

Travail de fin d'études

Auteur : Bricmont, François

Promoteur(s) : Rougeot, Carole

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/15417>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège
Faculté des Sciences



Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Travail de fin d'étude

Evaluation du bien-être du sandre dans différents systèmes d'élevage par l'utilisation d'indicateurs physiologiques et biologiques

Réalisé par

François Bricmont

Promoteur

Carole Rougeot

Encadrant

Renaud Nivelles

Année académique 2021 – 2022

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice, Carole Rougeot, pour ses nombreux conseils et corrections qui m'ont permis de réaliser ce mémoire. Je remercie également mon encadrant, Renaud Nivelles, de m'avoir accompagné tout au long de ce mémoire, d'avoir poussé plus loin ma réflexion scientifique et développé mes connaissances en biologie moléculaire qui n'était pas mon domaine de prédilection. Merci à toi et à Alicia de m'avoir accepté dans votre bureau. Je me suis directement senti à l'aise en votre compagnie ce qui a rendu ce mémoire encore plus agréable.

Je souhaite remercier l'entièreté de l'équipe pour sa bonne humeur et ses conseils qui m'ont poussé à approfondir mes réflexions. Je me suis vraiment plu au CEFRA et c'est sûrement grâce à vous tous.

Cette année m'a également permis de rencontrer Léa, ma partenaire de promotion, sans qui cette année m'aurait semblée bien plus longue.

Merci à mes sœurs, Estelle et Clotilde, de m'avoir soutenu tout au long de cette dernière année d'étude et de m'avoir apporté leur aide dans la réalisation de ce travail. Enfin, je remercie encore une fois mes parents de m'avoir permis de réaliser ce master grâce auquel j'ai pu me spécialiser dans un domaine qui me plaît.

RÉSUMÉ

L'*aquaponie* est la combinaison d'un élevage de poissons en *aquaculture* et d'une culture de plantes hors-sol en *hydroponie*. Cette innovation a de nombreux avantages comme une faible consommation d'eau (i.e. < 10 % par rapport à une agriculture conventionnelle), le recyclage des nutriments (i.e. 80 à 85 % de l'azote et du phosphore), la réduction des déchets et l'absence de pesticides. Dans le cadre d'un projet INTERREG Grande-Région intitulé « PERCIPONIE – Développement de la perciculture en Aquaponie », l'effet des systèmes aquaponiques sur le bien-être et les performances de croissance de sandres a été évalué. A ce niveau, l'utilisation de plantes pour l'amélioration du bien-être et de la santé des poissons n'a jamais été intégrée dans la conception de systèmes aquaponiques. En effet, des effets bénéfiques des plantes sur les poissons ont été prouvés. Le bien-être des sandres a été évalué par des indicateurs physiologiques classiques (e.g. glycémie, taux de cortisol plasmatique), des neurotransmetteurs (e.g. sérotonine et dopamine) ainsi que par l'utilisation d'un nouvel indicateur : le microbiote intestinal de *Sander lucioperca*. Les analyses ont été réalisées dans un système aquaponique où le sandre est élevé en monoculture, dans un système ouvert où le sandre est élevé en monoculture et sur des échantillons issus de sandres élevés en monoculture dans un système avec accumulation des nitrates (Maliki, 2021). La comparaison des indicateurs a permis de montrer qu'un stress aigu (e.g. manipulation) entraîne un pic de glucose et de cortisol sanguin et qu'un stress chronique par accumulation de nitrates inhibe l'activité des systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques. L'établissement de la composition du microbiote a mis en évidence certaines tendances : la présence de *Photobacterium damsela damsela* en aquaponie qui pourrait être la cause de la mortalité chronique observée ; une présence plus importante de *Shewanella* en circuit ouvert ; une présence plus prononcée de *Plesiomonas* et *Cetobacterium* à de faibles concentrations en nitrates avec une tendance d'augmentation de la diversité avec l'accumulation des nitrates. Ces résultats montrent que les réponses au stress, évaluées via les indicateurs physiologiques ou par l'étude du microbiote, sont différentes en fonction des systèmes d'élevage testés.

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction.....	1
1.1	Généralités.....	1
1.2	Les différents modes d'élevage du sandre.....	2
1.2.1	Les paramètres de croissance du sandre.....	2
1.2.2	RAS en monoculture : problématique des nitrates.....	3
1.3	L'aquaculture multitrophique intégrée.....	4
1.3.1	L'aquaponie.....	5
1.4	Le projet Perciponie – Développement de la perculture en aquaponie.....	6
1.5	Le bien-être animal.....	7
1.5.1	Règlementation et libertés.....	7
1.5.2	L'impact du stress sur les organismes.....	7
1.5.3	Les indicateurs de stress.....	8
1.5.3.1	Les neurotransmetteurs.....	10
1.5.3.1.1	Sérotonine.....	11
1.5.3.1.2	Dopamine.....	12
1.5.3.2	Le microbiote.....	14
2	Matériel et méthodes.....	16
2.1	Système aquaponique de Strée.....	16
2.2	Procédures de maintenance du système.....	17
2.3	Design expérimental.....	17
2.4	Echantillonnage.....	18
2.5	Dosage du cortisol sanguin.....	18
2.6	Dosage des neurotransmetteurs.....	19
2.6.1	Préparation des échantillons.....	19
2.6.2	Dosage de la sérotonine.....	19
2.6.3	Dosage de la dopamine.....	20
2.7	Analyse du microbiote.....	20
2.7.1	Extraction d'ADN.....	20
2.8	Analyses statistiques.....	22
3	Résultats.....	23
3.1	Effet du poids moyen sur les indicateurs physiologiques de stress.....	23
3.2	Glycémie.....	23
3.3	Taux de cortisol plasmatique.....	24

3.4	Concentration en sérotonine	25
3.5	Concentration en dopamine	25
3.6	Analyse du microbiote.....	26
3.6.1	Estimation de la diversité des échantillons	26
3.6.2	Analyses taxonomiques.....	27
4	Discussion	29
5	Conclusion et perspectives.....	37
6	Bibliographie.....	38
7	Annexes.....	57
7.1	Cortisol ELISA.....	57
7.2	Dosage de la sérotonine et dopamine	57
7.2.1	Préparation des échantillons.....	57
7.2.2	Serotonin FAST ELISA	58
7.2.3	Serotonin Research ELISA	59
7.2.4	Dopamine ELISA	60
7.2.5	Dopamine Research ELISA	61
7.3	Protocole d'extraction d'ADN.....	63
7.3.1	Statistiques générales	64
7.3.2	Nombre de séquences.....	69
7.3.3	Histogramme de qualité de séquences	70
7.3.4	Scores de qualité par séquence.....	71
7.3.5	Contenu en GC par séquence	72
7.3.6	Contenu en N par base	73
7.3.7	Distribution des longueurs de séquence	74
7.3.8	Niveaux de duplication des séquences	75
7.3.9	Contenu en adaptateurs	76
7.3.10	Contrôle des statuts	77

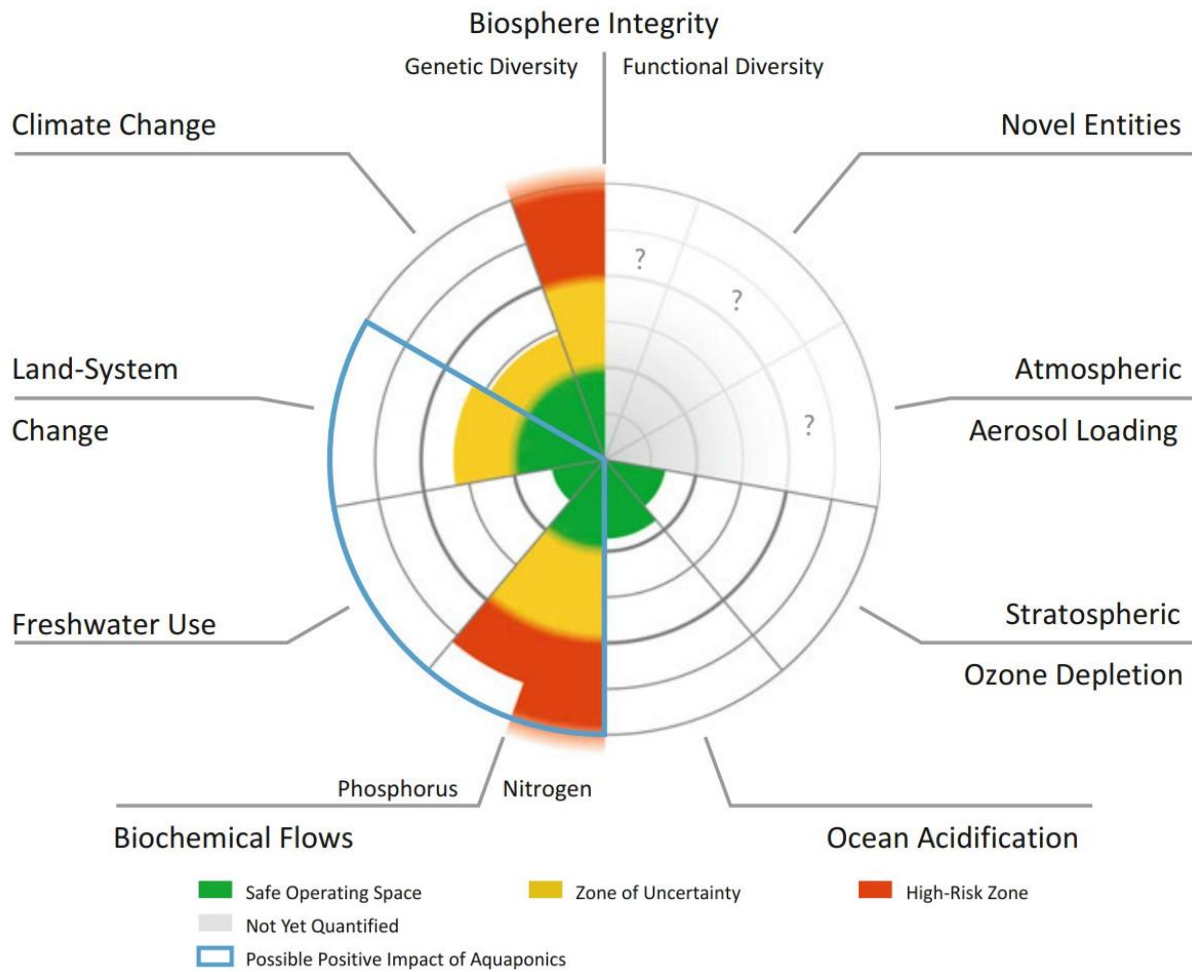


Fig 1 : État des variables de contrôle de sept limites planétaires. La zone verte représente l'espace d'exploitation sûr. Les zones jaunes et rouges représentent respectivement des risques moyens et importants tandis que les zones grisées indiquent les limites encore non quantifiées. Les variables reprises dans la zone bleue (le changement de système terrestre, l'utilisation d'eau douce et les flux biochimiques) indiquent les limites planétaires sur lesquelles l'aquaponie pourrait exercer un effet positif (Goddek *et al.*, 2019a).

1 INTRODUCTION

1.1 GÉNÉRALITÉS

La population humaine mondiale subit l'influence de deux phénomènes : la dynamique malthusienne selon laquelle une population croît exponentiellement jusqu'à la limitation ou l'épuisement des ressources et la dynamique darwinienne qui implique le contournement de ces limites par des évolutions ou adaptations des systèmes biologiques et culturels (Nekola *et al.*, 2013). Ces deux phénomènes sont d'autant plus importants que l'espèce humaine connaît une croissance démographique telle qu'elle atteindrait les dix milliards d'individus vers l'année 2057 (Ramakrishna, 2021). La production de nourriture a alors dû augmenter, accélérant ainsi la consommation des ressources planétaires. Cette surconsommation est marquée par l'arrivée précoce du jour du dépassement, soit le moment où les ressources que la Terre est capable de générer en un an ont été consommées (Lee *et al.*, 2021; Ramakrishna, 2021). La croissance de la demande en ressources impacte l'ensemble des systèmes de production dont fait partie l'aquaculture. L'intensification de l'activité humaine a été observée aussi bien dans le secteur agricole qu'aquacole afin d'assurer au maximum la sécurité alimentaire (Kopittke *et al.*, 2019; Campanati *et al.*, 2022). Cependant, la capacité de production d'aliments est directement proportionnelle à la disponibilité en ressources comme les terrains, l'eau, les sources énergétiques ainsi que les nutriments (Conijn *et al.*, 2018). Le concept de limite planétaire permet de définir les secteurs dans lesquels l'homme peut opérer en fonction des ressources les plus rares et limitantes (Steffen *et al.*, 2015). Certains systèmes de production auraient un impact positif sur trois de ces limites : la disponibilité de terrains, l'utilisation d'eau et les flux biochimiques de phosphore et d'azote (Figure 1). Ainsi, l'innovation technique et technologique pourrait permettre de transformer le contexte socio-économique de la croissance économique infinie en un système de production durable permettant le renouvellement des ressources consommées (Manelli, 2016). En effet, l'inflation est telle qu'une adaptation des modes de production est nécessaire afin de minimiser le coût des intrants tout en optimisant la productivité et la rentabilité des systèmes. Afin de limiter l'exploitation abusive des ressources finies de la Terre, les modes de pensées évoluent vers des systèmes comme l'économie circulaire qui vise principalement à minimiser la production de déchets en améliorant la réutilisation des ressources (Stahel, 2016).

La surexploitation des stocks naturels de poissons a accéléré le développement de la production aquacole afin de limiter la pression exercée, jusqu'à dépasser la production

halieutique (Tacon, 2020). L'aquaculture évolue également vers une diversification des espèces (Kim *et al.*, 2022) élevées comme le sandre, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758), qui est apprécié des consommateurs (Alexi *et al.*, 2018).

1.2 LES DIFFÉRENTS MODES D'ÉLEVAGE DU SANDRE

1.2.1 Les paramètres de croissance du sandre

La croissance de cette espèce est influencée par différents paramètres comme la température et l'alimentation. Afin d'optimiser la croissance des individus permettant d'améliorer la productivité du système, il est préférable de fournir une température d'eau qui permet la croissance optimale de l'espèce élevée (Árnason *et al.*, 2009; Neubauer & Andersen, 2019). Les percidés, qui sont plutôt thermophiles pour des poissons d'eaux tempérées, montrent de meilleures croissances à des températures plus élevées. Par exemple, *Perca flavescens* et *Perca fluviatilis* grandissent davantage à des températures de 23-24 °C, alors que la croissance optimale de *Sander vitreus* a lieu dans des eaux de 24-26 °C (Wang *et al.*, 2009). En ce qui concerne le sandre *Sander lucioperca* en élevage, sa croissance serait optimale à 28°C avec une fréquence de nourrissage de trois par jour à un taux de nourrissage de 2% de biomasse (Wang *et al.*, 2009), avec un aliment coulant qui permet d'obtenir de meilleures performances de croissance qu'un semi-flottant (Baekelandt *et al.*, 2018). Avec un taux d'alimentation et une densité d'élevage plus importants, la demande en oxygène est également plus conséquente. L'eau de l'élevage devrait donc être à un minimum de 50% de saturation en oxygène afin de permettre la croissance des sandres (Dalsgaard *et al.*, 2013). La luminosité impacte également le développement des sandres qui y sont particulièrement sensibles à cause de leur *tapetum lucidum*, qui permet d'améliorer la sensibilité de la rétine à la lumière (Baekelandt *et al.*, 2020). C'est pour cela que les sandres sont élevés à de faibles luminosités, préférentiellement à un éclairage de 10 lux plutôt que 100, ce qui est en adéquation avec leur comportement naturel de prédateur actif au crépuscule et à la tombée de la nuit (Baekelandt *et al.*, 2018). Les juvéniles de sandres peuvent être élevés à des densités allant de 15 à 30 kg.m⁻³ sans influence néfaste sur leur physiologie (Dalsgaard *et al.*, 2013). Il est également possible d'élever des individus jusqu'à 2 kg à des densités de 30 à 60 kg.m⁻³ sans augmenter le stress de confinement (Dalsgaard *et al.*, 2013). Enfin, il existe un dimorphisme sexuel de croissance chez les percidés pour lesquels les femelles ont une croissance plus rapide que les mâles (Craig, 2000). Un système multi-cohorte ne présentant que des individus femelles, obtenu par un traitement hormonal permettant l'inversion sexuelle (Rougeot, 2015), pourrait donc significativement améliorer la productivité de l'espèce (Jarmołowicz *et al.*, 2014).

1.2.2 RAS en monoculture : problématique des nitrates

L'intérêt grandissant pour la production aquacole de percidés rend nécessaire la connaissance des conditions physico-chimiques de l'eau permettant la croissance optimale des poissons comme le sandre (Dalsgaard *et al.*, 2013). Avec l'intensification de l'élevage, la matière organique présente dans les bassins est également plus importante, ce qui induit une diminution de la qualité du milieu. En effet, la dégradation des protéines mène à l'accumulation d'azote dans le milieu, ce qui est d'autant plus vrai pour les productions en système recirculé où le renouvellement d'eau est limité (van Rijn *et al.*, 2006). Cet azote est principalement excrété par les branchies sous forme d'ammoniac (85 – 90 %) et d'urée (10 – 15%) (Evans *et al.*, 2005) pour ensuite être nitrifié en nitrites et puis en nitrates par les bactéries (e.g. *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrotoga*, *Nitrolobus* (Ruiz *et al.*, 2019)) présentes dans le biofiltre (Colt *et al.*, 2006). Ces nitrates vont alors s'accumuler dans le système et sont éliminés par un renouvellement d'eau plus important, une unité de dénitrification, ou encore, dans le cadre d'une production aquacole multitrophique intégrée, grâce à des végétaux qui vont les capter pour leur croissance (Müller-Belecke *et al.*, 2013; Monsees *et al.*, 2017b; Wongkiew *et al.*, 2017).

Dès lors, connaître l'impact des nitrates sur les espèces élevées permettrait d'optimiser le système de production et ainsi réduire les coûts de production et/ou d'augmenter la productivité (Steinberg *et al.*, 2018). Cependant, l'effet généré par les nitrates peut varier en fonction des individus, des souches et mais aussi des stades considérés. En effet, la sensibilité d'une espèce aux paramètres physico-chimiques de l'eau serait positivement proportionnelle à la taille et à l'âge des individus. Ainsi, des individus juvéniles pourraient ne montrer aucun signe de stress pour une concentration de nitrates alors que des individus adultes en souffriraient. C'est ce qui a notamment été montré par une étude où des juvéniles de *S. lucioperca* ne sont pas négativement affectés par des concentrations atteignant les 350 mg N-NO₃ L⁻¹ (Schram *et al.*, 2014) alors que des individus subadultes auraient montré une diminution de leur alimentation à une dose de seulement 68 mg N-NO₃ L⁻¹ (Müller-Belecke *et al.*, 2013). Il a déjà été montré que les nitrates sont toxiques et que cette toxicité augmente avec la concentration et le temps d'exposition (Davidson *et al.*, 2014; Monsees *et al.*, 2017a). Un des effets connus d'une concentration trop importante en azote et principalement en nitrites est la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine. La méthémoglobine fixe définitivement l'oxygène ce qui mène à la réduction de l'efficacité du transport d'oxygène dans le sang (Kocour Kroupová *et al.*, 2018; Ciji & Akhtar, 2020). Le stress généré se marque par un

catabolisme augmenté des protéines corporelles chez les juvéniles élevés à des doses élevées en nitrates ($240 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$) (Steinberg *et al.*, 2018). Cependant, un effet positif a pu être montré chez les individus élevés à de faibles doses de nitrates ($30 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$). Cela serait dû à une salinité légèrement plus importante qui limite le gradient d'osmolarité entre le milieu extérieur et le poisson. Le stress osmorégulateur est donc moindre (Romano & Zeng, 2013; Steinberg *et al.*, 2018). L'impact de l'accumulation des nitrates a également été étudié dans une première étude réalisée par Maliki en 2021 chez le sandre à des concentrations en N-NO_3 de 34 mg.L^{-1} (T₀) - 80 mg.L^{-1} (T₁) - 160 mg.L^{-1} (T₂) - 320 mg.L^{-1} (T₃) - 430 mg.L^{-1} (T₄) et 600 mg.L^{-1} (T₅) (Maliki, 2021). Cette étude a mis en évidence l'impact de l'accumulation des nitrates sur le taux de survie où une diminution significative a été observée à partir de la condition T₂. Les concentrations les plus élevées ont également impacté négativement le taux de croissance des sandres (Maliki, 2021). Ces études soulignent l'importance d'optimiser les conditions d'élevage du sandre. En effet, le taux de mortalité observé chez *S. lucioperca* au stade larvaire et juvénile peut atteindre les 30% (Kestemont *et al.*, 2007; Szkudlarek & Zakęś, 2007; Dalsgaard *et al.*, 2013; Baekelandt *et al.*, 2018).

L'aquaculture se développe et évolue vers un mode durable qui vise à minimiser l'impact de la production sur l'environnement en optimisant l'utilisation des ressources naturelles (Frankic & Hershner, 2003). Une méthode prometteuse pour la mise en place d'une aquaculture durable, qui permet d'économiser l'eau et de réduire les effluents riches en composés azotés dans le milieu, consisterait en l'intégration d'un élevage multitrophique.

1.3 L'AQUACULTURE MULTITROPHIQUE INTÉGRÉE

Il s'agit d'une technique où plusieurs espèces de niveau trophique différent sont présentes dans le même système où les co-produits d'une espèce sont valorisés par au moins une autre (Knowler *et al.*, 2020). Ce dernier peut donc contenir des poissons accompagnés d'organismes suspensivores et d'algues qui vont respectivement valoriser les matières en suspension et la matière inorganique (Park *et al.*, 2018). En général, l'organisme végétal utilisé est une algue qui va consommer l'azote et le phosphore et peut alors constituer un aliment pour une autre espèce d'élevage ou représenter un produit en soi (Chopin *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 2010).

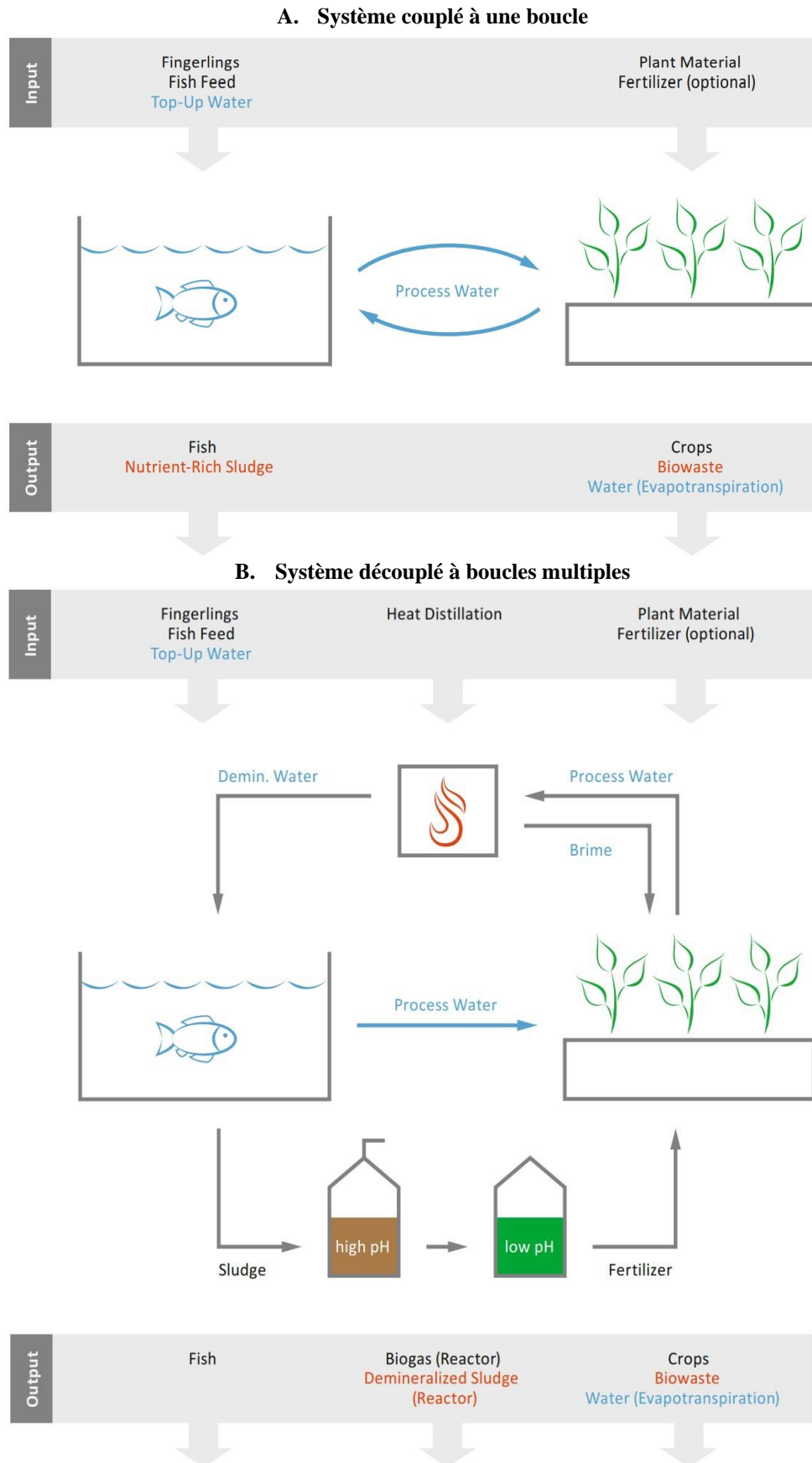
Les *Integrated Multi-Trophic Aquaculture* (IMTA) sont également un moyen de minimiser les coûts environnementaux générés par l'activité aquacole tout en augmentant le profit de l'élevage par l'intégration de différentes espèces.

l'élevage par l'intégration de différentes espèces. Des modèles pourraient être développés afin de comparer les IMTA aux autres modes de production afin d'évaluer les réels avantages de cette technologie (Konig *et al.*, 2016; Knowler *et al.*, 2020).

1.3.1 L'aquaponie

Il s'agit d'un mode d'aquaculture multitrophique intégrée qui comprend un système recirculé où l'eau des bassins de pisciculture, enrichie en nutriments issus de l'activité métabolique des poissons et de la dégradation des matières organiques, est utilisée pour améliorer la production de végétaux cultivés dans un système hydroponique hors sol (Goddek *et al.*, 2019a). L'aquaponie a été identifiée comme un moyen de production susceptible de développer une production durable, particulièrement en zones arides ou dépourvues de zones arables (Greenfeld *et al.*, 2022). En effet, les plus grandes zones de production sont installées en zones arides, comme dans la péninsule arabique ou l'Afrique sub-saharienne, mais l'aquaponie est également adoptée dans d'autres régions (Goddek *et al.*, 2019a). Il s'agit également d'un moyen de valoriser les zones urbaines périphériques en produisant des ressources proches des consommateurs (Goddek *et al.*, 2019a). En effet, l'aquaponie offre la possibilité de produire dans des zones densément peuplées (e.g. toits, bâtiments abandonnés, écoles) qui ne pourraient être utilisées pour une agriculture classique. L'intégration de l'aquaponie avec une production verticale permet aussi de limiter la surface de sol exploitée tout en augmentant la productivité par unité de surface (Metcalf & Widener, 2011; Love *et al.*, 2014).

Un système aquaponique peut être construit en deux conformations principales (Figure 2). Le système couplé comporte des organismes aquatiques, des bactéries et des plantes. Les bactéries convertissent les déchets de poissons en nutriments utilisés pour la croissance des plantes (Palm *et al.*, 2019). Les composants du système aquaponique peuvent également être découplés afin d'assurer une croissance optimale des poissons mais aussi des plantes (Goddek *et al.*, 2019b). La gestion des caractéristiques physico-chimiques de l'eau diffère dans ces types de système. En effet, dans un système couplé où l'eau circule entre les bassins aquacoles et l'hydroponie, un compromis doit être adopté afin de satisfaire au mieux les besoins de la partie animale et végétale du système (Goddek & Keesman, 2018). Dans le cas d'un système découplé, les différentes unités séparées le sont afin d'optimiser les caractéristiques physico-chimiques pour la croissance des poissons et des plantes (Goddek *et al.*, 2019b).



L'aquaponie est un système de choix en termes d'efficacité et de durabilité de production mais les nutriments des effluents de l'eau des poissons peuvent être complétés par une solution de nutriments afin d'améliorer la croissance des végétaux (Goddek *et al.*, 2019a). En effet, les éléments comme le phosphore, le magnésium, le fer, le manganèse et le soufre sont souvent déficients dans les effluents d'élevage de poissons (Delaide *et al.*, 2019; Goddek *et al.*, 2019a). Ces systèmes d'élevage sont efficaces mais l'élevage intensif peut entraîner une accumulation de nitrates dans le système. Les recherches se développent notamment sur la synergie qui peut exister entre différentes espèces au sein d'un système d'élevage.

Les plantes émettent des substances volatiles en fonction des caractéristiques de leur environnement (Liebelt *et al.*, 2019). La mise en place d'un système d'élevage en polyculture associant les poissons avec les plantes pourrait permettre la transmission de substances phytochimiques, ce qui pourrait être bénéfique pour les poissons. L'augmentation de la quantité de molécules bioactives (e.g. immunostimulants) dans le système pourrait permettre de diminuer les pertes liées aux infections bactériennes, virales et parasitaires (Chitmanat *et al.*, 2005; Vasudeva Rao *et al.*, 2006; Sahu *et al.*, 2007; Estaiano de Rezende *et al.*, 2021; Kari *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022).

1.4 LE PROJET PERCIPONIE – DÉVELOPPEMENT DE LA PERCULTURE EN AQUAPONIE

Il s'agit d'un projet de coopération transfrontalière à l'échelle de la Grande Région (espace de coopération regroupant des territoires partenaires allemands, belges et français ainsi que le Grand-Duché du Luxembourg) qui vise à initier la recherche et la mise en place de nouveaux modes de production comme l'aquaponie en zones urbaines et périurbaines. Ce projet repose sur la création d'une production durable en minimisant la consommation d'eau tout en garantissant la production d'aliments dépourvus de pesticides. Une partie de ce projet repose sur une ferme aquaponique pilote, située au *Centre des Technologies Agronomiques* de Strée, qui produit des sandres en aquaculture ainsi que des laitues en hydroponie. Le pilote permet de définir des associations d'espèces différentes pour optimiser la production du système aquaponique. Entre autres, le projet vise à : (1) améliorer le bien-être des poissons ; (2) valoriser l'ensemble des ressources du système afin d'accroître la productivité et (3) définir l'existence d'interactions bénéfiques entre différentes espèces élevées ensemble.

1.5 LE BIEN-ÊTRE ANIMAL

1.5.1 Règlementation et libertés

En élevage intensif, les poissons sont davantage soumis à un stress causé par la densité d'élevage, une diminution de la qualité de l'eau, un manque d'oxygène dissous ou par l'apparition de maladies parasitaires et infectieuses. Cela peut impacter le bien-être des individus et donc les performances de croissance ce qui limite la rentabilité de l'élevage. La gestion des conditions environnementales est donc primordiale afin de permettre une croissance optimale (Oliva-Teles, 2012). Mais assurer le bien-être animal est également nécessaire d'un point de vue éthique et pratique (Toni *et al.*, 2019). Afin d'assurer la prise de mesures en aquaculture, la directive 2010/63/EU a été instaurée ainsi qu'une série de recommandations visant à assurer le bien-être et éviter toute souffrance inutile chez les organismes élevés ou manipulés. Ces règles stipulent que les organismes doivent avoir à disposition un environnement, une alimentation ainsi que des soins qui leurs sont adaptés. De plus, toute manipulation ou transport doit suivre les recommandations établies pour limiter le stress de l'animal. Enfin, l'environnement doit être contrôlé quotidiennement afin de veiller à ce que les organismes ne soient pas dans une situation inconfortable pour ainsi apporter les corrections nécessaires (Toni *et al.*, 2019).

Le bien-être peut aussi être évalué grâce aux cinq règles de libertés établies par le *UK Farm Animal Welfare Council* (Toni *et al.*, 2019) : (1) libre de la soif, de la faim et de la malnutrition en apportant un accès à de l'eau et un régime adapté afin de maintenir l'animal en bonne santé ; (2) libre de l'inconfort grâce à un environnement adapté comportant un abri et une zone de repos ; (3) libre de ne pas éprouver de douleur, de blessure ou de maladie en faisant de la prévention ou en exerçant des diagnostics et des soins rapides ; (4) libre de ne pas ressentir de la peur ou de la détresse en mettant en place des conditions qui évitent une souffrance mentale et enfin (5) libre d'exprimer un comportement normal en élevant l'animal dans un espace suffisant comprenant les caractéristiques retrouvées dans son environnement naturel (Mellor, 2016).

1.5.2 L'impact du stress sur les organismes

En aquaculture, il peut être complexe d'assurer le bien-être de l'animal à cause de la variabilité interspécifique voire intraspécifique. En effet, chaque espèce a des besoins particuliers concernant la physico-chimie de l'eau, l'environnement, la densité et l'ensemble des comportements réalisés par l'espèce élevée (Toni *et al.*, 2019).

Dès lors, il s'impose de pouvoir définir le bien-être animal ainsi qu'une ou plusieurs méthodes fiables afin de quantifier ou de détecter un stress. Le stress est défini par une situation où l'homéostasie, qui est l'état d'équilibre interne maintenu malgré l'évolution des paramètres du milieu externe (Reece *et al.*, 2012), est perturbée par un agent intrinsèque ou extrinsèque appelé stresseur (Martos-Sitcha *et al.*, 2020). L'état physique est un des premiers éléments considérés pour déterminer le bien-être bien qu'un mauvais état physique puisse être la cause ou la conséquence d'un mal-être. Un autre facteur à considérer est la détresse mentale de l'animal ce qui implique la souffrance chez les poissons, alors que ce concept n'était appliqué qu'aux organismes ayant des capacités cognitives supérieures à ceux-ci. Sur ce sujet, la communauté scientifique est divisée. Certaines recherches appuient l'existence de la nociception (i.e. perception de la douleur) chez les poissons alors que d'autres travaux tentent de prouver le contraire (Sneddon, 2020). Malgré cela, la réponse au stress est un phénomène adaptatif nécessaire afin de contrer l'agent perturbant l'homéostasie. A court terme, ce stress n'implique pas forcément une diminution du bien-être mais bien une adaptation physiologique au changement perçu dans l'environnement (Ashley, 2007). Cependant, lors d'un stress chronique, de nombreux effets négatifs peuvent survenir comme une diminution des performances de croissance (Abdel-Tawwab *et al.*, 2019), des capacités de reproduction plus faibles (Webb & Doroshov, 2011), un affaiblissement du système immunitaire et donc une résistance moins importante aux maladies (Nardocci *et al.*, 2014). Il paraît donc important de mettre au point des méthodes de quantification du stress afin de pouvoir définir le stress, les situations stressantes pour l'animal étudié et dans quelle mesure celui-ci est capable de s'y adapter (Sopinka *et al.*, 2016).

1.5.3 Les indicateurs de stress

La réponse au stress est un processus adaptatif qui inclut l'activation de l'axe hypothalamo-pituitaire-interrénal (HPI). La réponse au stress est composée d'une réponse primaire qui consiste en la mise en place de mécanismes neuroendocriniens qui permettent de passer à la réponse secondaire qui correspond aux modifications physiologiques de l'individu afin de conserver son homéostasie. Lors d'une prolongation du stress, c'est la réponse tertiaire qui s'active et qui impacte l'organisme en limitant l'énergie normalement allouée à sa croissance, sa reproduction et son système immunitaire (Figure 3).

Chez les mammifères et les poissons, le cortisol est le principal corticostéroïde produit par l'HPI dont la sécrétion augmente avec des stimuli stressants comme le confinement, les

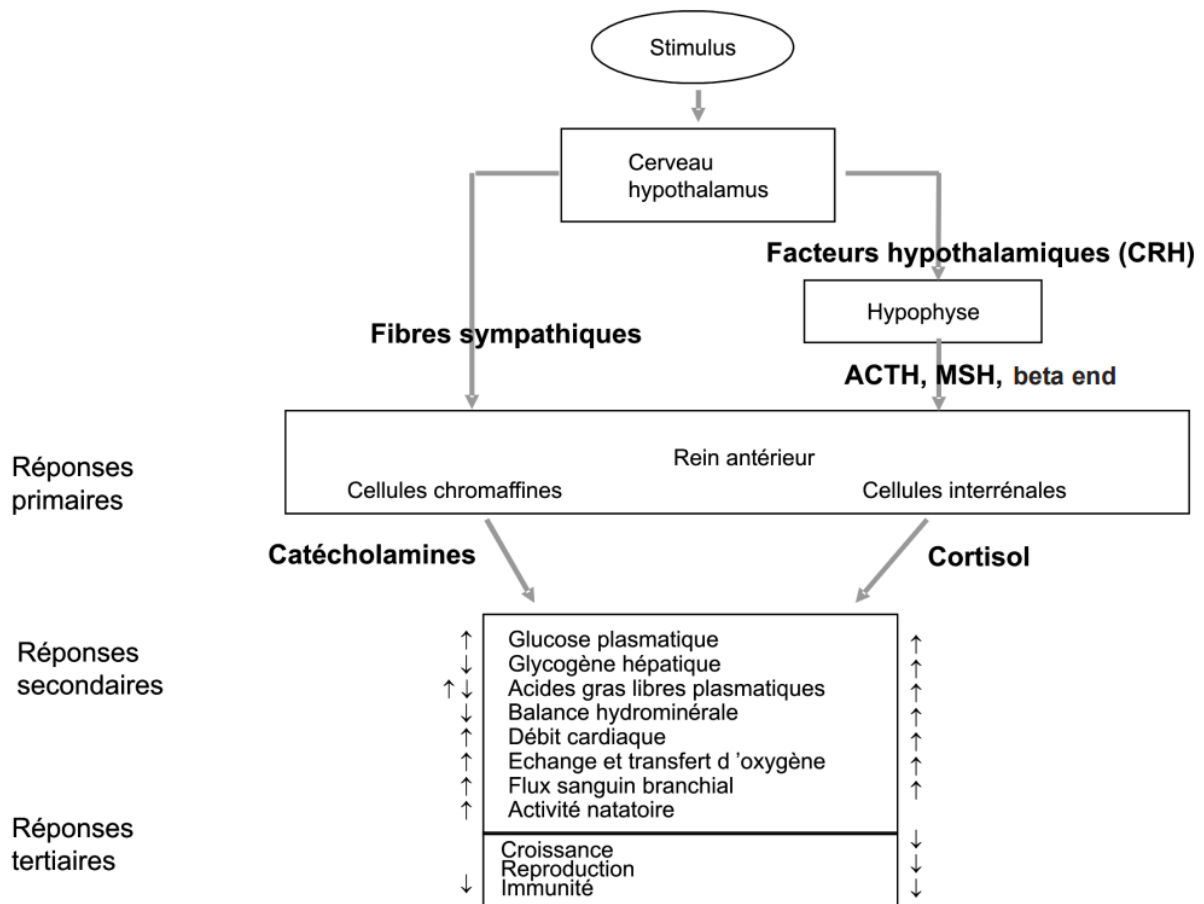


Fig 3 : Schéma des voies neuroendocriniennes majeures d'intégration de la réponse au stress chez les poissons. ACTH = hormone adrénocorticotrope ; MSH = hormone mélanotrope ou Melanocyte Stimulating Hormone ; β End = β -endorphine. Les flèches grises indiquent les voies d'intégration de la réponse au stress. Les plus petites flèches montrent l'effet croissant ou décroissant que peuvent jouer les catécholamines et le cortisol sur les facteurs de la réponse secondaire et tertiaire au stress (Prunet & Auperin, 2007).

manipulations, des changements brutaux de températures ou encore la présence de produits toxiques dans l'environnement (Sadoul & Geffroy, 2019). Cette libération de corticostéroïdes permet de mobiliser les réserves énergétiques, notamment par la glycolyse ou la gluconéogenèse (Aluru & Vijayan, 2009), afin de permettre à l'organisme de conserver son homéostasie (Tort, 2011). Il est admis que le cortisol est un indicateur de stress aigu mais pas forcément d'un stress chronique à cause d'une désensibilisation de l'axe HPI due à une surcharge allostatique (Moltesen *et al.*, 2016). L'individu devient alors moins apte à s'adapter au stress de son environnement. La mesure du cortisol plasmatique permet de définir la capacité d'adaptation du poisson à son environnement (Sadoul & Geffroy, 2019). Il est alors nécessaire de connaître le niveau basal de l'indicateur ainsi que l'amplitude de sa variation afin d'estimer l'impact du stress sur l'organisme (Sopinka *et al.*, 2016). L'augmentation du cortisol plasmatique due à un stress aigu varie entre 40 et 200 ng.mL⁻¹ chez *Salmo trutta* et *Salmo gairdneri* avec un retour au niveau basal après un à deux jours. Chez ces mêmes espèces, un stress chronique comme un confinement prolongé induit une augmentation de 10 ng.mL⁻¹ mais une période d'un mois est alors nécessaire afin de revenir à un état basal (Pickering & Pottinger, 1989).

Lorsqu'une réponse doit être quantifiée, la concentration plasmique en cortisol est un premier indicateur directement relié à la fonction de l'axe HPI (Sopinka *et al.*, 2016). En effet, concernant la réponse primaire au stress (Figure 3), deux catégories d'hormones peuvent être utilisées : les catécholamines (e.g. adrénaline et noradrénaline) et les glucocorticoïdes (e.g. cortisol) (Romero & Butler, 2007). Le cortisol, de par sa réponse plus lente, est le plus utilisé et sa concentration peut être analysée en conditions de terrain ou de laboratoire, pour autant que les individus aient été rapidement prélevés car le stress de manipulation induit un pic de cortisol en quelques minutes (Romero & Reed, 2005; Sopinka *et al.*, 2016). Afin de pouvoir comparer différents groupes avec le cortisol comme biomarqueur, les mesures devraient être réalisées au cours de la même saison et au même moment de la journée à cause des variations saisonnières (Ellis *et al.*, 2012) et nyctémérales (Fatira *et al.*, 2014) du taux de cortisol plasmatique. Le second niveau de réponse au stress (Figure 3) peut être évalué par l'augmentation de la concentration en lactates (Herbert & Steffensen, 2005), de l'osmolalité de certains ions (Fiol & Kültz, 2007) et de la densité en leucocytes (Verburg-Van Kemenade *et al.*, 2009) mais la concentration en glucose sanguin est l'indicateur le plus utilisé (Sampaio & Freire, 2016; Sopinka *et al.*, 2016). Enfin, la réponse tertiaire (Figure 3) impacte l'organisme en de multiples

façons comme des modifications comportementales ou des diminutions de performance de croissance (Sopinka *et al.*, 2016).

Finalement, l'utilisation d'un seul indicateur pourrait ne pas suffire à déterminer les conditions les plus stressantes pour les organismes. La désignation des espèces les plus susceptibles au stress devrait donc passer par l'évaluation de multiples indicateurs. C'est pour cela que cette étude s'est également penchée sur l'utilisation d'autres indicateurs de stress comme les neurotransmetteurs.

1.5.3.1 Les neurotransmetteurs

La communication intercellulaire au sein du système nerveux est principalement effectuée par le largage de vésicules contenant des neurotransmetteurs par le neurone pré-synaptique (Focke *et al.*, 2013). Ces vésicules fusionnent avec la membrane neuronale pour libérer des neurotransmetteurs (e.g. sérotonine, dopamine, glutamate, GABA) dans l'espace inter-neuronal : la synapse (Focke *et al.*, 2013). Les neurotransmetteurs sont transportés vers des récepteurs du neurone post-synaptique. Cela permet de ne pas conserver les neurotransmetteurs à de trop fortes concentrations dans le milieu extra-cellulaire, ce qui pourrait impacter l'organisme. Par exemple, une concentration trop importante en glutamate a des effets neurotoxiques (Danbolt, 2001; Grewer & Rauen, 2005).

1.5.3.1.1 Sérotonine

La sérotonine est une monoamine biogène qui est produite en deux étapes. L'hydroxylation du tryptophane génère du 5-hydroxytryptophane qui est ensuite décarboxylé pour donner la sérotonine. Ces deux étapes d'hydroxylation et de décarboxylation se produisent presque instantanément en présence de tryptophane (Clark *et al.*, 1954). Chez les téléostéens, l'axe hypothalamo – pituitaire – interrénal est responsable de la sécrétion de cortisol. En effet, lorsqu'un stress est perçu, la production de sérotonine (i.e 5-HT) augmente et la 5-HT vient se fixer sur un récepteur au niveau de l'aire pré-optique de l'hypothalamus ce qui déclenche la production du CRF (i.e. Corticotropin Releasing Factor). En se fixant au récepteur CRH1, cela stimule la sécrétion d'ACTH qui elle-même stimule la production de cortisol par les cellules interrénales (Figure 4).

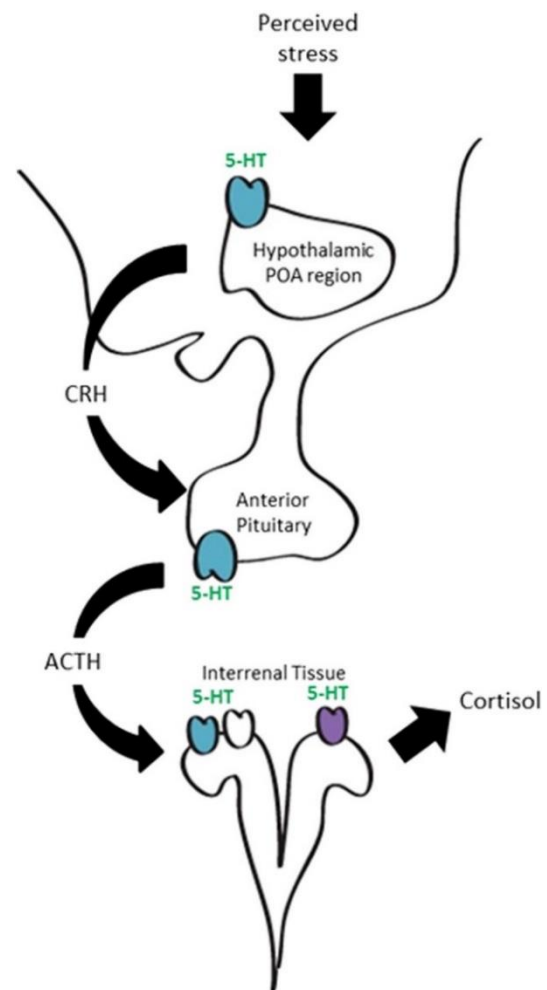


Fig 4 : Influence de la sérotonine sur l'axe HPI. Les symboles bleus représentent les récepteurs 5-HT_{1A}, les symboles blancs indiquent les récepteurs 5-HT₂ et les symboles mauves indiquent les récepteurs 5-HT₄. 5-HT : sérotonine ; CRH : corticotropin-releasing hormone et ACTH : adrenocorticotropin hormone (McDonald, 2017).

Le cortisol peut alors se fixer sur des récepteurs aux glucocorticoïdes dispersés dans le corps entier. De plus, le cortisol peut réguler le fonctionnement de l'axe HPI par feedback négatif au niveau de l'hypothalamus et de la glande pituitaire, en inhibant ainsi la sécrétion de CRF et d'ACTH (McDonald, 2017). Dans le système nerveux central, la 5-HT est stockée dans des vésicules de sécrétion des neurones sérotoninergiques. Ces vésicules fusionnent avec les membranes pour libérer la sérotonine dans la synapse, où elle peut exercer son action. Elle est alors captée par des transporteurs 5-HTT qui interrompent son action. La sérotonine est métabolisée au niveau des terminaisons présynaptiques (Fuller & Wong, 1990), par la monoamine oxydase (MAO) ce qui génère de l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) (Molinoff & Axelrod, 1971). Le 5-HIAA présent dans le cerveau est transporté en périphérie où les métabolites de la sérotonine sont excrétés via l'urine (Jonnakuty & Gragnoli, 2008).

1.5.3.1.2 Dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur appartenant aux catécholamines et possède une structure catéchol (i.e. cycle benzénique avec deux groupes hydroxyles adjacents) liée par une chaîne éthyle à un groupement amine (Vallone *et al.*, 2000). Sa synthèse commence par la transformation de l'acide aminé tyrosine en L-DOPA qui est alors décarboxylée pour donner la dopamine (Feldman *et al.*, 1983). Celle-ci exerce son action en se liant à des récepteurs membranaires (i.e. familles *D1-like* et *D2-like*) associés à des protéines G permettant l'activation d'une chaîne de seconds messagers (Gingrich & Caron, 1993). La dopamine interviendrait dans le contrôle des mouvements (Song & Kim, 2016; Surmeier, 2018), la modification des comportements sociaux (O'Connell & Hofmann, 2011; Antunes *et al.*, 2022), l'évaluation des risques (Schultz, 2002, 2006; Heimovics *et al.*, 2009) mais également dans la gestion du stress (Thörnqvist *et al.*, 2019).

L'induction d'un stress déclenche une libération de dopamine et de sérotonine (de Abreu *et al.*, 2020). Chez *Danio rerio*, les individus avec une tendance pour la prise de risques montraient une expression plus importante des récepteurs D2 à la dopamine (*drd2a* et *drd2b*) et des récepteurs aux opioïdes comparé aux individus prenant moins de risques (Thörnqvist *et al.*, 2019). La dopamine influence entre autres le comportement des individus et c'est le stress qui active le système dopaminergique (de Almeida *et al.*, 2005; Thörnqvist *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; de Abreu *et al.*, 2020). Il a été montré que l'activation des système dopaminergique et sérotoninergique influence la prise de nourriture chez les téléostéens (Leal *et al.*, 2013; Conde-Sieira *et al.*, 2018). Chez *Oncorhynchus mykiss*, la hiérarchisation implique des variations de concentrations de cortisol. A la suite d'un comportement agonistique, les niveaux de cortisol plasmatique augmentent à la fois chez le perdant et le vainqueur. Chez l'individu dominant, le cortisol retourne à un niveau basal après environ trois heures alors qu'il reste élevé chez le subordonné. Ensuite, le système sérotoninergique s'active au niveau du télencéphale chez les dominants et se développe davantage chez les subordonnés chez qui le système catécholaminergique s'active également. Ces deux systèmes pourraient influencer la sécrétion de cortisol à la suite d'un stress aigu ou modéré mais aussi dans des conditions normales (Øverli *et al.*, 1999). Il a été montré chez les mammifères qu'un stress aigu pouvait augmenter la libération de dopamine par le noyau accumbens (i.e. structure de l'encéphale) alors qu'un stress chronique avait l'effet inverse (Cabib & Puglisi-Allegra, 2012). Eventuellement, une libération plus élevée de dopamine serait associée à une adaptation au stress des individus proactifs alors que les réactifs seraient plutôt associés à une diminution de la libération de dopamine (Cabib &

Puglisi-Allegra, 2012). Le système dopaminergique pourrait expliquer les variations intraspécifiques concernant l'adaptation au stress. Le système dopaminergique mésolimbique permet l'évaluation des stimuli environnementaux qui mène à une adaptation comportementale de l'individu. Cette fonction semble avoir été fortement conservée chez les vertébrés (Cabib & Puglisi-Allegra, 2012). Chez les téléostéens, les cellules dopaminergiques auraient des fonctions homologues au système présent chez les mammifères (Thörnqvist *et al.*, 2019).

D'un point de vue hormonal, les cellules à ACTH (i.e. Adrenocorticotropic Hormone) chez la carpe semblent être sous contrôle dopaminergique négatif *in vivo*. La dopamine inhiberait ces cellules chez un poisson intact ce qui pourrait être une condition pour l'action de la CRF (i.e Corticotropin-Releasing Factor). Les cellules à ACTH dépendent du CRF uniquement lors d'un blocage de la dopamine (Flik *et al.*, 2006). Le signal de l'ACTH serait normalement inhibé par la dopamine pour conserver une réponse équilibrée face à un stimulus stressant. Ainsi, le bon fonctionnement des cellules à ACTH *in vitro* ne serait assuré qu'à une certaine activité du système dopaminergique. C'est la puissance du signal envoyé par l'ACTH, admis de par les augmentations picomolaires de l'ACTH lors d'un stress, qui appuie l'idée que la dopamine fait partie intégrante de l'équilibre de la réponse au stress et de l'adaptation au stress (Flik *et al.*, 2006). Une diminution de l'activité dopaminergique due au stress pourrait désensibiliser les cellules à ACTH pour le CRF, empêchant les signaux de stress aigus. Chez *Oreochromis mossambicus* soumis à un stress chronique (Lamers *et al.*, 1997), les cellules hypophysaires produisant la MSH (i.e. Melanocyte Stimulating Hormone) expriment un récepteur D1 ayant une haute affinité pour la dopamine. Cela serait compatible avec la diminution du niveau de dopamine et d'augmentation de la production de MSH pendant un stress chronique, ces situations se produiraient donc chez les poissons (Flik *et al.*, 2006).

Afin de pouvoir croiser de multiples indicateurs de stress, de nombreuses recherches s'intéressent sur la composition et les variations du microbiote des téléostéens, les avantages qu'il peut apporter pour son hôte ce qui permettrait de faciliter l'adaptation au stress. Contrairement au cortisol plasmatique, à la glycémie et aux neurotransmetteurs qui requièrent une prise de sang ou une euthanasie en vue d'un prélèvement de l'encéphale, l'analyse du microbiote intestinal est bien moins invasive car elle ne demande qu'un échantillon de fèces qui peut être récupéré en strippant l'animal.

1.5.3.2 Le microbiote

Les poissons sont des holobiontes, c'est-à-dire des macroorganismes abritant en leur sein des microorganismes commensaux (Turner *et al.*, 2022). Les holobiontes peuvent fonctionner comme une seule entité d'un point de vue anatomique, métabolique et immunologique au cours de l'évolution. Ce point de vue a mis en évidence l'*Hologenome Concept* où l'individu, étant considéré comme un super-organisme (Salvucci, 2014), est caractérisé par le génome de l'hôte et le microbiome (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). La modification de l'un de ces génomes peut être sélectionnée et induire des adaptations du super-organisme à son environnement. Le génome de l'hôte est hautement conservé et les modifications génétiques sont donc lentement établies alors que les changements du microbiome sont bien plus dynamiques (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018) grâce à des modifications des proportions bactériennes, au transfert horizontal de gènes ou à des mutations (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). Le microbiote pourrait également jouer un rôle dans le phénomène de spéciation (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018).

Des études réalisées chez l'homme et d'autres mammifères ont montré que le stress ou les maladies (Frank *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2017) pouvaient induire des modifications du microbiote ou dysbiose. Chez les poissons, ce genre d'étude commence à se développer mais principalement pour des espèces de grand intérêt économique. Etant donné que le microbiome aide à la digestion et peut intervenir dans la nutrition, la reproduction, la croissance mais aussi dans la résistance de l'hôte contre les maladies, il est pertinent d'étudier les communautés microbiennes dans une optique de production en aquaculture (Ghanbari *et al.*, 2015). Le microbiome varie en fonction de facteurs liés à l'hôte comme l'espèce, les composantes génétiques, l'âge, le genre, la taille, le poids, le régime alimentaire (Navarrete *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013, 2014, 2015, 2016; Tarnecki *et al.*, 2017). Les bactéries gastro-intestinales sont également influencées par l'environnement dans lequel évolue l'hôte. En effet, la colonisation bactérienne du système gastro-intestinal débute après l'éclosion et ce sont les bactéries présentes dans la masse d'eau qui constituent le microbiome (Sanchez *et al.*, 2012; Parrott *et al.*, 2022). Ensuite, la diversité du microbiome évolue avec l'alimentation du poisson qui permet la prolifération et le développement de certaines bactéries. Des changements dans le régime du poisson, par exemple dus à une raréfaction des ressources, peuvent également induire une modification de la flore intestinale (Smith *et al.*, 2015; Friberg *et al.*, 2019). Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau peuvent aussi influencer la composition des bactéries commensales. Cette dernière peut être influencée par la température de l'eau et la concentration en oxygène

(Vasemägi *et al.*, 2017), la salinité (Dulski *et al.*, 2020), le pH (Gallo *et al.*, 2020) mais aussi par le type d'habitat (Kim *et al.*, 2021) dans lequel vit l'hôte. Les facteurs microbiens comme les capacités d'adhésion, la production d'enzymes et leur métabolisme (Prakash *et al.*, 2011) peuvent également influencer la structure de la flore microbienne. De plus, la relation entre le microbiote et le système gastro-intestinal de son hôte est dynamique. Certains microorganismes sont présents dans l'alimentation et intègrent ainsi le système digestif. Seulement, ceux-ci ne font que transiter car la flore bactérienne résidente est en place. On distingue alors le microbiote transitoire du microbiote persistant (Yukgehnaish *et al.*, 2020).

La présente étude vise à évaluer le bien-être de *Sander lucioperca* dans différents systèmes d'élevage. Les comparaisons ont été faites sur des sandres : (1) élevés en monoculture en circuit ouvert dans des conditions de maintien afin de réduire les stimuli stressants; (2) en système aquaponique en monoculture et (3) élevés en RAS avec des concentrations croissantes de nitrates. Cette dernière étude a été réalisée l'année passée (Maliki, 2021) mais les résultats obtenus n'ayant pas permis d'émettre des conclusions, certains échantillons conservés et non traités comme les encéphales et certains plasmas ont été traités dans le présent travail afin d'obtenir des résultats complets pouvant être comparés à d'autres conditions d'élevage. Ce travail est basé sur la mesure de paramètres zootechniques et le développement d'indicateurs du bien-être comme la concentration plasmique en cortisol, la concentration en dopamine et sérotonine ainsi qu'une comparaison du microbiote des sandres dans ces trois systèmes d'élevage. À terme, cette étude aurait pour objectif de déterminer les conditions d'élevage permettant de minimiser le stress des sandres et donc d'améliorer leurs performances de croissance et la productivité du système. De plus, des différences notables du microbiome pourraient permettre de tester relativement simplement l'état de stress des poissons sans avoir besoin de sacrifier plusieurs individus sentinelles. Cela faciliterait la tâche des producteurs, limiterait les pertes et aurait un impact éthique positif.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expérimentations réalisées sur les sandres ont été faites selon les recommandations européennes. Le protocole expérimental a été accepté par la commission d'éthique de l'ULiège (2342).

2.1 SYSTÈME AQUAPONIQUE DE STRÉE

Le système aquaponique de Strée est constitué d'une partie aquacole de 7,6 m³ et d'une partie hydroponique de 8 m³. Le système est un système bouclé. L'arrivée d'eau du système se déverse dans le bac de charge qui recueille également l'ensemble de l'eau du système. Deux systèmes de trop-plein sont installés. Le premier permet de récolter environ 600 L d'eau aquaponique stockée afin de contrer une perte d'eau importante dans le système. Le second trop-plein placé plus haut dans le bac permet d'éviter les débordements. C'est également dans le bac de charge que l'eau est chauffée et que sont ajoutés la dolomite et le KHCO₃ lorsqu'il est nécessaire d'augmenter le pouvoir tampon de l'eau. Ensuite, l'eau est pompée et passe dans un filtre UV (AS-UV - Synergy 25 - 95W) afin de limiter la charge en micro-organismes (Figure 3). Une partie de cette eau va être dirigée vers l'unité hydroponique qui est constituée de quatre bacs de culture sur radeau à une densité de 16 salades par m² avec des lumières LED blanches horticoles (Vegeled - 144 W/m² - photopériode de 12h) permettant la croissance des végétaux. Afin d'optimiser celle-ci, une solution riche en microéléments (Fe, Mn, Mo, Cu, Ni et B) est déversée par une pompe péristaltique dans l'eau hydroponique. L'autre partie de l'eau est dirigée vers un biofiltre à lit fluidisé (volume de 1,5 m³ avec 0.57 m³ de substrat mobile en HDBE – surface spécifique 800 m²/m³). La quantité d'eau nécessaire est alors dirigée vers l'unité aquacole tandis que le restant est déversé vers le bac de charge. Concernant la section aquaponique, celle-ci est constituée de six bassins de volume croissant (Figure 3) qui permettent l'élevage du sandre en monoculture. Les sandres reçoivent une ration d'aliment *Le Gouessant Percid* (52% de protéines, 15% de lipides) variant selon la biomasse présente dans le bassin en fonction des instructions du fournisseur (Annexes – Figure A0). Les rations ont été diminuées lorsque les concentrations en oxygène dissous passaient sous les 7 mg.L⁻¹ lors des périodes de fortes chaleurs. L'eau aquacole est emmenée vers un tambour filtrant (Ratz BaseDrum 30 - 104 W - maille 100 µm) qui permet la filtration mécanique de l'eau pour la récolte des matières solides en suspension (i.e. fèces et restes d'aliment non consommé) avant de l'envoyer vers le bac de charge (Figure 3).

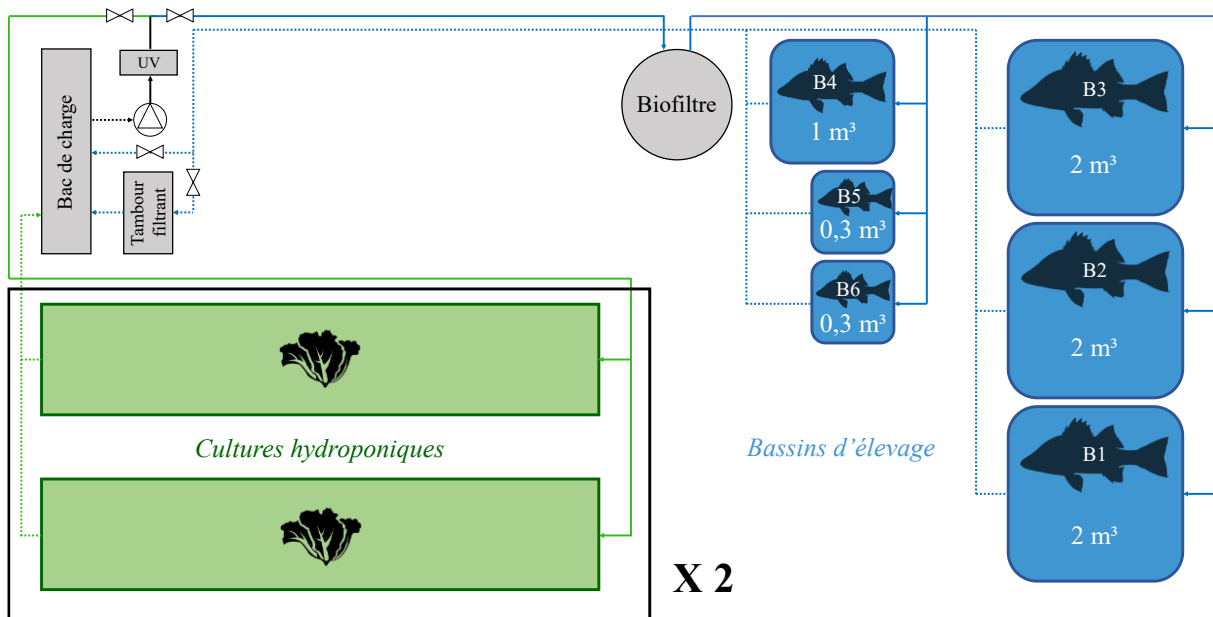


Fig 5 : Schéma du système aquaponique de Strée. L'eau est pompée et envoyée vers le biofiltre et les bassins d'élevage (flèches bleues) ou vers les cultures hydroponiques constituées de 4 rafts (flèches vertes). Le symbole en triangle indique la pompe, les sabliers les vannes de dérivation et les flèches en pointillés montrent le retour d'eau des différentes unités.

2.2 PROCÉDURES DE MAINTENANCE DU SYSTÈME

Quotidiennement, la température ambiante et l'humidité relative du local sont relevées. Ensuite, des mesures sont effectuées au niveau du bac de charge concernant la physico-chimie de l'eau : la température [$^{\circ}\text{C}$], la concentration en oxygène dissous [mg.L^{-1}], le pH, la conductivité (EC) [$\mu\text{S.cm}^{-1}$], les concentrations en NH_4^+ [mg.L^{-1}], NO_2^- [mg.L^{-1}], NO_3^- [mg.L^{-1}] et l'alcalinité. Lorsque le pH est inférieur à 7, une dose de 50 g de dolomie est diluée dans le bac de charge afin d'augmenter le pouvoir tampon de l'eau du système. Un bidon contenant 500 g de KHCO_3 dans 25 L d'eau se déverse par une pompe péristaltique associée à une sonde pH afin d'augmenter le pouvoir tampon lors d'une acidification de l'eau du bac de charge. Après cela, la concentration en oxygène, le pourcentage de saturation et la température des bacs contenant les sandres peuvent alors être calculées. Avant de nourrir les sandres, les bassins sont inspectés pour repérer les éventuels individus morts et le surnourrissage.

2.3 DESIGN EXPÉRIMENTAL

Trois systèmes d'élevage sont utilisés pour notre expérimentation :

1. Le système aquaponique pilote (Figure 5) qui produit des sandres en RAS ainsi que des laitues en hydroponie. Les sandres ont été échantillonnés dans 3 bassins.
 - ❖ B1 : sandres de taille L ($P_{\text{moyen}} = 772,8 \text{ g}$) ; 2 m^3 ; à une densité de 36 kg.m^{-3}
 - ❖ B3 : sandres de taille M ($P_{\text{moyen}} = 471,9 \text{ g}$) ; 2 m^3 ; à une densité de 28 kg.m^{-3}
 - ❖ B5 : sandres de taille S ($P_{\text{moyen}} = 310,4 \text{ g}$) ; $0,3 \text{ m}^3$; à une densité de 88 kg.m^{-3}

Le volume d'eau du circuit est de $17,6 \text{ m}^3$ dont les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes : $T^{\circ} = 23,3^{\circ}\text{C}$; $[\text{O}_2] = 8 \text{ mg.L}^{-1}$; $\text{pH} = 6,76$; $\text{EC} = 1025 \mu\text{S.cm}^{-1}$; $[\text{NH}_4^+] = 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_3^-] = 388 \text{ mg.L}^{-1}$ et une alcalinité moyenne de 26 mg.CaCO_3 .

2. Un système ouvert afin de déterminer l'impact de la concentration en nitrates (Maliki,2021). Vingt sandres juvéniles de $194,3 \pm 28,3 \text{ g}$ (comparables aux sandres de taille S) sont placés dans des aquariums de 250 L alimentés d'une eau à 23°C . Cinq concentrations croissantes en N- NO_3 ont été testées en duplicat afin d'évaluer l'impact des nitrates sur la croissance et le bien-être des sandres :
 - ❖ 34 mg.L^{-1} ($T_0 = \text{contrôle}$)
 - ❖ 80 mg.L^{-1} (T_1)
 - ❖ 160 mg.L^{-1} (T_2)
 - ❖ 320 mg.L^{-1} (T_3)
 - ❖ 430 mg.L^{-1} (T_4)

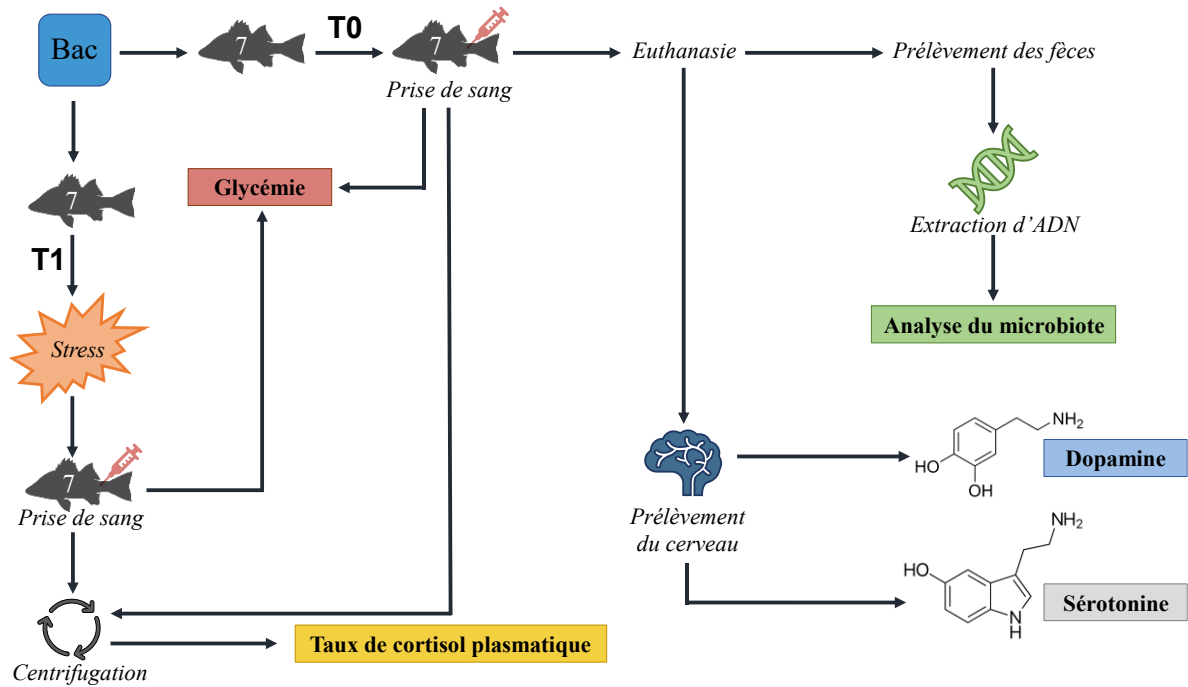


Fig 6 : Méthode d'échantillonnage pour les sandres des bassins B1, B3, B5, B10 et B11. Au total, 14 sandres sont pêchés dans chaque bassin. Une prise de sang est réalisée sur 7 d'entre eux (T0) pour mesurer la glycémie et le taux de cortisol plasmatique basal. Ces sandres sont ensuite euthanasiés pour prélever le cerveau qui permet de doser la sérotonine et la dopamine. Dans le même temps, les fèces sont récupérées pour définir le microbiote intestinal. Les 7 autres sandres subissent un stress de manipulation et de confinement pendant 30 minutes (T1) pour mesurer leur glycémie et le taux de cortisol plasmatique post-stress.

❖ 600 mg.L⁻¹ (T₅)

3. En bassins de 2 m³ en circuit ouvert alimentés d'une eau à une température de 14,8°C et un taux d'oxygène dissous de 7,8 mg.L⁻¹ dans le bassin B10 (sandres de taille S-M (P_{moyen} = 405,3 g)) et une température de 14,2°C et un taux d'oxygène dissous de 8,4 mg.L⁻¹ dans le bassin B11 (sandres de taille XS (P_{moyen} = 19,1 g)).

2.4 ECHANTILLONNAGE

Dans le cadre de l'expérience réalisée sur l'impact des nitrates dans un système en RAS (Maliki, 2021), 10 sandres (poids moyen 194,3 ± 28,3 g) ont été sélectionnés au hasard pour chaque concentration (T₀ à T₅) et pour chaque réplicat. Pour les systèmes en aquaponie et en circuit ouvert, sept individus ont été prélevés au hasard dans chaque bassin. Pour chaque expérience, les sandres ont été plongés dans une solution anesthésique de benzocaïne à une concentration de 0,7 mL.L⁻¹. Après trois minutes, un échantillon (1 mL) de sang est prélevé au niveau de la veine caudale (Lawrence *et al.*, 2020) à l'aide d'une aiguille héparinée (Figure 6). Pour chaque condition, au temps T₀, les sandres pêchés sont euthanasiés par dislocation cervicale et pesés. Après cela, l'encéphale et un échantillon de fèces ont été prélevés et conservés à -80°C pour les futures analyses (Figure 6). La prise de sang permettant le dosage du cortisol basal a été réalisée dans un délai de 5 minutes (T₀) à partir du moment où les poissons ont été pêchés. Pour l'expérience aquaponique et en circuit ouvert, les bassins ont été échantillonnés à raison d'un par jour afin d'éviter les perturbations d'un échantillonnage sur les bassins voisins. En effet, il a été montré chez le sandre qu'un délai d'une heure post-stress (Baekelandt, 2020) permettait un retour à un niveau basal de cortisol. Le taux de cortisol post-stress a été mesuré au temps T₁ (i.e. T₀ + 30 min) sur 7 poissons pêchés à T₀. Directement après les prises de sang, la glycémie de chaque individu a été mesurée à l'aide de tiges glucométriques (Eames *et al.*, 2010) utilisées dans le cadre du suivi glycémique chez des patients diabétiques. Cette méthode précise a été validée et permet un gain de temps et de précision significatif en comparaison aux kits de dosage du glucose classiquement utilisés. Les échantillons sanguins sont ensuite directement centrifugés (14 000 g, 4°C, 5 min) afin de récupérer le plasma qui est conservé à -80°C jusqu'à la suite des analyses.

2.5 DOSAGE DU CORTISOL SANGUIN

Le dosage du cortisol sanguin a été réalisé avec le kit *Cortisol ELISA* (EIA-1887). Le test est basé sur une réaction immuno-enzymatique compétitive avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique du cortisol. Le cortisol présent dans le plasma de sandre entre en compétition avec le cortisol conjugué à la peroxydase HRP pour la liaison à l'anticorps.

Le test est réalisé à partir de 20 µl de sérum en duplicat pour chaque condition. A la fin du kit, l'ajout de la *Stop Solution* arrête les réactions enzymatiques et la densité optique est mesurée à 450 ± 10 nm dans les dix minutes après l'ajout de la solution. La coloration indique la quantité de peroxydase présente dans les puits et son intensité de coloration est inversement proportionnelle à la concentration en cortisol de l'échantillon. La comparaison des densités optiques obtenues à une courbe standard permet de calculer la concentration en cortisol [ng/ml]. Le protocole détaillé est repris en annexes (Annexe 7.1). Des étapes de mise au point ont été nécessaires afin de déterminer les dilutions à appliquer aux échantillons pour rentrer dans la courbe standard et inférer par intrapolation les concentrations de cortisol plasmatique.

2.6 DOSAGE DES NEUROTRANSMETTEURS

2.6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de cerveaux conservés à -80°C ont été pesés et homogénéisés dans un potter avec un volume dix fois supérieur d'une solution d'homogénéisation empêchant la dégradation de la sérotonine et de la dopamine (Tris. HCl 25mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM à pH 7). Un maximum de 2 mL d'homogénat a été conservé pour la suite de la méthode qui consiste à réaliser une centrifugation (11.000 g, 4°C , 30 minutes) pour ne garder que le surnageant. La moitié de ce dernier a été filtrée ($0.22\ \mu\text{m}$) et a été utilisée pour le dosage de la sérotonine. L'autre moitié a été centrifugée (14.000 rpm, 4°C , 3 minutes) pour récupérer le surnageant permettant le dosage de la dopamine. Les tubes ont été conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des kit ELISA.

2.6.2 Dosage de la sérotonine

Comme pour le kit de dosage du cortisol plasmatique, une étape de mise au point permettant de déterminer les dilutions à appliquer à nos échantillons a été nécessaire. Celle-ci a été réalisée à l'aide du kit « rapide » *Serotonin FAST ELISA* (EIA-5061). Ce test préliminaire a permis d'approximer les concentrations de sérotonine afin de savoir s'il était nécessaire de réaliser une dilution des échantillons pour le test de haute précision, réalisé par le kit *Serotonin Research ELISA* (EIA-4642). Nous avons ainsi déterminé qu'une dilution de 100 fois des échantillons de départ était nécessaire pour pouvoir inférer par intrapolation la concentration en sérotonine. Ce kit est basé sur une réaction immuno-assay enzymatique débutant avec l'acylation de la sérotonine. Les antigènes sont liés à la phase solide de la plaque de microtitration. Les normes, contrôles et échantillons acylés et les analytes liés à la phase solide sont en compétition pour un nombre fixe de sites de liaison des anticorps. Une fois le système

en équilibre, l'antigène libre et les complexes antigène-anticorps libres sont éliminés par lavage. L'anticorps lié à la phase solide est détecté par un conjugué IgG anti-lapin-peroxydase utilisant le TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) comme substrat. La densité optique est lue à 450 ± 10 nm dans les dix minutes après l'ajout de la *Stop Solution*. Le protocole détaillé est repris en annexes (Annexes 7.2.2 et 7.2.3).

2.6.3 Dosage de la dopamine

Comme pour les deux précédents kits de dosage ELISA, une étape de mise au point permettant de déterminer les dilutions à appliquer à nos échantillons a été nécessaire. Celle-ci a été réalisée à l'aide du kit « rapide » Dopamine ELISA (EIA-4161). Suite aux résultats de celui-ci, les échantillons n'ont pas été dilués afin de doser la dopamine des échantillons avec le kit Dopamine Research ELISA (EIA-4824). Ce dernier a également été réalisé en suivant les instructions du fabricant. Le principe de ce test est identique à celui utilisé pour le dosage de la sérotonine mais la dopamine est extraite par un gel d'affinité spécifique au cis-diol, acylée puis convertie par voie enzymatique. La densité optique est mesurée à 450 ± 10 nm dans les dix minutes après l'ajout de la *Stop Solution*. Le protocole détaillé est repris en annexes (Annexes 7.2.4 et 7.2.5).

2.7 ANALYSE DU MICROBIOTE

2.7.1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit *Genomic DNA from tissue* de Macherey-Nagel. L'ADN contenu dans les fèces a été extrait selon les consignes du fabricant en débutant avec le protocole *Genomic DNA from stool* pour poursuivre avec le protocole standard. L'incubation à 56°C a duré 2h30 et a été suivie d'une incubation de cinq minutes avec $20 \mu\text{L}$ de RNase A. Le protocole détaillé est repris en annexes (Annexe 7.3). Ceci a permis de récupérer l'ADN total retrouvé dans l'échantillon de fèces. Les extraits d'ADN total ont été dosés au spectrophotomètre (Nanodrop, référence : 30254729) et sont exprimés en $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Les rapports d'absorbance à 260/280 nm et 260/230 nm ont également été mesurés et témoignent de la pureté de l'ADN extrait par rapport aux protéines et autres polluants d'extraction (e.g. éthanol, sel). Une analyse préliminaire est disponible en annexes (Annexe 7.4).

A partir des échantillons d'ADN extraits, nous réalisons l'analyse du microbiome par la technologie de l'*Amplicon 16rRNA Sequencing*. Succinctement, nous réalisons:

1. Une PCR avec des amorces partiellement flottantes (*overhang* PCR) avec un *spacer* de N6 ou N7 afin d'amplifier la région variable V3-V4 du gène codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) de la sous-unité 16S du ribosome qui est spécifique aux procaryotes. Pour cela, nous utilisons des amorces PCR dégénérées qui s'hybrident à des régions constantes qui flanquent la région V3-V4 d'intérêt auxquelles sont ajoutées les séquences P5 et P7, respectivement pour les amorces sens et anti-sens ((16S/18S/ITS Amplicon Metagenomic Sequencing - Novogene, n.d.), nécessaires dans le cadre d'un séquençage par synthèse de type Illumina.
REV (341R) : GGACTACNNGGGTATCTAAT (longueur = 20 paires de bases)
FOR (806F) : CCTAYGGGRBGCASCAG (longueur = 17 paires de bases)
Où N = A, T, C ou G ; Y = T ou C ; R = A ou G ; B = T, C ou G ; S = C ou G ; les régions P5 et P7 ne sont pas présentées.
2. Une seconde étape de PCR afin d'ajouter les séquences *index* spécifiques à chaque échantillon et qui permettent de réaliser un séquençage multiplexé où les échantillons sont traités dans un même pool pour être séquencés simultanément.
3. Le séquençage proprement dit sur un séquenceur *MiSeq* (Illumina, California) avec un séquençage de type *Paired End* (PE ou séquençage des deux extrémités) de 300 pb par lecture. Nous avons dilué les bibliothèques construites de façon à acquérir 50 000 reads par échantillon.

La réalisation de ces trois étapes a été confiée à la plateforme génomique de l'institut GIGA (ULiège). Nous récupérons les fichiers de séquençage au format *dastq.gq* ou *Raw Sequences*. Le séquenceur a automatiquement réalisé l'étape de démultiplexage sur ces *Raw Sequences* (Figure 7) ce qui permet de séparer les séquences de chaque échantillon à partir des *index* qui leur ont été attribués. Lors de cette étape de démultiplexage, les séquences P5 et P7 nécessaires au séquençage ainsi que les *index* ont été retirés. Les séquences brutes que nous obtenons à ce stade correspondent aux régions variables V3-V4 flanquées des régions constantes ciblées par les amorces de la PCR (1) et des régions dégénérées issues des *spacers* N6 ou N7. Les *spacers* ainsi que les séquences des amorces de la PCR (1) ont ensuite été retirés lors de l'étape de trimming à l'aide du logiciel Cutadapt, ne laissant *in fine* plus que les séquences des régions V3-V4 pour chaque échantillon.

Ces séquences brutes démultiplexées et trimmées ont été utilisées comme entrée dans la suite du logiciel Qiime 2, pour les analyses d'abondance et de représentation taxonomique. Brièvement, les étapes appliquées sont (Figure 7) :

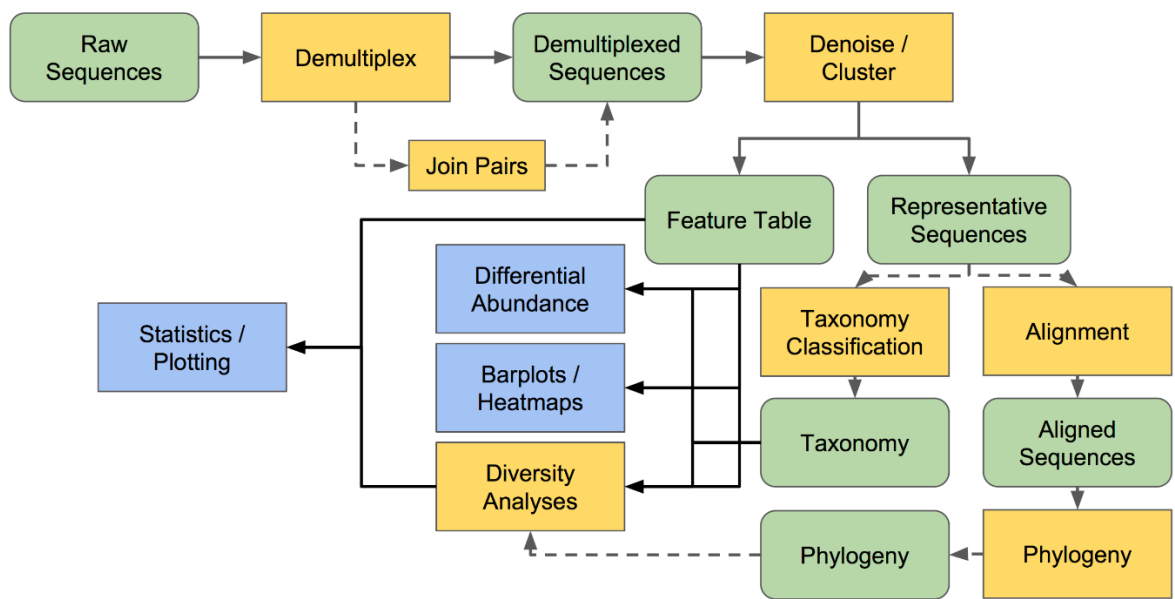


Fig 7 : Schéma général du fonctionnement du logiciel QIIME 2.

- La fusion des lectures (reads) 1 et 2 pour chaque élément de librairie séquencé ayant une qualité de séquençage suffisante.
- La réduction en séquences représentatives ou OTU (*Operational Taxonomic Units*) pour un seuil de similarité de plus de 95% (alignement multiple).
- L'attribution d'un groupe taxonomique à chaque séquence représentative à partir d'une base de données préexistantes associant les séquences V3-V4 à un groupe taxonomique (e.g. phylum, genre, espèce). Dans la présente étude, la base de données Silva a été utilisée.

2.8 ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été analysées dans R (version 4.2.1) et ont été représentées graphiquement par des boxplots (ggplot2) pour mettre en évidence les variations des indicateurs selon les bassins et les tailles de sandres. Ces données ont ensuite été comparées par des anova à un facteur et des tests post-hoc de Tukey pour préciser quelles sont les modalités présentant des différences significatives. Ces différences significatives ($p\text{-value} \leq 0,5$) sont indiquées par la présence de lettres différentes entre les modalités comparées.

Dans le cadre des analyses du microbiote, la diversité entre échantillons (i.e. α -diversité) a été estimée grâce à l'indice de Faith qui tient compte des relations phylogénétiques existantes. Au plus sa valeur est élevée, au plus l'échantillon est diversifié. Une mesure de dissimilarité (i.e. β -diversité) a également été réalisée au moyen de l'indice UniFrac. Il s'agit d'une mesure de distance permettant de comparer des communautés d'organismes en intégrant des informations de parenté des membres de la communauté grâce aux distances phylogénétiques entre individus. Il existe deux variantes de cet indice (i.e. quantitative ou qualitative). La première informe sur l'abondance des organismes présents dans l'échantillon tandis que la seconde informe sur leur présence ou leur absence. C'est la variante qualitative, également appelée non pondérée ou *unweighted*, qui a été sélectionnée car certains échantillons comportent un nombre très faible de séquences représentatives.

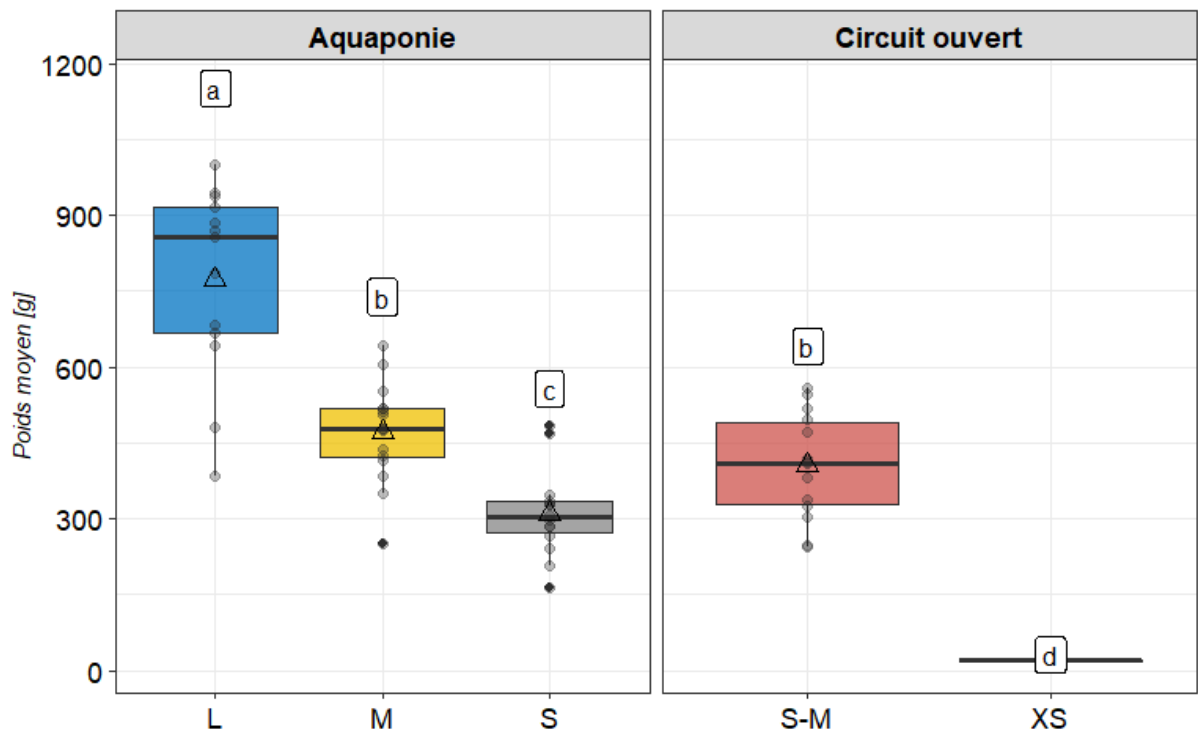


Fig 8 : Comparaison des poids corporels moyens des sandres élevés en système aquaponique (L, M et S) et en système ouvert (S-M et XS). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique le poids corporel de chaque individu.

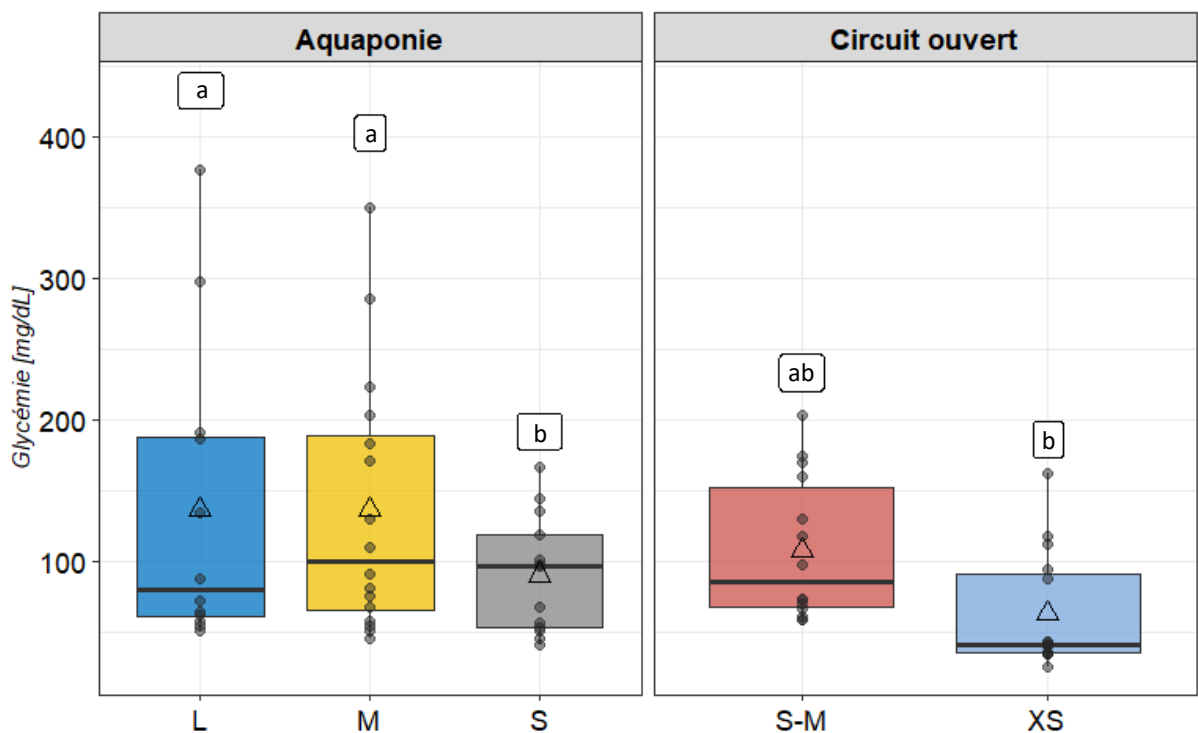


Fig 9 : Comparaison de la glycémie de sandres élevés en système aquaponique (B1, B3 et B5) et en système ouvert (B10 et B11). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique la masse de chaque individu.

3 RÉSULTATS

3.1 EFFET DU POIDS MOYEN SUR LES INDICATEURS PHYSIOLOGIQUES DE STRESS

Les indicateurs de stress sont analysés afin d'évaluer l'impact des modalités d'élevage et de la taille des sandres sur l'ampleur de leur réponse au stress. Dès lors, les poids corporels des individus issus des bassins étudiés ont été comparés (Figure 8). En production aquaponique, les sandres de taille L ($P_{\text{moyen}} = 772,8 \text{ g}$), M ($P_{\text{moyen}} = 471,9 \text{ g}$) et S ($P_{\text{moyen}} = 310,4 \text{ g}$) appartenant respectivement aux bassins B1, B3 et B5, diffèrent significativement en masse (anova, $p\text{-value} < 0.05$), tout comme les individus S-M ($P_{\text{moyen}} = 405,3 \text{ g}$) et XS ($P_{\text{moyen}} = 19,1 \text{ g}$) des bassins B10 et B11 élevés en circuit ouvert (Tableau 1). Les juvéniles élevés pour évaluer l'impact des nitrates avaient pour poids moyen initial $194,3 \pm 28,3 \text{ g}$ (comparable aux sandres de taille S) (Maliki, 2021).

Tableau 1 : Poids corporels des sandres [g]. Valeur moyenne \pm écart-type (Min \pm SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	S-M	XS
Moy \pm SD	772,8 \pm 189,7	471,9 \pm 95,7	310,4 \pm 86,7	405,3 \pm 103,8	19,1 \pm 4,4
Min	383	251	165	245	11,6
Max	1000	642	484	557	27,1
Méd	856	478	302,5	410	19,6
Q1	666	423	271,2	329,2	16,9
Q3	917	517,5	333,8	490,8	20,8

3.2 GLYCÉMIE

La glycémie basale a été mesurée sur les sandres issus de l'élevage aquaponique et en système ouvert (Figure 9). La glycémie des sandres XS ($63,7 \text{ mg.dL}^{-1}$) est significativement différente de celle des individus M ($136,4 \text{ mg.dL}^{-1}$) (anova, $p\text{-value} < 0.05$). La concentration basale est comparable chez les sandres et se situe généralement sous les 100 mg.dL^{-1} (Tableau 2). La glycémie tend à diminuer après un stress de confinement en fonction des tailles, montré par une diminution de l'espace interquartile. Ceci est observé dans le système aquaponique et dans le circuit ouvert. Pour chaque taille de sandres, les valeurs de glycémie sont significativement différentes au niveau basal et en condition post-stress (t-test non apparié, $p\text{-value} < 0.05$).

Tableau 2 : Glycémie des sandres [mg.dL^{-1}]. Valeur moyenne \pm écart-type (Min \pm SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	S-M	XS
Moy \pm SD	136,8 \pm 106,9	136,4 \pm 91,6	90,9 \pm 41,6	108,4 \pm 50,5	63,7 \pm 41
Min	52	46	41	59	26
Max	376	350	167	203	162
Méd	80,5	100,5	97	86	42
Q1	61,8	65,5	54	67,8	36
Q3	188	188,8	119	152,5	91,5

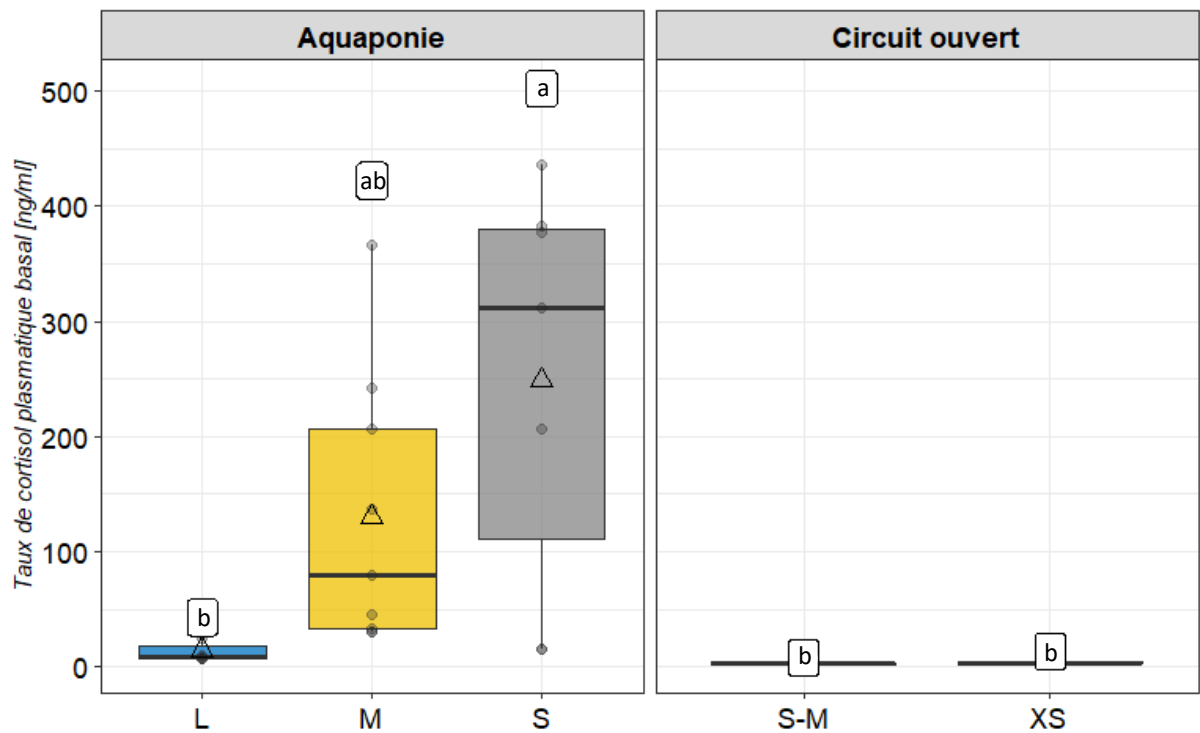


Fig 10 : Comparaison du taux basal de cortisol plasmatique de sandres élevés en système aquaponique (L, M et S) et en système ouvert (S-M et XS). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique la masse de chaque individu.

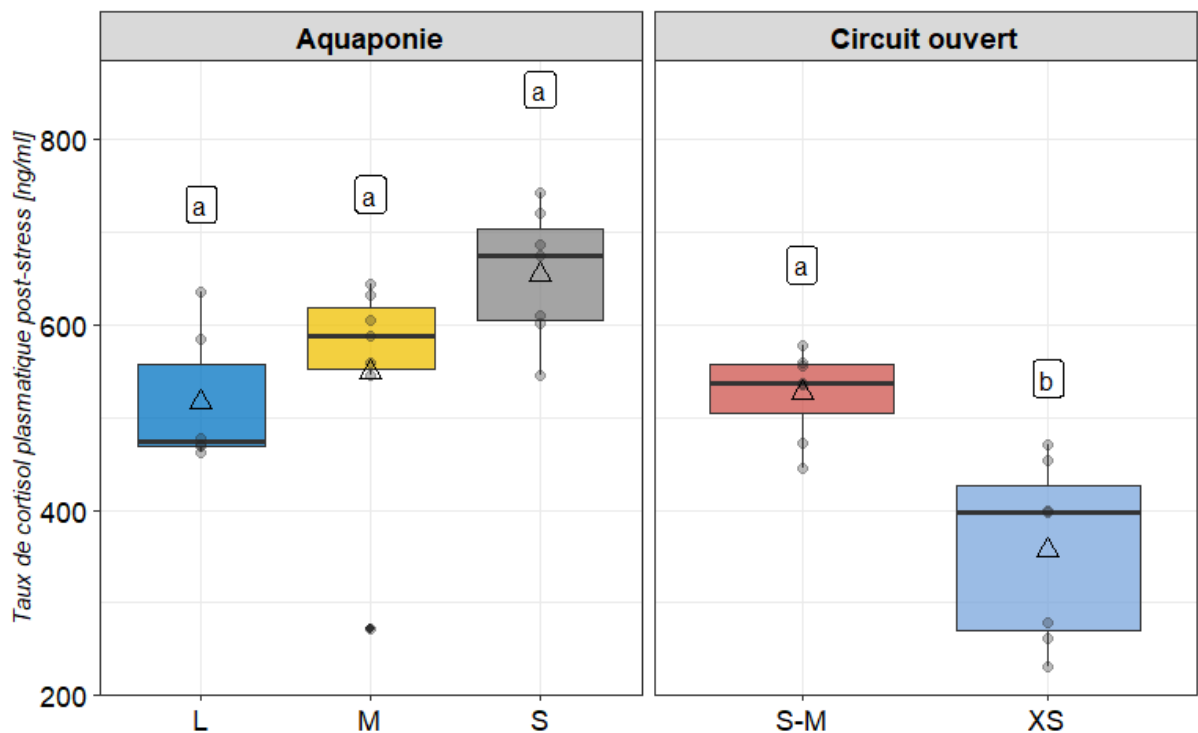


Fig 11 : Comparaison du taux de cortisol plasmatique post-stress de sandres élevés en système aquaponique (L, M et S) et en système ouvert (S-M et XS). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique la masse de chaque individu.

3.3 TAUX DE CORTISOL PLASMATIQUE

En ce qui concerne la concentration plasmatique en cortisol, celle-ci a été déterminée dans deux systèmes (Figure 10 et 11). Le taux de cortisol basal (Tableau 3) des individus de taille M et S est significativement différent des taux des bassins B1, B10 et B11 (Figure 10) (anova, $p\text{-value} < 0.05$). Pour la condition post-stress (Tableau 4), la concentration en cortisol des individus de taille XS ($P_{\text{moyen}} = 19,1$ g) varie significativement de celles retrouvées chez les sandres des autres catégories de taille (Figure 11) (anova, $p\text{-value} < 0.05$). Enfin, les deux conditions diffèrent significativement dans chaque bassin (t-test non apparié, $p\text{-value} < 0.05$).

Tableau 3 : Concentrations basales en cortisol [$\text{ng}\cdot\text{dL}^{-1}$]. Valeur moyenne \pm écart-type (Min \pm SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	S-M	XS
Moy \pm SD	14,7 \pm 12	133 \pm 119,3	249,5 \pm 175,4	3,1 \pm 1,7	4,7 \pm 3,1
Min	6,8	30,4	15,1	1,7	2,3
Max	37,3	367,1	436,8	6,9	11,6
Méd	9	79	311,6	2,7	3,5
Q1	7,3	32,9	111,4	2,2	3,4
Q3	17,5	207,2	380,3	3,1	4,2

Tableau 4 : Concentrations post-stress en cortisol [$\text{ng}\cdot\text{dL}^{-1}$]. Valeur moyenne \pm écart-type (Min \pm SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	S-M	XS
Moy \pm SD	531,1 \pm 77,9	549,3 \pm 127,5	654,7 \pm 70,8	526,5 \pm 48,7	356,4 \pm 97,7
Min	462,6	271,7	546,3	445,6	231
Max	635,2	644,4	742,8	578,1	471,5
Méd	477,6	587,5	674,5	538	398
Q1	469,6	552,6	605,9	504	270,2
Q3	601,5	618,4	703,8	558	427

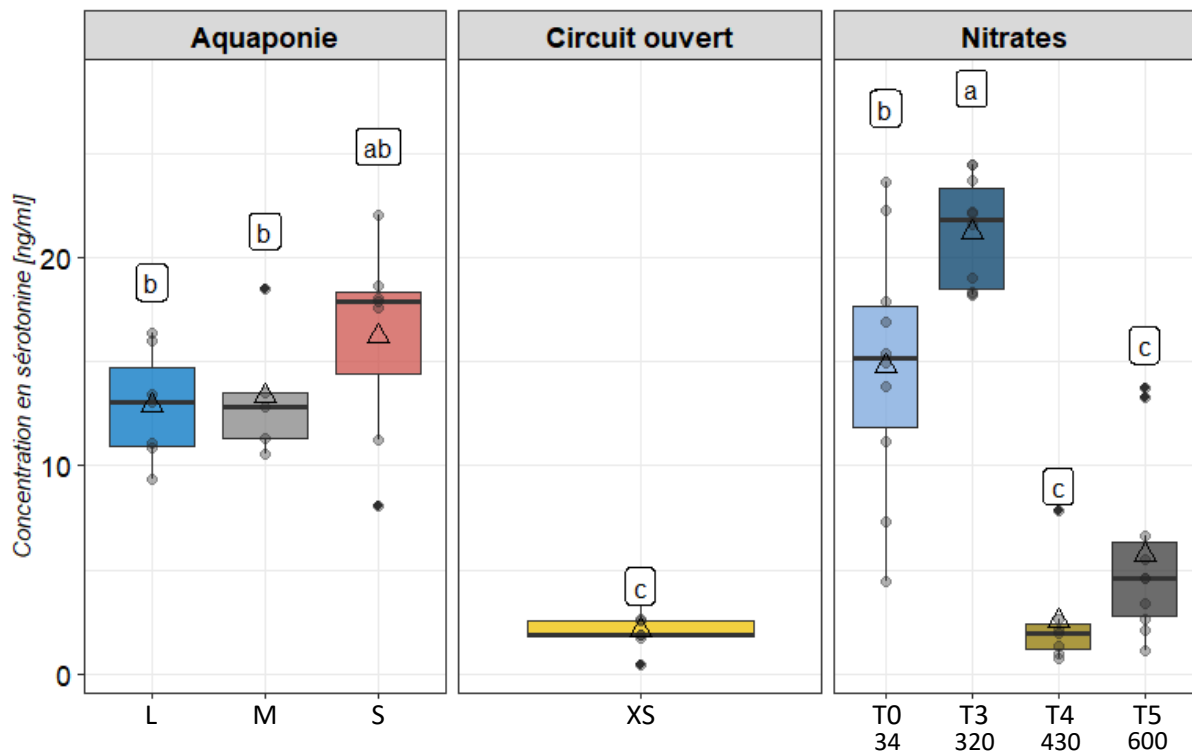


Fig 12 : Comparaison des concentrations de sérotonine de sandres élevés en système aquaponique (L, M et S), en système ouvert (XS) et en système recirculé avec concentrations croissantes en NO_3^- (34, 320, 430 et 600 ng.mL^{-1}). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique la masse de chaque individu.

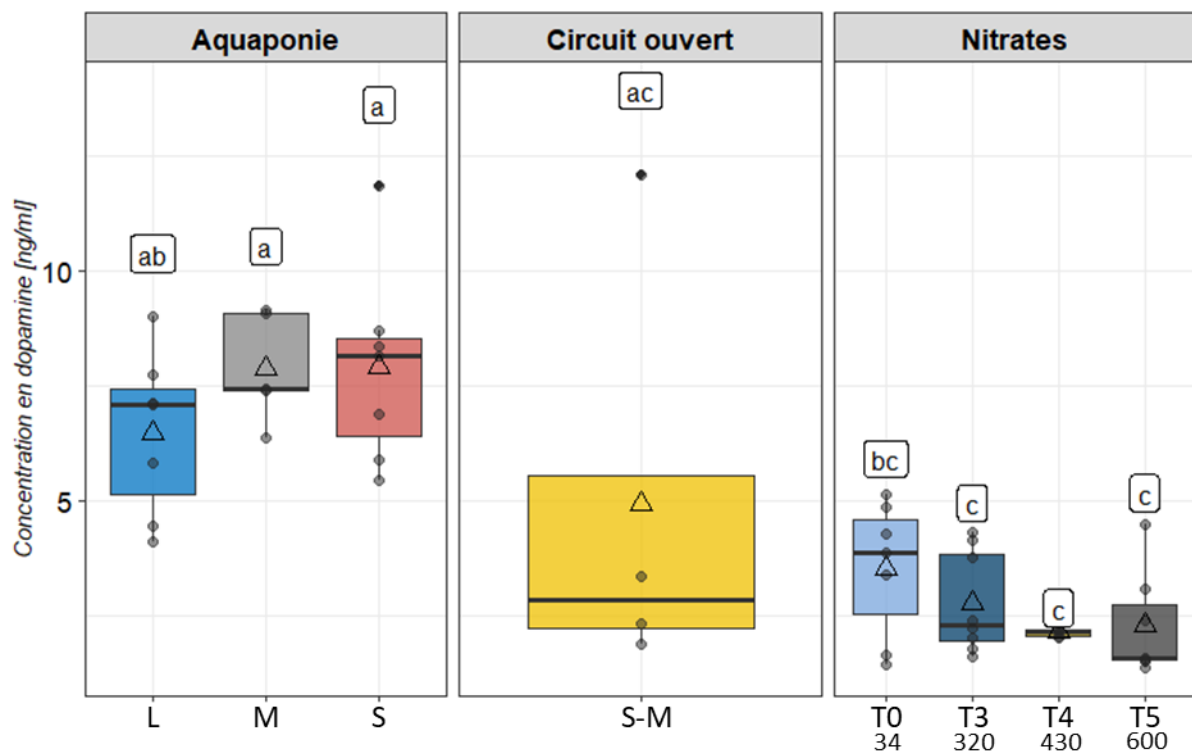


Fig 13 : Comparaison des concentrations de dopamine de sandres élevés en système aquaponique (B1, B3 et B5), en système ouvert (B10) et en système recirculé avec concentrations croissantes en NO_3^- (34, 320, 430 et 600 ng.mL^{-1}). Les boxplots sont constitués de trois barres horizontales : celle du haut est le 3^{ème} quartile, celle du milieu représente la médiane et celle du bas indique le 1^{er} quartile. Le triangle représente la moyenne pour chaque bassin et chaque point indique la masse de chaque individu.

3.4 CONCENTRATION EN SÉROTONINE

Dans le cadre de l'élevage dans le système aquaponique, aucune concentration en sérotonine ne se détache des autres (12,9 ; 13,3 et 16,2 ng.mL⁻¹) (Tableau 5) (anova, *p-value* > 0.05). L'accumulation de nitrates semble faire diminuer le métabolisme de la sérotonine avec des valeurs de sérotonine retrouvées chez les individus des conditions T₀ (14,8 ng.mL⁻¹) et T₃ (21,2 ng.mL⁻¹) significativement différentes de celles calculées pour les conditions T₄ (2,5 ng.mL⁻¹) et T₅ (5,7 ng.mL⁻¹) (anova, *p-value* < 0.05). Les sandres du bassin B11, de taille XS, et des conditions T₄ et T₅ montrent des concentrations en sérotonine plus basses que celles retrouvées dans les autres groupes (Figure 12).

Tableau 5 : Concentrations en sérotonine [ng.mL⁻¹]. Valeur moyenne ± écart-type (Min ± SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	XS	T0	T3	T4	T5
Moy	12,9	13,3	16,2	2,1	14,8	21,2	2,5	5,7
± SD	± 2,7	± 3,1	± 4,8	± 1	± 6	± 2,6	± 2,4	± 4,4
Min	9,3	10,6	8,1	0,4	4,4	18,2	0,8	1,1
Max	16,4	18,5	22	3,7	23,6	24,5	7,8	13,7
Méd	13,1	12,8	17,9	1,9	15,2	21,8	2	4,6
Q1	11	11,3	14,4	1,8	11,8	18,5	1,2	2,8
Q3	14,7	13,5	18,4	2,6	17,6	23,3	2,4	6,3

3.5 CONCENTRATION EN DOPAMINE

Le dosage de la dopamine ne montre aucune différence significative en aquaponie (6,5 ; 7,9 et 7,9 ng.mL⁻¹) (Tableau 6) bien qu'il semble que les individus de plus petites tailles élevés en aquaponie présentent des concentrations légèrement plus importantes de dopamine, même si elles ne sont pas significativement différentes (Figure 13) (anova, *p-value* > 0.05). La dopamine est retrouvée à de plus faibles concentrations chez les individus issus du B10 (4,9 ng.mL⁻¹), élevés en circuit ouvert. Une diminution peut également être observée avec l'augmentation des concentrations en nitrates (3,5 ; 2,8 ; 2,2 et 2,3 ng.mL⁻¹) bien qu'aucune différence ne soit significative (anova, *p-value* > 0.05).

Tableau 6 : Concentrations en dopamine [ng.mL⁻¹]. Valeur moyenne ± écart-type (Min ± SD), minimum (Min), maximum (Max), médiane (Méd), 1^{er} quartile (Q1) et 3^{ème} quartile (Q3).

	L	M	S	S-M	T0	T3	T4	T5
Moy	6,5	7,9	7,9	4,9	3,5	2,8	2,2	2,3
± SD	± 1,8	± 1,2	± 2,1	± 4,8	± 1,5	± 1,1	± 0,1	± 1,2
Min	4,1	6,4	5,5	1,9	1,4	1,6	2	1,4
Max	9	9,2	11,8	12,1	5,1	4,3	2,3	4,5
Méd	7,1	7,4	8,2	2,9	3,9	2,3	2,2	1,6
Q1	5,1	7,4	6,4	2,2	2,5	2	2,1	1,5
Q3	7,4	9,1	8,5	5,5	4,6	3,9	2,2	2,8

3.6 ANALYSE DU MICROBIOTE

L'analyse des séquences a impliqué le retrait des séquences des amorces PCR V3-V4 utilisées (Tableau A1). Le jeu de données initial a subi des filtrations successives et les séquences non-chimériques (Tableau A2) représentent le nombre de séquences conservées à la fin des étapes de filtration (i.e. contrôle qualité). Ce tableau présente le nombre total de séquences exploitées pour l'identification des séquences représentatives (fichier disponible à la demande). Ces séquences ont été rassemblées (i.e. clustering) ce qui a permis de réduire la complexité du jeu de données, constitué de 634 groupes distincts. Les filtrations réalisées ont fortement réduit le nombre de séquences mais chaque modalité est représentée (Figure 14).

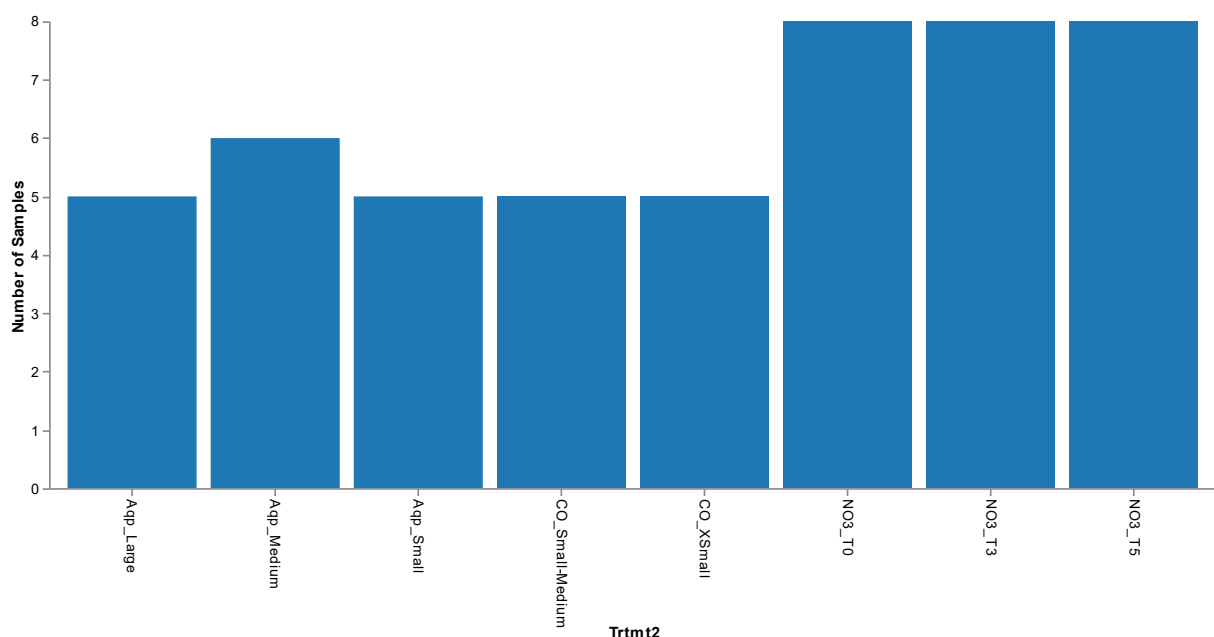


Fig 14 : Nombre d'échantillons par condition observés après les différentes filtrations appliquées. Aqp = aquaponie ; CO = circuit ouvert et NO3 = expérience des nitrates

3.6.1 Estimation de la diversité des échantillons

L'indice de Faith permettant d'évaluer l' α -diversité des échantillons a été comparé (Figure 15) pour chaque condition de chaque expérience (i.e. aquaponie, circuit ouvert et impact des nitrates). Mais aucune différence statistiquement significative n'a été observée (q -value > 0,05) (Annexe - Tableau A3). Lorsque la comparaison n'est effectuée que selon les expériences (Figure 16), aucune différence significative n'a été observée (q -value > 0,05). Cependant, la comparaison entre les échantillons provenant de l'aquaponie et ceux du circuit ouvert tend vers une différence avec une q -value de 0,08 (Tableau 7).

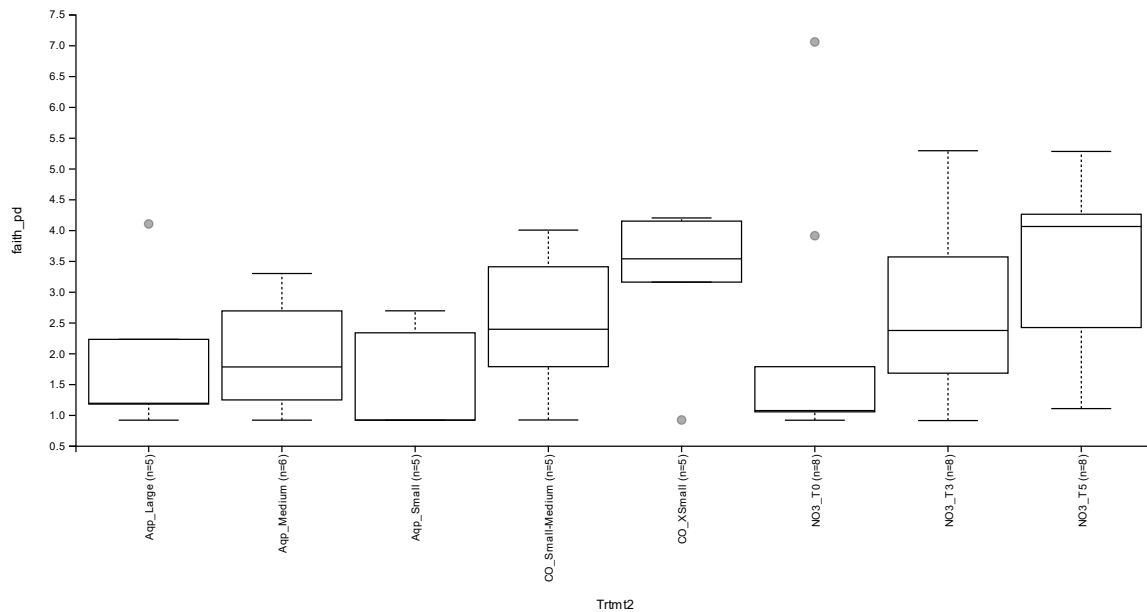


Fig 15 : Comparaison des indices de Faith pour chaque condition de chaque expérience (i.e. aquaponie, circuit ouvert et impact des nitrates).

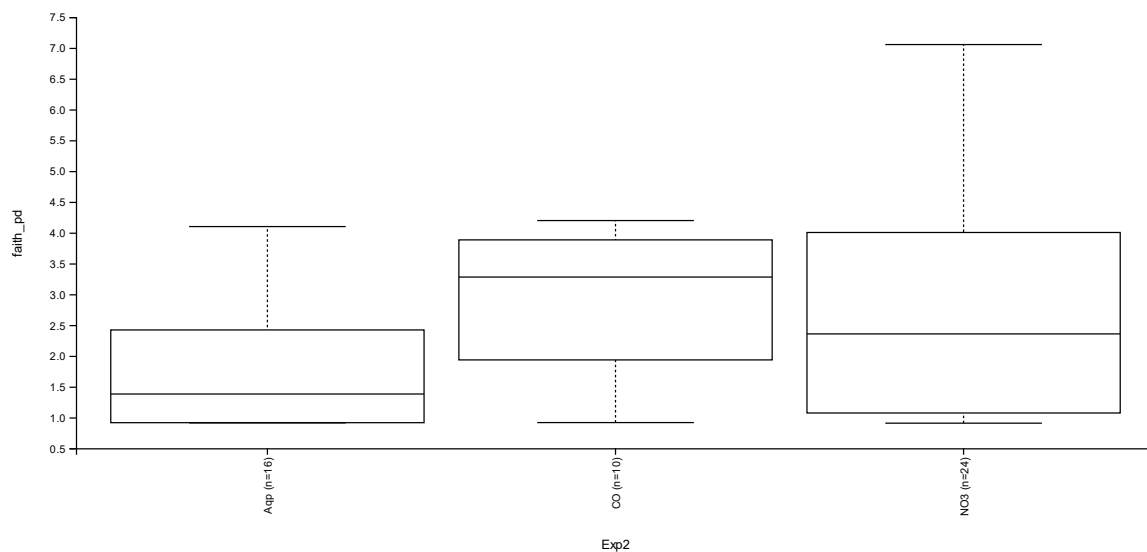


Fig 16 : Comparaison des indices de Faith pour chaque expérience (i.e. aquaponie, circuit ouvert et impact des nitrates).

Tableau 7 : Valeurs statistiques pour la comparaison des indices de Faith pour chaque expérience. Le groupe 1 contenant N1 individus est comparé au groupe 2 composé de N2 individus. Aqp = aquaponie ; CO = circuit ouvert et NO3 = expérience des nitrates. La q-value est la p-value corrigée. La valeur du seuil de significativité a été établie à 0,05.

Groupe 1	N1	Groupe 2	N2	H	p-value	q-value
Aqp	16	CO	10	4,9	0,02	0,08
Aqp	16	NO3	24	2,39	0,12	0,18
CO	10	NO3	24	0,01	0,93	0,93

La mesure de la dissimilarité entre les échantillons, appelée β -diversité, montre à quel point la composition du microbiote des échantillons varie entre les expériences et conditions. Une dissimilarité statistiquement significative (q -value $\leq 0,05$) a été observée entre les échantillons issus du système aquaponique et ceux du circuit ouvert (Tableau 8). La différence entre les échantillons du circuit ouvert et de l'expérience sur l'impact des nitrates n'est pas significative avec une q -value de 0,06.

Tableau 8 : Valeurs statistiques pour la comparaison des indices UniFrac pour chaque expérience. Le groupe 1 est comparé au groupe 2. Aqp = aquaponie ; CO = circuit ouvert et NO3 = expérience des nitrates. La q -value est la p -value corrigée. La valeur du seuil de significativité a été établie à 0,05.

Groupe 1	Groupe 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
Aqp	CO	26	999	4,08	0,018	0,05
Aqp	NO3	40	999	1,66	0,114	0,11
CO	NO3	34	999	2,47	0,04	0,06

La dissimilarité entre les échantillons est également évaluée au travers d'une PCoA (i.e. Principal Coordinate Analysis) en trois dimensions à partir du calcul de l'indice de dissimilarité de Bray & Curtis, permettant l'estimation de la β -diversité (Figure 5). Cette analyse met en évidence une distinction entre les échantillons provenant des trois expériences (Aquaponie, circuit ouvert et nitrates) avec une variabilité plus importante pour l'expérience des nitrates, selon les axes 2 et 3 (Figure 17).

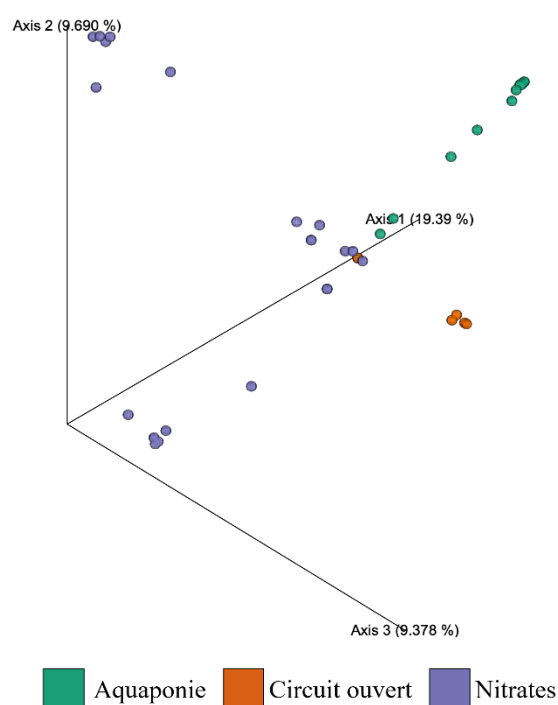


Fig 17 : Principal Coordinate Analysis pour la comparaison de la dissimilarité, par l'indice de Bray & Curtis, des échantillons issus des expériences en aquaponie, en circuit ouvert et sur les nitrates.

3.6.2 Analyses taxonomiques

Afin de pouvoir comparer les taxa bactériens présents dans les échantillons, les données ont été filtrées afin d'éliminer les artefacts de séquençage (e.g. séquences identifiées comme appartenant aux bactéries mais qui appartenaient à l'organisme hôte, à savoir le sandre).

D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae;D_5__Cetobacterium;D_6__uncultured bacterium
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Vibrionales;D_4__Vibrionaceae;D_5__Photobacterium;D_6__Photobacterium damsela subsp. damsela
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Alteromonadales;D_4__Shewanellaceae;D_5__Shewanella;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae;D_5__Plesiomonas;D_6__uncultured bacterium
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae;D_5__Plesiomonas;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Vibrionales;D_4__Vibrionaceae;D_5__Photobacterium;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae;D_5__Streptococcus;_
 D_0__Bacteria;D_1__Spirochaetes;D_2__Spirochaetia;D_3__Brevinematales;D_4__Brevinemataceae;D_5__Brevinema;D_6__uncultured spirochete
 D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae;D_5__Cutibacterium;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae;D_5__Weissella;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae;D_5__Acinetobacter;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae;D_5__Staphylococcus;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae;D_5__Curvibacter;_
 D_0__Bacteria;D_1__Cyanobacteria;D_2__Oxyphotobacteria;D_3__Chloroplast;_;;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae;D_5__Bacillus;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae;D_5__Lactobacillus;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae;D_5__Pseudomonas;_
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae;D_5__Enhydrobacter;_
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae;D_5__Geobacillus;D_6__Geobacillus stearothermophilus
 D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae;D_5__Acinetobacter;D_6__Acinetobacter lwoffii
 D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae;D_5__Paraclostridium;_

Fig 18 bis : Liste des taxa identifiés dans le microbiote intestinal du sandre (Figure 18).

Certaines différences sont observées selon les expériences. En effet, le microbiote des sandres élevés en aquaponie est caractérisé par la présence de la bactérie pathogène *Photobacterium damsela damsela*. Ce résultat a été validé en réalisant un BLASTn entre les données séquencées et la base de données de NCBI (Annexes – Figure A4). En circuit ouvert, le microbiote des sandres de taille S-M est particulièrement représenté par des bactéries du genre *Shewanella*. Cette tendance n’a pas été remarquée chez les sandres XS dont le microbiote semble varier davantage. Enfin, le microbiote des sandres issus de l’expérience sur l’impact des nitrates semble diverger selon les réplicats 1 et 2 (Figure 18) de la condition T0. Le premier réplicat montre une tendance vers les *Plesiomonas (uncultured bacterium)* alors que le second réplicat est davantage représenté par des *Cetobacterium (uncultured bacterium)*. Globalement, l’augmentation de la concentration en nitrates en conditions T3 et T5 ne semble induire aucune autre tendance supplémentaire bien que la diversité semble augmenter.

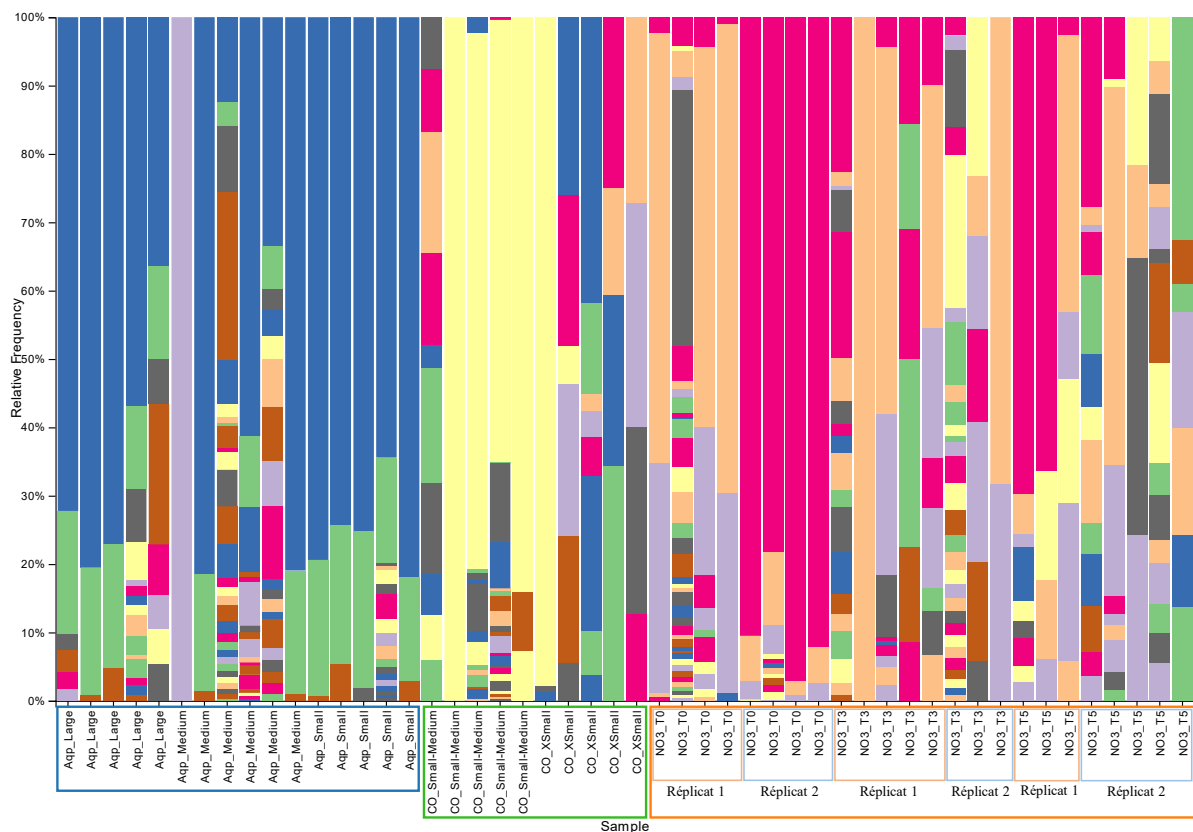


Fig 18 : Composition du microbiote intestinal des sandres pour chaque condition de chaque expérience (i.e. aquaponie en bleu, circuit ouvert en vert et impact des nitrates en orange). Le cadre bleu reprend les individus de l’expérience en aquaponie, le cadre vert les individus de l’expérience en circuit ouvert et le cadre orange les individus de l’expérience sur l’impact des nitrates. Dans ce dernier, une distinction a été ajoutée pour les individus de la condition T₀ pour lesquelles une différence est observée entre le réplicat 1 et 2.

4 DISCUSSION

L'intensification de l'aquaculture s'accompagne de la diversification des espèces élevées comme le sandre, *Sander lucioperca*, qui génère un intérêt grandissant de par sa croissance rapide et une valeur marchande importante malgré une réponse au stress assez élevée. Cependant, l'élevage à forte densité est une source de stress qui diminue les performances de croissance des espèces élevées. Le bien-être animal est donc évalué par différents indicateurs de stress.

Afin d'évaluer le bien-être des sandres élevés dans trois systèmes différents, plusieurs types d'indicateurs de stress ont été mesurés. Seulement, ces indicateurs peuvent présenter quelques faiblesses qui rendent plus complexe leur interprétation. Par exemple, un des inconvénients des indicateurs de stress comme le taux de cortisol plasmatique et la glycémie est que leur mesure requiert une manipulation de l'individu pour effectuer une prise de sang. Etant donné qu'un stress aigu entraîne à la fois une forte augmentation de cortisol et de glucose sanguin, ces méthodes peuvent biaiser les résultats (Pérez-Casanova *et al.*, 2008) sur le stress des organismes étudiés. C'est pour cela que de nouvelles méthodes basées sur des mesures indirectes des indicateurs de stress sont développées. Celles-ci sont basées sur des échantillons de mucus (Franco-Martinez *et al.*, 2022), de fèces (Cao *et al.*, 2017) ou sur l'eau de rétention des poissons (i.e. eau dans laquelle évolue le poisson) (Earley *et al.*, 2008; Fanouraki *et al.*, 2011; Makaras *et al.*, 2020). En ce qui concerne le dosage des neurotransmetteurs, celui-ci impose l'euthanasie de l'individu afin de pouvoir prélever son encéphale. Cela fait que d'un point de vue de production, la détermination du bien-être par le dosage de neuromédiateurs demande de sacrifier une partie de la production pour en plus devoir réaliser un test long dont les conclusions peuvent être difficiles à poser. De plus, chez les plus petits individus, il peut être complexe de récupérer l'entièreté du cerveau, ce qui constitue également un biais de la méthode.

Le taux de cortisol plasmatique basal du sandre est de l'ordre de 15 à 89 ng.mL⁻¹ (Baekelandt *et al.*, 2018) et peut suivre un cycle nyctéméral avec des valeurs plus importantes au cours de la photophase (82 ± 17 ng mL⁻¹), caractérisée par un pic de cortisol vers 10 heures, et une diminution à la scotophase (28 ± 12 ng mL⁻¹) (Baekelandt *et al.*, 2019). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans cette étude. Le stress induit par la manipulation a bien induit un pic de cortisol et de glycémie, ce qui a été constaté pour différents types de stress aigu (Falihatkar *et al.*, 2012; Frisk *et al.*, 2012; Falihatkar & Poursaeid, 2014; Faught & Vijayan, 2016; Rożyński *et al.*, 2016; Swirplies *et al.*, 2019; Demska-Zakęś *et al.*,

2021). Les valeurs de glycémie que nous avons obtenues concordent avec celles retrouvées dans la littérature (Baekelandt *et al.*, 2018). Etant donné que le cortisol et le glucose sont rapidement métabolisés (Baekelandt *et al.*, 2018), l'étude de l'activité du système sérotoninergique a montré une corrélation avec les performances de croissance d'un élevage (Baekelandt *et al.*, 2018). Il s'agirait donc d'un indicateur plus performant que le taux de cortisol (Baekelandt *et al.*, 2018). Cependant, la méthode utilisée pour la présente étude a permis de quantifier un métabolite de la sérotonine (5-HIAA) alors que l'activité du système est évaluée par le rapport sérotonine (5-HT) / son métabolite (5-HIAA). La concentration en dopamine, elle, est assez complexe à discuter étant donné les nombreux rôles que ce neurotransmetteur peut jouer. Cependant, une activité dopaminergique plus importante serait un signe d'un stress aigu alors qu'une diminution de cette activité indiquerait l'effet d'un stress chronique, comme observé par l'expérience sur l'impact d'une accumulation des nitrates (Maliki, 2021).

L'étude du microbiote a comme avantage d'être peu invasive en ce sens qu'elle ne requiert qu'une manipulation du poisson afin de récupérer un échantillon de fèces qui peut être analysé en laboratoire. Cette manipulation peut induire un stress passager qui n'influence pas la composition du microbiote et ne demande aucun sacrifice. Dans le microbiote du sandre, le phylum des *Proteobacteria* est dominant (Dulski *et al.*, 2018), ce qui a également été montré dans notre étude. Globalement, la diversité du microbiote du sandre est assez limitée ce qui serait dû à son régime carnivore. En effet, la diversification du microbiote est plus importante chez un organisme herbivore que carnivore (Ley *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2009; Dulski *et al.*, 2018). De plus, l'évolution de la diversité du microbiote en fonction du stade et de l'âge du poisson doit encore faire l'objet de nouvelles recherches, en particulier sur l'impact que cela peut avoir sur le bien-être. Certaines études n'ont montré aucune différence concernant la flore microbienne du tube digestif mais cela pourrait être dû à une période expérimentale insuffisante pour discerner une évolution (Dulski *et al.*, 2018). Alors que chez *Oncorhynchus kisutch* et *O. mykiss*, la diversité tend à augmenter avec le développement des individus (Romero & Navarrete, 2006; Ingerslev *et al.*, 2014), la tendance contraire a été observée chez *Ctenopharyngodon idellus*, *Siniperca chuatsi* et *Silurus meridionalis* (Yan *et al.*, 2016). Dans notre étude, les sandres de tailles différentes ne semblent pas être caractérisés par des microbiotes complètement différents mis à part pour les sandres élevés en système ouvert dont les individus de taille S-M sont caractérisés par la forte présence de bactéries du genre *Shewanella*. Cette tendance n'a pas été remarquée chez les sandres XS dont le microbiote

semble varier davantage. En effet, le microbiome varie en fonction de facteurs liés à l'hôte comme l'espèce, les composantes génétiques, l'âge, le genre, la taille, le poids, le régime alimentaire (Navarrete *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013, 2014, 2015, 2016; Tarnecki *et al.*, 2017). D'ailleurs, les sandres élevés en système ouvert ont une origine et un historique différents. Les sandres S-M ont été fournis par l'INAGRO et sont dans le système depuis environ un an alors que les sandres XS proviennent d'un fournisseur allemand KaiserZander et séjournent dans le système depuis quelques mois.

Les sandres élevés en système aquaponique possèdent un microbiote principalement composé de bactéries du genre *Photobacterium* (γ -*Proteobacteria*). Ces bactéries ont la capacité de produire des composés antibactériens (Oku *et al.*, 2008) ce qui expliquerait la grande proportion de *Photobacterium damsela damsela* retrouvée dans le microbiote des sandres élevés en système aquaponique. Leur capacité de conversion des nitrates en nitrites (Moi *et al.*, 2017) peut entraîner des dommages chez les poissons étant donné la toxicité des nitrites (Kocour Kroupová *et al.*, 2018; Ciji & Akhtar, 2020). Les *Photobacterium* requièrent du glucose et de l'ammonium NH_4^+ comme source de carbone et d'azote et certaines souches bactériennes consomment des acides aminés pour leur croissance qui n'est optimale qu'en présence de sodium (Moi *et al.*, 2017). Seulement, les protéines sont le principal substrat pour la croissance des poissons, ce qui pourrait être une cause de leur croissance limitée. Le fait que ces bactéries soient présentes dans le tractus digestif des sandres est en accord avec leur utilisation de ces substrats énergétiques pour leur croissance. De plus, leur croissance est optimale à des températures allant de 18 à 25°C, à un pH de 6 à 9 (Moi *et al.*, 2017) ce qui correspond aux caractéristiques physico-chimiques de l'eau aquaponique. *Photobacterium damsela damsela* possède un plasmide portant des marqueurs de résistance aux antibiotiques ainsi que des marqueurs de virulence (Moi *et al.*, 2017). Plus spécifiquement, *Photobacterium damsela damsela* possède un plasmide de 200 000 paires de bases portant sept gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des gènes codant pour un système de sécrétion de type IV (Nonaka *et al.*, 2012) qui permet aux bactéries de transporter des protéines ou de l'ADN à travers leur membrane cellulaire (e.g. transfert horizontal de gènes de résistance). Un autre plasmide retrouvé chez *Photobacterium damsela damsela* (i.e. pPHDD1, 153 000 pb) code pour la damselysine (i.e. cytotoxine extracellulaire thermostable) ainsi que pour un homologue de la toxine HlyA qui entraînent toutes les deux une hémolyse et une virulence chez les poissons et la souris (Rivas *et al.*, 2011, 2013). Ces bactéries pourraient donc provoquer un stress chronique qui pourrait à terme entraîner une augmentation de la mortalité (Annexes – Figure A5) due à

un épuisement des sandres. Cependant, notre analyse n'est que qualitative. Il nous est donc impossible de savoir à quel point cette bactérie est présente dans le système digestif des sandres. De plus, l'ADN récolté pourrait être une forme libre présente dans le tractus digestif du sandre et ne pas être issu d'une bactérie vivante. Cela pourrait être investigué par de prochains travaux sur la détection de certains gènes codants dans le système digestif du sandre.

Photobacterium damsela damsela peut causer des infections opportunistes chez l'homme mais est pathogène de nombreux organismes aquatiques parmi les poissons, les mollusques et les crustacés (Moi *et al.*, 2017). La possibilité d'infection de mollusques par ces bactéries est problématique dans le cadre du système aquaponique. En effet, les installations sont envahies de petits gastéropodes qui pourraient être la porte d'entrée des *Photobacterium* dans les installations. Ces bactéries forment des produits extracellulaires (i.e. ECP ou *extracellular products*) comme des protéases, hémolysines et des sidérophores qui séquestrent le fer (Moi *et al.*, 2017). Ces produits provoquent l'histolysse et des hémorragies qui facilitent la colonisation et la dissémination de la bactérie. Les *Vibrionaceae* sont connues pour leur production de facteurs antimicrobiens (Bérdy, 2005; Clardy *et al.*, 2006; Oku *et al.*, 2008) qui inhibent la croissance de certaines souches pathogènes de *Staphylococcus*, *Streptococcus* mais aussi chez des bactéries pathogènes du genre *Vibrio*. La présence importante de ces bactéries limiterait donc la colonisation du système gastro-intestinal par d'autres bactéries, potentiellement bénéfiques.

Les bactéries du genre *Shewanella* sont anaérobiques facultatives (MacDonell & Colwell, 1985) et appartiennent à la classe des γ -*Proteobacteria* (Chaudhary *et al.*, 2022). Le genre *Shewanella* a la capacité à réduire divers composés organiques et inorganiques pour la respiration anaérobie. Cela lui permet de coloniser de nombreux habitats dont fait partie le tractus digestif de certains téléostéens (Chaudhary *et al.*, 2022). Une souche de *Shewanella putrefaciens* (i.e. SpPdp11) a été utilisée comme probiotique grâce à son importante capacité d'adhésion qui minimise la colonisation de bactéries pathogènes comme *Vibrio harveyi* et *Photobacterium damsela piscida* (Austin & Zhang, 2006; Cámara-Ruiz *et al.*, 2020), en diminuant leur capacité d'attachement (Chabrilion *et al.*, 2005, 2006). Cette capacité pourrait affecter de nombreuses bactéries étant donné la faible diversité du microbiote des sandres S-M qui est dominé par des *Shewanella*. La supplémentation de SpPdp11 au régime de juvéniles *Sparus aurata* élevés à de hautes densités, diminue la concentration plasmatique en cortisol et améliore la tolérance au stress des individus (Varela *et al.*, 2010). La concentration en cortisol post-stress mesurée chez les sandres S-M (526,5 ng.mL⁻¹) était plus faible que celle des sandres

M ($549,3 \text{ ng.mL}^{-1}$) élevés en système aquaponique, mais cette différence n'est pas significative. Alors que pour le taux de cortisol basal, celui-ci était très élevé chez les sandres S-M et très bas chez les individus de taille M. Cela pourrait en partie être dû à la présence de *Shewanella* qui bénéficie aux sandres, ce qui est marqué par un taux de cortisol plus bas. Cependant, les caractéristiques des différents systèmes d'élevage varient fortement, ce qui rend complexe l'interprétation de l'influence de *Shewanella* sur le stress du sandre.

Les bactéries du genre *Plesiomonas*, de la famille des *Enterobacteriaceae*, sont communément retrouvées dans le microbiote d'espèces d'eau douce (Duarte *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014a) et sa réintroduction dans les habitats naturels pourrait être liée à la contamination des eaux usées (Behera *et al.*, 2018) qui est à l'origine de l'infection des poissons. L'espèce *P. shigelloides* (Cortés-Sánchez *et al.*, 2021) croît à une température de 8 à 44°C, bien que sa croissance soit optimale vers les 38°C. Elle tolère des concentrations en NaCl de 0 à 5% et un pH de 4 à 9 (Krovacek, 2003). Les sandres élevés dans la condition T₀ étaient dans une eau à $23,1 \pm 0,8 \text{ °C}$ à une concentration en oxygène de $8,02 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$, un pH de $8,1 \pm 0,5$ et une concentration en NO₃⁻ de 34 mg.L^{-1} . Ces conditions répondent aux besoins de *P. shigelloides*, ce qui lui permet de se développer dans le microbiote des sandres. Elles agissent comme des pathogènes opportunistes qui se développent davantage lors d'épisodes de stress (e.g. manipulation, diminution de la qualité de l'eau, taux élevé de matière organique, augmentation de la température) (Cortés-Sánchez *et al.*, 2021). Le fait qu'elles soient retrouvées dans le microbiote des sandres pourrait être dû au stress induit par la méthode expérimentale (Maliki, 2021). Cette bactérie est responsable d'importantes mortalités de par ses capacités hémolytiques chez plusieurs espèces de téléostéens (Wang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Behera *et al.*, 2018). Mais elle n'est peut-être pas suffisamment présente que pour véritablement impacter le bien-être de *Sander lucioperca*. En effet, il est plus probable que les mortalités observées au cours de l'expérience sur l'impact des nitrates soient dues à une forte accumulation de NO₃⁻ plutôt qu'à la présence de *Plesiomonas*. Or, cette information manque étant donné que les analyses effectuées sont qualitatives et non quantitatives. Néanmoins, le développement de ces bactéries pathogènes serait une source de stress supplémentaire qui pourrait induire une mortalité sur le plus long terme.

Les bactéries *Cetobacterium* ont la capacité de produire de la vitamine B12 (Tsuchiya *et al.*, 2007), ce qui permet de compenser l'absence de vitamine B12 dans l'alimentation (Sugita *et al.*, 1991). Cet avantage pourrait être la raison de leur présence dans le microbiote de *S. lucioperca*. Chez *Arapaima gigas*, ce genre bactérien a été retrouvé à une abondance relative

de 55 à 87% (Ramírez *et al.*, 2018). Ces valeurs ont également été trouvées pour le microbiote des sandres de la condition T0, réplicat 2 (Figure R9). Des différences significatives dans la composition du microbiote ont été remarquées entre deux tailles différentes de *A.gigas*. Cependant, ces différences ne concernent pas les groupes bactériens dominants mais plutôt les groupes secondaires. Cela a également été observé dans les expériences réalisées sur *S. lucioperca* (Figure R9). Des *Fusobacteriaceae*, proches du genre *Cetobacterium* (Dulski *et al.*, 2018), ont été détectées dans le tube digestif d'un des neuf *S. lucioperca* mais également chez d'autres *Percidae* (Kashinskaya *et al.*, 2018). Le microbiome de certains perciformes, comme *Micropterus salmoides* ou *Lepomis macrochirus*, est dominé par des *Fusobacteria* et particulièrement par le genre *Cetobacterium* qui peut atteindre des proportions atteignant les 89,9% (Larsen *et al.*, 2014b). Ce genre pourrait donc être naturellement présent dans le microbiome intestinal de certains poissons mais davantage de recherches sont nécessaires afin de déterminer quel rôle les *Cetobacterium* peuvent jouer dans le système digestif (Larsen *et al.*, 2014b). Il est pour l'instant connu que ces bactéries interviennent dans la biosynthèse de vitamine B12 qui est d'une grande importance pour le développement du poisson (Eichmiller *et al.*, 2016; Yukgehnash *et al.*, 2020). Cependant, la présence de *Fusobacteria* pourrait être corrélée avec une mauvaise condition du poisson comme mis en évidence chez *O. niloticus* (Parata *et al.*, 2020). En effet, ces bactéries sont davantage présentes lorsque les rations sont les plus basses et qu'un stress de prédation est appliqué, ce qui pourrait indiquer que les *Fusobacteria* sont avantagées lors d'un stress de leur hôte (Zha *et al.*, 2018). Etant donné que l'alimentation impacte la composition du microbiome intestinal (Mekuchi *et al.*, 2018), une variation dans le microbiome pourrait être due à une différence d'alimentation chez les individus testés, où un individu se serait moins nourri que les autres pour une quelconque raison.

Il a été montré chez *Sparisoma viride* (*Scaridae*) et *Sander vitreus* (*Percidae*) que le microbiome différait significativement dans les groupes échantillonnés dans un environnement stressant, ce qui montre l'impact que peut générer le stress (Turner *et al.*, 2022). Par exemple, chez *S. vitreus*, les *Firmicutes* et *Fusobacteria* sont plus abondantes dans le groupe stressé alors que les *Proteobacteria* dominent dans les environnements plus stables (Turner *et al.*, 2022). Bien que les conditions expérimentales variaient entre les deux espèces, de nombreuses similarités ont été observées, notamment pour les altérations du microbiome dues au stress chronique des individus (Turner *et al.*, 2022).

La glycémie et le taux de cortisol plasmatique mesurés chez les sandres élevés en système aquaponique ou en circuit ouvert, ne servent *a priori* qu'à déterminer l'impact d'un stress de

manipulation sur le bien-être des sandres (Bertotto *et al.*, 2009; Sadoul & Geffroy, 2019). La glycémie était à un niveau basal lors de la prise de sang chez les sandres de chaque catégorie de taille. Globalement, la glycémie semble être moins importante chez les individus de plus petite taille. Mais le pic de glucose sanguin semble également être moins important chez les sandres élevés en circuit ouvert qu'en aquaponie. En recroisant ces informations avec les données de microbiote, une glycémie plus importante pourrait être due à une sensibilité au stress augmentée à cause d'une forte présence de la bactérie pathogène *Photobacterium damsela damsela* alors que les sandres S-M du circuit ouvert sont colonisés par des bactéries du genre *Shewanella* qui ont notamment déjà été utilisées comme probiotique. Quant aux sandres XS, ceux-ci ont un microbiote plus diversifié qui pourrait leur permettre de s'adapter plus efficacement à des variations de leur environnement, ce qui diminuerait leur sensibilité au stress. La même constatation peut être faite en fonction du taux de cortisol plasmatique. Une autre hypothèse peut être posée. En effet, la prise de sang peut s'avérer plus complexe à réaliser sur les sandres de plus petites tailles. Cela implique une manipulation plus longue qui peut déclencher l'induction du pic de stress avant la prise de sang (Flik *et al.*, 2006). Aussi, la glycémie et le taux de cortisol plasmatique des sandres XS ($P_{\text{moyen}} = 19,1 \text{ g}$) sont généralement plus bas que les autres. Cela pourrait être un artefact dû au protocole car les prélèvements de sang ont été effectués grâce à une aiguille héparinée contenant un volume mort d'héparine constant. Seulement, l'échantillon de sang des sandres XS était limité ($\pm 0,2 \text{ mL}$) ce qui fait que le rapport héparine : sang était plus important chez ce groupe que pour les sandres des autres catégories de taille. Cela pourrait être la cause de leurs valeurs plus faibles de glycémie et de cortisol plasmatique.

Concernant les concentrations en neurotransmetteurs, le stress est supposé augmenter l'activité des systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques (de Abreu *et al.*, 2020). En aquaponie, la forte densité d'élevage des sandres de taille S (densité de 88 kg.m^{-3} dans un volume de 300 L) constitue un stress qui pourrait être la cause de l'augmentation légère de la sérotonine par rapport aux sandres des bassins B1 et B3, bien que cette différence ne soit pas significative (Figure 12). Avec la présence de *Photobacterium damsela damsela* et les dégâts qu'elle peut entraîner, un stress chronique pourrait être causé par cette bactérie, ce qui devrait augmenter la concentration en sérotonine. Les concentrations de sérotonine observées en aquaponie sont effectivement plus importantes qu'en circuit ouvert. Seulement, un stress chronique devrait entraîner une diminution de l'activité dopaminergique, ce qui n'a pas l'air d'être le cas en aquaponie. Les *Photobacterium* ne sont peut-être pas assez nombreuses que pour entraîner un

stress chronique fort. En circuit ouvert où des conditions de maintien sont appliquées, les concentrations en sérotonine et en dopamine sont très faibles. Cela pourrait être dû à un stress peu élevé (pour la sérotonine et la dopamine) ou alors à la très petite taille des sandres (dans le cas de la sérotonine) qui impliquerait une plus faible capacité de sécrétion de la sérotonine. Au cours de l'accumulation des nitrates, les concentrations en sérotonine augmentent entre les conditions T₀ et T₃. Cela pourrait indiquer que les concentrations plus importantes en nitrates sont stressantes pour les individus qui s'adaptent en augmentant la sécrétion de sérotonine. Cependant, pour les conditions T₄ et T₅ où les nitrates sont les plus concentrés, il serait possible que l'intensité du stress génère une surcharge allostatique (Moltesen *et al.*, 2016). En effet, cette expérience a mis en place un stress chronique en appliquant des concentrations élevées en nitrates pendant 60 jours, et les individus deviendraient alors moins aptes à s'adapter au stress de leur environnement. Une autre hypothèse pourrait impliquer un phénomène d'habituation au stress qui réduirait l'ampleur de la réponse adaptative de l'individu, comme cela a été montré avec un stress de manipulation sur la réponse du cortisol chez *Oncorhynchus mykiss* et chez *Perca fluviatilis* (Jentoft *et al.*, 2005). Le stress chronique inhiberait l'activité du système dopaminergique (Cabib & Puglisi-Allegra, 2012), ce qui a été montré au cours de l'expérience réalisée sur l'accumulation des nitrates (Maliki, 2021) avec des concentrations en dopamine inversement proportionnelles aux concentrations en nitrates (Figure 13). Enfin, la diversification du microbiote observée avec l'accumulation des nitrates pourrait être une stratégie adaptative permettant de mieux répondre aux conditions environnementales.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence certaines différences concernant la réponse au stress du sandre dans différents systèmes d'élevage, ce qui montre à quel point il est important de maîtriser les conditions d'élevage d'une espèce aussi sensible que le sandre. En effet, le système aquaponique induit généralement une réponse au stress plus importante chez les sandres que le système d'élevage en circuit ouvert. L'impact de l'accumulation de nitrates dans le système est également montré par des modifications d'activité des systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques. Seulement, ces indicateurs physiologiques ne semblent pas être les meilleurs outils pour l'évaluation du stress. Cela pourrait indiquer que le bien-être des sandres a atteint un plateau et qu'ils se sont adaptés à leurs conditions d'élevage ou alors que les indicateurs utilisés étaient peu adaptés pour une telle étude. Le développement de mesures indirectes devrait être investigué pour l'évaluation du bien-être du sandre. Ces méthodes indirectes (e.g mesure du taux de cortisol présent dans l'eau de rétention du poisson) ont comme avantage de ne pas causer de stress de manipulation, de mesurer le cortisol à multiples reprises et d'évaluer le stress d'individus trop petits que pour être saignés.

Cependant, l'analyse du microbiote s'est avérée informative car elle a permis de montrer des différences dans la composition du microbiote intestinal du sandre dans les différents systèmes d'élevage. Cette étude a notamment mis en évidence la présence d'une bactérie pathogène *Photobacterium damsela damsela*, qui pourrait être un des facteurs induisant une mortalité chronique dans le système aquaponique pilote de Strée. Le microbiote pourrait faire l'objet de plus amples analyses comme l'identification et la quantification de plasmides de bactéries pathogènes par PCR quantitative. Une technique de séquençage complet (*ShotGun Metagenomic*) permettrait de récolter des informations sur les gènes codants présents dans le tractus digestif du sandre. Cependant, les méthodes d'échantillonnage devraient être adaptées afin de limiter les sources de contamination.

6 BIBLIOGRAPHIE

- 16S/18S/ITS Amplicon Metagenomic Sequencing - Novogene. (no date) .
<<https://en.novogene.com/services/research-services/metagenome-sequencing/16s-18s-its-amplicon-metagenomic-sequencing/>> (31 August 2022).
- Abdel-Tawwab, M., Monier, M.N., Hoseinifar, S.H. & Faggio, C. (2019) Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiology and Biochemistry*, **45**, 997–1013. *Fish Physiology and Biochemistry*.
- de Abreu, M.S., Maximino, C., Cardoso, S.C., Marques, C.I., Pimentel, A.F.N., Mece, E., Winberg, S., Barcellos, L.J.G. & Soares, M.C. (2020) Dopamine and serotonin mediate the impact of stress on cleaner fish cooperative behavior. *Hormones and Behavior*, **125**, 104813.
- Alexi, N., Byrne, D. v, Nanou, E. & Grigorakis, K. (2018) Investigation of sensory profiles and hedonic drivers of emerging aquaculture fish species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**, 1179–1187.
- de Almeida, R.M.M., Ferrari, P.F., Parmigiani, S. & Miczek, K.A. (2005) Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*, **526**, 51–64.
- Aluru, N. & Vijayan, M.M. (2009) Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *General and Comparative Endocrinology*, **164**, 142–150.
- Antunes, D.F., Soares, M.C. & Taborsky, M. (2022) Dopamine modulates social behaviour in cooperatively breeding fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **550**, 111649.
- Árnason, T., Björnsson, B., Steinarsson, A. & Oddgeirsson, M. (2009) Effects of temperature and body weight on growth rate and feed conversion ratio in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **295**, 218–225.
- Ashley, P.J. (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, **104**, 199–235.
- Austin, B. & Zhang, X.-H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 119–124.

- Baekelandt, S. (2020) Fish immunity modulation by the light environment and the melatonin hormone in a percid fish, the pike-perch.
- Baekelandt, S., Redivo, B., Mandiki, S.N.M., Bournonville, T., Houndji, A., Bernard, B., el Kertaoui, N., Schmitz, M., Fontaine, P., Gardeur, J.-N., Ledoré, Y. & Kestemont, P. (2018) Multifactorial analyses revealed optimal aquaculture modalities improving husbandry fitness without clear effect on stress and immune status of pikeperch *Sander lucioperca*. *General and Comparative Endocrinology*, **258**, 194–204.
- Baekelandt, S., Mandiki, S.N.M., Schmitz, M. & Kestemont, P. (2019) Influence of the light spectrum on the daily rhythms of stress and humoral innate immune markers in pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture*, **499**, 358–363.
- Baekelandt, S., Milla, S., Cornet, V., Flamion, E., Ledoré, Y., Redivo, B., Antipine, S., Mandiki, S.N.M., Houndji, A., el Kertaoui, N. & Kestemont, P. (2020) Seasonal simulated photoperiods influence melatonin release and immune markers of pike perch *Sander lucioperca*. *Scientific Reports*, **10**, 2650.
- Behera, B.K., Bera, A.K., Paria, P., Das, A., Parida, P.K., Kumari, S., Bhowmick, S. & Das, B.K. (2018) Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in silver carp. *Aquaculture*, **493**, 314–318.
- Bérdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, **58**, 1–26.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G. & Simontacchi, C. (2009) Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*.
- Cabib, S. & Puglisi-Allegra, S. (2012) The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **36**, 79–89.
- Cámara-Ruiz, M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.Á. & Esteban, M.Á. (2020) Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*, **8**, 1990.
- Campanati, C., Willer, D., Schubert, J. & Aldridge, D.C. (2022) Sustainable intensification of aquaculture through nutrient recycling and circular economies: more fish, less waste, blue growth. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, **30**, 143–169.

- Cao, Y., Tveten, A.-K. & Stene, A. (2017) Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. *Fish & Shellfish Immunology*, **66**, 317–324.
- Chabrillon, M., Rico, R.M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2005) Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, **28**, 531–537.
- Chabrillon, M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2006) Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, **37**, 78–86.
- Chaudhary, A., Ketkar, O.A., Irfan, S., Rana, V., Rahi, P., Deshmukh, R., Kaur, J. & Dhar, H. (2022) Genomic insights into omega-3 polyunsaturated fatty acid producing *Shewanella* sp. N2AIL from fish gut. *Biology*, **11**, 632.
- Chen, Y.-C., Baronio, D., Semenova, S., Abdurakhmanova, S. & Panula, P. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior. *The Journal of Neuroscience*, **40**, 6146–6164.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., Khanom, P., Pachontis, P. & Nunsong, W. (2005) Antiparasitic, antibacterial, and antifungam activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. *Acta Horticulturae*, 179–182.
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C. & Neefus, C. (2001) Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *Journal of Phycology*, **37**, 975–986.
- Ciji, A. & Akhtar, M.S. (2020) Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, **12**, 878–908.
- Clardy, J., Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2006) New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, **24**, 1541–1550.
- Clark, C.T., Weissbach, H. & Udenfriend, S. (1954) 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *Journal of Biological Chemistry*, **210**, 139–148.

- Colt, J., Lamoureux, J., Patterson, R. & Rogers, G. (2006) Reporting standards for biofilter performance studies. *Aquacultural Engineering*, **34**, 377–388.
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J.M. & Soengas, J.L. (2018) Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology*, **9**.
- Conijn, J.G., Bindraban, P.S., Schröder, J.J. & Jongschaap, R.E.E. (2018) Can our global food system meet food demand within planetary boundaries? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **251**, 244–256. Elsevier.
- Cortés-Sánchez, A.D.J., Espinosa-Chaurand, L.D., Díaz-Ramirez, M. & Torres-Ochoa, E. (2021) *Plesiomonas*: a review on food safety, fish-borne diseases, and tilapia. *The Scientific World Journal*, **2021**, 1–10.
- Craig, J.F. (2000) *Percid fishes*. P. in.: Wiley.
- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K. & Pedersen, P.B. (2013) Farming different species in RAS in nordic countries: current status and future perspectives. *Aquacultural Engineering*, **53**, 2–13.
- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, **65**, 1–105.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C. & Summerfelt, S.T. (2014) Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, **59**, 30–40.
- Delaide, B., Monsees, H., Gross, A. & Goddek, S. (2019) Aerobic and anaerobic treatments for aquaponic sludge reduction and mineralisation. Pp. 247–266 in: *Aquaponics Food Production Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Demska-Zakęś, K., Gomułka, P., Rożyński, M. & Zakęś, Z. (2021) Effect of a short-term sodium chloride bath on juvenile pikeperch (*Sander lucioperca*) welfare. *Aquaculture Reports*, **19**, 100569.
- Duarte, S., Silva, F.C. de P. e, Zauli, D.A.G., Nicoli, J.R. & Araújo, F.G. (2014) Gram-negative intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, **45**, 1283–1292.

- Dulski, T., Zakęs, Z. & Ciesielski, S. (2018) Characterization of the gut microbiota in early life stages of pikeperch *Sander lucioperca*. *Journal of Fish Biology*, **92**, 94–104.
- Dulski, T., Kujawa, R., Godziba, M. & Ciesielski, S. (2020) Effect of salinity on the gut microbiome of pike fry (*Esox lucius*). *Applied Sciences*, **10**, 2506.
- Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E. & Kinkel, M.D. (2010) Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish*, **7**, 205–213.
- Earley, R., Ellis, T., Hirschenhauser, K., Scott, A., Oliveira, R., Canario, A., Hubbard, P., Bender, N., Huertas, M., Pavlidis, M. & Sebire, M. (2008) Non-invasive measurement of steroids in fish-holding water: important considerations when applying the procedure to behaviour studies. *Behaviour*, **145**, 1307–1328.
- Eichmiller, J.J., Hamilton, M.J., Staley, C., Sadowsky, M.J. & Sorensen, P.W. (2016) Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome*, **4**, 44.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø. & Martins, C.I.M. (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**, 163–188.
- Estaiano de Rezende, R.A., Soares, M.P., Sampaio, F.G., Cardoso, I.L., Ishikawa, M.M., Lima Dallago, B.S., Rantin, F.T. & Teixeira Duarte, M.C. (2021) Phytobiotics blend as a dietary supplement for Nile tilapia health improvement. *Fish & Shellfish Immunology*, **114**, 293–300.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. & Choe, K.P. (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, **85**, 97–177.
- Falahatkar, B. & Poursaeid, S. (2014) Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture International*, **22**, 235–244.
- Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Efatpanah, I. & Meknatkhah, B. (2012) Primary and secondary responses of juveniles of a teleostean, pikeperch *Sander lucioperca*, and a chondrosteian, persian sturgeon *Acipenser persicus*, to handling during transport. *North American Journal of Aquaculture*, **74**, 241–250.

- Fanouraki, E., Mylonas, C.C., Papandroulakis, N. & Pavlidis, M. (2011) Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, **173**, 313–322.
- Fatira, E., Papandroulakis, N. & Pavlidis, M. (2014) Diel changes in plasma cortisol and effects of size and stress duration on the cortisol response in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **40**, 911–919.
- Faught, E. & Vijayan, M.M. (2016) Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **199**, 136–145.
- Feldman, R.D., Limbird, L.E., Nadeau, J., FitzGerald, G.A., Robertson, D. & Wood, A.J. (1983) Dynamic regulation of leukocyte beta adrenergic receptor-agonist interactions by physiological changes in circulating catecholamines. *Journal of Clinical Investigation*, **72**, 164–170.
- Fiol, D.F. & Kültz, D. (2007) Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS Journal*, **274**, 5790–5798.
- Flik, G., Klaren, P.H.M., van den Burg, E.H., Metz, J.R. & Huising, M.O. (2006) CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **146**, 36–44.
- Focke, P.J., Wang, X. & Larsson, H.P. (2013) Neurotransmitter transporters: structure meets function. *Structure*, **21**, 694–705.
- Franco-Martinez, L., Brandts, I., Reyes-López, F., Tort, L., Tvarijonavičiute, A. & Teles, M. (2022) Skin mucus as a relevant low-invasive biological matrix for the measurement of an acute stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water*, **14**, 1754.
- Frank, D.N., st. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 13780–13785.
- Frankic, A. & Hershner, C. (2003) Sustainable aquaculture: developing the promise of aquaculture. *Aquaculture International*, **11**, 517–530.
- Friberg, I.M., Taylor, J.D. & Jackson, J.A. (2019) Diet in the driving seat: natural diet-immunity-microbiome interactions in wild fish. *Frontiers in Immunology*, **10**.

- Frisk, M., Skov, P.V. & Steffensen, J.F. (2012) Thermal optimum for pikeperch (*Sander lucioperca*) and the use of ventilation frequency as a predictor of metabolic rate. *Aquaculture*, **324–325**, 151–157.
- Fuller, R.W. & Wong, D.T. (1990) Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **600**, 68–80.
- Gallo, B.D., Farrell, J.M. & Leydet, B.F. (2020) Fish gut microbiome: a primer to an emerging discipline in the fisheries sciences. *Fisheries*, **45**, 271–282.
- Ghanbari, M., Kneifel, W. & Domig, K.J. (2015) A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, **448**, 464–475.
- Gingrich, J.A. & Caron, M.G. (1993) *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. 299–321 pp.
- Goddek, S. & Keesman, K.J. (2018) The necessity of desalination technology for designing and sizing multi-loop aquaponics systems. *Desalination*, **428**, 76–85.
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B. & Dos-Santos, M. (2019a) Aquaponics and global food challenges. Pp. 3–17 in: *Aquaponics Food Production Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Goddek, S., Joyce, A., Wuertz, S., Körner, O., Bläser, I., Reuter, M. & Keesman, K.J. (2019b) Decoupled aquaponics systems. Pp. 201–229 in: *Aquaponics Food Production Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Greenfeld, A., Becker, N., Bornman, J.F., Spatari, S. & Angel, D.L. (2022) Is aquaponics good for the environment?- evaluation of environmental impact through life cycle assessment studies on aquaponics systems. *Aquaculture International*, **30**, 305–322.
- Grewer, C. & Rauen, T. (2005) Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. *The Journal of Membrane Biology*, **203**, 1–20.
- Heimovics, S.A., Cornil, C.A., Ball, G.F. & Ritters, L.V. (2009) D1-like dopamine receptor density in nuclei involved in social behavior correlates with song in a context-dependent fashion in male European starlings. *Neuroscience*, **159**, 962–973.

- Herbert, N.A. & Steffensen, J.F. (2005) The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Marine Biology*, **147**, 1403–1412.
- Hu, Q., Lin, Q., Shi, C., Fu, X., Li, N., Liu, L. & Wu, S. (2014) Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, **54**, 229–35.
- Ingerslev, H.-C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M. & Madsen, L. (2014) The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, **424–425**, 24–34.
- Jarmołowicz, S., Demska-Zakęś, K. & Zakęś, Z. (2014) Impact of butyl benzyl phthalate on development of the reproductive system of European pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Acta Veterinaria Hungarica*, **62**, 397–407.
- Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A. & Andersen, Ø. (2005) Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **141**, 353–358.
- Jonnakuty, C. & Gragnoli, C. (2008) What do we know about serotonin? *Journal of Cellular Physiology*, **217**, 301–306.
- Kari, Z.A., Wee, W., Hamid, N.K.A., Mat, K., Rusli, N.D., Khalid, H.N.M., Sukri, S.A.M., Harun, H.C., Dawood, M.A.O., Hakim, A.H., Khoo, M.I., Abd El-Razek, I.M., Goh, K.W. & Wei, L.S. (2022) Recent advances of phytobiotic utilization in carp farming: a review. *Aquaculture Nutrition*, **2022**, 1–10.
- Kashinskaya, E.N., Simonov, E.P., Kabilov, M.R., Izvekova, G.I., Andree, K.B. & Solovyev, M.M. (2018) Diet and other environmental factors shape the bacterial communities of fish gut in an eutrophic lake. *Journal of Applied Microbiology*, **125**, 1626–1641.
- Kestemont, P., Xueliang, X., Hamza, N., Maboudou, J. & Imorou Toko, I. (2007) Effect of weaning age and diet on pikeperch larviculture. *Aquaculture*, **264**, 197–204.

- Kim, D.-Y., Shinde, S.K., Kadam, A.A., Saratale, R.G., Saratale, G.D., Kumar, M., Syed, A., Bahkali, A.H. & Ghodake, G.S. (2022) Advantage of species diversification to facilitate sustainable development of aquaculture sector. *Biology*, **11**, 368.
- Kim, P.S., Shin, N.-R., Lee, J.-B., Kim, M.-S., Whon, T.W., Hyun, D.-W., Yun, J.-H., Jung, M.-J., Kim, J.Y. & Bae, J.-W. (2021) Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*, **9**, 166.
- Knowler, D., Chopin, T., Martínez-Espiñeira, R., Neori, A., Nobre, A., Noce, A. & Reid, G. (2020) The economics of integrated multi-trophic aquaculture: where are we now and where do we need to go? *Reviews in Aquaculture*, **12**, 1579–1594.
- Kocour Kroupová, H., Valentová, O., Svobodová, Z., Šauer, P. & Máchová, J. (2018) Toxic effects of nitrite on freshwater organisms: a review. *Reviews in Aquaculture*, **10**, 525–542.
- Konig, B., Junge, R., Bittsanszky, A., Villarroel, M. & Komives, T. (2016) On the sustainability of aquaponics. *Ecocycles*, **2**, 26–32.
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., McKenna, B.A. & Lombi, E. (2019) Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*, **132**, 105078. Elsevier.
- Krovacek, K. (2003) *Plesiomonas shigelloides*. Pp. 389–394 in: *International Handbook of Foodborne Pathogens*. CRC Press.
- Lamers, A.E., ter Brugge, P.J., Flik, G. & Wendelaar Bonga, S.E. (1997) Acid stress induces a D1-like dopamine receptor in pituitary MSH cells of *Oreochromis mossambicus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **273**, R387–R392.
- Larsen, A.M., Mohammed, H.H. & Arias, C.R. (2014a) Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, **116**, 1396–1404.
- Lawrence, M.J., Raby, G.D., Teffer, A.K., Jeffries, K.M., Danylchuk, A.J., Eliason, E.J., Hasler, C.T., Clark, T.D. & Cooke, S.J. (2020) Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature. *Journal of Fish Biology*, **97**, 4–15.

- Leal, E., Fernández-Durán, B., Agulleiro, M.J., Conde-Siera, M., Míguez, J.M. & Cerdá-Reverter, J.M. (2013) Effects of dopaminergic system activation on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. *Hormones and Behavior*, **64**, 113–121.
- Lee, Y.-J., Chai, L. & Wu, P.-S. (2021) Taiwan's ecological footprint and overshoot day. *Scientific Reports*, **11**, 15068. Nature Publishing Group UK.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R. & Gordon, J.I. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, **320**, 1647–1651.
- Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., Zhang, T., Yu, Y. & Yan, Q. (2014) Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *Journal of Applied Microbiology*, **117**, 1750–1760.
- Li, M., Wei, D., Huang, S., Huang, L., Xu, F., Yu, Q., Liu, M. & Li, P. (2022) Medicinal herbs and phytochemicals to combat pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*, **30**, 1239–1259.
- Li, T., Long, M., Gatesoupe, F.-J., Zhang, Q., Li, A. & Gong, X. (2015) Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microbial Ecology*, **69**, 25–36.
- Li, X., Yan, Q., Xie, S., Hu, W., Yu, Y. & Hu, Z. (2013) Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *PLoS ONE*, **8**, e64577.
- Li, X., Yan, Q., Ringø, E., Wu, X., He, Y. & Yang, D. (2016) The influence of weight and gender on intestinal bacterial community of wild largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*, 1874). *BMC Microbiology*, **16**, 191.
- Liebelt, D.J., Jordan, J.T. & Doherty, C.J. (2019) Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, **18**, 1409–1433.
- Liu, Z., Ke, X., Lu, M., Gao, F., Cao, J., Zhu, H. & Wang, M. (2015) Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, **55**, 96–106.

- Love, D.C., Fry, J.P., Genello, L., Hill, E.S., Frederick, J.A., Li, X. & Semmens, K. (2014) An International Survey of Aquaponics Practitioners. *PLoS ONE*, **9**, e102662.
- MacDonell, M.T. & Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology*, **6**, 171–182.
- Makaras, T., Razumienė, J., Gurevičienė, V., Šakinytė, I., Stankevičiūtė, M. & Kazlauskienė, N. (2020) A new approach of stress evaluation in fish using β -d-Glucose measurement in fish holding-water. *Ecological Indicators*, **109**, 105829.
- Maliki (2021) Détermination du bien-être du sandre (*Sander lucioperca*) élevé dans une eau aquaponique riche en nitrates, par l'utilisation d'indicateurs physiologiques. Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture, Université de Liège.
- Manelli, A. (2016) New paradigms for a sustainable well-being. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, **8**, 617–627. Elsevier Srl.
- Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., Prunet, P. & Magnoni, L.J. (2020) Editorial: welfare and stressors in fish: challenges facing aquaculture. *Frontiers in Physiology*, **11**, 10–12.
- McDonald, M.D. (2017) An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **197**, 19–31.
- Mekuchi, M., Asakura, T., Sakata, K., Yamaguchi, T., Teruya, K. & Kikuchi, J. (2018) Intestinal microbiota composition is altered according to nutritional biorhythms in the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*). *PLOS ONE*, **13**, e0197256.
- Mellor, D. (2016) Updating animal welfare thinking: moving beyond the “five freedoms” towards “a life worth living.” *Animals*, **6**, 21.
- Metcalf, S.S. & Widener, M.J. (2011) Growing buffalo's capacity for local food: a systems framework for sustainable agriculture. *Applied Geography*, **31**, 1242–1251. Pergamon.
- Moi, I.M., Roslan, N.N., Leow, A.T.C., Ali, M.S.M., Rahman, R.N.Z.R.Abd., Rahimpour, A. & Sabri, S. (2017) The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 4371–4385.

- Molinoff, P.B. & Axelrod, J. (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annual Review of Biochemistry*, **40**, 465–500.
- Moltesen, M., Laursen, D.C., Thörnqvist, P.-O., Andersson, M.Å., Winberg, S. & Höglund, E. (2016) Effects of acute and chronic stress on telencephalic neurochemistry and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*.
- Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W. & Wuertz, S. (2017a) Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Research*, **48**, 3482–3492.
- Monsees, H., Kloas, W. & Wuertz, S. (2017b) Decoupled systems on trial: eliminating bottlenecks to improve aquaponic processes. *PLOS ONE*, **12**, e0183056.
- Müller-Belecke, A., Zienert, S., Thürmer, C., Kaufhold, S. & Spranger, U. (2013) The “self cleaning inherent gas denitrification-reactor” for nitrate elimination in RAS for pike perch (*Sander lucioperca*) production. *Aquacultural Engineering*, **57**, 18–23.
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P.P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., Jara, P., Acuña-Castillo, C. & Fernández, R. (2014) Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **40**, 531–538.
- Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R. & Romero, J. (2012) PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE*, **7**, e31335.
- Nekola, J.C., Allen, C.D., Brown, J.H., Burger, J.R., Davidson, A.D., Fristoe, T.S., Hamilton, M.J., Hammond, S.T., Kodric-Brown, A., Mercado-Silva, N. & Okie, J.G. (2013) The Malthusian–Darwinian dynamic and the trajectory of civilization. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 127–130.
- Neubauer, P. & Andersen, K.H. (2019) Thermal performance of fish is explained by an interplay between physiology, behaviour and ecology. *Conservation Physiology*, **7**.
- Nobre, A.M., Robertson-Andersson, D., Neori, A. & Sankar, K. (2010) Ecological–economic assessment of aquaculture options: comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture*, **306**, 116–126. Elsevier B.V.

- Nonaka, L., Maruyama, F., Miyamoto, M., Miyakoshi, M., Kurokawa, K. & Masuda, M. (2012) Novel conjugative transferable multiple drug resistance plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from marine aquaculture environment. *Microbes and Environments*, **27**, 263–272.
- O’Connell, L.A. & Hofmann, H.A. (2011) Genes, hormones, and circuits: an integrative approach to study the evolution of social behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **32**, 320–335.
- Oku, N., Kawabata, K., Adachi, K., Katsuta, A. & Shizuri, Y. (2008) Unnarmicins A and C, new antibacterial depsipeptides produced by marine bacterium *Photobacterium* sp. MBIC06485. *The Journal of Antibiotics*, **61**, 11–17.
- Oliva-Teles, A. (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, **35**, 83–108.
- Øverli, Ø., Harris, C.A. & Winberg, S. (1999) Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain, Behavior and Evolution*, **54**, 263–275.
- Palm, H.W., Knaus, U., Appelbaum, S., Strauch, S.M. & Kotzen, B. (2019) Coupled aquaponics systems. Pp. 163–199 in: *Aquaponics Food Production Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Parata, L., Mazumder, D., Sammut, J. & Egan, S. (2020) Diet type influences the gut microbiome and nutrient assimilation of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLOS ONE*, **15**, e0237775.
- Park, M., Shin, S.K., Do, Y.H., Yarish, C. & Kim, J.K. (2018) Application of open water integrated multi-trophic aquaculture to intensive monoculture: A review of the current status and challenges in Korea. *Aquaculture*, **497**, 174–183. Elsevier.
- Parrott, J.L., Restivo, V.E., Kidd, K.A., Zhu, J., Shires, K., Clarence, S., Khan, H., Sullivan, C., Pacepavicius, G. & Alaei, M. (2022) Chronic embryo-larval exposure of fathead minnows to the pharmaceutical drug metformin: survival, growth, and microbiome responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **41**, 635–647.

- Pérez-Casanova, J.C., Afonso, L.O.B., Johnson, S.C., Currie, S. & Gamperl, A.K. (2008) The stress and metabolic responses of juvenile atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. *Journal of Fish Biology*, **72**, 899–916.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G. (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, **7**, 253–258.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., Tomaro-Duchesneau, C., Tomaro-Duchesneau, C., Coussa-Charley & Rodes. (2011) Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets and Therapy*, 71.
- Prunet, P. & Auperin, B. (2007) Bien-être chez les poissons d'élevage. *Inra, Productions Animales*, **20**, 35–40.
- Ramakrishna, S. (2021) Circular economy and sustainability pathways to build a new-modern society. *Drying Technology*, **39**, 711–712.
- Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A. & Romero, J. (2018) *Cetobacterium* is a major component of the microbiome of giant amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. *Animals*, **8**, 189.
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P. & Jackson, R. (2012) La structure et la fonction chez les Animaux: principes fondamentaux. Pp. 989–1015 in: *Campbell Biologie*. 4ème édition. Pearson Education.
- van Rijn, J., Tal, Y. & Schreier, H.J. (2006) Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquacultural Engineering*, **34**, 364–376.
- Rivas, A.J., Balado, M., Lemos, M.L. & Osorio, C.R. (2011) The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, **79**, 4617–4627.
- Rivas, A.J., Balado, M., Lemos, M.L. & Osorio, C.R. (2013) Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, **81**, 3287–3299.
- Romano, N. & Zeng, C. (2013) Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, **21**, 1–21.

- Romero, J. & Navarrete, P. (2006) 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, **51**, 422–430.
- Romero, L.M. & Butler, L.K. (2007) *Endocrinology of stress*. 89–95 pp.
- Romero, L.M. & Reed, J.M. (2005) Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **140**, 73–79.
- Rosenberg, E. & Zilber-Rosenberg, I. (2018) The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, **6**, 78.
- Rougeot, C. (2015) Sex and ploidy manipulation in percid fishes. Pp. 625–634 in: *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Rożyński, M., Ziomek, E., Demska-Zakęś, K., Kowalska, A. & Zakęś, Z. (2016) Propiscin — a safe anaesthetic for pikeperch (*Sander Lucioperca* L.). *Acta Veterinaria Hungarica*, **64**, 415–424.
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N. & Urrutia, H. (2019) Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, raq.12392.
- Sadoul, B. & Geffroy, B. (2019) Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, **94**, 540–555.
- Sahu, S., Das, B.K., Mishra, B.K., Pradhan, J. & Sarangi, N. (2007) Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, **23**, 80–86.
- Salvucci, E. (2014) Microbiome, holobiont and the net of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–10.
- Sampaio, F.D.F. & Freire, C.A. (2016) An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries*, **17**, 1055–1072.

- Sanchez, L.M., Wong, W.R., Riener, R.M., Schulze, C.J. & Linington, R.G. (2012) Examining the fish microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products. *PLoS ONE*, **7**, e35398.
- Schram, E., Roques, J.A.C., van Kuijk, T., Abbink, W., van de Heul, J., de Vries, P., Bierman, S., van de Vis, H. & Flik, G. (2014) The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, **420–421**, 95–104.
- Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, **36**, 241–263.
- Schultz, W. (2006) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual Review of Psychology*, **57**, 87–115.
- Smith, C.C., Snowberg, L.K., Gregory Caporaso, J., Knight, R. & Bolnick, D.I. (2015) Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *The ISME Journal*, **9**, 2515–2526.
- Sneddon, L.U. (2020) Can fish experience pain? Pp. 229–249 in: *The Welfare of Fish*.
- Song, J. & Kim, J. (2016) Degeneration of dopaminergic neurons due to metabolic alterations and Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **8**.
- Sopinka, N.M., Donaldson, M.R., O'Connor, C.M., Suski, C.D. & Cooke, S.J. (2016) Stress indicators in fish. Pp. 405–462 in: *Fish Physiology*. Elsevier Inc.
- Stahel, W.R. (2016) The circular economy. *Nature*, **531**, 435–438.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B. & Sörlin, S. (2015) Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet. *Science*, **347**.
- Steinberg, K., Zimmermann, J., Stiller, K.T., Nwana, L., Meyer, S. & Schulz, C. (2018) Elevated nitrate levels affect the energy metabolism of pikeperch (*Sander lucioperca*) in RAS. *Aquaculture*, **497**, 405–413. Elsevier.
- Sugita, H., Miyajima, C. & Deguchi, Y. (1991) The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, **92**, 267–276.

- Surmeier, D.J. (2018) Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *The FEBS Journal*, **285**, 3657–3668.
- Swirplies, F., Wuertz, S., Baßmann, B., Orban, A., Schäfer, N., Brunner, R.M., Hadlich, F., Goldammer, T. & Rebl, A. (2019) Identification of molecular stress indicators in pikeperch *Sander lucioperca* correlating with rising water temperatures. *Aquaculture*, **501**, 260–271.
- Szkudlarek, M. & Zakęś, Z. (2007) Effect of stocking density on survival and growth performance of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), larvae under controlled conditions. *Aquaculture International*, **15**, 67–81.
- Tacon, A.G.J. (2020) Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, **28**, 43–56.
- Tang, W.H.W., Kitai, T. & Hazen, S.L. (2017) Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation Research*, **120**, 1183–1196.
- Tarnecki, A.M., Burgos, F.A., Ray, C.L. & Arias, C.R. (2017) Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *Journal of Applied Microbiology*, **123**, 2–17.
- Thörnqvist, P.-O., McCarrick, S., Ericsson, M., Roman, E. & Winberg, S. (2019) Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. *Behavioural Brain Research*, **359**, 927–934.
- Toni, M., Manciocco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C. & Malavasi, S. (2019) Review: assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on european directives. *Animal*, **13**, 161–170.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 1366–1375.
- Tsuchiya, C., Sakata, T. & Sugita, H. (2007) Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, **0**, 071018031740002-???
- Turner, J.W., Cheng, X., Saferin, N., Yeo, J.-Y., Yang, T. & Joe, B. (2022) Gut microbiota of wild fish as reporters of compromised aquatic environments sleuthed through machine learning. *Physiological Genomics*, **54**, 177–185.

- Vallone, D., Picetti, R. & Borrelli, E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **24**, 125–132.
- Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijó, S., León-Rubio, J.M., García-Millán, I., Martín del Río, M.P., Moriñigo, M.A. & Mancera, J.M. (2010) Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, **309**, 265–271.
- Vasemägi, A., Visse, M. & Kisand, V. (2017) Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. *mSphere*, **2**.
- Vasudeva Rao, Y., Das, B.K., Jyotirmayee, P. & Chakrabarti, R. (2006) Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 263–273.
- Verburg-Van Kemenade, B.M.L., Stolte, E.H., Metz, J.R. & Chadzinska, M. (2009) Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. Pp. 313–364 in.:
- Wang, N., Xu, X. & Kestemont, P. (2009) Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, **289**, 70–73.
- Wang, X., Xu, L., Cao, H., Wang, J. & Wang, S. (2013) Identification and drug sensitivity of a *Plesiomonas shigelloides* isolated from diseased sturgeons. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, **53**, 723–9.
- Ward, N.L., Steven, B., Penn, K., Methé, B.A. & Detrich, W.H. (2009) Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles*, **13**, 679–685.
- Webb, M.A.H. & Doroshov, S.I. (2011) Importance of environmental endocrinology in fisheries management and aquaculture of sturgeons. *General and Comparative Endocrinology*, **170**, 313–321. Elsevier Inc.
- Wongkiew, S., Hu, Z., Chandran, K., Lee, J.W. & Khanal, S.K. (2017) Nitrogen transformations in aquaponic systems: a review. *Aquacultural Engineering*, **76**, 9–19.

- Yan, Q., Li, J., Yu, Y., Wang, J., He, Z., van Nostrand, J.D., Kempfer, M.L., Wu, L., Wang, Y., Liao, L., Li, X., Wu, S., Ni, J., Wang, C. & Zhou, J. (2016) Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environmental Microbiology*, **18**, 4739–4754.
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B.A. & Arockiaraj, J. (2020) Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, raq.12416.
- Zha, Y., Eiler, A., Johansson, F. & Svanbäck, R. (2018) Effects of predation stress and food ration on perch gut microbiota. *Microbiome*, **6**, 28.

7 ANNEXES

7.1 CORTISOL ELISA

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **20 µL** de chaque *Standard*, *Control* et *échantillons*, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **200 µL** d'**Enzyme Conjugate** dans chaque puits. Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **60 minutes à température ambiante**.
5. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 3 fois avec de la **Wash Solution** diluée (**400 µL** par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

Remarque importante : la sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !

6. Ajouter **100 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
7. Incuber pendant **15 minutes à température ambiante**.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
9. Lire la densité optique à **450 ± 10 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques dans les **10 minutes** après avoir ajouté la Stop Solution.

7.2 DOSAGE DE LA SÉROTONINE ET DOPAMINE

7.2.1 Préparation des échantillons

Afin de doser la sérotonine et dopamine chez le sandre, sept individus ont été prélevés dans les bassins B1, B3 et B5. Ceux-ci ont alors été anesthésiés et euthanasiés afin de pouvoir prélever leur cerveau. Ces derniers ont alors été congelés à -80°C . Pour préparer les échantillons, ceux-ci sont pesés et homogénéisés par un potter dans un volume dix fois supérieur d'une solution (Tris.HCl 25mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM à pH 7). En tout, deux millilitres d'homogénat sont conservé pour la suite de la méthode qui consiste à réaliser une centrifugation (11.000 g, 4°C , 30 minutes) pour ne garder que le surnageant. La moitié de ce dernier est filtré et sera utilisé pour le dosage de la sérotonine. L'autre moitié a à nouveau été centrifugée (14.000 rpm, 4°C , 3 minutes) pour récupérer le surnageant permettant le dosage de la dopamine. Les tubes ont été conservés à -80°C .

7.2.2 Serotonin FAST ELISA

Préparation des échantillons et acylation du sérum, de l'urine et des plaquettes.

1. Déposer **25 µL** de chaque **Standard, Control** et **échantillons**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les tubes de réaction appropriés.
2. Ajouter **500 µL** d'**Acylation Buffer** dans chaque tube.
3. Ajouter **25 µL** d'**Acylation Reagent** dans chaque tube.
4. Mélanger et incuber pendant **15 minutes à température ambiante** (20 – 25°C).

Serotonin ELISA

5. Déposer **25 µL** de chaque **Standard, Control** et **échantillons** acétylés dans les puits appropriés de la **Serotonin Microtiter Strips**.
6. Déposer **100 µL** de **Serotonin Antiserum** dans chaque puits.
7. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
8. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
9. Déposer **100 µL** de **Conjugate** dans chaque puits.
10. Incuber pendant **15 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
11. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
12. Déposer **100 µL** de **Substrate** dans chaque puits.
13. Incuber pendant **15 ± 2 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
Éviter l'exposition directe à la lumière du soleil !
14. Déposer **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits et agiter la plaque pour assurer une distribution homogène de la solution.
15. Lire la densité optique à **450 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques dans les **10 minutes** après avoir ajouté la Stop Solution.

7.2.3 Serotonin Research ELISA

Acylation

1. Déposer **100 µL** des dilutions de chaque **Standard, Control** et **échantillons** dans les puits appropriés de l'**Acylation Plate**.
2. Ajouter du diluant dans les tubes contenant les échantillons pour obtenir un **volume final** de **100 µL**.
3. Déposer **25 µL** d'**Acylation Buffer** dans chaque puits.
4. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).

Serotonin ELISA

5. Déposer **100 µL** de chaque **Standard, Control** et **échantillons** acétylés dans les puits appropriés de la **Serotonin/5-HIAA Microtiter Strips**.
6. Déposer **25 µL** de **Serotonin Antiserum** dans chaque puits.
7. Couvrir la plaque avec une feuille adhésive et incuber pendant **15 à 20 heures (2 – 8°C)**.
8. Retirer l'adhésif. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
9. Déposer **100 µL** d'**Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
10. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
11. Retirer l'adhésif. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
12. Déposer **100 µL** de **Substrate** dans tous les puits et incuber pendant **20 à 30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
Eviter l'exposition directe à la lumière du soleil !
13. Ajouter **100 µL** de **Stop Solution** dans chaque puits et agiter la plaque pour assurer une distribution homogène de la solution.
14. Lire la densité optique à **450 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques dans les **10 minutes** après avoir ajouté la Stop Solution.

7.2.4 Dopamine ELISA

Préparation des échantillons, extraction et acylation

1. Déposer **10 µL** de chaque **Standard, Control** et **300 µL** de chaque **échantillon** dans les puits désignés de l'**Extraction Plate**.
2. Ajouter **250 µL** d'eau distillée dans les puits contenant les standards et les contrôles.
3. Déposer **50 µL** d'**Assay Buffer** dans chaque puits.
4. Déposer **50 µL** d'**Extraction Buffer** dans chaque puits.
5. Couvrir la plaque d'une feuille adhésive et incubé **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
6. Retirer l'adhésif, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant.
7. Ajouter **1 mL** de **Wash Buffer** dans chaque puits. Incuber **5 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**). Jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **deux fois**.
8. Déposer **150 µL** d'**Acylation Buffer** dans chaque puits.
9. Déposer **25 µL** d'**Acylation Reagent** dans chaque puits.
10. Incuber pendant **15 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
11. Jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant.
12. Ajouter **1 mL** de **Wash Buffer** dans chaque puits. Incuber **10 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**). Jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant.
13. Déposer **175 µL** d'**HCl** dans chaque puits.
14. Couvrir la plaque d'une feuille adhésive et incubé **10 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).

Dopamine ELISA

15. Déposer **25 µL** d'**Enzyme Solution** dans les puits de la **Dopamine Microtiter Strips**.
16. Déposer **25 µL** des extraits de chaque **Standard** et **Control** et **50 µL** de chaque échantillon dans les puits appropriés.
17. Ajouter **25 µL** d'**HCl** à chaque Standard et Control.
18. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
19. Déposer **50 µL** de **Dopamine Antiserum** dans chaque puits et couvrir la plaque d'une feuille adhésive.
20. Incuber pendant **2 heures à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).

21. Retirer l'adhésif et jeter le contenu de la plaque. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
22. Déposer **100 µL** d'**Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
23. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
24. Retirer l'adhésif et jeter le contenu de la plaque. Laver la plaque en ajoutant **300 µL** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **trois fois**.
25. Déposer **100 µL** de **Substrate** dans les puits et **incuber pendant 25 ± 5 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
Eviter l'exposition directe à la lumière du soleil !
26. Ajouter **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits et agiter la plaque pour assurer une distribution homogène de la solution.
27. Lire la densité optique à **450 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques dans les **10 minutes** après avoir ajouté la Stop Solution.

7.2.5 Dopamine Research ELISA

Extraction et acylation

1. Déposer **10 µL** de chaque **Standard** et **Control** et **100 µL** de chaque **échantillon**.
2. Ajouter de l'eau distillée pour atteindre 100 µL dans chaque puits.
3. Déposer **25 µL** de **TE Buffer** dans chaque puits.
4. Couvrir la plaque d'une feuille adhésive. Incuber pendant **60 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
5. Retirer l'adhésif, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant.
6. Ajouter **1 mL** de **Wash Buffer** dans chaque puits. Incuber **5 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**). Jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **deux fois**.
7. Déposer **150 µL** d'**Acylation Buffer** dans chaque puits.
8. Déposer **25 µL** d'**Acylation Reagent** dans chaque puits.
9. Incuber pendant **20 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
10. Retirer l'adhésif, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant.

11. Ajouter **1 mL** de **Wash Buffer** dans chaque puits. Incuber **5 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**). Jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **deux fois**.
12. Déposer **100 μ L** d'**HCl** dans chaque puits.
13. Couvrir la plaque d'une feuille adhésive. Incuber pendant **10 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
Le surnageant est à conserver pour la suite !

Conversion enzymatique

14. Déposer **90 μ L** des extractions de chaque **Standard, Control** et des **échantillons** dans les puits correspondants de la **Microtiter Plate**.
15. Ajouter **25 μ L** d'**Enzyme Solution** dans chaque puits.
16. Couvrir la plaque d'une feuille adhésive. Incuber la plaque pendant **1 minute à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
17. Incuber pendant **2 heures à 37°C**.

Dopamine ELISA

18. Transférer **100 μ L** de chaque **Standard, Control** et **échantillons** de l'**Enzyme Plate** dans les puits correspondants de la **Dopamine Microtiter Strips**.
19. Déposer **50 μ L** de **Dopamine Antiserum** dans chaque puits.
20. Couvrir la plaque avec une feuille adhésive et incubé pendant **1 minute à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
21. Incuber pendant **15 à 20 heures (2 – 8°C)**.
22. Retirer l'adhésif. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 μ L** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **quatre fois**.
23. Déposer **100 μ L** d'**Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
24. Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
25. Retirer l'adhésif. Jeter ou aspirer le contenu de chaque puit. Laver la plaque en ajoutant **300 μ L** de **Wash Buffer**, jeter le contenu et sécher les puits en tapant la plaque inversée sur du papier absorbant. Le lavage est effectué **quatre fois**.
26. Déposer **100 μ L** de **Substrate** dans tous les puits et incubé pendant **20 à 30 minutes à température ambiante** sur un agitateur (\pm **600 rpm**).
Eviter l'exposition directe à la lumière du soleil !

27. Ajouter **100 µL** de **Stop Solution** dans chaque puits et agiter la plaque pour assurer une distribution homogène de la solution.
28. Lire la densité optique à **450 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques dans les **10 minutes** après avoir ajouté la Stop Solution.

7.3 PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN

Protocole pour l'extraction d'ADN génomique de fèces

- Ajouter **1 mL** de **TE Buffer** (10 mM Tris/Cl ; 1 mM EDTA, pH 8) dans l'échantillon de fèces.
- Centrifuger à **4 000 g** pendant **15 minutes**. Jeter le surnageant.
- Ajouter **0,2 à 1 mL** de **Buffer T1**. Ajouter le buffer jusqu'à bonne suspension de l'échantillon.
- Transférer **200 µL** dans un nouveau tube de centrifugation.

Protocole standard pour les tissus humains et animaux et pour les cellules en culture

- Ajouter **25 µL** de **Proteinase K**. Mélanger au vortex.
- Incuber à **56 °C** jusqu'à lyse complète (\pm 2h30).
- Ajouter **20 µL** de **RNase A** et incuber à **température ambiante** pendant **5 minutes**.
- Mélanger au vortex. Ajouter **200 µL** de **Buffer B3**, mélanger et incuber à **70 °C** pendant **10 minutes**.
- Ajouter **210 µL** d'**éthanol** (96 – 100 %) et mélanger au vortex.
- Transférer l'échantillon dans une colonne NucleoSpin placée dans un tube collecteur.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute**. Jeter le liquide du tube collecteur.
- Ajouter **500 µL** de **Buffer BW**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute**. Jeter le liquide du tube collecteur.
- Ajouter **600 µL** de **Buffer B5**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute**. Jeter le liquide du tube collecteur.
- Centrifuger la colonne à **11 000 g** pendant **1 minute**.
- Placer la colonne NucleoSpin dans un nouveau tube (1,5 mL) et ajouter **100 µL** de **Buffer BE**.
- Incuber à **température ambiante** pendant **1 minute**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute**.

TABLE D'ALIMENTATION

Poids vif (g)		Aliment	P	L	Diamètre		Taux de rationnement (% de la biomasse/ jour) suivant les T°C												
De	A				N°	(mm)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<0,1		NEO SUPRA	58	13	AL00	< 0,15	Ad libitum												
					AL0	0,15-0,4	Ad libitum												
0,1	0,5				AL1	0,4-0,7	3,21	3,49	3,80	4,11	4,41	4,74	5,05	5,44	5,53	4,93	3,90	2,74	1,88
0,5	1,5				AL2	0,7-1	2,74	2,98	3,27	3,55	3,84	4,08	4,37	4,66	4,79	4,23	3,46	2,66	1,87
1,5	2,5				AL3	1,2	2,42	2,62	2,87	3,13	3,39	3,58	3,82	4,00	4,11	3,68	3,11	2,50	1,87
2,5	5	AL4	1,4	2,02	2,21	2,39	2,58	2,76	2,94	3,13	3,26	3,33	3,17	2,74	2,29	1,82			
5	10	PERCID STARTER	55	12	1	1,7	1,65	1,74	1,84	1,95	2,05	2,15	2,24	2,31	2,38	2,38	2,32	2,11	1,77
10	15				2	2,5	1,54	1,64	1,74	1,84	1,93	2,02	2,09	2,15	2,21	2,21	2,16	1,98	1,72
15	20				2	2,5	1,49	1,59	1,69	1,78	1,88	1,95	2,03	2,07	2,11	2,10	2,06	1,90	1,67
20	50				3	3,2	1,43	1,54	1,64	1,73	1,82	1,89	1,96	2,00	2,01	1,99	1,95	1,82	1,61
50	100				3	3,2	1,38	1,48	1,58	1,67	1,76	1,82	1,89	1,92	1,93	1,91	1,87	1,76	1,56
100	150	PERCID GROWER	52	15	4	4	0,96	1,06	1,17	1,28	1,39	1,50	1,61	1,69	1,76	1,77	1,78	1,64	1,51
150	200				4	4	0,76	0,85	0,93	1,02	1,11	1,19	1,28	1,34	1,41	1,41	1,41	1,31	1,20
200	300				5	5,5	0,67	0,74	0,81	0,89	0,97	1,05	1,12	1,18	1,23	1,24	1,24	1,15	1,05
300	400				5	5,5	0,58	0,65	0,71	0,78	0,85	0,92	0,98	1,03	1,07	1,08	1,08	1,01	0,93
400	500				5	5,5	0,50	0,55	0,61	0,68	0,74	0,80	0,85	0,89	0,93	0,94	0,94	0,88	0,81
500	600	PERCID FINISHER	50	17	7	7,5	0,44	0,48	0,53	0,58	0,63	0,68	0,73	0,77	0,80	0,81	0,81	0,75	0,69
600	800				7	7,5	0,36	0,40	0,44	0,48	0,52	0,56	0,60	0,63	0,66	0,66	0,67	0,62	0,56
800	1 000				9	9,5	0,29	0,33	0,36	0,39	0,43	0,46	0,49	0,52	0,54	0,54	0,55	0,50	0,46

Fig A0 : Table d'alimentation de l'aliment pour sandre *Le Gouessant Percid*.

7.4 MULTIQC

7.4.1 Statistiques générales

Le tableau suivant reprend les statistiques de l'analyse préliminaire de l'analyse MultiQC. Le tableau reprend le pourcentage de duplication (% Dups), le pourcentage en nucléotides GC (%GC), la longueur des reads en paires de bases (Length) et le nombre de séquences en millions (M Seqs). Les annexes 7.4.1 à 7.4.10 représentent le contrôle qualité des séquences brutes.

Sample Name	% Dups	% GC	Length	M Seqs
1-B1-1-NGS22-X222_S21_L001_R1_001	9.8%	53%	298 bp	0.0
1-B1-1-NGS22-X222_S21_L001_R2_001	15.9%	54%	298 bp	0.0
10-B3-6-NGS22-X231_S30_L001_R1_001	1.7%	49%	279 bp	0.0
10-B3-6-NGS22-X231_S30_L001_R2_001	2.1%	47%	282 bp	0.0
11-B3-7-NGS22-X232_S31_L001_R1_001	11.7%	53%	300 bp	0.0
11-B3-7-NGS22-X232_S31_L001_R2_001	17.1%	54%	300 bp	0.0
12-B5-1-NGS22-X233_S32_L001_R1_001	34.2%	53%	301 bp	0.1
12-B5-1-NGS22-X233_S32_L001_R2_001	47.8%	54%	301 bp	0.1
13-B5-7-NGS22-X234_S33_L001_R1_001	12.2%	53%	299 bp	0.0
13-B5-7-NGS22-X234_S33_L001_R2_001	17.9%	54%	300 bp	0.0
14-B5-4-NGS22-X235_S34_L001_R1_001	8.4%	53%	296 bp	0.0
14-B5-4-NGS22-X235_S34_L001_R2_001	11.7%	53%	297 bp	0.0
15-B5-5-NGS22-X236_S35_L001_R1_001	15.4%	52%	294 bp	0.1
15-B5-5-NGS22-X236_S35_L001_R2_001	23.4%	53%	294 bp	0.1
16-B5-6-NGS22-X237_S36_L001_R1_001	11.4%	53%	298 bp	0.0
16-B5-6-NGS22-X237_S36_L001_R2_001	17.0%	54%	298 bp	0.0
17-T0-1-1-NGS22-X238_S37_L001_R1_001	10.7%	54%	298 bp	0.0
17-T0-1-1-NGS22-X238_S37_L001_R2_001	17.5%	54%	299 bp	0.0
18-T0-1-3-NGS22-X239_S38_L001_R1_001	0.8%	52%	270 bp	0.0
18-T0-1-3-NGS22-X239_S38_L001_R2_001	1.9%	51%	273 bp	0.0
19-T0-1-4-NGS22-X240_S39_L001_R1_001	6.0%	52%	281 bp	0.1
19-T0-1-4-NGS22-X240_S39_L001_R2_001	9.3%	51%	282 bp	0.1
2-B1-2-NGS22-X223_S22_L001_R1_001	13.2%	53%	301 bp	0.0
2-B1-2-NGS22-X223_S22_L001_R2_001	20.4%	54%	301 bp	0.0
20-T0-1-5-NGS22-X241_S40_L001_R1_001	13.5%	54%	300 bp	0.0
20-T0-1-5-NGS22-X241_S40_L001_R2_001	20.6%	54%	300 bp	0.0
21-T0-2-1-NGS22-X242_S41_L001_R1_001	7.6%	51%	300 bp	0.0
21-T0-2-1-NGS22-X242_S41_L001_R2_001	22.6%	51%	300 bp	0.0
22-T0-2-3-NGS22-X243_S42_L001_R1_001	5.5%	52%	300 bp	0.0

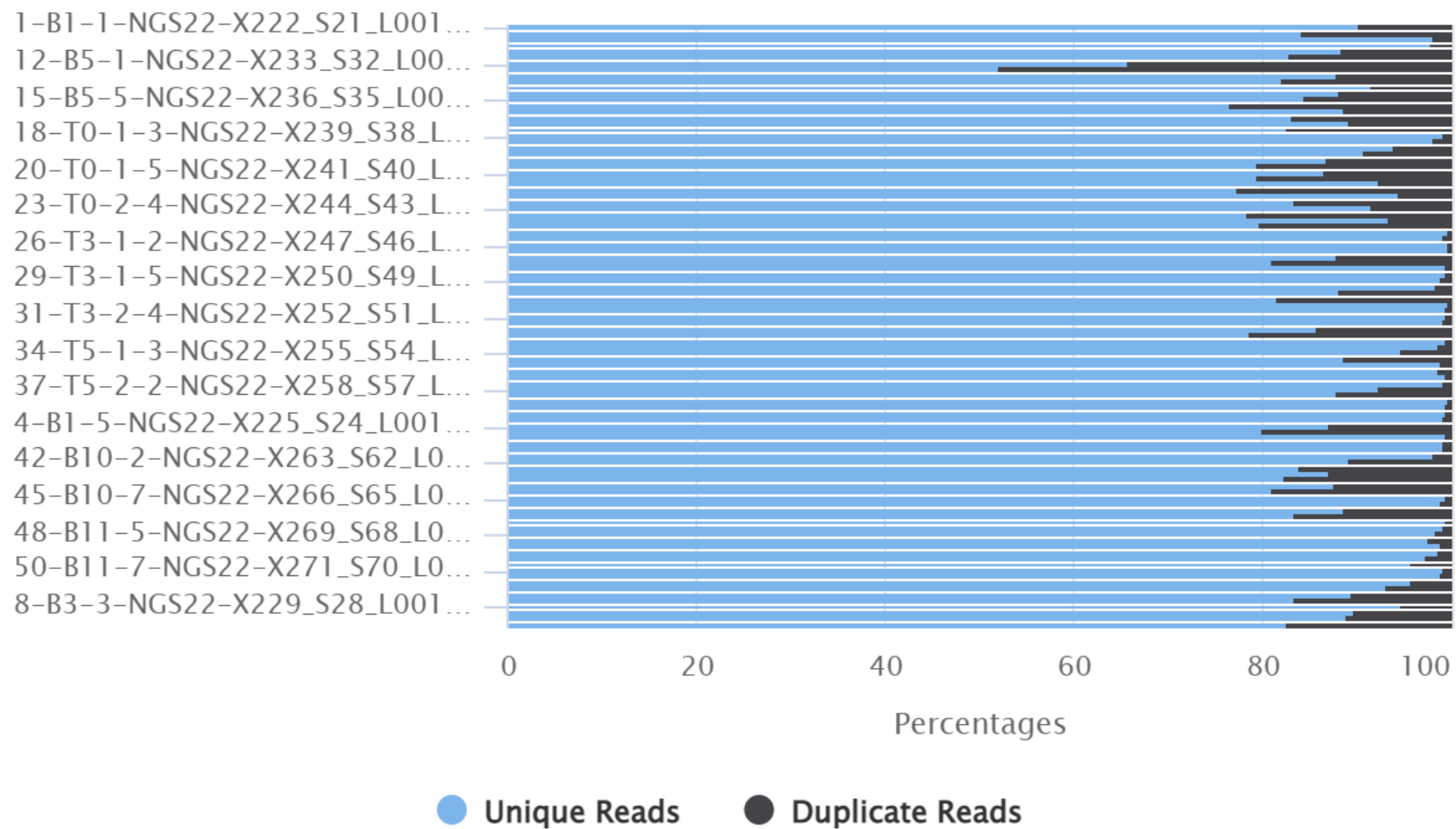
22-T0-2-3-NGS22-X243_S42_L001_R2_001	16.5%	52%	300 bp	0.0
23-T0-2-4-NGS22-X244_S43_L001_R1_00	8.4%	49%	300 bp	0.0
23-T0-2-4-NGS22-X244_S43_L001_R2_001	21.5%	49%	300 bp	0.0
24-T0-2-5-NGS22-X245_S44_L001_R1_001	6.5%	51%	301 bp	0.0
24-T0-2-5-NGS22-X245_S44_L001_R2_001	20.3%	51%	301 bp	0.0
25-T3-1-1-NGS22-X246_S45_L001_R1_001	0.3%	52%	260 bp	0.0
25-T3-1-1-NGS22-X246_S45_L001_R2_001	0.7%	52%	263 bp	0.0
26-T3-1-2-NGS22-X247_S46_L001_R1_001	0.4%	48%	278 bp	0.0
26-T3-1-2-NGS22-X247_S46_L001_R2_001	0.3%	46%	284 bp	0.0
27-T3-1-3-NGS22-X248_S47_L001_R1_001	12.1%	54%	294 bp	0.0
27-T3-1-3-NGS22-X248_S47_L001_R2_001	18.8%	54%	295 bp	0.0
28-T3-1-4-NGS22-X249_S48_L001_R1_001	0.5%	48%	273 bp	0.0
28-T3-1-4-NGS22-X249_S48_L001_R2_001	0.6%	47%	278 bp	0.0
29-T3-1-5-NGS22-X250_S49_L001_R1_001	1.1%	49%	279 bp	0.0
29-T3-1-5-NGS22-X250_S49_L001_R2_001	1.5%	47%	282 bp	0.0
3-B1-3-NGS22-X224_S23_L001_R1_001	11.9%	53%	300 bp	0.0
3-B1-3-NGS22-X224_S23_L001_R2_001	18.4%	54%	300 bp	0.0
30-T3-2-2-NGS22-X251_S50_L001_R1_001	0.2%	51%	259 bp	0.0
30-T3-2-2-NGS22-X251_S50_L001_R2_001	0.4%	51%	263 bp	0.0
31-T3-2-4-NGS22-X252_S51_L001_R1_001	0.6%	49%	277 bp	0.0
31-T3-2-4-NGS22-X252_S51_L001_R2_001	0.8%	47%	279 bp	0.0
32-T3-2-5-NGS22-X253_S52_L001_R1_001	14.1%	54%	301 bp	0.0
32-T3-2-5-NGS22-X253_S52_L001_R2_001	21.4%	54%	301 bp	0.0
33-T5-1-1-NGS22-X254_S53_L001_R1_001	0.6%	49%	276 bp	0.0
33-T5-1-1-NGS22-X254_S53_L001_R2_001	1.4%	48%	279 bp	0.0
34-T5-1-3-NGS22-X255_S54_L001_R1_001	5.3%	53%	301 bp	0.0
34-T5-1-3-NGS22-X255_S54_L001_R2_001	11.4%	53%	301 bp	0.0
35-T5-1-4-NGS22-X256_S55_L001_R1_001	1.0%	49%	273 bp	0.1
35-T5-1-4-NGS22-X256_S55_L001_R2_001	1.4%	48%	276 bp	0.1
36-T5-2-1-NGS22-X257_S56_L001_R1_001	0.4%	49%	262 bp	0.0

36-T5-2-1-NGS22-X257_S56_L001_R2_001	0.7%	48%	264 bp	0.0
37-T5-2-2-NGS22-X258_S57_L001_R1_001	7.6%	53%	282 bp	0.0
37-T5-2-2-NGS22-X258_S57_L001_R2_001	12.0%	53%	284 bp	0.0
38-T5-2-3-NGS22-X259_S58_L001_R1_001	0.4%	48%	277 bp	0.0
38-T5-2-3-NGS22-X259_S58_L001_R2_001	0.5%	47%	278 bp	0.0
39-T5-2-4-NGS22-X260_S59_L001_R1_001	0.6%	49%	260 bp	0.0
39-T5-2-4-NGS22-X260_S59_L001_R2_001	0.8%	48%	264 bp	0.0
4-B1-5-NGS22-X225_S24_L001_R1_001	12.8%	53%	291 bp	0.1
4-B1-5-NGS22-X225_S24_L001_R2_001	20.0%	53%	291 bp	0.1
40-T5-2-5-NGS22-X261_S60_L001_R1_001	0.6%	48%	269 bp	0.0
40-T5-2-5-NGS22-X261_S60_L001_R2_001	0.9%	47%	272 bp	0.0
41-B10-1-NGS22-X262_S61_L001_R1_001	0.9%	47%	264 bp	0.1
41-B10-1-NGS22-X262_S61_L001_R2_001	1.8%	46%	267 bp	0.1
42-B10-2-NGS22-X263_S62_L001_R1_001	10.7%	54%	300 bp	0.0
42-B10-2-NGS22-X263_S62_L001_R2_001	16.1%	54%	300 bp	0.0
43-B10-4-NGS22-X264_S63_L001_R1_001	12.8%	54%	291 bp	0.1
43-B10-4-NGS22-X264_S63_L001_R2_001	17.5%	53%	291 bp	0.1
44-B10-6-NGS22-X265_S64_L001_R1_001	12.5%	53%	293 bp	0.1
44-B10-6-NGS22-X265_S64_L001_R2_001	19.0%	53%	294 bp	0.1
45-B10-7-NGS22-X266_S65_L001_R1_001	0.6%	48%	278 bp	0.0
45-B10-7-NGS22-X266_S65_L001_R2_001	1.0%	47%	280 bp	0.0
46-B11-2-NGS22-X267_S66_L001_R1_001	11.3%	54%	300 bp	0.0
46-B11-2-NGS22-X267_S66_L001_R2_001	16.5%	54%	300 bp	0.0
47-B11-3-NGS22-X268_S67_L001_R1_001	0.5%	48%	271 bp	0.0
47-B11-3-NGS22-X268_S67_L001_R2_001	0.8%	47%	274 bp	0.0
48-B11-5-NGS22-X269_S68_L001_R1_001	1.6%	49%	274 bp	0.1
48-B11-5-NGS22-X269_S68_L001_R2_001	2.3%	48%	276 bp	0.1
49-B11-6-NGS22-X270_S69_L001_R1_001	1.2%	47%	274 bp	0.0
49-B11-6-NGS22-X270_S69_L001_R2_001	1.4%	46%	276 bp	0.0
5-B1-7-NGS22-X226_S25_L001_R1_001	2.6%	50%	275 bp	0.0

5-B1-7-NGS22-X226_S25_L001_R2_001	4.2%	50%	277 bp	0.0
50-B11-7-NGS22-X271_S70_L001_R1_001	0.8%	48%	275 bp	0.0
50-B11-7-NGS22-X271_S70_L001_R2_001	1.0%	46%	277 bp	0.0
6-B3-1-NGS22-X227_S26_L001_R1_001	4.3%	53%	285 bp	0.0
6-B3-1-NGS22-X227_S26_L001_R2_001	6.9%	54%	286 bp	0.0
7-B3-2-NGS22-X228_S27_L001_R1_001	10.6%	53%	297 bp	0.0
7-B3-2-NGS22-X228_S27_L001_R2_001	16.7%	54%	297 bp	0.0
8-B3-3-NGS22-X229_S28_L001_R1_001	5.2%	52%	288 bp	0.0
8-B3-3-NGS22-X229_S28_L001_R2_001	10.2%	52%	289 bp	0.0
9-B3-4-NGS22-X230_S29_L001_R1_001	10.9%	53%	301 bp	0.0
9-B3-4-NGS22-X230_S29_L001_R2_001	17.2%	54%	301 bp	0.0

7.4.2 Nombre de séquences

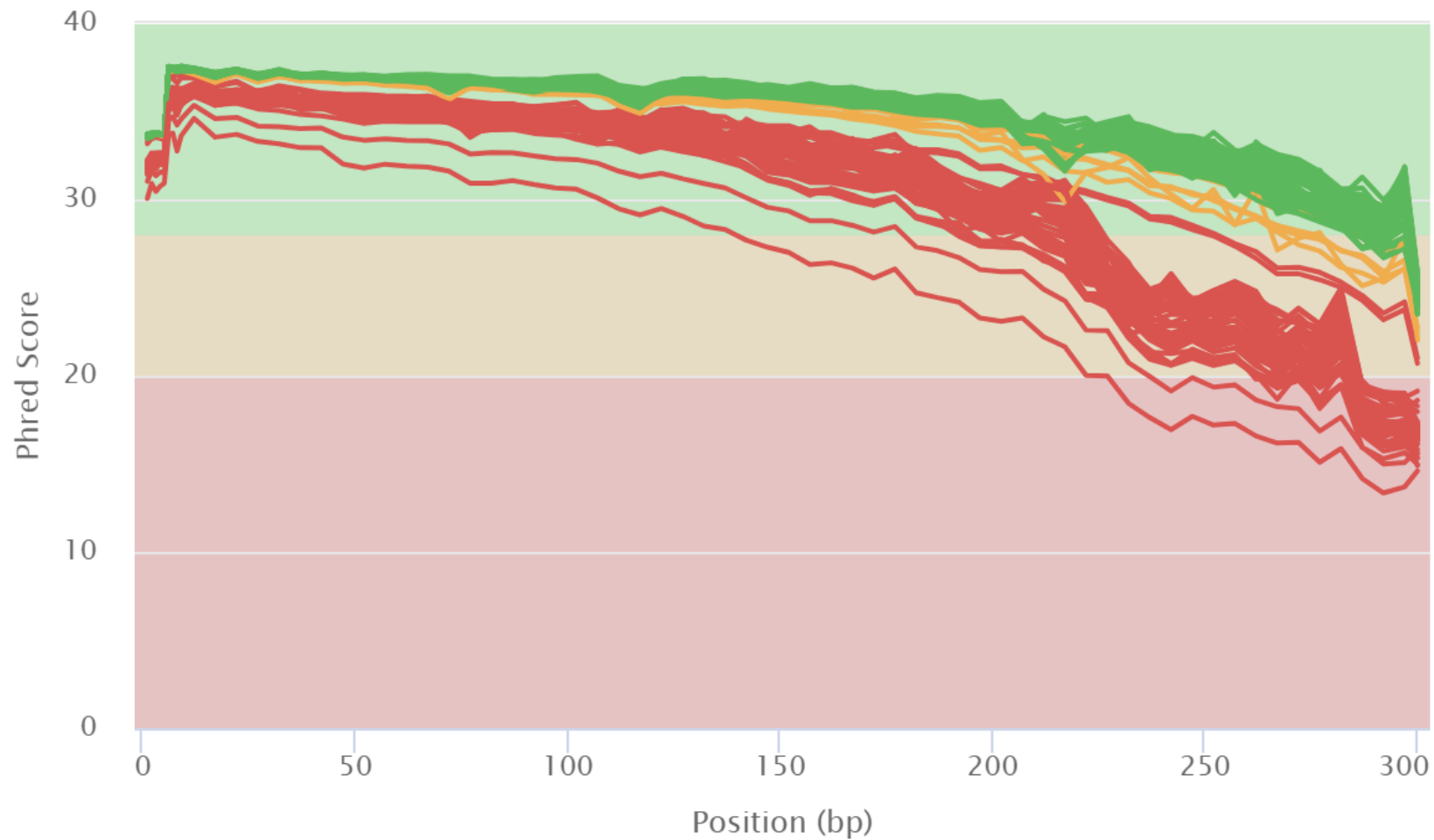
FastQC: Sequence Counts



Created with MultiQC

7.4.3 Histogramme de qualité de séquences

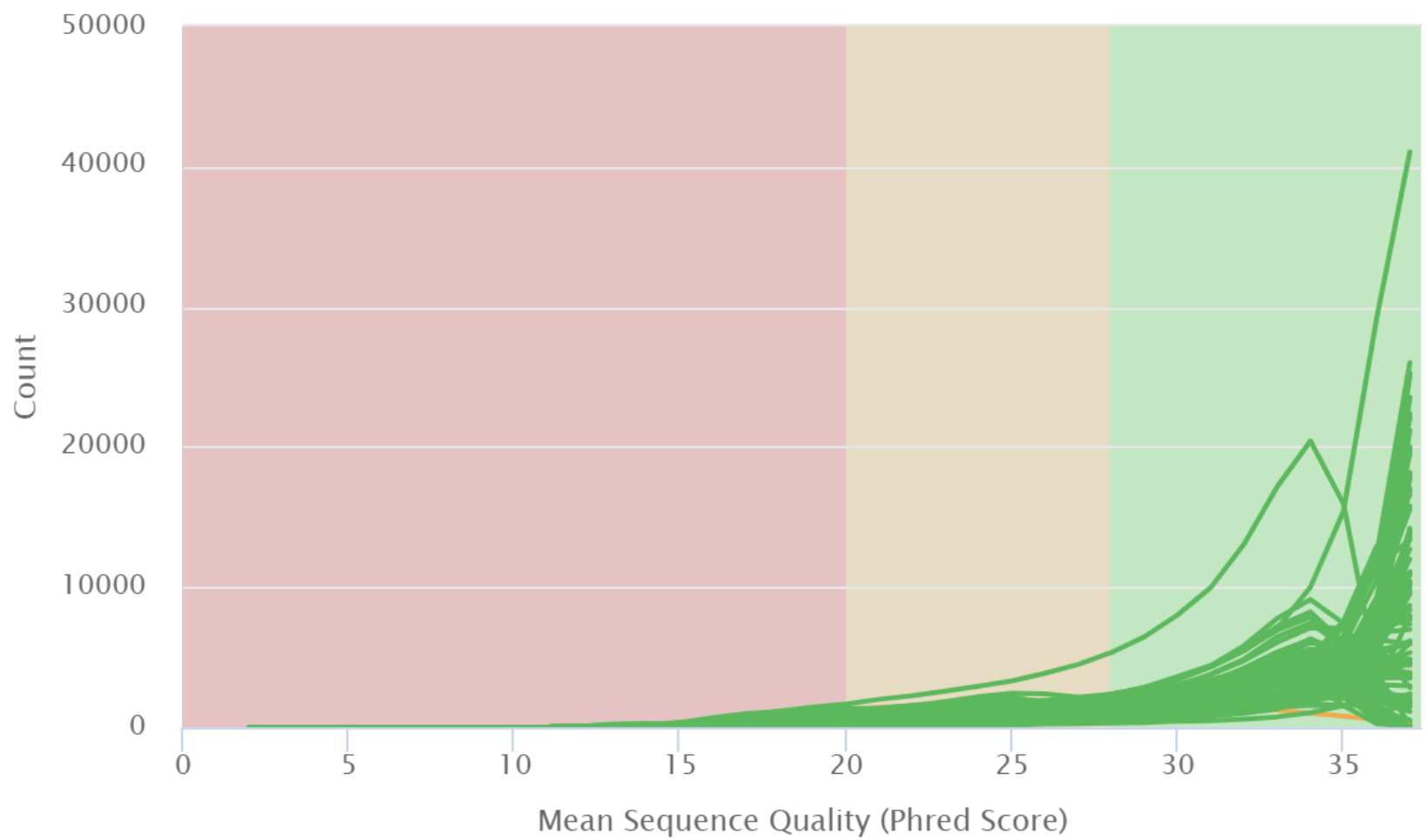
FastQC: Mean Quality Scores



Created with MultiQC

7.4.4 Scores de qualité par séquence

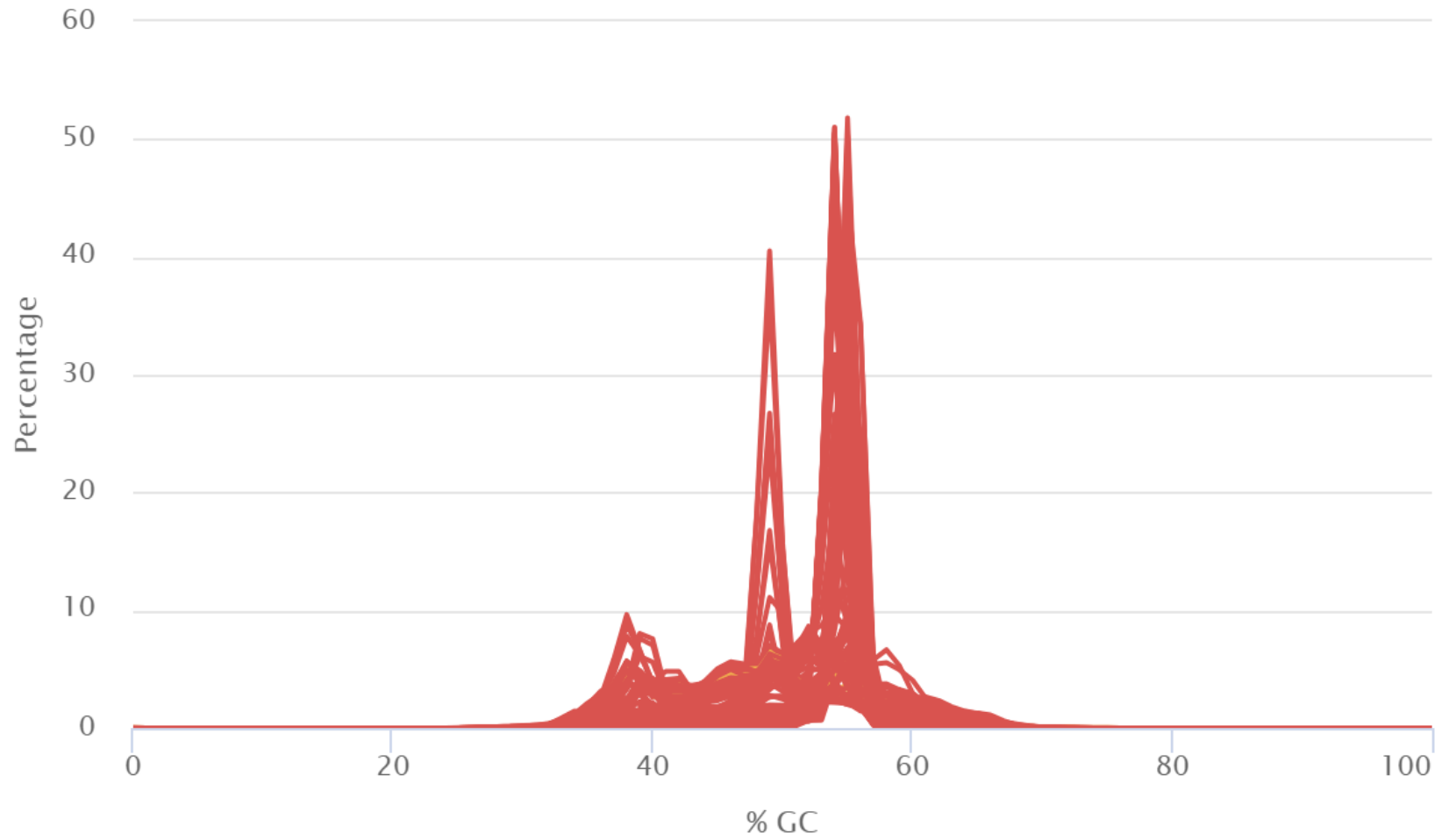
FastQC: Per Sequence Quality Scores



Created with MultiQC

7.4.5 Contenu en GC par séquence

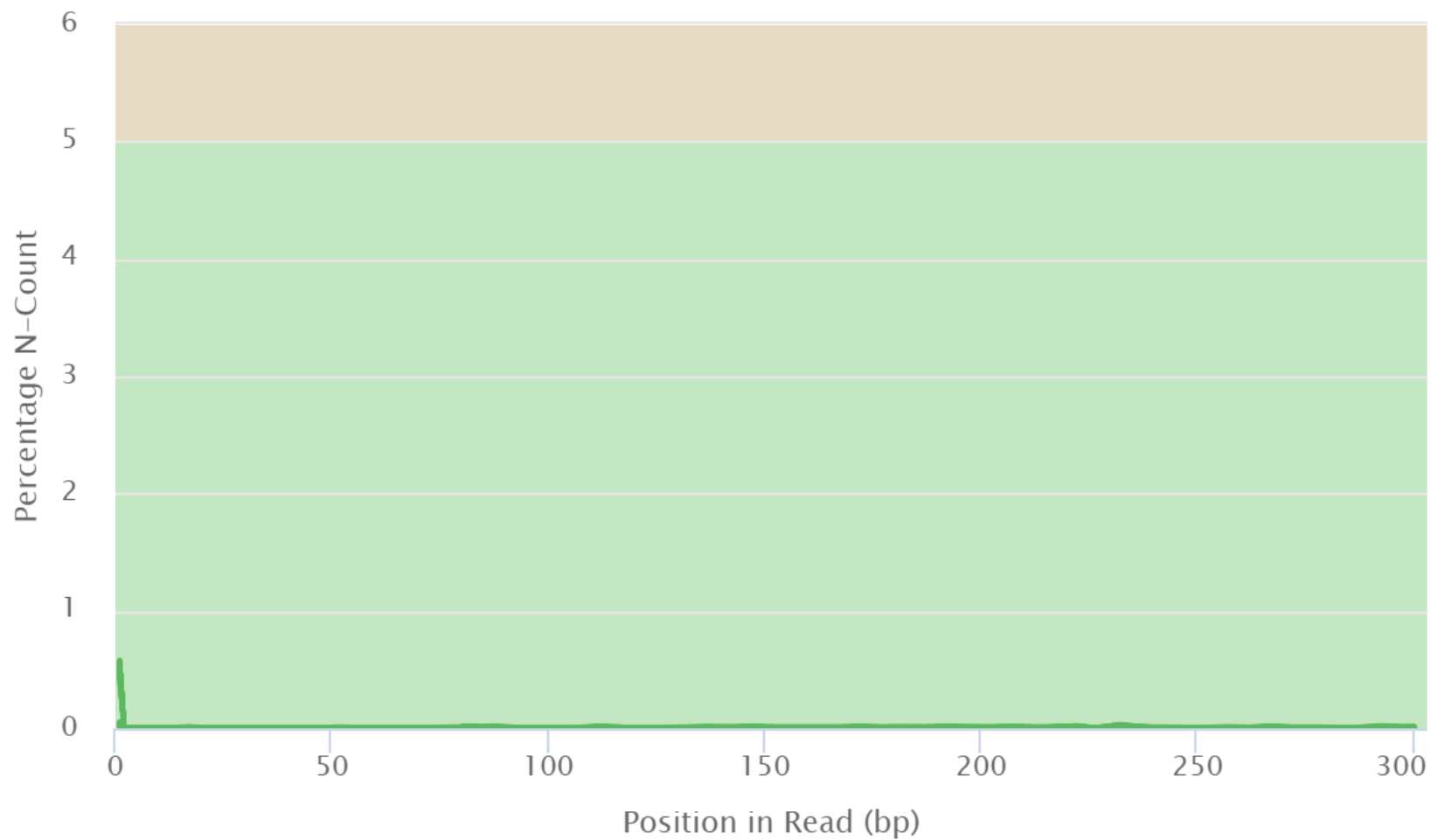
FastQC: Per Sequence GC Content



Created with MultiQC

7.4.6 Contenu en N par base

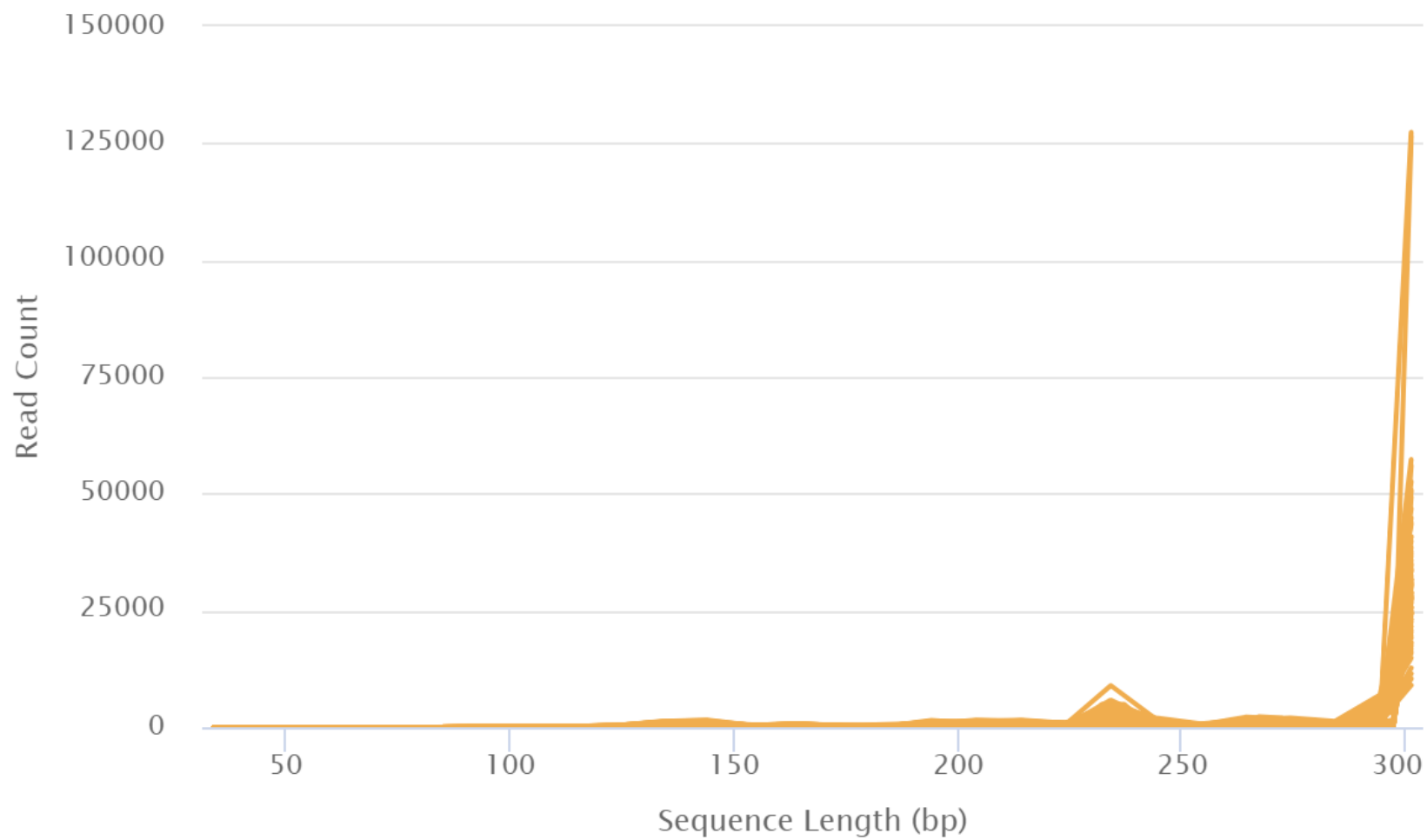
FastQC: Per Base N Content



Created with MultiQC

7.4.7 Distribution des longueurs de séquence

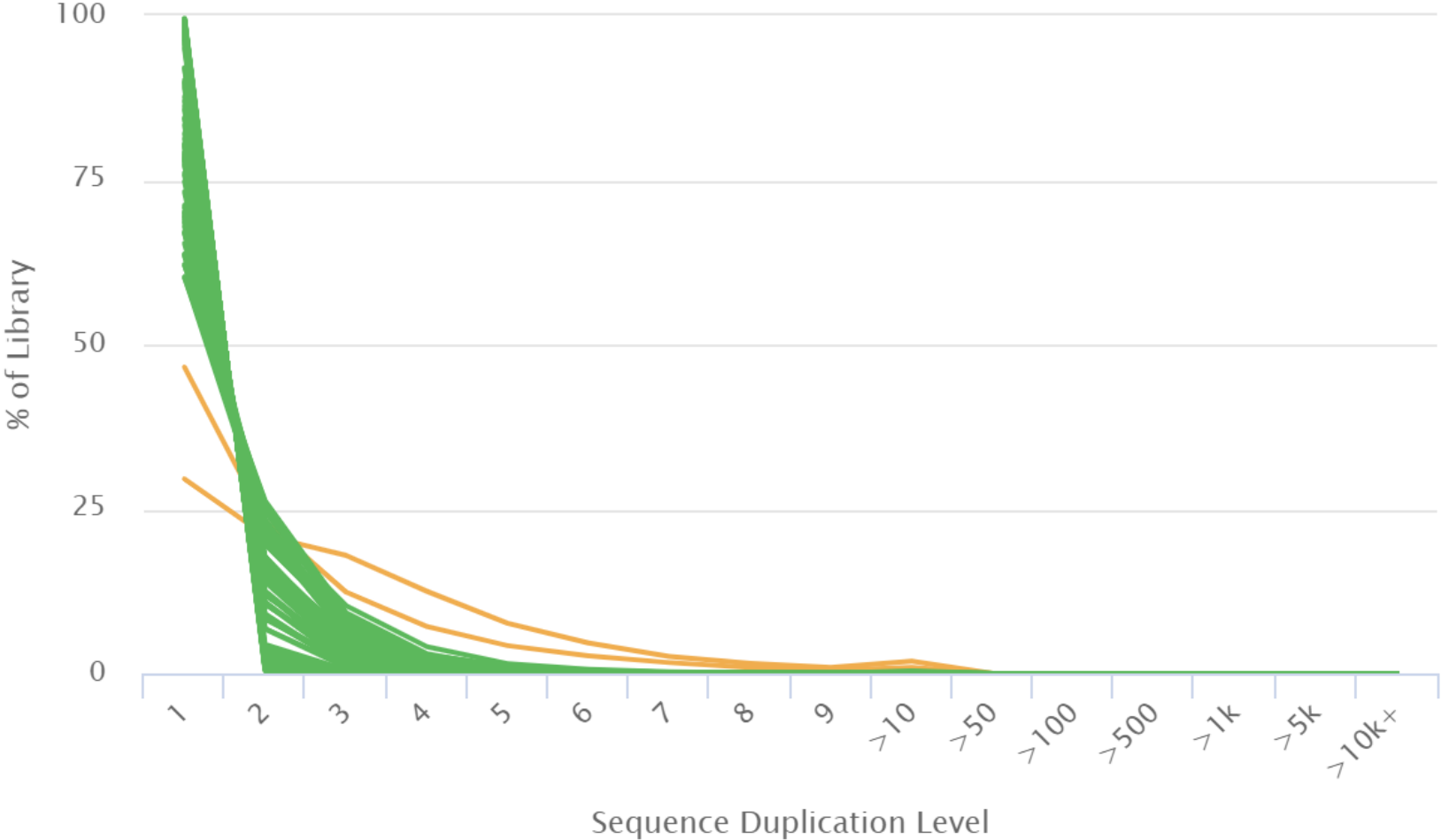
FastQC: Sequence Length Distribution



Created with MultiQC

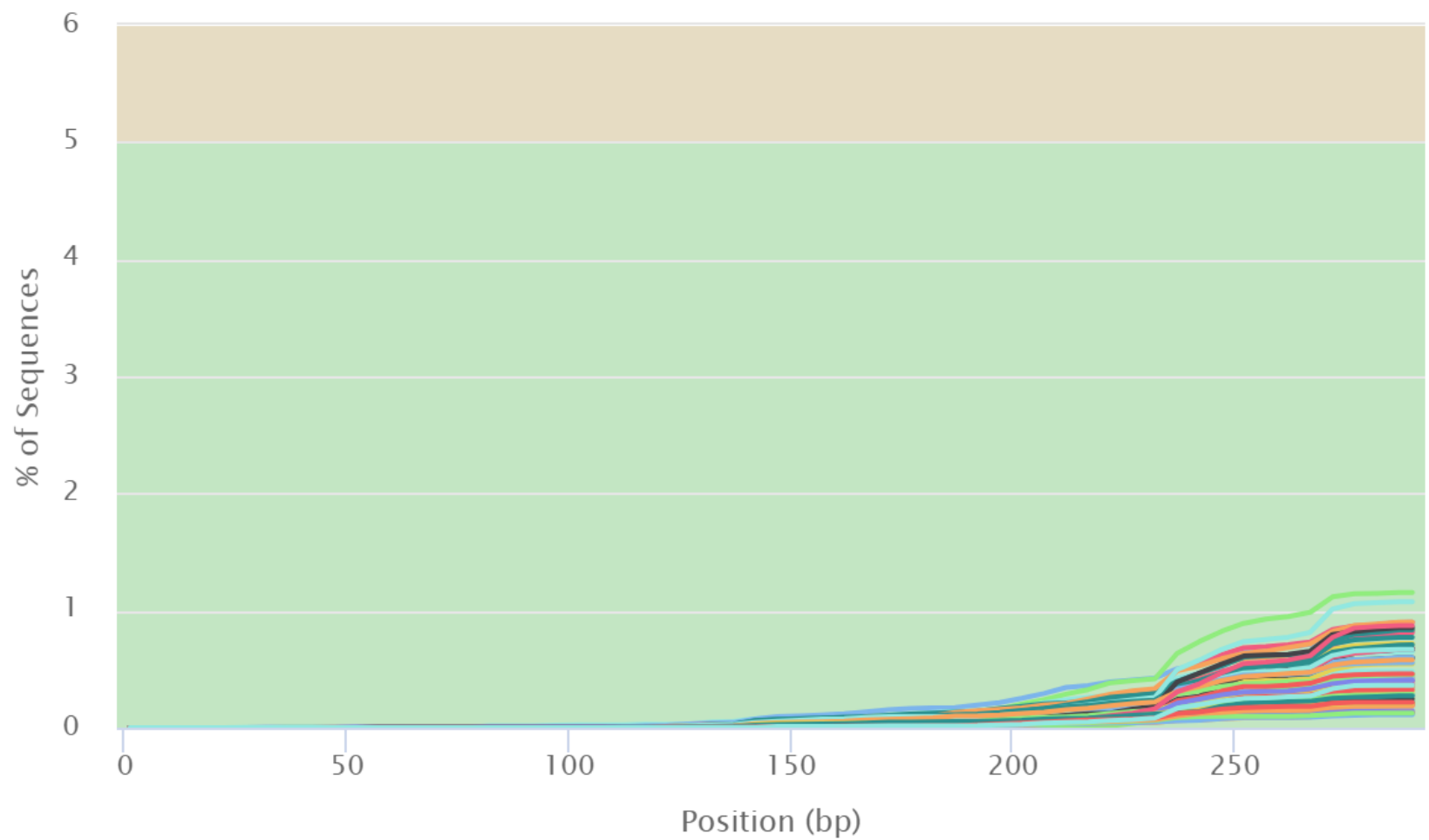
7.4.8 Niveaux de duplication des séquences

FastQC: Sequence Duplication Levels



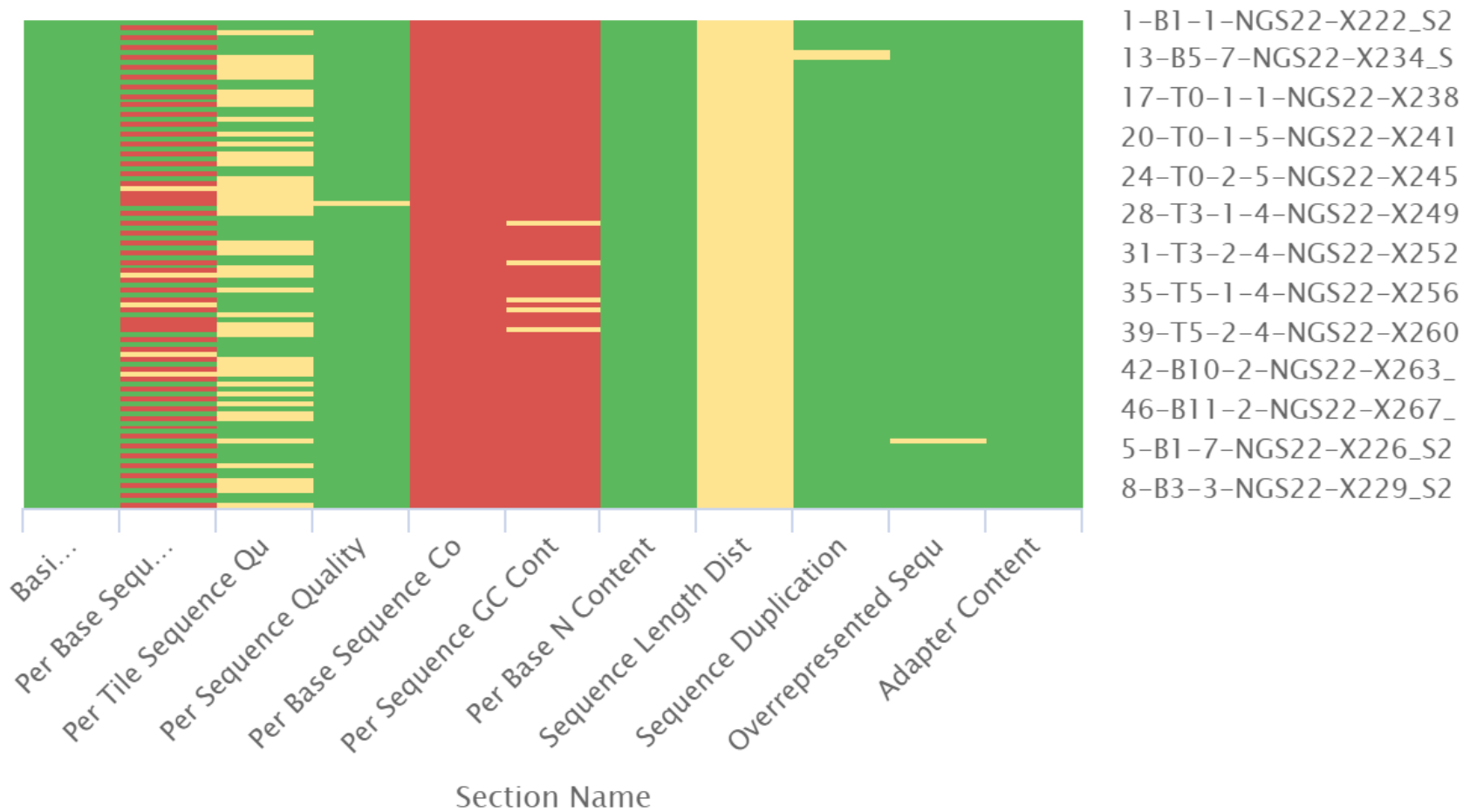
Created with MultiQC

FastQC: Adapter Content



Created with MultiQC

FastQC: Status Checks



Created with MultiQC

7.5 SUPPLÉMENTS DU MICROBIOTE

Tableau A1 : Distribution de la longueur des reads reverse et forward après le retrait des séquences des amorces PCR V3-V4 utilisées.

Demultiplexed sequence length summary

Forward Reads

Total Sequences Sampled	10000
2%	140 nts
9%	211 nts
25%	276 nts
50% (Median)	277 nts
75%	278 nts
91%	279 nts
98%	301 nts

Reverse Reads

Total Sequences Sampled	10000
2%	141 nts
9%	210 nts
25%	275 nts
50% (Median)	275 nts
75%	275 nts
91%	301 nts
98%	301 nts

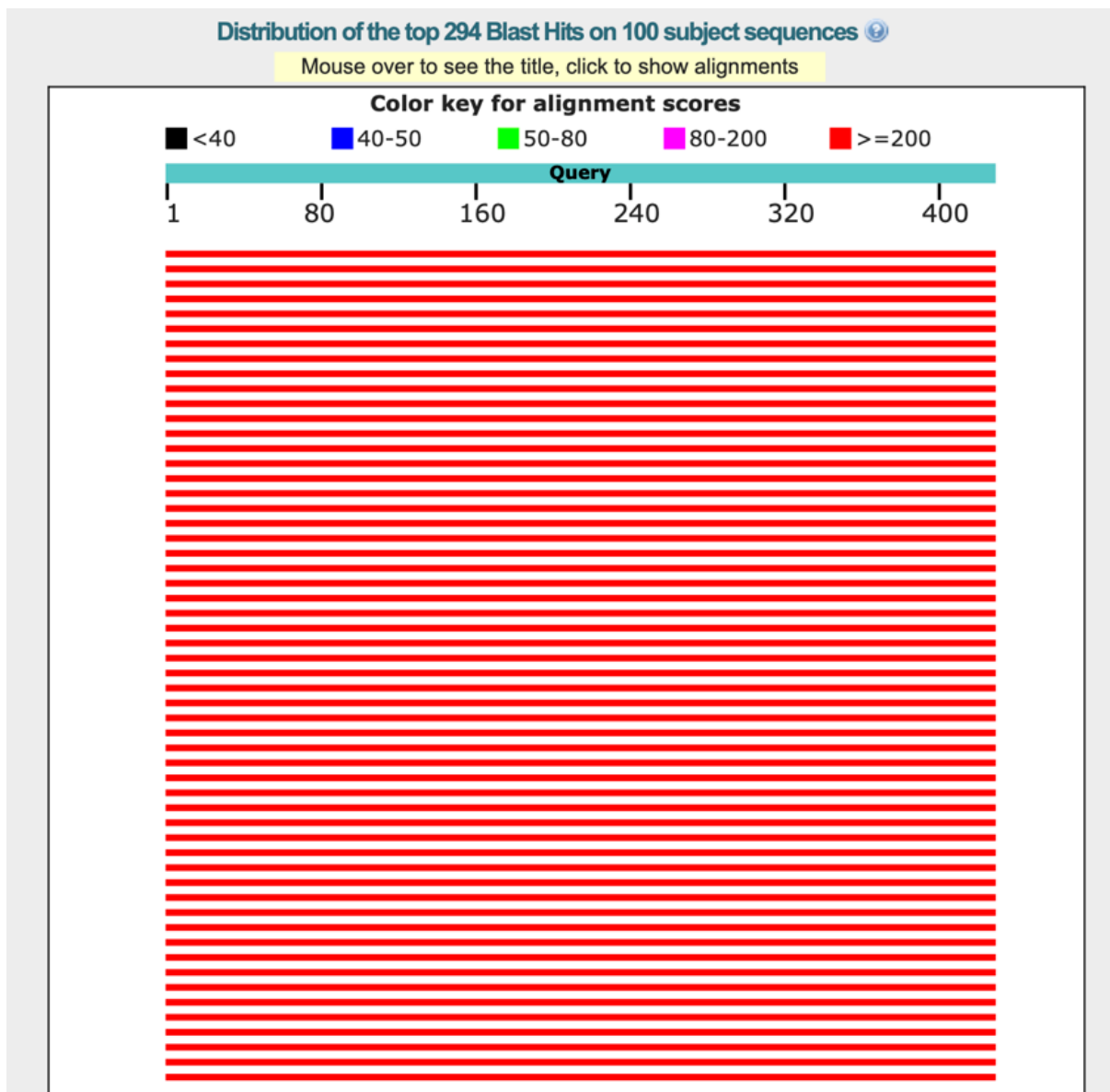
Tableau A2 : Synthèse de la réduction du jeu de données complet en 634 groupes distincts.

Sample ID	Input	Filtered	Input passed filter (%)	Denoisé	Merged	Input merged (%)	Non-chimeric	Input non-chimeric (%)
#q2:types	Numeric	Numeric	Numeric	Numeric	Numeric	Numeric	Numeric	Numeric
1-B1-1-NGS22-X222	28947	9904	34.21	5176	414	1.43	414	1.43
10-B3-6-NGS22-X231	44536	16244	36.47	6179	3029	6.8	3022	6.79
11-B3-7-NGS22-X232	28788	8776	30.48	4730	360	1.25	358	1.24
12-B5-1-NGS22-X233	128010	43550	34.02	25122	1484	1.16	1476	1.15
13-B5-7-NGS22-X234	31906	10396	32.58	5637	411	1.29	410	1.29
14-B5-4-NGS22-X235	25828	7538	29.19	3567	268	1.04	268	1.04
15-B5-5-NGS22-X236	62289	23224	37.28	11799	1762	2.83	1760	2.83
16-B5-6-NGS22-X237	32239	11410	35.39	6197	370	1.15	369	1.14
17-T0-1-1-NGS22-X238	30114	12157	40.37	6383	533	1.77	533	1.77
18-T0-1-3-NGS22-X239	40936	18416	44.99	7996	2399	5.86	2399	5.86
19-T0-1-4-NGS22-X240	59902	26033	43.46	11487	2185	3.65	2162	3.61
2-B1-2-NGS22-X223	33803	10371	30.68	5882	410	1.21	410	1.21
20-T0-1-5-NGS22-X241	34287	13616	39.71	7593	563	1.64	562	1.64
21-T0-2-1-NGS22-X242	38110	14404	37.8	8091	3156	8.28	3146	8.26
22-T0-2-3-NGS22-X243	28557	9246	32.38	5205	1635	5.73	1632	5.71
23-T0-2-4-NGS22-X244	35680	14548	40.77	8169	4633	12.98	4624	12.96
24-T0-2-5-NGS22-X245	30991	12235	39.48	7157	3029	9.77	2860	9.23
25-T3-1-1-NGS22-X246	20542	8179	39.82	2055	368	1.79	368	1.79
26-T3-1-2-NGS22-X247	27209	4153	15.26	1012	17	0.06	17	0.06
27-T3-1-3-NGS22-X248	44180	16060	36.35	8626	712	1.61	711	1.61
28-T3-1-4-NGS22-X249	42548	12740	29.94	4794	2290	5.38	2290	5.38
29-T3-1-5-NGS22-X250	45681	18788	41.13	8451	3076	6.73	3076	6.73
3-B1-3-NGS22-X224	30295	9431	31.13	5348	442	1.46	441	1.46
30-T3-2-2-NGS22-X251	17326	8019	46.28	3054	1557	8.99	1557	8.99
31-T3-2-4-NGS22-X252	41644	17502	42.03	7368	3379	8.11	3379	8.11
32-T3-2-5-NGS22-X253	35077	12697	36.2	6992	477	1.36	477	1.36

33-T5-1-1-NGS22-X254	36552	11945	32.68	5081	3054	8.36	3054	8.36
34-T5-1-3-NGS22-X255	30711	9572	31.17	5676	1235	4.02	1181	3.85
35-T5-1-4-NGS22-X256	62082	26676	42.97	12227	4447	7.16	4447	7.16
36-T5-2-1-NGS22-X257	38412	18928	49.28	8235	4373	11.38	4373	11.38
37-T5-2-2-NGS22-X258	47295	19687	41.63	8145	439	0.93	439	0.93
38-T5-2-3-NGS22-X259	25008	8090	32.35	2119	971	3.88	971	3.88
39-T5-2-4-NGS22-X260	42797	20992	49.05	7845	5216	12.19	5216	12.19
4-B1-5-NGS22-X225	50011	18787	37.57	9653	1343	2.69	1338	2.68
40-T5-2-5-NGS22-X261	49715	20456	41.15	8060	2319	4.66	2319	4.66
41-B10-1-NGS22-X262	51019	28125	55.13	16672	9143	17.92	9091	17.82
42-B10-2-NGS22-X263	27454	5594	20.38	3223	464	1.69	457	1.66
43-B10-4-NGS22-X264	57038	19183	33.63	9183	1894	3.32	1881	3.3
44-B10-6-NGS22-X265	57841	19473	33.67	9987	2589	4.48	2587	4.47
45-B10-7-NGS22-X266	42192	18275	43.31	8696	4497	10.66	4497	10.66
46-B11-2-NGS22-X267	28220	7251	25.69	4063	487	1.73	487	1.73
47-B11-3-NGS22-X268	49955	23179	46.4	10904	7086	14.18	7086	14.18
48-B11-5-NGS22-X269	53193	23383	43.96	11790	5068	9.53	5062	9.52
49-B11-6-NGS22-X270	31736	16782	52.88	10133	6943	21.88	6934	21.85
5-B1-7-NGS22-X226	39748	17247	43.39	7235	2686	6.76	2686	6.76
50-B11-7-NGS22-X271	32724	15235	46.56	7518	4691	14.34	4674	14.28
6-B3-1-NGS22-X227	28679	9697	33.81	4567	1134	3.95	1132	3.95
7-B3-2-NGS22-X228	33017	11582	35.08	6111	623	1.89	621	1.88
8-B3-3-NGS22-X229	30924	12856	41.57	7310	2113	6.83	2104	6.8
9-B3-4-NGS22-X230	27588	9320	33.78	5331	384	1.39	380	1.38

Tableau A3 : Valeurs statistiques pour la comparaison des indices de Faith pour chaque condition de chaque expérience. Le groupe 1 contenant N1 individus est comparé au groupe 2 composé de N2 individus. Aqp = aquaponie ; CO = circuit ouvert et NO3 = expérience des nitrates. La q-value est la p-value corrigée. La valeur du seuil de significativité a été établie à 0,05.

Groupe 1	N1	Groupe 2	N2	H	p-value	q-value
Aqp_Large	5	Aqp_Medium	6	0.0	1.0	1.0
Aqp_Large	5	Aqp_Small	5	0.39	0.52	0.57
Aqp_Large	5	CO_Small-Medium	5	0.53	0.46	0.52
Aqp_Large	5	CO_XSmall	5	1.84	0.17	0.50
Aqp_Large	5	NO3_T0	8	0.77	0.37	0.50
Aqp_Large	5	NO3_T3	8	0.53	0.46	0.52
Aqp_Large	5	NO3_T5	8	3.62	0.05	0.31
Aqp_Medium	6	Aqp_Small	5	0.83	0.36	0.50
Aqp_Medium	6	CO_Small-Medium	5	0.83	0.36	0.50
Aqp_Medium	6	CO_XSmall	5	2.70	0.10	0.46
Aqp_Medium	6	NO3_T0	8	0.81	0.36	0.50
Aqp_Medium	6	NO3_T3	8	0.81	0.36	0.50
Aqp_Medium	6	NO3_T5	8	3.75	0.05	0.31
Aqp_Small	5	CO_Small-Medium	5	2.45	0.11	0.46
Aqp_Small	5	CO_XSmall	5	4.81	0.02	0.26
Aqp_Small	5	NO3_T0	8	0.77	0.37	0.50
Aqp_Small	5	NO3_T3	8	1.37	0.24	0.50
Aqp_Small	5	NO3_T5	8	4.82	0.02	0.26
CO_Small-Medium	5	CO_XSmall	5	1.09	0.29	0.50
CO_Small-Medium	5	NO3_T0	8	0.77	0.37	0.50
CO_Small-Medium	5	NO3_T3	8	0.02	0.88	0.91
CO_Small-Medium	5	NO3_T5	8	2.14	0.14	0.50
CO_XSmall	5	NO3_T0	8	1.04	0.30	0.50
CO_XSmall	5	NO3_T3	8	0.53	0.46	0.52
CO_XSmall	5	NO3_T5	8	0.53	0.46	0.52
NO3_T0	8	NO3_T3	8	1.33	0.24	0.50
NO3_T0	8	NO3_T5	8	4.86	0.02	0.26
NO3_T3	8	NO3_T5	8	1.58	0.20	0.50



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 100

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TV27_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT549173.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TV25_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT549172.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TV8_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT549163.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_CMFRI/PhD-14_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT453892.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_MBL0056_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT187907.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TZH4_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT075581.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TZH8_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT071415.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TZH7_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT071412.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_TZH6_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	MT071409.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_OXEDWH2018052303_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221535.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_damselae_strain_FDHD20180629021_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221534.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_H2010062301_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221511.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_Vh720_3_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221504.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_SQ2011070101_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221497.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_LYJT2011070101_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	OP221496.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_FFH20211105031_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	ON950703.1
<input checked="" type="checkbox"/> Photobacterium_sp._strain_Qx2019092402_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	770	770	100%	0.0	99.77%	ON950666.1

Fig A4 : Alignement BLASTn d'une séquence ADN retrouvée dans le microbiote de *Sander lucioperca*, qui correspond bien à la bactérie *Photobacterium damsela*.

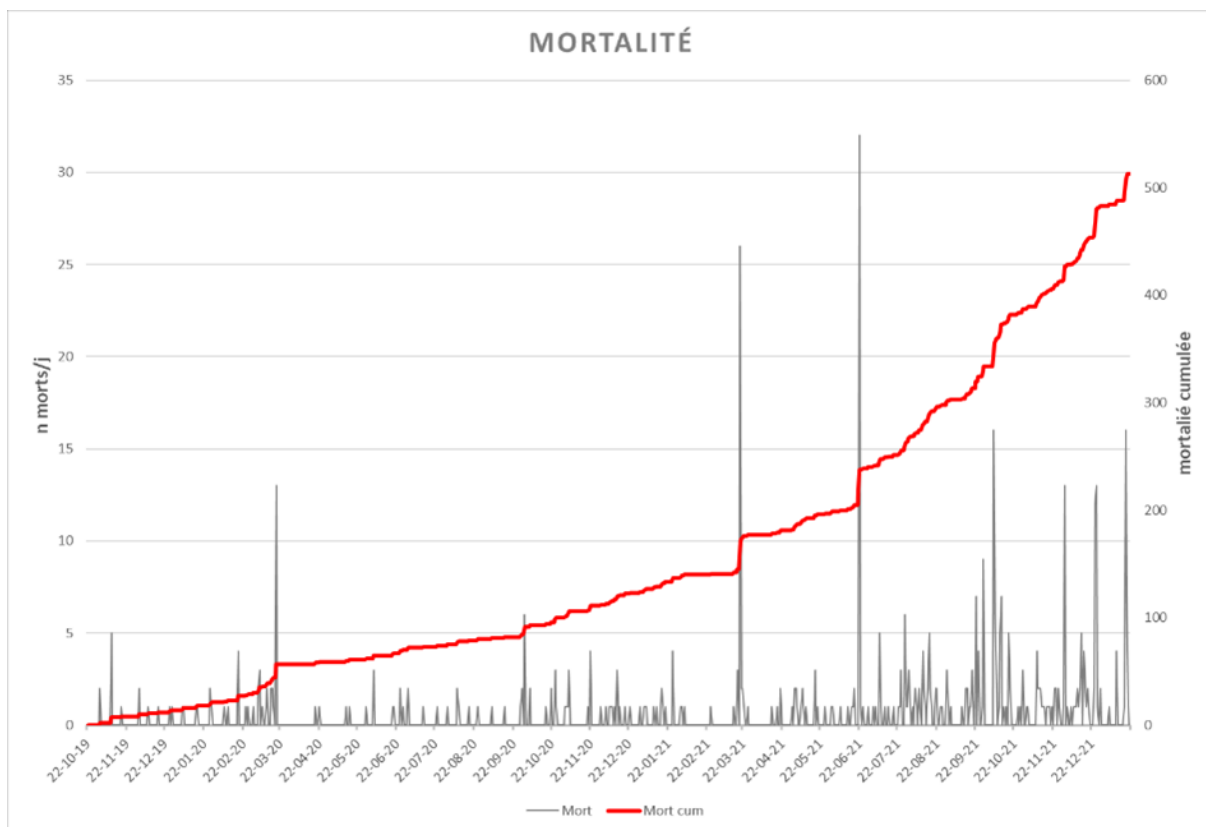


Fig A5 : Mortalités ponctuelle et cumulée du sandre dans le système d'élevage en aquaponie de Strée en l'espace de deux ans. Une mortalité chronique est observé de par les nombreux pics répertoriés sur la figure. Certains pics exceptionnellement grands sont dus à un tri des sandres ou à un stress trop important dans le système.