indice de consommation (Feed Conversion Ratio) , page 22
Fe	Fer, page 22
FeSO ₄	Sulfate de ferreux, page 29
fgf23	facteur 23 de croissance du fibroblaste, page 162
FI	Feed Intake (prise alimentaire), page 58
GI	Gastrointestinal tract, page 53
GRIPHA	Groupe de Recherche Intégré en Physiologie et sciences Animales, page 67
HASP	Hologic Anthropomorphic Spine Phantom, page 88
HSI	Hepatosomatic Index (Indice hépatosomatique), page 58
I-NaPi	cotransport sodium-phosphate intestinal, page 16
IBW	Initial Body Weight (biomasse initiale), page 58
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometr, page 124
IgY	Egg yolk antibodies, page 139
IHC	Immunohistochemistry, page 127
K	Condition factor (facteur de condition), page 97
K-NaPi	cotransport sodium-phosphate rénale, page 16

LARSA	LABoratoire de Recherche en Sciences Aquatiques, page 56
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, page 25
MELCC	Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques, page 25
MES	Matières En Suspension, page 18
MG	Masse Grasse , page 12
MM	Masse Maigre, page 12
MS-222	Tricaine methanesulfonate, page 86
N	Azote, page 18
Na-K	cotransport sodium-potassium, page 9
NaPi	cotransport sodium-phosphate, page 9
NRC	National Research Council, page 6
NSERC	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, page 140
o-PO ₄	Orthophosphates, page 52
P	Phosphore, page iv
P-D	Phosphorus Deficient, page 129
P-S	Phosphorus Sufficient, page 129
PC-NaPi	cotransport sodium-phosphate pylorique, page 16
PCBF	Programme Canadien des Bourses de la francophonie, page 67
pH	Potentiel hydrogène, page 21
Pi	inorganic phosphorus, page 120
Pt	Phosphore total, page 32
PTH	Hormone Parathyroïde, page 162
Q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction, page 165
R ²	Coefficient de détermination, page 14
RAQ	Ressources Aquatiques Québec, page 67
RAS	Recirculatin Aquaculture Systems, page 138
RMSE	Écart quadratique moyen, page 14
rMSPE	relative Mean Square Prediction Error, page 99

ROI	regions of interest (région d'intérêt), page 97
RSE	Residual Standard Error (Bone Mineral Content), page 89
SC	Stanniocalcine, page 162
SD	Standard deviation (Écart type), page 60
SEM	Standard Error Mean (erreur type), page 14
SRP	Soluble Reactive Phosphorus, page 52
STRADDAQ	Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au Québec, page 25
TAF	Time after feeding, page 132
TGC	thermal-unit growth coefficient, page 58
WB	Western blots, page 126
wk	Week, page 86

À Aïda, Mamadou Fara et Aziz

Remerciements

Cette thèse de doctorat a été rendue possible grâce au soutien d'un ensemble d'organismes et institutions. Je remercie donc :

- Les institutions qui ont financé les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Ce sont : le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Réseau Aquatique Québec (RAQ) et le Programme Canadien des Bourses de la Francophonie (PCBF) ;
- L'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) à travers son Centre de Recherches Océanographique Dakar-Thiaroye (CRODT), et plus particulièrement aux Dr Massal Fall et Dr Hamet Diaw Diadhiou qui ont bien voulu appuyer mon dossier afin d'obtenir l'allocation de recherche m'autorisant à réaliser cette thèse ;
- Le département des sciences animales de la faculté des sciences de l'alimentation et de l'agriculture (FSAA) de l'université Laval de m'avoir accueilli en son sein durant ces années ;
- Le Laboratoire Aquatique de Recherche en Sciences Environnementales et Médicales (LARSEM, ex LARSA) et son personnel pour leur appui lors de mes expérimentations.

La thèse est loin d'être un travail solitaire. Je m'en suis rendu compte pendant la phase de rédaction en jetant un regard rétrospectif à partir du jour où j'ai quitté le CRODT pour intégrer le département des sciences animales. J'en ai conclu que ces travaux n'auraient jamais été possible sans le soutien d'un grand nombre de personnes. Leur générosité, leur bonne humeur et leur intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette étape importante de mon cheminement professionnel : l'étape de « l'apprenti chercheur ». J'aimerais remercier mon directeur de thèse Dr. Grant Vandenberg, professeur à l'Université Laval de m'avoir fait confiance, encadré et conseillé. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements et conseils instructifs. Un immense merci à ma codirectrice Dre Marie-Pierre Létourneau-Montminy professeure à l'Université Laval pour ses conseils, sa disponibilité permanente, et sa volonté à transmettre et partager son savoir. Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse Dr Peter Vanrolleghem, Dr Frédéric Guay, et Dr Pierre Blier d'avoir nourri cette thèse de nouvelles idées et d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Un grand merci à Dre Marie-Hélène Deschamps, à Dr Yves Comeau et à Dr Patrice Brehmer pour avoir nourri cette thèse de nouvelles idées et de m'avoir toujours poussée à l'excellence à travers des critiques très méticuleuses. Vos conseils étaient efficaces pour moi durant toute la période de la thèse.

Je remercie l'ensemble de mes collègues, du Groupe de recherche intégré en physiologie et sciences animales (GRIPHA) et du laboratoire Grant W Vandenberg, et particulièrement, Yolaine Debeuf, Nancy Bolduc, Dominique Gagne, Annie Pelletier, Piterson Floradin, Amel Lounas, Jennifer Larouche, Bakary Diarra et Mahamadou Koné, pour m'avoir chaleureusement accueilli, accompagné et apporté énormément de bonne humeur et de fous rires. Merci également au personnel du LARSA pour leur appui lors de mes expérimentations. Je remercie le laboratoire SO Conté Anadromous fish research center (Montague, Massachusetts, EU), et plus particulièrement, le professeur Stephen McCormick et Amy Regish de m'avoir accueilli pour un séjour de recherche dans leur équipe. Merci aussi à Dr Adria Elkus, Jessica Norstog, Diogo Ferreira-Martins, André Barany, Daniel et Ciaran Shaughnessy, pour leur accueil chaleureux et aide lors de ce séjour.

Je remercie ma famille et spécifiquement, ma mère et mon père qui ont toujours cru en moi et se sont toujours souciés de m'assurer les meilleures conditions d'étude, ainsi que mes frères et sœurs, Ngoné, Ousmane, Bigué, Aïssatou, Gnilane, et Papa qui sont pour moi des exemples de courage et des sources de motivation inépuisables. Je ne serais jamais arrivé à ce niveau sans l'appui de ma grand-mère Bigué, mes oncles, Pape Niang, Aziz, Fara, Fodé, Djiby et Mbaye, et ma tante Ndèye Aïda, qui depuis le bas âge se sont investis à me fournir les conditions nécessaires pour aller loin dans les études. Je n'aurais pas achevé ces travaux sans le soutien inconditionnel de ma partenaire de vie et épouse et amie, Dre Maïmouna Yokessa, qui m'apporte un amour et une bienveillance qui n'ont pas de prix.

Enfin, je remercie mes amis, Issakha Gaye, Pape Faye, Amadou Sow, Papis Séne, Jeff Daniel Nze Memiaghe, Aliou Bâ, Mamadou Siley Niang, Fulgence Diedhiou, Kamarel Bâ, Mamadou Ndiaye, et encore Piterson Floradin, d'avoir rendu ma vie plus belle.

Avant-propos

Cette thèse présente une série d'expériences réalisées dans des projets sur la problématique du P dans les fermes piscicoles. Dans un projet de recherche appliquée, il a été mis en évidence la possibilité d'utiliser l'encapsulation d'éléments actifs, comme l'aluminium et le fer, afin de réduire les rejets en phosphore dans les fèces des truites arc-en-ciel en élevage. Dans le cadre d'expériences *in vivo* de restriction alimentaire au phosphore, une étude en parallèle a été réalisée afin de déterminer la précision de tomодensitométrie (DXA) comme outil permettant de mesurer la composition proximale des poissons et la rétention en phosphore.

Dans un projet de recherche fondamentale sur la plasticité branchiale des truites soumises à une carence de P, il a été mis en évidence les conditions permettant de matérialiser une absorption externe du phosphore inorganique par des poissons nourris avec un aliment déficient en cet élément. De plus, il a été mis en évidence que cette absorption externe du phosphore est corrélée à une surexpression des cotransporteurs de sodium-phosphate du niveau des branchies.

Ce document a été réalisé en compilant trois articles rédigés, découlant de ces études, et qui ont été soumis pour fins de publications. Ces articles sont :

1. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, K. Chowdhury, J-D. Bunod, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** *In situ* chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Revise et re-soumis à *Animal Feed Science and Technology*.
2. **W. N. Ndiaye, Y. Lebeuf, M-H Deschamps, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** Assess body composition and dietary phosphorus retention using Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) : application on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Galbanum). *Revisé et re-soumis à Aquaculture Research Journal*.
3. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, A. M. Regish, M-P. Letourneau-montminy, S. D. McCormick, G. W. Vandenberg.** Phosphorus-mediated mechanisms of brachial plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following chronic deficiency. En préparation pour soumission à la revue *Journal of Experimental Biology*

L'état de publication et la contibution des auteurs sont rapportés au niveau de la page de garde de

chaque article.

Ce travail à fait l'objet de communications dans les événements scientifiques suivants :

1. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, K. Chowdhury, J-D. Bunod, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2019) *In situ* chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *XIV The International Symposium on Aquaculture Nutrition (ISAN)*, Novembre 13-15, Mérida, Yucatán, México. **Affiche scientifique.**
2. **W. N. Ndiaye, Y. Lebeuf, M-H Deschamps, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2019) Proximate composition analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Annual Network Ressources Aquatiques Québec (RAQ) meeting*, Novembre 11-12, Rimouski, Canada. **Communication orale, par Grant W Vandenberg.**
3. **W. N. Ndiaye, Y. Lebeuf, M-H Deschamps, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2019) The accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) to assesses rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) proximate composition and diet phosphorus retention. *Journée Etudiante de l'IBIS*, 29 août 2019, Québec, Canada. **Affiche scientifique**
4. **W. N. Ndiaye, Y. Lebeuf, M-H Deschamps, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2019) The accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) to assesses rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) proximate composition and diet phosphorus retention. *Journée*, May 6-8, Victoria, British Columbia, Canada. http://aquacultureassociation.ca/wp-content/uploads/2019/04/Abstracts-by-Session-2019_final.pdf
5. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2019) Réduction de la pollution piscicole : Développement de pièges à phosphore encapsulés dans la moulée pour poisson (P-trap). *Journée de la Recherche de la FSAA*, 16 mai 2019, Québec, Canada. **Affiche scientifique.**
6. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, K. Chowdhury, J-D. Bunod, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2018) *In situ* chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annual Aquaculture Association of Canada conference (AAC) meeting*, May 27-30, Québec, Canada. **Communication orale.**
7. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2018) Réduction de la pollution piscicole : Développement de pièges à phosphore encapsulés dans la moulée pour poisson (P-TRAP). *Journée québécoise des étudiants CentrEau 2018*, le 22 mars 2018, Sherbrooke, Québec, Canada. **Affiche scientifique.**
8. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2017) Réduction de la pollution piscicole : Développement de pièges à phosphore en-

capsulés dans la moulée pour poisson (P-TRAP). *Symposium sur la gestion de l'eau, 11 octobre 2017, Lewis, Québec, Canada. Affiche scientifique.*

9. **W. N. Ndiaye, M-H Deschamps, Y. Comeau, M-P. Letourneau-Montminy, G. W. Vandenberg.** (2017) Réduction de la pollution piscicole : Développement de pièges à phosphore encapsulés dans la moulée pour poisson. *Journée de la Recherche de la FSAA, 18 mai 2017, Québec, Canada. Communication orale.*

Introduction générale

L'aquaculture est le secteur de production animale qui présente la croissance la plus rapide dans le monde. En effet, depuis les années 70, le taux de croissance annuelle de l'aquaculture avoisine les 9% contre 2,5% pour les autres productions animales (bœuf, porc, poulet, etc.). Dans les années 1980 et 1990 cette croissance s'est maintenue à 10,8 et 9,5%, respectivement (FAO, 2012). Depuis 2000, l'aquaculture mondiale ne connaît plus les mêmes taux de croissance. Néanmoins, elle continue de se développer plus rapidement que les autres grands secteurs de production alimentaire. La croissance annuelle a baissé pour s'établir à 5,8% entre 2001-2016, bien qu'une croissance supérieure à 10 % ait été enregistrée au niveau de quelques de pays, en particulier d'Afrique (Nigéria et Ghana), entre 2006 et 2010 (FAO, 2016) (tableau 0.1).

TABLE 0.1 – La pêche et l'aquaculture dans le monde : production et utilisation en millions de tonnes (FAO, 2018).

Catégorie	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Production						
Pêche						
Continentale	10.7	11.2	11.2	11.3	11.4	11.6
Marine	81.5	78.4	79.4	79.9	81.2	79.3
Total - pêche	92.2	89.5	90.6	91.2	92.7	90.9
Aquaculture						
Continentale	38.6	42.0	44.8	46.9	48.6	51.4
Marine	23.2	24.4	25.4	26.8	27.5	28.7
Total - aquaculture	61.8	66.4	70.2	73.7	76.1	80.0
Total - pêche et aquaculture mondiale	154.0	156.0	160.7	164.9	168.7	170.9
Utilisation¹						
Consommation humaine	130.0	136.4	140.1	144.8	148.4	151.2
Usages non alimentaires	24.0	19.6	20.6	20.0	20.3	19.7
Population (milliards de personnes) ²	7.0	7.1	7.2	7.3	7.3	7.4
Consommation apparente par habitant (en kg)	18.5	19.2	19.5	19.9	20.2	20.3

NOTES : ¹Les mammifères aquatiques, les crocodiles, alligators et caïmans, les algues marines et les autres plantes aquatiques ne sont pas prises en compte.

²source des chiffres relatifs à la population : ONU, 2015

En 2016, la production halieutique mondiale a atteint une valeur record d'environ 171 millions de tonnes. Le secteur de l'aquaculture participe pour 47% de ce chiffre, voire 53% si l'on exclut la production destinée à des utilisations non alimentaires comme la production de farine et d'huile de poisson. Cette croissance de l'aquaculture est accompagnée par une stagnation des captures de la pêche. Cette situation est liée à une situation de surexploitation dont sont confrontés les stocks de poissons sauvages depuis ces dernières décennies par suite de l'augmentation de l'effort de pêche. D'après la FAO (2018), il ressort de l'analyse de ces données de l'état des pêcheries à l'échelle mondiale une tendance à la baisse de la proportion de stocks de poissons exploités à un niveau biologiquement soutenable, de 90% en 1974 à 67% en 2015 (FAO, 2018). Inversement, la proportion de stocks exploités à un niveau biologiquement non durable est passée de 10% en 1974 à 33% en 2015, la situation s'étant particulièrement aggravée vers la fin des années 1980. Mal connu, l'état des ressources sauvages continentales est probablement tout aussi inquiétant. En effet, ces ressources continentales subissent un impact environnemental nettement plus important.

Il apparaît donc que le développement de l'aquaculture semble être la seule voie capable de répondre à la demande croissante en produits d'origine aquatique. Ainsi, ces dernières années, l'aquaculture participe à plus de la moitié de la consommation en produits halieutiques. La majorité de cette production provient de l'aquaculture continentale (plus de 64%, voir tableau 0.1).

Comme c'est le cas dans la majorité des productions animales, le secteur d'aquaculture d'eau douce est confronté au défi majeur de satisfaction de la demande en produits halieutiques tout en limitant ses impacts négatifs sur l'environnement. Parmi ces effets négatifs, nous allons principalement nous intéresser aux rejets en excès des nutriments via les effluents piscicoles. En effet, la libération de nutriments (P, azote, matières en suspension) dans le milieu naturel peut avoir des impacts négatifs sur les milieux environnants. Elle peut occasionner l'eutrophisation des plans d'eau récepteurs. Cette situation est très préoccupante au Québec au vu des expériences d'eutrophisation des cours d'eau enregistrés au cours des dernières années. Étant donné leur sensibilité, les plans d'eau internes sont particulièrement exposés à ce phénomène.

Ainsi, pour lutter contre ces problèmes, une réglementation des rejets en P et des restrictions d'usages piscicoles ont été mises en place au Québec afin de limiter ces rejets dans les piscicultures. Ces mesures ont eu un impact important dans le développement de l'industrie piscicole ces 19 dernières années. En effet, il a été mis en évidence durant cette période une baisse rapide de la production piscicole suivie d'une phase de stagnation (autour de 1500 tonnes/an). Cette phase de stagnation/baisse de la production piscicole au Québec est toujours une réalité avec une production enregistrée autour 1200 tonnes/an entre 2010-2016 (MAPAQ, 2018). Ces mesures ont contraint le secteur à s'ajuster afin de faire face principalement à la limitation des rejets en P. Ainsi, elle a mis en place des stratégies de réduction de ces rejets en P générés dans les structures d'élevages. Les deux principales stratégies utilisées sont : (1) la réduction du niveau de P inclus dans les aliments et (2) l'enlèvement du P des effluents (principalement par chaulage). Malgré ces ajustements, les niveaux en P rejetés dans les fermes piscicoles sont restés toujours importants. Les stratégies utilisées font appel à des techniques

correctrices une fois que le P polluant est produit par les poissons à travers les fèces, les branchies et les urines.

Les techniques d'enlèvements du P utilisées dans ce secteur interviennent plusieurs mois après que ce "polluant" soit produit dans les fèces, les urines et la respiration (par les branchies). Cette approche favorise l'accumulation du P dans la colonne d'eau dans les structures d'élevage et dans les bassins de sédimentation. Par conséquent, il en résulte une augmentation de la charge polluante au cours du temps.

La prise en charge de ce phénomène dans les stratégies de réduction du P des effluents piscicoles nécessite une meilleure compréhension des dynamiques du P, apporté par l'alimentation. Ces dynamiques dépendent de la source de P et sa disponibilité, des besoins de l'espèce élevée et sa capacité à assimiler cet élément présent dans le système et des paramètres environnementaux des structures d'élevage (pH, température, etc.).

Le **premier chapitre** de ce manuscrit va mettre en évidence l'implication de ces paramètres dans la dynamique du P rejeté dans l'environnement par les fermes salmonicoles au Québec. En tenant compte de ces mécanismes et afin d'appuyer l'industrie dans sa démarche, un projet de recherche a été développé afin de valider une technique de piégeage du P dans des effluents piscicoles. Le **second chapitre** de ce document, présente une approche novatrice par rapport à ce qui existe dans le domaine. En effet, la finalité de ce travail de recherche est d'utiliser des éléments actifs incorporés dans l'aliment pour insolubiliser les P non absorbés dès sa production. L'avantage de cette technique est que l'action intervient précocément (> 15 jours) et à la source, limitant ainsi l'accumulation du P dans les effluents piscicoles.

Les rejets en P dans les effluents piscicoles vont dépendre de la capacité des poissons élevés à absorber cet élément contenu dans l'aliment et potentiellement dans l'environnement immédiat. L'absorption du P alimentaire chez les poissons a été largement étudiée afin de le prendre en compte dans la formulation des aliments et, par extension, le bilan l'utilisation de ce nutriment important dans le système d'élevage. Cependant, la capacité des poissons à absorber le P de leur environnement a largement été négligée. De ce fait, il est communément admis, dans le monde scientifique, que la seule source de P disponible pour les poissons d'eau douce est l'aliment. Ce "fait" a principalement été accepté puisque les concentrations en P de leur milieu naturel sont relativement faibles (<0,1 ppm de P dans l'eau). Cependant, les observations, qui découlent des expériences réalisées dans le laboratoire Grant Vandenberg, contredisent cette perception. Cette nouvelle question sera développée dans la section absorption du P du **premier chapitre** et dans le **quatrième chapitre**.

En travaillant sur le problème des rejets de P, des indicateurs afin de contrôler, de suivre et de valider le statut en P des individus impliqués sont utilisés. Ces indicateurs sont principalement : le contenu en cendre et/ou en P dans les écailles et les carcasses, la teneur P dans le sang, les déformations observées au niveau des vertèbres et l'excrétion en P inorganique dans l'eau des bassins après alimentation. Pour mesurer ces indicateurs, plusieurs opérations sont nécessaires. Ces opérations sont fastidieuses,

longues et nécessitant souvent l'emploi de grandes quantités en produits chimiques. De plus, ces opérations sont sujettes au biais des opérateurs. Considérant l'ensemble de ces contraintes, nous avons testé la précision de l'absorption biphotonique à rayons X (le DXA) pour analyser la composition en P et la rétention de cet élément par la truite arc-en-ciel. Ce travail sera exposé dans la partie sur le statut en P dans le premier chapitre et le **troisième chapitre** de ce manuscrit.

En somme, ce travail de thèse regroupe trois projets de recherches :

- Un projet de recherche appliquée visant à mettre en place une technique adaptée pour lutter contre la pollution au P dans le secteur de la pisciculture ;
- Un projet de recherche appliquée ayant comme objectif de montrer la précision du DXA pour l'analyse de la composition proximale des poissons et la rétention en P pour un aliment considéré ;
- Un projet de recherche fondamentale visant à améliorer les connaissances sur les mécanismes qui interviennent dans l'absorption du P chez la truite arc-en-ciel en élevage.

Chapitre 1

Revue de littérature - Phosphore (P) et pisciculture

"Chaque génération doit, dans une relative opacité, découvrir sa mission, la remplir ou ... la remplir"
Maïmouna Yokessa (inspirée de Frantz Fanon)

1.1 Le phosphore dans la nutrition chez la truite arc-en-ciel

Le P est un macro-élément indispensable à plusieurs fonctions physiologiques chez les poissons (Kaushik, 2005; Lall and Lewis-McCrea, 2007). Le P et le calcium sont les constituants majeurs du squelette des poissons. La participation de cet élément à la constitution du P squelettique est estimée entre 85% et 89% du P total de l'organisme chez la truite arc-en-ciel (Rønsholdt, 1995; Ouellet, 1999; Hua, 2005). Autrement dit, le P participe également à plusieurs processus physiologiques (NRC, 1993) comme le développement, la croissance et la reproduction. De plus, le P est un composant majeur des acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN). Il participe également à la constitution des adénosines di — et triphosphates (ADP et ATP), et des phospholipides membranaires (Lotz et al., 1968; Hettleman et al., 1983); ce qui lui confère un rôle de premier plan dans les métabolismes en catalysant les réactions de phosphorylation (Kaushik, 2005). Les carences en P se traduisent par l'anorexie, la diminution de la croissance pondérale (Kaushik, 2005) et des déformations squelettiques (Sugiura and Ferraris, 2004). Ces derniers symptômes témoignent du fait que le niveau de P ingéré ne permet pas une constitution et un entretien adéquats des tissus de soutien. Cet indicateur permet, entre autres, de mettre en évidence l'adéquation entre le phosphore fourni dans l'aliment et les besoins des poissons en élevages : **le statut en minéral**.

Compte tenu de son importance dans la nutrition des poissons, cet élément a été ajouté en quantité jugée "importante" dans les aliments des poissons afin de limiter les carences et ses conséquences. Il en a résulté des rejets de cet élément important dans les effluents piscicoles. Au Québec, la pollution piscicole vers les années 2000 a été évaluée à 7 kg de P/ tonne de production (Koko, 2007). Cette pollution a été désignée comme étant impliquée dans l'eutrophisation des cours d'eau récepteurs des fermes piscicoles. Ainsi, une réglementation des rejets en P dans les fermes piscicoles a été mise en place afin de limiter ces effets. L'application des directives de cette réglementation a eu des répercussions importantes sur le secteur. Ainsi, afin de limiter les impacts de cette réglementation sur l'activité piscicole, les acteurs du secteur ont mis en place des stratégies afin de limiter cette pollution (voir section 1.3).

1.1.1 Besoins en phosphore chez la truite arc-en-ciel

La méthode la plus couramment utilisée pour l'estimation du besoin, consiste à employer un aliment semi-purifié avec des apports variables en P sous forme de sels inorganiques et de suivre certaines réponses chez l'animal considéré. Les réponses mesurées sont principalement la croissance pondérale accompagnée ou non d'autres critères (minéralisation osseuse, composition minérale, teneurs circulantes en minéraux, activités enzymatiques...). Proposée par Sugiura et al. (2000a) et rapportée dans (Kaushik, 2005) la méthode la plus pertinente consiste à étudier l'excrétion des rejets métaboliques, le niveau de besoin étant celui où l'on observe une augmentation de l'excrétion de P (Figure 1.1).

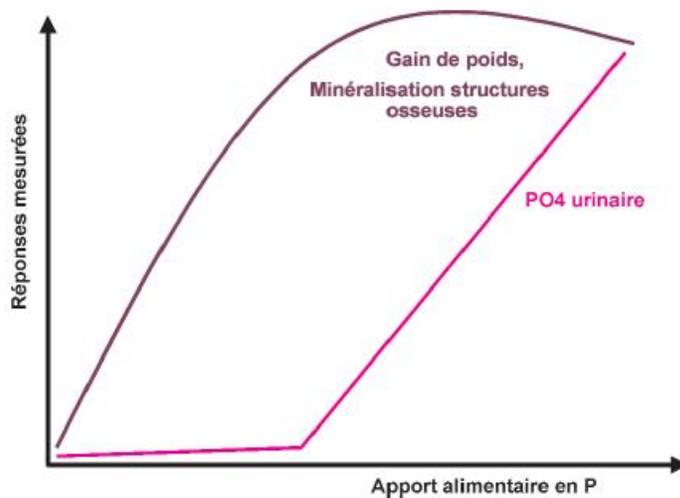


FIGURE 1.1 – Critères d'estimation du besoin en P chez les poissons (Kaushik, 2005)

Les besoins en P chez les poissons varient en fonction du stade de développement. Selon Sugiura et al. (2000a), ces besoins sont moins élevés pour les poissons de grandes tailles sur la base de la concentration en P dans les aliments. Ainsi, Lellis et al. (2004) confirment ces observations en évaluant les besoins en P chez la truite arc-en-ciel. Pour des individus de 200, 300, et 400 g, ils trouvent des besoins respectifs de 0,6; 0,3 et 0,15% de l'aliment. Cette différence s'explique par les besoins plus élevés en constitution et en entretien pendant les premiers stades de développement.

D'autres auteurs ont tenté de déterminer les besoins en P chez les poissons en terme de proportion du P total dans l'aliment. Les données disponibles chez les poissons téléostéens montrent que les besoins varient entre 0,5 et 0,9% (Kaushik, 2005; NRC, 2011) et 0,4 à 0,7% du P total (Hardy and Gatlin, 2002; Kaushik, 2005) faisant ainsi du P le constituant minéral de l'aliment quantitativement le plus important. Contrairement aux animaux terrestres, pour lesquels le rapport Ca/P idéal a pu être bien établi, il n'en est pas de même chez les poissons. Ceci résulte d'une part des variations de la qualité de l'eau qui peuvent agir sur le besoin en calcium et d'autre part de la variabilité dans la disponibilité en P contenu dans les matières premières (Kaushik, 2005; NRC, 2011). Chez la truite arc-en-ciel ces besoins sont estimés à 0,35-0,57% par Rodehutschord et al. (2000) puis à 0,5-0,6% du P total par Lall and Nanton (2002).

Considérant l'observation de Yamamoto et al. (2000), selon laquelle les truites peuvent contrôler leur ingestion d'énergie par unité de masse corporelle, Sugiura et al. (1998) estiment qu'il serait plus pertinent d'exprimer les besoins en tenant compte de ce facteur. Ils suggèrent de considérer le rapport entre le P et l'énergie totale disponible. Cet ajustement de la prise alimentaire proportionnellement à l'augmentation de la concentration énergétique du régime, rapporté notamment chez les volailles, permet de maintenir la quantité d'énergie disponible ingérée de façon constante (Fournier, 2012). Tenant compte de ce qui précède, Rodehutschord (1996) puis Cho and Bureau (2001) ont estimé ce besoin en P entre 0,19 et 0,27 g/MJ.

1.1.2 Source, forme et disponibilité du phosphore

Il est généralement accepté par la communauté scientifique que l'aliment constitue la seule source de P chez le poisson (Verri and Werner, 2019). La disponibilité du P pour le poisson dépend de sa source (organique ou inorganique) et de sa forme (mono —, di —, tribasique, hydroxyapatite, phospholipides, etc.). Chez les salmonidés, le P inorganique (Pi) est hautement disponible (NRC, 1993). Cette digestibilité est plus importante pour les sources de P inorganique monophosphate (de sodium [98%], de K [98%] et de Ca [94%]) comparativement à celle dibasique (71%) ou tribasique (64%) chez la truite arc-en-ciel (Kaushik, 2005).

En pisciculture, la farine de poissons a été la principale source de protéines pour les espèces carnivores pendant des années. Son importance dans la formulation des aliments a considérablement baissé, mais elle reste toujours un ingrédient non négligeable. Elle est très riche en P sous forme d'hydroxyapatite et de phospholipides (Vandenberg, 2001). La forme hydroxyapatite est peu disponible pour les poissons. Par conséquent, les phospholipides sont la forme principale de P disponible chez les poissons. Néanmoins, parmi les ingrédients couramment utilisés dans la formulation des régimes de truite arc-en-ciel, la farine de poissons présente la plus forte digestibilité des apports en P (66-74%). La disponibilité du P contenu dans les autres ingrédients majeurs comme la farine de plumes, la farine de blé, le tourteau de soja et gluten de maïs, est estimée respectivement à 62, 47, 22, et 9% chez la truite arc-en-ciel (Kaushik, 2005).

Dans un contexte de substitution de la farine de poissons par une source protéique végétale, la farine de soja est l'ingrédient de substitution préconisé. Avec une digestibilité en P aussi faible, cet ingrédient ne semble pas optimal pour assurer les apports en P. Cependant, l'ajout de phytase permet d'améliorer la digestibilité du P présent dans l'aliment à base de farine de soja (Medale et al., 1998; Cheng and Hardy, 2004; Rodehutsord, 1996). En effet, l'ajout de cette enzyme dans les régimes permet d'augmenter la disponibilité du P phytique (Vandenberg, 2001).

1.1.3 Absorption et excrétion du phosphore

Il est communément accepté que la quasi-totalité du P absorbé par les poissons provient de leur aliment, même si une absorption d'origine environnementale a été démontrée (Coffin et al., 1949; Guillaume, 1999), cette absorption du P externe est toutefois jugée faible, voire insignifiante. Par conséquent, seulement le P alimentaire est pris en compte dans les travaux d'estimation des besoins des poissons d'élevage. Chez la truite arc-en-ciel, l'absorption du P alimentaire se déroule au niveau de l'intestin alors que l'excrétion de ce nutriment se fait principalement au niveau des reins.

Absorption du phosphore

Au niveau fondamental, les mécanismes d'absorption du P ne sont pas très bien documentés pour les différentes espèces de poissons (Verri and Werner, 2019). Un certain nombre d'études a mis en évidence les mécanismes qui interviennent pendant l'absorption de cet élément chez les poissons

(Sugiura et al., 2003; Avila et al., 2000; Lall, 1991) en se basant sur l'étude de Murer et al. (1994) chez les vertébrés supérieurs. D'après ces auteurs, le transport du P alimentaire de la lumière intestinale vers le milieu intérieur se fait de manière passive par simple diffusion, et active grâce à une protéine de transport. Ceci est le cas comme pour la plupart des minéraux majeurs (Barlet et al., 1995). Le transport passif par diffusion a été mis en évidence dans des conditions de pH neutre dans l'intestin (Cross et al., 1990).

Chez les mammifères, l'absorption du P se fait au niveau de la bordure en brosse de l'intestin par un système de cotransport sodium-phosphate (NaPi) permettant l'entrée simultanée de ces deux ions dans l'entérocyte (Hildmann et al., 1982). Par ailleurs, quelques études sur l'absorption intestinale du P chez la truite arc-en-ciel ont été réalisées afin de mieux comprendre ce phénomène (Avila et al., 2000; Sugiura et al., 2003). D'après ces auteurs, le NaPi-II, principal transporteur intestinal du P en matière d'absorption intestinale, serait surtout retrouvé dans l'intestin proximal et le cæcum pylorique. Cet isoforme de la protéine transmembranaire des entérocytes se trouverait en quantité moindre dans l'intestin distal et serait absent dans l'estomac et l'œsophage. Ces observations montrent que l'absorption du P se fait majoritairement dans l'intestin proximal et dans le cæcum pylorique de la truite arc-en-ciel. Ce transport est maintenu et contrôlé par la Na-K (cotransport sodium-potassium) ATPase localisée au niveau de la membrane basolatérale (Danisi and Straub, 1984). En incubant des portions de l'intestin dans une solution dépourvue d'ions sodium, Avila et al. (2000) ont mis en évidence un transport passif de P à travers la membrane, confirmant ainsi l'existence de ce transport chez la truite arc-en-ciel. Malgré ces connaissances, le phénomène d'absorption de ce nutriment reste un sujet à étudier afin d'en avoir une meilleure compréhension.

Excrétion du phosphore

Selon Lall and Nanton (2002), le P présent dans le sang est sous forme inorganique, majoritairement sous la forme HPO_4^{2-} . Chez la truite non carencée, cette fraction de P corporelle est majoritairement issue de l'absorption intestinale. Elle n'est pas totalement assimilée dans l'organisme. En effet, selon Hayes and Jodrey (1952) une partie est déposée au niveau des tissus osseux (écailles, vertèbres, opercules, etc.) et mous (protéine, lipides, cartilages). L'autre partie est excrétée par les reins et les branchies (Cho et al., 1991; Dosdat, 1992). Cette excrétion participe au maintien de l'équilibre minéral : l'osmorégulation. Cette homéostasie résulte du processus de filtration et d'absorption des ions phosphates au niveau de l'unité structurale et fonctionnelle du rein : le néphron. Ce processus va dépendre principalement du niveau P dans l'aliment et de la pression osmotique des cellules sous l'effet du milieu environnant (eau douce, ou salée). Au niveau des branchies, cette excrétion se fait au niveau des ionocytes (cellules à chlorures) des lamelles branchiales. Cette excrétion au niveau des branchies participe à l'osmorégulation et l'équilibre acidobasique chez le poisson (Bucking and Wood, 2006). Cet équilibre acidobasique est lié aux conditions d'oxygénation de la truite arc-en-ciel (normoxie, hypoxie ou hyperoxie). L'excrétion rénale de phosphate est plus importante que celle effectuée au niveau des branchies. Elle représente 90% du P sanguin excrété (Dosdat, 1992). Le P excrété par ces deux

organes est sous la forme dissoute contrairement à celui rejeté par les fèces, qui se présente sous la forme particulaire. L'importance relative de ces différentes sources de pollution par rapport au P total apporté au poisson via l'aliment a été établie par le bilan alimentaire en P (voir section 1.1.7).

1.1.4 Statut minéral : cas du phosphore

Le concept de statut minéral est utilisé en physiologie animale (Dean et al., 2015) et humaine (Chan et al., 1984), mais est toujours relié à un tissu. Il est considéré comme un indicateur qui renseigne sur l'état nutritionnel par rapport à un minéral considéré. De manière pratique en nutrition animale, ce statut permet de mettre en évidence l'adéquation entre les apports, venant dans l'aliment, et les besoins du poisson en élevage (Le Luyer et al., 2014). En aquaculture, il est important de connaître les besoins en P afin d'ajuster les apports dans les régimes, minimiser les rejets en P, sans induire de carence chez les poissons. Plusieurs études ont été réalisées sur les besoins en P en utilisant des indicateurs comme le gain de poids, la conversion alimentaire, la teneur en P dans les tissus, la densité minérale osseuse, les déformations osseuses et l'activité de certaines enzymes : phosphatase alcaline, enzymes impliquées dans la néoglucogénèse (NRC, 1993; Kaushik, 2005; Sugiura et al., 2000b).

Chez la truite arc-en-ciel, le P et le calcium (Ca) corporel et dans les tissus osseux sont liés à la composition en P et Ca des apports. Considérant ce lien, Sugiura and Ferraris (2004) recommandent l'emploi des teneurs en P et Ca dans le corps entier et les tissus pour mettre en évidence le statut minéral du poisson. En revanche, pour le P, la présence d'un lien entre le P plasmatique et celui dans les régimes est controversée. Hille (1982) rapporte que le P dans le sérum de la truite arc-en-ciel ne dépend pas du niveau de P dans le régime consommé. Dougall et al. (1996) puis Skonberg et al. (1997) montrent que le P plasmatique n'est pas lié au P ingéré. Cependant, Vielma and Lall (1998) suggèrent que le P plasmatique varie en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon de sang après un repas. Considérant ces données, Sugiura and Ferraris (2004) concluent que, comme les animaux terrestres, le P dans le plasma ou le sérum ne dépend pas seulement de la composition en P de l'aliment, mais du temps après la prise alimentaire (période de jeun). En revanche, cette conclusion ne prend pas en compte les observations de Bureau et al. (1999). Dans cette étude ils mettent en évidence un lien entre le niveau de P ingéré et le P dans le plasma en utilisant 4 régimes contenant un niveau en P croissant (0,75, 1,15, 1,66 et 2,19%). Malgré ces observations et suite à la recommandation de Sugiura and Ferraris (2004), le statut en P chez les poissons est généralement déterminé en se basant sur la composition corporelle ou osseuse en P.

La majorité de ces travaux se focalisent sur des individus jeunes (larves et juvéniles). Sugiura et al. (2000b) ont cherché la précision d'un ensemble d'indicateurs du statut en P chez les truites arc-en-ciel de grandes tailles. À la suite de son travail, ils recommandent le dosage du P dans les urines pour valider le statut minéral.

Une carence prononcée en P entraîne des déformations de structures osseuses occasionnant, dans certains cas, des phénomènes de torsions et de déformations du corps et des opercules (Deschamps et al.,

2014; Sugiura and Ferraris, 2004). Ces déformations sont hautement corrélées à la minéralisation des écailles (Deschamps et al., 2014; Le Luyer et al., 2014). Ainsi, le dosage du P et de la teneur en cendres dans les écailles permet de mettre en évidence une carence (figure 1.2).

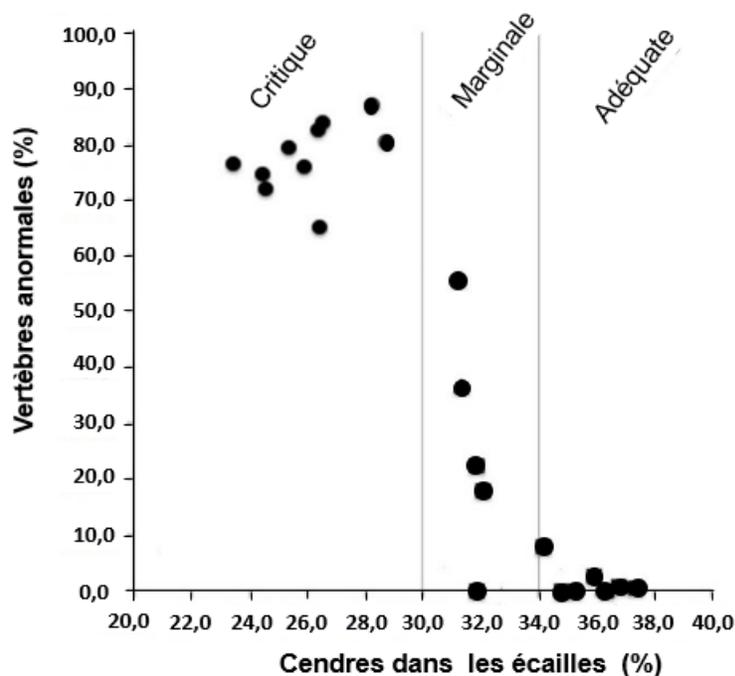


FIGURE 1.2 – Corrélation entre la minéralisation (contenu en cendres, %) des écailles et le pourcentage d’anomalies vertébrales (%) chez des truites soumises à une déficience en phosphore prolongée (Deschamps et al., 2014).

Selon Deschamps et al. (2014), la probabilité d’observer des déformations au niveau des vertèbres est importante quand la teneur en cendre est inférieure à 28%. Cependant ce seuil peut varier en fonction de l’aliment auquel les poissons sont habitués depuis les premières étapes de leur vie et l’âge de ceux-ci. La détermination de la teneur en P et cendre corporelle, et plus généralement, la composition proximale, passent par le sacrifice de l’animal. Il en est de même lors des analyses des cendres et de P dans les écailles.

Pour la composition proximale, le poisson est euthanasié, la carcasse est broyée puis lyophilisée. La masse sèche ainsi obtenue est incinérée pour obtenir les cendres. Le contenu en P est obtenu en cet élément dans la solution de digestion de ces cendres avec des acides (chlorhydrique et nitrique). Ce processus de digestion est optimisé en amenant la solution en ébullition.

Le P et les cendres dans les écailles sont déterminés par la même méthode. Au préalable, les écailles prélevées dans les carcasses sont dégrossies (élimination de la matière organique), puis séchées. Cette étape de dégrossissement se fait par bains successifs dans des solvants organiques (éthanol, acétone, trichloréthylène). Ce travail est long et fastidieux et sujet au biais de l’opérateur. De plus, ce travail né-

cessite l'utilisation de plusieurs solvants et acides dont la manipulation est potentiellement dangereuse (incinération acide avec ébullition).

1.1.5 L'absorptiométrie aux rayons X (DXA) comme outils d'estimation de la minéralisation osseuse et de la composition proximale des truites

Nécessitant le sacrifice du poisson, ces méthodes classiques ne permettent pas de faire un suivi sur un même poisson en plusieurs temps d'échantillonnage. Le DXA a été proposée avec succès pour estimer le contenu minéral osseux (CMO) et la densité minérale osseuse (DMO) chez l'homme (Perilli et al., 2012) et chez les animaux en raison de sa précision (Martinez, 2017), sa rapidité, les bas niveaux de radiation et de sa calibration stable. Il est rapporté par Létourneau-Montminy et al. (2017) que cette technique est utilisée par Agriculture et Agroalimentaire Canada depuis 1995 pour déterminer la composition corporelle et minérale des porcs et des agneaux.

Le principe de fonctionnement du DXA est basé sur la mesure de la transmission des rayons X à travers le corps. Une source de rayons X génère un faisceau de rayons X composés de particules de photons qui vont circuler selon le gradient d'énergie électromagnétique. Ces photons vont présenter des interactions physiques avec les tissus traversés entraînant une atténuation du faisceau. Cette atténuation va dépendre de l'énergie des photons et de la densité et de l'épaisseur du tissu traversé (Toombs et al., 2012).

La mesure du CMO par DXA est basé sur l'hypothèse que le corps est un modèle à deux compartiments : minéraux osseux et tissus mous (muscles, matières grasses, peau et eau). Ce dernier compartiment possède densité la plus faible. Afin de différencier le compartiment minéral et les tissus mous, la source de rayons X génère un faisceau de rayons X avec deux énergies photoniques. L'atténuation du faisceau de rayons X diminue à mesure que l'énergie des photons augmente. Les tissus de basse densité (tissus mous) permettent le passage de plus de photons, atténuant ainsi le faisceau moins que les tissus osseux (Pietrobelli et al., 1996).

Afin de déterminer la quantité de tissus mous gras et sans gras (maigre) dans le corps, le DXA mesure le rapport d'atténuation des deux énergies photoniques dans le compartiment des tissus mous (généralement le tissu mou pur qui est adjacent à l'os). Dans le compartiment des tissus mous, le rapport de l'atténuation (R-value) des deux énergies photoniques est lié linéairement à la proportion de graisse dans les tissus mous (Laskey, 1996). Par conséquent, l'atténuation du faisceau de rayons X capté par le détecteur est analysée et la masse grasse (MG), la masse maigre (MM) ainsi que le CMO peut sont discriminés (Figure 1.3).

Il existe plusieurs types d'appareils de DXA sur le marché (GE Luna DPX, GE Luna Prodigy, GE Luna DPX, Hologic QDR, etc). Ils sont basés sur le même principe physique mais diffèrent quant aux générateurs à rayons X, aux détecteurs, à la géométrie du faisceau (pencil vs. fan-beam vs. narrow-beam), aux algorithmes de détection des contours de l'image et à la méthode de calibration.

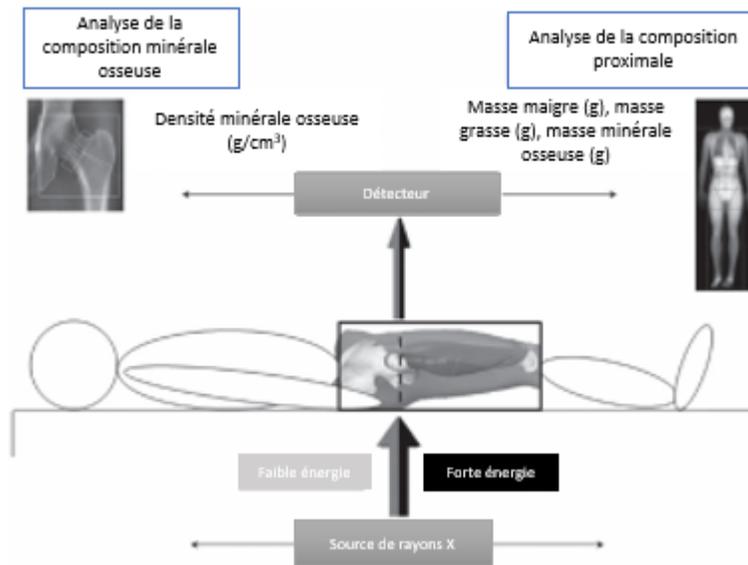


FIGURE 1.3 – Principe fondamental de l’absorptiométrie à rayons X à double énergie (DXA) d’après Toombs et al. (2012) : le DXA mesure la transmission des rayons X à haute et basse énergie à travers le corps. L’énergie du faisceau de rayons X est atténué par le passage à travers les tissus.

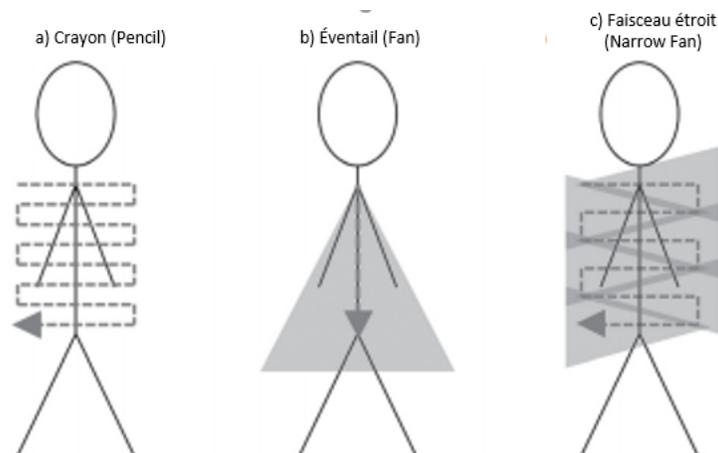


FIGURE 1.4 – Description de la trajectoire du faisceau de rayons X (flèche) à double énergie des appareils d’absorptiométrie en fonction du système (DXA) : (a) faisceau crayon, (b) faisceau éventail, et (c) faisceau étroit (modifié Toombs et al. (2012)).

La fiabilité du DXA est liée à l'opérateur, au sujet et au type d'appareils utilisé. Les appareils de seconde génération du type "pencil-beam" et "narrow fan-beam" (Figure 1.4) donne une généralement meilleure précision comparativement à ceux du type "fan-beam" (Toombs et al., 2012).

La précision d'un instrument DXA individuel pour l'évaluation du CMO est excellente, avec des CVs inférieurs à 1,0% (Johnson and Dawson-Hughes, 1991; Compston et al., 1992). Cependant plusieurs auteurs (Mazess et al., 1990; Johnson and Dawson-Hughes, 1991; Fuller et al., 1992; Compston et al., 1992; Goldberg and Fung, 2019) ont rapportés des CVs élevés pour les mesures des tissus mous (3,1% pour la masse maigre, 8,6% pour la masse grasse et 7,9% pour le pourcentage de graisse corporelle).

Les données de composition proximale obtenue ont été comparé avec les méthodes classiques (analyse chimique ou dissection) chez plusieurs espèces animales. Chez les rats vivants, (Nagy and Clair, 2000) ont été utilisés les valeurs du DXA (MG, MM, CMO) pour prédire les valeurs déterminées chimiquement (observées) de la composition en lipides et en MM. La composition en lipides observée a été prédite au mieux par la MG associée à la MM obtenue avec le DXA [$MG (g) = -0,50 + 1,09(DXA \text{ MG}) - 0,11(DXA \text{ MM})$, $R^2 = 0,73$, erreur quadratique moyenne (RMSE) = 0,233 g]. Cette observation est paradoxale étant donné que la MM est la masse des tissus mous sans la masse grasse. La MM observée est prédite à partir de la seule donnée de MM obtenue avec le DXA [$MM (g) = -0,14 + 1,04(DXA \text{ MM})$, coefficient de détermination (R^2) = 0,98, écart quadratique moyen (RMSE) = 0,238 g]. Chez les porcs vivants (56 à 138 kg), Mitchell et al. (2003) quant à eux ont utilisé principalement les données de proportion (%) obtenues avec le DXA pour prédire la composition en lipides [$MG (\%) = 6,5 + 0,817(DXA \text{ MG})$, $R^2 = 0,88$, erreur type (SEM) = 2,06;] et en MM ($MM (\%) = 2,37 + 0,886(DXA \text{ MM})$, ($R^2 = 0,79$, SEM = 2,07). Ces auteurs ont aussi développé des équations de prédictions assez bien corrélées ($R^2 = 0,82$ à $0,88$) avec les données observées en utilisant des sections de scans (cross-sectional slice) sur différentes parties du corps de l'animal. De plus, ils ont réussi à obtenir un modèle de prédiction de la MM à partir de données de R-value aussi précises que celle obtenue avec la proportion MM donnée par le DXA. La relation entre la MG et la teneur en protéines et en masse hydrique chez les porcs a été établie avec une bonne précision à partir de la MM par Mitchell et al. (1998) [$Protein (g) = -145 + 0,23(DXA \text{ MM})$, masse hydrique (g) = $150 + 0,73(DXA \text{ MM})$].

Peu d'études proposent de modèle de prédiction des minéraux à partir des données de DXA. Nagy and Clair (2000) estiment une bonne prédiction de la teneur en cendres corporelle en se basant sur CMO sans pour autant proposer une équation. La comparaison entre les cendres observées et le CMO montrent une bonne précision pour la majorité des observations (figure 1.5).

Pour les minéraux comme le P et Ca, qui nous intéressent sur cet aspect de la minéralisation osseuse des poissons, très peu d'études utilisant le DXA vont jusqu'à proposer modèle de prédictions pour ces minéraux. Ces deux éléments sont les constituants majeurs des tissus osseux, par conséquent nous pensons qu'il existe un lien fort entre le CMO et la teneur corporelle en P et Ca. En établissant ce lien, il sera possible d'évaluer la minéralisation des truites arc-en-ciel et établir le statut minéral en tenant compte du niveau de P dans le régime utilisé. En outre, le bilan en P de l'élevage des truites

pourra être établi et les rejets en P estimés pour un cycle de production. Ce travail permettra de jeter les bases d'une méthode d'estimation des rejets en P dans les fermes salmonicoles en utilisant le DXA, permettant d'évaluer avec précision et rapidité le potentiel de pollution de chaque aliment (riche en P, pauvre en P, riche en énergie, à base de protéine d'origine végétale, avec pièges à P, etc.) ainsi que de la méthode d'élevage (alimentation à la main ou avec un distributeur automatique, à satiété ou en rationnement, en circuit ouvert ou fermé, etc.).

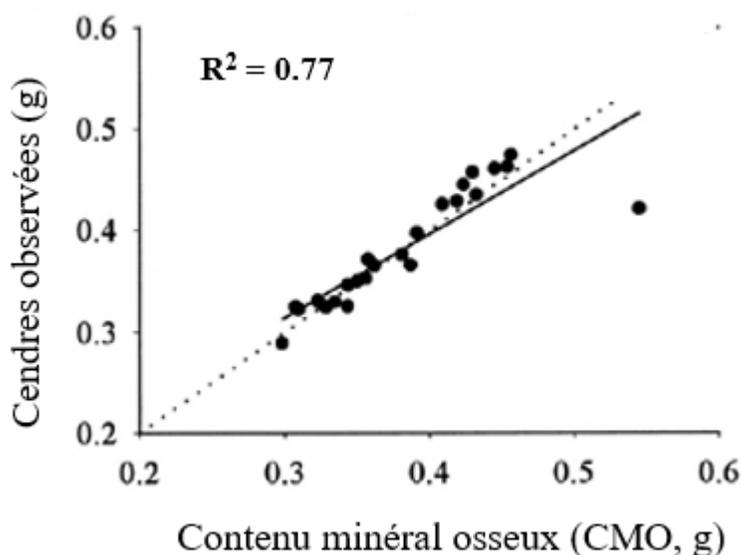


FIGURE 1.5 – Comparaison entre les cendres coporelles et le contenu minéral osseux chez les rats vivants d'après Nagy and Clair (2000). Le trait noir indique la droite de regression et celui en pointillé la modèle linéaire parfait ($Y=X$)

1.1.6 Régulation de l'absorption en cas de carence en phosphore

Les rôles principaux du P dans le métabolisme intermédiaire sont clairement établis chez les poissons (Kaushik, 2005). En dépit des rôles principaux du P, on en sait peu sur les effets physiologiques de la carence en P. Cela est probablement dû au fait que le P est abondant dans de nombreux aliments. Par conséquent, une carence alimentaire en P est rarement observée chez de nombreuses espèces vertébrées. Cependant, la compréhension de la carence clinique en P chez les poissons s'impose de plus en plus comme une nécessité, en raison de la pression croissante sur les pisciculteurs afin de réduire le P des effluents. Cette pression implique une réduction significative de la teneur en P dans les aliments. De plus, cette stratégie de réponse nécessite l'établissement d'indicateurs afin de mettre en évidence les carences en P associées à la baisse de cet élément dans les régimes (Le Luyer et al., 2014; Deschamps et al., 2008; Poirier Stewart et al., 2014).

La régulation de ces mécanismes a été bien étudiée. Chez la truite arc-en-ciel, la restriction alimentaire de P augmente l'absorption intestinale du Pi. Cette régulation se fait, via un mécanisme moléculaire, qui régule l'absorption du Pi par les transporteurs de sodium-phosphate du cæcum pylorique et de l'intestin proximal (I-NaPi et PC-NaPi respectivement). En effet, une réduction du P alimentaire entraîne un mécanisme de régulation qui se fait à travers une augmentation de l'expression des ARNs messagers de ces deux types de transporteurs (I-NaPi et PC-NaPi). Ainsi, cette adaptation entraîne l'augmentation de l'absorption du P au niveau du cæcum pylorique et de l'intestin proximal (Sugiura et al., 2003; Avila et al., 2000). Ces deux transporteurs ont un homologue (62%) au niveau du rein (K-NaPi). Son abondance au niveau du rein des truites arc-en-ciel est régulé par une surexpression en cas de restriction chronique de P alimentaire (Sugiura et al., 2003; Lake et al., 2010). Des travaux antérieurs ont suggéré que l'activité rénale du NaPi et l'expression de son ARN messenger (ARNm) sont relativement insensibles aux variations de P dans l'aliment (Murer et al., 1994; Kohl et al., 1998). La raison évoquée pour expliquer cela est liée au fait que ce mécanisme est considéré comme le principal mécanisme de régulation rénale du P, et que sa régulation n'est pas dépendante de la transcription génétique. Elle est plutôt sous le contrôle de l'activité du transporteur.

Il est bien établi que les poissons peuvent absorber divers minéraux solubles dans l'eau. En effet, le poisson peut satisfaire ses besoins nutritionnels en calcium en prélevant directement les ions Ca^{2+} de l'eau (Fenwick, 1989). En raison des faibles concentrations de P dans les eaux naturelles, le mécanisme d'absorption du P par les branchies est considéré comme inefficace, voire inexistant. Ainsi, il est unanimement accepté et assumé depuis longtemps que le P doit être fourni à travers l'aliment. Cette évidence semble être le cas chez les truites arc-en-ciel ayant un statut normal pour cet élément (poissons non carencés). Une étude récente a toutefois démontré que les truites arc-en-ciel carencées en P sont en mesure d'absorber le P dans leur environnement (Sarker et al., 2011). En mesurant l'excrétion urinaire de P inorganique chez des truites carencées constamment maintenues dans une eau statique, il a été mis en évidence une nette absorption du P par ces poissons à partir de l'eau des bassins (Figure 1.6).

Les calculs préliminaires suggèrent que ce P absorbé dans l'eau des bassins peut représenter une partie non négligeable de leurs besoins en P, en fonction du statut (carencé ou non), et de l'âge. Notre hypothèse pour donner suite à ces observations est que : la carence en P chez la truite arc-en-ciel entraîne une adaptation par une régulation positive des transporteurs branchiaux d'ions afin de permettre l'absorption de P dans l'eau. Ce travail d'investigation fera l'objet du chapitre 4 de ce manuscrit.

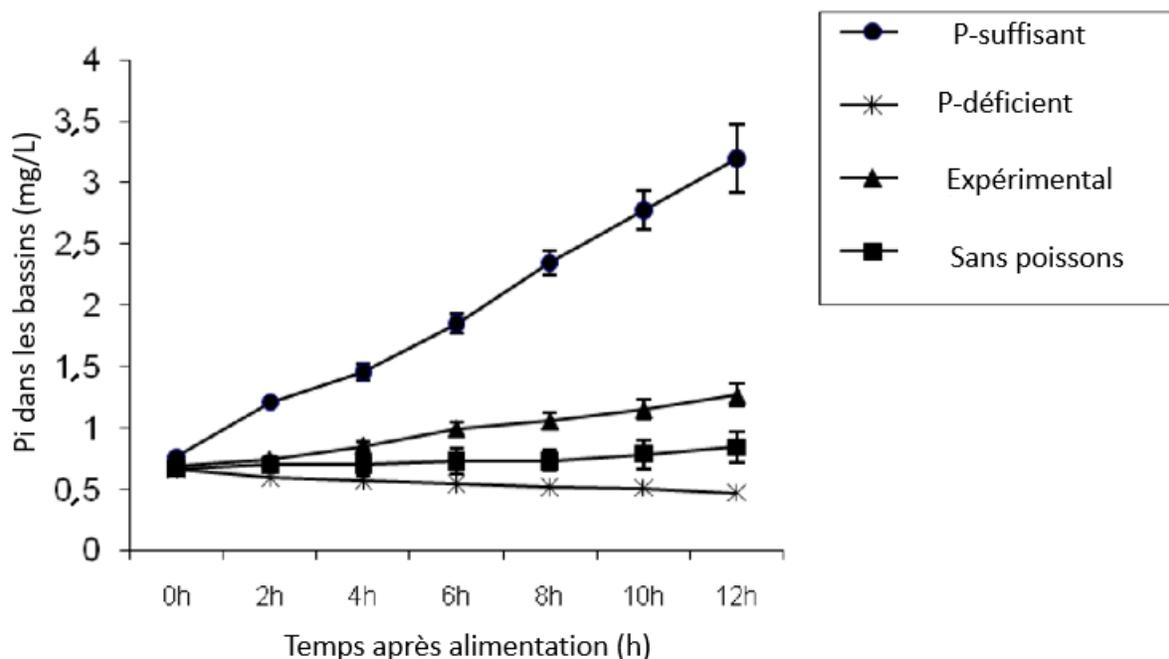
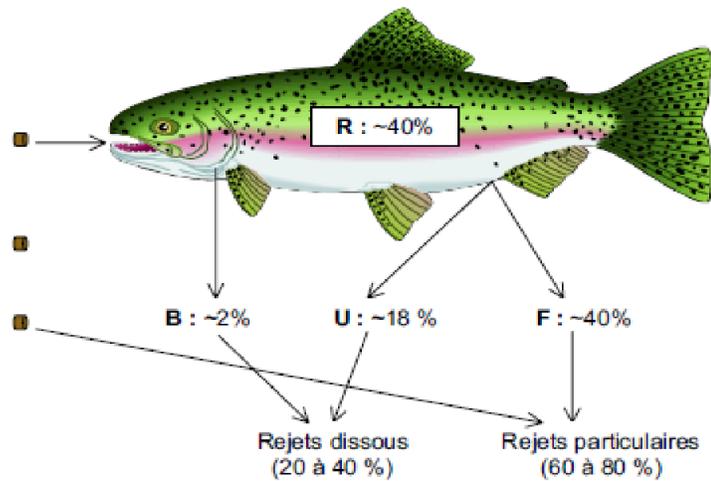


FIGURE 1.6 – Accumulation de P dans les bassins d’après Sarker et al. (2011). Les bassins sont nourris, en triplicata, par un aliment riche, très pauvre et pauvre en P (P-suffisant, P-déficient, Expérimental, respectivement). Les bassins sans poissons ont été utilisé comme témoin.

1.1.7 Bilan de l’absorption du phosphore chez la truite

Plusieurs facteurs influencent l’absorption, l’utilisation et l’excrétion du P (Figure 1.7) dans l’organisme (NRC, 2011). Selon Koko (2007), les 4 principaux sont : 1) la qualité de l’aliment, qui dépend d’une part de la teneur et de la digestibilité du P, et d’autre part, de l’équilibre des différents nutriments ; 2) la quantité et le mode de distribution de l’aliment ; 3) l’adéquation du régime alimentaire au besoin réel de l’espèce de poisson en élevage ; et 4) l’état physiologique du poisson : notamment l’âge et l’état de santé. Une quantité du P digestible, fournie dans l’aliment, est absorbée par la truite arc-en-ciel. Cette quantité est estimée entre 40% et 60% (Ouellet, 1998; Kaushik, 2005). Le reste (40-60%) du P non absorbé est excrété avec les fèces. Une partie du P absorbé est retenue pour les besoins du poisson. Chez la truite arc-en-ciel, plusieurs valeurs ont été proposées afin de quantifier ce P retenu, soit entre 20-30% (Dosdat, 1992), 39% (Cho et al., 1991) et 38-55% (Azevedo et al., 1998) du P total dans l’aliment. Le P absorbé non retenu est excrété par les branchies et le rein. Selon Ouellet (1998), le rein excrète 18% du P total via les urines tandis que les branchies rejettent une faible proportion estimée à 2%. Cependant, cette excrétion branchiale peut atteindre 10% du P total Dosdat (1992). Ces rejets relargués dans les cours d’eau directement ou après passage dans un bassin de décantation vont jouer un rôle sur l’enrichissement des cours d’eau récepteurs.



Légende : B représente les pertes branchiales
 U représente les pertes urinaires
 F représente les pertes fécales
 R représente la rétention dans le poisson

FIGURE 1.7 – Bilan simplifié du P chez la truite arc-en-ciel d’après Ouellet (1999).

1.2 Impacts de la pisciculture sur l’environnement

La prise en compte des problèmes liés à la pollution piscicole est apparue récemment. En effet, ce problème ne faisait pas partie des préoccupations dans le monde piscicole jusqu’à la fin des années 1970 (Fauré, 1983). C’est vers les années 1980 que les acteurs de la filière piscicole ont commencé à prendre en compte cette problématique, avec la mise en place d’outils afin de traiter les matières en suspension (MES) dans les effluents piscicoles. C’est ainsi qu’apparaissent les premiers indicateurs des rejets au niveau de la salmoniculture en France et au Danemark (Iversen, 1995). Le terme pollution n’est utilisé que plus tard, vers la fin des années 1990. L’origine de cette pollution et sa nature ont été établies. Les mesures de limitations des rejets ont été mises en place avec plus ou moins de succès.

1.2.1 Rejets des fermes piscicoles : origines, types et natures

L’origine, la nature et les types de rejets responsables de la pollution piscicole ont été bien étudiés et décrits. Les MES, P total et en azote (N) sont les polluants les plus couramment évalués dans les effluents piscicoles. Dans certains cas, les bactéries mésophiles sont évaluées. Ces rejets ont plusieurs origines possibles : elles sont soit liées à l’aliment non ingéré par le poisson, ou soit au poisson lui-même, après ingestion de l’aliment (métabolisme et digestion). En fonction de sa composition, de sa digestibilité, une partie de l’aliment sera excrétée sous forme solide, les fèces (non digérée), et une autre partie sera libérée sous forme dissoute (digérée non fixée). Cette dernière est liée au métabolisme du poisson. En fonction de la composition de l’aliment et de sa digestibilité, les proportions rejetées

en N et en P varient. La majorité de l'azote est rejetée sous forme dissoute, tandis que pour le P, la principale fraction est sous forme particulaire (Enell and Löf, 1983). Le tableau 1.1 résume l'origine, la nature, et le type de polluant présent dans les effluents de salmonicultures, ainsi que l'importance relative (+ ou -).

TABLE 1.1 – Origine, nature, source des rejets de polluants, ainsi que leur importance (+ ou -) dans les fermes salmonicoles (Laguerre, 2008).

Origine	Nature rejets	Azote (N)	Phosphore (P)	Autres
Non ingéré	P Particulaire	N Solide (+)	P solide (-)	MES
Fèces	P Particulaire	N Solide (-)	P solide (++)	MES
Métabolisme	P Dissous	N ammoniacal, urée, nitrates, nitrites : dégradation des protéines (+ +)	Orthophosphates PO_4^{3-} (-)	Dégradation lipides et glucides : CO_2 et H_2O Carbone des aliments : CO_2 , HCO_3^-

En pratique, des mesures sont réalisées au niveau de l'entrée (source d'eau utilisée) et à la sortie (exutoire) de la pisciculture pour évaluer la proportion de ces polluants dans les effluents. Ces données permettent de calculer le bilan réel issu de l'activité piscicole. Ce bilan a été réalisé dans trois fermes de truites de dimension variable (15, 55 et 500 tonnes/an) afin d'établir l'effet potentiel de la pollution sur les cours d'eau récepteurs (Boaventura et al., 1997). Concernant le P, cette étude a mis en évidence une pollution annuelle comprise entre 8,8 et 22,6 kg/tonne de poissons. Réalisée au Portugal, cette étude donne une estimation de la pollution au P comparable (15-25 kg/tonne) à celles déjà rapportées en Angleterre et Irlande du Nord (Foy and Rosell, 1991). Au Québec, cette pollution au P a été évaluée à 7,4 kg/tonne en 2004 (Koko, 2007). Cette pollution, jugée importante, a été considérée comme étant responsable de l'eutrophisation des cours d'eau récepteurs des effluents issus des piscicultures (STRADDAQ, 2010). En guise de comparaison, cette pollution ne représente qu'une proportion insignifiante des rejets en P provenant des eaux usées urbaines (8,8 vs. 600.000 tonnes/an), si nous considérons qu'une personne au Québec utilise 200 litres en moyen par jour et que le règlement municipal (R.V.Q.416) fixe un seuil de 1 mg de P/litre pour rejet dans le réseau d'égouts pluvial ou dans un cours d'eau. Malgré son importance relativement faible, cette pollution reste une préoccupation importante dans le secteur dans la perspective d'établir durablement une production efficace tout en minimisant les externalités négatives.

1.2.2 Rejets en phosphore

L'aliment est la principale source de P rejeté par les fermes piscicoles dans l'environnement (Ketola and Harland, 1993). Il existe plusieurs voies de rejets en P dans les fermes piscicoles : les fèces, l'aliment non ingéré, l'excrétion branchiale et urinaire, et en enfin les mortalités de poissons. Les poissons

excrètent le P sous la forme soluble et particulaire (Lall, 1991). La majorité (60 à 80%) de la pollution piscicole liée au P est issue des rejets particuliers (Ouellet, 1999). Dans les piscicultures modernes, où le gaspillage alimentaire est assez bien limité, ces rejets particuliers sont principalement composés des fèces des poissons (Dosdat, 1992; Kibria et al., 1995). Cette forme particulaire précipitée au fond des bassins ou accumulée dans les sédiments des bassins de décantation est susceptible d'être remise en suspension contribuant ainsi à élever la fraction dissoute directement disponible pour les plantes (Boström et al., 1988).

Formes et solubilisation du phosphore dans les bassins de décantation

Le P est un élément très dynamique. Comme dans le milieu naturel, il se retrouve sous deux formes : dissoute ou particulaire. Selon Numery (2018) le P dissous comprend les formes minérales d'ions orthophosphates, et les formes organiques en cours de minéralisation de la matière morte (phosphoprotéines, phospholipides). En décrivant le phénomène d'eutrophisation, Ouellet (1999) décrit un relargage du P sous forme de phosphates organiques dans l'eau par les particules sédimentées dans le fond des bassins de décantation. Cette fraction de P organique dissoute dans l'eau (dissolution) peut relâcher des phosphates organiques en solution dans l'eau, lesquels peuvent ensuite être hydrolysés en orthophosphate par des processus chimiques ou enzymatiques. Ce processus est fonction de la température : en été, cette transformation peut être très rapide (de 5 à 100 min) tandis qu'en hiver, elle peut être 100 fois plus lente (Wetzel, 1983). Les ions orthophosphates (classiquement désignés PO_4^{3-}) constituent la seule forme de P biodisponible pour les végétaux. Ils sont présents dans les eaux interstitielles des sols et des sédiments et dans la colonne d'eau des milieux aquatiques. Prélevés par les végétaux pour produire de la matière organique (biosynthèse), ils sont ensuite libérés par la matière morte sous l'action des bactéries hétérotrophes (minéralisation). Ces formes de P de la fraction dissoute peuvent être distinguées par leur taille : les orthophosphates sont de petite taille ($0.45\mu m$), alors que la forme de P organique dissoute est de taille plus grande. En utilisant des filtres de $0.45\mu m$ ces deux formes sont séparées.

Le P particulaire est soit organique, soit minéral. La fraction organique correspond à l'ensemble des phosphates de la matière organique animale et végétale, vivante ou en voie de minéralisation. Selon Numery (2018), elle peut représenter une proportion de 50% dans des sédiments de rivière en zone agricole. La fraction inorganique peut être présente sous deux formes ; le P cristallisé (sels de calcium, de fer ou d'aluminium) déposée dans le fond des bassins, qui compte parmi les formes les moins solubles et le P fixé ou adsorbé à la surface des particules et de ses constituants (carbonate de calcium, hydroxydes de Fer et d'Aluminium, argile, matière organique) (Numery, 2018). La forme cristallisée se dépose dans le fond des bassins (précipitation). La fraction inorganique particulaire est en échange permanent avec la forme dissoute inorganique accessible aux végétaux, par le mécanisme d'absorption et de désorption (Khan and Ansari, 2005; Numery, 2018). La figure 1.8 résume les formes et interactions des P de phosphore dans le milieu naturel avec des proportions plus ou moins amplifiées en fonction des activités anthropiques qui s'y déroulent.

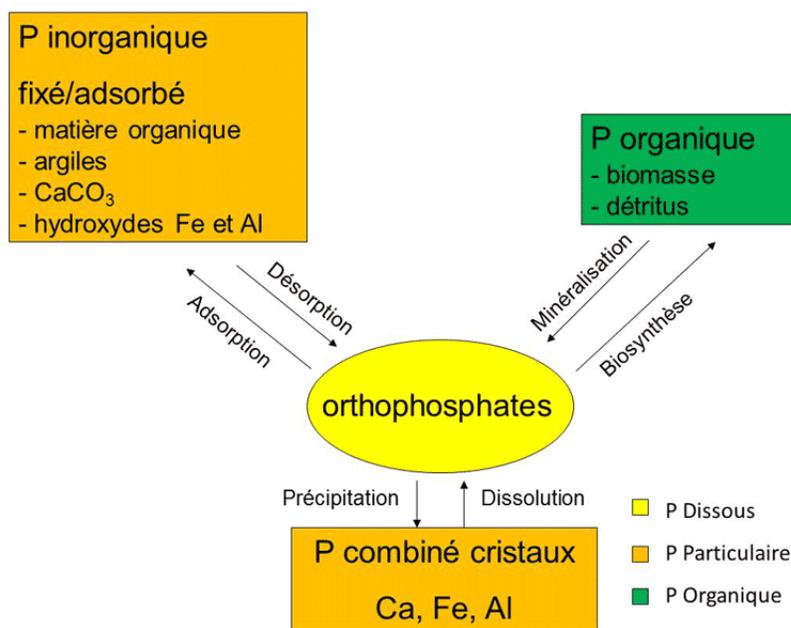


FIGURE 1.8 – Les formes du phosphore et leurs interactions d’après Numery (2018).

Facteurs influençant la solubilisation du phosphore

Les rejets en P provenant des boues piscicoles sont influencés par plusieurs facteurs. Selon Persson (1988), cette quantité de P dépend des paramètres physicochimiques tels que le pH, la température, l’oxygénation, et la turbidité. Elle est fonction aussi de l’activité microbienne dans le médium.

L’effet du potentiel hydrogène (pH) sur le relargage de P a été seulement testé au niveau de l’aliment afin de mettre en évidence la pollution liée à l’aliment non consommé (Kibria et al., 1995). Cet essai montre que le relargage du P dans l’aliment est plus important à un pH plus acide (pH : 4 > 7 > 10). Cependant, cet essai n’a pas été étendu au niveau de la matière fécale. La température et l’oxygénation vont influencer la proportion de P rejetée, via l’activité microbienne (Persson, 1988). Par conséquent, on s’attendrait à avoir des rejets en P plus importants aux températures élevées, corrélés à une plus grande activité microbienne. Paradoxalement, (Kibria et al., 1995) démontrent que l’élevage de perche grise australienne (*Bidyanus bidyanus*) entraîne des rejets en P via les fèces plus importantes à basse température (95% de P rejetés à 20°C) qu’à une température élevée (80% de P rejetés à 25°C). Ce résultat pourrait s’expliquer par une conversion alimentaire plus importante à haute température.

Les processus de transformation du P en ses différentes formes par adsorption, desorption, précipitation et dissolution sont contrôlés par la présence des oxydes de Fe, Al et leurs complexes organiques (Goldberg, 1989; Borggaard et al., 2005; Hinkle et al., 2015; Nguyen et al., 2019), les argiles silicatées et la calcite (Richardson, 1985; Millero et al., 2001; Nguyen et al., 2019). Les potentiels d’oxydoréduction des sédiments, en particulier les bas, peuvent également avoir un impact sur la dissolution en favorisant la libération du P dans l’eau (Gächter and Müller, 2003; Lai and Lam, 2008).

La solubilisation du P l'environnement des bassins va dépendre de la combinaison de l'ensemble des facteurs cités ci-dessous. Par exemple, dans des conditions oxiques et à un pH neutre, le fer est sous forme d'oxyhydroxyde de Fe trivalent qui a une grande capacité à précipiter et / ou adsorber le phosphate. Inversement, dans les conditions anoxygènes, la dissolution réductrice de l'oxyhydroxyde de Fe trivalent en oxyhydroxyde de fer (Fe) divalent se traduit par une dissolution en parallèle de phosphate lié (Gächter and Müller, 2003; Lai and Lam, 2008).

Ces facteurs influençant les rejets en P sont liés à l'environnement du médium dans lequel ces particules, issues de l'aliment, se trouvent. En revanche, des paramètres liés à l'aliment (digestibilité du P) et à l'efficacité alimentaire ont un effet sur la quantité de P rejeté. En effet, deux tiers du P des ingrédients végétaux sont très peu digestibles pour les salmonidés (Ketola and Richmond, 1994), car liés à l'acide phytique. Apportée en grande quantité dans l'aliment, cette source de P est peu digérée et rejetée dans les fèces entraînant une pollution accrue au P. L'indice de consommation (FCR) est aussi un facteur important, car il détermine le niveau de P rejeté. Il existe une forte corrélation positive ($R^2 = 0.97$) entre FCR et les rejets en nutriment (Nut) comme le P (Kibria et al., 1995). Cette relation est donnée par l'équation suivante :

$$FCR = 0.070 \times (Nut) + 0.396 \quad (1.1)$$

Estimation de cette pollution au phosphore

Des essais de quantification ont été réalisés en raison des problèmes liés à la pollution au P. Philips et al. (1990) estiment que 85% du P alimentaire est rejeté dans l'environnement. Cette proportion a été considérablement réduite (40-50%) au cours des 20 dernières années (Beveridge et al., 1997; Satoh et al., 2003; Sugiura et al., 2000a; Bureau et al., 2003; Sarker et al., 2011). Il convient de faire une distinction entre la quantité totale de P rejetée par une ferme et celle émise dans l'environnement susceptible de générer des problèmes de pollution. En effet, une partie du P émanant des fermes est retenue dans les sédiments des bassins de rétention (Hasnaoui et al., 2001). La quantité de P rejetée par une ferme piscicole est estimée en tenant compte de la quantité de P apporté aux poissons, et celle retenue dans la biomasse. Ackefors and Enell (1990) synthétisent les rejets dans l'équation suivante :

$$P(kg) = (A \times Cdp) - (B \times Cfp) \quad (1.2)$$

Avec, A : la quantité d'aliments donnée en base sèche ; B : la masse fraîche de poissons produits par an
Cdp : la teneur en P dans l'aliment sur base sèche Cfp : la teneur en P dans les carcasses de poissons sur base humide

Chez les salmonidés, plusieurs auteurs ont évalué cette pollution au phosphore dans plusieurs fermes commerciales, et ce dans différents endroits. Cette pollution a été estimée entre 9 et 40 kg/tonne de production (tableau 1.2).

TABLE 1.2 – Comparaison de la pollution au phosphore chez quelques espèces de salmonidés en élevage commercial (adapté de Kibria et al. (1995)).

Pays	P rejeté (kg/t)	Espèce	Méthode de culture	Sources
Danemark	11	<i>O. mykiss</i>	Étangs	Warrer-Hansen (1982)
Finland	18,3	<i>O. mykiss</i>	Étangs	Sumari (1982)
Angleterre	15,7	<i>O. mykiss</i>	Étangs	Solbe (1982)
Irlande du Nord	25,6	<i>O. mykiss</i>	Bassins	Foy and Rosell (1991)
Norvège	9,0	<i>S. salar</i>	Étangs	Ibrekk et al. (1991)
Etats Unis	10,0-15,0	<i>O. mykiss</i>	Jars	Ketola and Richmond (1994)
Pologne	23	<i>O. mykiss</i>	Cages	Penczak et al. (1982)
Norvège	13,5	<i>O. mykiss</i>	Cages	Enell and Löf (1983)
Angleterre	27	<i>O. mykiss</i>	Cages	Philips (1985)
Espagne	39,2	<i>O. mykiss</i>	Étangs	Tarazona et al. (1993)
Canada	6,0-7,0	<i>S. trutta</i>	Bassins	Cho and Bureau (1997a)

La quantité de P réellement produite et relarguée (P_{rej}) dans l'environnement par les effluents piscicoles sont toutefois difficilement estimables de façon directe. Foy and Rosell (1991) ont proposé une équation incluant la quantité P donnée (P_{ad}), celle retenue par les poissons, celle contenue dans les fèces (P_f), en plus de celle perdue avec l'aliment non ingéré (P_{noI}). L'équation est la suivante :

$$P_{rej} = P_{ad} - (P_{noI} + P_f) \quad (1.3)$$

Cette équation ne donne qu'une estimation ponctuelle de la quantité de P rejetée dans les effluents. L'estimation de ce paramètre n'est intéressante que s'il permet de prendre en compte la pollution cumulative pour une période donnée. Par conséquent, il est nécessaire d'établir un modèle prenant en compte la cinétique de relargage des P contenus dans les fèces et dans une moindre mesure dans l'aliment non ingéré afin de bien se rendre compte de la pollution potentielle au P. Cette cinétique étant liée aux paramètres reportés précédemment.

1.2.3 Impact des rejets : eutrophisation

Les rejets en P des effluents piscicoles favorisent une eutrophisation accélérée des cours d'eau récepteurs. L'eutrophisation est un processus naturel lent, par lequel les plans d'eau reçoivent une quantité d'éléments nutritifs (notamment du P et de N), entraînant la croissance des algues et des plantes aquatiques. En effet, le P et le N sont des éléments essentiels à la croissance des plantes et des algues. Ils sont considérés comme des nutriments limitants (Elser et al., 2007), c'est-à-dire que la croissance des plantes et des algues est limitée par la disponibilité de ces deux éléments. De ce fait, ils contrôlent la productivité primaire. Autrement dit, ils sont responsables de l'eutrophisation des cours d'eau. Naturellement, le processus d'eutrophisation est très lent. Cependant, un enrichissement rapide en N, et plus particulièrement en P, accélère ce processus (Correll, 1998; Elser et al., 2007). Donc un apport important en P particulière et dissout, provenant des effluents des piscicultures, dans ses différentes

formes (orthophosphates, pyrophosphate, mono — et di —hydrogénophosphate, etc.) entraîne une croissance anormale des algues et des plantes aquatiques (Correll, 1998; Khan and Ansari, 2005).

L'eutrophisation rapide des cours d'eau a des conséquences néfastes parmi lesquelles nous pouvons citer :

- Une prolifération des micro-algues d'eau douce et des plantes aquatiques. Il est bien documenté qu'un gramme d'orthophosphate peut provoquer une prolifération d'algues de 100 g. Parmi ces algues les cyanobactéries produisent des toxines à l'intérieur de leur cellule. À leur mort (naturelle ou par algicide) ces algues bleues libèrent ces toxines pouvant entraîner un risque sanitaire pour la santé humaine et animale ;
- Une dégradation de la qualité de l'eau avec des épisodes d'anoxie du milieu qui devient ainsi défavorable au développement et à la survie des poissons et des autres vertébrés aquatiques. Par équivalence avec le point précité, 100 g d'algues mortes requièrent 150 g d'oxygènes environ pour se décomposer ;
- Une accumulation des sédiments entraînant un envasement, conduisant à une réduction du lit du cours d'eau ;
- Un changement dans la biodiversité animale et végétale, favorisant les espèces les mieux adaptées aux nouvelles conditions ou l'implantation de nouvelles espèces au détriment de certaines qui étaient déjà établies.

À long terme, ces effets conduisent à un vieillissement du cours d'eau et plus tard à une disparition par envasement (Elser et al., 2007). Ainsi, des mesures de limitation des rejets en P dans les effluents piscicoles sont nécessaires afin protéger les cours d'eau récepteurs.

1.3 Limitations des rejets en phosphore

Au Québec, les considérations liées à la pollution piscicole par P ont fait suite à l'instauration d'une réglementation visant à limiter celle-ci. Cette réglementation a eu un impact sur la productivité des fermes. Afin de se conformer à la réglementation tout en gardant un niveau de production acceptable, le secteur piscicole a mis en place des stratégies pour s'affranchir de cette contrainte.

1.3.1 Réglementation du phosphore au Québec

En production animale, deux leviers peuvent être activés afin de lutter contre l'eutrophisation des cours d'eau récepteurs à travers une limitation des rejets en P : l'aliment et les effluents. Ainsi, deux stratégies de réglementation ont été développées dans le monde en se basant sur la teneur maximale du P dans l'aliment (en Europe) et sur la charge maximale du P dans les effluents (en Amérique du Nord) (Hardy and Gatlin, 2002). Au Québec, les stations piscicoles ont été citées spécifiquement comme étant des sources d'émissions importantes de P contribuant à l'eutrophisation des bassins versants.

Ce constat a conduit, en 1999, à la mise en place d'une réglementation fixant les concentrations en P dans les cours d'eau récepteurs (rivières et lacs). Par directives du Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques (MELCC), le seuil en P des effluents piscicoles a été limité entre 0,01 - 0,03 mg/L (Ouellet, 1999). De plus, tout nouvel établissement piscicole doit obligatoirement détenir et respecter un certificat d'autorisation. Dans ce certificat d'autorisation sont inclus les seuils maximaux de rejets pour le P et les MES. Ces seuils sont déterminés pour chaque entreprise en fonction de la capacité du cours d'eau récepteur. Ce resserrement de la réglementation a eu pour effet un ralentissement de l'expansion de l'industrie aquacole (Figure 1.9).

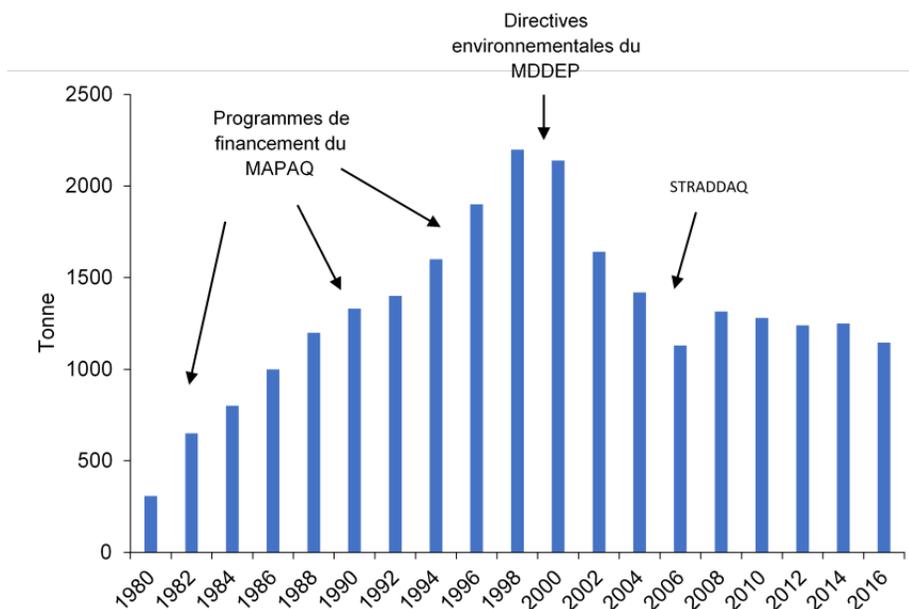


FIGURE 1.9 – Production piscicole annuelle au Québec depuis 1980-2018 (Adapté de Morin (2007) et (MAPAQ, 2018)).

Plusieurs entreprises qui ne répondaient plus aux normes environnementales ont été contraintes de cesser leur activité expliquant cette baisse. Cette baisse s'est maintenue jusqu'en 2006. Entre temps, en 2003, dans le cadre de la Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au Québec (STRADDAQ), une entente tripartite est intervenue, entre l'Association des Aquaculteurs du Québec (AAQ), le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et le MELCC, qui fixe à 4,2 kg de P par tonne de poissons produite la cible à atteindre sur dix ans (2004 - 2014). Cela correspond à une réduction de 40% du niveau moyen en 2004 (7,2 kg de P/tonne) des rejets de P (Koko, 2007). Cette réglementation est toujours en vigueur de même que les contraintes liées à l'attribution des nouveaux permis d'exploitation. Ainsi, il est impératif pour la profession de mettre en place des stratégies afin d'amorcer une nouvelle croissance en réponse à la demande tout en réduisant au maximum les rejets de P dans les fermes de truite arc-en-ciel.

1.3.2 Stratégies de réduction des rejets du phosphore

Afin de se conformer à la réglementation, deux stratégies ont été mises en œuvre : une stratégie nutritionnelle et une stratégie non nutritionnelle.

Stratégies de réduction des rejets du phosphore

L'approche la plus pertinente afin de limiter les rejets dans les fermes de truite arc-en-ciel est de réduire le potentiel polluant à la source (c.-à-d. dans l'aliment). La seconde option est de limiter son rejet dans les fèces. Ces deux options peuvent être combinées afin d'améliorer la disponibilité de P tout en limitant son rejet dans l'environnement. Dans ce sens, Lall (1991) préconisait quatre leviers liés à la nutrition afin de réduire les rejets en P dans les fermes de truite arc-en-ciel sans affecter la productivité. Ces leviers sont : 1) réduire le niveau de P dans les régimes, 2) minimiser l'aliment non ingéré, 3) améliorer l'efficacité alimentaire, 4) inclure dans les régimes des ingrédients riches en P digestible.

Régimes pauvres en phosphore

Comme mentionné précédemment, les rejets de P issus de la production aquacole proviennent uniquement de l'alimentation des poissons. En se basant sur les connaissances des besoins réels du poisson en P, les acteurs ont réduit considérablement les quantités de P dans les régimes afin de limiter les rejets. Ketola and Harland (1993) avaient déjà préconisé cette approche visant à réduire le niveau P dans les régimes. Ils concluent leur étude en suggérant la réduction de la quantité de farine de poissons ajoutée dans l'aliment. Cette approche avait pour but de limiter la quantité de P peu digestible présente dans les régimes. Dans la farine de poissons, ce P indigestible est principalement composé d'hydroxyapatite formée par les tissus osseux des poissons broyés lors de la fabrication (Sugiura et al., 1998). Cette stratégie aura pour effet d'augmenter la proportion des phospholipides, plus digestible dans la farine de poissons apportée aux poissons par l'aliment.

En revanche, la farine de poissons est un ingrédient important dans la formulation des régimes en pisciculture (Miles and Chapman, 2006). Une réduction importante, dans l'état des connaissances de l'époque, aurait pu affecter la qualité des diètes du fait de sa composition en protéines et en énergie, hautement digestibles pour les poissons (Bureau et al., 1999). Ainsi, l'alternative a été de séparer la partie osseuse du reste par des processus simples comme le tamisage. L'inconvénient de cette option est lié aux coûts supplémentaires engendrés par la séparation et les quantités importantes de résidus osseux retirés lors de la formulation. L'option la plus pertinente a été adoptée. Elle consistait à privilégier les farines issues des poissons de fourrages pauvres en tissus osseux. C'est ainsi que la farine de hareng, suivie de celle d'anchois, ont été préférées à celle de menhaden. Ces deux ingrédients ont l'avantage d'être riches en protéines et plus pauvres en P indigestible (Moghaddam et al., 2007). Ainsi, plusieurs aliments pauvres en P ont été développés et mis sur le marché (Sugiura et al., 2006). L'efficacité du type d'aliment sur la réduction des rejets en P a été bien documentée ces dernières années (Bureau et al., 2003; Satoh et al., 2003; Sugiura et al., 2000a; Sarker et al., 2011).

Régimes riches en énergie et hautement digestes

Proposée par Cho and Bureau (1997b), la formulation de ce type de régimes est basée sur le principe simple selon lequel l'apport en excès de chaque nutriment par rapport au besoin de l'animal engendre des rejets. Ainsi, ils proposent un régime hautement digeste et dense en énergie brute (17-19 vs. 21-22 MJ/kg) par ajout supplémentaire de lipides, en se basant sur les travaux antérieurs sur les sources de protéines et d'énergie dans les régimes pour poissons (Cho et al., 1976; Watanabe et al., 1999; Johnston and Southern, 2000). En excluant les ingrédients peu digestibles, pauvres en énergie et en protéines comme les sous-produits riches en fibres et glucides, Cho and Bureau (1997b) mettent en évidence une réduction des rejets solides (150 kg/ tonne de poissons) et en P (3 kg/tonne de poissons) comparativement à un aliment conventionnel chez les salmonidés.

Régimes avec des sources de protéines d'origines végétales

L'avantage des sources de protéines d'origines végétales est leur teneur faible en P (0.75% vs. 2-3.5%) comparée aux protéines d'origine animale (NRC, 1993). De plus, certaines sources végétales ont des profils en acides aminés intéressants (Hughes, 1991; Gomes et al., 1995). Ainsi, le soja a suscité beaucoup d'intérêt pour son utilisation comme source de protéines durant ces dernières décennies (Medale et al., 1998) en remplacement total ou partiel à la farine de poissons. En revanche, la présence de facteurs antinutritionnels limite l'inclusion des sources de protéines d'origines végétales (Bureau et al., 1998; Medale et al., 1998). La présence élevée aussi en phytates dans les ingrédients végétaux ne favorise pas une inclusion en grande quantité. Des techniques de traitement thermique ont été utilisées pour limiter l'effet des facteurs antinutritionnels avec des résultats intéressants (Bureau et al., 1998). Cette technique de traitement thermique (extrusion) est couramment utilisée dans le domaine. De plus, l'avantage de cette technique de traitement thermique est multiple. Elle améliore la flottabilité de l'aliment, augmentant la probabilité de prise alimentaire (limitation du gaspillage). L'extrusion améliore aussi la digestibilité des protéines et des glucides (Hua and Bureau, 2009). L'utilisation de la phytase a été testée afin d'améliorer la disponibilité du P phytique. Compte tenu de la destruction de ces enzymes par les traitements thermiques (110-150°C, 4 MPa), liés au processus d'extrusion des régimes, des techniques d'encapsulation ont été proposées afin de s'affranchir de cette contrainte (Vandenberg, 2001).

Stratégies non nutritionnelles

Plusieurs approches ont été utilisées séparément ou en combinaison afin de réduire les rejets en P. La limitation des rejets solides à partir de l'aliment non ingéré est la première démarche pour réduire les rejets en P. Une fois les rejets solides produits (fèces, aliment non consommé), la filtration mécanique et/ou la décantation est principalement utilisée pour les capter dans les effluents piscicoles. Ces deux démarches visent principalement les rejets solides particuliers. Pour les rejets dissous, l'enlèvement du P survient après les étapes de filtration/décantation pour finaliser le traitement des effluents. Connues depuis les années 1950, les techniques d'enlèvement et d'insolubilisation du P

ont été utilisés en réponse aux phénomènes d'eutrophisation des cours d'eau (Morse et al., 1998). Parmi ces méthodes, nous pouvons citer la précipitation chimique, l'enlèvement biologique (lagunage), la cristallisation (DHV Crystalactor), la précipitation chimique améliorée (HYPO) et l'échange ionique (RIM-NUT). Parmi ces techniques, la précipitation chimique est la plus utilisée en raison de sa simplicité et de son efficacité. Ainsi, nous allons nous focaliser principalement sur cette technique d'enlèvement du P dissout dans cette étude.

Réduction de l'aliment non ingéré

L'approche la plus pertinente adoptée passe par l'amélioration de l'efficacité de la production en limitant l'aliment non ingéré. En plus de permettre aux pisciculteurs de réduire les charges de P polluant, cette approche aura pour but principalement de limiter les pertes liées à l'aliment non distribué et non ingéré (Cho and Bureau, 2001; Vandenberg, 2001). En effet, l'aliment est le principal poste de dépense en production piscicole. Ces pertes en aliment dépendent des pratiques d'alimentation plutôt que de l'aliment. L'excédent d'aliments engendre des pertes économiques importantes. Néanmoins, il doit être distribué aux poissons en quantité suffisante en tenant compte de la croissance, de l'âge, et de la température de l'eau. Ainsi, les fabricants d'aliments et les scientifiques ont établi des chartes permettant d'estimer la quantité d'aliments à fournir à l'espèce de poissons considérée basés, sur les paramètres cités précédemment (Cho and Bureau, 2001). En revanche, cette charte doit être ajustée en fonction de chaque système de production (circuit ouvert ou fermé, bassins en dur ou étangs, etc...), ce qui nécessite un suivi très régulier de la prise alimentaire. Ce suivi permet d'ajuster la quantité donnée en fonction de l'appétit des poissons. Dans cette optique de contrôler l'aliment distribué, Summerfelt et al. (1995) ont mis au point des distributeurs automatiques d'aliments conçus pour s'arrêter au moment où le système détecte des granulés non consommés. Ce système fonctionne à l'aide de sondes hydroacoustiques installées dans les conduits de drainage des effluents du bassin. Ces sondes envoient un signal indiquant la présence de granulés à un système de commande à microprocesseur qui contrôle le distributeur automatique (Juell and Westerberg, 1993). Cette approche visant à contrôler l'aliment donné est amenée à son extrême avec des distributeurs d'aliment à la demande, activés par les poissons (Alanärä, 1996). Cette technologie permet une utilisation plus efficace de l'aliment, et permet une réduction importante du gaspillage alimentaire (Bailey and Alanärä, 2001).

Filtration et décantation des rejets solides

Les rejets en matière organique sont estimés à 2500 kg par tonne de poissons produite (Ackefors and Enell, 1990). Ces rejets solides sont les plus faciles à piéger, par des techniques de filtration mécaniques et/ou par décantation. Deux types de filtration sont utilisés : la filtration sur lit granulaire et le tamisage. La filtration sur lit granulaire se fait par percolation à travers un substrat. Le filtre à sable est couramment utilisé dans les écloséries. Il ne permet pas de filtrer de gros volumes d'eau contrairement au tamisage. La machine, la plus couramment utilisée pour filtrer de gros volumes d'eau est le filtre à tambour rotatif. L'eau coule par gravité dans un tambour rotatif et les particules solides sont retenues dans ce dernier quand l'eau passe à travers les mailles (60 à 250 μm) du tamis

(Timmons et al., 2002). La décantation permet de séparer la MES et l'eau en deux phases distinctes par sédimentation dans un bassin où la vitesse d'écoulement du courant est très faible. Ce processus peut être amélioré en ajoutant des coagulants (sels métalliques; Fe^{3+} et Al^{3+}) permettant d'agglomérer les particules. Une étude comparative réalisée par D'Orbcastel (2008) synthétise l'efficacité de ces différents traitements (tableau 1.3).

TABLE 1.3 – Efficacité des techniques des traitements des effluents salmonicoles d'après Heerfordt et al. (1991) rapporté par D'Orbcastel (2008).

Traitements	Efficacité du traitement (en %)		
	P total	DBO5 ¹	MES
Filtration mécanique	35-55	31-71	21-39
Décantation	20-36	15-37	25-13
Filtration mécanique + décantation	34-54	40-70	

NOTES : ¹DBO5 = demande biochimique en oxygène pendant cinq jours

Une autre approche utilisée pour traiter les MES dans les eaux usées des fermes de truites arc-en-ciel passe par le lagunage (Uusi-Kämpä et al., 2000). Comeau et al. (2001) ont démontré que les plantes aquatiques peuvent éliminer jusqu'à 95% de l'azote et 80% du P rejetés par les étangs de pisciculture. En effet, ces plantes fournissent un habitat aux micro-organismes qui décomposent la matière organique en suspension. L'azote organique est dégradé sous l'action des bactéries et des champignons (Van Bochove, 1993). Le P libéré se fixe dans le substrat meuble. Ce substrat à la longue se sature au bout de quelques années, ne garantissant plus cette action de captation (Drizo et al., 2002).

Précipitation chimique du phosphore

Utilisée pour la première fois en Suisse (1950), la précipitation chimique est une technique simple et couramment utilisée dans plusieurs pays pour réduire la quantité de P émise par les stations d'épuration des eaux usées urbaines. Elle est basée sur l'utilisation principalement des sels de calcium, comme la chaux vive (CaO) ou hydratée ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) comme c'est le cas avec le chaulage des bassins et silos de sédimentation des effluents piscicoles. En revanche, dans le secteur piscicoles, les sels de métaux comme le sulfate d'aluminium (alun, Al_2SO_4) et le sulfate ferreux (FeSO_4) ne sont pas couramment utilisés. Ces composés réagissent avec les ions phosphates entraînant la précipitation du P dissous sous forme de sels de Ca, Fe ou d'Al. Au Québec, les effluents piscicoles sortant des structures d'élevages sont stockés dans des bassins de sédimentation/décantation. Durant ce traitement, l'eau surnageant pauvre en MES est rejetée dans les cours d'eau récepteurs. L'eau trouble au fond du bassin est stockée dans les silos où elle est traitée par chaulage principalement (Gagnon, 2014). Pendant l'étape de décantation, des sels de métaux peuvent être utilisés afin d'améliorer la floculation de la MES et aussi induire la précipitation du P dissous. Deux ou quatre fois par an, ces boues traitées avec de la chaux sont décantées puis collectées pour l'épandage agricole (Gagnon, 2014). Mis en évidence par Drizo et al. (2006), les scories d'aciers ont la capacité de réduire de 75 à 90% le P des eaux usées. En

effet, la chaux contenue dans ces sous-produits absorbe et cristallise les phosphates. C'est ainsi que, Puigagut et al. (2011) ont réussi à obtenir une réduction significative (36%) du P contenu dans des effluents d'un élevage de truite arc-en-ciel en utilisant un filtre à base de scories d'acier. La précipitation chimique avec ces composés à base de calcium a comme inconvénient d'entraîner une élévation du pH. En conséquence, les surnageants de ces boues traitées doivent subir une forte dilution avant d'être rejetés dans l'environnement. Dès lors, l'utilisation des sels de métaux semble être une alternative à ce problème. Du fait de l'action des sels de métaux, plusieurs études ont été réalisées afin de réduire la pollution au P (Morse et al., 1998). Chez le poulet, Shreve et al. (1995), Codling et al. (2000), et Sims and Luka-McCafferty (2002) ont mis en évidence l'efficacité de l'alun et du sulfate de fer sur l'insolubilisation du P dans la litière. Shreve et al. (1995) ont mis en évidence une insolubilisation du P dans la litière de 77% et 48% dans les eaux du premier et du second ruissellement respectivement en appliquant du sulfate de fer (10%). Tandis qu'avec l'alun (10%), Moore et al. (1999) ont rapporté 87% et 63% respectivement pour le premier et le second ruissellement. Ces résultats vont dans le sens de ceux rapportés dans Codling et al. (2000). Cette étude met en évidence des insolubilisations du P de 78% pour l'alun et 51,8% pour le sulfate de fer, sept semaines après une application de 10% de ces 2 éléments actifs dans la litière de poulet. De plus, Sims and Luka-McCafferty (2002) ont montré que le Al_2SO_4 ajouté à de la litière de poulet diminue non seulement la solubilité du phosphore, mais également celles d'autres éléments chimiques comme le cuivre, le zinc et l'arsenic.

Ajout d'agents actifs dans l'aliment

En pisciculture, les fèces décantées dans les structures d'élevages (grilles d'évacuations par exemples) sont récoltées généralement qu'une ou deux fois par semaine en système d'élevage en bassins hors sol, ou après plusieurs mois dans le cas des élevages en étang (Fournier, 2012). De ce fait, l'ajout d'agents insolubilisants du P comme cela se fait chez les poulets est peu efficace. En effet, cet intervalle de temps entre l'émission et la collecte des fèces occasionne des pertes importantes de P (dans l'eau) par fragmentation. Cette fragmentation des fèces peut être limitée par ajout de gomme de guar (Brinker, 2009). En effet, cet auteur a pu obtenir une amélioration significative de la stabilité des fèces produites par des truites arc-en-ciel en élevage en ajoutant 3 g de gomme de guar/kg d'aliment. Cette approche permet ainsi d'améliorer la filtration et la décantation des fèces. De plus, elle limite la dissolution de la fraction organique des effluents piscicoles réduisant ainsi son évacuation avec la colonne d'eau surnageante par l'exutoire.

Il a été démontré que le P dans les fèces est libéré à partir de quelques jours seulement après leur production (Dosdat, 1992). L'insolubilisation du P dans l'eau des bassins de décantation est possible par ajout d'agents insolubilisants comme dans les stations d'épuration. Cependant, cette option génèrerait des coûts importants pour la pisciculture avec l'utilisation des sels de métaux. De ce fait, l'incorporation de produits déphosphatants directement dans l'aliment contourne ce problème de solubilisation, en piégeant le P dans les fèces. Ainsi, cette approche permet de réduire le P soluble à la source tout en utilisant une quantité limitée de sels. L'équation de la réaction de ces deux composés avec les ions

phosphates varie en fonction du pH. En effet, les phosphates (forme oxydée du phosphore) comprenant les sels d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) peuvent s'ioniser en $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} selon le pH dans un milieu humide (Figure 1.10).

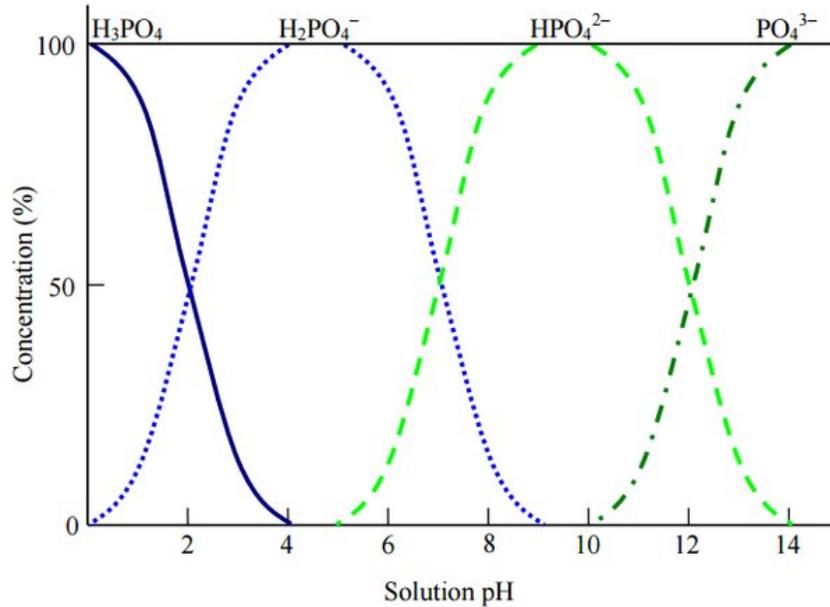
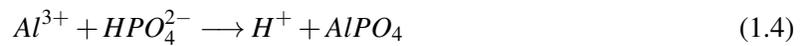


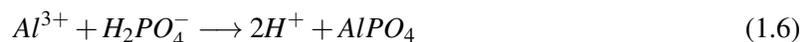
FIGURE 1.10 – Distribution des composés d'orthophosphates en solution en fonction du pH selon Sato (2003).

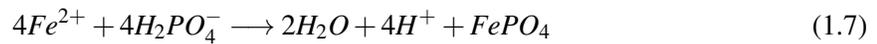
Le P alimentaire est absorbé dans la partie proximale de l'intestin chez la truite arc-en-ciel. Le P non absorbé passe avec le bol alimentaire dans la partie distale de l'intestin. Le pH dans cette partie du tube digestif est estimé entre 7,8 et 9 (Bucking and Wood, 2006). Dans cette plage de pH, le P inorganique est majoritairement sous forme HPO_4^{2-} et dans une certaine mesure du $H_2PO_4^-$. Sous cette forme, il va réagir avec l'alun et sulfate ferreux selon les réactions simplifiées suivantes :



Après le passage dans l'intestin distal, les fèces sont rejetées dans l'eau. Le pH de l'eau à la sortie des bassins se situe dans une gamme de 5 à 7. Dans cette large gamme de pH, les ions $H_2PO_4^-$ sont majoritaires.

Sous cette forme, le P va réagir avec l'alun et le sulfate de fer selon les réactions suivantes :





Ainsi, le P s'agglutine aux particules et précipite au fond de l'eau le rendant indisponible pour les algues (Morse et al., 1998). En revanche, l'ajout direct d'alun et de sulfate de fer entraînerait une insolubilisation du P dans l'aliment le rendant indisponible pour le poisson. Cela aura pour effet d'induire des carences en P. L'approche d'encapsulation des éléments actifs pour leur libération tardive (après l'absorption du P) est l'approche la plus réaliste dans le cas du poisson.

Encapsulation et ajout d'agents actifs dans l'aliment

En alimentation animale, l'encapsulation est une technique utilisée afin de contrôler la libération d'un ingrédient à l'endroit et au moment souhaités (Gouin, 2004). Chez les poissons, plusieurs études ont mis en évidence la possibilité de livrer des acides gras essentiels (Wakil et al., 2010), des vaccins (Lillehaug, 1989; Vandenberg, 2004) et des phytases (Vandenberg, 2001), en les protégeant soit des enzymes digestives, soit du processus thermique lors de la fabrication de l'aliment. Ainsi, en incorporant de l'alun encapsulé (matrice Jefo) dans l'aliment, l'étude préliminaire chez la truite arc-en-ciel a montré une réduction du P soluble dans les fèces des poissons (Fournier, 2008) (Figure 1.11). L'ajout de ces éléments dans l'aliment peut amener à se poser la question des effets de ceux-ci sur les poissons et de leur devenir une fois rejeté avec les fèces.

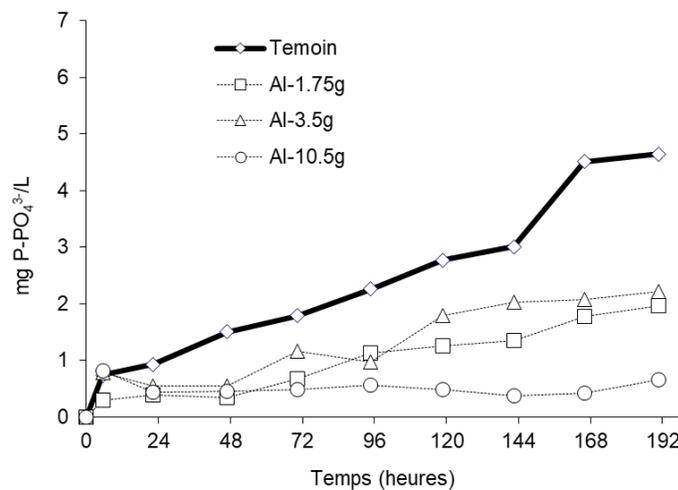


FIGURE 1.11 – Mise en suspension du phosphore total (Pt) en fonction de la teneur en alun (encapsulé) présent dans le régime alimentaire de truite arc-en-ciel d'après Fournier (2008).

L'acceptation d'une technologie visant à piéger le P en utilisant des éléments actifs incorporés directement dans l'aliment dépendra en grande partie de la démonstration de l'innocuité du procédé. L'alun est utilisé comme agent raffermissant de plusieurs aliments (Encyclopedia of Food Additives, Food in Canada, <http://www.foodincanada.com>). D'après Handy and Poxton (1993), sa toxicité orale

est limitée (supérieur à 10 g d'Al/kg d'aliment, c.-à-d. 1%) chez la truite arc-en-ciel. À cette dose, les branchies, le foie, les reins et le mucus, des individus exposés ne montrent aucun signe habituel de toxicité (mortalité, hypersécrétion de mucus au niveau des branchies et pertes d'équilibre) malgré une certaine accumulation de l'Al dans le muscle. Cependant, la truite arc-en-ciel est plus sensible à un niveau élevé de fer dans son régime. Selon l'étude de Desjardins et al. (1987), ce seuil se situerait au-delà de 1,38 g de Fe/kg d'aliment. Cette toxicité est imputée aux effets concurrents de la rancidité du régime alimentaire. Cette rancidité est matérialisée par une augmentation du niveau de malondialdéhyde liée à l'augmentation de la teneur en fer dans l'aliment. Ces effets de l'ajout de fer dans l'aliment sont réduits par la présence d'antioxydants dans l'aliment (éthoxyquine). Des niveaux élevés de fer (1,97 g de Fe/kg) d'aliment entraînent l'accumulation de Fe dans le foie, corrélé avec l'augmentation de l'activité de la réductase hépatique et la saturation de la transferrine sérique, et causeraient une diminution de la prise alimentaire et de la croissance, de la diarrhée ainsi que des lésions au foie pouvant conduire à la mort du poisson (Carriquirborde et al., 2004).

Plusieurs recherches ont également montré que le traitement des litières avec les composés d'Al permet d'accroître la valeur fertilisante des litières épandues de même que la qualité du sol, tout en réduisant l'impact environnemental de l'application de litières animales (Moore and Edwards, 2005, 2007). L'ajout d'alun à la litière inhibe la minéralisation du P organique lors de leur entreposage et favorise la formation de composés phosphorés alcalins rendant le P moins soluble dans le sol (Warren et al., 2008). Compte tenu de cela et des observations de Warren et al. (2006), il semble que l'utilisation des boues des bassins de décantation pour des fèces dont l'alun est utilisé pour piéger le P n'affecte pas la prise en charge de ce dernier par la plante.

1.4 Hypothèses et Objectifs

La problématique de la pollution piscicole au P est toujours présente. Cette problématique est le principal frein au développement du secteur de la salmoniculture au Québec. Ainsi, la validation de techniques efficaces pour limiter cette pollution est plus que salutaire dans ce secteur. Par ailleurs, le développement de ces techniques nécessite une connaissance assez exhaustive des mécanismes qui interviennent dans l'absorption et l'excrétion du P alimentaire ainsi que des minéraux dans le milieu environnant. Chez les poissons, il existe peu de connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation de l'absorption du P dans une situation de carence pour ce nutriment. La mise en évidence et la compréhension de ces mécanismes permettraient une meilleure prise en compte des sources appréciables pour le poisson. Ainsi, la prise en compte de l'ensemble de ces sources de P permettrait une meilleure formulation des régimes et le choix d'un environnement permettant de minimiser les rejets en phosphore. D'un autre côté, l'un des préalables à ce travail de recherche est l'existence d'outils performants pour évaluer le statut minéral du poisson, et par extension la composition proximale. Les techniques classiques disponibles sont longues, fastidieuses, et utilisent beaucoup de produits chimiques. La validation de la précision de certains appareils comme le DXA, pour l'analyse de la composition proximale des poissons permettrait de simplifier la détermination de

la minéralisation chez la truite arc-en-ciel. De plus, elle simplifiera aussi l'estimation de la rétention en P d'un aliment à donner.

Ainsi, les trois objectifs de ce travail sont les suivants :

1. valider une technique de piégeage du P dans les effluents piscicoles par l'incorporation d'éléments piégeants microencapsulés dans l'aliment chez la truite arc-en-ciel ;
2. mettre en évidence les mécanismes d'absorption du P dans le milieu environnant chez la truite carencée en phosphore puis révéler les mécanismes impliqués et les conditions environnementales qui les influencent ;
3. montrer la précision du DXA pour évaluer la composition proximale des truites, le statut minéral et la rétention en P en fonction du régime utilisé.

1.5 Bibliographie

Ackefors, H. and Enell, M. (1990). Nutrient discharges from aquaculture operations in nordic countries into adjacent sea areas. *Ambio*, 19(1) :28–35.

Alanära, A. (1996). The use of self-feeders in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production. *Aquaculture*, 145(1-4) :1–20.

Avila, E. M., Tu, H., Basantes, S., and Ferraris, R. P. (2000). Dietary phosphorus regulates intestinal transport and plasma concentrations of phosphate in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B*, 170(3) :201–209.

Azevedo, P. A., Cho, C. Y., Leeson, S., and Bureau, D. P. (1998). Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Living Resources*, 11(4) :227–238.

Bailey, J. and Alanära, A. (2001). A test of a feed budget model for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). *Aquaculture Research*, 32(6) :465–469.

Barlet, J. P., Davicco, M. J., and Coxam, V. (1995). Physiologie de l'absorption intestinale du phosphore chez l'animal. *Reproduction Nutrition Development*, 35(5) :475–489.

Beveridge, M., Phillips, M., and Macintosh, D. (1997). Aquaculture and the environment : the supply of and demand for environmental goods and services by asian aquaculture and the implications for sustainability. *Aquaculture Research*, 28(10) :797–807.

Boaventura, R., Pedro, A. M., Coimbra, J., and Lencastre, E. (1997). Trout farm effluents : characterization and impact on the receiving streams. *Environmental Pollution*, 95(3) :379–387.

Borggaard, O. K., Raben-Lange, B., Gimsing, A. L., and Strobel, B. W. (2005). Influence of humic substances on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides. *Geoderma*, 127(3-4) :270–279.

- Boström, B., Andersen, J. M., Fleischer, S., and Jansson, M. (1988). Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. In *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*, pages 229–244. Springer, Heidelberg, Germany.
- Brinker, A. (2009). Improving the mechanical characteristics of faecal waste in rainbow trout : the influence of fish size and treatment with a non-starch polysaccharide (guar gum). *Aquaculture Nutrition*, 15(3) :229–240.
- Bucking, C. and Wood, C. M. (2006). Gastrointestinal processing of na, cl, and k during digestion : implications for homeostatic balance in freshwater rainbow trout. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(6) :R1764–R1772.
- Bureau, D. P., Gunther, S. J., and Cho, C. Y. (2003). Chemical composition and preliminary theoretical estimates of waste outputs of rainbow trout reared in commercial cage culture operations in ontario. *North American Journal of Aquaculture*, 65(1) :33–38.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., and Cho, C. Y. (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 161(1-4) :27–43.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., and Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180(3-4) :345–358.
- Carriquiriborde, P. R., Handy, R. D., and Davies, S. J. (2004). Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *Journal of Experimental Biology*, 207(1) :75–86.
- Chan, G. M., Hess, M., Hollis, J., and Book, L. S. (1984). Bone mineral status in childhood accidental fractures. *American Journal of Diseases of Children*, 138(6) :569–570.
- Cheng, Z. J. and Hardy, R. W. (2004). Nutritional value of diets containing distiller’s dried grain with solubles for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Aquaculture*, 15(3-4) :101–113.
- Cho, C. Y. and Bureau, D. P. (1997a). Reduction of waste output from salmonid aquaculture through feeds and feeding. *The Progressive Fish-Culturist*, 59(2) :155–160.
- Cho, C. Y. and Bureau, D. P. (1997b). Reduction of waste output from salmonid aquaculture through feeds and feeding. *The Progressive Fish-Culturist*, 59(2) :155–160.
- Cho, C. Y. and Bureau, D. P. (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*, 32 :349–360.
- Cho, C. Y., Cowey, C. B., and Wilson, R. P. (1991). *Handbook of Nutrient Requirements of Finfish (1991)*, chapter Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pages 181–192. CRC Press Inc 2017., Boca Raton, FL.

- Cho, C. Y., Slinger, S. J., and Bayley, H. S. (1976). Influence of level and type of dietary protein, and of level of feeding on feed utilization by rainbow trout. *The Journal of Nutrition*, 106(11) :1547–1556.
- Codling, E. E., Chaney, R. L., and Mulchi, C. L. (2000). Use of aluminum-and iron-rich residues to immobilize phosphorus in poultry litter and litter-amended soils. *Journal of Environmental Quality*, 29(6) :1924–1931.
- Coffin, C. C., Hayes, F. R., Jodrey, L. H., and Whiteway, S. G. (1949). Exchange of materials in a lake as studied by the addition of radioactive phosphorus. *Canadian Journal of Research*, 27(4) :207–222.
- Comeau, Y., Brisson, J., Réville, J.-P., Forget, C., and Drizo, A. (2001). Phosphorus removal from trout farm effluents by constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11-12) :55–60.
- Compston, J., Bhambhani, M., Laskey, M., Murphy, S., and Khaw, K. (1992). Body composition and bone mass in post-menopausal women. *Clinical Endocrinology*, 37(5) :426–431.
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters : A review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2) :261–266.
- Cross, H. S., Debiec, H., and Peterlik, M. (1990). Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 16(2-3) :115–124.
- Danisi, G. and Straub, R. W. (1984). Phosphate transport across brush border and basolateral membrane vesicles of small intestine. *Progress in Clinical and Biological Research*, 168 :229–234.
- Dean, M. N., Ekstrom, L., Monsonego-Ornan, E., Ballantyne, J., Witten, P. E., Riley, C., Habraken, W., and Omelon, S. (2015). Mineral homeostasis and regulation of mineralization processes in the skeletons of sharks, rays and relatives (*Elasmobranchii*). In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, volume 46, pages 51–67. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Deschamps, M., Poirier Stewart, N., Demanche, A., and Vandenberg, G. W. (2014). Preliminary study for phenotypic description of vertebral abnormalities in triploid trout subjected to prolonged deficiency in phosphorus. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :833–839.
- Deschamps, M.-H., Kacem, A., Ventura, R., Courty, G., Haffray, P., Meunier, F. J., and Sire, J.-Y. (2008). Assessment of “discreet” vertebral abnormalities, bone mineralization and bone compactness in farmed rainbow trout. *Aquaculture*, 279(1-4) :11–17.
- Desjardins, L. M., Hicks, B. D., and Hilton, J. W. (1987). Iron catalyzed oxidation of trout diets and its effect on the growth and physiological response of rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3(4) :173–182.
- D’Orbcastel, R. E. (2008). *Optimisation de deux systèmes de production piscicole : biotransformation des nutriments et gestion des rejets*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

- Dosdat, A. (1992). L'excrétion chez les poissons téléostéens : L'azote. *La Pisciculture Française*, 108 :25–40.
- Dougall, D. S., Woods III, L. C., Douglass, L. W., and Soares, J. H. (1996). Dietary phosphorus requirement of juvenile striped bass *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(1) :82–91.
- Drizo, A., Comeau, Y., Forget, C., and Chapuis, R. P. (2002). Phosphorus saturation potential : a parameter for estimating the longevity of constructed wetland systems. *Environmental Science & Technology*, 36(21) :4642–4648.
- Drizo, A., Forget, C., Chapuis, R. P., and Comeau, Y. (2006). Phosphorus removal by electric arc furnace steel slag and serpentinite. *Water Research*, 40(8) :1547–1554.
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., and Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12) :1135–1142.
- Enell, M. and Löf, J. (1983). Changes in sediment phosphorus, iron and manganese dynamics caused by cage fish farming impact. In *11. Nordic Symposium on Sediments, Finse (Norway), 10-13 Mar 1983*. Norsk Limnologforening.
- Fauré, A. (1983). Salmoniculture et environnement. vol. 1, evaluation de la pollution rejetée par les salmonicultures intensives, etude no. 16. Technical report, CEMAGREF, Bordeaux, France.
- Fenwick, J. C. (1989). *Calcium exchange across fish gills*. In *Vertebrate Endocrinology : Fundamentals and Biomedical Implications*, volume 3. New York : Academic Press. pp. 319–342.
- Fournier, J. (2008). Amélioration de la stabilité des fèces de truites arc-en-ciel par intervention alimentaire. Bsc thesis, Université Laval, Québec, Canada. 70p.
- Fournier, J. (2012). Optimisation de la formulation d'un régime à teneur réduite en phosphore chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans le but de réduire les rejets en phosphore. Msc thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- Foy, R. H. and Rosell, R. (1991). Loadings of nitrogen and phosphorus from a northern ireland fish farm. *Aquaculture*, 96(1) :17–30.
- Fuller, N., Jebb, S., Laskey, M., Coward, W., and Elia, M. (1992). Four-component model for the assessment of body composition in humans : comparison with alternative methods, and evaluation of the density and hydration of fat-free mass. *Clinical Science*, 82(6) :687–693.
- Gächter, R. and Müller, B. (2003). Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface. *Limnology and Oceanography*, 48(2) :929–933.

- Gagnon, D. (2014). Détermination expérimentale des critères de chaulage pour la rétention du phosphore du surnageant de bassin d'épaulement et de stockage de boues piscicoles. Msc thesis, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.
- Goldberg, E. K. and Fung, E. B. (2019). Precision of the hologic dxa in the assessment of visceral adipose tissue. *Journal of Clinical Densitometry*, 00 :1–9.
- Goldberg, S. (1989). Interaction of aluminum and iron oxides and clay minerals and their effect on soil physical properties : a review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 20(11-12) :1181–1207.
- Gomes, E. F., Rema, P., and Kaushik, S. J. (1995). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 130(2-3) :177–186.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15(7-8) :330–347.
- Guillaume, J. (1999). *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Collection Du Labo au Terrain*. Editions INRA, Paris, France.
- Handy, R. D. and Poxton, M. G. (1993). Nitrogen pollution in mariculture : toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3(3) :205–241.
- Hardy, R. W. and Gatlin, D. M. (2002). Nutritional strategies to reduce nutrient losses in intensive aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3(6).
- Hasnaoui, M., Kassila, J., Loudiki, M., Droussi, M., Balvay, G., and Barrouin, G. (2001). Relargage du phosphore à l'interface eau-sédiment dans des étangs de pisciculture de la station deroua (béné mellal, maroc). *Revue des Sciences de l'Eau/Journal of Water Science*, 14(3) :307–322.
- Hayes, F. R. and Jodrey, L. H. (1952). Utilization of phosphorus in trout as studied by injection of radioactive phosphorus. *Physiological Zoology*, 25(2) :134–144.
- Heerfordt, L., De Pauw, N., and Joyce, J. (1991). Test of the efficiency of alternative treatment systems on the effluents from traditional trout farms in denmark. *Special Publication, European Aquaculture Society. 1991*.
- Hettleman, B. D., Sabina, R. L., Drezner, M. K., Holmes, E. W., and Swain, J. L. (1983). Defective adenosine triphosphate synthesis. an explanation for skeletal muscle dysfunction in phosphate-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(2) :582–589.
- Hildmann, B., Schmidt, A., and Murer, H. (1982). Ca⁺⁺-transport across basal-lateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. *The Journal of Membrane Biology*, 65(1-2) :55–62.

- Hille, S. (1982). A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. *Journal of Fish Biology*, 20(5) :535–569.
- Hinkle, M. A., Wang, Z., Giammar, D. E., and Catalano, J. G. (2015). Interaction of Fe (II) with phosphate and sulfate on iron oxide surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 158 :130–146.
- Hua, K. (2005). *Modeling phosphorus utilization in salmonid fish species*. Phd thesis, University of Guelph, Ontario, Canada, Ontario, Canada.
- Hua, K. and Bureau, D. P. (2009). A mathematical model to explain variations in estimates of starch digestibility and predict digestible starch content of salmonid fish feeds. *Aquaculture*, 294(3-4) :282–287.
- Hughes, S. G. (1991). Use of lupin flour as a replacement for full-fat soy in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 93(1) :57–62.
- Ibrekk, H. O., Molvær, J., and Faafeng, B. (1991). Nutrient loading to norwegian coastal waters and its contribution to the pollution of the north sea. *Water Science and Technology*, 24(10) :239–249.
- Iversen, T. (1995). Fish farming in denmark : environmental impact of regulative legislation. *Water Science and Technology*, 31(10) :73–84.
- Johnson, J. and Dawson-Hughes, B. (1991). Precision and stability of dual-energy x-ray absorptiometry measurements. *Calcified tissue international*, 49(3) :174–178.
- Johnston, S. L. and Southern, L. L. (2000). The effect of varying mix uniformity (simulated) of phytase on growth performance, mineral retention, and bone mineralization in chicks. *Poultry Science*, 79(10) :1485–1490.
- Juell, J.-E. and Westerberg, H. (1993). An ultrasonic telemetric system for automatic positioning of individual fish used to track atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a sea cage. *Aquacultural Engineering*, 12(1) :1–18.
- Kaushik, S. (2005). Besoins et apport en phosphore chez les poissons. *Productions Animales-Paris-Institut National de la Recherche Agronomique-INRA*, 18(3) :203. France.
- Ketola, H. G. and Harland, B. F. (1993). Influence of phosphorus in rainbow trout diets on phosphorus discharges in effluent water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122(6) :1120–1126.
- Ketola, H. G. and Richmond, M. E. (1994). Requirement of rainbow trout for dietary phosphorus and its relationship to the amount discharged in hatchery effluents. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123(4) :587–594.
- Khan, F. A. and Ansari, A. A. (2005). Eutrophication : an ecological vision. *The Botanical Review*, 71(4) :449–482.

- Kibria, G., Dayanthi, N., Poul, L., and R, F. (1995). Phosphorus balance in a simulated aquaculture system : case study with the australian native fish silver perch *Bidyanus biryanis*(mitchell) *Teraponidae*. Beijing, China.
- Kohl, B., Wagner, C. A., Huelseweh, B., Busch, A. E., and Werner, A. (1998). The na⁺-phosphate co-transport system (napi-ii) with a cleaved protein backbone : implications on function and membrane insertion. *The Journal of Physiology*, 508(2) :341.
- Koko, K. D. G. (2007). Une stratégie nutritionnelle de réduction du phosphore (p) dans les effluents aquacoles : l'alimentation en phase des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avec alternances d'un régime carencé et d'un régime équilibré en phosphore. Master's thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- Laguerre, H. (2008). Le traitement des effluents en salmoniculture. In *Colloque "Une profession responsable : la maîtrise de l'impact de l'effluent en salmoniculture"*, page 18, Lycée de Brehoulou, Fouesnant, France. Beg-meil, Agrocampus-ouest.
- Lai, D. Y. F. and Lam, K. C. (2008). Phosphorus retention and release by sediments in the eutrophic mai po marshes, hong kong. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12) :349–356.
- Lake, J., Gravel, C., Koko, G. K. D., Robert, C., and Vandenberg, G. W. (2010). Combining suppressive subtractive hybridization and cDNA microarrays to identify dietary phosphorus-responsive genes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 5(1) :24–35.
- Lall, S. (1991). Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. In *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquatic Wastes. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*.
- Lall, S. P. and Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—an overview. *Aquaculture*, 267(1) :3–19.
- Lall, S. P. and Nanton, D. (2002). Nutrition of atlantic cod. *Bulletin-Aquaculture Association of Canada*, (102) :23–26.
- Laskey, M. A. (1996). Dual-energy X-ray absorptiometry and body composition. *Nutrition*, 12(1) :45–51.
- Le Luyer, J., Deschamps, M., Proulx, E., Poirier Stewart, N., Robert, C., and Vandenberg, G. (2014). Responses of different body compartments to acute dietary phosphorus deficiency in juvenile tri-ploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :825–832.

- Lellis, W. A., Barrows, F. T., and Hardy, R. W. (2004). Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 242(1-4) :607–616.
- Lillehaug, A. (1989). Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. *Journal of Fish Diseases*, 12(6) :579–584.
- Lotz, M., Zisman, E., and Bartter, F. C. (1968). Evidence for a phosphorus-depletion syndrome in man. *New England Journal of Medicine*, 278(8) :409–415.
- Létourneau-Montminy, M.-P., Cloutier, L., and Gagnon, P. (2017). Validation de la méthode du bilan alimentaire pour estimer la production de phosphore d'un lieu d'élevage porcin. Tech report, Le Centre de développement du porc du Québec inc. (CDPQ), Bibliothèque et Archives nationales du Québec, Bibliothèque et Archives Canada, Québec.
- MAPAQ (2018). Pêches et aquaculture commerciales au québec : en un coup d'oeil. Tech report, MAPAQ, Québec, Canada. <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/publications/coupOeilpeche.pdf>.
- Martinez, E. G. (2017). *Consequences of a Dietary Phosphorus and Calcium Depletion and Repletion Strategy in Growing-finishing Pigs*. Phd thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- Mazess, R. B., Barden, H. S., Bisek, J. P., and Hanson, J. (1990). Dual-energy x-ray absorptiometry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(6) :1106–1112.
- Medale, F., Boujard, T., Vallée, F., Blanc, D., Mambrini, M., Roem, A., and Kaushik, S. J. (1998). Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources*, 11(4) :239–246.
- Miles, R. D. and Chapman, F. A. (2006). The benefits of fish meal in aquaculture diets. *IFAS Extension, University of Florida*.
- Millero, F., Huang, F., Zhu, X., Liu, X., and Zhang, J.-Z. (2001). Adsorption and desorption of phosphate on calcite and aragonite in seawater. *Aquatic Geochemistry*, 7(1) :33–56.
- Mitchell, A., Scholz, A., and Pursel, V. (2003). Prediction of pork carcass composition based on cross-sectional region analysis of dual energy x-ray absorptiometry (dxa) scans. *Meat Science*, 63(2) :265–271.
- Mitchell, A. D., Scholz, A. M., and Conway, J. M. (1998). Body composition analysis of small pigs by dual-energy X-ray absorptiometry. *Journal of Animal Science*, 76(9) :2392–2398.
- Moghaddam, H. N., Mesgaran, M. D., Najafabadi, H. J., and Najafabadi, R. J. (2007). Determination of chemical composition, mineral contents, and protein quality of iranian kilka fish meal. *International Journal of Poultry Science*, 6(5) :354–361.

- Moore, P. A., Daniel, T. C., and Edwards, D. R. (1999). Reducing phosphorus runoff and improving poultry production with alum. *Poultry Science*, 78(5) :692–698.
- Moore, P. A. and Edwards, D. R. (2005). Long-term effects of poultry litter, alum-treated litter, and ammonium nitrate on aluminum availability in soils. *Journal of Environmental Quality*, 34(6) :2104–2111.
- Moore, P. A. and Edwards, D. R. (2007). Long-term effects of poultry litter, alum-treated litter, and ammonium nitrate on phosphorus availability in soils. *Journal of Environmental Quality*, 36(1) :163–174.
- Morin, R. (2007). Production piscicole au québec. Technical report, Ministère de l’Agriculture des Pêcheries et de l’Alimentation (MAPAQ), Québec, Canada. 9 p.
- Morse, G. K., Brett, S. W., Guy, J. A., and Lester, J. N. (1998). Review : phosphorus removal and recovery technologies. *Science of the Total Environment*, 212(1) :69–81.
- Murer, H., Markovich, D., and Biber, J. (1994). Renal and small intestinal sodium-dependent symporters of phosphate and sulphate. *Journal of Experimental Biology*, 196(1) :167–181.
- Nagy, T. R. and Clair, A.-L. (2000). Precision and accuracy of dual-energy x-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obesity Research*, 8(5) :392–398.
- Nguyen, T. T., Nemery, J., Gratiot, N., Garnier, J., Strady, E., Tran, V. Q., Nguyen, A. T., Nguyen, T. N., Golliet, C., and Aimé, J. (2019). Phosphorus adsorption/desorption processes in the tropical saigon river estuary (southern vietnam) impacted by a megacity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 227 :106321.
- NRC (1993). *Nutrient requirements of fish*. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Numery, J. (2018). Phosphore et eutrophisation. Retrieved : <https://www.encyclopedie-environnement.org/eau/phosphore-et-eutrophisation/>.
- Ouellet, G. (1998). Caractérisation des effluents de stations piscicoles québécoises. Tech. report, Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation, Direction de l’Innovation et des technologies.
- Ouellet, G. (1999). Les rejets des stations piscicoles et leurs impacts environnementaux. Tech. report.
- Penczak, T., Galicka, W., Molinski, M., Kusto, E., and Zalewski, M. (1982). The enrichment of a mesotrophic lake by carbon, phosphorus and nitrogen from the cage aquaculture of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Applied Ecology*, pages 371–393.

- Perilli, E., Briggs, A. M., Kantor, S., Codrington, J., Wark, J. D., Parkinson, I. H., and Fazzalari, N. L. (2012). Failure strength of human vertebrae : prediction using bone mineral density measured by DXA and bone volume by micro-CT. *Bone*, 50(6) :1416–1425.
- Persson, G. (1988). Relationship between feed, productivity and pollution in the farming of large rainbow trout (*Salmo gairdneri*). page 48. agris.fao.org.
- Philips, M. J. (1985). The Environmental Impact of Cage on Scottish Freshwater Lochs. Res. report, University of Stirling Institute of Aquaculture, Stirling, Scotland, United Kingdom.
- Philips, M. J., Beveridge, M. C. M., and Macintosh, D. J. (1990). The impact of aquaculture on the coastal environment. In *in Proceedings of ISCZC, 1988, Beijing : China Ocean Press*.
- Pietrobelli, A., Formica, C., Wang, Z., and Heymsfield, S. B. (1996). Dual-energy X-ray absorptiometry body composition model : review of physical concepts. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 271(6) :941–951.
- Poirier Stewart, N., Deschamps, M., Witten, P. E., Le Luyer, J., Proulx, E., Huysseune, A., Bureau, D. P., and Vandenberg, G. W. (2014). X-ray-based morphometrics : an approach to diagnose vertebral abnormalities in under-mineralized vertebrae of juvenile triploid all-female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with a phosphorus deficient diet. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :796–803.
- Puigagut, J., Angles, H., Chazarenc, F., and Comeau, Y. (2011). Decreasing phosphorus discharge in fish farm ponds by treating the sludge generated with sludge drying beds. *Aquaculture*, 318(1-2) :7–14.
- Richardson, C. J. (1985). Mechanisms controlling phosphorus retention capacity in freshwater wetlands. *Science*, 228(4706) :1424–1427.
- Rønsholdt, B. (1995). Effect of size/age and feed composition on body composition and phosphorus content of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Water Science and Technology*, 31(10) :175–183.
- Rodehutsord, M. (1996). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 200 g to supplements of dibasic sodium phosphate in a semipurified diet. *The Journal of Nutrition*, 126(1) :324–331.
- Rodehutsord, M., Gregus, Z., and Pfeffer, E. (2000). Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture*, 188(3-4) :383–398.
- Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., and Vandenberg, G. W. (2011). Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3) :241–249.

- Sato, S. (2003). *Phosphorus sorption and desorption in a Brazilian Ultisol : effects of pH and organic anions on phosphorus bioavailability*. PhD thesis, University of Florida, USA.
- Satoh, S., Hernández, A., Tokoro, T., Morishita, Y., Kiron, V., and Watanabe, T. (2003). Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fish meal based diet. *Aquaculture*, 224(1-4) :271–282.
- Shreve, B. R., Moore, P. A., Daniel, T. C., Edwards, D. R., and Miller, D. M. (1995). Reduction of phosphorus in runoff from field-applied poultry litter using chemical amendments. *Journal of Environmental Quality*, 24(1) :106–111.
- Sims, J. T. and Luka-McCafferty, N. J. (2002). On-farm evaluation of aluminum sulfate (alum) as a poultry litter amendment : Effects on litter properties. *Journal of Environmental Quality*, 31(6) :2066.
- Skonberg, D. I., Yogev, L., Hardy, R. W., and Dong, F. M. (1997). Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 157(1-2) :11–24.
- Solbe, J. (1982). Fish farm effluents : a united kingdom survey. In *Report of the FIFAC Workshop on Fish-Farm Effluents, Denmark, 1981*, pages 29–55.
- STRADDAQ (2010). Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au québec. Tech. report, Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC), MAPAQ, Québec, Canada.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., and Hardy, R. W. (2000a). A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout based on nonfecal excretions of phosphorus and nitrogen. *The Journal of Nutrition*, 130(4) :865–872.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., and Hardy, R. W. (2000b). Primary responses of rainbow trout to dietary phosphorus concentrations. *Aquaculture Nutrition*, 6(4) :235–245.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., Rathbone, C. K., and Hardy, R. W. (1998). Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture*, 159(3-4) :177–202.
- Sugiura, S. H. and Ferraris, R. P. (2004). Contributions of different napi cotransporter isoforms to dietary regulation of p transport in the pyloric caeca and intestine of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 207(12) :2055–2064.
- Sugiura, S. H., McDaniel, N. K., and Ferraris, R. P. (2003). *In vivo* fractional pi absorption and napi-ii mrna expression in rainbow trout are upregulated by dietary p restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(4) :R770–R781.

- Sugiura, S. H., Roy, P. K., and Ferraris, R. P. (2006). Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺-ATPase expression in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 209(19) :3719–3728.
- Sumari, O. (1982). A report on fish-farm effluents in Finland. Tech. report, FAO, Rome, Italy.
- Summerfelt, S. T., Holland, K. H., Hankins, J. A., and Durant, M. D. (1995). A hydroacoustic waste feed controller for tank systems. *Water Science and Technology*, 31(10) :123–129.
- Tarazona, J. V., Ortiz, J. A., Carballo, M., and Munoz, M. J. (1993). Pollution generated by fish farms. A systems dynamics model. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2(2) :84–89.
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., and Vinci, B. J. (2002). Recirculating Aquaculture Systems, 2nd Editions. *Cayuga Aqua Ventures, LLC., Ithaca, NY*, 760 p.
- Toombs, R. J., Ducher, G., Shepherd, J. A., and De Souza, M. J. (2012). The impact of recent technological advances on the trueness and precision of DXA to assess body composition. *Obesity*, 20(1) :30–39.
- Uusi-Kämpmä, J., Braskerud, B., Jansson, H., Syversen, N., and Uusitalo, R. (2000). Buffer zones and constructed wetlands as filters for agricultural phosphorus. *Journal of Environmental Quality*, 29(1) :151–158.
- Van Bochove, E. (1993). *L'étude du cycle de l'azote dans le processus de compostage : le cas du fumier de bovin*. PhD thesis, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Québec, Canada. 203 p.
- Vandenberg, G. W. (2001). *Encapsulation de phytase microbienne : L'influence sur la disponibilité de nutriments chez la truite arc-en-ciel*. PhD thesis, Université Laval, Québec, Canada. 278 p.
- Vandenberg, G. W. (2004). Oral vaccines for finfish : academic theory or commercial reality? *Animal Health Research Reviews*, 5(2) :301–304.
- Verri, T. and Werner, A. (2019). Type ii na⁺-phosphate cotransporters and phosphate balance in teleost fish. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 471(1) :193–212.
- Vielma, J. and Lall, S. P. (1998). Control of phosphorus homeostasis of atlantic salmon (*Salmo salar*) in fresh water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(1) :83–93.
- Wakil, A., Mackenzie, G., Diego-Taboada, A., Bell, J. G., and Atkin, S. L. (2010). Enhanced bio-availability of eicosapentaenoic acid from fish oil after encapsulation within plant spore exines as microcapsules. *Lipids*, 45(7) :645–649.
- Warren, J. G., Penn, C. J., McGrath, J. M., and Sistani, K. (2008). The impact of alum addition on organic p transformations in poultry litter and litter-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, 37(2) :469–476.

- Warren, J. G., Phillips, S. B., Mullins, G. L., and Zelazny, L. W. (2006). Impact of alum-treated poultry litter applications on fescue production and soil phosphorus fractions. *Soil Science Society of America Journal*, 70(6) :1957–1966.
- Warrer-Hansen, I. (1982). Evaluation of matter discharged from trout farming in denmark. Tech. report, FAO, Rome, Italy, Rome, Italy. pp. 113-121.
- Watanabe, T., Jahan, P., Satoh, S., and Kiron, V. (1999). Total phosphorus loading onto the water environment from common carp fed commercial diets. *Fisheries Science*, 65(5) :712–716.
- Wetzel, R. (1983). *Limnology, 2nd edition*. 2nd edition. CBS College Publishing, New York, USA, 860 p.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Shiraishi, M., Sánchez-Vázquez, F. J., and Tabata, M. (2000). Self-selection of diets with different amino acid profiles by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 187(3-4) :375–386.

Chapitre 2

***In situ* chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

Author Contributions : 1-GVW, MPLM, YC and WN : conceptualize the work ; 2-WN, MPLM, MHD, YC, KC, J-CD and GVW : redact the paper ; 3- WN, MHD : conduct proximate composition analysis ; 4-WN, MPLM, MHD and GVW : analyses and interpret the data ; 5-WN and MHD : lead the experiment in the water tank and P-release trials ; 6-MPLM, KC, J-C D : design the P-trap agents

"La facilité avec laquelle nous renonçons, souvent, à notre culture ne s'explique que par notre ignorance de celle-ci, et non par une attitude progressiste adoptée en connaissance de cause."

Cheikh Anta Diop

1

1. Ce chapitre est présenté sous forme d'article soumis pour publication dans la revue Animal Feed Science and Technology le 3 mai 2019, révisé le 17 juin et re-soumis le 04 août 2019.

***In situ* chelation of phosphorus using microencapsulated aluminum and iron sulfate to bind intestinal phosphorus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

Waly N. NDIAYE^{1,4}, Marie-Hélène DESCHAMPS¹, Yves COMEAU², Kabir CHOWDHURY³, Jean-Daniel BUNOD³, Marie-Pierre LETOURNEAU-MONTMINY¹, Grant W. VANDENBERG¹.

¹Département des sciences animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425 Rue de l'Université Québec, QC, G1V0A6.

²Département des génies civil, géologique et des mines, Polytechnique Montréal, 2500 chemin de Polytechnique, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4.

³Jefo Nutrition Inc, 5020 Avenue Jefo, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7B6.

⁴Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT), Pôles de Recherches de Hann, Route du Front de Terre, BP : 2241, Dakar, Sénégal.

Running title : Intestinal binding of soluble phosphorus

*Corresponding Author : Grant W. Vandenberg,

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,

Département des sciences animales,

Université Laval,

2425 rue de l'Agriculture,

Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

Tel : + 1(418) 656-2131 (ext. 6541).

E-mail address : Grant.Vandenberg@fsaa.ulaval.ca

2.1 Résumé

L'excès de phosphore dans les écosystèmes d'eau douce augmente la production primaire qui, non contrôlée, peut conduire à une eutrophisation des cours d'eaux. En utilisant des agents piégeant (alun et Fe_2SO_4) microencapsulés dans une matrice lipidique hydrogénée, deux aliments ont été administrés aux poissons pendant 5 semaines. Les fèces des poissons nourris avec les régimes contenant de l'alun et du sulfate de fer dégagent respectivement 54 % et 38 % moins de phosphores que celles des poissons nourris avec des aliments conventionnels. Une seconde expérience a révélé une corrélation négative entre le niveau de Al_2SO_4 encapsulé dans le régime alimentaire et le phosphore libéré par les fèces ($y = -1,13x + 10,9$; $R^2 = 0,81$). Les poissons supplémentés en Al_2SO_4 et en Fe_2SO_4 ont gardé leurs performances de croissance et leurs statuts minéraux. L'incorporation d'agents piégeant encapsulés dans les aliments pour poissons offre une approche prometteuse permettant de limiter les rejets en phosphore dans les fermes de truites arc-en-ciel.

2.2 Abstract

Excess phosphorus (P) in freshwater ecosystems increases primary production which, left uncontrolled, may lead to eutrophication, accelerating the aging process of receiving water bodies. To limit phosphorus release resulting from feeding fish, we propose to incorporate microencapsulated P-chelating agents into fish diets. In a first trial, alum (Al_2SO_4) and ferrous sulfate (Fe_2SO_4) were encapsulated by spray-chilling in a hydrogenated lipid matrix. Two practical diets incorporating one of these two chelating elements (6 g/kg) were fed to fish for five weeks, and P release from resulting feces was compared. In a second trial, a similar approach was used to evaluate the impact of increasing supplementation of encapsulated alum (3, 6, 15 g/kg of diet). Feces from the fish fed with the diets incorporating alum and ferrous sulfate release 54% and 38% less phosphorus than feces from fish fed with control diets respectively. The second experiment revealed a negative correlation between the level of encapsulated Al_2SO_4 included in the diet and phosphorus released by the feces ($y = -1.13x + 10.9$; $R^2 = 0.81$). Feces from feed incorporating Al_2SO_4 at 0, 3, 6 and 15 g/kg released 69%, 58%, 43%, and 34% of the fecal P after 14 days respectively. Fish fed encapsulated Al_2SO_4 have similar growth performance and mineral status. Incorporation of encapsulated P-chelating agents into fish feed may offer an opportunity to manage P release from fish feces. Long-term feeding studies are required for validation of dietary Al_2SO_4 and Fe_2SO_4 impacts on potential toxicity and growth/environmental performance following chronic feeding of encapsulated P chelating agents.

Keywords: Fish farming - pollution - phosphorus solubilization – encapsulating - ferrous sulfate - Alum.

2.3 Introduction

Eutrophication is a slow natural process by which water bodies receive nutrients in excess, notably phosphorus (P) and nitrogen (N) leading to the growth of algae and aquatic plants (Elser et al., 2007). In freshwater systems, it is typically the rapid enrichment of P that accelerates this process (Correll, 1998; Elser et al., 2007). In streams and lakes, P is found in dissolved and particulate form. In dissolved form, soluble reactive phosphorus (SRP) is the amount of phosphorus directly available for plants. This phosphorus fraction should consist mainly of the inorganic orthophosphates (o-PO_4 , H_3PO_4 , H_2PO_4^- and HPO_4^{2-}). This SRP was currently determined by spectrophotometric analysis (Maruo et al. 2016). Particulate form (organic or mineral) were in permanent exchange with dissolved forms under the action of microorganisms and the adsorption/desorption mechanisms. SRP from these above process in oligotrophic zone diffuses into the eutrophic zone (Khan and Ansari, 2005).

Therefore, as fish farming activities constitute point sources of organic-P discharge to the environment, measures to limit its release from fish farm effluents were necessary to protect receiving water courses. Two strategies have been implemented to control P emissions : first ; limiting dietary P level by reducing nonavailable P source from raw ingredients to improve the digestible P fraction in diet and second, treating effluents by mechanic filtration followed or not by a P-removal treatment (Koko, 2007). For this last strategy, organic matter filtration and removal treatment of dissolved orthophosphates were generally used.

Effluent P-removal methods include chemical precipitation ; crystallization enhanced chemical precipitation (e.g., using steel slag, Claveau-Mallet et al. (2015)) and ion exchange (Morse et al., 1998). Chemical precipitation by the addition of hydrated lime to the supernatant from fish sludge storage tanks is the most widely used method. This approach was demonstrated to be very efficient (90 % reduction of SRP) but leads to an increase in effluent pH (≥ 10), which needs to be diluted into the main effluent stream. Effluent treatment techniques often take place several (≤ 6) months after feces egestion, resulting in potentially significant P (80 % of total P in feces) release into the water column, making subsequent o-PO_4 to remove higher (Dosdat, 1992).

In this study, we hypothesized that incorporating chelating agents directly into the fish diet would reduce o-PO_4 solubilization by feces in settled ponds. The compounds used to chelate the unabsorbed P were aluminum sulfate (alum) and ferrous sulfate. These metal salts have been used since the 1950s in municipal wastewater treatment. Studies in poultry have demonstrated the efficiency of alum and ferrous sulfate to render P insoluble in broiler litter (Sims and Luka-McCafferty, 2002; Shreve et al., 1995; Codling et al., 2000; Moore et al., 1999).

Phosphorus is an essential element for fish and is uniquely obtained from ingested food. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), available phosphorus is rapidly absorbed in the pyloric region of the proximal intestine (Vandenberg, 2001) with fractions of unabsorbed and unavailable P transiting to the distal intestine. To ensure adequate P absorption in the proximal intestine, chelating compounds were encapsulated in a hydrogenated lipid matrix. This encapsulation process limits the action of chelating

agents in the stomach and proximal intestinal regions. Then the action of pancreatic lipases liberates chelating compounds in the distal intestine, allowing complexation before egestion into the tank water. This study aimed to determine the efficiency of the addition of microencapsulated chelating agents in the fish diet to reduce P release from settled and undisturbed feces at 7 and 22 °C.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Experimental diets

Four diets were formulated based on the National Research Council recommendations for rainbow trout (NRC, 2011). The four diets included the following : diet Ctrl-, the negative control diet without a chelating compound ; diet Ctrl+, the positive control diet containing the lipid encapsulation matrix without a chelating compound ; diet Al-containing the chelating compound Al_2SO_4 in the lipid matrix ; diet Fe containing the chelating compound Fe_2SO_4 in the lipid matrix. The two chelating compounds were encapsulated whereby a molten lipid matrix (using a proprietary processing technique) by spray chilling, thus entrapping the product of interest . The chelating compounds used to chelate the unabsorbed P in feces produced fine, free-flowing microbeads (between 500-1000 μm) which were added in the feed mixture at a level of 20 g/kg before pelleting for the first feeding study (Table 2.1). The chelating compounds, Al_2SO_4 and Fe_2SO_4 were encapsulated in a commercial-scale facility (Jefo Inc., St Hyacinthe, Québec, Canada). An earlier investigation was carried out to validate the best matrix to be used in order to have a late release of chelating compound in the trout gastrointestinal (GI) tract (see annexe A). Jefo lipid matrix was the best one.

For the second feeding study, encapsulated Al_2SO_4 was supplemented at four (0, 10, 20 and 50 g/kg of Al_2SO_4 -chelating compound which gives 0, 3, 6 and 15 g/kg of Al_2SO_4 in diet, respectively) dietary concentrations (Table 2.2). Nutrient digestibility of the two groups of 4 diets formulated in two experiments is indicated in Table 2.3.

An indigestible marker (Sipernat 50TM as a source of insoluble acid ash (AIA)) was added to each diet at 10 g/kg in order to evaluate the apparent digestibility coefficient (ADC). Guar gum (3 g/kg) was added to the diets to improve feces stability. The ingredients were thoroughly mixed, and steam pelleted using a California Pellet Mill (detail in the footnote of Table 1). Fish oil was added to the feed in two stages ; 25 g/kg was first added to the mixture and the remaining quantity (90 g/kg) by coating after the pellets were produced and dried in a forced-air oven (45°C, 10 h). The pellets were sieved and stored at -20°C until feeding.

TABLE 2.1 – Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment¹

Ingredients (g/kg)	Diets (chelating inclusion) ^b			
	Ctrl	Ctrl+	Al	Fe
Herring meal ¹	300	300	300	300
Soybean meal ²	130	130	130	130
Corn gluten ²	167	147	147	147
Wheat grain ³	165	165	165	165
Dried whey ²	100	100	100	100
Fish oil ¹	115	115	115	115
Vitamin and mineral premix ^{4,e}	10	10	10	10
Sipernat 50 ^{5,c}	10	10	10	10
Guar guar ⁶	3	3	3	3
P-chelating microbead ^{s,d}	0	20	20	20
<i>Lipid matrix</i>	<i>0</i>	<i>20</i>	<i>14</i>	<i>13.4</i>
<i>Chelating compound</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>6</i>	<i>6.6</i>
Chemical composition (g/kg, dry basis)				
Dry matter	940	934.2	937.6	941.9
Crude proteins	422	427.8	419.2	403.4
Crude lipids	146.6	176.7	174.8	160.9
Ash	105.7	107.2	107.5	111.5
Energy (E. MJ/kg)	22.4	22.8	22.6	22.3
Total phosphorus (P)	11.4	12.9	12.7	12.7
Aluminium (Al, mg/kg)	57.1	56.8	960.2	50.5
Iron (Fe, mg/kg)	82.8	87.8	92.0	2490

NOTES :^aValues were means of triplicate chemical analyses (n=3) per diet; ^bdiets designations : Ctrl = control diet without P-chelating microbeads; Ctrl+ = positive control diet with 20g/kg of microbeads containing no chelating agent; Al = diet with microbeads containing Al₂SO₄; Fe = diet with microbeads containing Fe₂SO₄; ^cSipernat 50TM : a source of insoluble acid ash comprised of 98.50% SiO₂ with an average particle size of 50µm; dg/kg diet (italics) of lipid or chelating compound in microbeads.

^eSupplied the following : (to provide mg/kg except when noted) : vitamin mix = thiamin HCl, 2; riboflavin, 3; pyridoxine HCl, 0.6; niacin, 1; calcium Pantothenate, 4; folic Acid, 0.2; biotin (1mg/g), 4, vitamin B12 (0.1%), 10; vitamin A Palmitate, (250,000 IU/g) 2; vitamin D3 (400,000 IU/g), 1.5; vitamin E Acetate (500 IU/g), 29.8; menadione Sodium bisulfite (62.3% Menadione), 3.2; t-BHQ, 0.03, Dextrose, 938.66; mineral mix = potassium iodide (76%I), 2.63; ferrous sulfate 7H₂O (20%Fe), 50; manganese sulfate H₂O (32.5% Mn), 24.6; zinc sulfate H₂O (36.44%Zn), 37.48; cupric sulfate 5H₂O(25%Cu), 8; sodium selenite (45.6%Se), 0.35; cobalt chloride 6H₂O (24.77%Co), 0.085; dextrose, 876.855. Each mix was added at 5g/kg of diet.

North American supplier : ¹Comeau's sea food LTD; ²Meunerie Gérard Soucy Inc. 926 route Laurier. Sainte-Croix. QC. G0S 2H0; ³Colabor. 820 rue St-Alphonse Desrochers. Lévis. Qc. G7A 5H9; ⁴Dyets. Inc. 2508 Easton Avenue. Bethlehem. PA 18017. Bethlehem. PA 18017; ⁵Evonik Corporation. 2 turner place Piscataway. NJ 08855-0365. USA; ⁶Laboratoire Mat Inc. Quebec. QC

TABLE 2.2 – Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment

Ingredients (g/kg)	Diets ^b (alum inclusion) ¹			
	0	3	6	15
Herring meal ¹	300	300	300	300
Soybean meal ²	130	130	130	130
Corn gluten ²	167	167	157	127
Wheat grain ³	155	155	155	155
Dried whey ²	100	100	100	100
Fish oil ¹	115	115	115	115
Vitamin and mineral premix ^{4,e}	10	10	10	10
Sipernat 50 ^c	10	10	10	10
Guar gum	3	3	3	3
P-chelating microbeads ^d	10	10	20	50
<i>Lipid matrix</i>	<i>10</i>	<i>7</i>	<i>14</i>	<i>35</i>
<i>Chelating compound (Alum)</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>15</i>
Proximate composition (g/kg, dry basis)				
Dry matter	964.3	961.5	974.6	971.0
Crude proteins	416.8	409.9	406.9	380.7
Crude lipids	160.3	160.3	166.1	186.2
Ash	109.0	108.9	109.2	111.3
Energy (E, MJ/kg)	21.8	21.6	21.7	22.0
Total phosphorus (P)	13.6	13.7	13.2	13.0

NOTES :¹Diet designations : Ctrl+ or 0 : positive control diet with 10g/kg of microbeads containing no chelating agent, 3 = diet with 3 g/kg of alum inclusion, 6 = diet with 6 g/kg of alum inclusion, 15 = diet with 15 g/kg of alum inclusion. Microbeads with Al₂SO₄ as chelating compound was used for inclusion. For ingredient supplier and information see table 2.1

TABLE 2.3 – Nutrient digestibility¹ for diets used in the two experiments (g/kg or mg/kg dry basis).

Experiment	Experiment 1 (chelating inclusion)				Experiment 2 (alum inclusion)			
	Diets	Ctrl	Ctrl+	Al	Fe	0	3	6
Digestible dry matter	646 ± 23	644 ± 48	661 ± 14	643 ± 13	656 ± 07	672 ± 15	648 ± 31	645 ± 25
Digestible Protein	355 ± 5.5	356 ± 3.3	362 ± 7.5	352 ± 8.0	NA	NA	NA	NA
Digestible lipids	97 ± 6.3	121 ± 3.0	120 ± 14	107 ± 33	NA	NA	NA	NA
Digestible ash	43 ± 1.4	48 ± 1.1	482 ± 1.8	4.7 ± 1.4	47 ± 2.0	57 ± 2.1	51 ± 2.4	48 ± 3.0
Digestible E	162 ± 4	166 ± 3	168 ± 3	162 ± 3	NA	NA	NA	NA
Digestible P	0.5 ± 0.01	0.8 ± 0.06	0.7 ± 0.05	0.6 ± 0.06	0.7 ± 0.23	0.5 ± 0.12	0.6 ± 0.05	0.5 ± 0.01
Digestible Al (mg/kg)	8.5 ± 0.8	8.2 ± 0.2	9.1 ± 0.2	7.3 ± 0.4	NA	NA	NA	NA
Digestible Fe (mg/kg)	8.2 ± 0.5	8.2 ± 0.2	8.3 ± 0.4	7.9 ± 0.2	NA	NA	NA	NA

NOTES :¹The digestibility study was conducted in triplicate tanks. Values are indicated as mean (n = 3 tanks) ± Standard Deviation (sd). NA : in Experiment 2, the digestibility of dry matter, ash, and phosphorus content in the diet were only evaluated.

2.4.2 Fish rearing, feeding and experimental design

The feeding trials were conducted for 5 weeks in a freshwater recirculating aquaculture system (98% recirculation) at the '*Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques*' (LARSA - Université Laval). Suspended solids were removed using a sand filter, and ammonia was converted to nitrate using a trickling biofilter. Ammonia and nitrite concentrations were monitored twice weekly to assess biofilter performance. Fish were held at 12 °C. Dissolved oxygen varied between 9.4 -10.7 mg/L and photoperiod were adjusted to 16 h light - 8 h dark. For each experiment, all-female (n=264) triploid rainbow trout (Exp.1 : 182 ± 7 g, Exp.2 : 110 ± 5 g, mean \pm SEM) were transferred from a local fish farm ('*Pisciculture des Monts de Bellechasse Inc.*', Saint-Damien-de-Buckland, Canada) to the LARSA facilities. Fish were randomly distributed among 12 green semi-square tanks (150 L volume ; density of 24 kg/m³ at the start of the study) in a complete randomized design with four diets and three replicate tanks per diet.

Fish were acclimated during the first week and fed with the control reference diet. Fish were fed to satiation by hand on two consecutive days per week followed by restricted feeding by belt feeders on the subsequent five days of the week. Restricted feeding was defined as 80% of the average daily feed intake when fed to satiation. During satiation feeding, fish were fed by hand at 08.00 AM and 3.00 PM until no further feeding activity was observed. The experiments complied with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Olfert et al., 1993) and approved by the '*Comité de Protection des Animaux de l' Université Laval*' (CPAUL 2010).

2.4.3 Growth measurements

Fish were weighed just before each experiment, after two weeks and at the end of the experiment (5 weeks). Growth performance was evaluated based on fish tank biomass (tank biomass/number of fish = Initial Body Weight or Final Body Weight; concise respectively IBW or FBW) gain and feed intake (FI) using the total amount of feed given to each tank in this period divided by the number of fish. Average feed conversion ratio (FCR) standard growth rate (SGR) thermal-unit growth coefficient (TGC) and hepatosomatic index (HSI) were calculated as follows :

- Weight gain = $[(\text{FBW} - \text{IBW}) / \text{IBW}] \times 100\%$
- FCR = $[\text{Feed intake} / (\text{FBW} - \text{IBW})]$
- SGR = $100 \times (\ln \text{FBW} - \ln \text{IBW}) / \text{days}$
- TGC = $100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3}) / \text{sum of daily water temperature}$
- HSI = $(\text{liver weight}/\text{body weight}) \times 100$

2.4.4 Fecal collection

Feces were collected using a modified Guelph system based on Cho et al. (1982) placed under the fish tanks. Following the last feeding (after 3 :00 PM feeding) of the previous day, the tanks and

collection systems were thoroughly cleaned and purged immediately of any uneaten feed and feces. Feces were collected overnight; before the morning feeding (8 :00 AM), feces were decanted, excess water removed and stored at -20°C. Feces were freeze-dried for 7 days before analysis to determine ADC. Feces used for the phosphorus release experiment were collected the same day for all tanks. For each treatment, the feces collected in the three tanks were pooled and used immediately for the experiment.

2.4.5 Scale and carcass collection

At the beginning and end of the experiments, six fish per tank (3 for scale and 3 for carcass collection) were sacrificed using MS-222 (150 mg/L, Syndel International Inc., Vancouver, BC, Canada) after a period of 24-h fasting, measured (fork length) and weighed. Scales were scraped from tail to head and stored in 70 % ethanol solution until the ash and P determination. For carcass processing, fish were stored at -20°C pending the determination of mineral content. Ash content in scales and carcass were determined using the method described in Le Luyer et al. (2014). Scales were dehydrated in a graded series of ethanol (70, 90, 100 %; 24 h /bath), delipidated in acetone (two baths of 24 h), then in trichloroethylene (two baths of 24 h). Carcasses were autoclaved, homogenized then freeze-dried. Scales and carcasses were used to estimate fish bone mineral and ash whole-body content. These parameters indicate the bone mineral status of fish (P-sufficient or P-deficient).

2.4.6 Analytical methods

Scales, carcasses, feces, and diet were analyzed for dry matter (drying in a vacuum oven for 18 h at 105 °CC) and ashed (incinerating in a muffle furnace for 18 h at 550 °C) to the nearest 0.1 mg according to AOAC 927.05 and 930.30 methods guidelines (AOAC 1990). Phosphorus content was determined by ion chromatography (*ICS-3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA*) following ash digestion in nitric acid (18 ml of HCl 50% + 3 ml nitric acid) solution and filtering (Whatman paper no1, rinsed three times in 100 mL volumetric flask) (Naumann and Bassler, 1976). The mass of acid-insoluble ash represented mainly the mass of Sipernat 50TM (Atkinson et al., 1984).

For diet and feces, crude protein (% N×6.25) was quantified using the semi-automatic Kjeldahl method (*Foss Electric, Denmark; AOAC method 7, B01-7, B04*), lipid content using ethyl ether extraction without acid hydrolysis (*Soxtec System HT12, Foss Tecator AB; Hoganas, Sweden*), and crude energy using content was an adiabatic bomb calorimeter (*Parr Instrument Co., Moline, IL, USA*). The ADC for dry matter, protein, energy, lipids, and phosphorus were calculated using the following formula (Gui et al., 2010) :

$$ADC = 1 - (N_{feces}/S_{feces}) \times (S_{diet}/N_{diet}) \quad (2.1)$$

where S and N were the Sipernat 50 and nutrient content (dry matter, protein, lipids, energy, ash, and P) in the diet or feces, respectively.

2.4.7 Fecal phosphorus release

Feces use for P release trials was collected on two consecutive days, 3 weeks following feeding initiation. These feces samples were pooled according to the treatment were transferred to 50 mL conic tube (*Falcon, Becton Dickinson*) and centrifuged (5 min at 1300 x g) in order to dewater feces to a similar degree. The supernatant was removed, and the sedimented pellet was used for the P release experiments. The fecal samples used for the digestibility study were collected during the entire experiment except for these two days. These fecal samples were frozen until (-20°C) used for analytical analysis as previously described.

Approximately 5 g of feces from each diet were placed in the bottom of a beaker (500 mL) containing 300 ml of deionized water (Hasnaoui et al., 2001). Each treatment (feces from one of the four diets) was repeated three times. Two conditions were tested : low temperature (7°C) and room temperature (22°C) in the absence of light. On days 1, 2, 4 and 7, duplicate water samples (5 mL) were aspirated from each beaker using a 15 mL syringe, fitted with 0.45 μm EMD Millipore Millex filter, to measure the released inorganic P, which was determined using the molybdate vanadate American Public Health Association method (APHA, 1992).

2.4.8 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM) or standard deviations (SD) with tank or beaker as the experimental unit. Normality and homogeneity of variance were tested using Shapiro Wilk, and Bartlett tests and data were log-transform when needed. When data respected the assumptions of normality ANOVA, or ANCOVA was performed. For growth performance indicators and P-status despite the IBW was significantly ($P = 0.033$ and 0.007) different between diet, ANCOVA was used to compare the effect of diet on growth indicator (FBW, FI, WG, TGC, HIS, ash, and P content). When analysis showed a significant difference, the Tukey test was performed to compare the treatments. For the o-PO₄ release, two way (feces and time) analysis of variance was performed. When significant interaction between these factors was found, the Tukey test was used to compare treatment each time (Zar, 1999). All statistical analyses were performed using R version 3.2.3. The level of significance used in all tests was $P < 0.05$. Regression analysis was performed using the regression function of the software Microsoft Excel (*Microsoft, Seattle, WA, USA*).

2.5 Results

Effect of feeding encapsulated alum and iron sulfate

At day 0, individual average body mass for fish feed with Fe was lower than feed with Ctrl+. However, the initial individual body mass of these two groups does not individually differ with the other two groups (Ctrl and Al). These differences were found to impact feed intake, mass gain, and TGC during the first two weeks. These differences disappeared after five weeks (Table 2.4 and Table 2.5).

TABLE 2.4 – Growth performance indicators of fish during experiment 1.

Growth performance	Unit	Week	Diets				Statistics	
			Ctrl	Ctrl+	Al	Fe	Pooled SEM	P-value
IBW ¹		0	179 ^{ab}	190 ^b	185 ^{ab}	175 ^a	3.4	0.033*
FBW ¹	g	5	269 ^{AB}	286 ^B	260 ^{AB}	256 ^A	6.2	0.005*
Feed intake	g	2	42.8 ^b	44.7 ^b	38.7 ^{ab1}	35.7 ^a	1.72	0.000***
		5	79.6 ^C	73.8 ^B	74.2 ^B	68.1 ^A	1.53	0.000***
Weight gain	g	2	37.9 ^{ab}	41.5 ^c	33.9 ^{ab}	26.8 ^a	1.44	0.003**
		5	51.9	54.4	40.7	54.1	1.45	0.112 (ns)
FCR ¹	g/g	2	1.15	1.07	1.14	1.33	0.05	0.065 (ns)
		5	1.4	1.46	1.65	1.19	0.15	0.326 (ns)
TGC ¹		2	0.22 ^b	0.23 ^b	0.19 ^{ab}	0.16 ^a	0.024	0.006**
		5	0.19	0.18	0.15	0.22	0.021	0.177 (ns)
HSI ^{1,2}	%	0			1.03 ^a			
		5	1.6 ^c	1.4 ^b	1.4 ^b	1.4 ^b	0.201	0.001**

NOTES :¹Initial body weight (IBW), Final body weight (FBW), feed conversion ratio (FCR), thermal-unit growth coefficient (TGC) and hepatosomatic index (HSI). Values (IBW, FBW, feed intake, weight gain, FCR, TGC, and HSI) were means of 3 tanks by treatment (experimental unit). For parameter pooled Standard Error of Means (SEM) were shown. Means were analyzed with one-way ANCOVA (effect of diet), as covariable IBW ($P=0.033$). Means within each parameter were analyzed at 0 or 2 weeks (tiny letters) and the end of the trial (capital letters). Values not sharing identical letters were significantly different ($P<0.05$). ²For HSI at the beginning of the trial (0w), one sample was taken. This mean is compared to 4 means from 4 treatments (diets, Ctrl = control, Ctrl+ = control positive, Al = diet with alum inclusion, Fe = diet with Iron inclusion) at the end of the trial. Ns= not significant. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

TABLE 2.5 – Growth performance indicators of fish during experiment 2.

Growth performance	Unit	Week	Diets				Statistics	
			0	3	6	15	Pooled SEM	P-value
IBW		0	113 ^b	109 ^a	114 ^b	112 ^b	2.2	0.007*
FBW	g	5	171	168	173	167	4.5	0.064 (ns)
Feed intake	g	2	28.6	27.7	30.0	22.7	1.54	0.056 (ns)
		5	63.4	56.3	63.6	57.9	1.41	0.095
Weight gain	g	2	17.2	20.6	18.3	18.6	1.22	0.562 (ns)
		5	40.2 ^B	37.6 ^{AB}	40.5 ^B	36.4 ^A	1.15	0.047*
FCR	g/g	2	1.67	1.36	1.67	1.23	0.153	0.131 (ns)
		5	1.57	1.49	1.57	1.59	0.054	0.539
TGC		2	0.14	0.17	0.15	0.15	0.014	0.340 (ns)
		5	0.19	0.18	0.19	0.17	0.010	0.075 (ns)

The ash content in fish scales ($30.6 \pm 2.2\%$) was similar at the beginning and end of the experiment. However, the ash content of carcasses was significantly higher at the beginning ($9.4 \pm 1.0\%$) than the end ($7.8 \pm 0.4\%$) of the experiment. At the end of the experiment, carcass ash was similar regardless of the dietary treatment. These same variations were found in P carcass (Table 2.6).

TABLE 2.6 – Ash and P level (% , dry basis) in carcasses and scales at the beginning (0 wk) and the end (5 wk) of the Experiment 1.

P statut indicator ¹	0 wk		5 wk		Statistics		
	Ctrl	Ctrl+	Al	Fe	Poled SEM	P-value	
Scale ash	31.4	31.3	28.3	31.5	30.9	2.35	0.303 (ns)
Carcass ash	9.4 ^b	8.3 ^a	7.7 ^a	7.8 ^a	7.5 ^a	0.70	0.012*
Scale P	2.9 ^a	3.9 ^{ab}	3.2 ^{ab}	3.0 ^a	4.4 ^b	0.08	0.026*
Carcass P	1.51 ^b	1.36 ^a	1.26 ^a	1.29 ^a	1.22 ^a	0.81	0.000***

NOTES :¹Values were indicated as means. The different letters indicate significantly different means ($P<0.05$). Ash (or P) (%) = ash (or P) content/dry sample weight (g). For parameter pooled Standard Error of Means (SEM) were shown. At the beginning of the trial (0 wk), one sample was taken. This mean is compared to 4 means from 4 treatments (diets, Ctrl = control, Ctrl+ = control positive, Al = Diet with alum inclusion, Fe = diet with Iron inclusion) at the end. One-way ANCOVA follows by Tuckey pairwise comparison : ns= not significant. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

The amount of P content in fecal matter use for P-release experiment was 18 ± 0.75 g/kg (mean \pm sd; dry basis). These values do not differ significantly according to the feces derived from considered diets. Thus, P-release was related to dry matter (DM). The release of o-PO₄ from the feces of fish fed different diets was higher at room temperature (Figure 2.1). Indeed, the minimum and maximum values, after seven days, were 2.7 ± 0.3 and 4.0 ± 0.2 mg/g DM of feces at seven °C and 3.4 ± 0.4 and 6.5 ± 0.2 mg g⁻¹ at 22°C, respectively. It seems that the effect of chelating compounds was more pronounced at room temperature. Indeed, after seven days, the o-PO₄ released in feces from Ctrl and Ctrl+ was significantly higher than released by feces from diets with chelating compounds (Fe and Al). The feces from Al diet released the lowest quantity of o-PO₄.

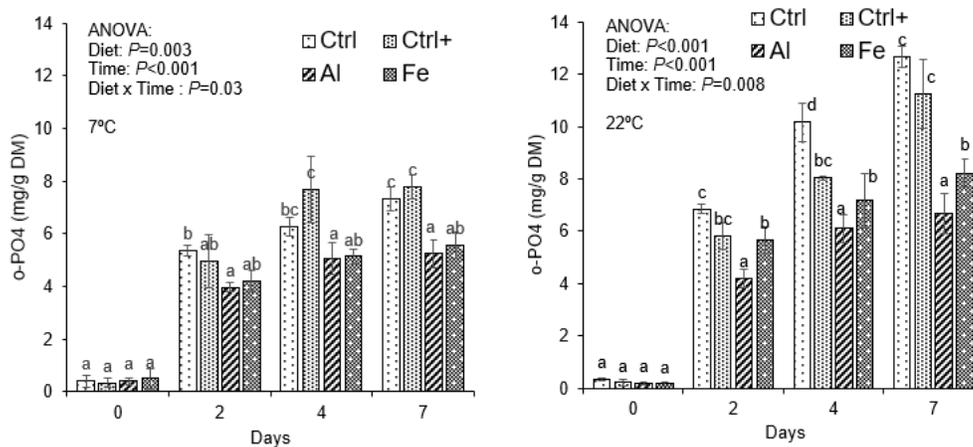


FIGURE 2.1 – o-PO₄ release over 7-day incubation by feces (expressed as DM from fish fed experimental diets at (7°C, left panel) and at (22°C, right panel).The value represents the o-PO₄ release (mean \pm sd, n = 3). Two ways ANOVA follows by Bonferroni pairwise comparison was used to identify the differences. The different letters indicate significantly different means ($P<0.05$).

Experiment 2 : increasing Al₂SO₄ concentration

Scales mineralization only significantly differed between fish at the beginning, and the fish fed after five weeks with diet having the highest inclusion of Alum (15 g/kg). At the end of the five-week feeding study, the level of alum incorporation did not affect scale mineralization of fish fed increasing Al (Figure 2.2).

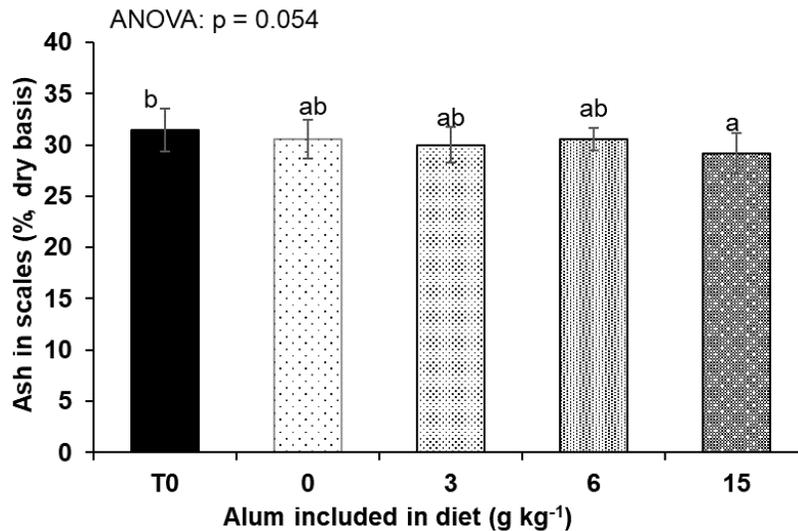


FIGURE 2.2 – Scales mineralization of graded levels of alum included : 0, 3, 6, 15 g/kg). The values represent mean \pm sd (n=3). ANCOVA followed by Tuckey pairwise comparison, was used to identify significant differences. The different letters indicate the significantly different means ($P<0.1$) : ns=not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Release of o-PO₄ from the feces increased significantly during the incubation period (0-14 days). The level of encapsulated Al incorporated in diets influenced fecal o-PO₄ release over time. The interactions between the level of encapsulated Al and time were highly significant ($P<0.001$). Thus, after 14 days, the amount of o-PO₄ released was highest from the feces of fish consuming the control diets (11.7 mg of o-PO₄ /g DM, $P<0.01$).

At the end of the feces incubation period (days 14), there was a highly significant linear regression ($P<0.001$; Figure 2.3) between fecal o-PO₄ release and encapsulated Al concentration fed to fish. Pi release experiment, feces from fish fed with a diet with 15 g/kg of encapsulated alum demonstrated a reduced fecal P release at the level of those released after four days by feces from the diet without alum.

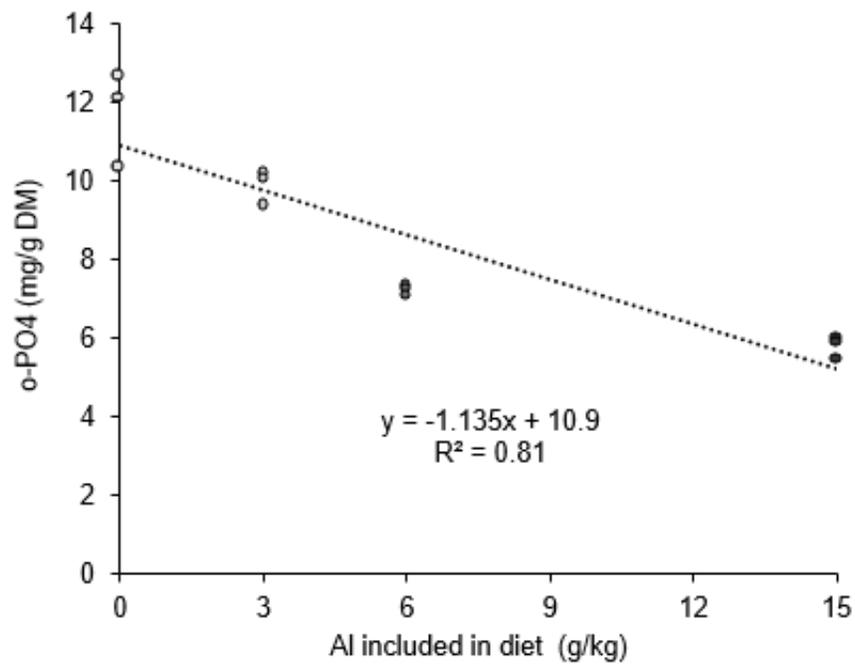


FIGURE 2.3 – Relation between o-PO₄ feces (0, 3, 6, 15 g/kg of alum) released after 14 days and the level of encapsulated alum included in diets. The values represent mean ± sd (n=3). ANCOVA followed by Tuckey pairwise comparison, was used to identify significant differences. The different letters indicate the significantly different means ($P < 0.1$): ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

2.6 Discussion

Numerous developments have been made in the field of encapsulated food ingredients (Gibbs et al., 1999). In this study, o-PO_4 chelating compounds were dispersed with a molten hydrogenated vegetable fat matrix and lipid microcapsules produced by spray-chilling (Champagne and Fustier, 2007). Lipid-based microcapsules resulting from this process were assumed to remain mostly intact through gastric and proximal intestinal transit, with chelating compounds being released into the intestinal lumen as intestinal lipases degrade the lipid microcapsules.

Regarding P absorption dynamics in fish, the anatomical region where chelating compounds were released is a key component determining the effectiveness of this technique. Ideally, the chelating compounds should be released after P absorption sites, those being within the pyloric caeca and regions immediately distal thereof (Avila et al., 2000; Sugiura et al., 2003). Release occurring before this part may lead to inadequate P absorption inducing P deficiency, with negative impacts on adequate tissue mineralization and growth performance (NRC, 2011). The kinetics of chelating compound release from lipid microcapsules, therefore, depends on the activity of the lipases in the different regions (stomach, pyloric caeca, midgut, and hindgut) of the GI tract. Few studies have been conducted to determine the difference in lipase activity between these GI tract regions in rainbow trout. The most relevant study only considers the total lipase activity (Furné et al., 2005). We have previously determined that lipase activity is significantly higher in the pyloric caeca/midgut versus the stomach and hindgut in rainbow trout of 120 and 800 g (Ndiaye 2018 unpublished data, Appendix A).

The results of scale mineralization do not show signs of P deficiency in fish fed diets with chelating compounds. This supports the underlying assumption that the lipid microspheres were degraded distal to the sites of P absorption. Indeed, Deschamps et al. (2014) and Le Luyer et al. (2014) demonstrated a rapid decrease in scale mineralization in rainbow trout fed a P-deficient diet. The levels of ash in scales of fish used in the two feeding experiments (30.6-32.0%) were similar to the values found in trout fed with sufficient dietary phosphorus Le Luyer et al. (2014). In the current studies, neither scale nor carcass mineralization was altered following feeding encapsulated P-chelating compounds. The level of P included in diets in these two experiments was high compared to the commercial rainbow trout (200-300 g) diet (11.2-13.7 vs. 9.0 g/kg). Early release chelating compound in the GI tract of fish would lead to, with Fe and 15 g/kg of Alum included diets, either a P-deficiency or significant absorption of Fe or Al. In both cases, we did not notice any significant difference in mineral status (Table 2.6 and Figure 2.2) and Al or Fe digestibility (Table 2.3), when compared to the other treatments, thus confirming our underlying assumption.

Another argument that confirms liberation in the distal part of the intestine is the fact that we do not detect any sign of intoxication-related to the accumulation of Fe and Al in fish tissues although high levels supply. For fish, iron is more toxic than Al (Bury et al., 2003; Desjardins et al., 1987; Handy and Poxton, 1993) and it is required in small quantities in the feed (0.1-0.3 g of Fe/kg-1 of feed). At higher concentrations (0.2-6.3 g of Fe/kg of diet), fishes develop signs of intoxication from this

element (Baker et al., 1997; Desjardins et al., 1987). Iron intoxication causes a decrease in feed intake and growth, diarrhea, and liver damage (an increase of HSI) that can lead to fish death. Despite the high level of iron (2.4 g of Fe/kg of feed) inclusion the experiment 1, no signs of intoxication were reported (Table 2.4).

Few studies have been performed to highlight the effect of adding alum or iron on the insolubilization of P from egested feces in fish. Preliminary studies on the use of encapsulated alum in the diet of rainbow trout were aimed to reduce feces friability (Fournier, 2012). This study demonstrated that the addition of alum reduced the suspension of o-PO₄ by up to 85 % (10.5 g of Al/kg of feed) over a one-week sampling period. In experiment 1, we observed reductions of 54% and 38% of o-PO₄ with the inclusion of 0.9 g/kg of Al and 2.4 g/kg of Fe, respectively, which is consistent with Fournier (2012). The second experiment also confirmed this study and highlighted the dose-effect of encapsulated dietary alum on the insolubilization of fecal P. Indeed, the levels of o-PO₄ released from feces after 14 days were reduced by 15, 38 and 50% for the 3, 6, and 15 g/kg feed of encapsulated alum, respectively.

On the other hand, the form of phosphorus has a significant effect on the solubilization of P from feces. Lall and Lewis-McCrea (2007) noted that calcium-bound phosphorus (main hydroxyapatite) fractions were insoluble, whereas fractions of organic P (OP; 60-80% of total P) were dissolved over time (Ackefors and Enell, 1990; Dosdat, 1992; Foy and Rosell, 1991). There is a consensus on this level of fecal organic P (Ouellet, 1999) despite great variability from one experience to another (Dosdat, 1992; Lall, 1991). It seems that fecal OP is largely mineralized to o-PO₄ after a few days. Garcia-Ruiz and Hall (1996) showed with laboratory tests that 40% of total phosphorus (TP) in feces could be dissolved in 5 hours, which corresponds to a proportion of 50-70% of the OP fraction. Dosdat (1992) reported 48% TP mineralization after 15 days (at 17 °C). In our first study, 50-60% of TP mineralization in the feces (18-20 mg of P/g) was obtained after one week from feces of fish fed control diets (Ctrl and Ctrl+) devoid of chelating compounds and incubated at 22 °C. In the second experiment, 69% of the TP was mineralized at the end of the 14th day (at 22 °C) for feces from control feed-derived feces.

These results clearly demonstrate that it is possible to reduce by about half the OP mineralization from trout feces using the encapsulated chelating compounds, that were already approved and widely employed as approaches for wastewater treatment (Metcalf and Eddy, 2003; Morse et al., 1998). Several nutritional strategies have been developed to minimize P loaded in fish farm effluent. Low-P diets (Ketola and Harland, 1993; Bureau et al., 2000), high nutrient-dense diets (Cho and Bureau, 1997) and inclusion of plant-derived proteins (Medale et al., 1998) have been used in recent decades to address this problem. Considering that the requirements of nutrients in most animals are known to decrease with age because the growth rate decreases and the dietary nutrients including P are used mainly for maintaining the metabolic functions. According to this Sarker et al. (2011) shows that the feeding phase of P in diets (alternating P-sufficient and Low-P diets) for larger fish is a clear opportunity to significantly reduce (182.7%) P output from trout farm facilities.

This P output from fish feeding is the main source of P pollution on fish farms and is predominantly

represented by fish feces. Mechanical filtration and settling suspended solids allowed to reduce 20 to 55% of total P release into effluents (D'Orbcastel et al., 2006). Using the technique described in his study we obtained the close reduction than using both mechanical filtration and settling suspended solids (34 to 54%) and more than those found with sludge filtration in steel slag methods (36%, e.g., (Puigagut et al., 2011) and (Kõiv et al., 2016)). Contrary to Steel slag methods and liming using CaO, micro-encapsulating Al and Fe included in the diet does not increase effluent pH. The combination of inclusion of encapsulated P-traps in early growing (50-300 g) phase and the use of Low-diet in the late growing phase (300-700 g) combined with sludge treatment using steel slag methods (Kõiv et al., 2016), could allow fish farms to reduce P loads to the environment, improving the environmental-friendship of rainbow trout diets.

2.7 Conclusion

Minimizing P wastes is a critical factor for the environmental sustainability of freshwater aquaculture operations. The proposed technique offers a novel approach to capture soluble P from feces. This will have the effect of limiting the level of effluent phosphorus and ultimately, the level of this element being discharged into receiving aquatic ecosystems. In the context of Quebec's freshwater aquaculture sector, where there exists a mandatory threshold of 4.2 kg of P/ton of fish produced, the dietary incorporation of microencapsulated chelating compounds described herein may provide a practical tool to assist in managing effluent P emissions and allow the sector to pursue anticipated sustainable industry growth and development. A complementary long-term study is required ensure no toxic impacts of chronic feeding of micro-encapsulated Al and Fe in diets. Finally, large-scale experiments on conventional rainbow trout farms over an entire growing cycle should be carried out to validate the reduction of P output from these facilities.

2.8 Acknowledgments

We greatly thank the technical assistance of the staff at the LARSA and 'Groupe de Recherche Intégré en Physiologie et sciences Animales' (GRIPHA) at the 'Université Laval', particularly to Yolaine Lebeuf and Nancy Bolduc. This project was supported by 'Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation-INNOVAMER', Ressources Aquatiques Québec (RAQ) and the Programme Canadien des Bourses de la francophonie (PCBF).

2.9 Bibliographie

Ackefors, H. and Enell, M. (1990). Nutrient discharges from aquaculture operations in nordic countries into adjacent sea areas. *Ambio*, 19(1) :28–35.

APHA (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. In *American Water*

- Works Association/Water Pollution Control Federation (APHA–AWWA–WPCF), 17th ed. Washington, DC, USA.*
- Atkinson, J., Hilton, J., and Slinger, S. (1984). Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(9) :1384–1386.
- Avila, E. M., Tu, H., Basantes, S., and Ferraris, R. P. (2000). Dietary phosphorus regulates intestinal transport and plasma concentrations of phosphate in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B*, 170(3) :201–209.
- Baker, R. T. M., Martin, P., and Davies, S. J. (1997). Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by african catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology*, 40(1) :51–61.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., Bevan, D. J., Simmons, L. A., Azevedo, P. A., and Cho, C. Y. (2000). Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, 181(3-4) :281–291.
- Bury, N. R., Walker, P. A., and Glover, C. N. (2003). Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 206(1) :11–23.
- Champagne, C. P. and Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2) :184–190.
- Cho, C. Y. and Bureau, D. P. (1997). Reduction of waste output from salmonid aquaculture through feeds and feeding. *The Progressive Fish-Culturist*, 59(2) :155–160.
- Cho, C. Y., Slinger, S. J., and Bayley, H. S. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes : energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 73(1) :25–41.
- Claveau-Mallet, D., Lida, F., and Comeau, Y. (2015). Improving phosphorus removal of conventional septic tanks by a recirculating steel slag filter. *Water Quality Research Journal*, 50(3) :211–218.
- Codling, E. E., Chaney, R. L., and Mulchi, C. L. (2000). Use of aluminum-and iron-rich residues to immobilize phosphorus in poultry litter and litter-amended soils. *Journal of Environmental Quality*, 29(6) :1924–1931.
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters : A review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2) :261–266.
- Deschamps, M., Poirier Stewart, N., Demanche, A., and Vandenberg, G. W. (2014). Preliminary study for phenotypic description of vertebral abnormalities in triploid trout subjected to prolonged deficiency in phosphorus. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :833–839.

- Desjardins, L. M., Hicks, B. D., and Hilton, J. W. (1987). Iron catalyzed oxidation of trout diets and its effect on the growth and physiological response of rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3(4) :173–182.
- D'Orbcastel, R. E., Roque, E., and Blancheton, J. P. (2006). Wastes from marine fish production systems : Characterization, minimization, treatment and valorization. *World Aquaculture*, 37 :173–182.
- Dosdat, A. (1992). L'excrétion chez les poissons téléostéens : L'azote. *La pisciculture française*, 108 :25–40.
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., and Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 10(12) :1135–1142.
- Fournier, J. (2012). *Optimisation de la formulation d'un régime à teneur réduite en phosphore chez la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) dans le but de réduire les rejets en phosphore*. Phd thesis, Université Laval, Québec, Canada, Québec, Canada.
- Foy, R. H. and Rosell, R. (1991). Loadings of nitrogen and phosphorus from a northern ireland fish farm. *Aquaculture*, 96(1) :17–30.
- Furné, M., Hidalgo, M. C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezainé, J., and Sanz, A. (2005). Digestive enzyme activities in adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. a comparative study. *Aquaculture*, 250(1) :391–398.
- Garcia-Ruiz, R. and Hall, G. H. (1996). Phosphorus fractionation and mobility in the food and faeces of hatchery reared rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 145(1-4) :183–193.
- Gibbs, F., Selim, K., Inteaz, A., Catherine, N., and Mulligan, B. (1999). Encapsulation in the food industry : a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3) :213–224.
- Gui, D., Liu, W., Shao, X., and Xu, W. (2010). Effects of different dietary levels of cottonseed meal protein hydrolysate on growth, digestibility, body composition and serum biochemical indices in crucian carp (*carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology*, 156(3) :112–120.
- Handy, R. D. and Poxton, M. G. (1993). Nitrogen pollution in mariculture : toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3(3) :205–241.
- Hasnaoui, M., Kassila, J., Loudiki, M., Droussi, M., Balvay, G., and Barrouin, G. (2001). Relargage du phosphore à l'interface eau-sédiment dans des étangs de pisciculture de la station deroua (béné mellal, maroc). *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 14(3) :307–322.

- Ketola, H. G. and Harland, B. F. (1993). Influence of phosphorus in rainbow trout diets on phosphorus discharges in effluent water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122(6) :1120–1126.
- Khan, F. A. and Ansari, A. A. (2005). Eutrophication : an ecological vision. *The botanical review*, 71(4) :449–482.
- Kõiv, M., Mahadeo, K., Brient, S., Claveau-Mallet, D., and Comeau, Y. (2016). Treatment of fish farm sludge supernatant by aerated filter beds and steel slag filters-effect of organic loading rate. *Ecological engineering*, 94 :190–199.
- Koko, K. D. G. (2007). Une stratégie nutritionnelle de réduction du phosphore (p) dans les effluents aquacoles : l'alimentation en phase des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avec alternances d'un régime carencé et d'un régime équilibré en phosphore. Master's thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- Lall, S. (1991). Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. In *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquatic Wastes. University of Guelph, Guelph, Ontario. 1991.*
- Lall, S. P. and Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—an overview. *Aquaculture*, 267(1) :3–19.
- Le Luyer, J., Deschamps, M., Proulx, E., Poirier Stewart, N., Robert, C., and Vandenberg, G. (2014). Responses of different body compartments to acute dietary phosphorus deficiency in juvenile triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :825–832.
- Medale, F., Boujard, T., Vallée, F., Blanc, D., Mambrini, M., Roem, A., and Kaushik, S. J. (1998). Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources*, 11(4) :239–246.
- Metcalf, E. E. and Eddy, H. (2003). *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*, chapter Wastewater engineering : treatment and reuse. Boston, US : McGraw-Hill Higher Education (No. 628.3 T252s), MA, USA.
- Moore, P. A., Daniel, T. C., and Edwards, D. R. (1999). Reducing phosphorus runoff and improving poultry production with alum. *Poultry Science*, 78(5) :692–698.
- Morse, G. K., Brett, S. W., Guy, J. A., and Lester, J. N. (1998). Review : phosphorus removal and recovery technologies. *Science of the total environment*, 212(1) :69–81.
- Naumann, K. and Bassler, R. (1976). *The Chemical Analysis of Feeds*. Methodenbuch Bd. III. Verlag J. Neumann-Neudamm, Germany, 24 chapters.
- NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academy Press, Washington, DC.

- Olfert, E. D., Cross, B. M., and McWilliam, A. A. (1993). *Guide to the care and use of experimental animals*. Canadian Council on Animal Care Ottawa.
- Ouellet, G. (1999). Les rejets des stations piscicoles et leurs impacts environnementaux. Tech. report, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Direction de l'Innovation et des technologies.
- Puigagut, J., Angles, H., Chazarenc, F., and Comeau, Y. (2011). Decreasing phosphorus discharge in fish farm ponds by treating the sludge generated with sludge drying beds. *Aquaculture*, 318(1-2) :7–14.
- Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., and Vandenberg, G. W. (2011). Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3) :241–249.
- Shreve, B. R., Moore, P. A., Daniel, T. C., Edwards, D. R., and Miller, D. M. (1995). Reduction of phosphorus in runoff from field-applied poultry litter using chemical amendments. *Journal of Environmental Quality*, 24(1) :106–111.
- Sims, J. T. and Luka-McCafferty, N. J. (2002). On-farm evaluation of aluminum sulfate (alum) as a poultry litter amendment : Effects on litter properties. *Journal of Environmental Quality*, 31(6) :2066.
- Sugiura, S. H., McDaniel, N. K., and Ferraris, R. P. (2003). *In vivo* fractional pi absorption and napi-ii mrna expression in rainbow trout are upregulated by dietary p restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(4) :R770–R781.
- Vandenberg, G. W. (2001). *Encapsulation de phytase microbienne : L'influence sur la disponibilité de nutriments chez la truite arc-en-ciel*. PhD thesis, Université Laval.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Biostatistical Analysis, 4 ed. Upper Saddle River, Prentice Hall, London, UK. ISN : 9780130815422. 929 p.

Chapitre 3

Assess body composition and dietary phosphorus retention using Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) : application on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Galbanum)

Author Contributions : 1-GVW, MPLM, WN : conceptualize the work ; 2-WN, MPLM, MHD, YL, and GVW : redact the paper ; 3-YL, WN : conduct proximate composition analysis ; 4-WN, MPLM, MHD : analyses and interpret the data ; 5-WN and MHD : lead the experiment in the water tank, 6-WN, MHD : perform DXA scans of fish carcass. ¹

"La vérité scientifique a pour signe la cohérence et l'efficacité. La vérité poétique a pour signe la beauté."

Aimé Césaire

1. Ce chapitre est présenté sous forme d'article soumis pour publication le 04 novembre 2019 dans la revue Aquaculture Research. L'article corrigé selon les recommandations des correcteurs est re-soumis le 05 mai 2020.

The accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) to assesses body composition and dietary phosphorus retention in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Waly N. NDIAYE^{1,2}, Yolaine LEBEUF¹, Marie-Hélène DESCHAMPS¹, Marie-Pierre LETOURNEAU-MONTMINY¹, Grant W. VANDENBERG¹.

¹Département des sciences animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425 Rue de l'Université Québec, QC, G1V0A6.

⁴Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT), Pôles de Recherches de Hann, Route du Front de Terre, BP : 2241, Dakar, Sénégal.

Running title : DXA estimation of body composition in trout

*Corresponding Author : Grant W. Vandenberg,

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,

Département des sciences animales,

Université Laval,

2425 rue de l'Agriculture,

Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

Tel : + 1(418) 656-2131 (ext. 6541).

E-mail address : Grant.Vandenberg@fsaa.ulaval.ca

3.1 Résumé

Cette étude a testé la précision de l'absorptiomètre biphotonique à rayons X (DXA) pour l'évaluation de la composition proximale de truites arc-en-ciel (36-136 g) nourries à différents niveaux de phosphore (P : control = 11 g P/kg et régime pauvre en P = 5,5 g de P/kg). Les analyses ont été effectuées sur des carcasses congelées et décongelées. Les données du DXA ont été comparées à celles des analyses chimiques. La teneur en P était bien prédite par le DXA [$P = - 0,087 + 0,092$ (teneur minérale osseuse) + 0,003 (masse maigre); $R^2 = 0,91$, temps : $P < 0,001$]. Les estimations de la rétention et du rejet en P sont similaires à celles obtenues à l'aide de méthodes classiques. D'autres composantes corporelles, notamment le poids, l'humidité, les protéines et la teneur en calcium ont été également bien prédites, indiquant que le DXA est une méthode fiable pour l'analyse de la composition corporelle de la truite, à l'exception de la teneur en lipides.

3.2 Abstract

Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) was evaluated to estimate body composition of rainbow trout (*O. mykiss*), with an emphasis on phosphorus (P) retention. Ninety rainbow trout (36 to 136 g) fed with control (1.10%) or low-P (P-deficient diet, 0.55%) diets, were scanned using a DXA instrument, both frozen and thawed. Whole-body scans were analyzed using the 'rat whole body' scan mode. Chemical analyses determined crude lipid and crude protein, water, ash, phosphorus (P), and calcium (Ca). Except for lipid, DXA predicted accurately body composition. The prediction capabilities of the model were assessed by comparing actual and simulated body composition using the generated equations. Results showed good agreement except for lipid and P for which adjusted equations were proposed resulting in highly improved predictions. To predict total carcass P, P retention/excretion, an equation predicting body P was developed and adjusted based on the validation [Body P (g) = - 0.087 + 0.103 (BMC) + 0.00336 (lean), $R^2 = 0.91$, $P < 0.001$]. Retention and loading estimates for P using models from DXA are similar to those from chemical methods. Our results suggest that DXA can estimate body content of protein, moisture, ash, and P; refinement is needed to predict body lipid content.

Keywords : DXA, body composition, accuracy, trout, phosphorus.

3.3 Introduction

In the aquaculture industry, the importance of flesh color and chemical composition has increased in the two last decades (Calanche et al., 2020). Lipid content of the fillet is important to flesh texture and flavor Johansson et al. (2000); Mørkøre et al. (2001); Quillet et al. (2005). Whole-body lipid composition depends mainly on feed characteristics (e.g., digestible protein and energy content) and genetics (Quillet et al., 2005).

Moreover, high body lipid content is associated with a high visceral-somatic index and a low carcass yield. The interest in understanding body composition dynamics points to the importance of having adequate tools to estimate the chemical composition of whole-body fish. Traditionally, dissection has been used to isolate lean, fat, and bone tissue deposition (Soladoye et al., 2016), and chemical analyses of the carcass composition are still thoroughly employed (Johnson et al., 2017; Wood, 2004; Lovett et al., 2019).

Over the past few decades, with the concerns related to P pollution from freshwater fish farms, the ability to monitor P deposition in fish has been an essential component of the sustainability of the production. Indeed, the levels of ash or P contents in the carcass and scales (Koko, 2007; Deschamps et al., 2014; Le Luyer et al., 2014) are tools used to highlight fish mineral status and P fish retention. Classical methods to determine whole-body composition are costly, require significant effort for dissection and laboratory manipulation, are subject to operator bias and require lethal sampling. Quillet et al. (2005) reported attempts to develop noninvasive methods for measuring body composition of fish. Electric conductivity (Hancz and Horn, 2003), near-infrared reflectance spectroscopy (Gjerde and Martens, 1987), and condition factor (Kora et al., 2000) are either difficult to apply or do not allow an exhaustive estimate of all measurements of the whole-body chemical composition.

Based on differential attenuation of high and low energy X-rays by the major components of animal tissues including bone mineral content/density, lean, and fat, dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) is a non-invasive, easy-to-operate, precise and relatively inexpensive technology for carcass composition determination (Soladoye et al., 2016). Its principle has been widely described in the literature (Brienne et al., 2001; Jebb, 1997) and its accuracy demonstrated in pigs (Pomar and Rivest, 1996; Scholz et al., 2007; Mitchell et al., 1998), broilers (Mitchell et al., 1997a; Shim et al., 2012), and beef (rib carcasses; (Mitchell et al., 1997b)). In fish, few studies have been conducted to validate DXA accuracy for estimation of whole-body composition Johnson et al. (2017); Wood (2004); Lovett et al. (2019). These reports concluded that DXA appears to be a viable tool for assessment of whole-body composition for king salmon, channel catfish, and hybrid striped bass. However, an underestimation of fat and an overestimation of lean was reported (Soladoye et al., 2016).

Pencil-beam and fan-beam are the most commonly applied bone densitometer technologies. Pencil-beam densitometers were the first generation of DXA systems to market and gave the best accuracy (Ruetsche et al., 2000). Due to the long scan time using pencil beam densitometers (up to 30 min), fan-beam DXA systems were developed to speed up the testing process (3 min). The image acquisition

time for the latest fan-beam models was reduced to 10-30 s. With pencil-beam and fan-beam systems, most scattered photons miss the detector, and accurate measurement of the transmitted radiation is possible without any confusing signal from scattering. More recently, cone-beam systems (PIXImus lunar) were introduced in which the single the entire scans field is imaged in a single exposure using a two-dimensional detector after only 1 s (Blake et al., 2005).

The objective of this study was to evaluate the potential of fan-beam DXA to estimate the composition of rainbow trout. In particular, we assessed DXA as an approach to quantify whole-body P content to determine P-retention and P-loading, to estimate P emissions.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Experimental diets

Diets were formulated according to National Research Council recommendations for rainbow trout (NRC, 2011). Two diets with different levels of total P (Control = 1.10% and Low-P diet = 0.55%) were formulated to induce large variability in fish mineral status (table 3.1). The ingredients were thoroughly mixed, and steam pelleted, using California Pellet mill (3 mm diameter; *Model CPM CL-5, California Laboratory Pellet Mill, Crawfordsville, IN, USA*). Fish oil was added to the feed in two stages; 40 g/kg was first added to the mixture and the remaining quantity (140 g/kg) by coating after the pellets were produced and dried in a forced-air oven (45°C, 10 h). The pellets were sieved and stored at -20°C until feeding.

3.4.2 Husbandry

Seven-hundred all-female triploid rainbow trout sourced from a local fish farm (*Pisciculture des Monts de Bellechasse Inc. Saint-Damien-de-Buckland, Qc, Canada*) were used for this study. Fish with an initial average body mass of 68 g (\pm 15 g) were allocated to six 150 L semi-circular tanks at the *Laboratoire de Recherche des Sciences Aquatiques (LARSA), Université Laval (Québec, Canada)*. Fish were housed in 6 green semi-square tanks (150 L; density of 53.0 kg/m³ from the beginning, 3 replicate tanks/diet, n=117 fish per tank). All tanks were supplied with recirculated freshwater (40 L/min; water renewal 20% water renewal/day) and held at 10.0 \pm 0.5°C. Before the start of the trial, fish were acclimated for two weeks (wk) and fed with the Control diet. During the study, fish were fed twice daily (8 :00 AM and 3 :00 PM) by hand to apparent satiation on two consecutive days. The amount of feed consumed was compiled, and the average daily feed intake was calculated for each tank. On subsequent days, fish were fed at 80% of this average using belt feeders. Fish were not fed one day/week to permit cleaning and system maintenance. The experiments complied with the guidelines of the *Canadian Council on Animal Care (Olfert et al., 1993)* and approved by the *Animal Protection Committee of Université Laval (CPAUL)*.

TABLE 3.1 – Diet composition in ingredients and nutrients.

Ingredient	Diet	
	Control diet	Low-P diet
Herring meal ^a	75	75
Blood meal ^f	100	100
Feather meal ^f	100	100
Wheat meal ^c	180	205
Soybean meal ^b	80	80
Wheat gluten ^c	70	70
Corn gluten meal ^b	170	170
Fish oil ^a	180	180
¹ CaHPO ₄ ^g	25	0
² Vitamin and mineral mix ^d	10	10
Lysine ^e	0.012	0.012
DL-methionine ^e	0.002	0.002
Stay ^{c,d}	0.15	0.15
Choline ^d	0.1	0.1
Sipernat 50 ^h	10	10
Proximate composition (%dry basis)		
Dry matter	98.3	98.2
Crude protein	50.3	49.6
Crude lipid	16.8	16.3
Ash	6.1	4.24
Energy (E. MJ/kg)	23.5	24.1
Total P	1.1	0.55
Digestible P	0.45	0.29

NOTES : ^aComeau's sea food LTD; ^b Meunier Gérard Soucy Inc. 926 route Laurier. Sainte-Croix. QC. G0S 2H0; ^cColabor. 820 rue St-Alphonse Desrochers. Lévis. Qc. G7A 5H9; ^dDyets. Inc. 2508 Easton Avenue. Bethlehem. PA 18017. Bethlehem. PA 18017; ^eADM Alliance Nutrition Canada. St-Hyacinthe. QC; ^fSANIMAX Marketing Limited. Guelph, ON; ^gLaboratoire Mat Inc., Quebec, QC; ^hEvonik Corporation, 2 turner place Piscataway, NJ, USA.

¹Source of inorganic P

²Supplied the following : (to provide mg/kg except when noted) : vitamin mix = thiamin HCl, 2; riboflavin, 3; pyridoxine HCl, 0.6; niacin, 1; calcium Pantothenate, 4; folic Acid, 0.2; biotin (1mg/g), 4, vitamin B12 (0.1%), 10; vitamin A Palmitate, (250,000 IU/g) 2; vitamin D3 (400,000 IU/g), 1.5; vitamin E Acetate (500 IU/g), 29.8; menadione Sodium bisulfite (62.3% Menadione), 3.2; t-BHQ, 0.03, Dextrose, 938.66; mineral mix = potassium iodide (76%I), 2.63; ferrous sulfate 7H₂O (20%Fe), 50; manganese sulfate H₂O (32.5% Mn), 24.6; zinc sulfate H₂O (36.44%Zn), 37.48; cupric sulfate 5H₂O (25%Cu), 8; sodium selenite (45.6%Se), 0.35; cobalt chloride 6H₂O (24.77%Co), 0.085; dextrose, 876.855. Each mix was added at 5g/kg of diet. Sipernat50 : source of insoluble ash comprised of 98.50% SiO₂.

3.4.3 Carcasses and scales sampling and preparation

Six fish per tank were sampled at wk 0, 2, 4, 6, and at the end of the experiment (9 wk). Fish were euthanized by immersion in an overdose (150 mg/L) solution of tricaine methanesulfonate (MS-222, *Syndel International Inc., Vancouver, BC, Canada*). For each sampling time, three fish per tank were

used to establish the mineral status using scale ash content. Fish scales were scraped from tail to head and stored in 70% ethanol and dehydrated in a graded series of ethanol (70, 90, 100%; 24 h bath), delipidated in acetone (two baths of 24 h) as well as in trichloroethylene (two baths of 24 h). Three other fish per tank were frozen at - 20 °C for DXA scans.

3.4.4 DXA scans

Frozen fish were transported to Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CR-SAD) for DXA assessment. Each fish was individually scanned twice frozen and thawed (2h at the ambient temperature of 25°C) with a DXA scanner (*Hologic Discovery W, Hologic Inc., Waltham, MA*). Initial instrument calibration using Hologic Anthropomorphic Spine Phantom (HASP) was performed. Each fish was positioned laterally and scanned from the cranial to the caudal region using the rat whole body scan mode under the small animal settings. Whole-body composition estimation, according to their x-ray attenuation at 100-140 kV, was performed by the computer software (Hologic QDR 2000). Scan estimates provided : fish area (cm), bone mineral content (BMC, g), fat mass (g), lean mass (g), and total mass (g). Before scanning, fish were weighed (± 1 g) using electronic balance (*Mettler Toledo MS32001L MS-L Precision Balance, Mississauga, CA*). The validation of the repeatability of the DXA measurements was made before scans acquisition of the fish included in the experiment. On this step, eighteen carcasses of trout (6 groups of 3 fishes) were scanned in three positions : horizontal, perpendicular, and oblique to the beam. The lowest (<6%) absolute value of coefficient of variation (CV) between DXA mass and balance mass were obtained when carcasses were placed in a horizontal position. During the exams of fish from experiment, the scan (n=10/n=180) which seems to be untrue (ICV>6) have been repeated.

3.4.5 Chemical composition analyses

After DXA analysis, carcasses were autoclaved, freeze-dried, and ground using a 1 mm screen (Magic Bullet-Mixer system, LA, USA). The whole-body content was analyzed according to the *Association of Official Analytical Chemists* guidelines (AOAC, 1990) for moisture (AOAC n° 927.05 : drying in a vacuum oven for 18 h at 105 °C) and ashed (AOAC n° 930.30 : incinerating in a muffle furnace for 18 h at 550 °C). Fish ash composition was compared to DXA whole-body bone mineral content (BMC) estimates. The BMC represents mostly the fraction of P and Calcium whole-body composition. Fish chemical composition of P and Ca were determined using an inductively coupled plasma atomic emission spectrometry method (*ICP-AES, SPECTRO Analytical Instruments Inc., NJ, USA*) after ash digestion in HCl-nitric acid solution (18 mL of HCl 50% + 3 drops of nitric acid, (Naumann and Bassler, 1976)). Crude protein (% N x 6.25) and crude lipids were quantified using the semi-automatic Kjeldahl method (*Foss Electric, Denmark; AOAC method 7, B01-7, B04*) and ANKOM^{XT15} (an automated system for Soxhlet, crude fat extraction with diethyl ether -*AOCS Am 5-04*), respectively. Whole-body P retention and P loading (kg P/tonne production) were obtained according to the formula present by Watanabe et al. (1987) and Jahan (1999) :

- P retained (kg) = final P content (kg) – initial P content (kg)
- P retention (%) = (P retained/ P intake) x 100
- P load (kg/ton) = [P intake (kg) – P retained (kg)]/weight gain (ton)

3.4.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software 3.2.5 (<https://www.r-project.org/>). Normality and homogeneity of variances were tested using Shapiro Wilk and Bartlett tests, respectively, and data were log- or arcsin-transformed when required. When data respected the assumptions of normality, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed for each fish condition (frozen/thawed). First, the effect of time and fish condition were tested. Secondly, the effect of diet and time were analyzed. When significant differences were found, the means within each treatment and among treatments were compared using Tukey's test of multiple comparisons. P retained and loading, mean comparison according to diet and methods (DXA vs. Chemical methods) was performed using the Tukey's test. The level of significance used in all tests was $P < 0.05$.

Linear regression was performed to predicted body composition using DXA data. The trueness of the prediction equations was evaluated based on the statistical properties of the intercept, the slope, the coefficient of determination (R^2), and the Residual Standard Error (RSE). Student's t-test was performed to highlight that intercept and slope are not significantly different from 0.0 and 1.0, respectively ($P > 0.05$) as described by St-Pierre (2001). Additionally, the accuracy of the prediction equation was assessed using the mean square prediction error (MSPE). The relative MSPE (rMSPE) expressed as a percentage of the observed mean (%) was divided into error in central tendency (ECT), error due to regression (ER), and error due to disturbance (ED), as used by Létourneau-Montminy et al. (2011) according to Theil (1966) and Bibby and Toutenburg (1977). The best prediction equation was characterized by the lowest rMSPE and the highest ED compared to ECT and ER.

3.5 Results and discussion

The current work aimed to demonstrate that DXA can be employed effectively to estimate certain body composition parameters in juvenile rainbow trout. It is worth noting that the ability to scan frozen carcasses would simplify the logistics of this approach. Therefore, the accuracy of the equations of prediction (Table 3.2) of scans from frozen versus thawed carcasses has been first validated. Thereafter, as P excretion limits fish production in Quebec, using the DXA to estimate P loading would be of great advantage to speed up the research and for field-based evaluation of P loading, both contributing to sustainable fish production. DXA whole-body estimates of body mass, fat mass, BMC, lean mass (mean \pm sd) for three sampling times (0 wk, 4 wk, 9 wk; n=54) of frozen and thawed fish carcasses were showed in Table 3.5 attached to the end of the chapter.

TABLE 3.2 – Best-fit regression equation, intercept and probability, and coefficient of determination for prediction body composition using data from fan-bean DXA for juvenile rainbow trout (n = 90) carcass frozen and thawed.

Parameters	Equation	Statistics ^d		
		Intercept	P-value	R ²
Mass				
Thawed	Body mass (g) = - 0.156 + 1.01 DXA mass (g)	0.6	<0.001	0.98
Frozen	Body mass (g) = 0.356 + 0.971 DXA mass (g)	0.9	<0.001	0.99
Ash				
Thawed	Carcass ash (g) = - 0.248 + 0.259 BMC (g) + 0. 019 DXA lean (g) + 0.019 DXA fat (g)	<0.001	<0.001	0.89
Frozen	Carcass ash (g) = - 0.240 + 0.247 BMC (g) + 0. 020 DXA lean (g) + 0.017 DXA fat (g)	<0.001	<0.001	0.91
Protein				
Thawed	Crude protein (g) = -1.55 + 0.178 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.87
Frozen	Crude protein (g) = -2.35 + 0.191 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.88
Lipid				
Thawed	Crude lipids (g) = 1.430 + 0.813 DXA fat (g)	<0.001	<0.001	0.1
Frozen	Crude lipids (g) = 4.42 + 0.214 DXA fat (g)	<0.001	<0.001	0.49
Phosphorus				
Thawed	Carcass P (g) = - 0.059 + 0.053 BMC (g) + 0.003 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.91
Frozen	Carcass P (g) = - 0.087 + 0.092 BMC (g) + 0.003 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.94
Calcium				
Thawed	Carcass Ca (g) = - 0.041 + 0.052 BMC (g) + 0.003 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.86
Frozen	Carcass Ca (g) = - 0.073 + 0.113 BMC (g) + 0.003 DXA lean (g)	<0.001	<0.001	0.87

NOTES :^dSlope were all significant at $P < 0.05$.

3.5.1 Evaluation of the trueness of DXA whole-body estimates vs. carcass chemical composition

Body weight

The body mass of the fish used in this study ranged between 36 and 132 g, and 37 and 136 g, using an analytical balance and DXA estimates, respectively. The fish condition (frozen/thawed) did not influence the accuracy of whole-body mass estimates using DXA (Figure 3.1). Intercepts were not significant and the DXA estimates of body mass were slightly lower than carcass mass determined by balance (average slope of 0.98; Table 3.2). When the difference between balance mass and the DXA mass was expressed as a CV [$CV (\%) = (\text{body mass} - \text{DXA mass}) / \text{body mass} \times 100$], values ranging between 0.3 to 10.3% were obtained for all groups of fish. When data from the two groups (frozen and thawed) were analyzed separately, this difference was lower when fish were frozen (CV min-max = 0.31 – 5.2 and 0.81 – 10.3 for frozen and thawed fish, respectively). This strong fit is in accordance with other studies performed in broilers (CV = 0.5 – 1.1; Mitchell et al. (1997a)), rats (CV = 2.2; Lu et al. (1994)), channel catfish (CV = 0.33 - 0.40; Johnson et al. (2017)), and in striped bass (CV = 6.1 – 13.4; Wood (2004)).

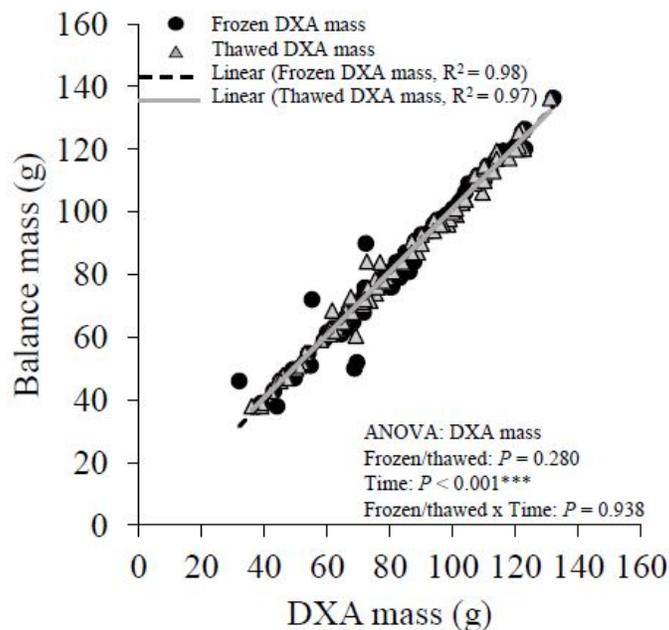


FIGURE 3.1 – Relationship between balance mass and DXA mass small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

When the difference between balance mass and the DXA mass was expressed as a percentage [$CV\% = (\text{mass balance} - \text{DXA mass}) / \text{mass balance} \times 100$], values ranging between 0.2 to 3.0% were obtained. When data from the two groups (frozen and thawed) were analyzed separately, this difference was lower when fish were frozen (minimum to maximum = - 1.0 to 5.1 vs. - 4.0 to 5.5%). This strong fit is

in accordance with other studies performed in broilers (CV = 0.5 – 1.1; Mitchell et al. (1997a)), rats (CV = 2.2; Lu et al. (1994)), channel catfish (CV = 0.33 - 0.40; Johnson et al. (2017)), and in striped bass (CV = 6.1 – 13.4; Wood (2004)).

Lean tissues

As expected, DXA whole-body lean tissue values and carcass crude protein values, increased with fish growth (Time = $P < 0.001$; Table 3.5). Whole-body lean mass of fish includes all other components of the soft tissue that are not fat, so carcass protein and moisture were the major components of DXA whole-body lean mass estimates Mitchell et al. (1997a). There was a high correlation ($R^2 > 0.86$) between DXA whole-body lean and crude proteins with no effect of fish condition (frozen vs. thawed; Figure 3.2). The relationship between crude proteins and DXA whole-body lean estimates showed an average slope of 0.185, indicating that proteins represent 18.5% of the DXA lean estimates. Our result is consistent with previous studies in hybrid striped bass, where values were found to be 16.6 and 19.6% using Pencil Beam DXA and Fan beam DXA, respectively (Wood, 2004). In broilers, crude proteins were evaluated at 18.7% (Mitchell et al., 1997a).

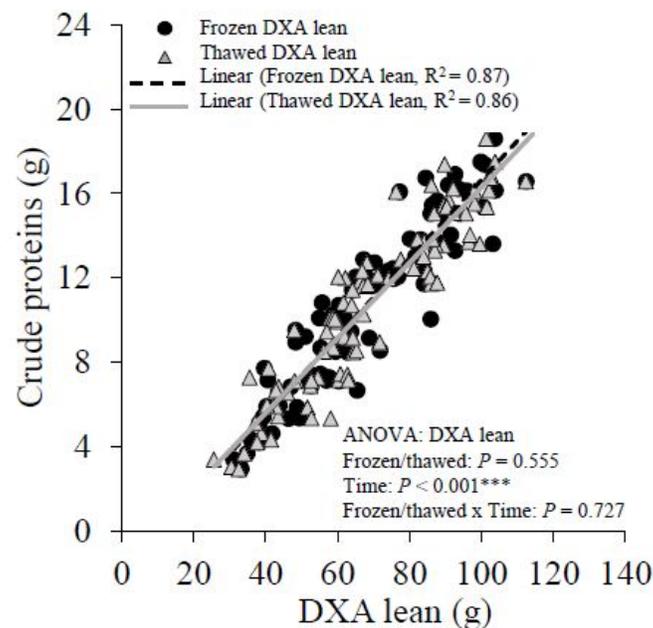


FIGURE 3.2 – Relationship between crudes proteins and DXA lean small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

DXA whole-body lean estimates were correlated with the chemical composition of carcass water ($R^2 = 0.92$ and 0.88 in frozen and thawed fish, respectively). Data showed a significant effect of time and no significant effect of fish condition (frozen vs. thawed; Figure 3.3). The best-fit equation indicated that carcass water content represented 73% of DXA whole-body lean estimates. This result is consistent with other studies in hybrid striped bass where carcass moisture was found to be between 68 and

80% of DXA estimates using Pencil-beam DXA and fan-beam DXA, respectively (Wood, 2004). In broilers, Mitchell et al. (1997a) evaluated this percentage at 68%.

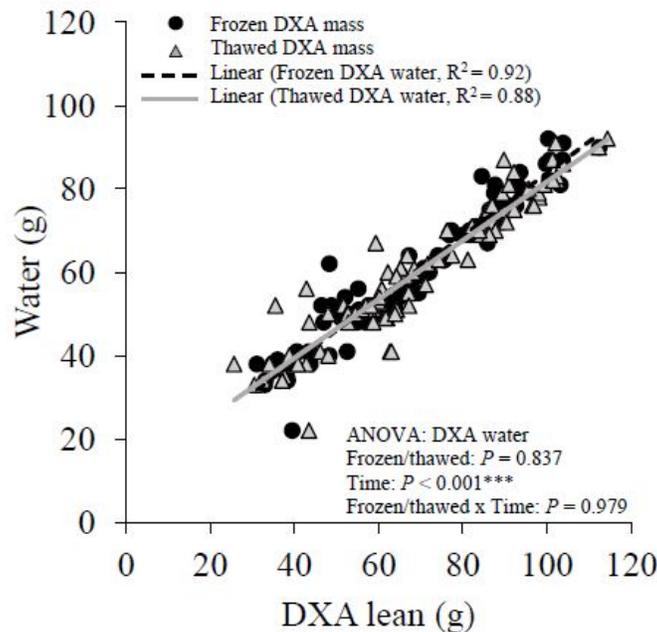


FIGURE 3.3 – Relationship between water and DXA lean small animal scan mode for 90 fish’s carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Body fat

The linear relationship between whole-body estimates for fat via DXA versus lipid determined by analytical/chemical methods was low with R^2 values ranging from 0.10 and 0.49 for the frozen and thawed carcass, respectively (Figure 3.4). There was also a weaker relationship in the thawed carcass (Frozen/thawed x Time, $P < 0.001$). This poor prediction of fat carcass content by DXA has already been reported in channel catfish (Johnson et al., 2017) and hybrid striped bass (*M. chrysops* x *M. saxatilis*; (Wood, 2004)) with R^2 of 27 to 34 and 50 to 55% respectively. Additionally, the relationship between DXA fat estimates and analytical crude lipid is mostly influenced by frozen/thawed conditions ($P < 0.001$) and although both increase with time ($P < 0.001$), the relationship is different (Frozen/thawed x Time, $P < 0.001$; Figure 3.4). In theory, body fat should consist almost only of lipid, so a slope close to 1 is expected. This is not the case with slopes of 0.21 and 0.81 (Table 3.2) in frozen and thawed DXA whole-body fat estimates, respectively, indicating 21 to 81% lipid in the DXA estimate of fat.

When using only data from larger fish (88 to 134 g, $n = 36$) at the end of the experiment, it seems likely that when the carcass is frozen, DXA overestimated fat content and underestimated lean content, whereas the opposite situation occurs when the carcass of fish is thawed (circled in Figure 3.4). However, this variation has more impact on DXA estimates of fat vs. lean, given that lean represents more

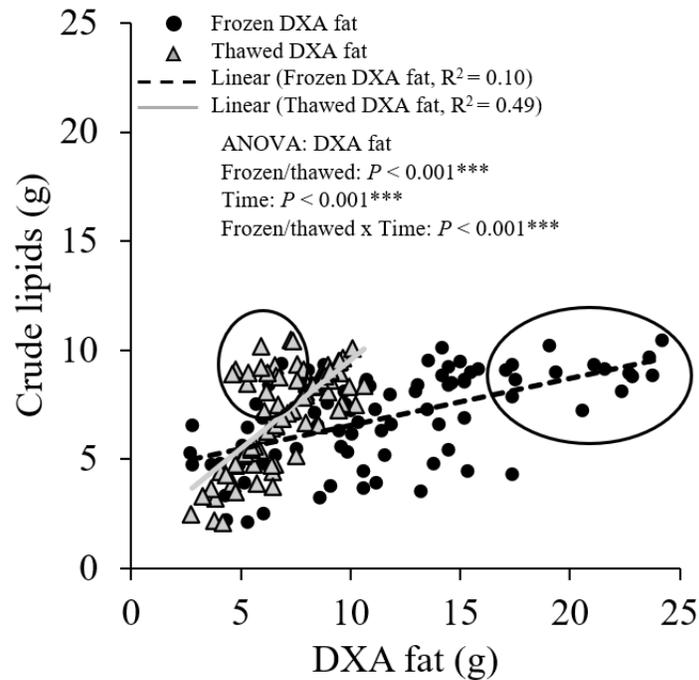


FIGURE 3.4 – Relationship between crude lipids and DXA fat small animal scan mode for 90 fish's carcass. The two black circles indicate the oldest trout (at 9 wk, 88 to 134 g, n = 18) for frozen and thawed showing overestimation and underestimation of DXA estimate fat for the frozen and thawed carcass, respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

than 75% of the whole-body mass. Similar observations were made by Wood (2004) in striped bass (*M. saxatilis*). Rose et al. (1998) suggested that the low accuracy of DXA fat estimation could be the result of the type of software used (Human vs. Rat Whole Body V5.71P). The algorithms of the DXA software are not explicitly developed for fish.

Many studies reported a non-linear relationship of R-value over the fat content in carcasses (Svendsen et al., 1993; Mitchell et al., 1998; Mercier et al., 2006) thus may constitute a source of error in the estimation of the fat content of the soft tissue mass in a wide range of an animal size (rigorously fatness) as suggest by (Soladoye et al., 2016). On growing phase juvenile rainbow trout accumulate fat on muscles and viscera over time. It results in a wide range of fatness (1.04 and 1.46 for 0 wk and 9 wk, respectively) resulting in a weak trueness DXA fat estimation. Wood (2004) showed similar weak trueness of DXA to assess body fat content in striped bass. DXA fat value was determined using the R-value, which is the ratio of the mass attenuation coefficient of non-bone soft tissue at the low energy relative to that at the higher energy. This R-value gives the composition (lean/fat) to the non-bone soft tissue. Fat in bone soft tissue was estimated by assuming that these two soft tissues (bone and non-bone) have the same composition. Total DXA fat mass was obtained by adding the fat mass from bone and non-bone soft tissues (Scholz et al., 2007)). The non-bone soft tissue composition change affected

the estimation of fat in bone soft tissue relatively constant, explaining the weak of trueness for DXA fat prediction.

Bone mineral content

The chemical/analytical analysis gives the carcasses ash content and not only the ash contained in bone. However, as bone mineral content is the primary source of total body ash Mitchell et al. (1997a), it was expected that there would be a strong relationship between the DXA whole-body BMC estimates and carcass ash composition as showed in Nagy and Clair (2000). In the current study, the DXA whole-body BMC showed a linear relationship with the ash composition of carcasses with R^2 of 0.77 and 0.76 in frozen and thawed fish, respectively (Figure 3.5). A strong linear relationship between DXA whole-body BMC and carcass ash was already reported in channel catfish, with R^2 above 0.83 (Johnson et al., 2017). Wood (2004) reported different precisions according to the mode of scan used on striped bass (600 g). The R^2 values were of 0.86, 0.66-0.86, 0.79, and 0.80 for PIXImus table-top scanner, pencil-beam, fan-beam detailed scan mode, and fan-beam high-resolution scan mode, respectively. For the fan-beam base DXA small animal scan mode, the strongest linear relationship (R^2) found between carcass ash content and DXA whole-body BMC, was of 0.55 for an individual scan (Wood, 2004).

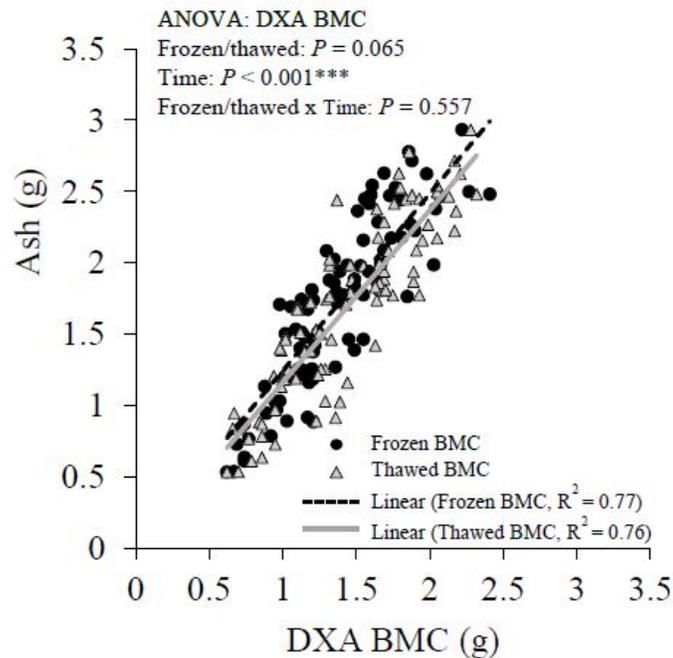


FIGURE 3.5 – Relationship between whole-body ash and DXA BMC small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Freezing and thawing the carcass tended to affect DXA whole-body BMC estimates ($P=0.065$); freezing tends to give higher BMC values (ash = 1.23 BMC, and ash = 1.20 BMC for frozen and thawed, respectively) indicating the BMC represents 80 – 83% of whole-body ash. This result is consistent with findings in hybrid striped bass, where Wood (2004) showed that DXA whole-body estimate of BMC represents 76% and 64% of analytical ash for the stacked and unstacked carcass, respectively. Body ash is also found in soft tissues like lean; therefore, an equation adding other DXA whole-body estimates was performed and showed that the prediction of carcass ash content could be significantly improved by including DXA estimates for lean and fat ($R^2 = 0.90$, Table 3.2).

Phosphorus and calcium content

The percentage of P and Ca in fish carcasses showed a strong linear relationship linear with DXA whole-body estimate BMC, with R^2 value ranging from 0.77 to 0.78 (Figure 3.6). Time showed that as expected BMC and P and Ca increased ($P<0.001$) with time in the same way if they have been scanned thawed or frozen (frozen/thawed : $P=0.883$). The relation between P and Ca content and BMC in carcass showed a close slope around 0.25 with different intercepts of - 0.056 and - 0.048, respectively. These results suggested that P and Ca are deposited in bone tissue at the same level. That means that for each unit of BMC deposited in rainbow trout half of the total amount was represent by P and Ca (quarter each). No available studies had shown the amount of P and Ca deposited in fish bones per unit of BMC deposited. However, most of the available data show that Ca is major constituent of fish bones (Ca/P = 1.5 to 1.7 for salmonids, (Toppe et al., 2007)).

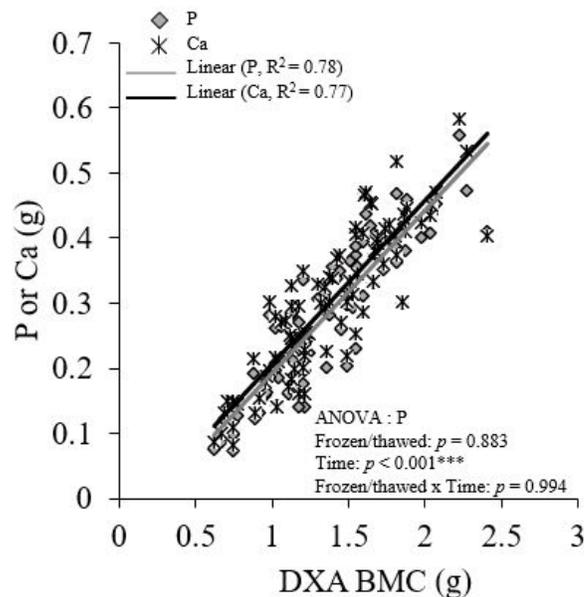


FIGURE 3.6 – Relationship between the amount phosphorus (P) or calcium content and total DXA BMC small animal scan mode for 90 fish's carcass. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

3.5.2 Accuracy of the DXA to predict body composition

The ability of the proposed models to predict body composition based on DXA measurements was assessed (Table 3.3). The result shows that models were more accurate when frozen data were used with lower rMSPE, excepted for ash content where rMSPE were close (25.04 and 25.62%). Most of DXA body composition prediction studies are done on frozen carcasses as it is more convenient. However, little data is available showing that freezing the carcasses have a non-significant effect on DXA measurements. Nevertheless, our results confirmed that prediction is more accurate on a frozen basis.

Predicted models from frozen data showed that the intercept is significantly different from 0 only for lipid ($P < 0.001$) while the slope deviates from one for lipid and P ($P < 0.001$). In general, ED, which represents the prediction error that has been accounted for by the model, was high (86.3 to 99.0%) excepted for P (ED = 39.4%) and lipid (ED = 69.5%).

The strong relationships between DXA lean estimates and carcass determination in protein and water contents using analytical methods were previously reported in fish (Wood, 2004; Johnson et al., 2017; Lovett et al., 2019), pigs (Pomar and Rivest, 1996; Soladoye et al., 2016), and chickens (Mitchell et al., 1997a). Our study confirms that it is possible to accurately predict carcass crude protein content using DXA technology. Using the prediction equation of crude protein based on DXA, lean estimates could facilitate the studies of the effect of varying dietary protein on carcass protein content in fish (Cho et al., 1976; Yang et al., 2002; Kerr et al., 2003). Although these comparisons of DXA whole-body lean mass or water content results in a relatively strong relationship, it should be noted that body composition estimates obtained from DXA can vary between ranging of body mass (Mitchell et al., 1997b) even breeds within similar species (Soladoye et al., 2016), so care must be taken when interpreting results from different individuals being measured. For lipid, it was the ER that was high (21.6%). This error can be reduced to 4.24% and the rMPSE to 18% by excluding the smallest trout sampled on 0 wk and 2 wk from predicted values (FrozenL-adjusted, Table 3.3). This inaccuracy with the smallest trout can be explained by their greater presence of body lipid into muscles. Indeed, condition factor ($K = [\text{weight (g)/length}^3 \text{ (cm)}] \times 100$) from fish sampled on 0 and 2 wk (1.04 to 1.06, respectively) are lower than those sampled on 4, 6, and 9 wk (1.30, 1.38 and 1.46, respectively, 3.4). We can hypothesize that abdominal lipid are more accurately estimated by DXA than lipid into a muscle (heterogeneous). A strong and significant positive correlation was observed between condition factor and total lipid content in immature Atlantic salmon (Herbinger and Friars, 1991) and mature rainbow trout (Johansson et al., 2000). Thus, it would be interesting to investigate the accuracy of DXA lipid content estimation according to K. Then correlating results from those obtained using DXA spine scan in abdominal fat regions of interest (ROI) as used in Bea et al. (2016) will allow better understanding why DXA poorly predicted lipid content.

TABLE 3.3 – Regression between observed and predicted values of the equations predicting body composition based on DXA measurements showing the intercept, the slope, the relative mean square prediction error (rMSPE) divided into error in central tendency (ECT), error due to regression (ER), and error due to disturbance (ED).

Parameters	Intercept ^a	Slope ^a	R ²	rMSPE ^b	ECT	ER	ED
Mass							
Thawed	-0.51	1.03	0.99	4.19	26.2	3.61	70.2
Frozen	0.01	0.99	0.99	2.45	12.5	1.10	86.3
Ash							
Thawed	-0.02	0.96	0.65	25.04	4.74	0.340	94.9
Frozen	0.04	0.92	0.64	25.62	5.73	1.39	92.9
Protein							
Thawed	0.19	0.97	0.86	14.75	0.422	0.446	99.1
Frozen	-0.34	1.04	0.88	13.31	0.094	0.877	99.0
Lipid							
Thawed	3.56*	0.25*	0.11	94.56	43.9	30.6	25.5
Frozen	-5.06*	1.55*	0.51	42.36	21.6	8.95	69.5
FrozenL-ajusted ^c	1.13	0.90*	0.40	18.48	4.24	0.881	94.9
Phosphorus							
Thawed	0.01	1.23*	0.90	24.87	68.0	7.70	24.3
Frozen	0.01	1.12*	0.91	18.31	55.9	4.72	39.4
FrozenP-ajusted ^d	0.01	1.00	0.91	11.97	7.70	0.001	92.3
Calcium							
Thawed	0.00	1.23*	0.86	24.60	59.9	6.96	33.2
Frozen	0.00	1.03	0.87	13.91	7.24	0.592	92.2

^aThe * means that the intercept differs from 0 and the slope from 1

^brMSPE : the sum of the square of the difference between the predicted (DXA) and the chemical measurement divided by the number of experimental observations (MSPE), expressed as a percentage of the chemical measurement mean (%)

^cThe model was adjusted by withdrawing data from 0 wk and 2 wk (smallest rainbow trout)

^dThe model was adjusted by applying the slope of 1.12 on P predicted

TABLE 3.4 – Body mass, P content for three sampling times (0, 4 and 9 wk; n=54) of frozen and thawed fish carcasses. For P content DXA method (valid equation of P using DXA) and chemical methods were used. Relevant data like growth parameter such standard growth rate (SGR) and feed intake (FI), and indicator of fatness (condition factor, K^c) was provided table and footnote, respectively.

Weeks	Diet	SGR ^b	FI (kg)	Body mass (g)	P (g/kg) DXA	Chemical methods
0 wk	Low-P diet	nc	nc	48.1 ^a	3.07 ^{ab}	2.96 ^a
	Control diet	nc	nc	54.6 ^a	3.08 ^{ab}	2.63 ^a
4 wk	Low-P diet	16.2	6.43 ± 0.133	89.2 ^c	3.01 ^a	3.65 ^b
	Control diet		6.55 ± 0.093	73.6 ^b	3.50 ^b	3.65 ^{ab}
9 wk	Low-P diet	8.1	11.45 ± 0.208	105.3 ^d	3.49 ^b	3.76 ^b
	Control diet		11.32 ± 0.433	107.1 ^d	3.80 ^c	3.87 ^b
Pooled SEM						
	Diet			7.9	1.2	2.5
	Time			0.894	0.190	0.741
P-value	Time			<0.001***	0.048*	<0.001***
	Diet x Time			0.001**	0.048*	0.008**

^aK ([weight (cm)/length³ (g)] x 100) = 1.04, 1.06, 1.30, 1.38 and 1.46 for 0, 2, 4, 6 and 9 wk, respectively
^bSGR = 100 × (ln FBW - ln IBW) / days, where FBW, final body weight; IPC, initial P content; IBW, initial body weight

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001. Mean values (n = 3 tanks per diet), nc=not calculated. Values not sharing identical letters were significantly different (P<0.05).

The average predicted P deviates largely from the average of observed P (ECT = 55.9%) for an unknown reason. This error can be significantly reduced to 7.7% using linear correction, by applying a slope of 1.12 to P predicted (FrozenP-adjusted, Table 3.3). The BMC and lean parameters of the equation reported in Table 3.2 for frozen carcasses has thus to be multiplied by 1.12 (Carcass P (g) = -0.087 + 0.103 BMC (g) + 0.00336 DXA lean (g)) to improve the prediction capability of the model. According to that the whole-body P predicted (3.07 to 3.80 g/kg, Table 3.4) using adjusted model with DXA data (mainly BMC and lean) was calculated and values were consistent with the chemical composition of P (2.93 to 3.87 g/kg) and with previous studies in Atlantic salmon and rainbow trout in which Storbakken et al. (1998) and Satoh et al. (2003) evaluated whole body P around 4.0 to 4.8 g/kg and 3.7 to 4.3 g/kg, respectively.

3.5.3 DXA as a tool to assess phosphorus balance

To assess the capability of DXA to be used in trials varying P levels in fish, the developed equation has been used to assess the effect of P dietary supply in comparison to chemical analysis data. The best-fit equation for body P obtained with frozen carcass adjusted to correct the error of central tendency was used. The P retention and loading were calculated and compared to chemical data expressed on a weight gain basis (Watanabe et al., 1999). Fish fed with the low-P retained a higher level of P (32 and 36% for DXA and chemical, respectively) compared to fish fed with the control diet (12 and 15% for DXA and chemical, respectively, Figure 3.7 A). According to that fish fed Low-P diet excreted less P (2.5 and 2.7 kg/ton for DXA and chemical, respectively) than those fed with a control diet (4.3 and 4.7 kg/ton for DXA and chemical, respectively, 3.7 B). These results are consistent with P retention and loading found in other studies (Satoh et al., 2003; Bureau et al., 1999; Sarker et al., 2011), where the efficiency of P retention decreased with increasing P intake according to our findings with DXA and chemical methods. Our results confirm that it is possible to use models resulting from the DXA analysis to have a precise evaluation of the dietary P utilization by the fish and especially the amount released in the environment, as it was done in pigs (Létourneau-Montminy et al., 2017).

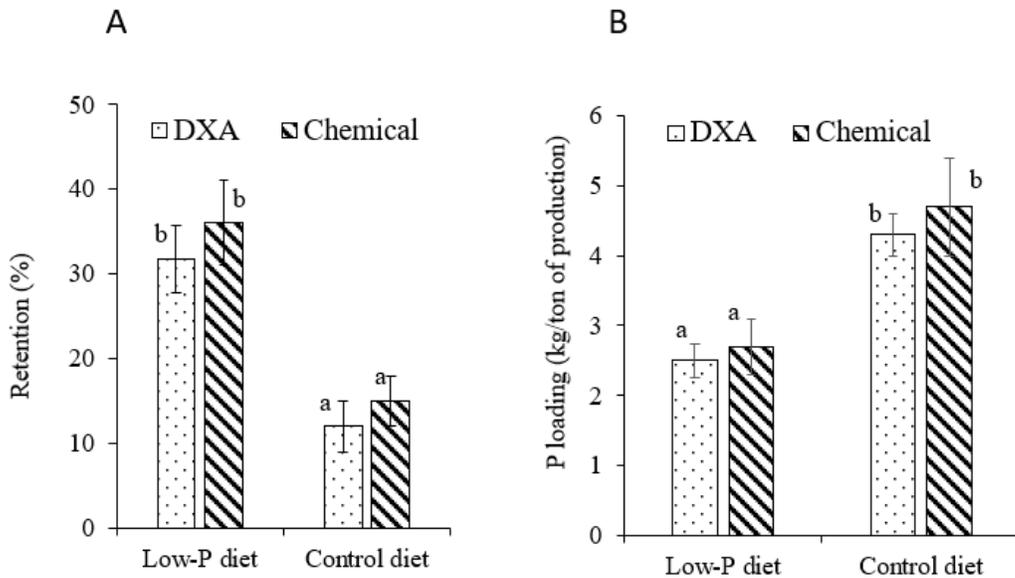


FIGURE 3.7 – Comparison of P retention (%), A and P loading (Kg/ton of production, B) predicted (frozenP-adjusted = DXA) and chemical measurements for a growing period of feeding trial (0-9 wk). Values were means of 3 tanks per diet. Values not sharing identical letters were significantly different ($P < 0.05$).

3.6 Conclusion

Results from this study indicate that dual-energy X-ray absorptiometry can be used to predict body mass, lean tissues, bone mineral content, ash, crude protein, and P accurately in juvenile rainbow trout. However, the whole-body fat estimates using DXA employing fan-beam technology (rat whole body scan mode under small animal settings) were not accurate to predict lipid content in fish carcasses for smallest rainbow trout used in this study (<90 g). According to that an additional investigation should be done to improve the accuracy of the model by integrating the true measure of DXA fat, at least for the prediction model for P. The proportion of phospholipid in fat is not negligible in fish.

The DXA method also accurately evaluated P retention and loading. The developed equations could be useful to assess P output from aquaculture facilities and thus extremely helpful tool to assess practices employed to lower P excretion. This approach should be extended to live fish to offer a non-invasive approach, as well as conducting individual time sampling surveys that could improve our model, allowing reducing the use of animals in experiments. The use of DXA scans to determine carcass composition reduces operator bias, costs, and chemicals associated with classical analytic methods used to assess body composition.

3.7 Acknowledgments

We thank the technical assistance of the staff at the LARSA Special thanks to Nancy Bolduc and our trainees Océane Savage and Joseph Ndong and the *Groupe de Recherche Intégré en Physiologie et sciences Animales* (GRIPHA) at the Université Laval. We also thank the CRSAD staff, particularly to Dr. Carl Julien, for his technical assistance for DXA measurements. This project was financially supported by the *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada* (NSERC), the network *Ressources Aquatiques Québec* (RAQ), and the *Canadian Francophonie Scholarship Program* (CFSP).

3.8 Bibliographie

- AOAC (1990). Official methods of analysis of aoac (association of official analytical chemists) international. In *Official Methods of Analysis, 16th ed.* Washington, DC, USA.
- Bea, J. W., Blew, R., Going, S. B., Hsu, C.-H., Lee, M., Lee, V., Caan, B., Kwan, M., and Lohman, T. G. (2016). Dual energy x-ray absorptiometry spine scans to determine abdominal fat in postmenopausal women. *American Journal of Human Biology*, 28(6) :918–926.
- Bibby, J. and Toutenburg, H. (1977). *Prediction and improved estimation in linear models*. J. Wiley and Sons, New York, NY.
- Blake, G., Knapp, K., and Fogelman, I. (2005). Dual x-ray absorptiometry. *Calcified Tissue International*, 76(2) :113–120.
- Brienne, J. P., Denoyelle, C., Baussart, H., and Daudin, J. D. (2001). Assessment of meat fat content using dual energy x-ray absorption. *Meat Science*, 57(3) :235–244.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., and Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180(3-4) :345–358.
- Calanche, J. B., Beltrán, J. A., and Hernández Arias, A. J. (2020). Aquaculture and sensometrics : the need to evaluate sensory attributes and the consumers' preferences. *Reviews in Aquaculture*, 12(2) :805–821.
- Cho, C. Y., Slinger, S. J., and Bayley, H. S. (1976). Influence of level and type of dietary protein, and of level of feeding on feed utilization by rainbow trout. *The Journal of Nutrition*, 106(11) :1547–1556.
- Deschamps, M., Poirier Stewart, N., Demanche, A., and Vandenberg, G. W. (2014). Preliminary study for phenotypic description of vertebral abnormalities in triploid trout subjected to prolonged deficiency in phosphorus. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :833–839.
- Gjerde, B. and Martens, H. (1987). Predicting carcass composition of rainbow trout by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 100 :137–148.

- Hancz, C. Milisits, G. and Horn, P. (2003). *In vivo* measurement of total body lipid content of common carp (*Cyprinus carpio* l.) by electrical conductivity. *Archives Animal Breeding*, 46(4) :397–402.
- Herbinger, C. and Friars, G. (1991). Correlation between condition factor and total lipid content in atlantic salmon, *salmo salar* l., parr. *Aquaculture Research*, 22(4) :527–529.
- Jahan, P. (1999). Reduction of environmental phosphorus loading from carp culture. Mastersthesis, Tokyo University of fisheries, Japan. 62 pp.
- Jebb, S. A. (1997). Measurement of soft tissue composition by dual energy x-ray absorptiometry. *British Journal of Nutrition*, 77(2) :151–163.
- Johansson, L., Kiessling, A., Kiessling, K.-H., and Berglund, L. (2000). Effects of altered ration levels on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Quality and Preference*, 11(3) :247–254.
- Johnson, M. S., Watts, R. J., Hammer, H. S., Nagy, T. R., and Watts, S. A. (2017). Validation of dual-energy x-ray absorptiometry to predict body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(1) :122–131.
- Kerr, B. J., Southern, L. L., Bidner, T. D., Friesen, K. G., and Easter, R. A. (2003). Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *Journal of Animal Science*, 81(12) :3075–3087.
- Koko, K. D. G. (2007). Une stratégie nutritionnelle de réduction du phosphore (p) dans les effluents aquacoles : l'alimentation en phase des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avec alternances d'un régime carencé et d'un régime équilibré en phosphore. Master's thesis, Université Laval, Québec, Canada.
- Kora, H., Tsuchimoto, M., Miyata, K., Osato, S., Wang, Q., Apablaza, P. A. G., Mishima, T., and Tachibana, K. (2000). Estimation of body fat content from standard body length and body weight on cultured red sea bream. *Fisheries Science*, 66(2) :365–371.
- Le Luyer, J., Deschamps, M., Proulx, E., Poirier Stewart, N., Robert, C., and Vandenberg, G. (2014). Responses of different body compartments to acute dietary phosphorus deficiency in juvenile triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :825–832.
- Létourneau-Montminy, M., Couture, C., Cloutier, L., Marcoux, M., Pomar, C., et al. (2017). Revision of the simplified balance method to evaluate phosphorus excretion by canadian fattening pig farms. *Journées de la Recherche Porcine en France*, 49 :263–264.
- Létourneau-Montminy, M., Narcy, A., Lescoat, P., Magnin, M., Bernier, J., Sauvante, D., Jondreville, C., and Pomar, C. (2011). Modeling the fate of dietary phosphorus in the digestive tract of growing pigs. *Journal of Animal Science*, 89(11) :3596–3611.

- Lovett, B. A., Firth, E. C., Plank, L. D., Symonds, J. E., Preece, M. A., and Herbert, N. A. (2019). Investigating a relationship between body composition and spinal curvature in farmed adult new zealand king salmon (a) : A novel application of dual-energy x-ray absorptiometry. *Aquaculture*, 502 :48–55.
- Lu, P., Briody, J., Howman-Giles, R., Trube, A., and Cowell, C. (1994). Dxa for bone density measurement in small rats weighing 150–250 grams. *Bone*, 15(2) :199–202.
- Mercier, J., Pomar, C., Marcoux, M., Goulet, F., Thériault, M., and Castonguay, F. (2006). The use of dual-energy x-ray absorptiometry to estimate the dissected composition of lamb carcasses. *Meat Science*, 73(2) :249–257.
- Mitchell, A., Rosebrough, R., and Conway, J. (1997a). Body composition analysis of chickens by dual energy x-ray absorptiometry. *Poultry Science*, 76(12) :1746–1752.
- Mitchell, A., Scholz, A., and Conway, J. (1998). Body composition analysis of small pigs by dual-energy x-ray absorptiometry. *Journal of Animal Science*, 76(9) :2392–2398.
- Mitchell, A. D., Solomon, M. B., and Rumsey, T. S. (1997b). Composition analysis of beef rib sections by dual-energy x-ray absorptiometry. *Meat Science*, 47(1-2) :115–124.
- Mørkøre, T., Vallet, J. L., Cardinal, M., Gomez-Guillen, M. C., Montero, P., Torrissen, O. J., Nortvedt, R., Sigurgisladottir, S., and Thomassen, M. S. (2001). Fat content and fillet shape of atlantic salmon : relevance for processing yield and quality of raw and smoked products. *Journal of food science*, 66(9) :1348–1354.
- Nagy, T. R. and Clair, A.-L. (2000). Precision and accuracy of dual-energy x-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obesity Research*, 8(5) :392–398.
- Naumann, K. and Bassler, R. (1976). *chemische Untersuchung von Futtermitteln*. In : The Chemical Analysis of Feed :Neumann-Neudamm, Germany, 24 chapters.
- NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academy Press, Washington, DC.
- Olfert, E. D., Cross, B. M., and McWilliam, A. A. (1993). *Guide to the care and use of experimental animals*. Canadian Council on Animal Care Ottawa, Ontario, Canada.
- Pomar, C. and Rivest, J. (1996). The effect of body position and data analysis on the estimation of body composition of pigs by dual energy x-ray absorptiometry (dexa). In *Proceedings of the 46th Annual Conference of the Canadian Society of Animal Science, Lethbridge, AB, Canada*, page 26.
- Quillet, E., Le Guillou, S., Aubin, J., and Fauconneau, B. (2005). Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 245(1-4) :49–61.

- Rose, B. S., Flatt, W. P., Martin, R. J., and Lewis, R. D. (1998). Whole body composition of rats determined by dual energy x-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *The Journal of Nutrition*, 128(2) :246–250.
- Ruetsche, A. G., Lippuner, K., Jaeger, P., and Casez, J.-P. (2000). Differences between dual x-ray absorptiometry using pencil beam and fan beam modes and their determinants in vivo and in vitro. *Journal of Clinical Densitometry*, 3(2) :157–166.
- Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., and Vandenberg, G. W. (2011). Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3) :241–249.
- Satoh, S., Hernández, A., Tokoro, T., Morishita, Y., Kiron, V., and Watanabe, T. (2003). Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fish meal based diet. *Aquaculture*, 224(1-4) :271–282.
- Scholz, A. M., Mitchell, A. D., Förster, M., and Pursel, V. G. (2007). Two-site evaluation of the relationship between in vivo and carcass dual energy x-ray absorptiometry (dxa) in pigs. *Livestock Science*, 110(1-2) :1–11.
- Shim, M. Y., Karnuah, A. B., Mitchell, A. D., Anthony, N. B., Pesti, G. M., and Aggrey, S. E. (2012). The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. *Poultry Science*, 91(8) :1790–1795.
- Soladoye, O. P., Campos, O. L., Aalhus, J. L., Gariépy, C., Shand, P., and Juárez, M. (2016). Accuracy of dual energy x-ray absorptiometry (dxa) in assessing carcass composition from different pig populations. *Meat Science*, 121 :310–316.
- St-Pierre, N. (2001). Invited review : Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of Dairy Science*, 84(4) :741–755.
- Svendsen, O. L., Haarbo, J., Hassager, C., and Christiansen, C. (1993). Accuracy of measurements of body composition by dual-energy x-ray absorptiometry in vivo. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5) :605–608.
- Theil, H. (1966). Applied economic forecasting. *Studies in Mathematical and Managerial Economics, North-Holland, Amsterdam, the Netherlands*.
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., and Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 146(3) :395–401.
- Watanabe, T., Jahan, P., Satoh, S., and Kiron, V. (1999). Total phosphorus loading onto the water environment from common carp fed commercial diets. *Fisheries Science*, 65(5) :712–716.

- Watanabe, T., Takeuchi, T., Satoh, S., Ida, T., and Yaguchi, M. (1987). Development of low protein-high energy diets for practical carp culture with special reference to reduction of total nitrogen excretion. In *Nippon Suisan Gakkaishi*, volume 53 of 8, page 10.
- Wood, S. E. (2004). *The effectiveness of dual energy X-ray absorptiometry to non-invasively determine body composition of hybrid striped bass*. PhD thesis, University of maryland, USA.
- Yang, S.-D., Liou, C.-H., and Liu, F.-G. (2002). Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 213(1-4) :363–372.

3.9 Appendix

TABLE 3.5 – DXA whole-body estimates of body mass, fat mass, BMC, lean mass (mean \pm sd) for three sampling times (0 wk, 4 wk, 9 wk; n=54) of frozen and thawed fish carcasses.

Condition	Frozen (F)			Thawed (t)			Statistics (P-value)	
	0 wk	4 wk	9 wk	0 wk	4 wk	9 wk	F/t	Time (T)
Body mass (g)	52.0 \pm 11	82.2 \pm 15	109.5 \pm 15	51.0 \pm 11	81.3 \pm 15	106.3 \pm 14	0.28	< 0.001 ***
Fat mass(g)	9.2 \pm 4.1	11.3 \pm	19.4 \pm 5	8.1 \pm 4.1	9.0 \pm 5.1	11.5 \pm 4	0.001 **	< 0.001 ***
BMC (g)	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	1.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	0.065	< 0.001 ***
Lean (g)	42.2 \pm 8.1	70 \pm 15.0	86 \pm 11.0	44.3 \pm 8.1	70.1 \pm 15.0	90 \pm 11.0	0.555	< 0.001 ***
								F/t x T
								0.936
								0.001 **
								0.557
								0.895

Chapitre 4

Phosphorus-mediated mechanisms of brachial plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under chronic Pi-dietary restriction

Author Contributions : 1-GVW, MPLM, WN : conceptualize the work ; 2-WN, MPLM and GVW : re-dact the paper ; 3- WN : conduct laboratory analysis, 4-WN, MPLM, MHD : analyse and interpret the data, 5-WN and MHD : lead experiments in the water tank, 6-WN : perform WB and IHC analysis. ¹

"Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien, tandis que les autres croient savoir ce qu'ils ne savent pas." Socrate

1. Ce chapitre est présenté sous forme d'article en préparation en vue de publication dans la revue Journal of experimental biology.

Phosphorus-mediated mechanisms of brachial plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under chronic Pi-dietary restriction

Waly N. NDIAYE^{1,2}, Marie-Hélène DESCHAMPS¹, Marie-Pierre LETOURNEAU-MONTMINY¹, Grant W. VANDENBERG¹.

¹Département des sciences animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425 Rue de l'Université Québec, QC, G1V0A6.

⁴Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT), Pôles de Recherches de Hann, Route du Front de Terre, BP : 2241, Dakar, Sénégal.

Running title : P-deficient trout plasticity

*Corresponding Author : Grant W. Vandenberg,

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,

Département des sciences animales,

Université Laval,

2425 rue de l'Agriculture,

Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

Tel : + 1(418) 656-2131 (ext. 6541).

E-mail address : Grant.Vandenberg@fsaa.ulaval.ca

4.1 Résumé

Une restriction alimentaire en phosphore (P) dite chronique puisque induite pendant 14 semaines a été menée en circuit ouvert et fermé simultanément. Un régime pauvre en P ($P = 0,55\%$) a été utilisé. Les truites arc-en-ciel ($50 \pm 10\text{g}$) ont été comparées à un groupe témoin nourri avec une alimentation riche en phosphore ($P = 1,00\%$). Deux essais d'accumulation de P dans les bassins aux semaines 11 et 14 semaines ont été réalisés. Les résultats ont montré que lorsque la quantité de P soluble augmentait ($1,00$ à $2,58 \text{ mg/L}$) dans les bassins au début de l'essai d'accumulation, une diminution de cette teneur en ions dans les bassins était obtenue uniquement chez les poissons déficients élevés dans le circuit fermé. Ce résultat indique une absorption externe de P_i par les poissons chroniquement restreints par leur régime alimentaire. Cette absorption de P_i a été estimée à $0,122 \text{ mg de P/heure/kg de biomasse}$. Elle est corrélée à une plus grande présence de transports des ions $\text{NaP}_i\text{-II}$ dans les branchies

4.2 Abstract

A 14-week (wk) feeding trial employing P-deficient and sufficient diets was conducted in flow-through (open) and recirculating (closed) culture systems to quantify the inorganic phosphorus (Pi) uptake by trout and examine possible uptake mechanisms in the gill. A practical, low-P diet (P-deficient = 0.29 digestible P) was used to induce P deficiency; control groups of fish were fed with a P-sufficient diet (0.45 digestible P). Following confirmation of clinical P-deficiency symptoms a 12-h post-prandial accumulation of non-fecal Pi was performed at 11 wk to assess the capacity of fish to absorb Pi; the results demonstrated no evidence of Pi absorption in fish fed the P-deficient diet. Following this sampling event, the ambient Pi concentrations were increased in the closed unit from 1.00 to 2.50 mg/L by the addition of Pi (KH_2PO_4). At week 14, the 12-h post-prandial accumulation of non-fecal Pi demonstrated a significant decrease on Pi in tank water which was only present in tanks of fish fed with P-deficient diet. These results indicate an external uptake of Pi by fish following chronic dietary Pi-restriction. The Pi uptake was estimated at 0.122 mg of P/hour/kg of biomass. Using immunohistochemistry and western blot analysis, protein quantification we showed that this external Pi uptake was correlated with elevated levels of a sodium phosphate (NaPi-II) transporter in the gill. These findings tend to validate our assumptions that in water having high Pi background, fish chronically restricted by this element can develop the ability to accumulate an appreciable amount of external Pi across their gills.

Keywords : Gill, ion transport, Pi-deficiency, NaPi-II, Trout

4.3 Introduction

Phosphorus is a key element involved in many critical biological processes, including reproduction, growth, and development and is also a crucial structural component for many all organisms. As an essential nutrient for animals, P is derived from dietary sources. Whole-body P homeostasis is assured by transporters within intestinal and kidney epithelial and depends on a balance of intestinal absorption and renal excretion and the needs for soft tissues and bone growth (Sugiura et al., 2000). Over the past 20 years, a number of several cDNA encoding Na-dependent P transporters (NaPi cotransporters) have been identified and classified as either type I, type II, and type Type III based on sequence homology (Werner and Kinne, 2001).

The type II-NaPi cotransporter proteins are particularly interesting as they are involved in regulating both intestinal Pi absorption and renal Pi resorption (Werner and Kinne, 2001; Werner et al., 1998). In mammals, the type II-NaPi cotransporter is further subdivided into types IIa and IIb based on structure, tissue distribution, and pH dependency (Hilfiker et al., 1998; Werner and Kinne, 2001). The type IIa Na-Pi cotransporter is primarily expressed in the apical membranes in renal proximal tubules (Feild et al., 1999; Magagnin et al., 1993) and is the primary renal NaPi cotransporter. In the brush-border membranes of the small intestinal epithelium, the type IIb cotransporter is the major NaPi cotransporter (Hilfiker et al., 1998). Interestingly, the type IIb cotransporter is also expressed in human lung and secretory tissues (Feild et al., 1999).

Mechanisms of P intestinal absorption in fish species have been reported and it occurs in a similar fashion as in higher vertebrates (Sugiura and Ferraris, 2004). The pyloric caeca are the principal sites of P absorption, with 89% of total Pi absorption occurring in this GI tract part; the transport of Pi on the apical side of pyloric caeca involves components of passive diffusion (92%) and NaPi-II transporters (8%) (Sugiura and Ferraris, 2004).

In mammals, the NaPi type IIb (NaPi-IIb) is responsible for intestinal absorption of P and cotransporter type IIa (NaPi-IIa) is involved in renal P reabsorption (Nalbant et al., 1999). In fish, cotransporters NaPi type II genes homologous to mammalian NaPi type IIb have been identified and cloned in several species of teleosts. These NaPi-II transporters are known to be involved in P uptake in the intestine and renal reabsorption. Zebrafish intestine and kidney have two closely related NaPi-IIb isoforms, known as NaPi-IIb1 and NaPi-IIb2, respectively (Graham et al., 2003; Nalbant et al., 1999). In rainbow trout, dietary P restriction increases intestinal Pi uptake due to a number of molecular mechanisms regulating Pi transport through three isoforms : NaPi-IIb and NaPi-IIb1 in the intestine, and NaPi-IIb2 in the kidney (Coloso et al., 2003; Sugiura et al., 2003). The nucleotide sequence of the mRNA cotransporter isolated from pyloric caeca of trout is different from NaPi cotransporters sequenced previously from other animals; this cotransporter exhibited 92% homology with trout intestinal NaPi-IIb1 and 67% homology with renal NaPi-IIb2 from trout (Sugiura and Ferraris, 2004).

Several studies have demonstrating the impact of dietary P on the regulation of Pi absorption *in vivo* in trout; these responses have been mediated through the expression of genes for NaPi (Sugiura et al.,

2003; Coloso et al., 2003). Rainbow trout with fed low-P diets demonstrated an increase in the abundance of NaPi-II mRNA and Pi-Uptake Stimulator (PiUS) in the intestine and kidney. The abundance of mRNA for NaPi-II transporters in the kidney and pyloric caeca in trout fed low-P diets was altered as early as 5 days following the onset of P restriction (Sugiura and Ferraris, 2004). It has been demonstrated that gene expression involving key metabolic pathways were highly impacted by prolonged P deficiency, though there was no change in the expression of NaPi-II in the kidney in chronically P-deprived rainbow trout (Lake et al., 2010). Taken together, the above work demonstrates that despite anatomical differences between fish and higher vertebral species, there exist numerous commonalities regarding the importance of NaPi cotransporters in maintaining P homeostasis, as well as the impact of P status on their regulation.

Due to low P concentrations in natural waters and P uptake mechanisms from the gill that have been purported to be inefficient or non-existent, it has been assumed that brachial uptake of P is inconsequential (Sugiura et al., 2003; Verri and Werner, 2019). There is, however, a growing body of evidence demonstrating the dynamic nature of gill tissue and its plasticity in the face of a changing environmental conditions (Nilsson, 2007). Indeed, changing a range of abiotic factors (e.g. oxygen, temperature) results in considerable adaptive remodelling of brachial tissue (Mitrovic and Perry, 2009; Mitrovic et al., 2009; Tzaneva et al., 2011; Smith et al., 2012). A renewed appreciation of brachial tissue plasticity has come about in part due to the growing availability of genomic tools permitting wide-spectrum transcriptomic analyses (Wright and Wood, 2009) to better understand this phenomenon.

Using TrIib2 polyclonal rabbit antibody (EDAPPELLKVITEPVT, corresponding to the E62-T72 of trout kidney NaPi, accession n : AAG35800) linked to keyhole limpet hemocyanin (KLH), Sugiura et al. (2003) immunolocalized the NaPi-IIb in trout gill. Tools to design and harness polyclonal antibody of protein of interest were developed to assess their expression according to change of environmental ions concentration McCormick et al. (2009, 2013). Thus the objective of this study was to associate soluble P accumulation in water tanks after feeding (Sarker et al., 2011), and immunolocalization of NaPi-II cotransporters according to McCormick et al. (2009, 2013) to evaluate the ability to absorb soluble P from the gill of the juvenile trout (50 g) chronically fed with low-P diet and reared in high-level Pi water.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Experimental diets

A feeding experiment was carried out employing two practical, experimental diets formulated according to the National Research Council recommendations for rainbow trout (NRC, 2011). The experiment was designed using two diets (varying in P levels : P-sufficient diet (P-S) and P-deficient (P-D)) containing different levels of total P (1.00% and 0.55% of dietary P, respectively). The ingredients were thoroughly mixed, and steam pelleted using a California Pellet Mill (*Model CPM CL-5, California Laboratory Pellet Mill, Crawfordsville, IN, USA*) equipped with a 3 mm diameter. Pellets

were dried in a forced-air oven (45°C, 24 h), sieved and stored at - 20°C until feeding (Table 1).

TABLE 4.1 – Ingredients (g/kg) and proximate composition (g/kg dry-weight basis) of the test diets in experiment

Ingredients	Diets	
	P-deficient (P-D)	P-sufficient (P-S)
Herring meal ^a	75	75
Blood meal ^f	100	100
Faether meal ^f	100	100
Wheat meal ^c	202	177
Soybean meal ^b	80	80
Wheat gluten ^c	70	70
Corn gluten meal ^c	170	170
Fish oil ^a	180	180
CaHPO ₄ ^g (source of Pi)	0	25
*Vitamin and mineral mix ^d	10	10
Lysine ^e	0.012	0.012
DL-methionin ^e	0.002	0.002
Stay ^{c,d}	0.15	0.15
Choline ^d	0.1	0.1
Sipernat 50 ²	10	10
Proximate composition (% dry basis)		
Dry matter	95.6	95
Crude protein	49.9	49.1
Crude lipid	15.8	16.3
Ash	4.3	6.5
Energy (E. MJ/kg)	23.7	23.3
Total P	0.55	1.01
Digestible P	0.29	0.45

NOTES : ¹Chemical analysis was conducted in triplicate for each diet (treatments, n = 3 samples per diet).² Sipernat 50TM = silicon dioxide marker, a source of insoluble acid ash comprised of 98.50% SiO₂ with an average particle size of 50 μm. P = phosphorus; E = Energy.

North American supplier : ^aComeau's sea food LTD; ^bMeunier Gérard Soucy Inc. 926 route Laurier. Sainte-Croix. QC. G0S 2H0; ^cColabor. 820 rue St-Alphonse Desrochers. Lévis. Qc. G7A 5H9; ^dDyets. Inc. 2508 Easton Avenue. Bethlehem. PA 18017. Bethlehem. PA 18017; ^eADM Alliance Nutrition Canada. St-Hyacinthe. QC; ^fSANIMAX Marketing Limited. Guelph, ON; ^gLaboratoire Mat Inc., Quebec, QC.

*Supplied the following : (to provide mg/kg except when noted) : vitamin mix = thiamin HCl, 2; riboflavin, 3; pyridoxine HCl, 0.6; niacin, 1; calcium Pantothenate, 4; folic Acid, 0.2; biotin (1mg/g), 4, vitamin B12 (0.1%), 10; vitamin A Palmitate, (250,000 IU/g) 2; vitamin D3 (400,000 IU/g), 1.5; vitamin E Acetate (500 IU/g), 29.8; menadione Sodium bisulfite (62.3% Menadione), 3.2; t-BHQ, 0.03, Dextrose, 938.66; mineral mix = potassium iodide (76%I), 2.63; ferrous sulfate 7H₂O (20%Fe), 50; manganese sulfate H₂O (32.5% Mn), 24.6; zinc sulfate H₂O (36.44%Zn), 37.48; cupric sulfate 5H₂O (25%Cu), 8; sodium selenite (45.6%Se), 0.35; cobalt chloride 6H₂O (24.77%Co), 0.085; dextrose, 876.855.

Each mix was added at 5 g/kg of diet.

4.4.2 Husbandry

All-female, triploid rainbow trout from a local fish farm *Pisciculture des Monts de Bellechasse Saint-Damien-de-Buckland, Canada*) were used for the experiments. Fish ($n=700$; 50 ± 10 g : mean \pm sd) were distributed among 12 grey semi-square tanks (150 L; density of 20-25 kg/m³). Tanks were divided among two freshwater culture systems : partial recirculation (20% ; unit = open) and full recirculation (98% ; unit = closed) at the '*Laboratoire de Recherche des Sciences Aquatiques*' (LARSA) at Université Laval in Québec (Canada). Each diet was used to feed three replicate tanks in each unit. Water temperature is held at $10 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ during the experiment. Before the start of the experiment, fish were acclimated for two weeks and fed with the P-sufficient diet (control diet). Fish were fed twice daily (8 :00 AM and 3 :00 PM) by hand - to apparent satiation on two consecutive days. The quantities of feed consumed were compiled, and the average daily feed consumption was calculated for each tank. On subsequent days, fish were fed at 80% of this average using belt feeders. Fish were not fed one day/week during system cleaning and maintenance. The experiment complied with the guidelines of the *Canadian Council on Animal Care* (Olfert et al., 1993) and approved by *Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval* (CPAUL 2019).

Growth performance was evaluated according to average of feed conversion ratio (FCR), standard growth rate (SGR) and thermal-unit growth coefficient (TGC), as follows :

- $\text{FCR} = [\text{Feed intake} / (\text{final weight} - \text{initial weight})]$
- $\text{SGR} = 100 \times [\ln(\text{final weight}) - \ln(\text{initial weight})] / \text{days}$
- $\text{TGC} = 100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3}) / \text{sum of daily water temperature}$

4.4.3 Fish and tissue collection

Six fish per tank were sampled at 5 (0, 2, 4, 8, 14 wk) times. Fish were euthanized by immersion in an overdose (150 mg/L) solution of tricaine methanesulfonate (*MS-222, Syndel International Inc., Vancouver, BC, Canada*). Three fish per tank were used to evaluate mineral status. For this, scales were scraped from tail to head and stored in 70% ethanol; the carcasses were stored at -30°C until further processing.

4.4.4 Fish and tissue collection

Scales and carcasses were used as indicators of mineralization status (Le Luyer et al., 2014). Carcasses were autoclaved, homogenized, then freeze-dried, and the whole-body sample was ground using a 1mm screen. Scales were dehydrated in a graded series of ethanol (70, 90, 100% ; 24 h /bath), delipidated in acetone (two baths of 24 h), then in trichloroethylene (two baths of 24). Whole-body and scales were analyzed for dry matter (drying in a vacuum oven for 18 h at 105°C) and ash (incinerating in a muffle furnace for 18 h at 550°C) according to AOAC guidelines (AOAC, 1990). Phosphorus content was determined using an inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-

AES) method following ash digestion in nitric acid (18 mL of HCl 50% + 3 drops of nitric acid) solution.

4.4.5 Pi accumulation trials

To validate P status and evaluate the ability of fish to absorb ambient phosphorus, fish were subjected to a 12-hour post-prandial P accumulation studies. This trial was first performed once clinical P deficiency has been established (after 4 wk feeding) for fish fed with a low-P diet based on scales ash content. Prior to the initiation of P accumulation, fish were fasting 24 h. Then the trout were fed to apparent satiation by hand, and care was taken to ensure all feed was consumed. Tanks were then thoroughly cleaned and purged immediately after feeding to evacuate any feces. Water flow was stopped to allow excreted inorganic P (Pi) to accumulate for 12 h; no external water was supplied to the tank during this period. During the sampling day, water pH was maintained between 6.0 and 6.5 by the addition of acetic acid to counter the effects of accumulating ammonia; constant aeration allows maintaining water oxygen concentrations between 10 and 12 mg/L.

To determine the soluble P concentrations accumulated in the tank water, filtered (0.45 μm *EMD Millipore Millex® filter, Millipore Sigma, Burlington, MA, USA*) water samples were collected using a disposable 15 mL centrifuge tube (*Falcon®, Becton, Dickinson, Drive Franklin Lakes, NJ, USA*). Samples were stored at 4 °C until analyzed for soluble P within 24h post collection. In each unit, 3 additional tanks without fish were included as controls. In each unit, 3 additional tanks without fish were included as controls. Two P accumulation trials were carried out at 11 wk and 14 wk. Between 7-11 wk and 11-14 wk P daily, ambient Pi concentrations in the systems was monitored. It was around 0.5 mg/L and 0.2 mg/L for the closed and the open unit, respectively (Table 4.4). At the end of 11 wk, a P accumulation trial was carried out. Immediately following this trial, ambient Pi in closed unit was increased to 4-5 mg/L for 2 wk by the addition of KH_2PO_4 in the inflow tank. Three days prior to the last Pi accumulation trial (14 wk), the water rich in P in the closed unit was replaced by allowed to equilibrate prior to the final P-accumulation trial.

4.4.6 NaPi-II antibodies design

Peptide synthesis and chicken antibody production NaPi-II (B1433 and B1434) were contracted to GeneTel Laboratories (Madison, WI, USA). Isoform-specific antibodies against NaPi-II were generated against one complete and two partial protein sequence data provided by Berthelot et al. (2014), Sugiura and Ferraris (2004) and Werner and Kinne (2001) respectively from trout. This protein sequence was compared with those used by Werner et al. (2002) as reported in Graham et al. (2003) from the zebrafish kidney in National Center for Biotechnology Information website (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). The peptide sequences NH₂-CLTRDNEPLEAPKETVKATQL-COOH (B1433) and NH₂-CQKTEDEEKGGKERKKSQE-COOH (B1434) were selected (Figure 4.1). Peptides and antibodies were synthesized and purified according to the methods described by McCormick et al. (2009).

```

Berthelot      MKSIPHHQAASPHTEATSTHNYPNLTDGAKAPKDSVVLPAYSTMDLVDKDFDEDDFWNL
Sugiura       -----
Werner2       -----MAPRPPKHEHESDEKQPETLDGARKKSLSMAPAVSTAALIE-----DDFWEM
Werner1       -----

Berthelot      PELQDTGLKWESELDAGKGVMRVLTISIVKFIILLVGFLYMFCVSLDVLSSAFQLVGGKAAGD
Sugiura       -----AGD
Werner2       MELQDTGVRWADLDTKRVLRVFTAAKLIIMLLGLLYMFCVSLDVLSSAFQLVGGKAAGD
Werner1       -----

Berthelot      IFQDNAVLSNPFVAGLVIGLVLTIVLQSSSTSSIVVSMVSSGLEEVQSAVFMVIMGANIGT
Sugiura       IFQDNAALSFPVAGLVIGALVTLVQSSSTSSIVVSMVSSGLEEVQSAVFMVIMGANIGT
Werner2       IFQENKVLNPLAGLVIGMLVTLVQSSSTSSIVVSMVSSGMLEVATAVPIIMSTNIGT
Werner1       -----

Berthelot      SVTNTIVAMMQAGDRNEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLIIPLLEAATGVLYKLTIKVIDSF
Sugiura       SVTNTIVAMMQAGDRNEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLIIPLLEAATGVLYKLTIKIIDSF
Werner2       SVNTLVVAIQVQDRNKFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPLEVASGYLEKVTSLIVRSF
Werner1       ---TIVAMMQAGERNDKRAFAGATIHDCFNWLSVLVLLPMEVATGLMTHLAHIVVTF
*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Berthelot      NIQGGNAPDLLNVITDPLTSAIIELDKTVISDIATGDPAAARNKSLIKIKCKTENITLL
Sugiura       NIQGGNAPDLLNVITDPLTDAIIELDKRVISDIATGDPAAARNKSLIKIKCKTEKITTIV
Werner2       NIESGKAPALLNVITDPLTHSIIQLDESVMGIAVGDPEARNKSLIKIKVCHTASNTVQ
Werner1       NIQTGEDAPELLKVITEPVTKLIIQLDRQVITGIAMGDERMNRSLVKKWCHTGLVTSMS
*:*:* *:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Berthelot      NITVPSAANCTIGVPCWVEGNKTIQINVTETINLERCNHIFAYANLPDLAVGLLILLALS
Sugiura       NITVPSDANCTIGALCWVEGNKTIQINVTETINLERCNHIFVANLPDLAVGLLILLALS
Werner2       NVITTTNCT-----DLCWELKGVTEIINIKKCSHIFVNTSLSDLAVGLLILLAGS
Werner1       NISIFGSYNCSAHLCLQEGDITWITQNLPSSEVNIQKCRHLFADAHLSDLTIVGLILLAGS
*:*:* .. : *.. :*:*:* *:*:* *:*:*:*:*:*

Berthelot      LLILCTCLILIVKLLNSMLRGQVAVVIRKVLNTDFPPFGWVITGYIALLVAGMTFIVQS
Sugiura       LLILCTCLILIAKLLNSMLRGQVAVVIRKVLNTDFPPFGWVITGYIAIMVAGMTFIVQS
Werner2       LLILCTCLICIVKLLNSMLRGQVAVVIRKIVNTDFPPFFAMLTGYIALLVAGMTFIVQS
Werner1       LALLCTCLVIVKLLNSLQGVAKVIQVINTDLPYFFGWLGYLAFVAGMTFVVVQS
*:*:*:*:*: :*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Berthelot      SSVFTSAITPLVIGVISLERAYPLTIGSNIGTTTTAILAAMAAPGETLANSQIALCHF
Sugiura       SSVFTSAITPLVIGVISLERAYPLTIGSNIGTTTTAILAAMAAPGETLANSQIALCHF
Werner2       SSVFTSAITPLVIGVISIERAYPLSLGSNIGTTTTAILAAMASPGETLANSQIALVHF
Werner1       SSVFTSALPTLIGVISLERAYPLTIGSNIGTTTTALLAALASPGDKLAAAIQ-----
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Berthelot      FFNIAGILLWYPIPTRIPIRLARALGNRTANYRWFAAYVLLCCFFLPLTILGLSLAGW
Sugiura       -----
Werner2       FFNLGILLWYPIPTRIPIRLAKGLGETTAQYRWFAAFYIILCFFGLPLLVLGSLMAGW
Werner1       -----

Berthelot      QALVGVAVPIIVLAIFIIIVNLMQTRCPRYLP SRLRNWDFLPRPLMSMAPWDGVIMSGMA
Sugiura       -----
Werner2       QVLMGVLPVPIAVILIFAIIVNIIQKHKPCWLP SALRSWDFLPLWAHSLDPWDRVVTVIAA
Werner1       -----

Berthelot      FCGTRCCOCCCKQPTDEERGGKRRKRSQMYDNPSLRDREPLEAPRETVKATQ
Sugiura       -----
Werner2       RCCCCCKCCNSNEEDEKAKLENLANGIEINDNTMTTVELEERKTVDSCEILGATSL
Werner1       -----

```

FIGURE 4.1 – Clustal alignment of NaPi-II amino acid sequences. Sequences from trout (complete from Berthelot, partial from Sugiura and Werner (1)) and from Zebrafish (Werner2) were aligned with clustalW analysis program (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) in order to validate the similitude of epitope selected (highlighted in red) compared to those from focused work done by Werner2 (highlighted in green). Highlighted in blue, the epitopes previously used by Sugiura et al. (2003) to immunolocalized the NaPi-II in trout gill cells.

4.4.7 Western blots (WB)

Gill tissue proteins were isolated in 10 volumes of complete RIPA lysis and extraction Buffer (*Thermo Fisher, Rockford, IL, USA*). Homogenates were centrifuged at 5000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was used for subsequent manipulation. Samples protein concentrations were determined using the Protein Assay (*Thermo fisher Pierce Coomassie Plus Protein Assay, Rockford, IL, USA*)

with bovine serum albumin as a standard. Samples were then placed in an equal volume of structural cleavage of protein solution, 2X and 4X Laemmli buffer (*Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, Ontario, CA; catalog # 161-0737*), and heated for 1 min at 95°C and stored at room temperature. Samples were run on a 7.5% Mini-ProteanTXG® gel at 45 mg protein per lane. Precision Plus proteinTM standards dual color in a single reference lane (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*) were run to identify NaPi-II based in his molecular weight (NCBI accession # : CDQ73248-1). Following electrophoresis (200V for 1 h), proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) at 400mA for 1 h in 25 mmol/L Tris and 152 mmol/L glycine buffer, pH 8.3. The PVDF membranes were blocked in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (T-TBS) and 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature, rinsed in T-TBS and exposed to the primary antibody (1/500) in T-TBS and 3% non-fat dry milk for 2 h at room temperature. After rinsing in PBST blots were exposed to rabbit anti-Chicken IgY HRP conjugated diluted 1/10,000 in antibody dilution buffer, for 1 h at room temperature. After rinsing in PBST, PVDF was incubated for 1 min enhanced chemiluminescent solution (1 mL) Bio-rad ClarityTM Western ECL substrate according to instructions, then exposed to X-ray film (*MBI Fusion FX7, IL, USA*). Images were obtained using a Fusion FX7 reader from Vilber-Lourmat Lab Equipment (*Montreal Biotech Inc., Dorval, CA*) with Fusion software and band staining intensity measured using ImageJ (*NIH, Bethesda, MD, USA*); protein abundance is expressed as a cumulative 8-bit grayscale value. We previously evaluated the relationship of western blot quantification by four loading protein levels of 6.2, 12.5, 25, and 50 µg of purified (86.43%) NaPi-II protein and found a strong polynomial relationship ($R^2 = 0.99$).

4.4.8 Immunohistochemistry (IHC)

Gill tissue comprising of approximately 5-8 pairs of filaments were dissected, and the gill arch was removed. Tissues were rinsed with PBS for 30 min and placed into PBS containing 30% (w :v) sucrose. Tissues were embedded in Leica Surgipath OCT Compound (*Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA*) and stored at -80 °C. Embedded tissues were cut (6µm) with a cryostat (ThermoShandon, The Lan Word Group, Boston, MA, USA) at -24 °C, parallel to the long axis of primary filaments, and perpendicular to the attachment of secondary lamellae. The tissue was placed on Fisherbrand Colorfrost/Plus slides (*Fisher Scientific, Hampton, NH, USA*), dried (24 h at room temperature), rinsed with PBS (immersion for 10 min in PBS, with agitation) and then incubated successively in 0.1% (w :v) Sudan Dye Solution (C₂₉H₂₄N₆, *SPI-Chem inc., West Chester, PA, USA*) and a 5% non-fat dry milk solution for 30 min at room temperature. Tissues were exposed to NaPi-II primary antibody (B1433, 0.6 mg/mL and B1433, 1.1 mg/mL at 1/500) in antibody dilution buffer (0.01% NaN₃, 0.1% BSA, 2% normal goat serum and 0.02% keyhole limpet hemocyanin in PBS) and incubated 2h at 4°C. The slides were rinsed fives times with PBS and exposed to the secondary antibody (Alexa FluorTM488 goat anti-chicken IgG, at 1/10000 mg/mL) for 2 h at room temperature. After incubation, the slides were rinsed fives times with PBS, covered by a coverslip and examined with a Nikon Eclipse E600 inverted fluorescence (465-495) microscope with a mercury lamp : A) first, the image of the gill was taken without and with green filter 465-495nm, B) this last image was transformed in 16 bit-image

RGB with the green look using the “LUT” command of ImageJ, C) the threshold was adjusted to 1925, corresponding to the threshold that the pixels from the slides control (antibody minus fluorophore) started to light up in green, D) the images without green filter and resulting to step C were merged to highlighted NaPi-positive immunoreactive cells (complex between NaPi-II, antibodies, and Alexa Fluor IgG, Figure 4.2).

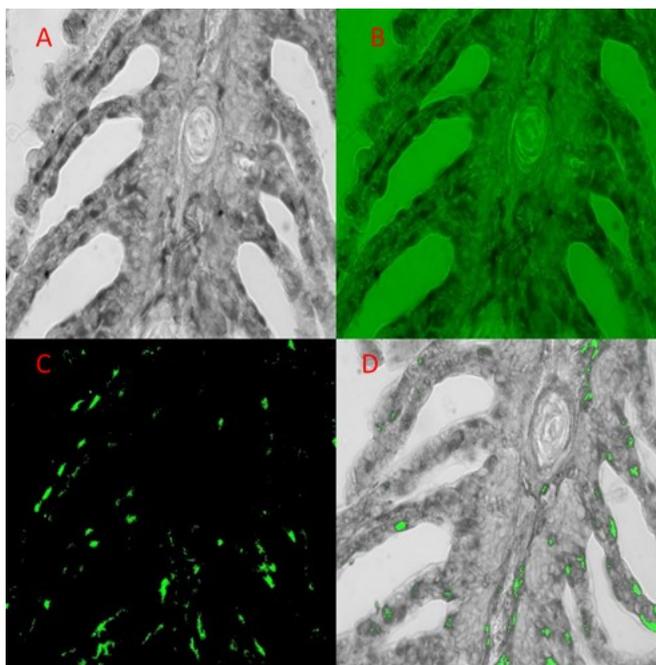


FIGURE 4.2 – Stacked image with ImageJ showed the procedure to use for labeling the intensity of NaPi-II. A = image of the gill was taken without green filter 465-495nm, B = image with green filter transformed, C = image adjusted to 1925, corresponding to the threshold that the pixels from the slides control, D = images in steps A and C merged.

4.4.9 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 3.2.5, <https://www.r-project.org/>). Data were expressed as mean \pm SE. Normality and homogeneity of variance were tested using Shapiro Wilk, and Bartlett tests and data were a log or arcsine-transformed when needed. When data respected the assumptions of normality, three-way and two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD test performed on the identified differences between groups for non-fecal soluble P in tanks, ash content, NaPi relative abundance, and the number of NaPi-positive gill cells stained. For growth performance, three-way ANOVA including all the potential main effects (Diet*Time*System) was first tested. Secondly, the effects of relevant interactions (Diet*time and Diet*System) were tested. Quadratic and cubic effects of time were also analyzed. The level of significance used in all tests was $P < 0.05$ except the scale ash ($P > 0.1$).

4.5 Results

The gain in fish mass and feed intake were different ($P < 0.001$) among dietary treatments. Higher wet weight was noted in fish fed P-sufficient diet even if their feed intake was lower ($P = 0.037$) than fish fed with the P-deficient diet. FCR was not different ($P = 0.707$) among dietary treatments. Neither TGC nor the SGR was influenced ($P < 0.05$) by diet. Rearing system had a significant ($P < 0.05$) effect on wet weight, feed intake, and SGR ($P = 0.003$, 0.015 , and 0.037 , respectively). These growth parameters (wet weight, FI, and SGR) were higher in the open system than in a closed system. FCR and TCG showed a tendency; indicating numerically higher ($P = 0.106$) FCR in a closed system at the opposite to TCG which tended to be higher ($P = 0.059$) in the open system. Results demonstrated a time-dependant impact on growth parameters. Time demonstrated a significant ($P < 0.05$) effect on all growth parameters, as well as the quadratic effect of time. The cubic effect of time was significant ($P < 0.05$) on TGC and SGR not for other growth parameters. No mortality was observed during the experiment (Table 4.2).

There was a tendency for the interaction of time and diet for scale ash ($P = 0.055$ and 0.096 for open and closed circuit, respectively). Scale mineralization decreased over time (0-14 wk); this decrease is greater when fish were fed with the P-deficient diet. Furthermore, the difference in scale ash between diets was more apparent when the fish were raised in the open system compared to fish reared in the closed system. As shown by the percentage of ash loss from scales between these two treatments, the most prevalent reductions in P were observed at 8 wk and 14 wk for open and closed systems, respectively. These partial observations suggest that fish raised in an open circuit are more affected by P-restriction in the diet than those raised in a closed system (Table 4.3).

The daily accumulation pattern of non-fecal Pi excreted by rainbow trout was performed after clinical P deficiency was demonstrated in fish receiving the low-P diet. According to the scale ash, P-deficiency was observed within 4 wk of feeding the low-P diet (Table 4.3). This result shown in Table was also reported in Le Luyer et al. (2014) and Sarker et al. (2011). The two daily Pi accumulation of P was realized : the first one at 11 wk and the second one at 14 wk. The difference between daily Pi content in water of the two-unit tanks was shown in Table 4.4 and the results for each trial presented in Figure 4.3.

TABLE 4.2 – Mean (n=3 tanks) wet weight, feed intake, FCR, TGC, SGR rate of rainbow trout fed with P-sufficient (P-S), and P-deficient (P-D) reared in open and recirculated (closed) aquaculture systems.

System	Open		Closed		Effect (<i>P</i> -value)	
	P-D	P-S	P-D	P-S		
Week						
Wet weight (g)						
0	65.77	65.95	67.58	67.42	Diet	<0.001
2	81.50	82.20	81.31	83.49	Time	<0.001
4	91.90	94.90	92.86	94.47	System	0.003
8	126.50	141.10	122.88	128.22	Diet*Time	0.152
14	216.40	228.80	189.38	200.17	Diet*System	0.388
					Time*Time	<0.001
Feed intake (g)						
2	14.60	14.40	14.50	15.00	Diet	0.037
4	16.10	17.10	15.00	16.40	Time	<0.001
8	18.30	23.00	22.00	21.80	System	0.015
14	51.80	52.80	41.40	47.20	Diet*Time	0.221
					Diet*System	0.507
					Time*Time	<0.001
FCR (g/g)						
2	0.93	0.89	1.10	0.94	Diet	0.707
4	1.57	1.35	1.42	1.55	Time	0.035
8	0.99	0.78	1.35	1.22	System	0.106
14	0.93	0.90	1.26	1.14	Diet*Time	0.612
					Diet*System	0.773
					Time*Time	0.006
TGC						
2	0.21	0.22	0.19	0.21	Diet	0.383
4	0.13	0.15	0.14	0.13	Time	<0.001
8	0.20	0.31	0.17	0.19	System	0.059
14	0.27	0.27	0.17	0.20	Diet*Time	0.304
					Diet*System	0.824
					Time*Time	0.040
					Time*Time*Time	0.007
SGR (%)						
2	19.30	19.80	16.80	19.30	Diet	0.336
4	11.30	13.40	12.30	11.60	Time	<0.001
8	15.70	22.90	13.40	14.90	System	0.037
14	26.70	26.50	18.50	21.00	Diet*Time	0.405
					Diet*System	0.928
					Time*Time	<0.001
					Time*Time*Time	<0.001
Mortality (n)						
0-14	0.00	0.00	0.00	0.00		

TABLE 4.3 – Relative impact on ash content (mean with pooled SEM) in scales for fish fed P-sufficient and P-deficient diets over the time¹.

Circuit	Open			Closed			
Diet	P-D	P-S	% loss ¹	P-S	P-D	% loss	
Weeks	0	29.6 ± 0.4 ^{bc}		nc	29.80 ± 0.5 ^{cd}		nc
	2	28.8 ± 0.2 ^b	30.3 ± 0.2 ^c	4.95	27.6 ± 0.3 ^{ab}	29.5 ± 0.3 ^{cd}	6.44
	4	28.4 ± 0.2 ^b	30.4 ± 0.2 ^c	6.58	28.5 ± 0.3 ^{bc}	30.3 ± 0.3 ^d	5.94
	8	25.5 ± 0.4 ^a	28.0 ± 0.4 ^b	8.93	25.5 ± 0.5 ^a	27.7 ± 0.5 ^{abc}	7.94
	14	25.4 ± 0.4 ^a	27.5 ± 0.4 ^b	7.64	25.6 ± 0.4 ^a	28.1 ± 0.3 ^{abc}	8.9
<i>P</i> -value	Diet	<0.001			<0.001		
	Time	<0.001			<0.001		
	Diet x Time	0.055			0.096		

NOTES : ¹Values are expressed in percentage of loss for ash content in P-deficient (P-D) fish compared to P-sufficient (P-S) fish at each time point : Loss (%) = [(value P-S – value P-D)/value P-S]. nc = not calculated, ANOVA (*P*<0.1) followed by Tukey test.

TABLE 4.4 – Daily Pi (ppm) in the water tank in the two units between the non-fecal soluble accumulation trial.

Periods	Open	Closed	Accumulation	Result
4 - 11 wk	0.2	0.5	1	4.3 A and B
11 -13 wk	0.3 - 1.2	2.5 - 5	2	4.3 C and D

The accumulation of non-fecal Pi evaluated at 11 wk did not show a significant difference between the two culture units. The accumulation of soluble P in the tanks increased significantly ($P<0.05$) 4 h after feeding (TAF) when fish were fed the P-sufficient diet. This accumulation is significantly higher compared to the fish fed on a P-deficient diet. Non-fecal soluble P in tanks of fish receiving the P-deficient diets remained constant for 12 h after feeding (Figure 4.3 A and B).

The profile of Pi excretion is similar between culture systems for the accumulation trial at 11 wk. For the second trial at 14 wk, the non-fecal soluble P excretion was significantly different between the units; the open unit showed the same profile as that described during the first accumulation trial (Figure 4.3 C). However, in the closed non-fecal P excretion showed a different profile compared to results from the open unit and previous non-fecal soluble P accumulation trials. Indeed, the P excreted in the tanks increased rapidly for fish fed with the P-sufficient diet, but for those fed with the P-deficient diet, P shows a significant ($P<0.05$) decrease over time (Figure 4.3 D)

Gill and skin tissues are directly exposed to external water and are assumed to be implicated in potential adaptations related to P homeostasis (Verri and Werner, 2019). Protein quantification using WB and IHC were performed in samples of gills from trout. The Na-Pi type II immunoreactivity in western blots was present as a single band at an apparent molecular mass of 71kDa (Figure 4.4 A). Statistical analyses (ANOVA followed by Tukey HSD test) of the quantitative band using ImageJ showed no significant difference between the two culture units and time after addition on Pi in closed water tanks. Only the level of P in diet presented and significant effect in quantitative NaPi-II in gill tissue (Figure 4.4 B).

The abundance of NaPi-II in gill trout was higher when fish were fed with a P-deficient diet compared to the fish fed with a P-sufficient diet. Following typical image processing using ImageJ, IHC revealed that NaPi-II immunofluorescence occurred in a small number of cells on filament and lamellae when fish were fed with P-sufficient diet. When fish were fed with P-deficient diet, immunofluorescence signal of NaPi-II increased significantly and was the most present border of gill filament (Figure 4.5).

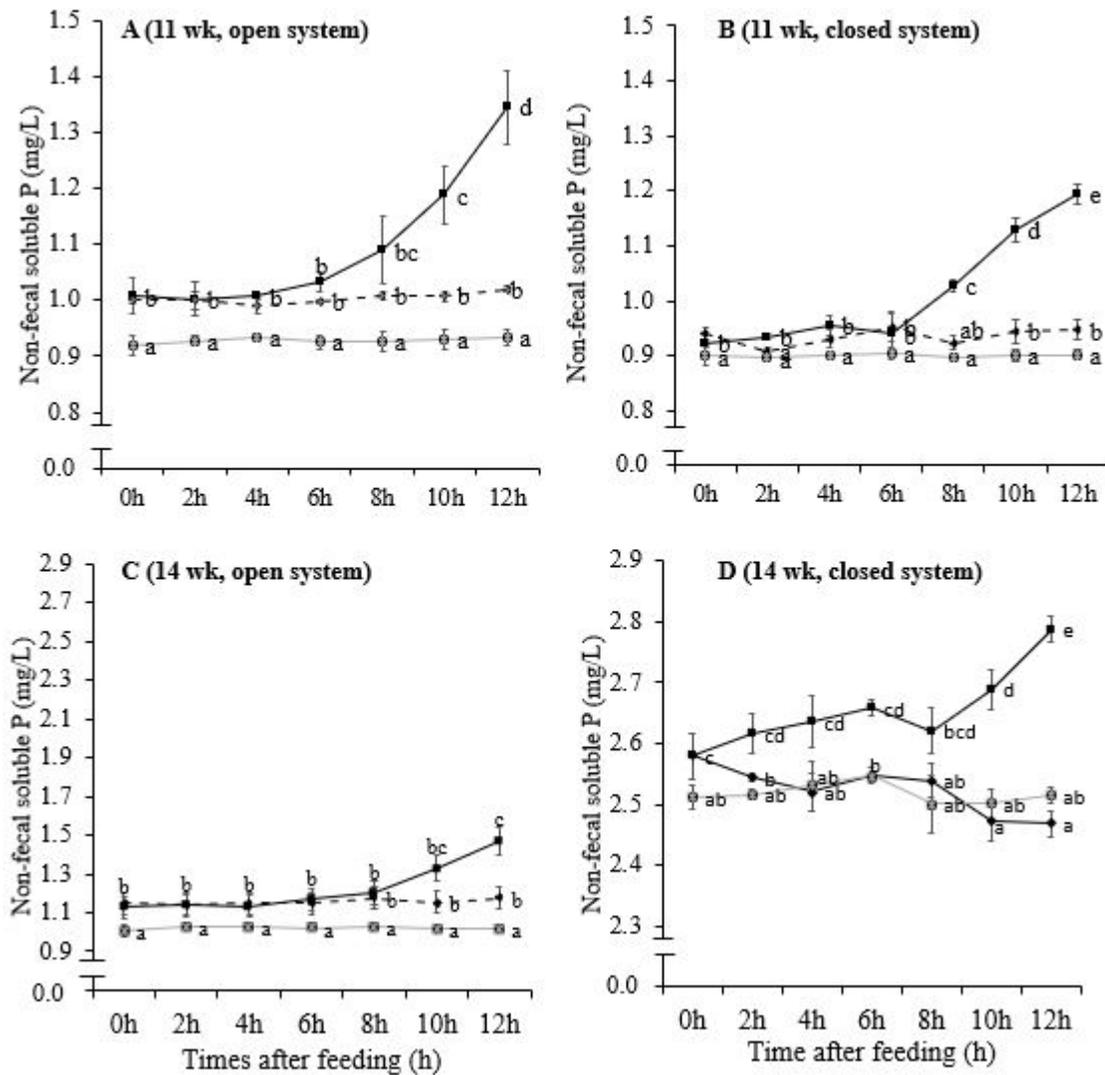
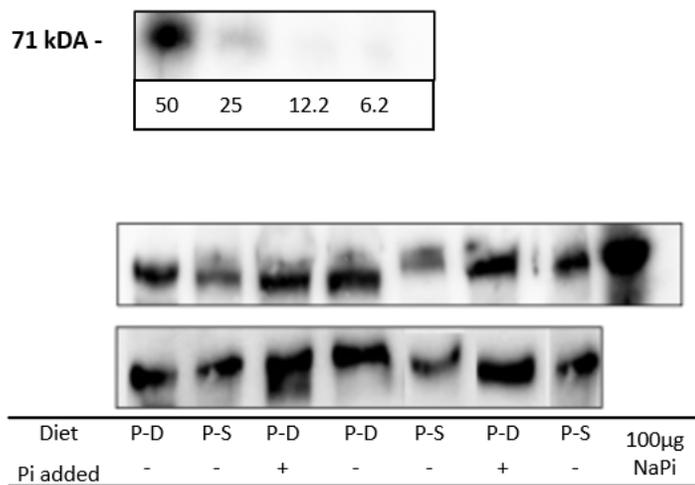


FIGURE 4.3 – Non-fecal soluble P release in tanks after feeding in the two 12-h accumulations (11 wk-above and 14 wk-below) in control tanks (grey line) and tanks fed by P-sufficient diet (black line), P-deficient (dashed line). Mean (n=3) were presented in the open (right) and closed (left) system separately. The 14 wk trials were conducted after that the P_i in the tank in the close system is increased to 4-5 mg/L daily for 2 wk by the addition of KH_2PO_4 in the inflow tank. Two-way ANOVA, followed by Tukey HSD test, was performed to identify significant difference ($P < 0.05$). The analysis shows a significant difference in P_i release in-tank between treatment ($P = 0.005$) over time ($P = 0.03$), as well as their interaction (treatment*time : $P = 0.01$). Mean values with similar superscripts are not significantly different ($P > 0.05$).

A



B

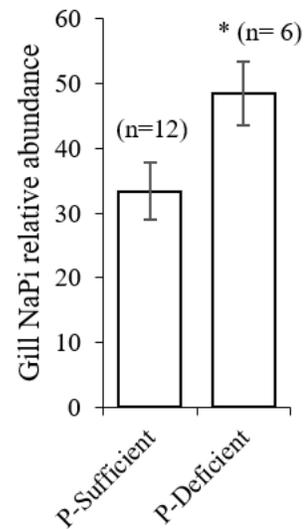


FIGURE 4.4 – A) NaPi-II standard range and representative western blots of gills trout, fed with a P-deficient diet (P-D) and the P-sufficient diet (P-S) among periods before (-) and after (+) Pi was added in the closed system; B) relative abundance of NaPi-II proteins in gill extract. Effect of diet and period on gill NaPi-II relative abundance using Image J processing was tested. Two-way (diet and period) ANOVA indicated a significant effect of diet ($P=0.002$) and their interaction ($P=0.030$), not for the period ($P=0.071$). HSD Tuckey test was used to compare the significant effect of diet. The asterisk indicates a significant change between the two P-dietary treatments (one-way ANOVA, $P<0.05$).

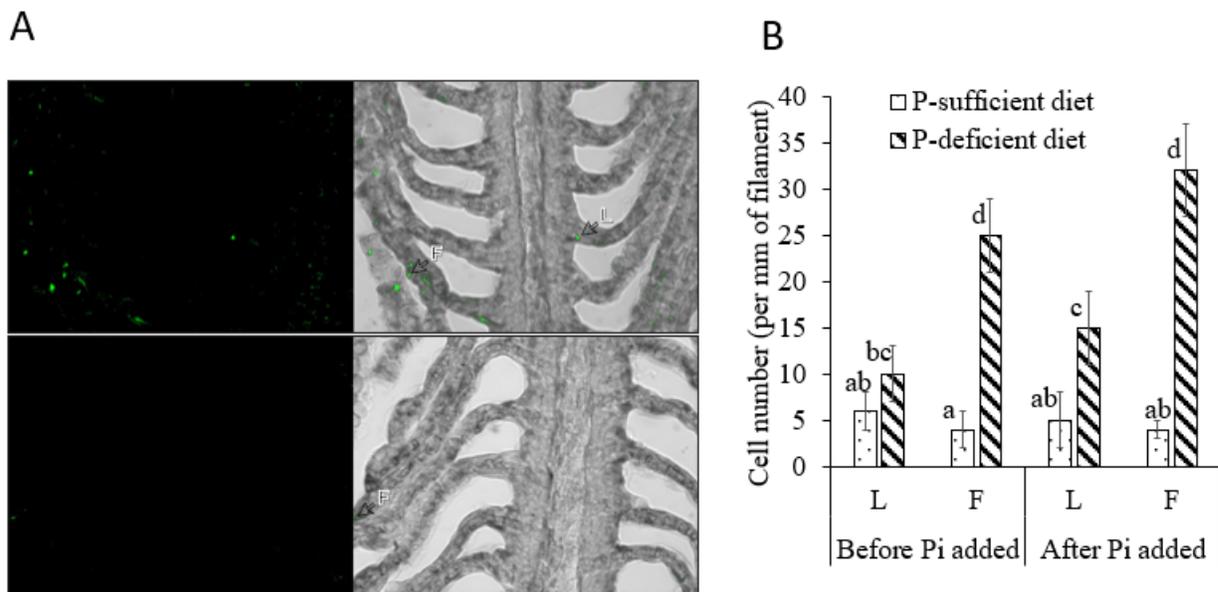


FIGURE 4.5 – Relative rate of Pi release in tanks at the end of the last 12h-accumulation (14 wk) in open (dark) and closed (white) system. Means values from triplicate tanks of fish fed with P-sufficient (black point) and P-deficient (black hatched) diets were calculated by dividing Pi accumulated in the tank at the end of the trial by time (12h) and biomass using the following equation $[Pi (mg/h/kg) = Pi_{final} - Pi_{initial} / (12 * biomass (kg))]$.

By applying a linear model to estimate the evolution of non-fecal soluble P excretion over time, our results generated the equations presented in Table 4.5. The results showed a low linear relationship between Pi release and the time after feeding, with R^2 ranging between 0.54 and 0.77. For fish fed with P-sufficient diet, the best-fit relationship is a polynomial function of time [$Pi \text{ mean} = 0.015 (\text{TAF})^2 - 0.073 (\text{TAF}) + 2.57$, $R^2 = 0.98$]. According to that the linear function of the evolution of Pi release in tanks was not highly true, the relative rate of Pi was calculated instead of the use of the slope of linear equations.

TABLE 4.5 – Linear models of prediction for Pi release in tanks water after feeding according to Pi-dietary and systems. This modeling was done using data from the last 14-h accumulation trial (14 wk).

System	Diet	P diet	Pi0	Linear models	R^2	<i>P</i> -value
Open	P-S	1	1.14	$Pi \text{ (mg/L)} = 1.01 + 0.052 (\text{TAF})$	0.77	<0.001
	P-D	0.5	1.14	$Pi \text{ (mg/L)} = 1.13 + 0.005 (\text{TAF})$	0.54	<0.001
Closed	P-S	1	2.58	$Pi \text{ (mg/L)} = 2.55 + 0.027 (\text{TAF})$	0.74	<0.001
	P-D	0.5	2.58	$Pi \text{ (mg/L)} = 2.59 - 0.016 (\text{TAF})$	0.76	<0.001

NOTES : ¹Pi0 : Pi-level at the start of accumulation trial; ²TAF : time after feeding; P-S= P-sufficient, P-D = P-deficient

The relative rate represents the amount of P excreted in the tank per hour per kg of biomass. These values were estimated at 0.407 and 0.031 mg in an open system and 0.218 and - 0.122 mg in a closed system for a P-sufficient diet and P-deficient, respectively. Our findings suggest that P deficient fish can absorb P from the environment. This external absorption of P seems to only be observed when P-deficient fish are maintained in water with relatively high background P concentrations (between 4 to 5 mg/L, Figure 4.6).

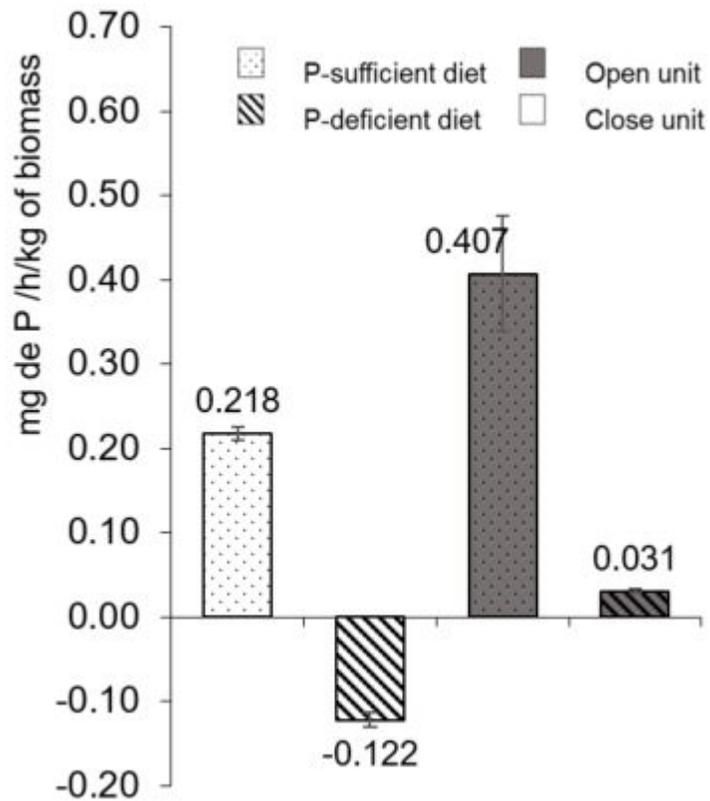


FIGURE 4.6 – Relative rate of Pi release in tanks at the end of the last 12h-accumulation (14 wk) in open (dark) and closed (white) system. Means values from triplicate tanks of fish fed with P-sufficient (black point) and P-deficient (black hatched) diets were calculated by dividing Pi accumulated in the tank at the end of the trial by time (12 h) and biomass using the following equation $[Pi (mg/h/kg) = (Pi_{final} - Pi_{initial}) / (12 \cdot biomass (kg))]$.

4.6 Discussion

It is well known that certain minerals can be absorbed by fish from their environment; indeed, a large body of work has demonstrated the importance of external calcium absorption in both fresh and salt-water. Over three decades ago, Fenwick (1989) reviewed work reporting on calcium absorption; the fact that calcium can be present in relatively high concentrations (particularly in marine environments) has continued to attract interest in this area. Given that P is present in low concentrations, the ability of fish to absorb appreciable quantities from their environment has been largely ignored.

The increased employment of recirculating aquaculture systems (RAS) to raise fish, results in higher background P concentrations. Sugiura et al. (2000) demonstrated the utility of nonfecal P excretion to estimate dietary requirements, during which it was noted that P concentrations in tanks with P-deficient fish tended lower over the P accumulation study period (Sugiura, 1998). Subsequent work in our lab confirmed this observation (Sarker et al., 2011). Then it was hypothesized that there is an element in the closed system which initiated this potential regulation. According to previous observations (Vielma and Lall, 1998; Witten and Huysseune, 2009), we identified the soluble Pi as the element that potentially initiates this regulation. Given the low level of this element in water it was suggested by these authors that the teleost fish are unable to absorb appreciable amounts by gills, supports a larger implication of P to regulate this phenomenon. Given this hypothesis, following the first accumulation trial, the background concentration of Pi was increased from 0.5 to 5 mg/L (by addition of KH_2PO_4) in order to ensure relatively high levels of background Pi in the system prior the subsequent accumulation trial.

The addition of Pi in the RAS also ensured relatively high concentrations of this element for 10 days before the start of the second P-accumulation trial (2.58 vs. 1.14 mg/L). This elevated background Pi concentration in the water of the RAS system after 11 wk seems critical in the ability of fish fed a P-deficient diet to absorb P, given the observation of Pi absorption from tank water by chronically-deficient trout when background Pi was raised to 2.58 mg/L). On the contrary, concentrations of 1.14 mg/L Pi seem to be below a 'critical threshold' in this experiment. As reported by Sarker et al. (2011), in P deficient trout with background Pi concentrations of 4-5 mg/L they demonstrated absorption of external Pi. It should be noted that the size of the trout used in this study was different from those in the current study (323 to 500 vs. 220 g).

Currently, little is known about the regulation of genes involved in this putative mechanism. According to (Sugiura et al., 2003), specific genes responsible for Pi-uptake like stimulator (PiUS) mRNA expression in gill ionocyte tissue of rainbow trout are responsible for Pi uptake mechanisms in gill tissue of P-deficient fish. Furthermore, PiUS was found in all tissues where NaPi-II mRNA was located. These authors were also speculated that the expression of PiUS in other tissues including gill, heart, and blood. They suggested the presence of other Pi transporters that coordinate their function with PiUS and the precocious (1 wk) severity of Pi-dietary restriction to explain these findings.

Gill and skin tissues are directly exposed to external water and are assumed to be implicated in po-

tential adaptations related to P homeostasis (Verri and Werner, 2019). Quantification of NaPi-II using Western blot demonstrated that a severe restriction in P causes over-expression of this protein in gill tissue. The immune-staining of branchial ionocyte NaPi-II strongly supports these quantitative results. No significant difference in increasing background P in RAS was found in NaPi-II immunostaining. Likewise, WB demonstrated that only dietary P induced an effect on NaPi-II presence in gill. These results refute the hypothesis that the high level of Pi in water initiates this regulation; it is derived by severe restriction dietary P; IHC gives an interesting indication of the location of these membrane transporters. Indeed, the staining signal appears almost always in the external border of gill lamellae, rarely in the filament. The observation was in accordance with the TrIib2 polyclonal rabbit antibody staining reported by Sugiura et al. (2003). Some immunofluorescence was also found in the central venous sinus (CVS) of gill lamellae, which was unexpected and suggested the presence of non-specific staining; increasing the blocking protein concentrations can reduce this potential non-specific staining. Egg yolk antibodies (IgY) constitutes a relevant alternative source of antibodies these last year due to some advantages over mammalian serum immunoglobulins regarding productivity, animal welfare, and specificity (Pereira et al., 2019). Nonetheless, a study conducted by Araújo et al. (2010) showed the frequently used method for the extraction of IgY by precipitation with high concentration (60% instead of 20%) of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) caused the presence of non-specific proteins in purified antibodies. Increasing the blocking with milk proteins may offer an alternative method to limit by competition the complexation of these non-specific proteins with their epitopes.

Our preliminary results demonstrated that P-deficient rainbow trout exposed to Pi-rich water develop a capacity to absorb an appreciable amount of Pi from the environment. This external absorption of Pi also correlated with an increase of NaPi-II abundance in gill. This increase of NaPi-II co-transport depended on the level of dietary P. While this result suggests a regulatory impact of dietary P restriction in the gill, it cannot be concluded that the augmented Pi absorption demonstrated in accumulation trial was only linked to NaPi-II overexpression in gill. Indeed, the absorption of Pi across epithelia in Pacific hagfish skin (*Eptatretus Stoutii*) was reported by Schultz et al. (2014). To assess the potential of different anatomical regions involved in P absorption, a modified metabolic chamber, as described by McKim and Goeden (1982), allowing separation of head/gills from the remaining body was validated. The protocol was defined in the framework of the designated study of active uptake Pi mechanism for validation of an implication of skin or/and gills in this regulation (Appendix B).

Teleost fish P dynamics are of prime interest for mainly two reasons : (i) teleost fish is an essential protein source in the human diet and supply increasingly depends on farmed fish that need a precisely balanced supply of Pi ; (ii) there are many teleost-specific strategies to maintain adequate Pi levels with essentially very similar transporters and hormones (Verri and Werner, 2019). Dietary P restriction is a realistic approach to maintain a precise and adequate supply of Pi (Bureau et al., 2003; Satoh et al., 2003; Sarker et al., 2011; Sugiura et al., 2000; Vandenberg, 2001). This approach can lead to P-deficiency if the biotic and abiotic factors are not taken into account. Thus, investigating the plasticity

of trout regarding P restriction is essential to improve the understanding of P metabolism in teleost fish.

4.7 Conclusion

Our results indicate that NaPi-II cotransporter is more abundant in gill lamellae of fish fed chronically (>4 wk) with a P-deficient diet compared to those fed with P-sufficient diet. This increase of NaPi-II cotransporter relied upon an external absorption of Pi shown when the fish were maintained in water with relatively high (2-5 mg/L) P concentrations. These findings indicate that in RAS systems, the source of P from the water must be integrated into the P balance when the low-P diet was used. The use of immunohistochemistry is a relevant approach to highlight the effect of chronic P-dietary restriction in NaPi-II gill cotransporter. It would also be interesting to use this same approach on trout skin. This approach can be coupled with an in vitro study of cotransporter activity in these two main external tissues.

4.8 Acknowledgments

We thank the technical assistance of the staff at the '*Laboratoire de Recherche des Sciences Aquatiques*' (LARSA) and '*Groupe de Recherche Intégré en Physiologie et sciences Animales*' (GRIPHA) at the Université Laval, particularly to Nancy Bolduc, Amel Lounas and our trainees Chloé Mougeolle, and Joseph Ndong. Thanks to Dr. McCormick and his staff at USGS, Conte Anadromous Fish Research Center, particularly to Amy Regish for their technical assistance, antibody design, IHC, and WB. his project was financially supported by the '*Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*' (NSERC), the network '*Ressources Aquatiques Québec*' (RAQ), and the '*Canadian Francophonie Scholarship Program*' (CFSP).

4.9 Bibliographie

- AOAC (1990). Official Methods of Analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. Technical report, Washington, DC, USA.
- Araújo, A. S., Lobato, Z. I. P., Chávez-Olórtegui, C., and Velarde, D. T. (2010). Brazilian IgY-Bothrops antivenom : Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon*, 55(4) :739–744.
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., and Alberti, A. (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications*, 5 :3657.

- Bureau, D. P., Gunther, S. J., and Cho, C. Y. (2003). Chemical composition and preliminary theoretical estimates of waste outputs of rainbow trout reared in commercial cage culture operations in Ontario. *North American Journal of Aquaculture*, 65(1) :33–38.
- Coloso, R. M., King, K., Fletcher, J. W., Weis, P., Werner, A., and Ferraris, R. P. (2003). Dietary P regulates phosphate transporter expression, phosphatase activity, and effluent P partitioning in trout culture. *Journal of Comparative Physiology B*, 173(6) :519–530.
- Feild, J. A., Zhang, L., Brun, K. A., Brooks, D. P., and Edwards, R. M. (1999). Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3) :578–582.
- Fenwick, J. C. (1989). Calcium exchange across fish gills. In *Vertebrate Endocrinology : Fundamentals and Biomedical Implications*. Technical report. pp. 319–342.
- Graham, C., Nalbant, P., Scholermann, B., Hentschel, H., Kinne, R. K. H., and Werner, A. (2003). Characterization of a type IIb sodium-phosphate cotransporter from zebrafish (*Danio rerio*) kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(4) :F727–F736.
- Hilfiker, H., Hattenhauer, O., Traebert, M., Forster, I., Murer, H., and Biber, J. (1998). Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24) :14564–14569.
- Lake, J., Gravel, C., Koko, G. K. D., Robert, C., and Vandenberg, G. W. (2010). Combining suppressive subtractive hybridization and cDNA microarrays to identify dietary phosphorus-responsive genes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D : Genomics and Proteomics*, 5(1) :24–35.
- Le Luyer, J., Deschamps, M., Proulx, E., Poirier Stewart, N., Robert, C., and Vandenberg, G. (2014). Responses of different body compartments to acute dietary phosphorus deficiency in juvenile triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :825–832.
- Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., and Murer, H. (1993). Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13) :5979–5983.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., and Christensen, A. K. (2009). Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺ ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 212(24) :3994–4001.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., Christensen, A. K., and Björnsson, B. T. (2013). Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 216(7) :1142–1151.

- McKim, J. M. and Goeden, H. M. (1982). A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gills of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology*, 72(1) :65–74.
- Mitrovic, D., Dymowska, A., Nilsson, G. E., and Perry, S. F. (2009). Physiological consequences of gill remodeling in goldfish (*Carassius auratus*) during exposure to long-term hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(1) :R224–R234.
- Mitrovic, D. and Perry, S. F. (2009). The effects of thermally induced gill remodeling on ionocyte distribution and branchial chloride fluxes in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology*, 212(6) :843–852.
- Nalbant, P., Boehmer, C., Dehmelt, L., Wehner, F., and Werner, A. (1999). Functional characterization of a Na⁺–phosphate cotransporter NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. *The Journal of Physiology*, 520(1) :79–89.
- Nilsson, G. E. (2007). Gill remodeling in fish—a new fashion or an ancient secret? *Journal of Experimental Biology*, 210(14) :2403–2409.
- NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Olfert, E. D., Cross, B. M., and McWilliam, A. A. (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Technical report.
- Pereira, E. P. V., van Tilburg, M. F., Florean, E. O. P. T., and Guedes, M. I. F. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health : A review. *International immunopharmacology*, 73 :293–303.
- Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., and Vandenberg, G. W. (2011). Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3) :241–249.
- Satoh, S., Hernández, A., Tokoro, T., Morishita, Y., Kiron, V., and Watanabe, T. (2003). Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fish meal based diet. *Aquaculture*, 224(1-4) :271–282.
- Schultz, A. G., Guffey, S. C., Clifford, A. M., and Goss, G. G. (2014). Phosphate absorption across multiple epithelia in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(6) :R643–R652.

- Smith, A. A., Zimmer, A. M., and Wood, C. M. (2012). Branchial and extra-branchial ammonia excretion in goldfish (*Carassius auratus*) following thermally induced gill remodeling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 162(3) :185–192.
- Sugiura, S. H. (1998). *Development of low-pollution feeds for sustainable aquaculture*. Phd thesis, University of Washington, Washington, USA.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., and Hardy, R. W. (2000). A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout based on nonfecal excretions of phosphorus and nitrogen. *The Journal of Nutrition*, 130(4) :865–872.
- Sugiura, S. H. and Ferraris, R. P. (2004). Contributions of different NaPi cotransporter isoforms to dietary regulation of P transport in the pyloric caeca and intestine of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 207(12) :2055–2064.
- Sugiura, S. H., McDaniel, N. K., and Ferraris, R. P. (2003). *In vivo* fractional Pi absorption and NaPi-II mRNA expression in rainbow trout are upregulated by dietary P restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(4) :R770–R781.
- Tzaneva, V., Bailey, S., and Perry, S. F. (2011). The interactive effects of hypoxemia, hyperoxia, and temperature on the gill morphology of goldfish (*Carassius auratus*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6) :R1344–R1351.
- Vandenberg, G. W. (2001). *Encapsulation de phytase microbienne : L'influence sur la disponibilité de nutriments chez la truite arc-en-ciel*. PhD thesis, Université Laval, Québec, Canada. 278 p.
- Verri, T. and Werner, A. (2019). Type II Na⁺- phosphate cotransporters and phosphate balance in teleost fish. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 471(1) :193–212.
- Vielma, J. and Lall, S. P. (1998). Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in fresh water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(1) :83–93.
- Werner, A., Dehmelt, L., and Nalbant, P. (1998). Na⁺-dependent phosphate cotransporters : the NaPi protein families. *Journal of Experimental Biology*, 201(23) :3135–3142.
- Werner, A. and Kinne, R. K. H. (2001). Evolution of the Na-Pi cotransport systems. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(2) :R301–R312.
- Werner, A., Preston-Fayers, K., Dehmelt, L., and Nalbant, P. (2002). Regulation of the NPT gene by a naturally occurring antisense transcript. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 36(2-3) :241–252.
- Witten, P. E. and Huysseune, A. (2009). A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biological Reviews*, 84(2) :315–346.

Wright, P. A. and Wood, C. M. (2009). A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals : role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *Journal of Experimental Biology*, 212(15) :2303–2312.

Discussion générale et conclusion

"La logique des passions renverse l'ordre traditionnel du raisonnement et place la conclusion avant les prémisses."

De Eric Hobsbawm

L'objectif principal de ce travail de thèse était de : 1) développer une technique de réduction à la source de la pollution piscicole liée au P, et 2) progresser dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'absorption de P, suite à une restriction alimentaire sévère de cet élément. Le troisième sujet s'intéressant à la validation du Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA) comme outils d'évaluation de la composition proximale des poissons et de la rétention alimentaire, est apparu comme une étude complémentaire très importante dans le contexte canadien. Ainsi, les résultats seront discutés en trois parties en fonction des objectifs de chaque étude. À la fin de chaque partie, des perspectives de recherche seront dégagées afin d'améliorer le travail débuté.

Réduction de la pollution piscicole : utilisation des pièges à phosphore

Le travail réalisé dans le chapitre 2 a permis de mettre en évidence que la micro-encapsulation d'éléments actifs, comme l'Al et le Fe, est une approche pertinente et efficace pour limiter les rejets de P dans les effluents des fermes de truites arc-en-ciel. Cependant, il est impératif de valider l'adéquation de la matrice (gras) d'encapsulation utilisée et l'activité lipasique afin de cibler l'endroit propice pour la libération des éléments actifs. Ce travail préliminaire a été réalisé avant les phases *in vivo* et les résultats ont été présentés en annexe 1. Dans notre cas, la matrice proposée par Jefo-matrix pour l'expérimentation chez le poulet était la meilleure compte-tenu de la contrainte imposée (libération tardive) au départ. L'efficacité de cette technique est influencée entre autres par la température, le pH, et la turbidité du substrat. Une investigation complémentaire a été réalisée afin de voir les tendances liées au pH et à la turbidité.

Effet combiné avec la température

L'efficacité de cette technique est influencée par plusieurs paramètres qui sont à prendre en compte. Considérant les variations de température observées au Canada, il a été jugé nécessaire de valider l'effet de la température et de l'inclusion des éléments actifs sur le P relargué par les fèces. Par conséquent, deux températures extrêmes ont été testées : 4 °C et 22 °C. Les résultats ont montré des contenus élevés maximaux de P de 7,7 et 12,6 g/kg de fèces secs au bout de 7 jours pour les températures 7 et 22 °C, respectivement. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de l'étude de Kibria *et al.* (1996). L'écart de température dans les deux études (± 15 vs. 5 °C) et la conversion alimentaire (FCR) pourraient expliquer ces résultats contraires. L'effet des éléments actifs est plus marqué en milieu ambiant dans notre étude. En effet, le P relargué est significativement plus faible pour les régimes incorporant les éléments actifs (Fe et Al) au bout de 7 jours. Entre ces deux régimes, l'effet de l'Al sur l'insolubilisation du P est significativement plus élevé (Figure 2.1, chapitre 2).

Effet combiné avec le pH

Le pH du milieu d'incubation montre aussi des effets significatifs sur la cinétique de libération du P contenu dans les fèces. En testant deux valeurs de pH différentes (pH = 4 et 8), des différences significatives ont été observées. En effet, les tendances montrent une quantité plus élevée de P libéré par les

fèces à un pH élevé (maximum de P relargué = 7 vs. 5 mg de P/g de fèces sèches-FC) comparativement à un pH bas. Ainsi, les résultats préliminaires observés sont en contradiction avec ceux mis en évidence pour l'aliment non absorbé dans l'étude de Kibria et al. (1996). Néanmoins, ils s'accordent avec ceux de (Comeau, 1989). En effet, cet auteur montre que les pHs alcalins favorisent le relargage du Pi dans les boues d'épuration avec des conditions comparables à celles des bassins de sédimentation des fermes piscicoles (boues avec de la matière organique en milieu anoxique. Ainsi, l'insolubilisation du P par l'ajout d'éléments actifs (Fe et Al) semble être plus efficace à pH plus faible (Figure 4.7).

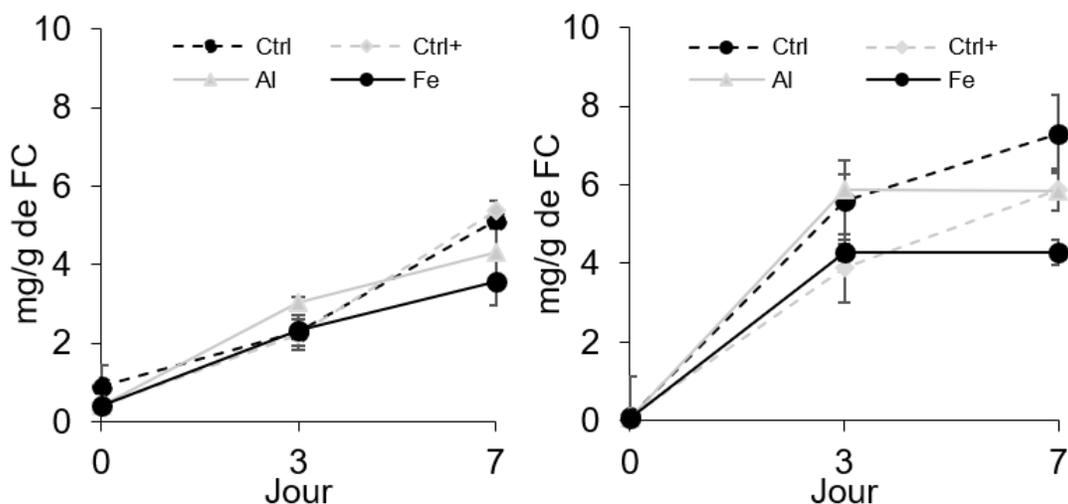


FIGURE 4.7 – Pi exprimé en (mg/g de FC) relargué au bout de 7 jours d'incubation par les fèces provenant des régimes expérimentaux et incubés à pH acide (4, à gauche) et à pH basique (8, à droite). Les valeurs de Pi sont exprimées sur base de fèces sèches (FC). Les valeurs représentent les moyennes (n=3) affectées de leurs écarts types.

Ces différences de relargage de P en fonction du pH peuvent s'expliquer par l'action des mécanismes éléments actifs dépendant du pH déjà mis en évidence par Metcalf et al. (1979). En effet, dans des milieux humides à pH acide ($\text{pH} < 6$), les phosphates d'aluminium (AlPO_4) et de fer (FePO_4) dominent, tandis que l'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}[\text{OH}]_3$) et l'oxyhydroxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) sont prédominants pour des pH compris entre 6 à 8 (Figure 4.8).

De l'analyse de ces données, il ressort donc, que l'élimination du P soluble semble efficace dans la plage de pH allant de 6,5 à 7 et de 5,5 à 6,5 pour le sulfate d'aluminium et le sulfate de fer respectivement. Ces observations à permettent de conclure que l'action d'insolubilisation recherchée avec l'ajout d'éléments actifs comme l'Al et le Fer (encapsulés) donne une meilleure efficacité à un pH compris entre 5,5 et 7.

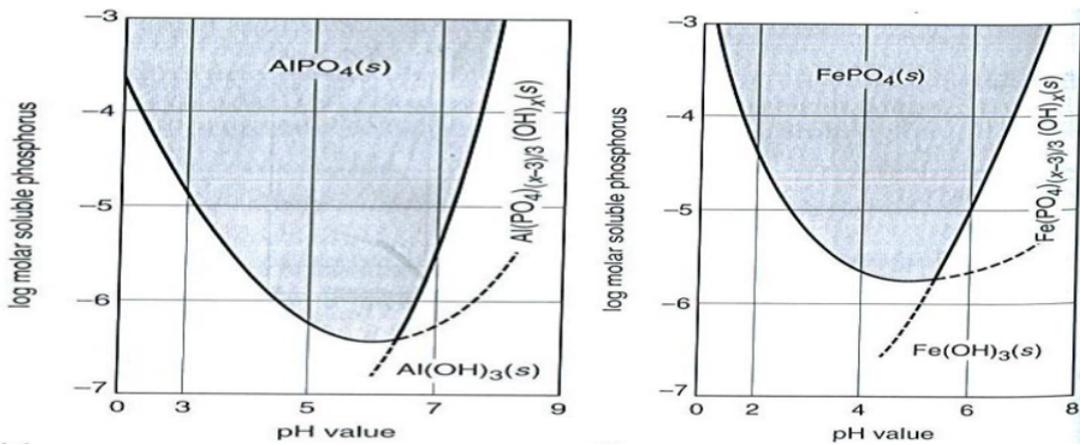


FIGURE 4.8 – Représentation graphique de l'évolution de la solubilité du phosphate d'aluminium et de fer en fonction du pH du milieu (images tirées de Metcalf et al. (1979)).

Effet combiné avec la turbidité

Les essais de relargage ont été réalisés avec une matrice fécale non perturbée, c.-à-d. sédimentée au fond du contenant. Cette option a été choisie afin de reproduire ce qui se passe généralement dans les bassins de sédimentation des fermes piscicoles. En revanche, cette situation n'est pas toujours effective, et de temps en temps, le milieu est perturbé par l'arrivée d'effluents sortant des structures d'élevages. Par conséquent, l'effet d'un mouvement d'eau constant a été testé sur la quantité de P remise en suspension. Les fèces incubées dans les bêchers ont été soumises à un mouvement régulier en utilisant l'appareil Orbical Shaker (aiguille de réglage de la vitesse maintenue à la graduation 6).

Par ailleurs, les données obtenues montrent que le relargage de P dans les fèces obtenues avec diverses moulées est plus important en absence de mouvement. En effet, les quantités minimales et maximales, au bout de 7 jours, pour les deux conditions étaient respectivement de $3,1 \pm 0,2$ et $5,6 \pm 0,19$ g/kg avec un mouvement d'eau, et $4,8 \pm 1,4$ et $8,4 \pm 0,6$ g/kg en absence de mouvement (Figure 4.9).

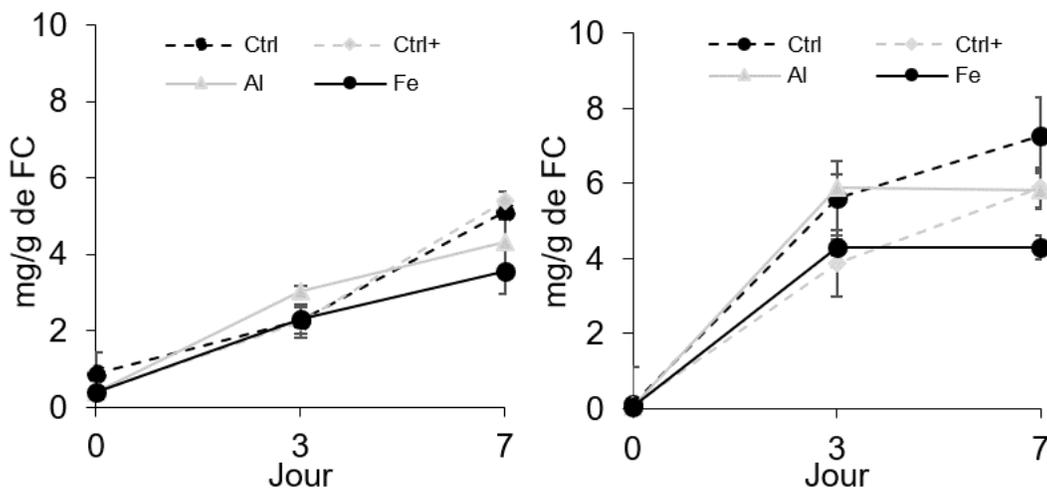


FIGURE 4.9 – Pi relargué au bout de 7 jours d'incubation par les fèces provenant des régimes expérimentaux et incubés avec mouvement (à gauche) et sans mouvement (à droite). Les valeurs de Pi sont exprimées sur base de fèces sèche (FC). Les valeurs représentent les moyennes (n=3) affectées de leurs écarts types.

Ainsi, les résultats observés montrent que la présence de mouvement a favorisé l'insolubilisation de P contenus dans les fèces, ce qui est en contradiction avec notre hypothèse initialement émise lors de cet essai. En effet, nous nous attendions à voir un relargage de P plus important avec le fractionnement de la matrice fécale en présence de mouvement. Cependant, il semblerait que ce mouvement favorise la complexation du P. De plus, il semblerait également que le mouvement tendrait à favoriser le contact entre les ions contenus dans le milieu conduisant à une insolubilisation importante du Pi.

Perspectives

Concernant l'efficacité de la technique utilisée, des réductions importantes de P rejeté par les fèces ont été obtenues. Ces réductions ont été estimées, lors de la première expérience in vivo, à 54% et 38%, avec l'inclusion de 0,9 g/kg d'Al et de 2,4 g/kg de Fe, respectivement. Dans la seconde expérience, la plus forte inclusion d'alun a permis d'enregistrer une baisse de plus de 60% de P rejeté par les fèces. Ces données confirment que la technique proposée est efficace pour réduire le P rejeté dans l'eau à partir des fèces de truite arc-en-ciel. L'alun est l'élément insolubilisant qui montre une meilleure insolubilisation du P dans les fèces de truite arc-en-ciel. Cependant, l'acceptation de la technologie proposée dépendra en grande partie de la démonstration de l'innocuité du procédé. Ce composé est utilisé comme agent affermissant dans plusieurs aliments pour la consommation humaine (Encyclopedia of Food Additives. 2005). Approuvé par l'agence d'administration des aliments et des médicaments des États unis ('*U.S. Food and Drug Administration*') pour le trempage des cornichons, l'alun doit cependant être utilisé de façon appropriée. La présence de l'Al dans l'alimentation est décriée (Duggan et al., 1992; Swegert et al., 1999) du fait des suspicions concernant son possible implication dans la maladie d'Alzheimer. Même si nos résultats ne montrent aucun signe d'accumulation de l'Al utilisé dans la chair des poissons. Une communication mal placée de l'usage d'Al dans l'alimentation des poissons pourrait nuire à l'image du produit, même si la finalité est de produire « proprement ». De plus, nous avons noté une conversion alimentaire numériquement plus faible de l'aliment incorporant l'Al, comparée à l'aliment supplémenté en Fe. Par conséquent, l'emploi de composés à base de Fe semble être le mieux indiqué. L'utilisation du Fe comme élément piégeant est d'autant plus intéressante qu'il est utilisé pour abaisser le pH des sols alcalins et lutter contre certaines carences chez les plantes (Hansen et al., 2006). Par conséquent, l'utilisation des boues issues de piscicultures utilisant cette technique de piégeage de P serait souhaitable dans ces types de sols alcalins. L'option alternative serait de tester l'efficacité de la zéolite encapsulée comme agent piégeant. Son action adsorbante sur les ions ammonium et phosphates a été mise en évidence par Huang et al. (2010). Cette propriété couplée à ses effets bénéfiques démontrés chez les poulets (Incharoen et al., 2010), les bœufs (Thilising-Hansen et al., 2002), et les poissons (Mumpton and Fishman, 1977) font de ce cet élément un bon candidat pour la réduction de la pollution au P (Karapinar, 2009) et l'amélioration de la productivité des poissons en élevage.

L'application de cette technique devra nécessairement passer par l'homologation de ces agents actifs protégés pour l'alimentation animale. Ce travail d'homologation devra être réalisé de concert avec les parties prenantes du projet afin de proposer cette technique aux fabricants d'aliments de truites arc-en-ciel. L'utilisation des boues issues de piscicultures utilisant cette technique, pour l'épandage, devra se conformer aux exigences et normes établies pour les matières résiduelles fertilisantes (Hébert, 2015). Les niveaux d'inclusion faibles (>60 g/kg) dans les régimes permettront d'avoir des boues dont les teneurs en Al ou Fe seront en deçà des seuils maximums fixés par le MDDELCC.

Utilisation du DXA pour évaluer la composition proximale des truites arc-en-ciel

La composition proximale est un important indicateur du statut nutritionnel et de la santé des organismes en élevage (Economos et al., 1997). Par conséquent, la précision de la méthode d'estimation des éléments nutritifs (protéines, lipides, cendre, P, Ca, etc.) de cette composition est une donnée fondamentale. Classiquement pour déterminer ces indicateurs chez les poissons, les carcasses sont broyées, puis lyophilisées, avant de passer à travers un ensemble d'analyses et de manipulations (Kjdhall, Soxhlet ou ANKOM, cendres, incinération, digestion acide, Dionex etc.). Le DXA est une méthode non invasive, mais qui est de plus en plus utilisée chez les humains et les porcs (Rose et al., 1998; Martinez, 2017).

Peu étudiée chez les poissons, la précision du DXA pour la détermination de la composition proximale a été évaluée afin de l'utiliser dans un contexte visant à limiter au maximum les rejets en P dans les fermes piscicoles. Les résultats présentés dans le chapitre 3 ont montré que le DXA possède une très bonne précision pour l'estimation de la composition proximale des truites arc-en-ciel. Par ailleurs, cette bonne précision du DXA a déjà été validée chez les humains, les porcs et les moutons.

Limites de l'estimation de composition proximale avec le DXA

La teneur en matières grasses (fat mass) obtenue avec le DXA n'est toutefois pas bien corrélée avec la teneur en lipides évaluée à l'aide des méthodes classiques ($R^2 = 0,31$ et $0,50$). Ce manque de précision de la teneur en matières grasses pourrait être probablement liée à une surestimation de cette composante par le DXA (Figure 3.4). En effet, des observations similaires ont été constatées par Wood (2004) chez le bar rayé (*M. saxatilis*). En comparant ces résultats à ceux de Rose et al. (1998) chez des femelles de rats obèses, l'auteur explique que cette faible précision est liée au type de logiciel utilisé dans les deux études (Humain vs. Rat Whole Body V5.71P). Les algorithmes utilisés dans ces deux modes ne sont pas spécifiquement développés pour les poissons. Par conséquent, il conviendrait de développer un mode ou une calibration spécifique aux poissons afin d'améliorer la précision. En outre, le mode de scan présente un impact sur la précision pour l'estimation du contenu en matières grasses. Pour cet indicateur, il a été démontré que la valeur de DXA r-value du mode détaillé (Detailed Mode, DM) montre une meilleure corrélation avec la quantité de lipides déterminés par la méthode classique (Wood, 2004; Mitchell et al., 1997; Swennen et al., 2004). Ainsi, il conviendrait d'utiliser cet indicateur pour une meilleure estimation de la composition en lipides des truites arc-en-ciel.

Chez les salmonidés, l'accumulation de graisse se fait majoritairement au niveau de la cavité abdominale. Ainsi, l'utilisation du mode Haute Résolution (High Resolution Mode, HRM) au niveau de cette partie permettrait d'avoir une meilleure estimation du contenu en graisses déposé pendant la phase de grossissement. Bien que les modes « DM » et « HRM » donnent de meilleurs résultats d'estimation de la composition proximale des carcasses, la durée de l'examen est relativement longue (10 et 60 min respectivement) comparé au mode « Rat whole-body » utilisé dans notre étude (4 min). Par

conséquent, un compromis devrait être fait entre la précision de la mesure et la durée de l'examen. De plus, la précision de l'estimation de la composition proximale pourrait être améliorée avec le type de scan. Il a été démontré que les appareils utilisant un faisceau de rayons x de type « pencil-beam » (crayon) possèdent une meilleure précision que ceux utilisant le type « fan-beam » (faisceau) (Wood, 2004; Henzell et al., 2003).

Avantages et perspectives de l'utilisation du DXA

Ce travail a permis de développer des équations de régression afin de déterminer le contenu en protéines, en cendres, et en P dans les carcasses à partir des données [masse maigre (lean), composition minérale osseuse (BMC), masse grasse (fat)] des scans de carcasses obtenus avec le DXA. Dans notre cas, ces équations ont été utilisées afin d'estimer la rétention en P des deux régimes testés. Cette rétention en P est similaire à celle obtenue à l'aide des méthodes classiques. Ainsi, cette observation met en évidence l'avantage de cette approche utilisant le DXA. Elle permet d'évaluer de façon simple et rapide le P retenu pour chaque aliment durant une période, et par ricochet, la quantité excrétée dans une ferme salmonicole. Par conséquent, cette méthode permettra de faciliter l'étude sur la disponibilité du P dans les régimes et dans les ingrédients afin de mettre en évidence la meilleure combinaison possible qui permettra de réduire les rejets en P. Par ailleurs, cette approche pourrait être aussi utilisée pour d'autres éléments nutritifs tels que les protéines, le Ca, etc.

En comparant les données des carcasses congelées et décongelées, il apparaît une précision similaire pour les équations de prédiction du poids, des protéines, des cendres, du P, du Ca. Dans le cas où le sacrifice des animaux est acceptable, il est plus adapté de congeler les carcasses lors des scans, afin de faciliter les manipulations. En revanche, il est préférable d'étendre ces modèles aux truites arc-en-ciel vivantes dans le souci de réduire l'utilisation des animaux dans les expériences (comme le recommande le Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval). L'examen des poissons vivants est réaliste car la durée de l'examen en mode « rat whole-body » est courte (4 min). Par conséquent, il est possible d'endormir les poissons pendant la durée de l'opération (environ 5min en tenant compte des réglages préopératoires). Toutefois, le défi est de trouver une technique permettant de maintenir les branchies humides durant l'examen, sans que cela n'altère la précision de la mesure. Cependant, l'utilisation de cette technologie dans l'industrie aquacole pose toutefois certaines limites. En effet, cet équipement est assez onéreux (100.000 dollars canadien) et nécessite donc l'aménagement d'une pièce dédiée à cet effet afin de confiner les rayons X. Des modèles de partage d'outil comme celui offert par le CRSAD, peuvent permettre au professionnel de s'affranchir de ces contraintes tout en bénéficiant d'une méthode efficace et rapide pour évaluer son emprunt environnemental vis-à-vis du P.

Mécanismes de régulation de la carence alimentaire en phosphore

La baisse des teneurs en P dans les régimes est l'approche classiquement utilisée afin de réduire ses rejets en P. Une restriction chronique du Pi alimentaire est associée à un retard de croissance, une réduction de la prise alimentaire, et une baisse de la densification osseuse favorisant des situations de déformation osseuse (Deschamps et al., 2014; Le Luyer et al., 2014; Deschamps et al., 2008). Cette situation n'est pas souhaitable dans un contexte d'élevage. Par conséquent, les poissons vont utiliser des mécanismes de régulation dans une certaine mesure, afin de limiter les effets de cette restriction. Cette régulation se déroule en situation de carence (hypophosphatémie), et en situation où cet élément est présent en grande quantité dans l'organisme (hyperphosphatémie). Elle fait intervenir principalement le cerveau, les reins, les tissus osseux et l'intestin. Les effets des hormones sécrétées par certains de ces organes étaient peu étudiés parce que la plupart des travaux se focalisaient sur la régulation du Ca. Par ailleurs, une revue réalisée par (Verri and Werner, 2019) a assigné récemment à chaque hormone son rôle dans la régulation du P chez les poissons téléostéens (Figure 4.10).

En revanche, l'action de la vitamine D3 (calcitriol) sur l'homéostasie phosphocalcique a été étudiée depuis longtemps. Son action sur le métabolisme du P est assez hétérogène. En effet, l'injection intrapéritonéale de vitamine D3 augmente le Pi plasmatique chez *Clarias batrachus* (Swarup et al., 1984) *Anguilla rostrata* (Fenwick, 1984), et plusieurs autres espèces (Srivastav et al., 1997; Swarup et al., 1992), mais elle n'a aucun effet chez *Oreochromis Mozambicus* (Rao and Raghuramulu, 1999). Cette augmentation du Pi dans le sang est liée à une réabsorption rénale du Pi (Fenwick and Vermette, 1989) et/ou une mobilisation du P dans les tissus osseux (Lopez et al., 1976; Avila et al., 2000). Même si certaines études suggèrent une synthèse de vitamine D3 au niveau de la peau chez la truite arc-en-ciel (Pierens and Fraser, 2015) exposée à la lumière bleue (440-480 nm), il est généralement admis que cette hormone doit être apportée par l'aliment. Chez les poissons téléostéens, la vitamine D3 apportée par l'aliment est stockée au niveau du foie et des dépôts de matière grasse. De ce fait, ces tissus sont considérés comme des sources importantes de vitamine D pour les humains (Bourre and Paquette, 2008). La vitamine D3 régule le P corporel en exerçant un contrôle sur l'expression de gènes codant pour les protéines membranaires impliquées dans le transport du P. Ainsi, les conséquences d'une carence alimentaire en P ($P = 0.24 \%$) sont contrebalancées par la supplémentation à forte dose de vitamine D3 (22.700 IU /kg) chez le poisson-chat. La régulation de la vitamine D3 sur le P est également associée à la sur l'expression intestinale des gènes de la famille des cotransporteurs de type II (Solute Carrier Family 34 Member, slc34) (Chen et al., 2017). En effet, une faible dose (3.621 IU /kg) de vitamine D3 entraîne au niveau rénal une surexpression des gènes slc34, tandis qu'à plus forte dose (22.700 IU /kg), un effet contraire y est observé.

Dans la figure 4.10, les organes intervenants dans la régulation sont schématisés en périphérie par des rectangles, et les flux de Pi sont indiqués avec des flèches bleues claires. Les hormones sont placées à côté de l'organe qui les sécrète. Il a été démontré que le stanniocalcine (SC) a tendance à induire une augmentation du Pi dans le sang, tandis que l'hormone parathyroïde (PTH) et le facteur 23 de croissance du fibroblaste (fgf23) ont majoritairement une action phosphaturique, tendant à réduire le

Pi dans le sang.

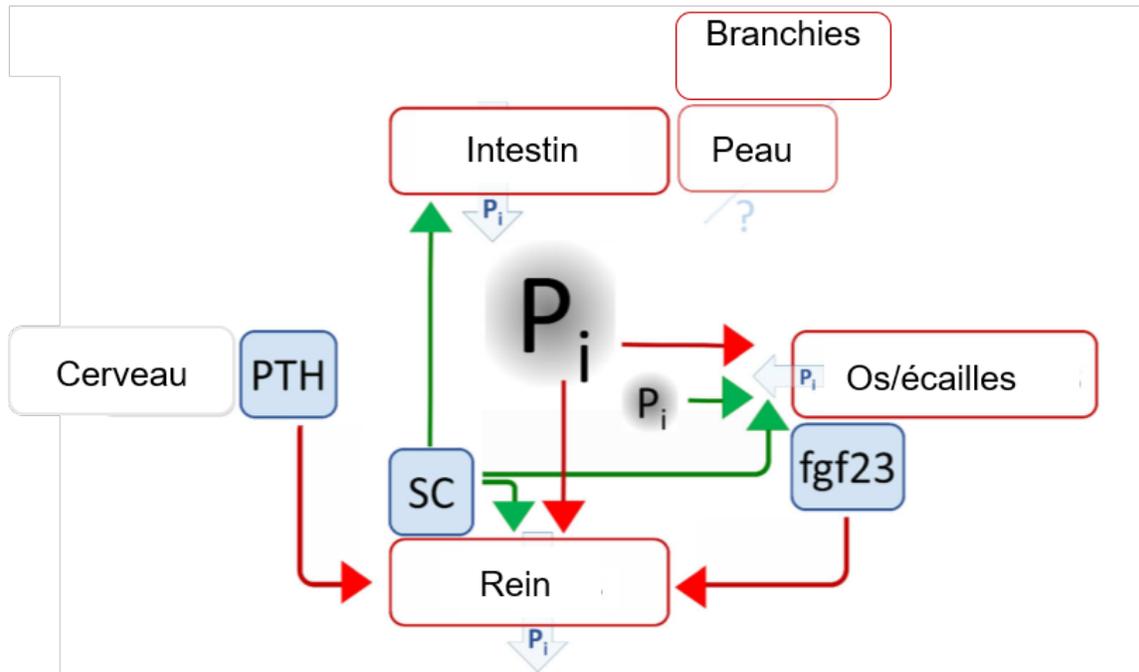


FIGURE 4.10 – Diagramme synthétique des éléments organes clés impliqués dans l'homéostasie du Pi adapté de Verri and Werner (2019). Stanniocalcine (SC), l'hormone parathyroïdienne (PTH), facteur 23 de croissance du fibroblaste (fgf23). Le grand et le petit « Pi » indiquent une hyperphosphatémie et une hypophosphatémie, respectivement. Les flèches vertes indiquent une absorption intestinale/résorption osseuse/réabsorption rénale du Pi. Celles en rouge indiquent une augmentation de l'excrétion rénale/désorption osseuse du Pi.

L'implication des organes externes comme la peau et la branchie dans cette régulation du P est jugée marginale, voire inexistante. Toutefois, cette perception est de plus en plus remise en question dans le monde scientifique. En effet, les conclusions de l'étude de Fenwick (1989) et de Sugiura (1998) de sur l'absorption du Ca^{2+} et du Pi (respectivement) externe par les poissons, avaient laissé entrevoir la possibilité d'une absorption du Pi via ces organes externes. Plus récemment, les observations de Sarker et al. (2011) ont confirmé la pertinence de cette hypothèse. Par conséquent, en conduisant cette étude sur l'absorption branchiale du P, l'objectif a été de reproduire les conditions permettant de mettre en évidence et de quantifier le Pi prélevé par les truites arc-en-ciel dans son environnement. L'approche immunohistochimique et de quantification des cotransporteurs utilisée dans cette étude est une approche pertinente qui a déjà été utilisée par plusieurs auteurs (McCormick et al., 2013, 2009; Werner and Kinne, 2001; Graham et al., 2003) afin de mettre en évidence l'adaptation impliquée au niveau des cotransporteurs NaPi. Ainsi, les résultats présentés confirment une surexpression des cotransporteurs NaPi-II au niveau des branchies avec une restriction chronique alimentaire au P. Les truites arc-en-ciel avec un tel statut vis-à-vis du P élevées dans une eau chargée en Pi soluble (2,5-5 mg/L) absorbent une quantité appréciable de cet ion phosphate au cours du temps. Les cotransporteurs NaPi sont assez bien décrits dans les reins, intestins, estomac chez les poissons téléostéens. Il existe très peu de connaissances sur la présence et l'absence, la localisation, les isoformes, et le fonctionnement des cotransporteurs NaPi au niveau des branchies. Des études en physiologie, en génomique et en transcriptome associées aux paramètres de l'eau des poissons permettront de mieux documenter cette protéine au niveau des branchies. Le saumon (*Salmo Salar*), qui effectue une migration des eaux fluviales vers la mer et inversement, pourrait être un modèle de choix.

Localisation des cotransporteurs NaPi au niveau des branchies

La mise au point du marquage immunohistochimique des cotransporteurs branchiaux a été effectuée sur des échantillons de branchies fraîchement prélevés sur un saumon qui a atteint le stade « parr ». La finalité a été de comparer le marquage avec deux anticorps : 1) NKA- $\alpha 5$, un anticorps couramment utilisé chez les poissons téléostéens pour marquer les transporteurs de sodium/potassium au niveau des ionocytes ; et 2) NaPi-II, l'anticorps développé principalement pour cette étude.

Le protocole utilisé avec l'anticorps NKA- $\alpha 5$ a été testé et validé par l'équipe du Professeur Stephen McCormick (USGS, Conte Anadromous Fish Research Center, Turners Falls, MA, USA) chez cette espèce de poisson. Le même protocole a été appliqué dans ce travail lors d'un stage dans le laboratoire du Professeur McCormick. L'utilisation en parallèle du NKA- $\alpha 5$ a permis de comparer le marquage et la localisation de ces deux protéines au niveau du tissu branchial. Les résultats, au niveau d'une même section de tissus branchiaux, sont schématisés dans la Figure 4.11.

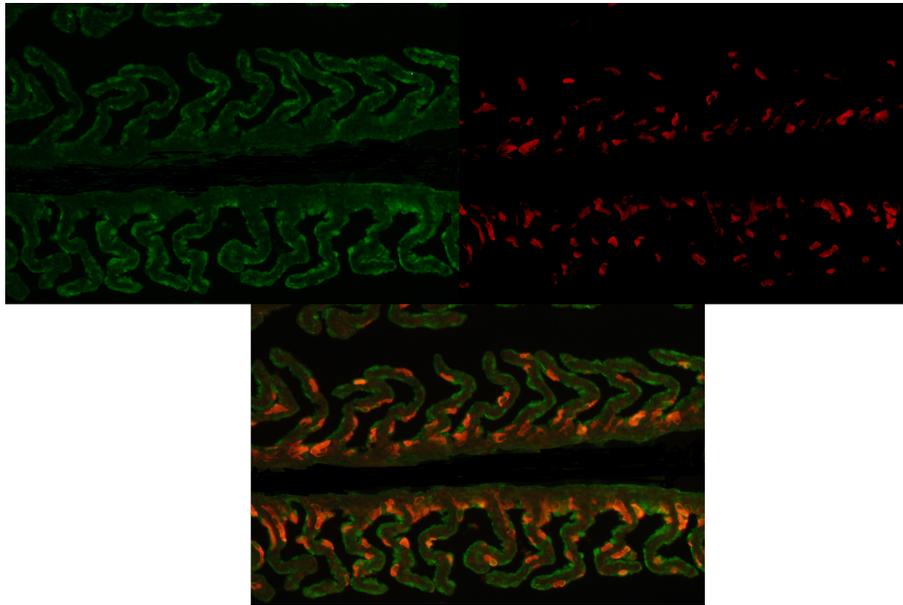


FIGURE 4.11 – Marquage des protéines NaPi (vert) et NKA (rouge) dans une section branchiale de saumon au stade « parr ». L'image en bas montre une superposition des deux images indiquant en jaune-orange la présence de ces protéines au même endroit. Barre d'échelle = 50 μ m

Les images présentées ci-dessus indiquent un marquage de la protéine NaPi-II majoritaire au niveau de l'épithélium respiratoire (EP2, partie apicale) des filaments branchiaux. En revanche, la protéine NKA est marquée au niveau de l'épithélium primaire (EP1, partie centrale). Ces observations indiquent une localisation différente au niveau des cellules branchiales chez le saumon (« parr »). Ces résultats vont dans le sens des observations de McCormick et al. (2013). En effet, ces auteurs ont mis en évidence une localisation majoritaire (non exclusive) des protéines NKA au niveau de l'EP1 chez les saumons avant la migration.

Les smolts exposés à l'eau de mer montrent une localisation exclusive de ces cotransporteurs au niveau de EP1. Nos résultats indiquent une localisation majoritairement apicale des transporteurs NaPi confirmée par les résultats du chapitre 4. Bien que l'anticorps NaPi-II utilisé dans ce travail ait été développé à partir de la séquence d'acide aminé de la truite arc-en-ciel, il apparaît qu'il se fixe bien au niveau des protéines membranaires des saumons.

Chez ces deux espèces de salmonidés, il y'a 89.37% de paires de bases identiques entre les deux cotransporteurs NaPi (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment). Cette ressemblance explique que l'anticorps développé pour la truite arc-en-ciel marque les NaPi chez le saumon. Une quantification (Q-PCR) supplémentaire des gènes *slc34* aurait pu permettre de mieux étayer nos résultats, mais l'approche protéomique a été choisie pour des raisons de temps et de compétences. Toutefois ces résultats, comparés à ceux obtenus dans le chapitre 4 suggèrent une localisation majoritaire des NaPi-II identique (dans les filaments) entre le saumon qui a atteint le stade « parr » et la truite arc-en-ciel.

Perspectives

La sévérité de la restriction alimentaire au P (faiblesse du % de P alimentaire) n'a pas été observée dans cette étude. En effet, une différence significative liée à la composition alimentaire en P n'a été obtenue qu'à partir d'un seuil de tolérance de 10% ($P > 0.1$). Cette situation s'expliquerait par le fait que la farine utilisée dans la formulation des aliments ait été débarrassée de sa fraction osseuse par tamisage. Cette approche avait pour but de limiter la présence de P peu digeste dans la moulée à des fins de meilleure calibration de la quantité de P disponible pour les poissons. Cependant, cette approche semble entraîner dans un autre sens, une disponibilité quasi totale du P ajouté dans l'aliment déficient, limitant ainsi la sévérité de cette restriction. Au vu des performances de croissance associées aux deux aliments, il est plus que pertinent de trouver un moyen de limiter la fraction osseuse dans les aliments afin d'optimiser l'absorption de cet élément. A cet effet, il est plus que pertinent de se baser sur cette approche afin de mettre en place un régime très pauvre en P qui offrirait des performances de croissance satisfaisantes pour des objectifs de production commerciale. Cela permettrait de limiter les rejets en P dans les fermes salmonicoles.

Par ailleurs, la promotion des systèmes piscicoles en recirculation (RAS) semble être justifiée, puisque les poissons carencés dans certaines conditions pourraient développer des aptitudes pour l'absorption du Pi accumulé dans le circuit. Même si ces quantités semblent être faibles dans cette étude, au bilan final, elles pourraient s'avérer non négligeables dans les conditions de grossissement. L'utilisation d'une chambre métabolique selon le protocole établi en annexe B constitue une option supplémentaire à envisager afin d'améliorer les résultats de ce travail préliminaire. Cette étude peut être conduite en même temps qu'une investigation sur le transfert d'ions à travers les membranes des tissus externes, afin de quantifier ce transport NaPi en fonction de la surface de tissus impliquée.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été de valider la technique de piégeage du P non absorbé dans les fèces de la truite arc-en-ciel, basé sur l'utilisation des sels de Fe et d'Al. L'étude a mis en évidence l'efficacité de cette technique. En effet, des réductions de moitié de la solubilité du P dans les fèces des truites arc-en-ciel ont été obtenues avec l'utilisation de cette technique, sans induction de carence pour cet élément, et sans altération des performances de croissance de la truite arc-en-ciel. L'utilisation de cette technique constituerait une approche pertinente afin de limiter les rejets en P dans les fermes salmonicoles au Québec, et par extension dans les autres pays. La restriction alimentaire au P est une approche souvent utilisée pour limiter les rejets de cet élément dans les fermes piscicoles. Cette restriction pourrait induire des situations de carences en P. Cette carence en P est corrélée à une surexpression des cotransporteurs de NaPi au niveau des branchies. Dans des conditions où le Pi est en concentration élevée dans les bassins d'élevage, les poissons carencés en P sont capables d'absorber une fraction non négligeable cet ion (environ 10 % de l'apport alimentaire quotidien). Cette source de P considérée comme inexistante devrait être considérée en raison de l'utilisation accrue des systèmes

d'élevage en recirculation. Dans ces systèmes, la concentration en Pi augmente au cours des cycles d'élevages. Ainsi, cette source de P pour les poissons pourrait occuper une fraction non négligeable au niveau des bilans en P.

Par ailleurs, ce bilan permet d'intégrer l'ensemble des sources de P susceptibles d'avoir un impact sur les rejets en P dans ces élevages. L'utilisation du DXA est pertinente pour la quantification de ces rejets totaux en P. En effet, cet outil permet d'avoir une bonne indication de la rétention en P par les truites arc-en-ciel en élevage. De plus, le DXA donne une bonne estimation de la composition proximale des truites arc-en-ciel en élevage, excepté la teneur en lipides. Cet indicateur est souvent surestimé par cette machine. Dans le cadre de cette thèse, les sujets traités présentent des aspects pratiques et fondamentaux liés à la problématique du P. Cette dualité d'approche a permis d'avoir une vision globale de la thématique du P dans l'alimentation des salmonidés.

Bibliographie

- Avila, E. M., Tu, H., Basantes, S., and Ferraris, R. P. (2000). Dietary phosphorus regulates intestinal transport and plasma concentrations of phosphate in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B*, 170(3) :201–209.
- Bourre, J.-M. and Paquotte, P. (2008). Seafood (wild and farmed) for the elderly : contribution to the dietary intakes of iodine, selenium, dha and vitamins b12 and d. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 12(3) :186–192.
- Chen, P., Huang, Y., Bayir, A., and Wang, C. (2017). Characterization of the isoforms of type iib sodium-dependent phosphate cotransporter (slc34a2) in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, and their vitamin d 3-regulated expression under low-phosphate conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(1) :229–244.
- Comeau, Y. (1989). *The role of carbon storage in biological phosphate removal from wastewater*. PhD thesis, University of British Columbia, Vancouver, Canada.
- Deschamps, M., Poirier Stewart, N., Demanche, A., and Vandenberg, G. W. (2014). Preliminary study for phenotypic description of vertebral abnormalities in triploid trout subjected to prolonged deficiency in phosphorus. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :833–839.
- Deschamps, M.-H., Kacem, A., Ventura, R., Courty, G., Haffray, P., Meunier, F. J., and Sire, J.-Y. (2008). Assessment of “discreet” vertebral abnormalities, bone mineralization and bone compactness in farmed rainbow trout. *Aquaculture*, 279(1-4) :11–17.
- Duggan, J. M., Dickeson, J. E., Tynan, P. F., Houghton, A., and Flynn, J. E. (1992). Aluminium beverage cans as a dietary source of aluminium. *Medical Journal of Australia*, 156(9) :604–605.

- Economos, C. D., Nelson, M. E., Fiatarone, M. A., Dallal, G. E., Heymsfield, S. B., Wang, J., Yasumara, S., Ma, R., Vaswani, A. N., and Russell-Aulet, M. (1997). A multi-center comparison of dual energy x-ray absorptiometers : *in vivo* and *in vitro* soft tissue measurement. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(5) :312.
- Fenwick, J. C. (1984). Effect of vitamin d3 (cholecalciferol) on plasma calcium and intestinal calcium absorption in goldfish, *Carassius auratus L.* *Canadian Journal of Zoology*, 62(1) :34–36.
- Fenwick, J. C. (1989). *Calcium exchange across fish gills. In Vertebrate Endocrinology : Fundamentals and Biomedical Implications*, volume 3. New York, USA : Academic Press. pp. 319–342.
- Fenwick, J. C. and Vermette, M. G. (1989). Vitamin d 3 and the renal handling of phosphate in american eels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-6) :351–358.
- Graham, C., Nalbant, P., Scholermann, B., Hentschel, H., Kinne, R. K. H., and Werner, A. (2003). Characterization of a type iib sodium-phosphate cotransporter from zebrafish (*Danio rerio*) kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(4) :F727–F736.
- Hansen, N. C., Hopkins, B. G., Ellsworth, J. W., and Jolley, V. D. (2006). Iron nutrition in field crops. In *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, pages 23–59. Springer, Heidelberg, Germany.
- Hébert, M. (2015). Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : Critères de référence et normes réglementaires. techreport, Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC). Édition 2015. Québec. ISBN- 978-2-550-72954-9, 216 pages.
- Henzell, S., Dhaliwal, S. S., Price, R. I., Gill, F., Ventouras, C., Green, C., Da Fonseca, F., Holzherr, M., and Prince, R. (2003). Comparison of pencil-beam and fan-beam dxa systems. *Journal of Clinical Densitometry*, 6(3) :205–210.
- Huang, H., Xiao, X., Yan, B., and Yang, L. (2010). Ammonium removal from aqueous solutions by using natural chinese (chende) zeolite as adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3) :247–252.
- Incharoen, T., Yamauchi, K.-e., Erikawa, T., and Gotoh, H. (2010). Histology of intestinal villi and epithelial cells in chickens fed low-crude protein or low-crude fat diets. *Italian Journal of Animal Science*, 9(4) :82.
- Karapınar, N. (2009). Application of natural zeolite for phosphorus and ammonium removal from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*, 170(2-3) :1186–1191.
- Kibria, G., Nugegoda, D., Lam, P., and Fairclough, R. (1996). Aspects of phosphorus pollution from aquaculture. *Naga, The ICLARM Quarterly*, 19(3) :20–24.

- Le Luyer, J., Deschamps, M., Proulx, E., Poirier Stewart, N., Robert, C., and Vandenberg, G. (2014). Responses of different body compartments to acute dietary phosphorus deficiency in juvenile triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4) :825–832.
- Lopez, E., Peignoux-Deville, J., Lallier, F., Colston, K. W., and MacIntyre, I. (1976). Responses of bone metabolism in the eel (*Anguilla anguilla*) to injections of 1, 25-dihydroxyvitamin d 3. *Calcified Tissue International*, 22 :19–23.
- Martinez, E. G. (2017). *Consequences of a Dietary Phosphorus and Calcium Depletion and Repletion Strategy in Growing-finishing Pigs*. phdthesis, Université Laval, Québec, Canada.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., and Christensen, A. K. (2009). Distinct freshwater and seawater isoforms of na⁺/k⁺ atpase in gill chloride cells of atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 212(24) :3994–4001.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., Christensen, A. K., and Björnsson, B. T. (2013). Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 216(7) :1142–1151.
- Metcalf, L., Eddy, H. P., and Tchobanoglous, G. (1979). *Wastewater engineering : treatment, disposal, and reuse*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Mitchell, A., Rosebrough, R., and Conway, J. (1997). Body composition analysis of chickens by dual energy x-ray absorptiometry. *Poultry Science*, 76(12) :1746–1752.
- Mumpton, F. A. and Fishman, P. H. (1977). The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. *Journal of Animal Science*, 45(5) :1188–1203.
- Pierens, S. L. and Fraser, D. R. (2015). The origin and metabolism of vitamin d in rainbow trout. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 145 :58–64.
- Rao, D. S. and Raghuramulu, N. (1999). Vitamin d3 and its metabolites have no role in calcium and phosphorus metabolism in tilapia mossambica. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 45(1) :9–19.
- Rose, B. S., Flatt, W. P., Martin, R. J., and Lewis, R. D. (1998). Whole body composition of rats determined by dual energy x-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *The Journal of Nutrition*, 128(2) :246–250.
- Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., and Vandenberg, G. W. (2011). Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3) :241–249.

- Srivastav, A. K., Srivastava, S. K., and Srivastav, S. K. (1997). Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(5) :841–846.
- Sugiura, S. H. (1998). *Development of low-pollution feeds for sustainable aquaculture*. Phd thesis, University of Washington, Washington, USA.
- Swarup, K., Norman, A. W., Srivastav, A. K., and Srivastav, S. P. (1984). Dose-dependent vitamin d3 and 1, 25-dihydroxyvitamin d3-induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male catfish *Clarias batrachus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 78(3) :553–555.
- Swarup, K., Pandey, A. K., Hasan, N., and Das, V. K. (1992). Dose-dependent vitamin d3, 25-hydroxyvitamin d3 and 1, 25-dihydroxyvitamin d3-induced hypercalcemia and hyperphosphatemia, and the correlative changes in the activity of ultimobranchial and parathyroid glands of the toad, *Bufo andersoni Boulenger*. *Biological Structures and Morphogenesis*, 4(4) :174–181.
- Swegert, C. V., Dave, K. R., and Katyare, S. S. (1999). Effect of aluminium-induced alzheimer like condition on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria. *Mechanisms of Ageing and Development*, 112(1) :27–42.
- Swennen, Q., Janssens, G. P. J., Geers, R., Decuypere, E., and Buyse, J. (2004). Validation of dual-energy x-ray absorptiometry for determining *in vivo* body composition of chickens. *Poultry Science*, 83(8) :1348–1357.
- Thilising-Hansen, T., Jørgensen, R. J., Enemark, J. M. D., and Larsen, T. (2002). The effect of zeolite a supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis. *Journal of Dairy Science*, 85(7) :1855–1862.
- Verri, T. and Werner, A. (2019). Type ii na⁺-phosphate cotransporters and phosphate balance in teleost fish. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 471(1) :193–212.
- Werner, A. and Kinne, R. K. H. (2001). Evolution of the na-pi cotransport systems. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(2) :R301–R312.
- Wood, S. E. (2004). *The effectiveness of dual energy X-ray absorptiometry to non-invasively determine body composition of hybrid striped bass*. PhD thesis, University of maryland, Washington D.C, USA.

Annexe A

Simulation de la digestion des matrices d'encapsulation dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Simulation de la digestion des matrices d'encapsulation dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Résumé

Cette étude préliminaire a été réalisée afin de valider l'adéquation de la matrice utilisée pour la réalisation des pièges de phosphates. L'activité lipasique dans chaque portion du tube digestif de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a été déterminée. Ensuite, une simulation de la digestion par les enzymes du tube digestif a été réalisée *in vitro* pour trois types de matrice de gras (Dritex, Jefo-Matrix-P, acide stéarique). Les résultats ont montré que l'activité lipasique est deux fois plus élevée au niveau de l'intestin proximal qu'au niveau de l'estomac et de l'intestin distal. La simulation de la libération des éléments actifs réalisés avec l'aide de billes de fluorescéine montre que la matrice Jefo-Matrix-P (Jefo Matrix pour volaille) est plus adaptée pour l'encapsulation des éléments actifs dans l'étude *in vivo* d'insolubilisation du phosphore (P) dans les fèces des poissons.

Mots clés : Lipase, activité, digestion, simulation, matrice, encapsulation, truite

Introduction

Dans le cadre l'étude « développement de pièges à phosphore encapsulé dans la moulée pour poissons », une matrice de gras sera utilisée pour encapsuler les éléments actifs. Nous souhaitons que cette matrice soit digérée tardivement. Compte tenu de l'effet chélatant des ingrédients actifs, le relargage avant l'intestin proximal peut avoir des effets négatifs. En effet, il est clairement établi que l'absorption du P se fait dans l'intestin proximal et dans une moindre mesure dans l'intestin distal (Avila et al., 2000 ; Suguira et al., 2000, Suguira et al., 2004 ; Suguira et al., 2003). Ainsi, cette étude préalable a été réalisée afin de valider l'adéquation entre la « dureté de la matrice » et la conditionnalité associée à l'efficacité de la technique dans notre postulat de base.

L'activité des lipases digestives est régulée principalement par deux principaux facteurs : le pH de la portion du tube digestif considérée et le temps de transit durant lequel la matrice dégradée est restée en contact avec ces enzymes (Furné et al., 2005). Chez la truite arc-en-ciel (TAC) en se basant sur les travaux de Bucking and Wood (2006). Il ressort que pendant le transit:

- La moulée arrive d'abord dans l'estomac où le pH est acide (2,8) pendant 60 minutes après le repas ;
- La moulée étant à un pH élevé, fait augmenter le pH aux alentours de 5 dans l'estomac pendant environ 8h après le repas ;
- Le bol alimentaire passe ensuite dans l'intestin proximal où le pH est basique (6,5-7) et y reste pendant 2 h ;
- Le bol finit dans l'intestin postérieur qui a un pH plus élevé (pH > 7), et y reste pendant 12 h.

Le pH dans les différents segments du tube digestif a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, ce n'est pas le cas de temps du transit qui a été peu étudié, étant un phénomène difficile à mesurer. On sait qu'il varie en fonction de la température (He and Wurtsbaugh, 1993) : plus la température augmente, plus le transit digestif est rapide. Le présent test sera réalisé à 12 °C qui est la

température d'élevage des truites lors des expériences de vérification *in vivo*. En se basant sur ce qui suit, les temps de transit et les valeurs de pH suivants ont été pris en compte dans le **tableau** suivant :

Tableau 1 : Temps de transit et pH dans le tube digestif de la truite selon Bucking and Wood (2006).

	Estomac		Intestin proximal		Intestin distal
Temps	1 h	7 h	2 h		12 h
pH	2,8	5	6,5		7

Du fait de la présence du cæcum pylorique, qui est un site de sécrétion importante d'enzymes digestives, l'activité lipasique est supposée plus élevée dans la partie proximale de l'intestin. Cela se traduira par une dégradation plus importante des billes de gras, à partir de l'intestin proximal.

Pour valider ces hypothèses, nous allons, dans un premier temps, déterminer l'activité lipasique dans chaque section du tube digestif de la TAC. Cette activité nous permettra de mettre en évidence l'endroit où la matrice d'encapsulation est susceptible d'être plus entamée par l'action des lipases du tube digestif. Dans une seconde phase, nous allons simuler *in vitro* la libération des éléments actifs sous l'action des extraits enzymatiques de truites. Cette simulation permettra d'avoir une idée de la cinétique probable de libération de ces agents dans le tube digestif des poissons.

Matériels et méthodes

Pour cela, l'activité lipasique a été évaluée dans trois parties du tube digestif. Dans ce travail, nous avons considéré les trois fragments suivants : l'estomac, l'intestin proximal et l'intestin distal. Un extrait enzymatique a été réalisé à partir de trois fragments issus de ces 3 parties considérées.

Préparation des extraits enzymatique

Des truites femelles haploïdes ($n = 5$), pour les deux (120 et 800g) classes de tailles, ont été nourries à satiété préalablement avant d'être sacrifiées. Elles ont été ensuite disséquées. Le tube digestif a été détaché délicatement des autres organes. L'estomac, l'intestin proximal (incluant le *cæcum pylorique*) et l'intestin distal (partie postérieure de l'estomac) ont été séparés et pesés individuellement. Chaque fragment a été ensuite homogénéisé (broyé) dans une eau froide stérile (1 :10, poids : volume). L'homogénat résultant a été centrifugé 15 minutes à 4 °C et 12 000 rpm (Morales and Moyano, 2010). Le surnageant a été ensuite délicatement prélevé, mis dans des tubes, puis stocké à -20 °C jusqu'aux dosages de l'activité lipasique et des protéines. La simulation de digestion des capsules a été réalisée aussi avec l'aide de ces homogénats.

Évaluation de l'activité enzymatique

La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée avec le kit lipase Activity Assay (n° 700640 Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Le kit fournit une procédure simple et directe pour mesurer l'activité de la lipase. La lipase hydrolyse un substrat de triglycérides pour former du glycérol qui est quantifié par colorimétrie (570 nm). La quantité de glycérol libérée est proportionnelle à l'activité enzymatique présente. Une unité de lipase est la quantité d'enzyme qui générera 1,0 μ mole de glycérol à partir de triglycérides par minute à 37 °C.

Dosage des protéines dans l'homogénat

La quantification des niveaux de protéines dans chaque fraction (estomac, intestin proximal et distal) a été réalisée selon la méthode de Bradford (1976). Pour cela, le kit Pierce Commassie (23200 Kit, Rockfort, IL, USA) a été utilisé selon les instructions du fabricant.

Matrices de protection testées

La libération des éléments actifs contenus dans nos pièges a été simulée en utilisant la fluorescéine comme indicateur. Trois matrices d'encapsulation avec

des points de fusion différentes ont été testées (Dritex Sc; Jefo-Matrix-P = 6; acide stéarique). Ces matrices de protection utilisées sont à base de gras végétale hydrogéné. La matrice Dritex Sc (Can America Foods, Toronto, Canada) est une matrice de gras à base d'huile de palme. Le point de fusion de cette matrice est atteint à 63°C. La matrice Jefo-Matrix-P (Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) est une matrice de protection développée pour une libération tardive d'antibiotiques dans le tractus digestive de la volaille¹. Sa température de fusion déterminée expérimentalement est 69°C. L'acide stéarique (C:18.0) utilisée dans cette expérience montre un point de fusion à 77°C. Le point de fusion de la matrice a été utilisé comme indicateur de la « dureté », c'est-à-dire la vitesse à laquelle elle est digérée par les lipases. Les trois types de capsules (250-500 µm) avec ces matrices ont été formés avec 30 % de fluorescéine et 70 % de matrice considérée. La fluorescéine a été utilisée comme indicateur. Libérée, elle donne une coloration détectable au spectrofluoromètre.

Simulation de la digestion intestinale des matrices de protection

Une gamme étalon de différentes concentrations (Flu = 0, 3, 7, 15, 31, 72, 156 et 300 ng/mL) de fluorescéine a été réalisée. Pour chaque concentration connue de ces standards, 20 µL de solution est prélevée et diluée avec un tampon tris 50 Nm (pH = 8). Un volume de 200 µL de cette solution est ensuite déposé dans un puits d'une plaque. En effet, la fluorescéine est très peu soluble au faible pH. Cette action aura pour effet d'avoir une solution homogène. Pour chaque solution standard, le dosage a été réalisé en triplicata. Avec cette gamme, il a été obtenu une bonne régression linéaire positive ($R^2 = 0.99$) entre l'unité de fluorescence relative (RFU) obtenue et la quantité de fluorescéine dans la solution. Ainsi, avec l'équation ($RFU = 12.15 \text{ Flu} + 73.19$), il est possible de déterminer la quantité de fluorescéine libérée lors de la simulation.

Pour cela, une quantité (10 mg) de capsules avec de la fluorescéine, pour chaque matrice a été pesée et déposée dans des tubes en verre de 5 mL. Un

¹ <https://jefo.ca/fr/innovation-developpement/technologie-jefo-matrix/>

volume de 2 mL d'homogénat d'estomac, préalablement ajusté à pH 2,8 a été déposés dans ce tube et incubés à 12 °C pendant 1 h. Lors de cette phase d'incubation, une agitation douce a été maintenue grâce à un agitateur rotatif. Au bout de l'heure d'incubation, trois prélèvements (20 µL) du surnageant ont été réalisés et dilués avec un tampon tris 50mM (pH = 8) avant d'être dosés. Puis, 2 mL d'homogénat d'estomac ont été rajoutés (pH = 5) dans le tube préalablement vidé du surnageant de la précédente fraction. Le tube a été ensuite incubé comme précédemment pendant 7 h. Les mêmes opérations ont été réalisées pour les 2 autres fractions (estomac, intestin distal) avec les temps d'incubations correspondants (tableau 1). Parallèlement, 3 tubes témoins ont été incubés avec une solution tampon citrate correspondant à chaque étape (1 h pour pH = 2,8 ; 7 h pour pH = 5 ; 2 h pour pH = 6,5 et 12 pour pH = 7). De plus, deux lots de témoins sans billes (homogénat seul et tampon citrate pH) ont été incubés à chaque étape.

Le dosage de la fluorescéine a été réalisé sur la plaque, contenant les différentes solutions de la simulation, par fluorométrie (Varioskan™ LUX Multimode Microplate Reader), à une longueur d'onde d'excitation de 494 nm et d'émission de 521 nm. La plaque a été préalablement incubée à 12 °C pendant 5 minutes.

La quantité de fluorescéine relarguée à chaque étape de la digestion a été obtenue en soustrayant la valeur obtenue de celles des témoins (pH avec billes, pH seul, homogénat seul). Afin de déterminer la quantité totale de fluorescéine contenue dans les billes, celle restante après digestion in vitro a été déterminée. Pour ce faire, les billes restantes après la digestion ont été totalement fondues (point de fusion de 80°C) dans une solution de tampon tris 50 Nm pH = 8. La quantité totale de fluorescéine restante a été obtenue en sommant les valeurs de chaque étape et de celle restante. Ainsi, le pourcentage de relargage pour chaque étape (chaque fraction du tube digestif) a été déterminé. Ce paramètre renseigne l'activité des lipases contenues dans les homogénats à chaque étape au cours du transit digestif.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées ~~porté~~ sur les données brutes pour lesquelles les conditions d'application des tests paramétriques (homogénéité des variances et évaluation de la normalité par les tests de Bartlett et de Shapiro et Wilk respectivement) ont été vérifiées. En cas de non-normalité des distributions, les valeurs ont été soumises à une transformation logarithmique. En cas de différence significative ($P < 0,05$) révélée par les analyses de variance entre les fractions, des tests de comparaisons multiples ont été réalisés, en utilisant un test *post-hoc*, le test LSD. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.0).

Résultats et discussion

L'analyse statistique montre un effet significatif de la fraction considérée du tube digestif sur l'activité lipasique (ANOVA : $F = 33,68$ et $P = 4\,465 \times 10^{-06}$). Cependant, ces résultats révèlent que le poids moyen des poissons n'a pas d'effet sur cette activité (ANOVA : $F = 0,701$ et $P = 0,416$). L'interaction entre ces 2 facteurs n'est pas significative (ANOVA : $P = 0,322$; $P = 0,729$). L'activité lipasique est significativement ($P > 0,05$) plus élevée au niveau de l'intestin proximal ($3,04 \pm 1,14$ et $2,85 \pm 1,08$ pour respectivement les individus de poids moyen 120 et 800) comparativement aux deux autres fragments (estomacs : $0,209 \pm 0,059$ et $0,193 \pm 0,059$; intestins distaux : $0,317 \pm 0,06$ et $0,392 \pm 0,08$), quelle que soit la taille des individus. Entre ces deux derniers, il n'existe pas de différence significative ($P = 0,729$) (Figure 1 A). Ces résultats confirment l'hypothèse que l'activité lipasique est plus élevée au niveau de l'intestin proximal, et ce malgré ses niveaux de protéines plus faibles.

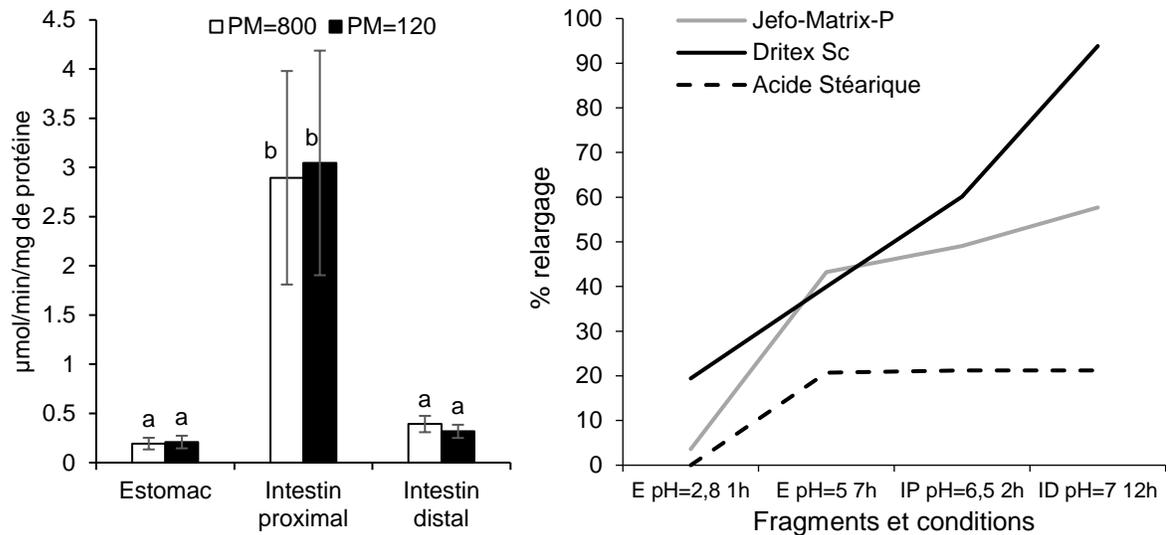


Figure 1 : à droite A) activité lipasique dans le tube digestif de la TAC (*O. mykiss*). Les valeurs représentent les moyennes (n = 6) affectées de leurs écarts types. Les lettres différentes indiquent les moyennes significativement différentes ($P < 0,05$) ; à gauche B) relargage de fluorescéine (% cumulée), simulée in vitro, en fonction de la fraction du tube digestif.

Les résultats de simulation montrent que près de 40 et 43% de la fluorescéine contenue dans les billes a été libérée au niveau de l'estomac pour la matrice Dritex Sc et Jefo-Matrix-P, respectivement. Cependant, pour l'acide stéarique le pourcentage de fluorescéine libéré à ce niveau est autour de 20%. Pour le reste du transit, la digestion de cette dernière ne change pratiquement pas (21%). Au niveau de l'intestin proximal, 60 % de la fluorescéine est libérée pour les billes faites avec la matrice Dritex Sc. En revanche pour les billes faites à base de la matrice Jefo-Matrix-P, nous obtenons une libération estimée à 49% (**Figure 1 B**).

Ces résultats suggèrent que 40% des éléments actifs sont relâchés dans l'estomac pour les deux types de billes (Dritex Sc et Jefo-Matrix-P). Autrement dit, 1,44 g sur les 3,46 g d'Al ou de Fe/kg de moulée libéré, soit une proportion de

41,6%, le seront au niveau de l'estomac. Si on considère que nous avons 1% de P dans la moulée, seuls 8,56 g de P/kg de moulée seront disponibles pour satisfaire les besoins physiologiques du poisson. Et cela, si on considère aussi que l'élément actif libéré se lie en uniquement avec le P alimentaire (ce qui n'est pas toujours le cas). Avec ce niveau de (8,56 g/kg) de P disponible dans la moulée, les risques que le poisson soit carencé sont faibles.

Les résultats de l'activité lipasique vont à l'encontre de ceux trouvés lors de la simulation. En effet, il y'a une plus grande digestion des matrices au niveau de l'estomac. Au vu de ces résultats, trois hypothèses ont été émises pour expliquer ces observations :

1— les matrices Jefo-Matrix-P et Dritex SC sont très digestes : ce qui fait que les couches externes sont digérées au niveau de l'estomac, libérant ainsi 43 et 40% de la fluorescéine respectivement, malgré l'activité lipasique relativement basse de l'estomac.;

2— La fluorescéine est majoritairement enrobée dans les premières couches externes. Par conséquent, le processus de libération de la fluorescéine est plus aisé avec la première fraction (estomac) ;

3— la fluorescéine dans les couches plus profondes est plus faible et plus difficile à libérer par les enzymes de l'intestin proximal (au bout de 2 h).

Conclusion

En comparant la libération de la fluorescéine pour ces deux types matrices au niveau de l'intestin, il est plus judicieux d'utiliser la matrice Jefo-Matrix-P qui donne la plus faible digestion cumulée. Cette simulation nous montre que les billes faites avec l'acide stéarique sont peu digestes. De ce fait, il est plus judicieux de ne pas l'utiliser pour encapsuler les éléments actifs dans notre étude. A la vue de ces résultats, il nous est apparu que les billes incorporant les éléments actifs encapsulés avec la matrice Jefo-Matrix-P étaient plus indiquées pour atteindre les

objectifs de l'étude. Ainsi, les résultats de l'expérience in vivo nous permettront de confirmer ces observations.

Références

Avila, E.M., Tu, H., Basantes, S., Ferraris, R.P., 2000. Dietary phosphorus regulates intestinal transport and plasma concentrations of phosphate in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B* 170, 201-209.

Bucking, C., Wood, C.M., 2006. Gastrointestinal processing of Na⁺, Cl⁻, and K⁺ during digestion: implications for homeostatic balance in freshwater rainbow trout. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291, R1764-R1772.

Furné, M., Hidalgo, M. C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezainé, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398.

He, E., Wurtsbaugh, W.A., 1993. An empirical model of gastric evacuation rates for fish and an analysis of digestion in piscivorous brown trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. 122, 717-730.

Morales, G.A., Moyano, F.J., 2010. Application of an in vitro gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306, 244-251.

Sugiura, S.H., Dong, F.M., Hardy, R.W., 2000. A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout based on nonfecal excretions of phosphorus and nitrogen. *The Journal of Nutrition* 130, 865-872.

Sugiura, S.H., Ferraris, R.P., 2004. Dietary phosphorus-responsive genes in the intestine, pyloric ceca, and kidney of rainbow trout. *American Journal of*

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 287, R541-R550.

Sugiura, S.H., McDaniel, N.K., Ferraris, R.P., 2003. *In vivo* fractional Pi absorption and NaPi-II mRNA expression in rainbow trout are upregulated by dietary P restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285, R770-R781.

Annexe B

Mise au point des chirurgies avant induction de la déficience alimentaire au phosphore chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

INTRODUCTION

Le projet proposé réfute la thèse selon laquelle la seule source de phosphore (P) disponible pour les poissons d'eau douce proviendrait de leur nourriture. Ce « fait » a été principalement accepté puisque les concentrations en P de leur milieu naturel sont relativement faibles (< 0,1 ppm de P dans l'eau), rendant les poissons d'eau douce incapables d'absorber des quantités appréciables de P provenant de l'environnement extérieur. Cependant, des mécanismes physiologiques semblent permettre aux truites d'absorber le P ambiant selon des observations préliminaires en système recirculé, où les concentrations en P sont autour de 1 ppm (Sarker et al., 2011). Une truite arc-en-ciel carencée en P semble donc développer la capacité d'absorber le P externe pour maintenir son homéostasie.

Afin de vérifier l'absorption externe du P, nous allons utiliser le dispositif de McKim and Goeden (1982). Ce dispositif permet de séparer les branchies et le reste du corps. Douze poissons (6 carencés en P et 6 non carencés) seront maintenus dans ce dispositif. Du P sera ajouté dans l'eau du compartiment dans lequel se trouve les branchies afin d'avoir une concentration de 1 ppm. L'autre compartiment sera rempli avec l'eau des bassins. Ainsi avec ce système ainsi préparé, l'évolution du P sera évaluée dans les 2 compartiments. Lors de la contention, l'urine et le sang seront collectés. Le P contenu dans le sang et l'urine seront dosés. Ainsi, le bilan visant à démontrer le devenir du P absorbé dans l'eau sera réalisé.

OBJECTIF

L'étape de mise au point, qui fait l'objet de ce rapport, est préalable au démarrage de l'induction de la déficience alimentaire en P dans cette expérimentation. Elle vise à :

- Maîtriser les opérations avant la contention (canulation et section spinale) ;
- Valider l'étanchéité du dispositif de même qu'une technique efficace pour empêcher le poisson de boire l'eau du compartiment branchial.

En effet, considérant que certains auteurs ont mis en évidence la capacité de la truite à absorber le P dans l'eau via l'intestin, il est nécessaire d'empêcher le poisson en contention de boire l'eau du compartiment branchial (avant).

POISSONS UTILISÉS

Le 01 février 2017, 40 poissons (de masse moyenne = 140g) provenant de la pisciculture des Monts de Bellechasse, ont été conditionnés dans le bassin 4 de l'unité 18 (380 litres). Les poissons qui seront utilisés seront préalablement maintenus à jeun dans un bassin 12 à 48h avant les chirurgies.

BAIN RECIRCULANT

Pour maintenir les branchies irriguées avec de l'eau anesthésiante (75ppm), nous utilisons un dispositif intégrant un thermostaté HAAKE de Fisons. Ce dispositif permet de faire recirculer l'eau au niveau des branchies des poissons. En outre, il permet, de maintenir la température de l'eau à 10°C. Cette température correspond à celle de conditionnement des poissons dans les bassins d'élevage.

RÉSULTATS

a- Maitrise des opérations

Un lot de 29 poissons de tailles comprises entre 122,4 g et 303 g ont été finalement utilisés. Dans un premier temps, nous avons tenté de nous familiariser à la maîtrise des chirurgies, et dans un second temps, nous avons entrepris de valider l'étanchéité du dispositif de contention lorsque la réussite des canulations le permettait.

La canulation urinaire (CU) est relativement aisée tandis que la canulation aortique (CA) et la section spinale (SP) le sont moins (fichier Excel : *compte rendu mise au point*). En effet, sur les 17 CU réalisées, deux n'ont pas été bien posées. Les 15 autres ont été bien posées. Sur ce lot de canulation urinaire réussie, les 8 essais ont permis de collecter l'urine.

La CA est plus fastidieuse à réaliser (nécessitant une concentration et une dextérité élevées). En effet, elle prend plus de temps, et sa réussite n'est toujours pas garantie. Sur les 15 CA posées, 13 ont été réussies et les deux autres ont été mal placées. Par contre, lors de la contention, nous n'avons pas pu prélever du sang dans les CAs, bien qu'elles aient été bien posées. Nous avons remarqué que la longue durée de la procédure augmente le risque de non-réveil des poissons après chirurgie selon le temps préconisé.

L'objectif des prises de sang dans la CA est de comparer le niveau d'ions phosphates dans le plasma avant, et pendant la contention. Dans l'optique de maximiser les chances de réveil du poisson après les chirurgies et se prémunir des risques d'échec lors de CA, nous préconisons de remplacer la CA par deux

prises de sang (avant et tout juste à la fin de la contention) dans l'optique de maximiser les chances de réveil du poisson après les chirurgies, et se prémunir des risques d'échec lors de CA, et ce d'autant plus que la collecte de sang à travers ce tube n'est pas garantie.

La réussite de la SP est plus aléatoire comparativement aux autres canulations. Sur les 26 SPs effectuées, 11 tentatives ont donné une paralysie totale du reste du corps (arrière de l'opercule) alors que six tentatives ont donné une paralysie partielle. Neuf tentatives se sont terminées en échec. Cette opération s'accompagne d'un risque d'apparition d'hémorragie. En effet, en cherchant à sectionner la moelle épinière à travers les stries de la colonne vertébrale, il apparaît des risques de toucher les organes en contrebas (par exemple le cœur). Cela occasionne des hémorragies. Ainsi, nous préconisons une longueur seuil d'aiguille à ne pas dépasser en rentrant cette dernière par le dos (figure 3). Cette longueur dépend de la taille du poisson (15 mn pour 140-200 g et 20 m pour 200-300 g). De ce fait, une marque délimitant ce seuil est nécessaire.

Lors de nos premières chirurgies, nous avons choisi de procéder selon l'ordre établi dans le protocole mis en place par l'étude pilote (2014071-1). Ce protocole préconise de réaliser d'abord la canulation aortique, puis urinaire, et ensuite finir par la section spinale. Cependant, nous avons remarqué que souvent la dernière étape, à savoir la section spinale, n'est pas totale après deux essais. Dans ce cas, le poisson est euthanasié même si les chirurgies précédentes fastidieuses pour l'opérateur et stressantes pour le poisson ont été réalisées avec succès. Ainsi, nous préconisons de démarrer dorénavant par la SP. Si elle est totale, alors les autres chirurgies seront réalisées.

b- Validation de l'étanchéité du dispositif de contention

Afin de mettre en évidence l'étanchéité du dispositif et l'absence de passage d'eau vers le compartiment arrière via le tube digestif, un colorant (fluorescéine) a été utilisé.



Figure 1: Contention de truites avant et après coloration à la fluorescéine du compartiment branchial.

MISE AU POINT DES CHIRURGIES AVANT INDUCTION DE LA DÉFICIENCE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL- 2016090-01

Laboratoire du Dr. Grant Vandenberg en collaboration avec la DSV

Waly Ndiaye, Marie-Hélène Deschamps, Annie Pelletier

Une quantité de 4 mg de fluorescéine ont servi à colorer le compartiment après que le poisson a été placé dans la boîte de contention (figure 1).

Des échantillons d'eau ont été prélevés dans les 2 compartiments au cours de la contention afin de vérifier si la fluorescéine passait à travers la membrane branchiale. La fluorescence (RFU) à 600 nm dans chaque échantillon a été mesurée au VARIOSKAN.

Trois contentions ont été réalisées afin de mettre en évidence l'étanchéité du dispositif :

La première contention a été réalisée sur un poisson de 198,8g (le 06/02/2017). La SP était totale. La CA et la CU ont été bien posées. Un tube à ballonnet gonflé au niveau de l'œsophage a été placé 1h30 (en jaune) après sa mise en contention. Ce tableau ci-après résume la fluorescence observée dans les 2 compartiments au cours des 3h de contention.

Temps après mise en boîte	RFU C branchial			RFU arrière		
		Moyenne		Moyenne		
0min	6036	6077	6057	57,35	57,13	57,24
25min	6162	6158	6160	11,08	10,64	10,86
1h	6082	6119	6100	9,36	9,41	9,38
1h30	6106	6133	6119	11,18	11,01	11,10
2h	6099	6055	6077	11,95	11,35	11,65
2h30	6098	6110	6104	13,44	13,71	13,57
3h	6188	6214	6201	24,73	24,52	24,62

Les résultats ne montrent pas de passage (augmentation significative de la RFU arrière) de la fluorescéine du compartiment avant, vers celui en arrière. De plus, l'urine collectée au début ne montre pas de coloration. Nous pouvons donc conclure que le dispositif de contention avec la membrane (avec le diamètre d'ouverture adéquate en fonction du poisson) garantit l'étanchéité entre les 2 compartiments lorsque le poisson est placé.

La deuxième contention a été réalisée sur un poisson de 162,8 g pendant 2h (le 07/03/2016). Cette fois, la CU et le tube à ballonnet n'ont pas été posés pour permettre au poisson d'uriner dans le compartiment arrière si le poisson boit l'eau du compartiment avant (colorée avec de la fluorescéine).

Temps après mise en boîte	RFU Avant		RFU Arrière	
5 min	10576,7	10478	122,71	143,408
30 min	10069,5	9866,78	44,5217	106,916
1h	9935,22	9702,17	67,6019	111,756
2h	9764,17	9802,71	121,307	139,335

Les résultats de cette deuxième contention ne montrent pas d'augmentation de la RFU dans le compartiment arrière. Ces résultats laissent penser que la

MISE AU POINT DES CHIRURGIES AVANT INDUCTION DE LA DÉFICIENCE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL- 2016090-01

Laboratoire du Dr. Grant Vandenberg en collaboration avec la DSV

Waly Ndiaye, Marie-Hélène Deschamps, Annie Pelletier

fluorescéine n'est pas passée du compartiment avant vers celui arrière, via les urines.

La troisième contention a été effectuée avec un poisson de 193,34 g (le 28/03/2017). Elle a duré plus longtemps (16h17) que les 2 précédentes. La CU a été posée pour collecter l'urine. Nous avons choisi de procéder ainsi afin de vérifier que la dilution de l'urine dans l'eau du compartiment arrière soit est responsable de la non-perception de l'augmentation de RFU arrière. En d'autres termes, le dosage du RFU dans l'urine permettrait de mettre en évidence plus sensiblement que le poisson boit l'eau en avant et transmet la fluorescéine par les urines.

Temps après mise en boîte	RFU avant			RFU arrière		
20 min	7803,75	7736,92	7852,93	14,5786	14,4801	14,9662
2 h	7438,19	7486,43	7489,97	15,2642	15,0989	15,2682
5h17	7208,7	7205,34	7194,39	13,2967	12,989	13,3971
16h17	7812,31	7731,59	7780,84	13,0127	13,0716	13,1717

Les résultats de cette dernière ne montrent pas de présence de coloration à la fluorescéine dans les tubes d'urines collectés malgré le fait que le poisson soit maintenu au moins pendant 5h après la mise en boîte.

La quatrième contention a été réalisée sur un poisson de 221,52 g. Elle avait pour but de collecter le maximum d'urine possible. La section spinale qui semblait totale au réveil, n'a pas tenu. Alors, le poisson agité dans le dispositif est sorti de celui-ci. Ainsi, la manipulation a été arrêtée et le poisson est euthanasié.

PROTOCOLES PRÉCONISÉS

Compte tenu de ces observations, nous préconisons d'adapter le protocole initialement prévu. Ainsi, les étapes suivantes seront réalisées selon cette ordre :

a- Bain anesthésiant (procédure inchangée)

Matériels

- MSS 222 ;
- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) ;
- Seau ;

Procédure

- Mettre 16,6 litres d'eau neuve dans le seau ;

- Mélanger dans un erlenmeyer et ajouter 1,25mg de MS22 et 2,5 mg de bicarbonate ;
- Verser le mélange dans le seau et remuer avec une épuisette pour bien mélanger la solution.

b- Injection de Ketoprofem (procédure inchangée)

Matériel

- Solution de **Ketoprofem** ;
- Seringue 1cc ;
- Aiguille 23 G ;

Procédure

- Prélever le volume de de kétoprofem correspondant au poids du poisson (0,02 ml/100 g) dans la seringue ;
- Injecter le volume prélevé intramusculaire (dans la partie arrière du corps sur le dos) au poisson anesthésié après l'avoir pesé.

c- Prélèvement de sang (pour remplacer la mise en place d'une CA)

Matériel

- Solution de saline héparine ;
- Seringue 1cc ;
- Aiguille 23 G ;

Procédure

- Insérer l'aiguille montée sur une seringue sous la peau de la ligne médiane ventrale du pédoncule caudal du poisson anesthésié ;
- Faire progresser l'aiguille jusqu'à la base de la colonne vertébrale ;
- Retirer l'aiguille d'une fraction de millimètre et prélever 500 µl de sang ;
- Retirer l'aiguille tout en comprimant la zone d'entrée de l'aiguille ;
- Injecter le sang prélevé dans le tube Eppendorf rapidement et mélanger avec la solution de saline héparine ;

- Continuer à appuyer sur la plaie du poisson tout en le maintenant son corps dans le seau contenant l'anesthésiant.



Figure 2: Prélèvement du sang au niveau du pédoncule caudal (source : http://www.ccac.ca/Documents/Education_fr/POC/4_Prelevements_sanguins_sur_des_poissons_a_nageoires.pdf)

d- Section spinale

Matériel

- Aiguille à ponction lombaire 26 G.

Procédure

- Maintenir le poisson droit avec la civière ;
- Insérer l'aiguille au niveau de la ligne médiane dorsale et perpendiculairement à la base de l'opercule (figure 3) ;
- Rentrer l'aiguille de façon droite jusqu'à toucher la colonne vertébrale,
- Ne pas dépasser une profondeur de 15 mm pour les poissons 150-200 g et 20 mm pour des poissons de 200-250 g ;
- Avec de petits mouvements en avant et en arrière et sur les côtés, essayer de toucher la moelle épinière ;
- Quand la moelle épinière est touchée, le poisson a un mouvement réflexe de la queue, alors maintenez l'aiguille en place et avec les mêmes petits mouvements sur les côtés sectionner la moelle ;
- Sortir l'aiguille et appuyer sur la plaie afin d'arrêter l'hémorragie (s'il y'a lieu) ;
- Transférer le poisson dans un bac de réveil avec de l'eau neuve ;
- Au réveil du poisson, vérifier si le poisson est capable de mouvoir sa queue ;
- Si la paralysie est totale (aucun mouvement de la queue), alors la procédure SP est terminée, sinon anesthésier de nouveau le poisson et refaire une nouvelle et dernière tentative ;



Figure 3: Profondeur de pénétration et positionnement de l'aiguille lors de la section spinale

e- Canulation urinaire (tel que décrite dans l'étude pilote)

Matériel

- 1 canule urinaire (CU)-annexe rapport étude pilote-P-47 ;
- 1 seringues de saline 1cc + aiguille 23G ;
- 1 pince Adson ;
- 1 porte aiguille ;
- Vicryl 4-0 RB-1 (17 mm).

Procédure

- Placer le poisson dans sa civière, et faire fonctionner le bain anesthésiant afin d'irriguer les branchies pendant l'opération ;
- Remplir le CU avec de la solution saline (utiliser une aiguille tronquée) ;
- Laisser l'aiguille et la seringue connectées sur le CU pour éviter qu'il ne se vide ;
- Soulever l'orifice urogénital afin de trouver la papille urinaire (Figure 4) ;
- Insérer le CU délicatement jusqu'à la bille ;
- Fixer la bille sur la papille à l'aide d'une suture ;
- Suturer la canule sur la nageoire anale à l'aide de deux sutures ;
- Pousser 0,5 ml de saline dans la canule, retirer délicatement l'aiguille et laisser dégoutter ;
- Peser le microtube avant d'insérer le CU pour les prélèvements.

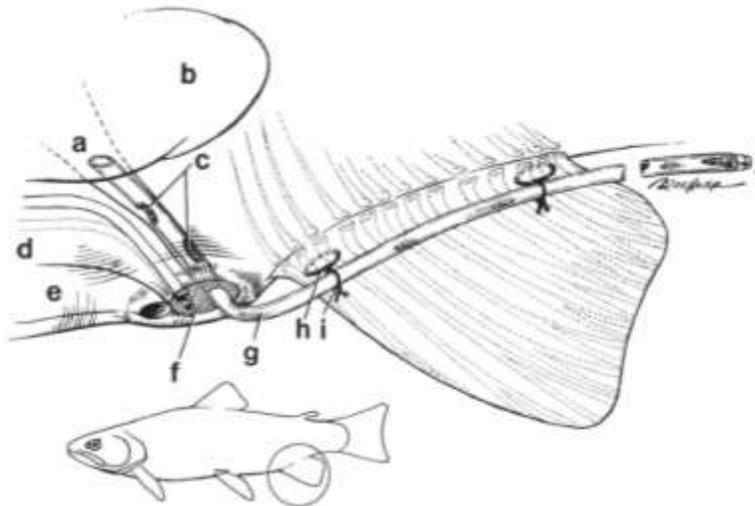


Figure 4 : Canulation urinaire (CU) de truite arc-en-ciel : (a) vessie urinaire; (b) vessie natatoire; (c) ouvertures dans la paroi du tube canulaire; (d) canaux spermatiques; (e) intestin distal; (f) papille uro-génitale; (g) canule; (h) boucle de suture de canule autour des bases de deux rayons des nageoires; (i) suture autour de la canule. Source : *Caron et al 2016*.

f- Contention (procédure inchangée)

Matériel

- Dispositif de contention (boîte, membrane, civière en PVC, etc.) ;
- Dispositif de recirculation de l'eau (celui utilisé pour maintenir le poisson en anesthésie lors des opérations) avec les conduits pour le connecter à la boîte de contention ;
- Petit compresseur à air avec son bulleur.

Procédure

- Fixer la membrane de latex dans la boîte. Celle-ci est choisie en fonction de la grosseur du poisson ;
- Placer la civière selon la grosseur du poisson ;
- Remplir d'eau douce de chaque côté. Le niveau de l'eau doit être égal afin de ne pas établir de pression négative ;
- Insérer le poisson par la tête en premier ;
- Avancer le poisson pour que les nageoires pectorales soient dans le compartiment branchial ;
- S'assurer que la membrane de latex ne soit pas directement sur le cœur afin de ne pas le comprimer ;
- Mettre du bullage d'air dans le bain recirculant ;
- Cacher la boîte avec une toile opaque et fermer les lumières afin de réduire le stress de l'animal ;
- Ne pas maintenir le poisson en contention au-delà de 3h.

Au regard de ces modifications, nous prévoyons de réaliser les chirurgies le matin et la contention l'après-midi pendant la phase d'expérimentation. Selon la procédure de l'étude pilote (P-47), les chirurgies sont réalisées la veille de la contention. Le poisson préparé (avec CA, CU et SP posées) est maintenu soit dans une boîte de contention, soit dans une civière accrochée dans un bassin jusqu'au lendemain. De ce fait, en réalisant toutes les procédures sur une journée, nous éviterons de maintenir les truites en contention prolongée. Cela limitera le stress occasionné par les procédures et augmentera nos chances d'avoir des résultats fiables. À la fin de la journée, les truites utilisées pour la contention seront euthanasiées.

POINTS LIMITES ASSOCIÉS AU NOUVEAU PROTOCOLE

Points limites généraux :

- Score 3 : deux observations tous les 15 min, traitements appropriés et suivi quotidien de l'animal (examen physique) ; euthanasie à prévoir.
- Score 4 : euthanasie de l'animal.

a- Prise de sang

Conditions	Pointage
Si la perte de sang liée à la prise de sang ne s'arrête pas après 15 s	4

b- Section spinale

Conditions	Pointage
Si mouvement après 1 ^{ère} tentative (anesthésie et paralyser de nouveau)	3
Si la perte de sang liée à la section ne s'arrête pas après 1 min	4
Si la colonne vertébrale est transpercée	4
Si plus de 2 sections spinales sont nécessaires	4
Infection au niveau du site d'insertion	3

c- Canulation urinaire

Conditions	Pointage
Présence de sang dans les urines ou la canule	4

d- Contention

Conditions	Pointage
Lésion corporelle	3
Serrement excessif de la membrane séparatrice	3
Si la fréquence respiratoire baisse de 90 battements 90/ min	4

CONCLUSION

Nous pouvons maintenant affirmer que nous possédons l'expertise pour effectuer la canulation urinaire (fichier Excel : *compte rendu mise au point*), la section spinale qui sont essentielles avant la contention des poissons. Pour pallier les difficultés liées à la canulation aortique, nous avons choisi de faire seulement des prises de sang avant et après la contention. Cette modification est un compromis afin de nous donner plus de chances d'arriver jusqu'à la contention, tout en ayant la possibilité faire un bilan de P convenable.

L'étanchéité du dispositif est confirmée par les résultats de contention. Il semble, que lors de la contention, le poisson ne boit pas assez suffisamment d'eau pour que cela ne soit détectable dans le compartiment arrière. Compte tenu de ces résultats, nous préconisons de ne pas utiliser de tube à ballonnet ou tout autre moyen (bouchon buccal) afin de limiter l'inconfort du poisson. L'absence de ce dispositif, ne biaiserait pas les résultats de notre bilan en P par une absorption intestinale des phosphates inorganiques par le poisson carencé.

Références

- SARKER, P. K., FOURNIER, J., BOUCHER, E., PROULX, E., DE LA NOÛE, J. & VANDENBERG, G. W. 2011. Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, 168, 241-249.
- MCKIM, J. M. & GOEDEN, H. M. 1982. A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gills of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 72, 65-74
- CARON S., PELLETIER A.; PROULX E. 2016. Mise au point d'une méthode de canulation urinaire et aortique chez la truite-Arc-en-ciel-2014071-1. **Rapport soumis au CPAUL.**