

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN ENVIRONNEMENT

PAR
HÉLÈNE LEMIEUX
B. SC. BIOLOGIE

LES LIMITES PHYSIOLOGIQUES DE LA CROISSANCE ET DE L'EFFICACITÉ DE
CONVERSION DES ALIMENTS CHEZ LA MORUE FRANCHE (*Gadus morhua*)

DECEMBRE 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'identifier des sites potentiels de limitation du taux de croissance maximum chez la morue franche (Gadus morhua). Pour ce, 40 morues (650-1150 g) ont été divisées au hasard en 5 groupes: 1 groupe témoin (injecté avec une solution saline) et 4 groupes expérimentaux recevant différentes doses d'hormone de croissance bovine recombinante (1; 2; 4 et 10 $\mu\text{g rbST g masse humide}^{-1} 2 \text{ semaines}^{-1}$) par injection dans la cavité abdominale. À la fin de l'expérience, nous avons mesuré l'activité des protéases totales dans l'estomac, de la trypsine et de la chymotrypsine dans les appendices pyloriques, de la phosphatase alcaline et de la γ -glutamyl transpeptidase dans l'intestin ainsi que la concentration de protéines dans les tissus digestifs et le muscle blanc. Nous avons aussi mesuré le taux de croissance, le taux d'ingestion et l'efficacité de conversion des aliments de chaque individu. Les résultats démontrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux de croissance, du taux d'ingestion ou de l'efficacité de conversion des aliments entre les différents groupes. Cependant, il semble qu'avec une augmentation de la dose d'hormone de croissance bovine, l'activité des protéases totales dans l'estomac (en $\text{U mg protéines}^{-1}$) augmente alors que la concentration de protéines dans le même tissu diminue. Les activités de la trypsine et la chymotrypsine dans les appendices pyloriques ainsi que la phosphatase alcaline et la γ -glutamyl transpeptidase (lorsqu'elle est exprimée en U g poisson^{-1}) dans l'intestin démontrent une corrélation positive avec le taux de croissance. Toutes ces enzymes sont aussi corrélées avec le taux d'ingestion sauf pour la trypsine exprimée en $\text{U mg protéines}^{-1}$. De plus, l'activité de la trypsine est la seule parmi les activités mesurées qui démontre une corrélation positive significative avec l'efficacité de conversion des aliments. Nous concluons en proposant que la trypsine est la seule

enzyme protéolytique qui pourrait exercer un effet limitant sur le taux de croissance de la morue franche.

REMERCIEMENTS

Gros merci, Pierre, tu as su modeler dans ma tête un avenir qui me fait rêver en me transmettant ta passion pour la physiologie. Si Platon était toujours de ce monde, il t'aurait certainement qualifié d'essence d'un directeur de thèse. Patience, compréhension, sens de l'humour et disponibilité. Que demander de plus?

Une équipe parfaite qui fût complétée par Jean-Denis Dutil à qui je décerne la palme d'or du codirecteur. Et un merci tout spécial pour m'avoir permis de travailler durant la réalisation de ma maîtrise : ce qui a grandement contribué au maintien de mon moral et de mes finances!

J'ai aussi été accueillie à l'Institut Maurice Lamontagne par une équipe de techniciens hors pair! Énorme merci à Yves Gagnon et Mario Péloquin. Comment aurais-je pu traverser la phase expérimentale tout en gardant le sourire sans bénéficier de votre aide précieuse. Et en dépassant le cadre de votre mandat vous m'avez en plus offert un appui moral inestimable.

Après de long mois à la recherche d'une compagnie pouvant offrir de l'hormone de croissance bovine à un prix abordable, nous commençons sérieusement à désespérer! Mais nous sommes alors tombé sur le Dr. Winston Samuels (Monsanto, Canada) qui nous a généreusement offert un don de cette substance très importante pour la réalisation du projet. MERCI!

Merci au Dr. Claude Maroi, biochimiste au centre hospitalier régional de Rimouski, pour m'avoir si bien accueilli dans ses laboratoires et m'avoir offert l'aide technique ainsi que le matériel nécessaire pour les dosages de l'hormone de croissance plasmatique effectués au cours des expériences préliminaires.

Comment oublier Nathalie LeFrançois, sans qui le laboratoire n'aurait pu être le même! Merci pour ton aide technique, tes précieux conseils et surtout pour m'avoir fait rigoler même dans les pires moments. Va-t-on pouvoir se passer de toi au laboratoire?

Je n'aurais pu traverser ces trois années sans l'appui de mes parents. Merci d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir permis de me rendre où je suis présentement. Il ne fait aucun doute dans mon esprit que sans vous, je n'y serais pas!

Finalement, un merci tout particulier à ceux et celles qui m'ont apporté le divertissement et l'appui moral. Comment aurais-je pu m'en sortir sans en décrocher de temps en temps. Merci à ma sœur France et à mes ami(e)s, en particulier Vio. Merci à mes colocs, Marie et Véronique, quel bonheur de partager mon milieu de vie avec vous deux durant la phase terminale de ma rédaction.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	.ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	xi
Introduction.....	xi
Matériel et méthodes.....	xii
Résultats et discussion.....	xiv
CHAPITRE I.....	1
Introduction.....	1
Problématique.....	1
Fonctions des enzymes étudiées.....	2
Facteurs limitant la digestion et l'absorption des aliments.....	3
Hormone de croissance chez les poissons.....	8
Hypothèses et objectifs.....	10
CHAPITRE II.....	12
Do digestive enzymes set a limit on growth rate and food conversion efficiency in Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)?.....	13
Abstract.....	14
Introduction.....	15
Methods.....	17
Experimental animals.....	17
Growth experiments.....	17
Tissue extraction.....	18
Enzymatic assays.....	20

Protein assays.	22
Chemicals.	22
Statistical analysis.	22
Results.	24
RbST effects.	24
Digestive enzyme activities.	24
Discussion.	35
RbST effects.	35
Digestive enzyme activities.	37
Acknowledgements.	41
CHAPITRE III.	42
Conclusion.	42
REFERENCES.	45

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
Table 1 : Body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency (mean \pm standard error) in control injected with saline solution and cod injected with different doses of rbST.	32
Table 2 : Coefficient of determination (R^2), significance of the regression coefficient (P) and equation of the linear regressions between relative mass of the stomach, pyloric caeca and intestine and individual body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency in the Atlantic cod.	33
Table 3 : Coefficient of determination (R^2), significance of the regression coefficient (P) and equation of the linear regressions between digestive enzyme activities and individual body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency in the Atlantic cod.	34

LISTE DES FIGURES

	PAGE
Figure 1 : The effect of rbST on stomach protein content and protease activities in Atlantic cod. (A : control injected, B : $1.0 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, C : $2.0 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, D : $4.0 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, E : $10.0 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$).	27
Figure 2 : Relationship between trypsin activity in the pyloric caeca and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.	28
Figure 3 : Relationship between chymotrypsin activity (square root transformed) in the pyloric caeca and individual (A) growth rate, (B) food intake and (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.	29
Figure 4 : Relationship between ALP activity in the intestine and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.	30
Figure 5 : Relationship between GGT activity in the intestine and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	: Hormone adrénocorticotropique
ALP	: Phosphatase alcaline
BGH	: Hormone de croissance bovine
bST	: Somatotropine (ou hormone de croissance) bovine
GGT	: γ -glutamyl transpeptidase
GH	: Hormone de croissance (ou somatotropine)
nm	: Nanomètre
GHRH	: Hormone de libération de l'hormone de croissance
rbST	: Hormone de croissance bovine recombinante
P	: Signification du coefficient de régression
R ²	: Coefficient de détermination de régression
SBTIs	: Inhibiteurs de la trypsine contenus dans la farine de soja
TAME	: N α -p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester
U	: Unités d'activité enzymatique
w/v	: poids par volume

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

INTRODUCTION

Chez les poissons, comme chez les endothermes (Karasov, 1986; Weiner, 1987, 1989, 1992; Peterson et al., 1990; Saarikko et Hanski, 1990; Diamond, 1991; Hammond et al., 1994), la limite supérieure du budget énergétique pourrait être déterminée par la capacité du tube digestif à assimiler les nutriments de la nourriture (Blier et al., 1997). Chez la morue franche (Gadus morhua), par exemple, le taux de croissance augmente et atteint un plateau alors que le taux d'ingestion de la nourriture continue d'augmenter (Houlihan et al., 1988). Cette observation suggère que la capacité de croissance est limitée par des processus physiologiques ultérieurs à l'ingestion de nourriture.

L'objectif de cette étude est de déterminer si une ou plusieurs enzymes digestives peuvent limiter les capacités digestives des poissons et ainsi déterminer leur taux de croissance maximal et leur efficacité de conversion des aliments. Nous avons mesuré le taux de croissance, le taux d'ingestion et l'efficacité de conversion des aliments chez des morues nourries à satiété. Dans le but de dépasser la croissance optimum, une partie des poissons ont été injectés avec différentes doses d'hormone de croissance bovine. Finalement, l'activité des différentes enzymes digestives a été mesurée dans les tissus des poissons à la fin de l'expérience.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les morues franches (40-50 cm) ont été capturées à l'aide d'un chalut de fond dans le golfe du Saint-Laurent au large de Saint-Anne-des-Monts (Québec, Canada) en juin 1996. Les poissons ont été gardés dans des réservoirs d'eau salée sous photopériode naturelle et habitués aux bassins pendant environ 4 mois avant le début des expériences. Durant l'acclimatation aux bassins, la température était d'environ 4 à 8°C et les poissons recevaient une ration de maintien de capelan (Mallotus villosus).

Les expériences se sont déroulées dans des réservoirs circulaires (1,5 m³ de volume) munis d'un système de recirculation partielle d'eau et de contrôle de la température. Chaque réservoir était séparé en 4 compartiments par des cloisons permettant à l'eau de circuler librement tout en maintenant les poissons séparés. Chaque compartiment contenait une seule morue. La température a été amenée graduellement à 10°C et ensuite maintenue ainsi durant les 4 semaines d'expérimentation. Le niveau d'oxygène dissout était maintenu au dessus de 80% de saturation. Des fluorescents contrôlés par une minuterie automatique permettaient de maintenir la photopériode naturelle.

Les morues ont été séparées en 5 groupes, un groupe témoin et 4 groupes expérimentaux recevant différentes doses (1; 2; 4 et 10 µg g poisson⁻¹ 2 semaine⁻¹) d'hormone de croissance bovine recombinante (rbST, Monsanto, Canada). Chaque poisson a reçu une injection dans la cavité abdominale correspondant à 2 µl g poisson⁻¹ à chaque deux semaines. Le groupe témoin a été injecté avec la même solution saline (NaCl 7 g l⁻¹) qui a servi à diluer l'hormone de croissance. Les morues ont été mesurées et pesées au début, après deux semaines et à la fin des expériences. Ces manipulations ont été effectuées en même temps que l'injection de l'hormone de croissance, sous

anesthésie au méthomidate à une concentration de 5 mg ml^{-1} (Sigma Chemical Co., Saint-Louis, États-Unis). Chaque morue a été nourrie à satiété 3 fois par semaine. Le taux de croissance (en pourcentage de la masse initiale par jour), le taux d'ingestion (en pourcentage de la masse initiale par jour) et l'efficacité de conversion des aliments (en pourcentage de la consommation totale de nourriture convertie en gain de masse) ont été mesurés individuellement pendant toute la durée des expériences.

Après 4 semaines, les morues ont été sacrifiées par un coup de bâton sur la tête. L'estomac, l'intestin, les appendices pyloriques et un extrait de muscle et de foie ont été prélevés. Nous avons mesuré l'activité de la phosphatase alcaline et de la γ -glutamyl transpeptidase dans l'intestin, de la trypsine et de la chymotrypsine dans les appendices pyloriques et des protéases totales dans l'estomac. Le contenu en protéines dans les tissus digestifs et le muscle ainsi que le contenu en eau dans le muscle et le foie ont été mesurés. Les activités enzymatiques sont exprimées en U g tissu^{-1} , en $\text{U mg protéine}^{-1}$ ou en U g poisson^{-1} .

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA. Un test de Bartlett a été utilisé pour tester l'homogénéité des variances entre les cinq groupes. Pour les variables ayant des variances homogènes, un test d'ANOVA a été utilisé pour déterminer si les groupes différaient entre eux. Nous avons par la suite utilisé un test a posteriori (test de Tukey) pour identifier les différences entre les groupes spécifiques. Pour les autres variables, un test de Kruskal-Wallis a été utilisé suivi d'un test a posteriori (test de Mann-Whitney). Les relations entre la masse, le taux de croissance, le taux d'ingestion, l'efficacité de conversion des aliments et l'activité des enzymes ont été examinées à l'aide de régressions linéaires simples. L'activité de la

chymotrypsine a été transformée (racine carrée de l'activité) pour rencontrer les prémisses de la régression. Le seuil de probabilité des tests statistiques a été fixé à 0.05.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'augmentation de la croissance et/ou du taux d'ingestion à la suite d'une administration d'hormone de croissance bovine a été démontrée maintes fois chez les poissons (Danzmann et al., 1990; McLean et al., 1990; Almendras et al., 1993; Cavari et al., 1993; Degani et Gallagher, 1985; Prack et al., 1980; Weatherley et Gill, 1987; Wilson et al., 1988). La plupart de ces études ont été réalisées chez des alevins ou des juvéniles mais des études sur les saumons coho sub-adultes (Oncorhynchus kisutch; Down et al., 1988) et le brochet vermiculé (Esox americanus vermiculatus; Weatherley et Gill, 1987) ont aussi démontré une augmentation du taux de croissance à la suite de l'administration d'hormone de croissance. Dans la présente étude, nous n'avons pas noté de différences de taux de croissance, de taux d'ingestion ou d'efficacité de conversion des aliments chez les morues recevant différentes doses d'hormone de croissance.

Une expérience préliminaire a cependant permis de démontrer qu'une dose importante d'hormone de croissance bovine ($30 \mu\text{g g poisson}^{-1} 2 \text{ semaines}^{-1}$) cause une exophthalmie et un noircissement de la peau, symptômes associés aux réactions de stress chez les morues. Ces symptômes ne peuvent être uniquement causés par le stress de l'injection puisqu'ils n'étaient pas présents chez les témoins injectés avec la solution saline. Dans une autre expérience, les saumons Atlantiques (Salmo salar) injectés à l'hormone de croissance porcine ont aussi présenté un noircissement des nageoires (Komourdjian et al., 1976). Ces auteurs ont formulé l'hypothèse que ce symptôme

pourrait être causé par la contamination de l'hormone de croissance (GH) injectée par de l'ACTH (hormone adrénocorticotropique). Cette hormone adrénocorticotropique qui, tout comme la GH, est présente dans le lobe antérieur de la glande pituitaire, est impliquée dans les réponses secondaires au stress (Jobling, 1994). Cependant, dans la présente expérience, l'utilisation d'hormone de croissance recombinante écarte cette possibilité. Chez les humains, l'hormone de croissance est libérée lors des périodes de stress (Vander et al., 1989). Ce pourrait également être le cas chez les poissons et l'action de cette hormone sur les réactions de stress pourrait être médiée par une stimulation directe ou indirecte de l'ACTH. Dans cette étude, nous ne pouvons savoir si les effets de l'hormone de croissance sur la croissance ou la consommation de nourriture ont été masqués par un effet plus prononcé sur les réactions de stress chez la morue.

Cette expérience n'a pas non plus fait ressortir de différences d'activités enzymatiques ou de contenu en protéines dans l'intestin, les appendices pyloriques ou le muscle blanc selon les doses d'hormone de croissance. Dans l'estomac, cependant, le contenu en protéines a diminué significativement suite à l'augmentation de la dose d'hormone de croissance alors que l'activité des protéases en $U\ mg\ protéine^{-1}$ a augmenté (Figure 1; chapitre 2). Ainsi, l'activité enzymatique des protéases en $U\ g\ poisson^{-1}$ a conservé une tendance (non significative) à l'augmentation suite à une augmentation de la dose d'hormone de croissance. Cette observation suggère que les enzymes protéolytiques ne sont pas affectées par la diminution générale du contenu en protéines dans l'estomac.

L'activité des protéases dans l'estomac ne montre pas de relation avec le taux de croissance, le taux d'ingestion ou l'efficacité de conversion des aliments. Kuz'mina et

Kuz'mina (1990) ont trouvé que l'activité des protéases dans l'estomac augmente initialement et ensuite diminue rapidement quand la digestion est complétée chez le doré (*Stizostedion lucioperca*) et la perche (*Perca fluviatilis*). Ceci peut expliquer que nous n'ayons pas trouvé de relation entre l'activité des protéases et le taux d'ingestion puisque les poissons ont été tués 2 jours après leur dernière alimentation et que l'activité des protéases semble reliée à l'alimentation seulement à très court terme. Donc, avec les résultats obtenus pour les protéases dans l'estomac, nous ne pouvons déduire que l'activité des protéases n'est pas reliée à la limitation de la croissance.

Les activités de la trypsine et de la chymotrypsine dans les appendices pyloriques sont corrélées au taux de croissance (Figures 2 et 3; chapitre 2). L'activité de la trypsine montre aussi une relation significative avec l'efficacité de conversion des aliments contrairement à celle de la chymotrypsine. Puisque le taux de croissance et le taux d'ingestion sont significativement corrélés avec la masse relative des appendices pyloriques, nous pouvons prédire une relation significative de l'activité de la trypsine ou de la chymotrypsine (exprimée en $U \text{ g poisson}^{-1}$) avec le taux de croissance et le taux d'ingestion. Cependant, lorsque l'activité de ces enzymes est exprimée en unités par gramme de tissu ou en unités par milligramme de protéine, les relations avec le taux de croissance sont maintenues. Ainsi, ces relations ne peuvent pas être expliquées par la masse relative du tissu. De plus, il n'y a pas de relation entre la masse relative des appendices pyloriques et l'efficacité de conversion des aliments. La relation entre l'activité de la trypsine en $U \text{ g poisson}^{-1}$ et l'efficacité de conversion des aliments ne peut donc être expliquée par la masse des appendices pyloriques par rapport à la masse du poisson. Quand l'activité de la trypsine est exprimée en $U \text{ mg protéines}^{-1}$, les relations avec l'efficacité de conversion et le taux de croissance sont significatives mais

pas la relation avec le taux d'ingestion. Ceci appuie notre interprétation et suggère que la relation de l'activité de la trypsine avec le taux de croissance est liée en partie à l'effet de cette enzyme sur la capacité du poisson à convertir les protéines exogènes en tissu somatique.

Bien que l'activité de l'ALP intestinale montre une relation très significative avec le taux de croissance quand elle est exprimée en U g poisson^{-1} , cette relation peut s'expliquer en majeure partie par la relation de l'activité de cette enzyme avec le taux d'ingestion. En effet, cette enzyme ne démontre aucune relation significative avec l'efficacité de conversion des aliments (Figure 4; chapitre 2). De plus, le taux de croissance et le taux d'ingestion sont significativement corrélés avec la masse de l'intestin (Tableau 2; chapitre 2). Puisque l'activité de l'ALP en U g poisson^{-1} est calculée en tenant compte de la masse du tissu, cette relation peut expliquer celle de cette enzyme avec le taux de croissance et le taux d'ingestion.

Les relations entre l'activité de la GGT intestinale (en U g poisson^{-1}) et le taux de croissance ou le taux d'ingestion sont faibles (Figure 5; chapitre 2) et disparaissent quand l'activité est exprimée en U g tissu^{-1} ou en $\text{U mg protéine}^{-1}$ (Tableau 1; chapitre 2). Puisque les relations entre la masse de l'intestin et le taux de croissance ou le taux d'ingestion sont significatives, elles peuvent expliquer une grande partie des relations entre l'activité de la GGT et le taux de croissance ou le taux d'ingestion. Cette enzyme, tout comme l'ALP, ne peut donc limiter la croissance chez la morue.

Cette étude permet de conclure que parmi les 5 enzymes digestives étudiées, la trypsine est la seule qui semble pouvoir limiter la croissance de la morue principalement parce que c'est la seule qui a montré une relation significative avec l'efficacité de

conversion des aliments et que sa relation avec le taux de croissance est plus forte que sa relation avec le taux d'ingestion.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

PROBLÉMATIQUE

La croissance des poissons est influencée par plusieurs facteurs qui peuvent être classifiés en deux catégories : biotiques et abiotiques. Les facteurs biotiques comprennent la locomotion, les interactions sociales, la taille, la génétique, la nutrition (fréquence et ration). Les facteurs abiotiques sont la température, la photopériode, la salinité, la concentration en oxygène, etc. (Blier et al., 1997; Jobling, 1994). En milieu naturel, la disponibilité de la nourriture est le facteur le plus souvent limitant pour la croissance des poissons. En laboratoire, cependant, il est possible d'atteindre des conditions optimales de croissance. Dans ce cas, les facteurs biotiques et abiotiques étant près de l'optimum, la performance de croissance peut être influencée par d'autres facteurs tel l'efficacité de digestion de la nourriture ou l'habileté à mobiliser et distribuer les nutriments aux tissus (Karasov, 1986). Cependant, chez les poissons, les paramètres physiologiques limitant la croissance en conditions optimales n'ont pas encore été clairement identifiés.

La détermination des facteurs potentiellement limitants pour la croissance des poissons en conditions optimales présente plusieurs intérêts. D'abord, la diminution des populations naturelles de poissons a entraîné un intérêt grandissant pour l'industrie de l'aquiculture. La compréhension des facteurs limitant le taux de croissance et l'efficacité de conversion des aliments en conditions optimales pourrait permettre de trouver de nouvelles solutions afin d'augmenter ces deux paramètres clés pour la rentabilité de l'industrie aquicole. Au niveau fondamental, la détermination des facteurs

physiologiques limitant la croissance pourrait fournir un outil pour l'étude de la variabilité du taux de croissance entre les individus d'une même population ou entre diverses populations. De plus, elle pourrait permettre d'étudier les contraintes, la plasticité ainsi que l'évolution des capacités de croissance.

FONCTIONS DES ENZYMES ÉTUDIÉES

Les protéases acides sont impliquées dans la dégradation des protéines, elles hydrolysent les liens peptidiques (Lehninger et al., 1993). La pepsine constitue la principale protéase dans l'estomac de la morue franche (Gadus morhua; Lied et Solbakken, 1984). Son action se limite à l'hydrolyse des liens peptidiques impliquant des résidus aromatiques (Tietz, 1986). L'action de la pepsine dans l'estomac facilite la digestion par l'hydrolyse acide des protéines (Lauff et Hofer, 1984). Parmi la grande variété d'enzymes protéolytiques dans les viscères et le tube digestif des animaux aquatiques, la pepsine constitue une des plus importantes enzymes avec la trypsine et la chymotrypsine (Sulistiyani et Heruwati, 1992).

La trypsine et la chymotrypsine sont des protéases à sérine (Lehninger et al., 1993). Elles sont synthétisées par le pancréas et libérées dans le tube digestif. La trypsine hydrolyse les liens peptidiques sur les groupes carboxyles de la lysine et de l'arginine (Tietz, 1986). Dans le tube digestif, le trypsinogène est activé, soit par l'enzyme entérokinase (entéropeptidase intestinale) ou par un processus d'autocatalyse (Tietz, 1986). La chymotrypsine hydrolyse pour sa part les liens peptidiques sur les résidus hydrophobes encombrants (phénylalanine, tryptophane, tyrosine). La catalyse s'effectue aussi auprès des résidus asparagine, histidine, méthionine et leucine mais de

façon plus lente (Tietz, 1986). Selon une étude sur les anchois (Engraulis encrasicolus), les protéases à sérine sont quantitativement très importantes et environ 55 à 60% de leur activité spécifique totale se retrouve dans les appendices pyloriques (Martinez et Serra, 1989).

La phosphatase alcaline (ALP) et la γ -glutamyl transférase (GGT) sont deux enzymes impliquées dans l'absorption des nutriments dans l'intestin (Fraisse et al., 1981). Chez la carpe (Cyprinus carpio) et la barbue (Ictalurus punctatus; Fraisse et al., 1981), la phosphatase alcaline semble être liée à la bordure en brosse de l'intestin (entérocytes) où elle est probablement impliquée dans l'absorption et le transport de molécules de lipides et de glucides. La GGT est présente en plus grande concentration dans la partie antérieure de l'intestin. Cette partie intestinale absorbe les protéines de la diète par pinocytose. La GGT joue un rôle dans le transport des oligopeptides et des acides aminés à travers les cellules épithéliales de la muqueuse de l'intestin. Cette activité pourrait être associée à la pinocytose de cette partie de l'intestin (Fraisse et al., 1981).

FACTEURS LIMITANT LA DIGESTION ET DE L'ABSORPTION DES ALIMENTS

Des études chez la morue franche ont montré que le taux de croissance varie entre des individus soumis à un même régime alimentaire et atteint son maximum à une ration variable selon les individus (Dutil et al., 1995; Lambert et al., 1994; Pelletier et al., 1994). En général, plus un poisson consomme de nourriture, plus il croît rapidement et la limite supérieure de croissance est fixée par la quantité de nourriture que le poisson peut convertir en chair. Il est évident que la croissance maximum et l'efficacité de

conversion maximum ne sont pas atteintes pour les mêmes conditions d'alimentation puisque l'efficacité de conversion diminue rapidement lors d'une augmentation du taux d'ingestion (Jobling, 1994). À ration maximum, l'efficacité de conversion est donc le principal facteur limitant la croissance du poisson et il semble très probable que l'habileté à utiliser les ressources alimentaires soit déterminée génétiquement (Blier et al., 1997).

La limitation physiologique de la digestion de la nourriture peut se situer soit au niveau de la synthèse et de la sécrétion d'enzymes, au niveau du transport des nutriments ou encore au niveau de la capacité de synthèse des protéines musculaires. Chez les poissons, peu d'études ont été réalisées à ce sujet. Par contre, chez les endothermes, la limite supérieure du budget énergétique semble déterminée par la capacité du tube digestif à assimiler les nutriments de la nourriture (Diamond, 1991; Hammond et al., 1994; Karasov, 1986; Peterson et al., 1990; Weiner, 1987, 1989, 1992).

Chez les poissons, l'utilisation des acides aminés pourrait être limitée par le taux de libération des acides aminés par les enzymes digestives ou par le nombre et les capacités catalytiques des transporteurs des nutriments (Dabrowski, 1983; Krogdahl et al., 1994; Torrissen et al., 1994). Les acides aminés libres ajoutés à l'alimentation sont plus facilement absorbés par la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri; Dabrowski et Dabrowska, 1981) et la carpe (Plakas et Katayama, 1981) que les mêmes acides aminés provenant des protéines. Les protéines exigent en effet un travail de digestion et donc une dépense énergétique supplémentaire. Ces observations démontrent qu'il pourrait y

avoir une limitation au niveau de la capacité des poissons à dégrader les protéines pour en retirer les acides aminés dont ils ont besoin.

Chez la morue franche (Gadus morhua), les protéines de la diète sont absorbées principalement dans la partie antérieure de l'ileum, incluant les appendices pyloriques (Lied et al., 1982; Lied et Njaa, 1982), mais il n'y a pas eu d'études plus spécifiques en ce qui concerne cette espèce. Chez la carpe cependant, l'absorption sélective d'acides aminés provenant de la digestion par la trypsine (Dabrowski, 1983; Plakas et Katayama, 1981; Scerbina et Sorvacev, 1969) et de la chymotrypsine (Dabrowski, 1983; Strobans et Van der Veen, 1980) s'effectue dans le premier segment de l'intestin. Le taux élevé de libération et d'absorption d'acides aminés résultant de la digestion par la trypsine et la chymotrypsine semble démontrer que ces deux enzymes jouent un rôle important dans le processus de digestion (Cohen et al., 1981).

Une alimentation riche en protéines augmente l'activité des protéases dans le tube digestif de la carpe (Kawai et Ikeda, 1972; Yaotong et Yongjan, 1988), de la truite arc-en-ciel (Kawai et Ikeda, 1973) et de l'omble chevalier (Salvelinus salvelinus; Dabrowski et al., 1992). Cependant, l'activité spécifique des enzymes protéolytiques et amylolytiques est réduite chez l'omble chevalier (Dabrowski et al., 1992), la truite arc-en-ciel (Dabrowski et al., 1989) et la barbusse de rivière (Wilson et Poe, 1985) nourris avec une diète contenant de la farine de soja. Cette réponse pourrait être due en partie aux inhibiteurs de la trypsine contenus dans ce type de farine. Kunitz (1947) et Krogdhal (1983) ont en effet démontré que la trypsine est fortement inhibée par les SBTIs et que l'inhibition est beaucoup moins importante en ce qui concerne la chymotrypsine. Une étude plus récente (Olli et al., 1994) a démontré que les inhibiteurs de la trypsine

réduisent significativement la digestibilité des protéines et des gras, les gains de poids et l'activité spécifique de la trypsine dans l'intestin des saumons atlantiques (Salmo salar). Les SBTIs seraient cependant des inhibiteurs non compétitifs puisqu'il semble que cette espèce peut compenser l'effet d'une certaine concentration d'inhibiteurs en augmentant la sécrétion de trypsine par les appendices pyloriques (Olli et al., 1994). Cette observation expliquerait l'augmentation de la concentration de trypsine dans les faeces de poissons nourris avec la farine de soja.

Chez la truite arc-en-ciel en début de développement, le remplacement de la farine de poisson par la farine de soja entraîne une diminution significative de la croissance (Dabrowski et al., 1989). Il a été suggéré qu'environ 30 à 50% de l'effet inhibiteur de la farine de soja sur la croissance des homéothermes pourrait mettre en cause les SBTIs (Kakade et al., 1973). Le reste pourrait s'expliquer par la faible disponibilité de la méthionine, l'acide aminé le plus rare dans ce type de farine, vue la corrélation élevée observée entre le gain de poids et le taux d'absorption de cet acide aminé (Dabrowski et al., 1989). En effet, bien que le chauffage de la farine de soja réduise l'impact des SBTIs, ce traitement réduit aussi la disponibilité des acides aminés (Skrede et Krogdahl, 1985) dont la méthionine.

Un organisme peut posséder différentes variantes d'un type donné d'enzyme. Ces variantes peuvent provenir de deux bases génétiques différentes. Le terme isoenzyme désigne le cas où le génome d'un organisme contient deux ou plusieurs loci pour une même enzyme. Chez les organismes diploïdes, des variantes alléliques d'une même enzyme peuvent exister quand le locus codant pour l'enzyme donnée est polymorphique, ces variantes sont appelées allozymes (Hochachka et Somero, 1984).

L'existence d'une variation génétique de la trypsine a d'abord été soupçonnée par Torrissen (1984) puis confirmée par Torrissen et Torrissen (1985). Chez les salmonidés, une association claire entre la taille du poisson et le génotype a été démontrée par Torrissen (1987). Les poissons possédant l'allozyme TRP-2*92 se démarquent des autres par un poids significativement plus élevé (Torrissen, 1987; Torrissen, 1991). Cet allozyme est aussi associé à une meilleure croissance chez le saumon atlantique (Torrissen, 1991; Torrissen et Shearer, 1992) et l'omble chevalier (Torrissen et Barnung, 1991; Torrissen et Shearer, 1992).

D'autres études ont démontré une meilleure absorption (indiquée par un niveau plus élevé d'acides aminés libres dans le plasma et le muscle blanc; Torrissen et al., 1994), un meilleur taux de digestion (indiqué par une élévation plus rapide des acides aminés libres dans le muscle blanc; Torrissen et al., 1994) et une meilleure utilisation (Torrissen et Shearer, 1992) des protéines de la diète chez les saumons atlantiques possédant l'allozyme TRP-2*92. L'efficacité de conversion des protéines (gain de poids par poids de protéines ingérées) est aussi supérieure chez les poissons de ce génotype; ce qui suggère une augmentation de la disponibilité ou une diminution du catabolisme des acides aminés (Torrissen et al., 1994).

Parmi les acides aminés essentiels, la quantité de lysine et d'arginine est significativement plus élevée dans le plasma des saumons possédant l'allozyme TRP-2*92 (Torrissen et al., 1994). Puisque ces deux acides aminés ne peuvent être synthétisés par le poisson, l'augmentation initiale dans le plasma est le résultat de l'absorption dans l'intestin alors que l'augmentation prolongée peut être le résultat de l'absorption ou du fractionnement des protéines (Torrissen et al., 1994). L'augmentation

du métabolisme de la lysine peut être partiellement due à un meilleur taux de digestion des protéines de la diète (Torrissen et al., 1994), puisque la lysine est libérée entre autre par l'action de la trypsine sur les liens peptidiques (Lehninger et al., 1993; Wallace et al., 1986).

Les observations recueillies par Torrissen et ses collaborateurs dans leurs différentes études sur les isoenzymes de la trypsine leur ont permis de suggérer qu'une stimulation de la sécrétion de trypsine pourrait entraîner une augmentation de la digestion des aliments et de l'apport en acides aminés. Cet apport en acides aminés stimulerait la sécrétion de l'insuline qui régule les processus anaboliques (Torrissen et al., 1994).

HORMONE DE CROISSANCE CHEZ LES POISSONS

L'hormone de croissance (ou somatotropine) est produite par les cellules alpha du lobe antérieur de l'hypophyse. Elle joue un rôle important dans la régulation du métabolisme et de la croissance chez les poissons. En effet, un retard de croissance important se produit chez les animaux hypophysectomisés. La croissance peut reprendre lorsque ces mêmes animaux reçoivent soit des injections d'extraits pituitaires contenant de l'hormone de croissance ou de l'hormone de croissance purifiée (Jobling, 1994).

La libération de l'hormone de croissance par la glande pituitaire semble contrôlée principalement par des facteurs hypothalamiques (Sumpter, 1992). Chez les mammifères, la sécrétion de l'hormone de croissance est contrôlée par deux principaux facteurs: la GHRH (hormone de libération de l'hormone de croissance) qui la stimule et la somatostatine qui l'inhibe (Vander et al., 1989). Le même type de régulation est

probablement présent chez les poissons (Sumpter, 1992). Une étude de Farmer et al. (1976) a de plus démontré une ressemblance significative entre l'hormone de croissance de Tilapia (Tilapia mosambica) et celle des mammifères, ce qui suggère que la structure tertiaire de celle-ci a été fortement conservée durant l'évolution.

L'hormone de croissance joue un rôle dans la régulation de la synthèse des protéines (Jobling, 1994). L'administration d'hormone de croissance bovine chez les poissons téléostéens a plusieurs impacts physiologiques. D'abord, elle est associée à une augmentation de la croissance (Adelman, 1977; Danzmann et al., 1990; Gill et al., 1985; Higgs et al., 1975, 1976; Markert et al., 1977; Pickford, 1957, 1973; Schulte et al., 1989; Weatherley et Gill, 1987). Elle produit aussi une augmentation de la mobilisation des lipides (Higgs et al., 1975, 1976; Markert et al., 1977), ce qui inciterait à une utilisation préférentielle des lipides comme source d'énergie (Frye, 1971) et la conservation des protéines (acides aminés) pour la croissance. De plus, l'hormone de croissance bovine produit une augmentation de la conversion des protéines et de la nourriture en chair (Donaldson et al., 1979; Jobling, 1994; Johnsson et Björnsson, 1994; Markert et al., 1977) ainsi qu'une augmentation de l'appétit (Higgs et al., 1975, 1976; Johnsson et Björnsson, 1994; Komourdjian et al., 1976; Pickford, 1957) et de la consommation de nourriture (Higgs et al., 1978; Johnsson et Björnsson, 1994).

L'utilisation de l'hormone de croissance peut provoquer des changements de la composition chimique (les protéines versus les lipides et l'eau) de différents tissus des poissons (Higgs et al., 1976). Pour que le gain de poids exprime de façon réaliste l'utilisation d'énergie, il faut que la composition relative des tissus du poisson demeure constante. Si cette dernière change selon les conditions de croissance, il est essentiel

d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats (Jobling, 1994). De plus, il est préférable de comparer des poissons de mêmes tailles puisque la composition tissulaire peut varier avec la taille du poisson (Goolish, 1991; Jobling, 1994).

Évidemment, l'administration d'hormone de croissance pose des problèmes reliés aux injections répétées. D'autres alternatives ont donc été explorées comme la production d'organismes transgéniques. Ce type d'organisme est défini comme provenant d'une cellule dont le génome a été modifié par l'introduction d'ADN extrinsèque (Griffiths et al., 1997). Par exemple, il est possible d'injecter le gène de l'hormone de croissance d'une espèce à croissance rapide dans une espèce à croissance lente pour en augmenter le taux de croissance (Suzuki et al., 1991). Ainsi, on assure une libération soutenue d'hormone de croissance et une stimulation de la croissance à long terme sans manipulations fréquentes des organismes. Un grand nombre d'espèces de poissons transgéniques ont été développées (MacLean et Penman, 1990). Chez les salmonidés, il a aussi été démontré que l'ADN extrinsèque inséré dans l'œuf par microinjection est retenu à long terme (Devlin et al., 1994; Du et al., 1992; Fletcher et al., 1988; Guyomard et al., 1989; Penman et al., 1991; Shear et al., 1991; Yoshizaki et al., 1991).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'hypothèse de base de ce travail est que si une enzyme limite la capacité de croissance des poissons, son activité sera corrélée positivement avec le taux de croissance et avec l'efficacité de conversion des aliments même lors d'un dépassement du taux de croissance maximum. Chez les poissons en général, lorsque l'on augmente le

taux d'ingestion, le taux de croissance augmente jusqu'à un plateau. Au delà du plateau, le poisson ne peut augmenter sa croissance. Au-delà de ce plateau, ce qui limite la croissance ne peut donc être l'injection des aliments. Ainsi, toute modification du ou des facteurs limitants devrait alors affecter à la fois l'efficacité de conversion et le taux de croissance, Nous pouvons donc suggérer que si une enzyme limite la croissance d'un poisson nourri a satiété, son activité sera non seulement corrélée au taux de croissance mais aussi à l'efficacité de conversion des aliments.

Cette étude vise à dresser un portrait général de plusieurs enzymes impliquées dans le transport et la dégradation des nutriments (en particulier les protéines) chez la morue franche. L'idée est de mettre l'activité de ces enzymes en relation avec le taux de croissance, le taux d'ingestion et l'efficacité de conversion des aliments afin de déterminer les sites potentiels de limitation du taux de croissance optimal (c'est-à-dire le taux de croissance maximum qui peut être obtenu dans les conditions de l'expérience). L'hormone de croissance est utilisée pour aider à maximiser la croissance. Elle permettra aussi d'étudier l'effet d'une hormone étrangère (hormone de croissance bovine) sur le taux de croissance, le taux d'ingestion, l'efficacité de conversion de la nourriture, la composition des tissus et l'activité de diverses enzymes impliquées dans la digestion.

CHAPITRE II

ARTICLE

Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (Gadus morhua)?

Lemieux, H.¹, P. Blier¹ and J.-D. Dutil²

¹Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

²Institut Maurice Lamontagne, Ministère des Pêches et des Océans, 850 route de la mer, Mont-Joli, Québec, G5H 3Z4, Canada

Correspondence should be addressed to Helene Lemieux, at the above address;

Fax : (418)724-1849

Email : Helene_Lemieux@uqar.quebec.ca

Keywords: acid proteases, alkaline phosphatase, chymotrypsin, digestive enzymes, fish, food intake, glutamyltransferase, growth hormone, protein content, trypsin.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the potential sites of maximal growth limitation in Atlantic cod (Gadus morhua). Forty cod were reared in ten sea water tanks. Fish were randomly divided into five groups, a control group (injected with saline solution) and four experimental groups that received different levels of recombinant bovine somatotropin (rbST: 1.0, 2.0, 4.0 and 10.0 $\mu\text{g g fish}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$) by injection in the abdominal cavity. Fish were fed ad libitum 3 times a week during four weeks. We measured individual body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency. At the end of the experiment, we measured the activity of acid proteases in the stomach; trypsin and chymotrypsin in the pyloric caeca; alkaline phosphatase (ALP) and glutamyltransferase (GGT) in the intestine. No significant differences were observed in growth rate, food intake or food conversion efficiency among the five groups. However, an increase in rbST dose resulted in increased acid protease activities (as U mg protein^{-1}) and decreased protein concentrations in the stomach. Trypsin, chymotrypsin, ALP and GGT activities when expressed in U g fish^{-1} were correlated with growth rate. These enzymes were also correlated with food ingestion except trypsin when expressed in U mg protein^{-1} . Trypsin was the only enzyme activity which showed a significant correlation with food conversion efficiency. Our conclusion is that trypsin is that, at the level of digestion, trypsin is the only enzyme measured that could be suspected to potentially limit growth rate in cod.

INTRODUCTION

In fish, growth capacity can be restricted by many environmental and physiological factors (Blier et al., 1997; Dutta, 1994; Weatherley and Gill, 1995). However, as demonstrated in endotherms (Diamond, 1991; Hammond et al., 1994; Karasov, 1986; Peterson et al., 1990; Saarikko and Hanski, 1990; Weiner, 1987, 1989, 1992), under optimal conditions the upper limit to the sustainable energy budget (energy allocation for resource acquisition) may be set by the capacity of the digestive tract to assimilate nutrients from food (Blier et al., 1997). For instance, in juvenile Atlantic cod (Gadus morhua), growth rate increases up to a plateau while food intake continues to increase (Houlihan et al., 1988) which suggests that the capacity for growth is constrained by digestion and transport of nutrients. Several factors at the level of digestion may limit the growth of fish. These include the efficiency of food absorption and conversion, which are both related to meal size and food quality (Kleiber, 1975; Weatherley and Gill, 1987). Efficiency of food absorption and conversion can also depend on the availability of digestive enzymes or on the capacity for trans-epithelial transport in the digestive tract.

Several enzymes are involved in the digestive process in fish. Pepsin is the main digestive enzyme in the stomach where it facilitates digestion by protein hydrolysis and denaturation (Lauff and Hofer, 1984). The proteases trypsin and chymotrypsin are synthesised by the pancreas which is diffusely distributed in the pyloric caeca in cod (Bishop and Odense, 1966) and cause selective hydrolysis (Tietz, 1986). Some intestinal enzymes facilitate the degradation and transport of nutrients. For example, alkaline phosphatase facilitates absorption and transport of lipid and carbohydrate while

glutamyl transferase plays a role in amino acid and oligopeptide transport across the intestinal wall (Fraisse et al., 1981).

The utilization of amino acids in fish may be limited by the rate of nutrient production by the digestive enzymes or by the capacity of nutrients transport mechanisms (Dabrowski, 1983; Krogdhal et al., 1994; Torrissen et al., 1994). Trypsin and chymotrypsin are the major digestive enzymes secreted in the anterior segment of the intestine (Dabrowski, 1983). The high rate of release and apparent absorption of amino acids specific to tryptic and chymotryptic activities in that segment of the intestine show the importance of these enzymes in digestion processes (Cohen et al., 1981; Stroband and Van der Veen, 1980). Furthermore, in rainbow trout fry, replacement of fish-meal by full-fat soybean meal decreased growth (Dabrowski et al., 1989). As much as 30-50% of the inhibitory effect of soybean on the growth of homeotherms can potentially be accounted for by the soybean trypsin inhibitor(s) (Kakade et al., 1973).

The objective of this study was to determine whether digestive enzymes could potentially set a limit upon digestive capacity of individual fish and therefore determine their maximal growth rate and food conversion efficiency. We therefore measured individual growth rate, food intake and food conversion efficiency in Atlantic cod that were fed a maximal ration. To improve growth performance, some fish were injected with different levels of bovine growth hormone. Finally, several digestive enzymes were assayed in the tissues of fish at the end of the experiment.

METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

Atlantic cod, Gadus morhua (40-50 cm), were caught by trawl in the Gulf of St. Lawrence near Ste-Anne-des-Monts (Québec, Canada) in June 1996. Fish were kept in running sea water (average salinity 28 mg ml⁻¹) tanks under natural photoperiod and habituated to laboratory conditions for about 4 months prior to our study. During acclimation, temperature ranged from 4 to 8°C and fish were fed a maintenance ration of capelin (Mallotus villosus).

GROWTH EXPERIMENTS

The experiment was conducted in ten 1.5 m³ fiberglass circular tanks using a partially recirculating, temperature-controlled system. Each tank was separated into four compartments with plastic partitions allowing water circulation but preventing passage of cod and food to other compartments. One cod was placed in each of the 40 compartments. The tanks were brought to and maintained at 10°C during the rest of the experiment. Dissolved oxygen was maintained above 80% saturation. Fluorescent lights, controlled by automatic timers, were adjusted to follow the natural photoperiod.

Cod were randomly separated into 5 groups, a control group and 4 groups receiving different treatments (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 µg g fish⁻¹ week⁻¹ recombinant bovine somatotropin (rbST; Monsanto, Canada)). Each fish received an injection of 2 µl g fish⁻¹ intraperitoneally every second week. The control group was injected with the saline solution (NaCl 0.7% w/v) used to dilute the rbST. Cod were anaesthetized with

methomidate 5 mg l⁻¹ (Syndell Laboratory, Canada), measured, weighed and injected at the beginning, after 2 weeks and at the end of the experiment (4 weeks). We chose a short experimental period (4 weeks) in order to avoid an allometric bias in enzyme activities within and between treatments. During the experiment, cod were fed to satiation three times weekly with capelin. They received individual rations corresponding to 20% of their body mass at each meal. Any food remaining after two hours was reweighed for the calculation of individual food intake and food conversion efficiency.

Individual growth rate, food intake and food conversion efficiency were determined for the last two weeks of the experiment. Growth rate was calculated using the following equation (Ricker, 1979):

$$\text{Growth rate (\% day}^{-1}\text{)} = [(W_2 - W_1) * 100 / W_1] / \Delta t$$

Where W_1 represents the initial mass (in g), W_2 the final mass (in g) and Δt the time interval in days. Food intake was expressed as a percentage of initial body mass consumed per day and food conversion efficiency as a percentage of total food consumption (in g) converted to weight gain (in g).

TISSUE EXTRACTION

After four weeks, cod were killed by a blow on the head two days after the last meal. The stomach and intestine were removed, cut longitudinally in two pieces, and washed with a saline solution to remove any remaining food or feces. For 95% of the fish, food remaining in the stomach represented less than 0.5% of body mass. The pyloric caeca were removed and the stomach, caeca and intestine weighed separately.

The caeca were finely chopped with a razor blade, and then divided into three samples. Samples of white muscle were taken from a point below the first dorsal fin and above the lateral line for protein assay. Tissue samples were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. Samples of muscle were also taken and immediately analysed for water content.

One half of the stomach was homogenized in one volume of potassium-phosphate buffer 0.2 M (pH 7.4) and centrifuged at 13,000 g, 4°C for 15 min. The supernatant was used for measurement of total protease activity. One sample of the caecums was homogenized in 49 volumes (w/v) of Tris (46 mM), CaCl₂ (11.5 mM) buffer, pH 8.1 and centrifuged at 13,000 g, 4°C for 15 minutes. The supernatant was used for the measurement of trypsin activity. Another sample of the caecums was diluted in 99 volumes of Tris (100 mM) CaCl₂ (100 mM) buffer (pH 8.1) and used for measurement of chymotrypsin activity. Intestine extracts were prepared by homogenizing one half of the intestine in 4 volumes of Tris-HCl buffer 100 mM (pH 9.0), to measure glutamyl transferase activity. The same homogenate was then diluted 20 times (total dilution 1/100) with the same buffer for the measurement of alkaline phosphatase activity. Samples of white muscle (0.3 g) were added to 3.0 ml of potassium-phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 0.3 ml of 1% triton X-100, and homogenized for the measurement of total protein content. We then subsampled 0.3 ml of the preparation and diluted it in 1.16 ml urea (10 M) and 40 µl glacial acetic acid (Somero and Childress, 1990). All tissues were homogenized using three 15 seconds bursts with a Tekmar homogenizer and placed on ice for one minute between homogenizations.

ENZYMATIC ASSAYS

Enzymatic activities were measured at 20°C using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer, lambda 11) equipped with a thermostated cell holder. All assays were run in duplicate and enzymatic activities were expressed in U g tissue⁻¹, in U mg protein⁻¹ and in U g fish⁻¹. For acid proteases, units are expressed in $\Delta DO_{280}/10$ minutes. For other enzymes, units are expressed in μmol substrate transformed per minutes. Conditions for enzyme assays were as follows :

1) Acid protease: Acid protease activity was determined by the methods of Sarath et al. (1989). The incubation mixture contained 2.5 ml of 2% bovine hemoglobin (dissolved in urea 32% and 25 mM phosphate buffer (pH 2.0)) and 0.4 ml of extract. The reaction was stopped after 10 minutes of incubation at 20°C by the addition of 5 ml of trichloroacetic acid 5%. For the blank, the trichloroacetic acid was added before the enzymatic solution. The resulting mixture was allowed to stand at room temperature for 30 minutes and then filtered through Whatman #3 filter paper. The absorbance was read at 280 nm with reference to the blank.

2) Trypsin: Trypsin activity was determined by the method of Bergmeyer (1974) using N α -p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) 10 mM as substrate in 41,4 mM Tris buffer with 10,4 mM CaCl₂ (pH 8.1). Activity was determined from the change in absorbance at 247 nm caused by the formation of toluenesulfonyl-L-arginine (extinction coefficient: 0.54 mmol⁻¹ cm⁻¹). Quartz cells were used.

3) Chymotrypsin: Chymotrypsin activity was measured using N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) as substrate. BTEE 16.0 mg was dissolved in 0.5 ml of methanol in a 50 ml volumetric flask and the volume was brought to the mark by slow addition of

0.2% Triton X-100 solution in 0.08 M Tris buffer (pH 7.8) containing 100 mM CaCl₂ (method of Hummel, 1959, modified by Rao and Lombardi, 1975). The change in absorbance at 256 nm is proportional to the formation of N-benzoyl-L-tyrosine (extinction coefficient of 964 mmol⁻¹ cm⁻¹). Quartz cells were used.

4) Alkaline phosphatase (ALP): ALP activity was determined by the method of Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1970, 1972) using p-nitrophenyl phosphate 60.8 mM in diethanol buffer 1 M (pH 9.8) with 0.5 mM magnesium ions. The rate of increase in absorbance at 405 nm is directly proportional to ALP activity in the sample. The extinction coefficient of p-nitrophenol is 18.45 mmol⁻¹ cm⁻¹ at 405 nm.

5) γ -glutamyltransferase (GGT): We used a modification of the method of Naftalin et al. (1969). 40 μ l of homogenate was incubated (37°C, 40 minutes) in 0.5 ml of reactive medium (L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, 51 μ M and glycylglycine, 1.1 mM in TRIS buffer 0.1 M (pH 9.0)). The reaction was stopped by the addition of 2 ml of acetic acid 10% (v/v). For the blank, the acetic acid solution was added before the homogenate. We then added 1.0 ml of sodium nitrite solution 0.1% (w/v), 1.0 ml of ammonium sulfamate solution 1% (w/v) and 1.0 ml of naphthylethylenediamine solution (1.9 μ M) to the reactive medium. The solution was quickly mixed between each addition and shaken vigorously at the end so that all bubbles rised the top. The final solution was centrifuged 15 minutes at 13 200 rpm to remove any remaining particles. The assay is based on the transfer of the glutamyl group from L- γ -glutamyl-p-nitroanilide to glycylglycine, which is catalysed by GGT. The p-nitroaniline produced is diazotized and

the absorbance of the pink azo-dye measured at 540 nm is proportional to GGT activity. The calibration curve was made with a solution of p-nitroaniline 0.126 mM.

PROTEIN ASSAYS

Total protein content of each tissue (stomach, intestine, caecum, muscle) was determined using the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985).

CHEMICALS

The rbST was obtained from Monsanto (Canada). All other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, Miss., USA) and Fisher Scientific Co (Montreal, Qc., Canada).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistica software was used for all statistical analyses. F-max tests were used to test the homogeneity of variances among the five groups. For variables with homogeneous variances, ANOVAs were used to test differences among groups and Tukey tests were used for a posteriori pairwise comparisons. For other variables, Kruskal-Wallis tests were used followed by a posteriori Mann-Whitney tests. Multiple regression was used to determine the proportion of the variance in growth rate that was explained by food intake and food conversion efficiency. Relationships between body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency and enzyme activities (in U g tissue^{-1} , in U g fish^{-1} or in U mg protein^{-1}) were examined using linear regression

analysis. For all analyses chymotrypsin activities were transformed (square root) to meet statistical normality. Significance was assessed at the 0.05 level for all tests.

RESULTS

RBST EFFECTS

Stomach protein content (in mg g tissue⁻¹) decreased with increased rbST treatment (Figure 1A) and protease activity (U g protein⁻¹) increased with increasing dose of rbST (Figure 1B). When the protease activity was expressed in U g fish⁻¹ no significant differences were detected (Figure 1C). There were no significant differences among groups in initial and final body mass, growth rate, food intake or food conversion efficiency (Table 1). Tissue mass, protein content or enzyme activities in the intestine, muscle, and caecums did not differ significantly among groups at the end of the four weeks period. Since rbST induced no significant effect on enzyme activities (except for acid protease activity in U mg protein⁻¹), relations between enzyme activities and individual body mass, growth rate, food intake or food conversion efficiency were tested, regardless of rbST concentrations, in subsequent analyses.

DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES

The relative mass of the caeca ($R^2 = 0.235$, $P = 0.002$) and intestine ($R^2 = 0.124$, $P = 0.030$) increased with body mass after four weeks (Table 2). The relative mass of the stomach, pyloric caeca and intestine also increased with growth rate ($R^2 = 0.210$, $P = 0.004$; $R^2 = 0.458$, $P = 0.001$; $R^2 = 0.377$, $P = 0.001$) and food intake ($R^2 = 0.372$, $P = 0.001$; $R^2 = 0.700$, $P = 0.001$; $R^2 = 0.540$, $P = 0.001$) but not with food conversion efficiency (Table 2).

Enzyme activities were weakly or not correlated with the body mass. Relationships for stomach acid proteases activities ($R^2 = 0.177$, $P = 0.050$), caecum trypsin activity ($R^2 = 0.113$, $P = 0.042$) and intestinal ALP activity ($R^2 = 0.109$, $P = 0.042$) were marginally significant when expressed in $U\ g\ fish^{-1}$ but were not significant when expressed in $U\ mg\ protein^{-1}$ (Table 3). Chymotrypsin and GGT activities were not correlated with body mass (Table 3). Stomach protease activities expressed in $U\ g\ tissue^{-1}$, in $U\ mg\ protein^{-1}$ or in $U\ g\ fish^{-1}$ were not related with body mass, growth rate, food intake or food conversion efficiency (Table 3).

Trypsin activity expressed in $U\ g\ fish^{-1}$ exhibited a significant relationship with growth rate ($R^2 = 0.578$, $P < 0,001$; figure 2A), food intake ($R^2 = 0.384$, $P < 0.001$; Figure 2B) and food conversion efficiency ($R^2 = 0.192$, $P = 0.017$; Figure 2C). The relation with food intake was less significant when the activity was expressed in $U\ g\ tissue^{-1}$ ($R^2 = 0.129$, $P = 0.028$, Table 3) and not significant when enzyme activity was expressed in $U\ mg\ protein^{-1}$. However, the relationship with growth rate and food conversion efficiency remained significant (Table 3).

Chymotrypsin activity (in $U\ g\ fish^{-1}$) exhibited a significant relation with growth rate ($R^2 = 0.397$, $P < 0.001$; Figure 3A) and food intake ($R^2 = 0.245$, $P = 0.002$; Figure 3B), but no significant relation with food conversion efficiency ($R^2 = 0.085$, $P = 0.119$; Figure 3C). When chymotrypsin activity was expressed in $U\ g\ tissue^{-1}$ or in $U\ mg\ protein^{-1}$, the relations with growth rate and food intake were also significant. However, when expressed in these units, the relation with food conversion efficiency was not significant ($R^2 = 0.128$ and $P = 0.052$ in $U\ g\ tissue^{-1}$; $R^2 = 0.125$ and $P = 0.055$ in $U\ mg\ protein^{-1}$; Table 3).

Enzymatic activities in the intestine (in U per fish weight) were correlated with growth rate and food intake, but not with food conversion efficiency (Figure 4 and 5). Growth rate and food intake explained a much larger proportion of the variance in ALP activity than in GGT activity. ALP activity expressed per g fish⁻¹ (Figure 4A, B) and per mg protein⁻¹ (Table 3) were strongly correlated with growth rate and food intake. However, the relation with food conversion efficiency was weak ($R^2 = 0.086$, $P = 0.001$) significant when expressed in U g tissue⁻¹ and not significant when enzyme activity was expressed in U mg protein⁻¹ (Table 3) or in U g fish⁻¹ (Figure 4C). GGT activity expressed in U g fish⁻¹ was positively but weakly correlated with growth rate ($R^2 = 0.192$, $P = 0.007$; Figure 5A) and food intake ($R^2 = 0.110$, $P = 0.045$; Figure 5B). However, the relations are not significant when enzyme activity is expressed in U g tissue⁻¹ or in U mg protein⁻¹ (Table 3). Furthermore, the relations of GGT activity with food conversion efficiency are not significant (Figure 5C; Table 3).

The correlation coefficient for the regression between growth rate and food intake (results not shown) was 0.74 ($P < 0.001$) but when we added food conversion efficiency (multiple regression) 93% of the variance was explained by these 2 factors ($P < 0.001$).

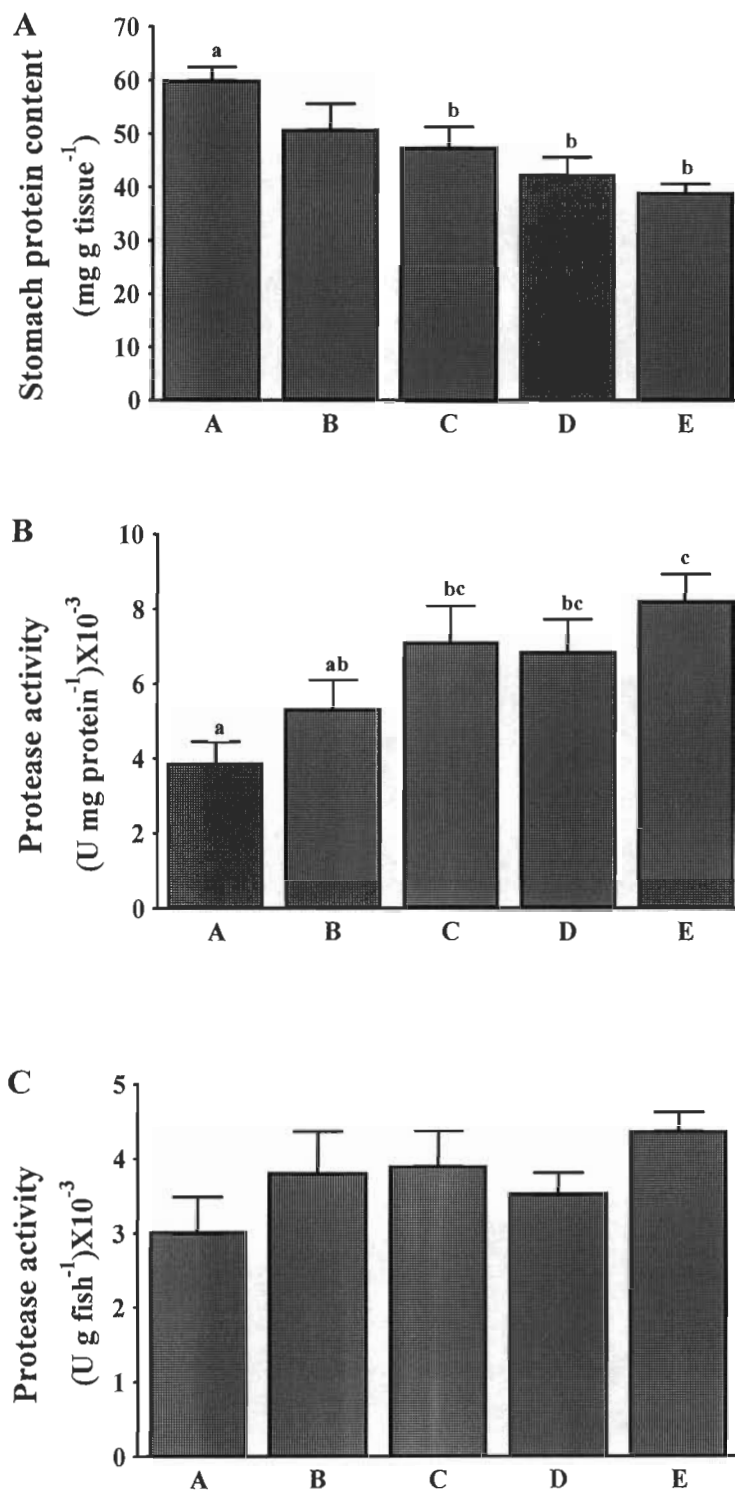


Figure 1 : The effect of rbST on stomach protein content and protease activities in Atlantic cod (A : control injected, B : $1 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, C : $2 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, D : $4 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$, E : $10 \mu\text{g g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$). Columns sharing one letter are not significantly different.

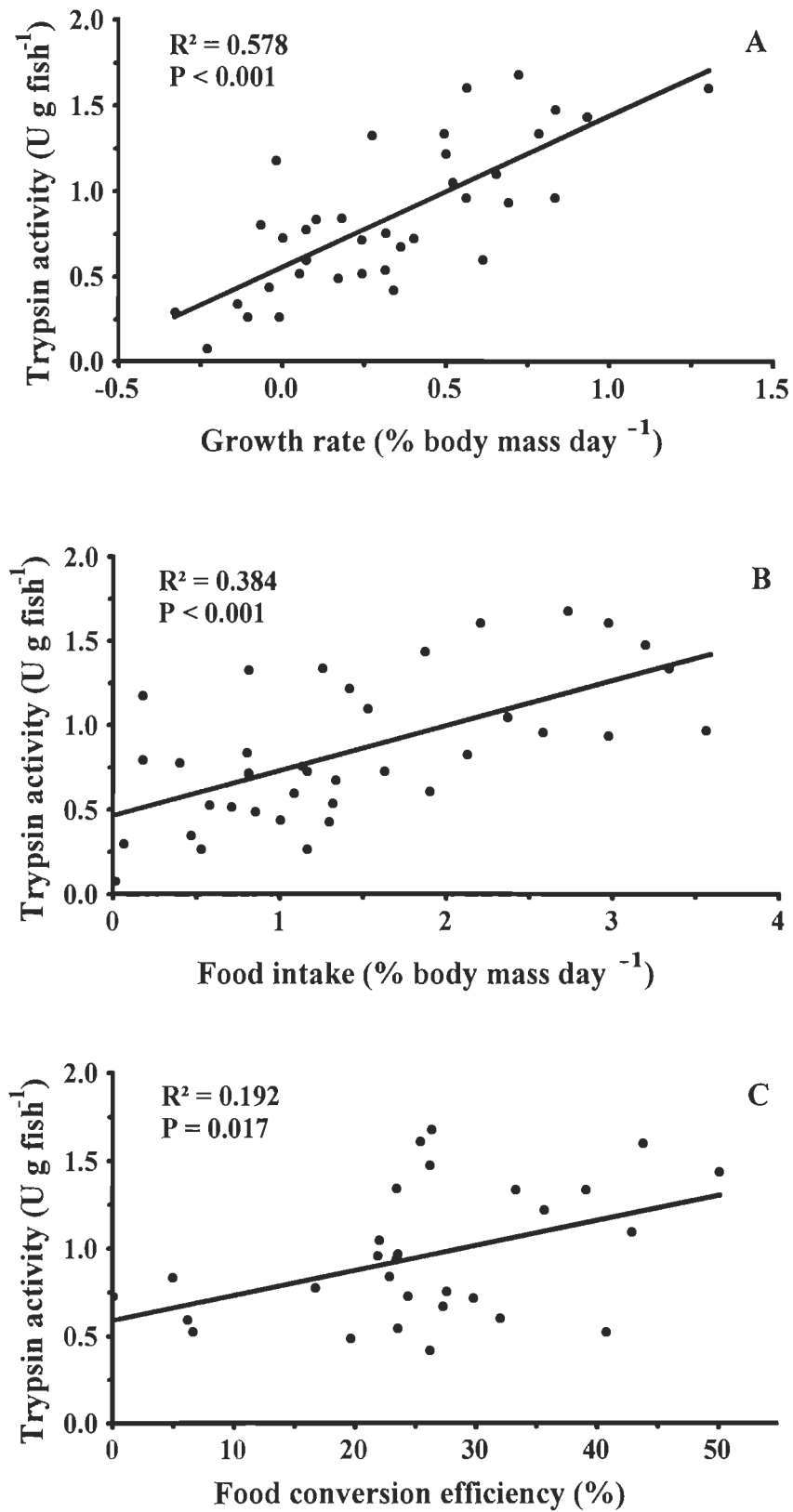


Figure 2 : Relationship between trypsin activity in the pyloric caeca and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.

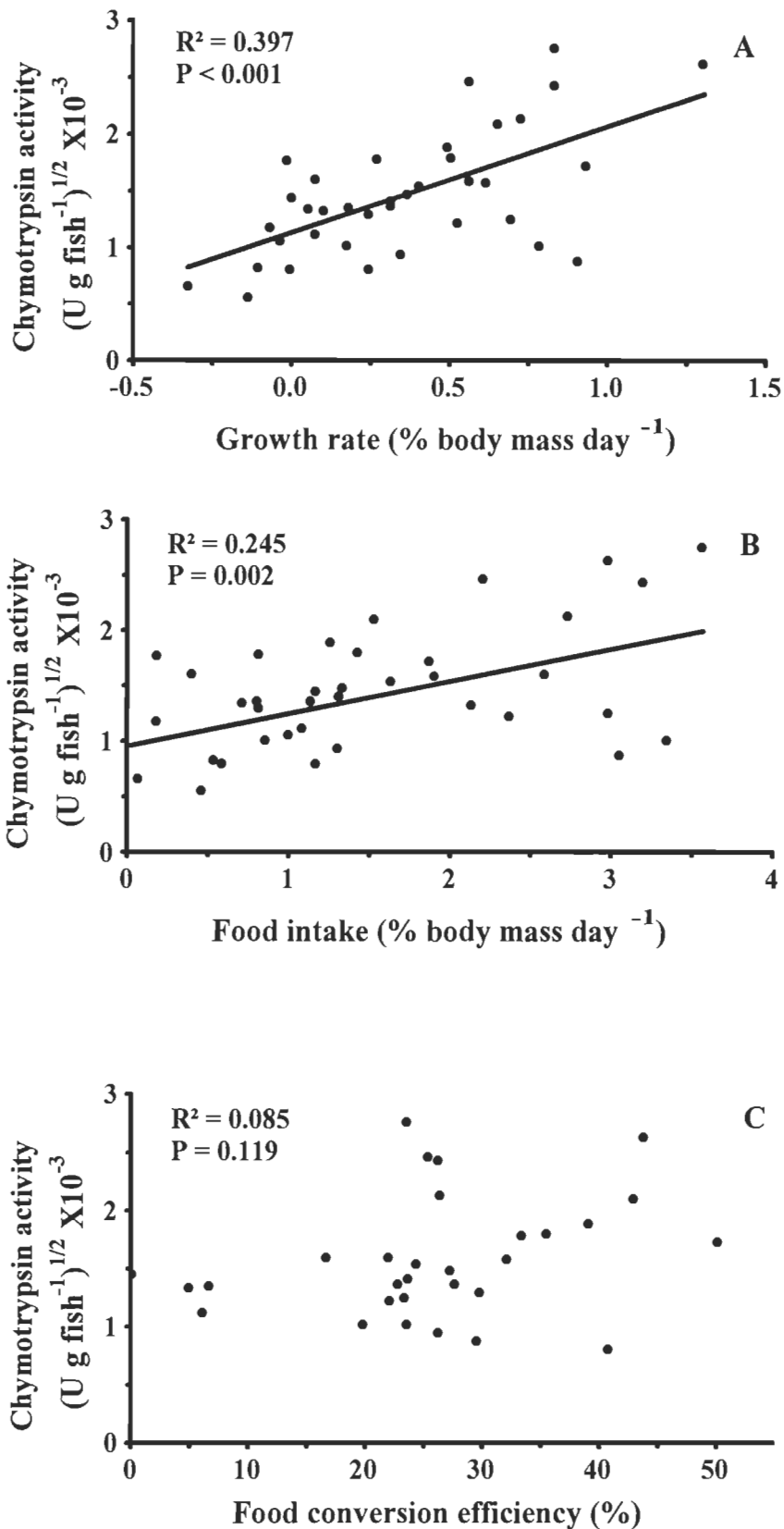


Figure 3 : Relationship between chymotrypsin activity (square root transformed) in the pyloric caeca and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.

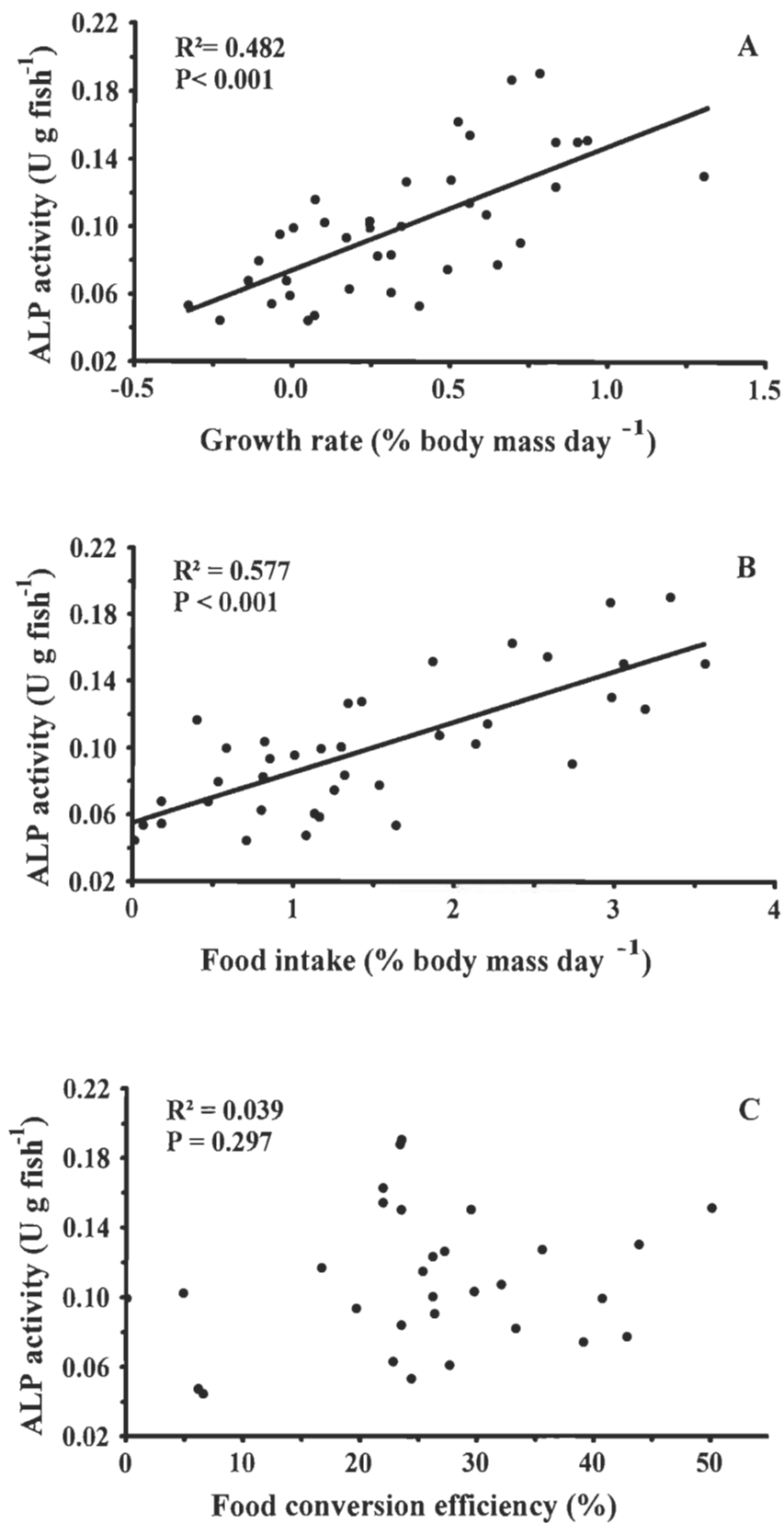


Figure 4 : Relationship between ALP activity in the intestine and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.

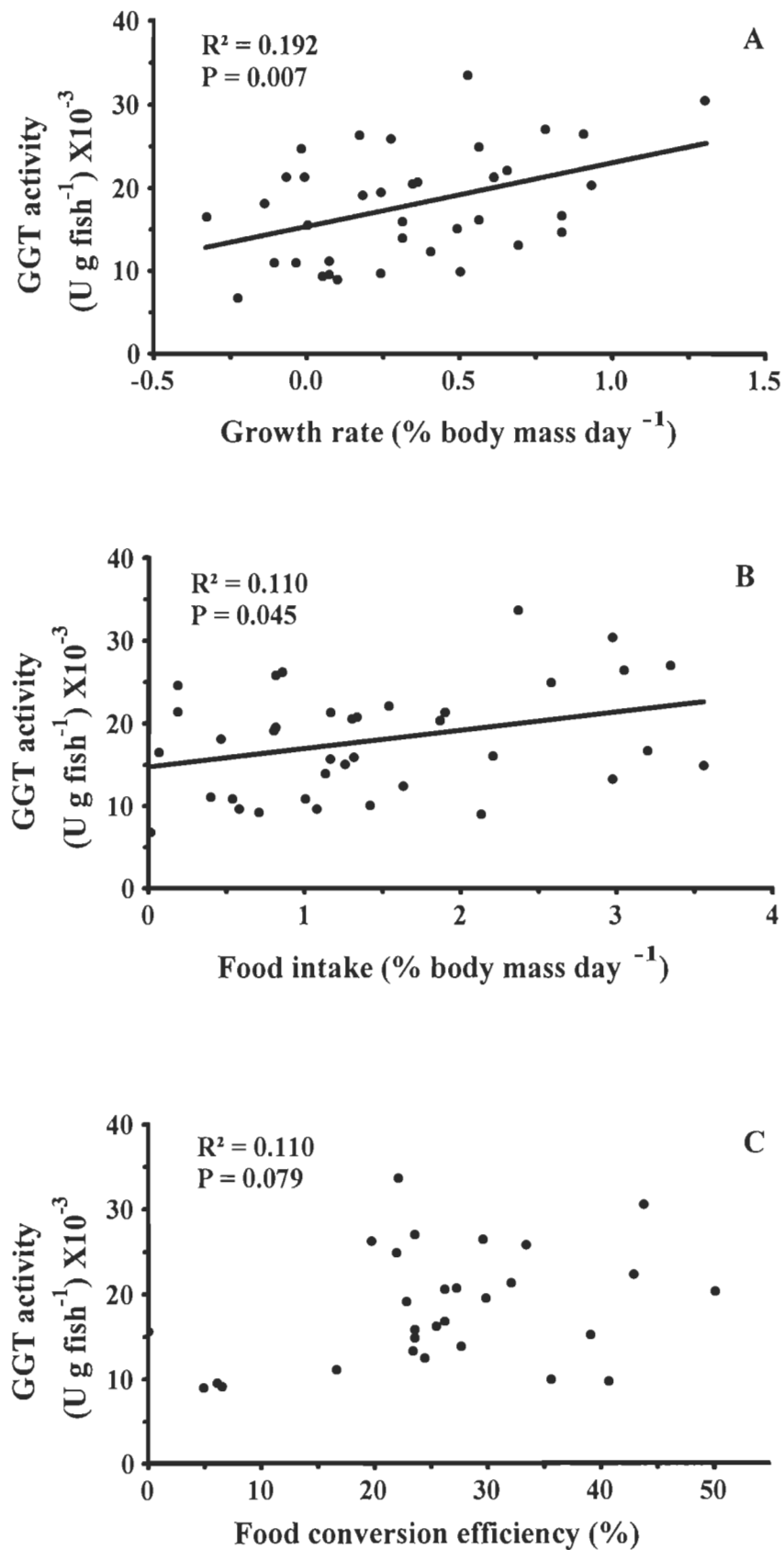


Figure 5 : Relationship between GGT activity in the intestine and individual (A) growth rate, (B) food intake or (C) food conversion efficiency of Atlantic cod.

Table 1 : Body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency (mean \pm standard error) in control injected with saline solution and cod injected with different doses of rbST.

	Control group	rbST injected groups				P
		1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 2 weeks ⁻¹	2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 2 weeks ⁻¹	5.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 2 weeks ⁻¹	10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 2 weeks ⁻¹	
Initial body mass (g)	877 \pm 55	862 \pm 44	870 \pm 57	859 \pm 47	895 \pm 67	0.990
Final body mass (g)	1058 \pm 62	1058 \pm 64	947 \pm 58	1028 \pm 50	1088 \pm 64	0.498
Growth rate (% body mass day ⁻¹)	0.39 \pm 0.12	0.42 \pm 0.19	0.11 \pm 0.09	0.37 \pm 0.14	0.44 \pm 0.12	0.398
Food intake (% body mass day ⁻¹)	1.4 \pm 0.3	2.0 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	0.201
Food conversion efficiency (%)	31.0 \pm 1.3	16.9 \pm 6.7	27.2 \pm 6.2	27.7 \pm 4.7	26.2 \pm 3.0	0.163

Table 2: Coefficient of determination (R²), significance of the regression coefficient (P) and equation of the linear regressions between relative mass of the stomach, pyloric caeca and intestine and body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency in the Atlantic cod.

	Mean \pm SE (n = 39)	Stomach mass (g g body mass ⁻¹)		Caeca mass (g g body mass ⁻¹)		Intestine mass (g g body mass ⁻¹)	
		R ²	P	R ²	P	R ²	P
Final body mass (g)	1036 \pm 26	0.060	0.138	0.235	0.002	0.124	0.030
				y = 8.09E-4x + 0.527		y = 2.26E-4x + 0.376	
Growth rate (% body mass day ⁻¹)	0.37 \pm 0.06	0.210	0.004	0.458	0.001	0.377	0.001
		y = 0.177x + 1.269		y = 0.495x + 1.194		y = 0.173x + 0.550	
Food intake (% body mass day ⁻¹)	1.57 \pm 0.18	0.372	0.001	0.700	0.001	0.540	0.001
		y = 0.087x + 1.200		y = 0.277x + 1.026		y = 0.077x + 0.495	
Food conversion efficiency (%)	25.9 \pm 2.0	0.005	0.697	0.007	0.667	0.001	0.969

In the equations, y corresponds to stomach, pyloric caeca and intestine mass relative to the whole body mass and x corresponds to body mass, growth rate, food intake or food conversion efficiency.

Table 3: Coefficient of determination (R^2), significance of the regression coefficient (P) and equation of the linear regressions between digestive enzyme activities and individual body mass, growth rate, food intake and food conversion efficiency in Atlantic cod.

Enzyme	Units	Body mass (g)		Growth rate (% body mass day ⁻¹)		Food intake (% body mass day ⁻¹)		Food conversion efficiency (%)	
		R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P
Proteases	U g tissue ⁻¹	0.106	0.046	0.047	0.191	0.027	0.321	0.025	0.401
	(U mg protein ⁻¹)X10 ⁻³	0.070	0.107	0.010	0.552	0.005	0.683	0.017	0.487
Trypsin	U g tissue ⁻¹	0.033	0.280	0.359	0.001	0.129	0.028	0.270	0.004
	U mg protein ⁻¹	0.034	0.272	0.306	0.001	0.085	0.080	0.306	0.002
Chymotrypsin	U g tissue ⁻¹	0.061	0.141	0.347	0.001	0.150	0.018	0.128	0.052
	(U mg protein ⁻¹)X10 ⁻³	0.043	0.211	0.332	0.001	0.166	0.011	0.125	0.055
ALP	U g tissue ⁻¹	0.075	0.096	0.350	0.001	0.343	0.001	0.086	0.001
	U mg protein ⁻¹	0.037	0.247	0.280	0.001	0.274	0.001	0.064	0.177
GGT	U g tissue ⁻¹	0.026	0.338	0.024	0.356	0.001	0.996	0.129	0.055
	(U mg protein ⁻¹)X10 ⁻³	0.037	0.247	0.033	0.277	0.001	0.874	0.112	0.071

In the equations, y corresponds to enzyme activities (expressed in U mg protein⁻¹) and x corresponds to body mass, growth rate, food intake or food conversion efficiency.

DISCUSSION

RBST EFFECTS

The stimulation of growth and/or food intake following bovine growth hormone administration has been demonstrated in many fish species including salmonids (Danzmann et al., 1990; Down et al., 1988, 1989; Gill et al., 1985; Higgs et al., 1975, 1976, 1977, 1978; Markert et al., 1977; McLean et al., 1990; Schulte et al., 1989), carp (Almendras et al., 1993), gilthead seabream (Sparus aurata; Cavari et al., 1993), American eel (Anguilla rostrata; Degani and Gallagher, 1985), goldfish (Carassius auratus; Prack et al., 1980), grass pickerel (Weatherley and Gill, 1987) and catfish (Ictalurus punctatus; Wilson et al., 1988). A few studies have also demonstrated an increase in food conversion following mammalian GH administration (Markert et al., 1977; Higgs et al., 1979; Degani and Gallagher, 1985; Down et al., 1989; Johnsson and Björnsson, 1994). Most of these studies dealt with early life stages. However studies on sub-adult coho salmon (Oncorhynchus kisutch; Down et al., 1988) or adult grass pickerel (Weatherley and Gill, 1987) have also demonstrated an increase in growth rate following GH administration.

Intramuscular injection of 40 µg bGH g⁻¹ 2 weeks⁻¹ led to significant differences in mass after 6 weeks in adult grass pickerel (Weatherley and Gill, 1987). In contrast, no differences in growth rate, food intake or food conversion efficiency were observed following rbST injection of Atlantic cod in our study. This could be related to the short duration of the experimental period or possibly to the stress response induced by rbGH injection. A preliminary experiment conducted under similar conditions allowed us to observe severe exophthalmia and skin darkening following injection of cod with 30 µg

rbST $\text{g}^{-1} 2 \text{ weeks}^{-1}$. These symptoms were not due to a stress caused by injection because control fish which were injected with saline were in good condition. By using smaller doses we prevented appearance of these strong symptoms but may have still evoked a less pronounced stress response. In their experiment on Atlantic salmon parr (Salmo salar) injected with porcine growth hormone, Komourdjian et al. (1976) observed a fin darkening and none of the silvering which is normally associated with smoltification. They did not explain the darkening but suggested that the GH they used was contaminated with ACTH. This adrenocorticotrophic hormone (secreted by the anterior pituitary gland) is implied in secondary stress responses (Jobling, 1994). However, our use of a recombinant form of the bovine somatotropin rules out this possibility. In humans, it is known that GH is liberated during stress reactions (Vander et al., 1989). This might occur in fish as well and the action of this hormone on stress reactions can be mediated through direct or indirect stimulation of ACTH secretion. Whether a stimulation by rbST of growth or food intake was masked by a more pronounced effect on stress in our study is unknown.

In our experiment, maximal individual growth rates obtained were equal or superior to the maximal rates observed in other experiments on cod fed similar ration under similar conditions of salinity and temperature (Lambert et al. 1994; Pelletier et al. 1994). However, higher growth rate can be achieved at higher temperatures since maximum growth in cod is obtained near 13°C (Jobling 1988). Furthermore, gonadal development could have influenced somatic growth rate, but at the period of the year that experiment were performed, gonadal development was limited.

The metabolic effects of GH may include a stimulation of protein synthesis and deposition but this does not necessarily imply that there should be changes in the relative composition of the body tissues (Jobling, 1994). Studies on GH administration are contradictory about the effect on muscle protein content. In coho salmon, Higgs et al. (1976) noted an increase in muscle protein content following GH administration while Markert et al. (1977) noted a decrease. In our study, no effect of rbST was noted on protein content of muscle. No previous study on fish has noted an effect of growth hormone administration on the protein content of the digestive tract. No correlation between bST administration and water, DNA or protein content of the small intestinal mucosa was found in sheep (Bird et al., 1996). However, these authors did not measure the stomach protein content. The protein content of the intestine did not change following administration of rbST in our study but the stomach protein content decreased. While protein content decreased, the protease activity relative to protein content (U mg protein^{-1}) increased allowing the overall protease activity expressed per g of fish to remain constant or even to tend to increase with increasing rbST dose. This suggests that the proteolytic enzymes were not affected by the general decrease of protein content in the stomach.

DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES

The lack of relationship between acid protease activities in the stomach and growth rate, food intake or food conversion efficiency is consistent with Kuz'mina and Kuz'mina's (1990) finding in zander (Stizostedion lucioperca) and perch (Perca fluviatilis) that the stomach protease activities initially increases after a meal and

subsequently sharply decreases when digestion is completed. Thus we may have found no relation with food intake because fish in our study were killed two days after the last meal while acid protease activities are adjusted to food intake on a shorter period of time (hours). Therefore, stomach acid protease cannot be ruled out as potentially limiting fish growth. These enzymes should be measured earlier after a meal in order to test these relationships more adequately.

Trypsin and chymotrypsin activities in pyloric caeca were correlated with growth rate both when expressed as U g fish^{-1} or as U mg protein^{-1} . These results agree with those of Baragi and Lovell (1986) who showed a correlation of trypsin and chymotrypsin activities with growth rate in striped bass. Trypsin activity also showed a significant relation with food conversion efficiency while chymotrypsin did not. Since the relative caeca mass was correlated with growth rate and food, we should expect a significant relation of trypsin and chymotrypsin with growth rate or food intake when these enzymes are expressed as total activities in the caeca over body mass. However, when enzyme activities are expressed in units per gram of tissue or mg protein the relations between trypsin or chymotrypsin and growth rate remained significant. Therefore these relations cannot be explained by the relative mass of the tissue. There was also no relation between relative caeca mass and food conversion efficiency, so the relation of trypsin activity as U g fish^{-1} with food conversion efficiency could not be explained by caeca mass relative to body mass. Furthermore, when trypsin activity was expressed in U mg protein^{-1} , the relation with food conversion was as strong as the relation with growth rate and the enzyme showed no relation with food intake. This reinforces the conclusion that trypsin activity and growth rate are linked through trypsin's effect on the capacity of fish to convert food into body component. As food

conversion efficiency explains a significant proportion of growth rate, an enzyme linked with this parameter would thus favor growth in fish fed to satiation.

In contrast to trypsin, intestinal enzymes did not seem to impose any limitation to growth in Atlantic cod. ALP activity showed a very significant relation with growth rate when expressed in U g fish^{-1} , but the relation with food intake was slightly stronger and no significant relation with food conversion efficiency was observed. Furthermore as growth rate and food intake were significantly correlated with the relative intestinal mass, a significant relation of ALP with growth rate or food intake can be expected when activities are expressed as total activity per units of body mass. In mammals (Corring 1980, Girard-Globa *et al.* 1980), the presence of food in the intestine stimulates the secretion of intestinal enzymes. The same situation may occur for alkaline phosphatase in fish. The level of activity in intestinal membrane enzyme is adjusted to the quantity of food present in the intestinal tract (Fraisse *et al.* 1981). Similarly, the weak relation between GGT (in U g fish^{-1}) and growth rate or food intake disappeared when the activity was expressed in U mg protein^{-1} . The relation between the relative intestinal mass and growth rate or food intake being significant, it can explain to a large extent the relation of this enzyme with growth rate or food intake.

In conclusion, trypsin was the only enzyme among those examined in this study that is suspected to potentially limit digestive capacity in cod mainly because it is the only one having shown a relation with food conversion efficiency. Furthermore, this limitation of digestive capacity could be linked with a limitation on growth rate because this enzyme showed a stronger correlation with growth rate than with food intake. This conclusion is in agreement with the studies of Torrissen and his collaborators who have

shown a relation between the presence of a specific trypsin isozyme (TRP-2*92) and growth rate (Torrissen 1991, Torrissen and Shearer 1992), absorption, utilization or digestion of dietary proteins (Torrissen *et al.* 1994, Torrissen and Shearer 1992). Similarly, our results indicate that trypsin may play an important role in regulating growth through its importance on protein digestion in Atlantic cod. Further studies on this enzyme could be of major significance in the elaboration of nutritional or selective programs in the aquaculture industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr. Yves Gagnon and Mr. Mario Péroquin for their technical assistance and their help in the fish culture facility. This research was funded by the Department of Fisheries and Oceans (Canada) and through an NSERC grant to P. Blier. We thank Monsanto Canada for the generous donation of the recombinant bovine somatotropin used in this experiment. We also thank Dr. Helga Guderley for her comments on the manuscript.

CHAPITRE III

CONCLUSION

Blier et al. (1997) dans leur revue de littérature ont suggéré 3 façons d'expliquer les contraintes métaboliques de la croissance maximale chez les poissons. D'abord la capacité de transport de l'oxygène de l'environnement aux tissus pourrait être limitante (Pauly, 1981). Cette limite métabolique pourrait aussi se situer au niveau de la capacité des tissus à synthétiser l'ATP requis pour les processus anaboliques, principalement la synthèse des protéines (Goolish and Adelman, 1987; Pelletier et al., 1993, 1994), ou encore, au niveau des processus digestifs c'est-à-dire de la synthèse et de la sécrétion d'enzymes digestives ou du transport actif des nutriments (Blier et al., 1997).

La présente étude s'est concentrée sur la dernière hypothèse car c'est celle qui semble la plus plausible (Blier et al., 1997). Les études effectuées jusqu'à présent sur une large gamme d'enzymes digestives chez les poissons visaient principalement l'étude de leur présence ou de leur quantité (Sarbah, 1951; Zendzian et Barnard, 1967). D'autre part, certaines études ont relié l'activité d'enzymes digestives (en particulier les protéases) avec le taux de croissance (Baragi et Lovell, 1986; Torrissen, 1991; Torrissen et Barnung, 1991; Torrissen et Shearer, 1992) mais ces études n'examinaient pas les taux de croissance individuels ni l'efficacité de conversion des aliments. Chez la morue, l'étude des enzymes digestives s'est limitée jusqu'à récemment à l'étude des propriétés de certaines enzymes tel la trypsine (Simpson et al., 1989) et la chymotrypsine (Asgeirsson et Bjarnason, 1991).

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux de Torrissen et ses collaborateurs qui ont aussi démontré une relation entre l'activité de la trypsine et le

taux de croissance (Torrissen, 1991; Torrissen et Shearer, 1992) ainsi que la digestion et l'absorption des protéines de la diète (Torrissen et al., 1994; Torrissen et Shearer, 1992). Cependant, notre étude constitue la première qui démontre le lien entre la trypsine et l'efficacité de conversion des aliments à l'échelle individuelle. Les autres études comparaient différentes souches d'une même espèce ou différentes espèces.

À la lumière de nos résultats, nous pouvons conclure que s'il existe un goulot d'étranglement au niveau des capacités de croissance de la morue, il pourrait se situer en partie au niveau de la trypsine puisque c'est la seule parmi les enzymes étudiées qui montre une relation avec l'efficacité de conversion des aliments. En effet, l'augmentation du taux d'ingestion de nourriture est suivie d'une augmentation du taux de croissance qui plafonne lorsque les poissons ont atteint leur capacité maximale en terme de conversion des aliments. À ce niveau, on peut donc supposer que les individus ayant la meilleure efficacité de conversion des aliments pourront accéder à un taux de croissance maximal plus élevé. Ainsi, une enzyme possédant une corrélation avec l'efficacité de conversion des aliments pourra être fortement soupçonnée de jouer un rôle limitant dans la capacité digestive et la croissance.

Nos résultats ouvrent des avenues intéressantes en physiologie de la croissance et de la nutrition chez les poissons. En effet, si nous savons que la trypsine peut limiter la croissance, il sera possible de trouver des solutions pour augmenter le taux de croissance et l'efficacité de conversion chez les poissons, par exemple en limitant les aliments à base végétale qui constituent une source d'inhibiteurs de la trypsine. De nouvelles avenues seront donc possibles pour permettre d'améliorer la rentabilité de l'industrie aquicole.

Il serait intéressant de vérifier si les relations obtenues s'étendent à d'autres stades de vie chez la morue ou à d'autres espèces. La possibilité d'existence de différentes formes (allozymes) de la trypsine chez la morue (comme c'est le cas chez les salmonidés) pourrait aussi être étudiée. En effet, certains allozymes pourraient être associés à un meilleur potentiel de croissance comme chez les salmonidés. Si c'est le cas, il pourrait s'agir d'une méthode permettant de sélectionner des sujets possédant un potentiel important pour l'industrie aquicole.

REFERENCES

Adelman, I.R. Effects of bovine growth hormone on growth of carp (Cyprinus carpio) and the influences of temperature and photoperiod. Journal of Fisheries Research and Board of Canada, 1977, 34, 509-515.

Almendras, J.M.E., Brunet, P. et Boeuf, G. Responses of a non migratory stock of brown trout, Salmo trutta, to ovine growth hormone treatment and seawater exposure. Aquaculture, 1993, 114, 169-179.

Asgeirsson, B. et Bjarnason, J.B. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (Gadus morhua). Comparison with bovine chymotrypsin. Comparative Biochemistry and Physiology, 1991, 99B, 327-335.

Baragi, V. et Lovell, R.T. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. Transactions of the American Fisheries Society, 1986, 115, 478-484.

Bergmeyer, H.V. (ed.) Methods of Enzymatic Analysis. New York : Academic Press, 1974, 701 p.

Bird, A.R., Croom, W.J., McBride, B.W., Fan, Y.K., Daniel, L.R. et Taylor, I.L. Recombinant bovine somatotropin increases nutrient absorption by the proximal intestine in sheep. Canadian Journal of Animal Science, 1996, 76, 343-350.

Bishop, C. et Odense, P.H. Morphology of the digestive tract of the cod, Gadus morhua. Journal of Fisheries Research and Board of Canada, 1966, 23, 1607-1615.

Blier, P.U., Pelletier, D. et Dutil, J.-D. Does aerobic capacity set a limit upon fish growth rate? Review of Fisheries Sciences, 1997, 5, 323-340.

Cavari, B., Funkenstein, B., Chen, T.T., Gonzalez-Villasenor L.I. et Schartl, M. Effect of growth hormone on the growth rate of gilthead seabream (Sparus aurata), and use of different constructs for the production of transgenic fish. Aquaculture, 1993, 111, 189-197.

Cohen, T., Gertler A. et Birk, Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (Cyprinus carpio L.) - II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. Comparative Biochemistry and Physiology, 1981, 69B, 647-653.

Corring, T. The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. Reproduction, Nutrition and Development, 1980, 20, 1217-1235.

Dabrowski, K. Digestion of protein and amino acid absorption in stomachless fish, common carp (Cyprinus carpio). Comparative Biochemistry and Physiology, 1983, 74A, 409-415.

Dabrowski, K. et Dabrowska, H. Digestion of protein by rainbow trout (Salmo gairdneri Rich.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. Comparative Biochemistry and Physiology, 1981, 69A, 99-111.

Dabrowski, K., Krumschnabel, G., Paukku M. et Labanowski, J. Cyclic growth and activity of pancreatic enzymes in alevins of arctic charr (Salvelinus alpinus L.). Journal of Fish Biology, 1992, 40, 511-521.

Dabrowski, K., Poczyczynski, P., Köck G. et Berger, B. Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (Salmo gairdneri). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. Aquaculture, 1989, 77, 29-49.

Danzmann, R.G., Van Der Kraak, G.J., Chen, T.-T. et Power, D.A. Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) reared at high temperature. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1990, 47, 1292-1301.

Degani, G. et Gallagher, M.L. Effects of dietary 17 α -methyltestosterone and bovine growth hormone on growth and food conversion of slow- and normally-growing American elvers (Anguilla rostrata). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1985, 42, 185-189.

Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson P. et Chan, W.-K. Extraordinary salmon growth. Nature, 1994, 371, 209-210.

Diamond, J.M. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. News in Physiological Sciences, 1991, 6, 92-96.

Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs D.A. et McBride, J.R. Hormonal enhancement of growth. Dans Fish Physiology. Vol. VIII. pp 455-497. Édité par W.S. Hoar, D.J. Randall et J.R. Brett. New York : Academic Press, 1979.

Down, N.E., Donaldson, E.M., Dye, H.M., Boone, T.C., Langley, K.E. et Souza, L.M. 1989. A potent analog of recombinant bovine somatotropin accelerates growth in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1989, 46, 178-183.

Down, N.E., Donaldson, E.M., Dye, H.M., Langley, K.E. et Souza, L.M. Recombinant bovine somatotropin more than doubles the growth rate of coho salmon (Oncorhynchus kisutch) acclimated to seawater and ambient winter conditions. Aquaculture, 1988, 68, 141-155.

Du, S.J., Gong, Z., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R. et Hew, C.L. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Bio/Technology, 1992, 10, 176-180.

Dutil, J.D., Lambert, Y., Chouinard, G.A. et Frechet, A. Fish condition : what should we measure in cod (Gadus morhua)? MPO Pêches de l'Atlantique, 1995, Document de recherche 95/11. 16p. + figures.

Dutta, H. Growth in fishes. Gerontology, 1994, 40, 97-112.

Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standardisierung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Zur für Klinische Chemie Klinische Biochemie, 1970, 8, 658.

Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standardisierung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Zur für Klinische Chemie Klinische Biochemie, 1972, 10, 182.

Farmer, S.W., Parkoff, H., Hayashida, R., Bewley, T.A., Bern, H.A. et Li, C.H. Purification and properties of teleost growth hormone. General and Comparative Endocrinology, 1976, 30, 91-100.

Fletcher, G.L., Shear, M.A., King, M.J., Davies, P.L. et Hew, C.L. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1988, 45, 352-357.

Fraisse, M., Woo, N.Y.S., Noaillac-Depeyre, J. et Murat, J.C. Distribution pattern of digestive enzymes activities in the intestine of the catfish (Ameiurus nebulosa L.) and of the carp (Cyprinus carpio L.). Comparative Biochemistry and Physiology, 1981, 70A, 443-446.

Frye, B.E. Hormonal control in vertebrates. New York : MacMillan Company, 1971. 122 p.

Gill, J.A., Sumpter, J.P., Donaldson, E.M., Dye, H.M., Souza, L., Berg, T., Wypych, J. et Langley, K. Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific salmon Oncorhynchus kisutch. Bio/technology, 1985, 3, 643-646.

Girard-Globa, A., Bourdel, G. et Lardeaux, B. Regulation of protein synthesis and enzyme accumulation in the rat pancreas by amount and timing of dietary protein. Journal of Nutrition, 1980, 110, 1380-1390.

Goolish, E.M. Aerobic and anaerobic scaling in fish. Biological Review, 1991, 66, 33-56.

Goolish, E.M. et Adelman, I.R. Tissue specific cytochrome oxidase activity in largemouth bass : the metabolic costs of feeding and growth. Physiological Zoology, 1987, 60, 454-464.

Griffiths, J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. et Gelbart, W.M. Introduction à l'analyse génétique. Paris : DeBoeck Université, 1997. 915 p.

Guyomard, R., Chourrout, D., Leroux, C., Houdebine, L.-M. et Pourrain, F. Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilized trout eggs. Biochimie, 1989, 71, 857-863.

Hammond, K.A., Konarzewski, M., Torres, R.M., et Diamond, J. Metabolic ceilings under a combination of peak energy demands. Physiological Zoology, 1994, 67, 1479-1506.

Higgs, D.A., Donaldson, E.M., Dye, H.M., et McBride, J.R. A preliminary investigation of the effect of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). General and Comparative Endocrinology, 1975, 27, 240-253.

Higgs, D.A., Donaldson, E.M., Dye, H.M. et McBride, J.R. Influence of bovine growth hormone and L-thyroxine on growth, muscle composition, and histological structure of the gonads, thyroid, pancreas and pituitary of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of the Fisheries Research and Board of Canada, 1976, 33, 1585-1603.

Higgs, D. A., Donaldson, E.M., McBride, J.R. et Dye, H.M. Evaluation of the potential for using chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary extract versus bovine growth hormone, to enhance the growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, 1978, 56, 1226-1231.

Higgs, D.A., Fagerlund, U.H.M., McBride, J.R., Dye, H.M. et Donaldson, E.M. Influence of combinations of bovine growth hormone, 17 α -methyltestosterone, and L-thyroxine on growth of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, 1977, 55, 1048-1056.

Higgs, D.A., Fagerlund, U.H.M., McBride, J.R. et Eales, J.G. Influence of orally administered L-thyroxine of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on growth, food consumption and food conversion of underyearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, 1979, 57, 1974-1979.

Hochachka, P.W. et Somero, G.N. Biochemical Adaptation. Princeton : Princeton University Press, 1984.

Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C. et Noble, B.S. Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1988, 45, 951-964.

Hummel, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37, 1393-1399.

Jobling, M. A review of the physiological and nutritional energetics of cod (*Gadus morhua*) L., with particular reference to growth under farmed conditions. Aquaculture, 1988, 70, 1-19.

Jobling, M. Fish Bioenergetics. London : Chapman & Hall, 1994. 309 p.

Jobling, M. Environmental Biology of Fishes. London : Chapman & Hall, 1995. 455 p.

Johnsson, J.I. et Björnsson, B. Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Animal Behaviour, 1994, 48, 177-186.

Kakade, M.L., Hoffa, D.E. et Liener, I.E. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybean fed to rats. Journal of Nutrition, 1973, 103, 1772-1778.

Karasov, W.H. Energetics, physiology and vertebrate ecology. Tree, 1986, 1, 101-104.

Kawai, S. et Ikeda, S. Studies on digestive enzymes of fishes II. Effect of dietary change on the activity of digestive enzymes in carp intestine. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1972, 38, 265-270.

Kawai, S. et Ikeda, S. Studies on digestive enzymes of fishes - III. Development of digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1973, 39, 817-823.

Kleiber, M. The fire of life : An introduction to animal energetics. New York : R.E. PUBLISHING COMPANY, 1975. 311 p.

Komourdjian, M.P., Saunders, R.L. et Fenwick, J.C. The effect of porcine somatotropin on growth, and survival in seawater of Atlantic salmon (Salmo salar) parr. Canadian Journal of Zoology, 1976, 54, 531-535.

Krogdhal, A. Pancreatic proteinases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. Comparative Biochemistry and Physiology, 1983, 74B, 403-409.

Krogdhal, A., Lea, T.B. et Olli, J.J. Soybean protease inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comparative Biochemistry and Physiology, 1994, 107A, 215-219.

Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitors. Journal of General Physiology, 1947, 30, 291-311.

Kuz'mina, V.V. et Kuz'mina, Y.G. Level of total proteolytic activity in some species of fish from the Volga Basin. Journal of Ichthyology, 1990, 30, 119-125.

Lambert, Y, Dutil, J.-D. et Munro, J. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (Gadus morhua). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1994, 51, 1569-1576.

Lauff, M. et Hofer, R. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture, 1984, 37, 335-346.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. et Cox, M.M. Principles of Biochemistry. New York : Worth Publishers, 1993.

Lied, E., Julsham, K. et Braekken, O.R. Determination of protein digestibility in Atlantic cod (Gadus morhua) with internal and external indicators. Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences, 1982, 39, 854-861.

Lied, E. et Njaa, L.R. Apparent availability of total nitrogen, protein nitrogen and of individual amino acids in Atlantic cod (Gadus morhua). Fiskeridirektoratets Skrifter-Serie Ernæring, 1982, 2, 53-62.

Lied, E. et Solbakken, R. The course of protein digestion in Atlantic cod (Gadus morhua). Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 77A, 503-506.

MacLean, N. et Penman, D. The application of gene manipulation to aquaculture. Aquaculture, 1990, 85, 1-20.

Markert, J.R., Higgs, D.A., Dye, H.M. et MacQuarrie, D.W. Influence of bovine growth hormone on growth rate, appetite, and food conversion of yearling coho salmon (Oncorhynchus kisutch) fed two diets of different composition. Canadian Journal of Zoology, 1977, 55, 74-83.

Martinez, A. et Serra, J.L. Proteolytic activities in the digestive tract of Anchovy (Engraulis encrasicolus). Comparative Biochemistry and Physiology, 1989, 93B, 61-66.

McLean, E., Donaldson, E.M., Dye, H.M. et Souza, L.M. Growth acceleration of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following oral administration of recombinant bovine somatotropin. *Aquaculture*, 1990, 91, 197-203.

Naftalin, L., Sexton, M., Whitaker, J.F. et Tracey, D. A routine procedure for estimating serum γ -glutamyl transpeptidase activity. *Clinical Chemistry Acta*, 1969, 26, 293.

Olli, J.J., Hjelmeland, K. et Krogdahl, A. Soybean trypsin inhibitors in the diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): Effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1994, 109A, 923-928.

Pauly, D. The relationship between gill surface area and growth performance in fish : a generalisation of von Bertalanffy's theory of growth. *Meeresforsch*, 1981, 28, 251-282.

Pelletier, D., Dutil, J.-D., Blier, P.U. et Guderley, H. Relation between growth and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology*, 1994, 164B, 179-190.

Pelletier, D., Guderley, H. et Dutil, J.-D. Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rate? *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 12, 83-93.

Pelmont, J. *Enzymes, Catalyseurs du monde vivant*. Grenoble : Presses de l'Université de Grenoble, 1995. 1039 p.

Penman, D.J., Beeching, A.J., Penn, S., Rhaman, A., Sulaiman, Z. et MacLean, N. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 1991, 30, 201-206.

Peterson, C.C., Nagy, K.A. et Diamond, J. Sustained metabolic scope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87, 2324-2328

Pickford, G.E. The growth hormone. Dans *The physiology of the pituitary gland of fishes*. Pp. 84-89. Édité par G.E. Pickford et J.W. Atz. New York : New York Zoological Society, 1957.

- Pickford, G.E. Introductory remarks. American Zoologist, 1973, 13, 711-717.
- Plakas, S.H. et Katayama, T. Apparent digestibilities of amino acids from three regions of the gastrointestinal tract of carp (Cyprinus carpio) after ingestion of a protein and a corresponding free amino acid diet. Aquaculture, 1981, 24, 309-314.
- Prack, M., Antoine, M., Caiati, M., Roskowski, M., Treacy, T., Vodcnik, M.J. et de Vlaming, M.L. The effects of mammalian prolactin and growth hormone on goldfish (Carassius auratus) growth, plasma amino acid levels and liver amino acid uptake. Comparative Biochemistry and Physiology, 1980, 67A, 307-310.
- Rao, K.N. et Lombardi, B. Substrate solubilization for the Hummel α -Chymotrypsin assay. Analytical Biochemistry, 1975, 65, 548-551.
- Ricker, W.E. Growth rate and models. Dans Fish Physiology, vol. 8. pp. 677-746. Édité par W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett. New York : Academic Press, 1979.
- Saarikko, J. et Hanski, I. Timing of rest and sleep in foraging shrews. Animal Behaviour, 1990, 40, 861-869.
- Sarath, G., de la Motte, R.S. et Wagner, F.W. Protease assay methods. Dans Proteolytic enzymes, a practical approach. pp. 25-55. Édité par Beynon, R.J. et Bond, J.S. Oxford : IRL Press, 1989.
- Sarbahi, D.S. Studies of the digestive tract and the digestive enzymes of the goldfish, Carassius auratus L., and the largemouth bass, Micropterus salmoides (Lacepede). Biological Bulletin, 1951, 100, 244-257.
- Scerbina, M.A. et Sorvacev, K.F. Some data concerning amino acid absorption in digestive tract of 2-years old common carp. Journal of Ichthyology, 1969, 16, 315-322.
- Schulte, P.M., Down, N.E., Donaldson, E.M. et Souza, L.M. Experimental administration of recombinant bovine growth hormone to juvenile rainbow trout (Salmo gairdneri) by injection or by immersion. Aquaculture, 1989, 76, 145-156.
- Shear, M.A., Fletcher, G.L., Hew, C.J., Gauthier, S. et Davies, D.L. Transfer, expression and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (Salmo salar). Marine Molecular Biology and Biotechnology, 1991, 1, 58-63.

Skrede, A. et Krogdhal, A. Heat affects nutritional characteristics of soybean meal and excretion of proteinases in mink and chicks. Nutrition and Reproduction Int., 1985, 32, 479-489.

Simpson, B.K., Simpson, M.V. et Haard, N.F. On the mechanism of enzyme action : Digestive proteases from selected marine organisms. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1989, 11, 226-234.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. et Klenk, M.D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 1985, 150, 76-85.

Somero, G.N. et Childress, J.J. Scaling of ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit. Journal of Experimental Biology, 1990, 149, 319-333.

Stroband, H.W. et Van der Veen, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grass carp. Ctenopharyngodon idella (Val.). Dans Structure and function of the digestive tract of the grass carp. pp. 1-16. Édité par Stroband, H.W.J. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1980.

Sulistiyani et Heruwati, E.S. Identification and purification of proteolytic enzymes from fish pyloric caeca. Communication présenté à la 8^e session de l'Indo pacific fishery commission working party on fish technology and marketing. Yogyakarta (Indonesia), september 1991 (no 470), 1992.

Sumpter, J.P. Control of growth of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture, 1992, 100, 299-320.

Suzuki, D.T., Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Lewontin, R.C. Introduction à l'Analyse Génétique. Montréal : Éditions du Renouveau Pédagogique, 1991. 768 p.

Tietz, N.W (ed.). Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1986. 1919 p.

Torrissen, K.R. Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (Salmo salar) in comparison with rainbow trout (Salmo gairdneri). Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 77B, 669-674.

Torrissen, K.R. Genetic variation of trypsin-like isozymes correlated to fish size of Atlantic salmon (Salmo salar). Aquaculture, 1987, 62, 1-10.

Torrissen, K.R. Genetic variation in growth rate of Atlantic salmon with different trypsin-like isozyme patterns. Aquaculture, 1991, 93, 299-312.

Torrissen K.R. et Barnung, T.N. Genetic difference in trypsin-like isozyme pattern between two strains of Arctic charr (Salvelinus alpinus). Aquaculture, 1991, 96, 227-231.

Torrissen, K.R., Lied, E. et Espe, M. Difference in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (Salmo salar) with genetically different trypsin isozymes. Journal of Fish Biology, 1994, 45, 1087-1104.

Torrissen, K.R. and Shearer, K.D. Protein digestion, growth and food conversion in Atlantic salmon and Arctic charr with different trypsin-like isozyme patterns. Journal of Fish Biology, 1992, 41, 409-415.

Torrissen, K.R. et Torrissen, O.J. Protease activities and carotenoid levels during the sexual maturation of Atlantic salmon (Salmo salar). Aquaculture, 1985, 50, 113-122.

Vander, A.J., Sherman, J.H. et Luciano, D.S. Physiologie humaine (2nd ed.). Montreal : McGraw-Hill, 1989.

Wallace, R.A., King, J.L. et Sanders, G.P. Digestion and nutrition. Dans Biology the Science of Life. pp. 731-757. Édité par Wallace, R.A., King, J.L. et Sanders, G.P. Illinois : Scott, Foresman, 1986.

Weatherley, A.H. et H.S. Gill, H.S. Growth increases produced by bovine growth hormones in grass pickerel, Esox americanus vermiculatus (Le Sueur), and the underlying dynamics of muscle fiber growth. Aquaculture, 1987, 65, 55-66.

Weatherley, A.H. et H.S. Gill, H.S. Growth. In Physiological Ecology of Pacific Salmon. pp. 103-158. Édité par Groot, C., Margolis, L. et Clark, W.C. Vancouver : UBC Press, 1995.

Weiner, J. Maximum energy assimilation rates in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). Oecologia, 1987, 72, 297-302.

Weiner, J. Metabolic constraints to mammalian energy budgets. Acta Theriologica, 1989, 34, 3-35.

Weiner, J. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: Ecological implications. Tree, 1992, 7, 384-388.

Wilson, R.P. et Poe, W.E. Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel catfish. Aquaculture, 1985, 46, 19-25.

Wilson, R.P., Poe, W.E., Nemetz, T.G. et MacMillan, J.R. Effect of recombinant bovine growth hormone administration on growth and body composition of channel catfish. Aquaculture, 1988, 73, 229-236.

Yaotong, H. et Yongjian, L. Study on protease activity in the intestine and hepatopancreas of grass carp, Ctenopharyngodon idellus (C. et V.). Acta Hydrobiologia Sinica, 1988, 12, 328-334.

Yoshizaki, G., Oshiro, T. et Takashima, F. Introduction of carp α -globin gene in rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57, 819-824.

Zendzian, E.N. et Barnard, E.A. Distribution of pancreatic ribonuclease, chymotrypsin, and trypsin in vertebrates. Archives in Biochemistry and Biophysics, 1967, 122, 699-713.