

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
AVANT-PROPOS.....	VI
RÉSUMÉ	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES	XVIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
L'aquaculture, une industrie de l'avenir.....	1
La plie rouge, une espèce candidate pour l'industrie maricole québécoise	4
L'élevage de la plie rouge, état de situation	7
La phase larvaire, une étape critique	10
Les besoins nutritionnels des stades larvaires de poissons	13
Le rotifère, une microcapsule vivante	20
La densité d'élevage larvaire, facteur de risque et de rentabilité	23
Un rotifère indigène à l'habitat de la plie rouge	25
Les objectifs de cette thèse	27

CHAPITRE 1	29
IMPORTANCE DE LA DIÈTE EN ACIDES GRAS POUR LES PREMIERS STADES DE DÉVELOPPEMENT CHEZ LA PLIE ROUGE (<i>PSEUDOPLEURONECTES AMERICANUS</i>)	30
Introduction	30
Materials and Methods	32
<i>Rearing procedures</i>	<i>32</i>
<i>Experimental design</i>	<i>33</i>
<i>Sampling and biochemical analysis</i>	<i>34</i>
<i>Data analysis</i>	<i>37</i>
Results.....	37
<i>Biochemical composition of prey</i>	<i>37</i>
<i>Growth indicators in control larvae.....</i>	<i>41</i>
<i>Biochemical composition and larval length.....</i>	<i>41</i>
<i>Juvenile survival.....</i>	<i>46</i>
Discussion	51
CHAPITRE 2	57
EFFET DE LA DENSITÉ D'ÉLEVAGE SUR LA CROISSANCE, LA SURVIE ET L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LARVES DE PLIE ROUGE (<i>PSEUDOPLEURONECTES AMERICANUS</i>)	58
Introduction	58

Matériel et méthodes	62
<i>Incubation des œufs et élevage larvaire</i>	<i>62</i>
<i>Échantillonnage et analyses biochimiques.....</i>	<i>64</i>
<i>Analyse des données</i>	<i>67</i>
Résultats	67
<i>Densité larvaire et survie des juvéniles.....</i>	<i>67</i>
<i>Taille des larves et indicateurs de croissance.....</i>	<i>69</i>
Discussion et conclusion	75
 CHAPITRE 3	 83
 ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET PARAMÈTRES D'ÉLEVAGE D'UN ROTIFÈRE INDIGÈNE À L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT.	 84
Introduction	84
Matériel et méthodes	91
<i>Obtention d'une souche de rotifères indigènes</i>	<i>91</i>
<i>Concept expérimental.....</i>	<i>93</i>
<i>Analyse des données.....</i>	<i>98</i>
Résultats	99
<i>Classification taxonomique de l'organisme</i>	<i>99</i>
<i>Maintien d'un élevage à long terme.....</i>	<i>101</i>
<i>Paramètres des conditions d'élevage.....</i>	<i>102</i>

Discussion et conclusion 109

CONCLUSION GÉNÉRALE 124

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition (according to manufacturers' specifications) of enriched diets fed to rotifers.	34
Tableau 2 : Biochemical composition of live prey (<i>Brachionus plicatilis</i>) enriched with different commercial formulations.	39
Tableau 3 : Fatty acid composition of live prey (<i>Brachionus plicatilis</i>) enriched with different commercial formulations.	40
Tableau 4 : Total lipids, lipid class and fatty acid composition of larvae feeding on rotifers enriched with different diets, year 1.	44
Tableau 5 : Total lipids, lipid class and fatty acid composition of larvae feeding on rotifers with enriched different diets, year 2.	45
Tableau 6 : Juvenile production resulting from larvae fed different enrichment formulas..	49
Tableau 7 : Densité larvaire et production de juvéniles sous différentes densités d'élevage (D).....	68
Tableau 8 : Longueur standard (mm) pour différentes densités (D) initiales.....	70
Tableau 9 : Indicateurs de croissance, lipides totaux, classes de lipides et composition en acide gras des larves à l'ouverture de la bouche, à la fin de la première alimentation et à la fin de la période larvaire.	71
Tableau 10 : Composition des larves en lipides totaux, stérols, DHA et DHA:EPA à différentes densités d'élevage (D) initiales.	73
Tableau 11 : Synopsis du concept expérimental	94
Tableau 12 : Composition des préparations d'enrichissement.	97
Tableau 13 : Taux instantanés de production (μ) lors des différentes expériences d'élevage du rotifère indigène au Saint-Laurent.....	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Plie rouge (<i>Pseudopleuronectes americanus</i> , Walbaum) adulte.	4
Figure 2 : Différents stades de développement larvaire chez la plie rouge	7
Figure 3 : Larve de plie rouge à J18.	9
Figure 4 : Juvénile de plie rouge à J39.	10
Figure 5 : Experimental sampling design.	35
Figure 6 : Linear regression of standard length (mm) in control larvae fed non-enriched rotifers for each year of the experiment.	42
Figure 7 : Protein content per larvae (A) and protein:RNA ratio (B) in control larvae fed non-enriched rotifers for the two years of the experiment.	43
Figure 8 : DHA:EPA ratios (mean \pm SD) at mouth opening, 120 and 260 degree-days in larvae fed with a) non-enriched rotifers and those enriched with high total lipids and b) non-enriched rotifers and those enriched with high protein and high DHA:EPA.....	47
Figure 9 : Growth as measured by standard length (mm) for years 1 (a) and 2 (b).	48
Figure 10 : Pigmentation index of newly metamorphosed juveniles.	50
Figure 11 : Mise en élevage des rotifères indigènes.....	92
Figure 12 : Rotifère indigène à l'estuaire du Saint-Laurent (400 X).....	100
Figure 13 : Évolution des densités maximales d'un élevage de rotifères d'eau froide durant une période de 6 semaines	101
Figure 14 : Évolution de la densité des rotifères selon le taux de renouvellement quotidien du milieu.....	103
Figure 15 : Évolution de la densité des rotifères selon la concentration de <i>Nannochloropsis sp</i>	106
Figure 16 : Évolution de la densité de rotifères selon les espèces de microalgues.	107
Figure 17 : Évolution de la densité des rotifères selon la ration quotidienne de l'enrichissement Culture Selco.....	108
Figure 18 : Évolution de la densité de rotifères en fonction du type d'enrichissement.	110
Figure 19 : Évolution de la densité des rotifères selon le nombre de repas quotidiens.....	111

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'aquaculture, une industrie de l'avenir

Depuis de nombreuses années, les débarquements mondiaux de poissons, mollusques et crustacés destinés à la consommation humaine se maintiennent à environ 60 000 000 tm/an (New 1997; FAO 2006). Par contre, l'augmentation de la population mondiale et l'accroissement de la consommation per capita accentuent la demande pour les organismes aquatiques destinés à la consommation humaine. L'aquaculture est perçue comme une activité pouvant permettre de combler en tout ou en partie ce déficit entre la demande des consommateurs et les débarquements mondiaux.

En 2005 la production aquicole mondiale se situait aux environs de 47 800 000 tm/an, résultat d'une croissance annuelle soutenue (FAO 2006). Selon des projections de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), le marché potentiel pour les produits aquacoles sera équivalent à celui des débarquements de la pêche pour consommation humaine, soit 60 000 000 tm/an, en 2035. L'économiste de renommée mondiale Peter Drucker a déclaré au *Globe and Mail* « fish farming is going to be the growth industry of the next 30 years » (Anonyme 1999).

Selon les statistiques de la FAO pour l'année 2005, la mariculture ne représentait que 17,6 % de la production mondiale destinée à la consommation humaine (FAO 2006).

L'aquaculture des poissons marins pour sa part générait en 2004 une production annuelle

ne représentant qu'environ 0,7 % de la production aquacole mondiale. Par contre on note que les poissons plats étaient en forte croissance parmi les espèces maricoles passant de 35 513 tm en 2002 à 109 342 tm en 2004, soit une croissance annuelle moyenne de 75% (FAO 2006). Toujours selon ces statistiques de la FAO, le Canada ne produisait en 2005 que 153 995 tm (espèces d'eau douce, diadromes et marines) soit 0,32% de la production aquacole mondiale ou 1% de la production mondiale en excluant la Chine qui éclipse l'ensemble des autres pays par sa production piscicole d'eau douce. Au Québec, la mariculture n'en est qu'à ses débuts avec une production annuelle de 915 tm en 2005 (MAPAQ 2007) résultat d'une croissance annuelle moyenne de 32% au cours des dix dernières années.

Le contexte mondial est donc favorable au développement de l'aquaculture et notamment de l'aquaculture marine. On doit cependant garder à l'esprit que ce développement devra se réaliser dans le respect des écosystèmes marins.

Au Canada, l'aquaculture des poissons marins est actuellement basée principalement sur l'élevage des salmonidés notamment du saumon de l'Atlantique (qui représente plus de 85% de la production), du saumon Chinook et de la truite arc-en-ciel. Au cours des dernières années, la compétition mondiale a eu pour effet de réduire les prix pour ces espèces sur les marchés et de rendre ce type de production moins profitable. Jumelée au déclin des stocks sauvages de poissons marins, cette situation incite à une diversification des espèces destinées à l'aquaculture marine. Au Canada Atlantique, plusieurs espèces de

poissons marins font l'objet d'activités de recherches et de développements depuis plusieurs années et pourraient bientôt être produites à une échelle pilote ou industrielle. C'est le cas notamment de la morue franche, du flétan de l'Atlantique, du loup tacheté et de l'aiglefin.

Actuellement, au Québec, l'aquaculture en eau marine, ou mariculture, est essentiellement axée vers la conchyliculture et basée sur l'élevage de la moule bleue et sur celle du pétoncle géant. Certaines autres espèces en sont à l'étape du développement au niveau industriel notamment la mye et le pétoncle d'Islande. En ce qui a trait aux poissons marins et compte tenu des conditions climatiques dans nos régions, on visera des espèces résistant aux températures froides tout en offrant une croissance relativement rapide. Toutes les espèces de poissons marins offrant un certain potentiel n'en sont encore qu'à l'étape de la recherche scientifique.

Parmi les espèces d'intérêt offrant un potentiel commercial au niveau mondial on retrouve les poissons plats. À titre d'exemple, l'Europe produit annuellement plusieurs milliers de tonnes de turbot (*Scophthalmus maximus*) (Howell 1998) vendu notamment à l'état vivant sur le marché asiatique. Sur la côte Atlantique canadienne, la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum) a d'ores et déjà été ciblée comme une espèce offrant un grand intérêt maricole (Litvak 1994, 1996, 1999) en raison notamment de sa rusticité et de sa capacité à survivre et à croître en eau froide.

La plie rouge, une espèce candidate pour l'industrie maricole québécoise

La plie rouge est un poisson plat de la famille des Pleuronectidés. Il s'agit d'une espèce necto-benthique côtière commune (Bigelow & Schroeder 1953, Scott & Scott 1988) et très valorisée le long de la côte atlantique de l'Amérique du Nord. Après l'étape de la métamorphose, les deux yeux se retrouvent du côté droit de l'animal. Ainsi le côté gauche, non pigmenté, se trouve en contact avec le substrat du fond alors que le côté droit, pigmenté, est orienté vers la surface (figure 1).

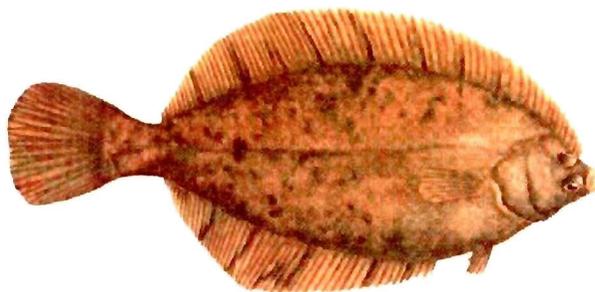


Figure 1 : Plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum) adulte.

Étant une espèce commune le long de la côte atlantique de la Georgie au Labrador (Scott & Scott 1988; Bigelow & Schroeder 1953), sa biologie est abondamment décrite dans la littérature scientifique. Les caractéristiques biologiques des plies rouges fréquentant l'estuaire du Saint-Laurent dans la région de Saint-Fabien-sur-mer ont été décrites par Vaillancourt (1982) et par Vaillancourt *et al.* (1985).

Il s'agit d'une espèce euryhaline capable de supporter une large gamme de salinités. Dans sa synthèse sur la biologie des stocks de cette espèce sur la côte Atlantique américaine, Klein-MacPhee (1978) signale qu'on la retrouve communément dans des eaux dont la salinité varie de 4‰ à 30‰. Les spécimens conservés en bassin à la Station aquicole de Pointe-au-Père vivent dans une eau atteignant 30‰ en été, mais supportent aussi très bien une eau saumâtre de 10‰ dans lesquels ils sont parfois maintenus à titre curatif pour éliminer certaines maladies dues à des myxobactéries.

L'une des caractéristiques les plus remarquables de la plie rouge est sa capacité à supporter un grand éventail de températures, notamment des températures très froides. Bigelow & Schroeder (1953) rapportent qu'on la retrouve dans des eaux de température variant de 21°C à 0°C et même -1°C. Cette résistance à l'eau très froide est due à sa capacité de synthétiser une protéine plasmatique antigèle (Fletcher 1980; Sicheri & Yang 1995). Le déclenchement de cette synthèse protéique est associé à la photopériode et plus exactement à la diminution de la période lumineuse. L'intérêt suscité par la découverte de cette protéine a mené à des travaux visant l'implantation du gène de la plie rouge responsable de cette synthèse chez d'autres espèces d'eau froide qui en sont démunies (Fletcher *et al.* 1988; Anonyme 1999).

En milieu naturel sous les latitudes du Golfe et de l'estuaire du Saint-Laurent, la plie rouge pond ses œufs au printemps (Scott & Scott 1988) lorsque l'eau s'est réchauffée à une température d'environ 5°C (Harmin & Crim 1992). Des observations faites sur des plies

rouges récoltées à Saint-Fabien-sur-Mer montrent que dans cette région la ponte s'effectue en mai et durant la première moitié de juin et que l'activité maximale de ponte se situe fin mai-début juin (Vaillancourt 1982).

La plie rouge est une espèce relativement féconde. Selon Scott & Scott (1988) les femelles de 3 ans pondraient en moyenne 435 000 œufs alors que les femelles de 5 ans pondraient en moyenne 3 329 000 œufs. Chez les plies rouges capturées à Saint-Fabien-sur-Mer la fécondité était plus faible et variait de 65 963 œufs chez une femelle de 5 ans à 2 009 365 œufs chez une femelle de 10 ans (Vaillancourt 1982). L'équation de la fécondité en fonction du poids de l'individu chez ces spécimens indique qu'une femelle de 500 g produirait 911 600 œufs matures. Le diamètre des œufs au moment de la ponte est d'environ 0,70 à 0,80 mm (Klein-MacPhee 1978).

À l'éclosion des œufs, les larves vésiculées mesurent en moyenne de 2.4 mm (Scott & Scott 1988) à 3,2 mm (Ben Khemis *et al.* 2000), elles sont pélagiques et combinent leurs besoins nutritionnels grâce à leur sac vitellin. Celui-ci est cependant de petite taille et fournit une réserve énergétique limitée (Laroche 1981). Le sac vitellin est complètement résorbé après environ 5 jours à une température de 9-10°C (Ben Khemis *et al.* 2000; Mercier 2001). C'est alors que la bouche s'ouvre. La larve pélagique doit alors se nourrir d'aliments exogènes.

Les larves se développent ensuite en conservant une forme symétrique et ce, jusqu'à leur métamorphose qui survient après environ 360-400 degrés-jours (Ben Khemis *et al.* 2003).

Par la suite, elles migrent vers le fond et adoptent un mode de vie benthique. La figure 2 illustre les différentes étapes de développement larvaire chez la plie rouge

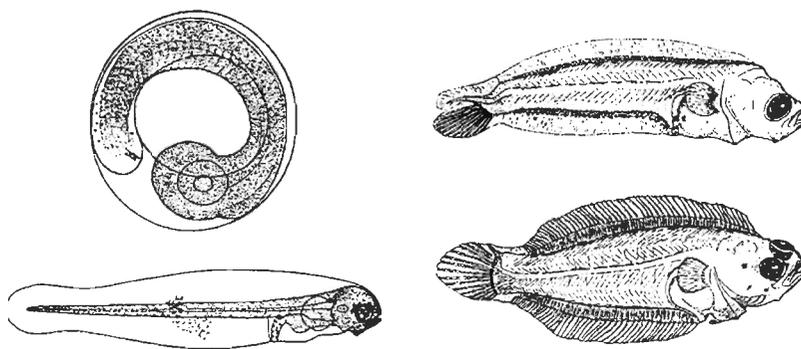


Figure 2 : Différents stades de développement larvaire chez la plie rouge

(tiré de Bigelow & Schroeder 1953).

De haut en bas et de gauche à droite on illustre un œuf embryonné, une larve à l'ouverture de la bouche, une larve avant métamorphose et un juvénile récemment métamorphosé. Cette transformation anatomique chez les poissons plats nécessite une grande quantité d'énergie, généralement sous formes de lipides, et une forte mortalité est généralement observée (Fernandez-Diaz *et al.* 2001).

L'élevage de la plie rouge, état de situation

Litvak (1999) souligne que, bien qu'il existe une importante littérature scientifique sur la plie rouge, il n'y a que relativement peu d'informations disponibles sur les aspects spécifiques à l'élevage aquacole de cette espèce. Il n'existe donc pas de protocole de

production de masse pour la plie rouge (Sawyer & Hoornbeck 1980) bien que plusieurs étapes de cet élevage soient relativement bien maîtrisées.

Les techniques de ponte, de fécondation et d'incubation des œufs sont maîtrisées (Smigielski & Arnold 1972; Ben Khemis *et al* 2000; Mercier 2001) et en usage à la Station aquicole de Pointe-au-Père. La plie rouge fraie au printemps et une seule femelle peut produire de très nombreux œufs. L'utilisation d'hormones LHRH permet au besoin de stimuler la ponte. L'éclosion des œufs survient après environ 70 degrés-jours (Mercier 2001; Ben Khemis *et al.* 2003).

L'élevage larvaire peut s'effectuer dans des bassins cylindroconiques dotés d'une alimentation en eau permettant un renouvellement complet du milieu sur une période de 12 heures. Ces bassins doivent être munis d'un système de bullage favorisant l'oxygénation et l'homogénéisation de l'eau (Litvak 1999; Ben Khemis *et al* 2000 et 2003; Mercier 2001). Après résorption du sac vitellin (figure 3), les larves de plies rouges peuvent être nourries d'abord avec des rotifères, un petit métazoaire dont la taille varie généralement de 100 à 400 μm selon l'espèce. Par la suite, les larves de plus grande taille peuvent être nourries avec des nauplii d'artémies et des micro-capsules produites commercialement (Ben Khemis *et al* 2003). L'optimisation de la nutrition des stades larvaires nécessite cependant encore des travaux de recherche et développement. De l'éclosion à la métamorphose, l'élevage larvaire dure de 36 à 40 jours à 10°C (Ben Khemis *et al.* 2003).



Figure 3 : Larve de plie rouge à J18.

Source: L. Seychelle

L'élevage du stade juvénile (Figure 4) est réussi avec un certain succès en utilisant un aliment inerte produit commercialement (Lee & Litvak 1996a, b). Les recherches se poursuivent pour améliorer les densités d'élevage et les taux de production en faisant appel à différents concepts de cages et de bassins et en ajustant la photopériode (Litvak 1999). Déjà les travaux de de Montgolfier *et al.* (2005) ont permis de constater que le type de bassins utilisés n'avait pas d'effet sur l'état général et le développement des juvéniles nouvellement métamorphosés.

Les conditions d'élevage du stade adulte et le développement d'un régime alimentaire optimal pour cette espèce ont fait l'objet de travaux concluants au Nouveau-Brunswick (e.g. Litvak 1994, 1996) et au Québec (Plante *et al.* 2002; 2003 et 2005). La maturation des gonades en conditions d'élevage est réalisée avec un certain succès, mais nécessite encore des travaux de recherche et développement pour assurer l'indépendance des fermes d'élevage à l'égard de l'approvisionnement en géniteurs sauvages.



Figure 4 : Juvénile de plie rouge à J39.

Source: L. Seychelle

La phase larvaire, une étape critique

L'élevage des espèces marines pondant de nombreux petits œufs et ayant une étape de métamorphose, comme c'est le cas pour la plie rouge, présente de nombreux défis technologiques, le principal étant d'obtenir un bon succès de survie jusqu'à cette métamorphose. L'une des principales pierres d'achoppement pour l'élevage en masse de la plie rouge demeure justement la forte mortalité durant le stade larvaire et lors de la métamorphose. Les chercheurs impliqués dans les travaux sur cette espèce s'accordent pour dire que les causes se trouvent vraisemblablement au niveau de la nutrition et de la digestion, notamment durant le développement du système digestif (de l'ouverture de la bouche jusqu'à une taille standard d'environ 5,5 mm soit environ au 25^{ième} jour de vie ou après 260 degrés-jours).

Dans leur synthèse sur l'ontogénie du développement de l'alimentation exogène chez les larves de poissons marins, Yúfera & Darias (2007) soulignent à quel point cette période est critique pour la survie des larves. Elle s'étend du moment où la bouche s'ouvre jusqu'à celui où une croissance est détectable. Pour que la transition entre une nutrition provenant du vitellin et celle à partir d'aliments exogènes soit réussie il faut que la larve dispose à ce moment précis des caractéristiques anatomiques et physiologiques requises et des aliments appropriés à ses besoins. Par ailleurs d'autres facteurs peuvent s'avérer limitant au succès de la toute première alimentation chez les larves au moment de l'ouverture de la bouche. Il s'agit notamment de la taille de la bouche, limitant la taille des particules ingérables, et la taille de la larve, limitant sa capacité à nager et à chasser. Ainsi une mortalité importante peut survenir à cette étape du développement larvaire si les conditions environnementales et alimentaires ne sont pas adéquates.

Jusqu'à l'atteinte d'une taille de 5-5,5 mm (correspondant à la différenciation de l'estomac), on peut nourrir les larves de plies rouges avec des rotifères. L'espèce *Brachionus plicatilis* est d'usage courant dans le monde entier pour un grand nombre d'espèces de poissons marins. *Brachionus plicatilis* est facilement élevé à une température de 20-25°C. On peut le nourrir avec de la levure de boulangerie ou des microalgues. Il s'agit cependant d'une espèce d'eau chaude (Minkoff 2000) et les qualités nutritives de cette espèce ne rencontrent généralement pas les besoins nutritionnels des larves de poissons, notamment des espèces d'eau froide. Il est donc d'usage courant d'enrichir les rotifères avec différentes formules en vente sur le marché avant de les donner aux larves de

poissons marins. Notons que l'analyse comparative des effets sur les larves de régimes alimentaires constitués des rotifères *Brachionus plicatilis* élevés à 24°C et acclimatés ou non à la température des bassins d'élevage larvaire à 10°C avant de les administrer aux larves n'a démontré aucune différence significative à l'exception de la teneur en DHA (Mercier 2001). Celle-ci était significativement plus élevée chez les larves qui étaient alimentées avec des *Brachionus plicatilis* préalablement acclimatés à la température des bassins.

Des travaux menés à la Station aquicole de Pointe-au-Père au cours des dernières années ont permis de faire progresser les connaissances sur l'élevage du stade larvaire de cette espèce. Il est désormais démontré que l'utilisation d'un aliment mixte, faisant appel à une combinaison de proies vivantes et de nourriture inerte, permet d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec une nourriture traditionnelle composée exclusivement de proies vivantes chez les larves dont le tube digestif est complètement différencié (> 5,5 mm) (Ben Khemis *et al.* 2003). Ce type d'alimentation mixte est de nature à faciliter le travail sur une base industrielle et à diminuer les coûts de production. Par contre, ce type d'alimentation ne convient pas pour les premiers stades de développement (< 5,5 mm) (Ben Khemis *et al.* 2000).

Les besoins nutritionnels des stades larvaires de poissons

Le principal défi de l'élevage du stade larvaire des poissons plats, quelle que soit l'espèce, est de maximiser la survie jusqu'au moment de la métamorphose et d'optimiser leur état physiologique afin de favoriser la productivité des stades juvénile et adulte.

Le taux de croissance chez les larves de poissons est très élevé. Il peut atteindre jusqu'à la moitié de la masse corporelle à chaque jour (Weiser 1994). Il s'agit du taux de croissance le plus élevé chez tous les vertébrés. Les besoins nutritionnels des larves sont ainsi très élevés pour être en mesure de soutenir une telle croissance.

La croissance animale exige la synthèse de protéines pour la fabrication des cellules et donc des tissus et d'organes. Le taux de synthèse protéique est relativement élevé chez les premiers stades de développement. Chez les larves de poissons, notamment, le taux quotidien de synthèse protéique est supérieur à 100% de la teneur en protéines de tout le corps (Houlihan *et al.* 1993). Ce processus de synthèse protéique requiert l'incorporation d'acides aminés libres. Ceux-ci ne sont cependant pas uniquement utilisés pour la fabrication de protéines. Ils sont également utilisés dans la production d'énergie, transformés en acides aminés, utilisés pour la synthèse de lipides et de glucides ou d'autres molécules nécessitant des atomes d'azote (Harel & Place 1998).

Durant les premiers jours de vie, la larve comble ses besoins en acides aminés libres à partir du sac vitellin. Ceux-ci représentent de 20 à 50% du contenu en acides aminés du vitellin.

De 20 à 30% de ces acides aminés libres entreront dans la synthèse de nouvelles protéines et le reste comblera les besoins énergétiques de la larve (Rønnestad *et al.* 1999; Finn *et al.* 1995). Cependant, chez les larves dont le sac vitellin est résorbé, la réserve d'acides aminés libres ne représente qu'un très faible pourcentage de tous les acides aminés du corps (Rønnestad *et al.* 1999; Finn *et al.* 1995). Les besoins métaboliques en acides aminés de la larve sont trop grands pour que les réserves puissent soutenir la synthèse protéique et la croissance (Rønnestad *et al.* 1999) et doivent ainsi être comblés par des apports exogènes.

En conditions d'élevage on doit s'assurer que la nourriture administrée rencontre ces besoins, notamment ceux pour les dix acides aminés essentiels. Ceux-ci sont l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la valine, la lysine, l'arginine et l'histidine (Harel & Place 1998). Tacon & Cowey (1985) soulignent qu'il importe également de fournir à la larve la combinaison d'acides aminés essentiels convenant à ses besoins spécifiques. Une carence de l'un d'eux peut se traduire par une réduction de la capacité d'assimilation de la nourriture et une réduction consécutive de la croissance ainsi que par des malformations (Cahu *et al.* 2003). Or les deux principales proies vivantes utilisées en nurserie de poissons marins, que sont le rotifère et la nauplii d'artémie, ne rencontrent généralement pas les besoins en acides aminés essentiels des larves. À titre d'exemple, Harel & Place (1998) rapportent que pour la brème de mer et le bar rayé, ces proies n'arrivent à combler que la moitié des besoins de ces espèces en méthionine et en tryptophane.

Par ailleurs, Bell *et al.* (1985) font valoir l'importance déterminante de la composition lipidique du régime alimentaire lors de la première alimentation chez les larves de poissons plats tant pour leur développement que pour le succès subséquent de la pigmentation des juvéniles. La synthèse des composantes structurales des membranes cellulaires est d'une importance majeure dans la croissance et le développement des stades larvaires des poissons. Les acides gras polyinsaturés (PUFA), notamment les acides gras essentiels (EFA), entrent dans la composition des phospholipides des membranes cellulaires et les propriétés de ces membranes sont largement tributaires des acides gras qui sont intégrés aux phospholipides (Harel & Place 1998).

Tous jouent un rôle clé dans l'intégrité et la fluidité des membranes. Certains d'entre eux jouent également un rôle métabolique. Les EFA dont le rôle dans le développement larvaire chez les poissons est le mieux documenté dans la littérature scientifique sont :

- l'acide arachidonique (ARA, 20:4 ω 6);
- l'acide docosapentaénoïque (ω 6DPA, 22:5 ω 6);
- l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 ω 3);
- l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 ω 3).

Il s'agit d'acides gras hautement insaturés (HUFA) des familles ω 3 et ω 6. La très faible capacité des poissons marins à biosynthétiser les PUFA, tel le DHA (22:6 ω 3) et l'EPA (20:5 ω 3) est connue depuis longtemps (Sargent *et al.* 2002; Bell *et al.* 2003). Les larves de poissons marins doivent donc trouver une source exogène de ces acides gras essentiels dès

leur première alimentation afin d'avoir une croissance et un développement normal (Sargent *et al.* 1999).

Le DHA est une composante majeure des phospholipides des membranes cellulaires du cortex cérébral, du cœur et de certains éléments de la rétine. Ainsi, les besoins de la larve en DHA sont plus grands dans les premiers stades de développement (Bazan 1990). Des travaux portant sur la nutrition de larves de flétan de l'Atlantique ont mis en lumière qu'un enrichissement des proies vivantes avec des composés riches en DHA se traduit par une augmentation du succès de métamorphose passant de 15% à 75% et du succès de pigmentation qui passe de 50% à 100% (Harel & Place 1998; McEvoy *et al.* 1998a). Copeman & Parrish (2002) ont étudié le profil lipidique de juvéniles de limande à queue jaune récemment métamorphosés. Ils rapportent que les spécimens normalement pigmentés présentaient un pourcentage en DHA plus élevé que les spécimens présentant des défauts de pigmentation ce qui supporte selon ces auteurs la théorie de l'importance du DHA dans la diète larvaire pour assurer le développement de la pigmentation chez les juvéniles.

Des travaux réalisés avec des larves de plie rouge tendent également à démontrer un meilleur taux de survie lors de la métamorphose chez des spécimens nourris avec des proies vivantes préalablement enrichies avec du DHA (Blair *et al.* 1998). Copeman *et al.* (2002) rapportent également une meilleure croissance et un plus grand taux de survie à la métamorphose chez la limande à queue jaune. À l'inverse, Villalta *et al.* (2005a; 2005b) et Morais *et al.* (2004) ne constatent aucun effet de la teneur en DHA des proies sur la

croissance des larves de la sole sénégalaise et sur la survie subséquente des juvéniles post-métamorphiques. On avance l'hypothèse que la courte durée, d'environ 10 jours suite à l'éclosion, de la phase pélagique avant l'amorce de la métamorphose et le changement précoce de régime alimentaire pourraient expliquer ces résultats.

Les rôles des EFA de la famille des $\omega 6$ sont moins bien connus que ceux de la famille des $\omega 3$ bien qu'on sache qu'ils sont essentiels au développement larvaire. Par exemple, il a été démontré qu'une déficience en ARA durant les premiers stades de développement peut affecter le fonctionnement normal du cerveau et du système nerveux (Harel & Place 1998). L'ajout d'ARA dans l'alimentation des larves améliorerait également la croissance (Castell *et al.* 1994; Estevez *et al.* 1997). Par contre d'autres travaux ont mis en lumière une corrélation négative entre le taux d'ARA dans le tissu nerveux et l'incidence d'une pigmentation déficiente chez les turbots et les soles sénégalaises récemment métamorphosés (Villalta *et al.* 2005a et b; Estevez *et al.* 1999) alors que McEvoy *et al.* (1998b) et Estevez *et al.* (2001) font valoir que c'est un faible ratio EPA:ARA qui induit une grande incidence de pigmentation déficiente chez les juvéniles de turbot, de plie japonaise et de flétan de l'Atlantique.

L'ARA et l'EPA peuvent aussi être convertis en eicosanoïdes et notamment en prostaglandines. Les eicosanoïdes interviennent dans plusieurs fonctions physiologiques chez les larves de poissons. Ils stimulent entre autres le transport ionique dans les branchies et les reins (Harel & Place 1998; Beckman & Mustafa 1992). Les prostaglandines, pour leur

part, interviennent dans la transmission neurale, le fonctionnement de l'hypothalamus et la régularisation de la circulation sanguine du cerveau.

De récents travaux se sont intéressés à l'importance de l'acide gras ω 6DPA dans la diète larvaire d'organismes marins (Milke *et al.* 2006; Parrish *et al.* 2007). Lorsque nourries avec des proies riches en cet acide gras, des larves de morue ont montré des taux de croissance significativement supérieurs (Garcia *et al.* 2005; Parrish *et al.* 2007). Le ω 6DPA aurait un rôle structurel important dans les membranes cellulaires ou serait un précurseur de docosanoïdes bioactifs (Parrish *et al.* 2007). Cependant ces auteurs ont démontré que le ω 6DPA ne peut être synthétisé à partir d'autres acides gras, du moins chez les larves de morues. Il doit donc provenir de sources alimentaires exogènes.

Une déficience en acide gras des familles ω 3 et ω 6 dans le régime alimentaire se traduit par une réduction de croissance et de l'acuité visuelle (Shields *et al.* 1999) ainsi que par des désordres structurels et métaboliques. À l'inverse, l'ajout d'acides gras de la famille ω 3 au régime alimentaire des larves a pour effet d'améliorer l'efficacité de la nutrition, la survie ainsi que la croissance (Copeman *et al.* 2002; Harel & Place 1998; Beckman & Mustafa 1992; Bell *et al.* 1985; Le Milinaire 1984).

Les besoins minimums en acide gras essentiels ne sont établis que pour très peu d'espèces. On sait cependant que le DHA est assimilé beaucoup plus rapidement que l'EPA. On s'accorde ainsi pour considérer qu'un aliment larvaire dont le ratio DHA:EPA serait égal

ou supérieur à 2 permettrait d'assurer un fonctionnement optimal des membranes cellulaires alors qu'un ratio inférieur se traduit par une faible croissance et un faible taux de survie des larves (Bell *et al.* 1985; Reitan *et al.* 1994; Rodriguez *et al.* 1997; Blair *et al.* 1998).

Plusieurs études ont démontré que différents régimes alimentaires pouvaient se traduire par des taux de croissance différents chez les larves de poissons marins et notamment chez les larves de poissons plats (Morais *et al.* 2006; Yúfera *et al.* 1995; Ben Khemis *et al.* 2000 et 2003; Fernandez-Diaz *et al.* 2001). L'une des conséquences de ces différences de taux de croissance serait l'accumulation d'une plus ou moins grande quantité de réserves énergétiques et notamment de lipides (Fernandez-Diaz *et al.* 2001).

Or la métamorphose, à l'issue du stade larvaire, nécessite une grande réserve énergétique. Pour obtenir cette énergie les larves utilisent généralement des composés riches en carbone comme les lipides et les glucides. Durant la phase larvaire, les phospholipides constituent la principale source de lipides alimentaires (Kanazawa *et al.* 1985; Kanazawa 1993; Geurden *et al.* 1995; Bell *et al.* 2003) en raison du développement encore rudimentaire du tube digestif chez les larves (Munilla-Moran & Stark 1989; Bisbal & Bengtson 1995). L'accumulation de lipides durant la période pré-métamorphose et leur utilisation durant la métamorphose ont été mises en lumière chez plusieurs espèces (Youson 1988; Kao *et al.* 1997; Pfeiler 1999; Christensen & Korsgaard 1999; Fernandez-Diaz *et al.* 2001). Des travaux avec des larves de sole sénégalaise (*Solea senegalensis*) suggèrent qu'un régime

alimentaire ne permettant pas aux larves d'accumuler suffisamment de réserves énergétiques durant la période pré-métamorphose entraînerait de très forts taux de mortalité durant le processus de métamorphose (Fernandez-Diaz *et al.* 2001).

Le rotifère, une microcapsule vivante

Les larves de poissons plats, notamment celles de plie rouge, peuvent être élevées avec un certain succès au début de leur alimentation exogène en utilisant le rotifère *Brachionus plicatilis* (Villalta *et al.* 2005a & b; Bell *et al.* 2003; Litvak 1996). Cependant, lorsque ces rotifères sont nourris en utilisant simplement de la levure de boulangerie, leur valeur nutritive tend à présenter des déficiences en acides gras essentiels, notamment en DHA et EPA. Or, ces acides gras présentent un caractère critique pour le développement et la survie des larves (Watanabe 1993; Takeuchi *et al.* 1994). De plus, sans enrichissement, le ratio DHA:EPA serait de l'ordre de 0,3 alors que nous avons déjà mentionné qu'il est souhaitable qu'il soit égal ou supérieur à 2.

Le rotifère *Brachionus plicatilis* ne rencontre pas non plus le profil en acides aminés essentiels requis pour plusieurs espèces de poissons. Par exemple, Watanabe & Kiron (1994) ont démontré que le profil en méthionine et en tryptophane, deux des dix acides aminés essentiels, ne représentait que 50% des concentrations requises pour le développement des larves de perche de mer et de bar rayé.

Au début des années 80, il était d'usage courant d'utiliser un mélange d'huile de poisson et de levure «oméga» pour enrichir les proies vivantes avant de les donner aux larves de poissons (Watanabe *et al.* 1983). Depuis lors, de nombreux produits d'enrichissement ont vu le jour sur le marché. Leur variété permet d'obtenir différents profils biochimiques car les différentes espèces de poissons ont des besoins qui leur sont spécifiques, notamment en ce qui a trait au ratio DHA:EPA:ARA (Harel & Place 1998). Ceux de la plie rouge restent à être précisés.

Une revue de littérature tend à démontrer qu'il n'y a que relativement peu d'études portant sur le développement de l'activité enzymatique chez les larves de plie rouge. Cette lacune avait été signalée par Ben Khemis *et al.* (2000). Des larves de plie rouge nourries exclusivement avec une nourriture inerte dès l'ouverture de la bouche se sont montrées incapables d'en assimiler les éléments nutritifs et ont présenté un profil biochimique qui a évolué comme celui de larves non nourries (Ben Khemis *et al.* 2000). Pourtant Mercier *et al.* (2004) ont démontré que chez la plie rouge la présence de trypsine est détectable dès l'ouverture de la bouche et avancent qu'elles seraient en mesure de digérer des protéines au tout début de leur première alimentation. D'autres travaux ont par ailleurs permis de mettre en lumière que l'activité enzymatique de la pepsine demeure très faible chez les larves de plie rouge jusqu'à l'âge de 20 jours (Douglas *et al.* 1999) alors qu'elles ont une taille d'environ 5-5,5 mm. Par la suite, cette activité augmente significativement pour demeurer à un niveau constant jusqu'à la métamorphose. Ces auteurs avancent qu'il est possible qu'au

début de leur développement, les larves n'aient pas la capacité digestive pour s'alimenter exclusivement de nourriture inerte.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer que des proies vivantes contribuent mieux à la nutrition des premiers stades larvaires que la nourriture inerte. L'une d'elle serait que l'activité enzymatique de la proie contribuerait à sa propre digestion chez les larves dont le tube digestif n'est pas complètement différencié (Dabrowski & Glogowski 1977a; 1977b; Lauff & Hofer 1984; Cousin et al. 1987). Kolkovski *et al.* (1997) qui ont étudié la nutrition chez les larves de perche de mer appuient cette hypothèse et ajoutent que des stimuli associés à la présence de la proie vivante déclencheraient le processus digestif chez la larve. Par contre, de nombreuses autres études réalisées avec plusieurs espèces (Lazo *et al.* 2000; Ribeiro *et al.* 1999; Kurokawa *et al.* 1998; Cahu & Zambonino-Infante 1997; Moyano *et al.* 1996; Cahu *et al.* 1995) la réfutent et concluent que les larves de poissons marins synthétisent une quantité suffisante d'enzymes digestives pour ne pas devoir profiter de celles de leurs proies.

Par ailleurs, De Araujo *et al.* (1998) ont démontré une corrélation significative et positive entre l'activité enzymatique (celle de l'estérase) et la taille des larves de plie japonaise. Ces auteurs ont aussi constaté une concomitance entre les faibles activités enzymatiques et de faibles taux de survie et de croissance. Ils concluent que l'activité enzymatique constitue un outil intéressant pour juger de la condition d'un élevage de larves de poissons.

La densité d'élevage larvaire, facteur de risque et de rentabilité

La larviculture des poissons marins est une opération délicate (Dhert *et al.* 1998; Planas et Cunha 1999) qui entraîne des coûts de main-d'œuvre importants pour les producteurs. De plus, la mortalité variable et parfois élevée qui affecte les élevages au moment de la métamorphose tend à réduire encore plus la rentabilité de l'opération. Il serait donc souhaitable d'optimiser l'utilisation des équipements en augmentant la densité des élevages larvaires.

Une interrogation des bases de données bibliographiques indique que peu de travaux ont été réalisés sur cet aspect de l'élevage larvaire des poissons marins et qu'aucun travail ou aucune étude n'a à ce jour porté sur les densités d'élevage larvaire de la plie rouge.

En élevage intensif, on signale des taux de survie pouvant varier de 3,6% à 67% chez *Gadus morhua* (Alver *et al.* 2007; Baskerville-Bridges & Kling 2000; Rosenlund *et al.* 1993). Pour les poissons plats, on rapporte des taux de survie de 20% chez *Paralichthys lethostigma* (Daniels *et al.* 1996) et de 25% à 77% chez *Paralichthys olivaceus* (Bolasina *et al.* 2006).

Des travaux réalisés avec la morue franche ouvrent d'intéressantes pistes de recherche (Baskerville-Bridges & Kling 2000). Ces auteurs ont mis en lumière que la survie des larves était significativement supérieure à haute densité d'élevage. L'explication avancée

est qu'une densité élevée influence le comportement des larves et atténue la dominance sociale et les antagonismes individuels. Des changements de comportements semblables à haute densité ont aussi été rapportés chez le tilapia (Macintosh & De Silva 1984). À l'inverse l'augmentation de la densité d'élevage larvaire de *Paralichthys olivaceus* se traduirait par un ralentissement de la croissance et une survie plus faible lors de la métamorphose (Bolasina *et al.* 2006; Dou *et al.* 2003). Ces résultats variables indiquent que l'effet de la densité d'élevage ne peut être extrapolé d'une espèce à l'autre.

Les travaux portant sur l'effet de la densité sur les larves en élevage présentent cependant un défi expérimental. En effet, la forte mortalité qui survient généralement au début de l'alimentation exogène (Yúfera & Darias 2007; Hatziathanasiou *et al.* 2002), non dépendante de la densité initiale (Dou *et al.* 2003), peut parfois réduire sensiblement les densités initiales et ainsi atténuer l'effet que l'on souhaite vérifier.

A forte densité la disponibilité des proies peut devenir un facteur limitant et entraîner un ralentissement de la croissance. Selon Baskerville-Bridges & Kling (2000), cette difficulté peut être contournée en maintenant une densité de proies égale ou supérieure à 3 ml⁻¹. Ces auteurs signalent cependant qu'il y a alors risque de détérioration rapide de la qualité de l'eau en raison de l'importante accumulation de métabolites résultant de l'intense activité alimentaire dans les bassins d'élevage. On doit alors assurer un taux de renouvellement de l'eau des bassins permettant de maintenir un niveau de NH₃ inférieur à 0,005 mg /L.

Un rotifère indigène à l'habitat de la plie rouge

La plie rouge pond de très nombreux œufs (Scott & Scott 1988; Vaillancourt 1982). En contre-partie ceux-ci sont relativement petits (Klein-MacPhee 1978) et il en va de même de la taille des larves à l'éclosion (Ben Khemis *et al.* 2000). Par conséquent elles requièrent des aliments relativement petits pour leur première alimentation lors de l'ouverture de la bouche. On considère généralement que les aliments doivent avoir une taille représentant de 25% à 50% celle de la bouche de la larve pour que celle-ci puisse l'ingérer (Yúfera & Darias 2007).

Par ailleurs, nous avons déjà signalé que Ben Khemis *et al.* (2000) ont démontré que les aliments inertes produits commercialement ne convenaient pas au début de la période d'alimentation larvaire de la plie rouge. Ainsi il faut leur fournir une diète à base de rotifères vivants. Cependant à ce jour aucun rotifère indigène à l'habitat de la plie rouge, ni même d'eau froide, n'est produit en masse. D'ailleurs selon la littérature consultée, la production de masse d'un rotifère d'eau froide ne semble pas encore avoir été réalisée avec succès à ce jour. L'utilisation d'une proie zooplanctonique indigène à l'habitat de la plie rouge pourrait cependant permettre de rencontrer naturellement ses besoins nutritionnels sans devoir recourir à leur enrichissement en lipides, notamment en acides gras. Ainsi pour espérer être en mesure de mener à bien une expérience visant à comparer les effets d'un régime alimentaire composé de rotifères d'eau froide indigènes au Saint-Laurent avec un

régime composé de *Brachionus plicatilis* enrichis, il fallait au préalable mettre au point un protocole de production de masse de ce rotifère d'eau froide.

L'examen des paramètres de production de masse du rotifère *Brachionus plicatilis* (Coves *et al.* 1986), universellement utilisé dans les écloséries de poissons marins, et d'élevage expérimentaux du rotifère *Synchaeta sp.*, souvent rencontré en milieu estuarien (Egloff 1986 et 1988; Heinbokel *et al.* 1988; Brownell 1988; Oltra & Todoli 1997; Oltra *et al.* 2000; Bosque *et al.* 2001), permet néanmoins d'identifier les paramètres régissant les conditions d'élevage. Cependant, il est nécessaire de pouvoir déterminer les conditions optimales pour en arriver à une production de masse sur une période de temps suffisamment longue pour supporter la période de première alimentation larvaire.

Ainsi si le repiquage hebdomadaire des élevages dans des bidons propres est important pour éviter un effondrement des populations, le taux de renouvellement quotidien du milieu d'élevage aurait une influence directe sur la production (Coves *et al.* 1986; R. Fournier comm. pers.). Plusieurs auteurs signalent également que si *Brachionus plicatilis* ou d'autres espèces peuvent être nourris avec de la levure de boulangerie, l'ajout de microalgues, et notamment d'un mélange de plus d'une espèce, peut améliorer les performances de l'élevage et influencer quelque peu sur le profil d'acides gras des rotifères (Coves *et al.* 1986; Brownell 1988; Egloff 1988; Dhert *et al.* 2001; Suchar & Chigbu 2006; Kostopoulou & Vadstein 2007). La production de microalgues peut cependant s'avérer coûteuse et requérir des moyens techniques sophistiqués. Il est possible de réduire les besoins en production de

microalgues en remplaçant une partie du régime alimentaire algal par des préparations alimentaires commerciales pour rotifères.

Les objectifs de cette thèse

Cette thèse vise à préciser les paramètres d'élevage des larves de plie rouge afin d'optimiser leur condition physiologique et nutritionnelle dans le but d'augmenter le succès de production de juvéniles de qualité destinés à l'engraissement.

Le premier objectif est d'étudier les besoins nutritionnels des larves de plie rouge durant la phase de première alimentation avec des proies vivantes, soit de l'ouverture de la bouche jusqu'au moment où elles peuvent être sevrées pour passer à une alimentation inerte. Pour ce faire nous avons étudié l'effet de différents enrichissements commerciaux pour rotifères, présentant des teneurs différentes en protéines et en lipides ainsi qu'un ratio DHA:EPA plus ou moins élevé, sur le profil biochimique des larves, leur croissance et leur survie à la métamorphose.

Le deuxième objectif est de déterminer si les larves de plie rouge peuvent être élevées à densité élevée sans affecter négativement la croissance et la survie à la métamorphose. On vise notamment à documenter l'évolution de la composition biochimique des larves élevées à différentes densités, cet aspect n'ayant généralement pas été couvert dans les études antérieures consultées.

Le troisième objectif est de documenter la possibilité de produire un rotifère d'eau froide, indigène à l'estuaire du Saint-Laurent et de définir les conditions permettant de soutenir une production de masse. À moyen terme, ceci permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle une proie zooplanctonique, issue du même environnement, constitue une meilleure source alimentaire pour les larves de plies rouges qu'un rotifère d'eau chaude qu'il soit enrichi ou non à l'aide d'additifs alimentaires. L'élevage de ce rotifère d'eau froide ouvrirait possiblement des perspectives intéressantes pour l'aquaculture des poissons marins d'eau froide en général.

CHAPITRE 1

.

**IMPORTANCE DE LA DIÈTE EN ACIDES GRAS POUR LES
PREMIERS STADES DE DÉVELOPPEMENT CHEZ LA PLIE
ROUGE (*PSEUDOPLEURONECTES AMERICANUS*)**

Introduction

The main issue in larval rearing of marine flatfish is the maximization of survival at metamorphosis and the optimization of physiological condition to enhance productivity of post-metamorphic stages. According to many recent studies, differences among larval diets may influence the growth rate in flatfish larvae (Yúfera *et al.* 1995; Ben Khemis *et al.* 2000; 2003; Fernandez-Diaz *et al.* 2001; Copeman *et al.* 2002). Fish larvae have the highest growth rate of vertebrates, and their nutritional requirements are likewise high. Daily protein synthesis in fish larvae is greater than 100% of the body's protein content (Houlihan *et al.* 1993). This process incorporates amino acids that come from the yolk sac during the first few days (Rønnestad *et al.* 1999) and later on from external supplies. Deficiencies in essential amino acids or inappropriate amino acid ratios in the diet could reduce food assimilation by fish larvae and thus slow the growth rate (Tacon & Cowey 1985).

The importance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the diet during first feeding of marine fish larvae has also been investigated (Watanabe & Kiron 1994; Navarro *et al.* 1999; Sargent *et al.* 1999; Copeman *et al.* 2002; Villalta *et al.* 2005b; Morais *et al.* 2006; Seoka *et al.* 2007). The enrichment of larval fish diets with ω 3 and ω 6 fatty acids is

essential for normal growth and development and increases survival (Sargent *et al.* 1999; Bell *et al.* 2003; Seoka *et al.* 2007). Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω 3) and arachidonic acid (ARA, 20:4 ω 6) are essential fatty acids important in the structural integrity and functionality of cell membranes (McEvoy *et al.* 1998a, b; Estevez *et al.* 1999). The addition of ARA to larval diets enhances growth rates (Castell *et al.* 1994; Estevez *et al.* 1997). DHA requirements are very high during early larval life (Tocher & Sargent 1984): it is a major component of phospholipids in the brain cortex, heart and in some elements of the retina's cell membrane. EPA and ARA are involved in the formation of eicosanoids that play an essential role in physiological processes such as branchial and kidney ionic regulation (Beckman & Mustafa 1992; Sargent 1995). In addition to their absolute concentrations, the ratios of some PUFA also seem to be key elements in larval development. For example, high levels of malpigmentation occur in Atlantic halibut and turbot fed with low EPA:ARA ratios (McEvoy *et al.* 1998b; Estevez *et al.* 1999) and in Senegalese sole fed prey with high ARA:DHA and high ARA:EPA ratios (Villalta *et al.* 2005a). Optimal membrane function requires a DHA:EPA ratio equal to or higher than 2 (Harel & Place 1998; Blair *et al.* 1998). Accumulation of lipids during the larval stage is critical for metamorphosis and may influence the success of metamorphosis in marine fish species (Youson 1988; Kao *et al.* 1997; Pfeiler 1999; Christensen & Korsgaard 1999; Fernandez-Diaz *et al.* 2001).

For many fish species, live prey remain the only food source readily accepted and used by young larvae. However, the nutritional profiles of live prey like rotifers may not meet larval

fish requirements, so prey have to be enriched (Watanabe *et al.* 1983; Watanabe 1993; Watanabe & Kiron 1994). One of the key issues in enrichment is to be able to meet the specific requirements of the fish species to be raised. The aim of this study was to test how different rotifer enrichments, with high levels of proteins, phospholipids, or high DHA:EPA ratios, modify larva biochemical composition, growth, and ultimately juvenile survival success in winter flounder.

Materials and Methods

Rearing procedures

Broodstock were captured in a commercial weir trap in the coastal zone of the St. Lawrence estuary. Fish were kept in 200 L rectangular tanks supplied with ambient seawater and under natural photoperiod conditions until spawning. Eggs were fertilized according to the procedure described in Ben Khemis *et al.* (2000). Fertilized eggs were placed in incubators supplied with running upwelling ambient seawater (year 1: $9.5 \pm 1^\circ\text{C}$; year 2: $7.5 \pm 1^\circ\text{C}$) and kept in darkness until hatching. At hatching, larvae were randomly transferred into six 55-L cylindro-conical tanks coated with dark green vinyl liners installed in a cold room maintained at $10 \pm 0.4^\circ\text{C}$; this temperature is typical of this zone of the St. Lawrence estuary at this time of the year. Tanks were supplied with filtered ($5 \mu\text{m}$) seawater and a 12:12 L:D photoperiod was provided (incandescent bulbs, 400 lux at water surface). Aeration in the central area of the tanks created a smooth upwelling. Initial densities were 190 larvae L^{-1} (year 1) and 125 larvae L^{-1} (year 2). From first feeding to

metamorphosis, water renewal was limited to the night period to avoid loss of prey. Water was replaced at 0.2 L min^{-1} , resulting in complete water renewal overnight (Sprague 1973). Every morning before turning on the lights, we added 1.0 g of Starter Formula Algae Paste (Innovative Aquaculture Products Ltd.) to each tank for green water culture, which prevents wall syndrome and enhances the optical quality of the rearing environment (Naas *et al.* 1992; Zambonino Infante *et al.* 1998).

Experimental design

For the first 260 degree-days (dd), which corresponds to the rotifer (*Brachionus plicatilis*) feeding period, larvae were fed rotifers that had been raised using one of three commercial diets selected with the aim of obtaining rotifers with different nutritional characteristics: unenriched rotifers that were fed phytoplankton only (NE), enrichment characterized by high protein content (HP) (Culture Selco, INVE Aquaculture), enrichment characterized by high lipid content (HL) (DHA-Protein Selco, INVE Aquaculture), and enrichment characterized by a high DHA:EPA ratio (HDE) (Algamac, Aquafauna, Biomarine) (Table 1). The enrichments were added to the rotifer tanks four times a day (1 g per million rotifers). Larval rearing tanks were randomly assigned one of the four rotifer diets, each rotifer diet was tested on duplicate larval tanks, and cultures were carried out over two years to obtain all comparisons. High total lipid enrichment was tested in year 1 and high protein and high DHA:EPA were tested during year 2; controls were run the two years. Rotifers were given at a density of 3-5 prey ml^{-1} and adjusted twice daily during the light period (Ben Khemis *et al.* 2003; Mercier *et al.* 2004). Even though the experimental

feeding treatments were stopped at 260 dd, experiments were continued to observe the potential impacts of fatty acid accumulation at first feeding at metamorphosis (~ 360 dd).

Table 1 : Composition (according to manufacturers' specifications) of enriched diets fed to rotifers.

	HP	HL	HDE
	High protein	High total lipid	High DHA :EPA
Crude protein (%)	35	27	39
Lipids (%)	15	29	32
DHA:EPA	1	2	40

HP = high protein; HL = high total lipids; HDE = high DHA:EPA.

At 260 dd, all larvae were fed newly hatched *Artemia franciscana* (San Francisco brand, Argent Chemical Laboratories) and a commercial microencapsulated diet (Hatchfry-Encapsulon, Argent Chemical Laboratories) according to Ben Khemis *et al.* (2003).

Sampling and biochemical analysis

The mean hatching day was considered as day 0 (0 dd) as in Rogers (1976). Samplings for growth measurements and biochemical analysis (in triplicate for rotifers and larvae for each culture tank) were performed randomly in each tank before the light period began and before prey distribution. For each rotifer culture tank, 15 L of culture were filtered through a 150 μ m nitex screen and rinsed with Millipore-filtered seawater. The filtered rotifers were separated into aliquots and stored at -80°C. Larvae were sampled at

mouth opening (40-48 dd) and at 120, 190, 260, and 350 dd (Figure 5). Larvae were individually rinsed three times in Millipore-filtered seawater, pooled (20-60 to obtain at least 0.8 g of dry mass) in 1.5 ml microcentrifuge tubes, frozen on dry ice and stored at -80°C. Ten larvae per tank were measured (standard length) on each sampling day. Measurements were taken using an ocular micrometer under a binocular microscope. Larvae were fixed with one drop (30 μ l) of 37.6% formalin and length was corrected using the Hjörleifsson & Klein-MacPhee (1992) equation. Total protein and nucleic acid concentrations were determined on each sampling day. For lipid and fatty acid composition, larvae were sampled at mouth opening, 120, and 260 dd (figure 5).

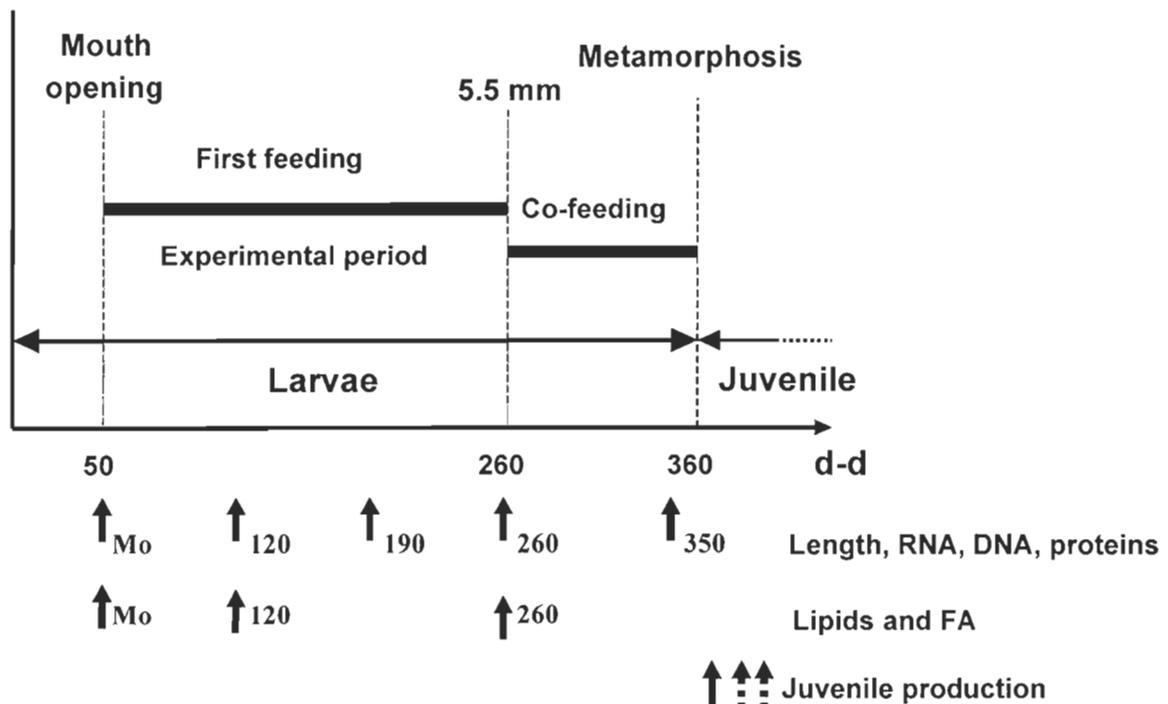


Figure 5 : Experimental sampling design.

At metamorphosis (~ 360 dd), settled juveniles were gently siphoned from the bottom of each tank and counted. This operation was repeated every two days in each tank until the number of juveniles dropped below 10 (after about 2 weeks). In year 2, pigmentation and fin erosion were evaluated at settlement using a modification of two qualitative methods previously described (Moore *et al.* 1996; Fairchild & Howell 2001). To qualify the development of pigmentation and fin erosion, we used a scale of 0-5 (pigmentation: 0 for total lack of pigmentation and 5 for normal pigmentation; fin erosion: 0 for total lack of erosion and 5 for complete fin erosion). The changes in pigmentation and fin erosion during the experiment were tested using a median test (Sokal & Rohlf 1995).

Samples for protein and nucleic acid analyses were homogenized on ice in autoclaved distilled water using an ultrasonic liquid processor (Sonicator model XL2010) for 30 s or more at a power of 100 W. Total protein content was determined on duplicate subsamples using the Hartree (1972) modification of the Lowry method. Bovine serum albumin (Sigma A-4503) was used as the standard. Nucleic acid (RNA, DNA) concentrations were determined using the Munro & Fleck (1966) modification of the Schmidt-Thannhauser method adapted by Buckley (1979) for microquantities present in fish larvae. Type III RNA from baker's yeast (Sigma R-7125) and DNA from calf thymus (Sigma D-3664) were used as standards. Lipids were extracted in chloroform/methanol using the Folch *et al.* (1957) method as modified by Parrish (1998). Lipid classes were analyzed using chromarod thin layer chromatography with quantification by flame ionization detection (Parrish 1998) on a Mark V Iatroscan (Iatron laboratories). Fatty acid composition was determined from fatty

acid methyl esters (FAME) obtained by transesterification of acyl lipid classes (Morrison & Smith 1964; Budge & Parrish 2003). Fatty acid analyses were performed using a Varian model 3400 GC fitted with an autosampler and a flame ionization detector. For rotifers, lipid results were expressed in mg per gram. Fatty acid results were expressed as percentages of total fatty acids. All other lipid results were expressed as μg per larva.

Data analysis

All statistical analyses were done with STATISTICA software version 5.1 (1997 edition). Normality of the data was examined before each statistical analysis using the Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity of variance was tested using the F-max test (Sokal & Rohlf 1995). Data were transformed when necessary to meet requirements of either normality or homoscedasticity. Differences among biochemical variables were tested using two-way ANOVA analysis. Growth in length was compared between replicates and among diets using ANCOVA. Survival of post-metamorphic juveniles was expressed as the percentage of the initial number of larvae and compared among experiments using ANOVA. A posteriori Tukey tests were applied when required. We used $\alpha = 0.05$ for all statistical tests.

Results

Biochemical composition of prey

Rotifers enriched with the high total lipid (HL) diet showed the highest protein content and those enriched with the high DHA:EPA ratio (HDE) had the lowest protein

content (Table 2). Except for NE rotifers, which contained a higher percentage of steryl/wax esters, rotifers enriched with the different diets were not significantly different in terms of total lipids or for most of the different classes of lipids. The exception was for phospholipid concentrations, which had the highest value in the HL treatment (17% compared to the lowest value of 8% for the HDE treatment).

The most interesting feature here is that we were able to obtain a large range of DHA:EPA ratios using these different enrichments, i.e., from 0.04 (NE) to 3.24 (HDE) (Table 3), while keeping most of the other important PUFA (ARA and EPA) relatively constant. This is explained by the DHA content, which increased from 0.6% of the fatty acids in non-enriched (NE) rotifers to 21.1% in those enriched with HDE. We observed a similar but nonsignificant pattern in total ω 3 and Σ PUFA.

Saturated and monounsaturated fatty acids (Σ SFA, Σ MUFA) were significantly different among treatments (Table 3). HP and HL had lower values of Σ SFA than NE and HDE. Results for Σ MUFA had the lowest value for the HDE treatment and the highest for the HP treatment.

Table 2: Biochemical composition of live prey (*Brachionus plicatilis*) enriched with different commercial formulations.

Enrichment type	NE	HP	HL	HDE
		(DHA:EPA = 1)	(DHA:EPA = 2)	(DHA:EPA = 40)
Protein content *	25.9 ± 3.05 ^{ab}	27.3 ± 5.33 ^{ab}	35.0 ± 2.47 ^b	21.9 ± 1.85 ^a
Total lipids *	39.7 ± 20.21	11.9 ± 6.14	21.7 ± 3.87	16.4 ± 7.26
Lipid class **				
Steryl/wax esters	16 ± 7 ^b	2 ± 3 ^a	5 ± 4 ^{ab}	7 ± 4 ^{ab}
Triacylglycerols	36 ± 16	31 ± 6	44 ± 15	32 ± 10
Free fatty acids	n.d.	14 ± 12	6 ± 8	13 ± 10
Sterols	17 ± 15	5 ± 5	4 ± 6	4 ± 3
Acetone mobile polar				
lipids	7 ± 11	21 ± 10	14 ± 12	14 ± 7
Phospholipids	9 ± 5 ^a	13 ± 3 ^{ab}	17 ± 40 ^b	8 ± 3 ^a

* Results in mg / g ww (mean ± SD, n = 3 pools). ** Results in % of total lipids (mean ± SD, n = 3 pools). Means with different superscripts are significantly different (p < 0.05). NE = non-enriched; HL = high total lipids; HP = high protein; HDE = high DHA:EPA.

Table 3 : Fatty acid composition of live prey (*Brachionus plicatilis*) enriched with different commercial formulations.

Fatty acid	NE	HP	HL	HDE
		(DHA:EPA = 1)	(DHA:EPA = 2)	(DHA:EPA = 40)
ΣSFA	35.2 ± 2.9 ^b	22.7 ± 3.8 ^a	25.0 ± 0.9 ^a	34.7 ± 4.0 ^b
ΣMUFA	33.3 ± 8.4 ^b	47.6 ± 3.2 ^c	32.6 ± 1.6 ^b	17.8 ± 4.9 ^a
ΣPUFA	31.5 ± 9.6	37.1 ± 0.8	48.3 ± 10.0	59.3 ± 16.9
Total ω3	10.4 ± 8.0	23.2 ± 11.4	26.8 ± 2.7	32.0 ± 9.2
Total ω6	5.1 ± 2.8	8.1 ± 7.0	12.7 ± 2.0	13.3 ± 1.2
ARA	1.9 ± 1.7	1.1 ± 1.0	1.9 ± 0.2	3.8 ± 0.5
EPA	7.9 ± 6.9	11.1 ± 6.7	7.2 ± 0.4	6.8 ± 2.5
DHA	0.6 ± 0.5 ^a	5.8 ± 3.8 ^{ab}	12.9 ± 1.3 ^{bc}	21.1 ± 6.1 ^c
DHA:EPA	0.04 ± 0.1 ^a	0.51 ± 0.0 ^a	1.78 ± 0.1 ^{ab}	3.24 ± 1.1 ^b

Results in % of total fatty acids (mean ± SD, n = 3 pools). Means with different superscripts are significantly different (p < 0.05). NE = non-enriched; HL = high total lipids; HP = high protein; HDE = high DHA: EPA.

Growth indicators in control larvae

Based on standard length measurements, we observed no differences in growth rate between the two years in the control larvae (fed with non-enriched rotifers) (figure 6) even though larvae were smaller at mouth opening in year 1. Protein content (figure 7a) and the protein:RNA ratio (figure 7b) differed between the two groups of control larvae from mouth opening to 190 dd but were similar at 260 and 350 dd. On the other hand, the RNA:DNA ratios were similar for both years ($p = 0.6$, $F = 2.8$, $df = 1$). Because of the differences observed in standard length, protein contents and protein:RNA ratios, we analyzed the data separately by year.

Biochemical composition and larval length

During larval ontogeny of winter flounder, we observed no effect in either year of rotifer enrichment for total lipid content or for most lipid classes. However, total lipids per larva increased from 120 to 260 dd (Tables 4 and 5). Larvae contained higher proportions of phospholipids at the end of the first feeding period (260 dd). In year 2, the HDE group had a significantly lower percentage of triacylglycerol (TAG) at 120 dd, but the groups were similar later (260 dd) (Table 5). Generally, the different diets we tested had only slight effects on the fatty acid composition of larvae. In the first experiment, when NE and HL were compared, no significant difference was observed in fatty acid composition. In the second experiment, the comparison among the three treatments showed differences mainly between HP and HDE. At 120 dd, \sum MUFA significantly decreased between NE

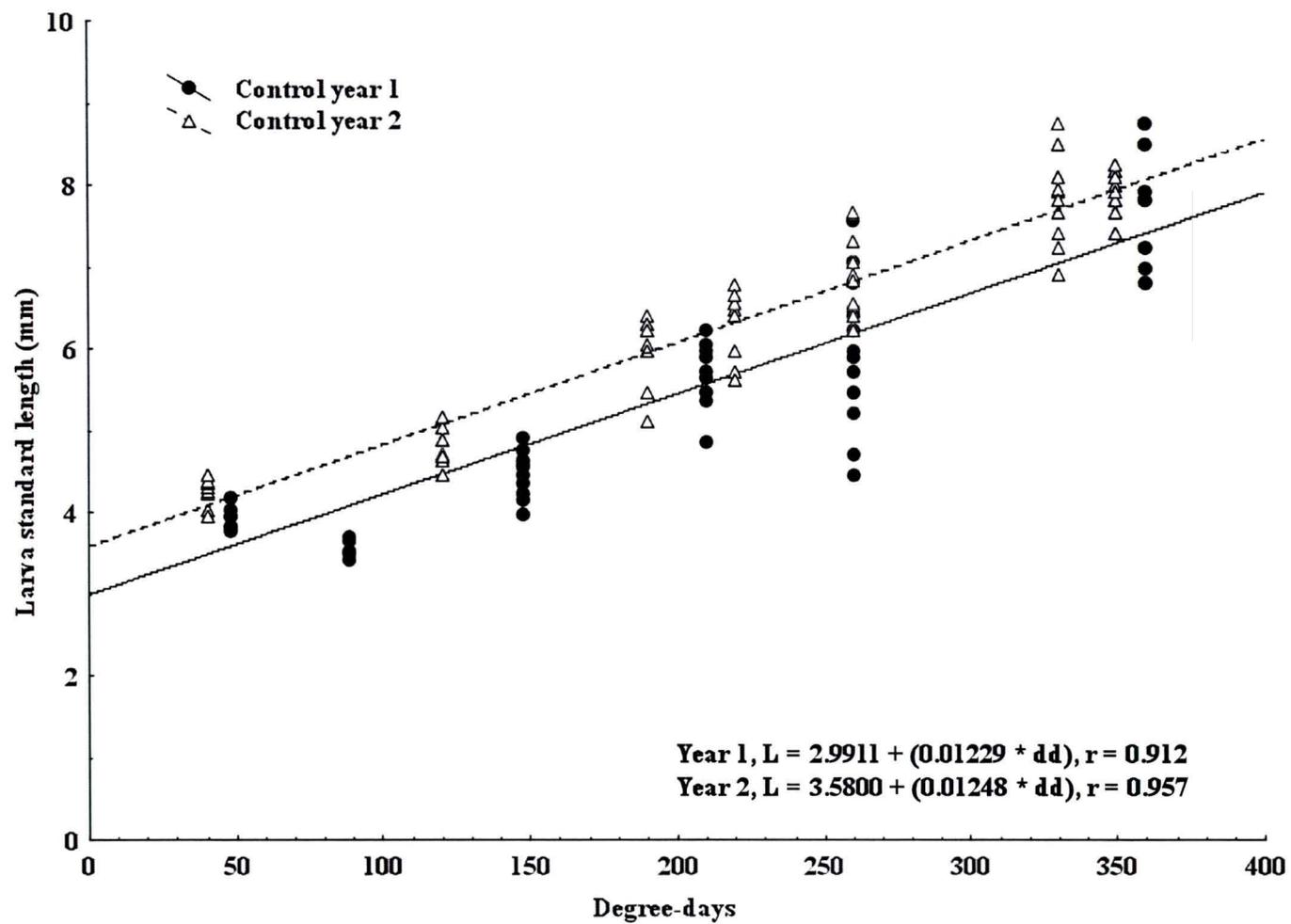


Figure 6 : Linear regression of standard length (mm) in control larvae fed non-enriched (NE) rotifers for each year of the experiment.

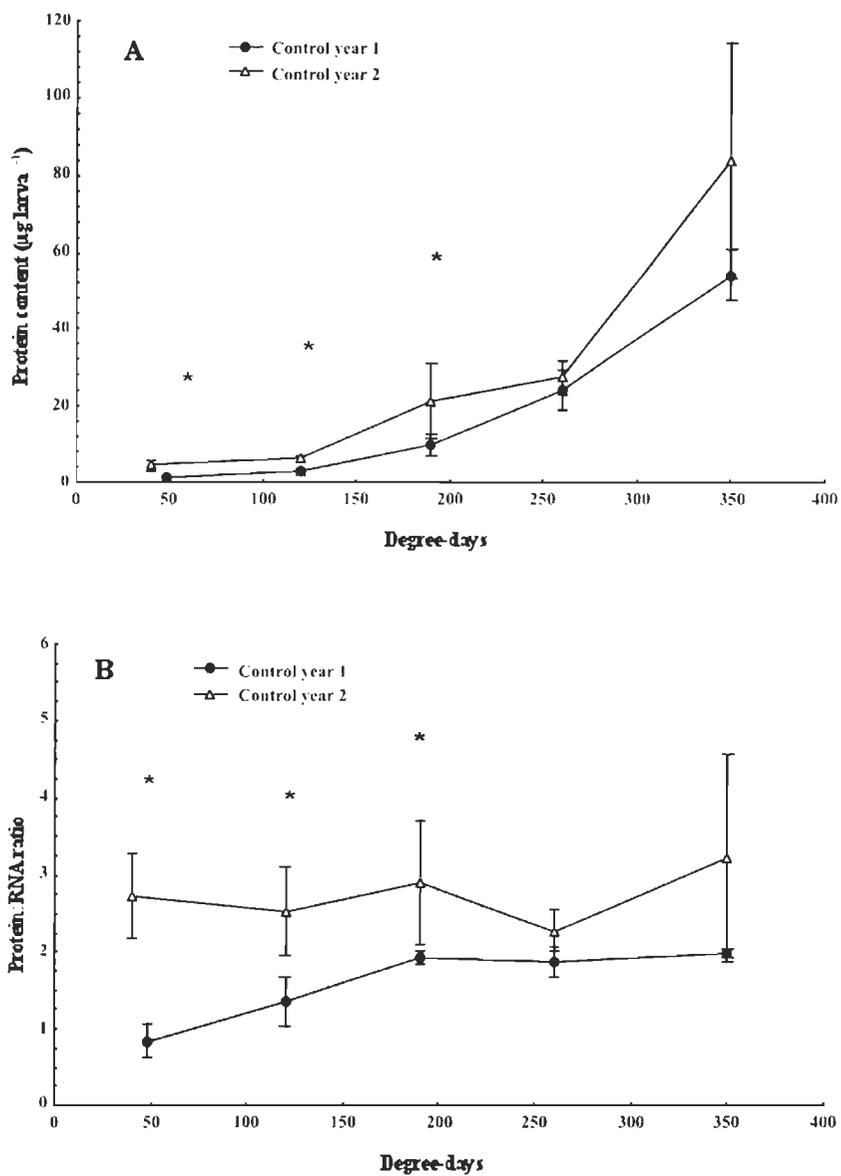


Figure 7 : Protein content per larvae (A) and protein:RNA ratio (B) in control larvae fed non-enriched (NE) rotifers for the two years of the experiment.

Mean \pm SD, asterisks indicate significant differences between the two years for a given sampling date.

Tableau 4 : Total lipids, lipid class and fatty acid composition of larvae feeding on rotifers enriched with different diets, year I.

	Mouth opening	NE 120 dd	HL 120 dd	NE 260 dd	HL 260 dd
Total lipids*	6.3 ± 7.53	3.7 ± 4.20	4.4 ± 4.36	30.2 ± 22.07	16.6 ± 8.9
Lipid class**					
Steryl/wax esters	2 ± 3	n.d.	n.d.	3 ± 3	4 ± 5
Triacylglycerols	7 ± 8	13 ± 21	13 ± 21	18 ± 11	21 ± 16
Free fatty acids	5 ± 4	5 ± 4	6 ± 5	3 ± 2	2 ± 3
Sterols	25 ± 21	31 ± 12	31 ± 19	7 ± 6	20 ± 18
Acetone mobile polar lipids	27 ± 14	12 ± 2	12 ± 12	24 ± 15	24 ± 30
Phospholipids	23 ± 23	27 ± 23	33 ± 20	38 ± 26	23 ± 22
Fatty acid composition***					
ΣSFA	35.4 ± 6.8	18.5	35.9 ± 9.3	26.9 ± 3.1	28.8 ± 5.0
ΣMUFA	24.5 ± 6.0	13.7	22.5 ± 7.1	25.5 ± 1.9	30.0 ± 13.5
ΣPUFA	40.1 ± 0.8	64.7	41.3 ± 1.9	47.2 ± 0.6	41.3 ± 18.3
Σω3	30.6 ± 1.1	28.7	30.6 ± 2.2	26.3 ± 7.5	20.5 ± 7.6
Σω6	6.6 ± 0.0	3.9	8.4 ± 1.7	10.6 ± 0.9	12.5 ± 6.2
AA	3.2 ± 0.0	1.0	3.5 ± 0.4	5.7 ± 0.8 ^b	2.4 ± 0.8 ^a
EPA	9.2 ± 1.2	20.6	7.9 ± 1.01	12.0 ± 5.2	6.3 ± 3.1
DHA	16.5 ± 3.2	4.7	15.8 ± 1.2	4.7 ± 1.5	10.1 ± 3.8

Larvae at mouth opening were not included in the statistical analysis. * Results in mg / larvae (mean ± SD, n = 3 pools). ** Results in % of total lipids (mean ± SD, n = 3 pools). *** Results in % of total fatty acids (mean ± SD, n = 3 pools). Means with different superscripts indicate significant differences between treatments for the same sampling day (p < 0.05). Bold characters indicate significant differences between 120 and 260 degree-days for the same diet (p < 0.05). NE = non-enriched; HL = high total lipids. Fatty acid composition in 120 dd larvae fed non-enriched prey could only be evaluated on one larval pool; these data were not included in the statistical analysis.

Table 5 : Total lipids, lipid class and fatty acid composition of larvae feeding on rotifers with enriched different diets, year 2.

	Mouth opening	NE 120 dd	HP 120 dd	HDE 120 dd	NE 260 dd	HP 260 dd	HDE 260 dd
Total lipids*	7.8 ± 2.68	5.6 ± 3.62	8.7 ± 0.42	9.5 ± 6.41	24.0 ± 14.03	30.5 ± 17.16	18.6 ± 7.24
Lipid class**							
Steryl/wax esters	5 ± 5	16 ± 5	11 ± 10	5 ± 1	3 ± 4	5 ± 2	9 ± 5
Triacylglycerols	27 ± 17	49 ± 9 ^b	32 ± 9 ^b	6 ± 1 ^a	23 ± 12	23 ± 5	29 ± 3
Free fatty acids	16 ± 27	n.d.	n.d.	1 ± 1	7 ± 10	0 ± 1	n.d.
Sterols	18 ± 25	9 ± 5	18 ± 17	44 ± 25	6 ± 2	11 ± 7	13 ± 6
Acetone mobile polar lipids	6 ± 7	6 ± 9	7 ± 13	n.d.	23 ± 32	22 ± 23	n.d.
Phospholipids	?	20 ± 0.0	14 ± 5	9 ± 5	30 ± 15	31 ± 19	36 ± 15
Fatty acid composition***							
ΣSFA	27.3 ± 10.8	29.5 ± 1.6	38.4 ± 9.8	35.0 ± 7.1	24.6 ± 5.0	24.5 ± 2.0	27.7 ± 0.8
ΣMUFA	22.3 ± 10.0	25.5 ± 5.6 ^b	23.5 ± 3.2 ^{ab}	9.3 ± 4.8 ^a	20.2 ± 0.7 ^a	31.4 ± 3.0^b	23.7 ± 0.6^a
ΣPUFA	49.2 ± 20.4	44.7 ± 7.6	38.1 ± 8.3	55.7 ± 2.3	55.3 ± 4.3	44.1 ± 3.7	48.6 ± 0.9
Σω3	22.8 ± 13.3	31.7 ± 10.4 ^{ab}	27.8 ± 4.8 ^a	53.2 ± 2.8 ^b	31.0 ± 9.7	25.7 ± 3.3	32.8 ± 2.4
Σω6	12.9 ± 10.9	9.9 ± 1.3	10.3 ± 3.8	2.5 ± 0.5	14.7 ± 0.4	11.8 ± 1.8	13.9 ± 1.9
AA	0.6 ± 1.0	5.3 ± 0.5 ^b	2.1 ± 0.8 ^a	n.d.	4.8 ± 2.1	4.0 ± 0.7	6.3 ± 0.3
EPA	3.8 ± 3.8	12.7 ± 3.8	8.8 ± 2.7	12.0 ± 0.3	12.8 ± 1.9	10.8 ± 3.2	11.8 ± 1.0
DHA	12.2 ± 5.9	13.2 ± 6.4 ^a	14.6 ± 2.2 ^a	35.9 ± 0.0 ^b	2.6 ± 1.0 ^a	4.1 ± 1.1^a	9.8 ± 0.7^b

Larvae at mouth opening were not included in the statistical analysis. * Results in mg / larvae (mean ± SD, n = 3 pools). ** Results in % of total lipids (mean ± SD, n = 3 pools). *** Results in % of total fatty acids (mean ± SD, n = 3 pools). Means with different superscripts indicate significant differences among treatments for the same sampling day (p < 0.05). Bold characters indicate significant differences between 120 and 260 degree-days for the same diet (p < 0.05). NE = non-enriched; HP = high protein; HDE = high DHA:EPA.

and HDE. $\Sigma \omega_3$ and DHA increased between HP and HDE. The difference in the DHA content was largest, with an increase from 13% to 36% at 120 dd. At 260 dd, the difference between the treatments was less pronounced, with DHA levels of only 2.6% in NE and 9.8% in HDE.

The DHA:EPA ratio dropped dramatically in control larvae (NE) compared to the ratio observed at mouth opening while it remained stable in larvae fed HL-enriched rotifers through 260 dd (figure 8a). In the second year, the DHA:EPA ratio remained high only with the HDE treatment (figure 8b). At 260 dd, the DHA:EPA ratio decreased in all treatments but was still highest in the HDE treatment.

The HL or HP rotifer enrichment did not improve or inhibit growth in larvae (figure 9a). However, control larvae grew better than one of the larval groups fed HDE-enriched rotifers (figure 9b). Similarly, larval diet had no effect on protein:RNA (year 1: $p = 0.84$, $F = 0.04$, $df = 1$; year 2: $p = 0.83$, $F = 0.18$, $df = 2$) or RNA:DNA (year 1: $p = 0.63$, $F = 0.24$, $df = 1$; year 2: $p = 0.09$, $F = 2.57$, $df = 2$) ratios for the whole experimental period.

Juvenile survival

At the end of larval rearing, juvenile survival, i.e., the percentage of the initial number of larvae that metamorphosed and settled to the bottom of the tanks, ranged from 3.2% to 14.1% (Table 6). In the first year, mass mortality occurred and was noticeable at 250 dd.

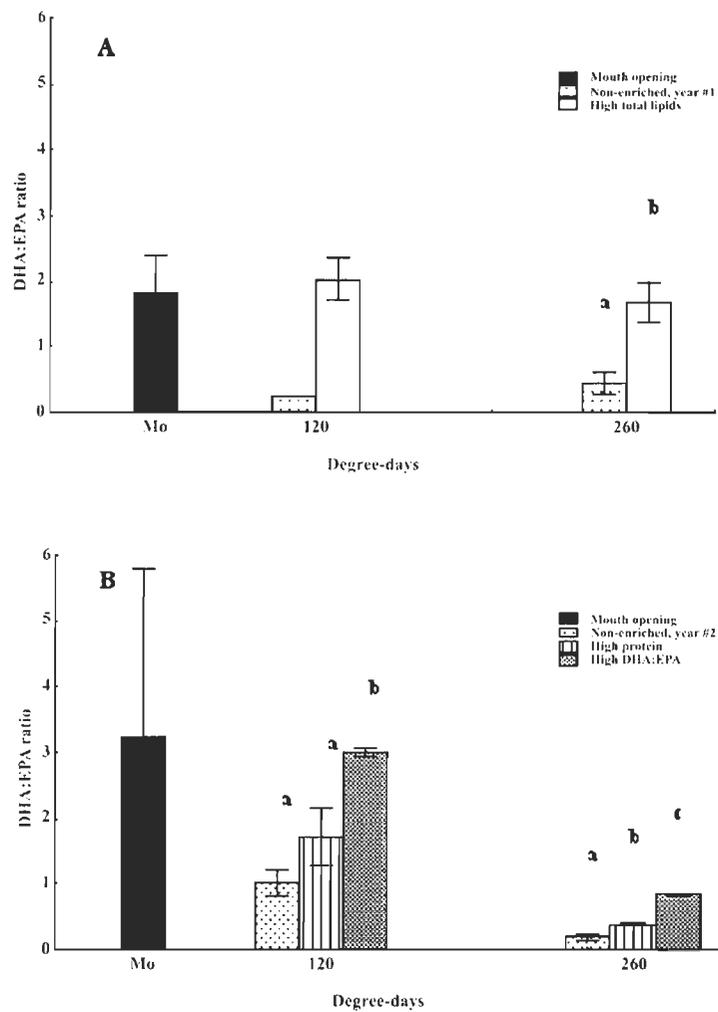


Figure 8 : DHA:EPA ratios (mean \pm SD) at mouth opening, 120 and 260 degree-days in larvae fed with a) non-enriched rotifers and those enriched with high total lipids and b) non-enriched rotifers and those enriched with high protein and high DHA:EPA.

Different letters indicate significant differences among treatments for a given sampling day. Larvae at mouth opening were not included in the statistical analysis. Fatty acid composition in 120 dd larvae fed non-enriched prey in year 1 could only be evaluated on one larval pool; these data were not included in the statistical analysis.

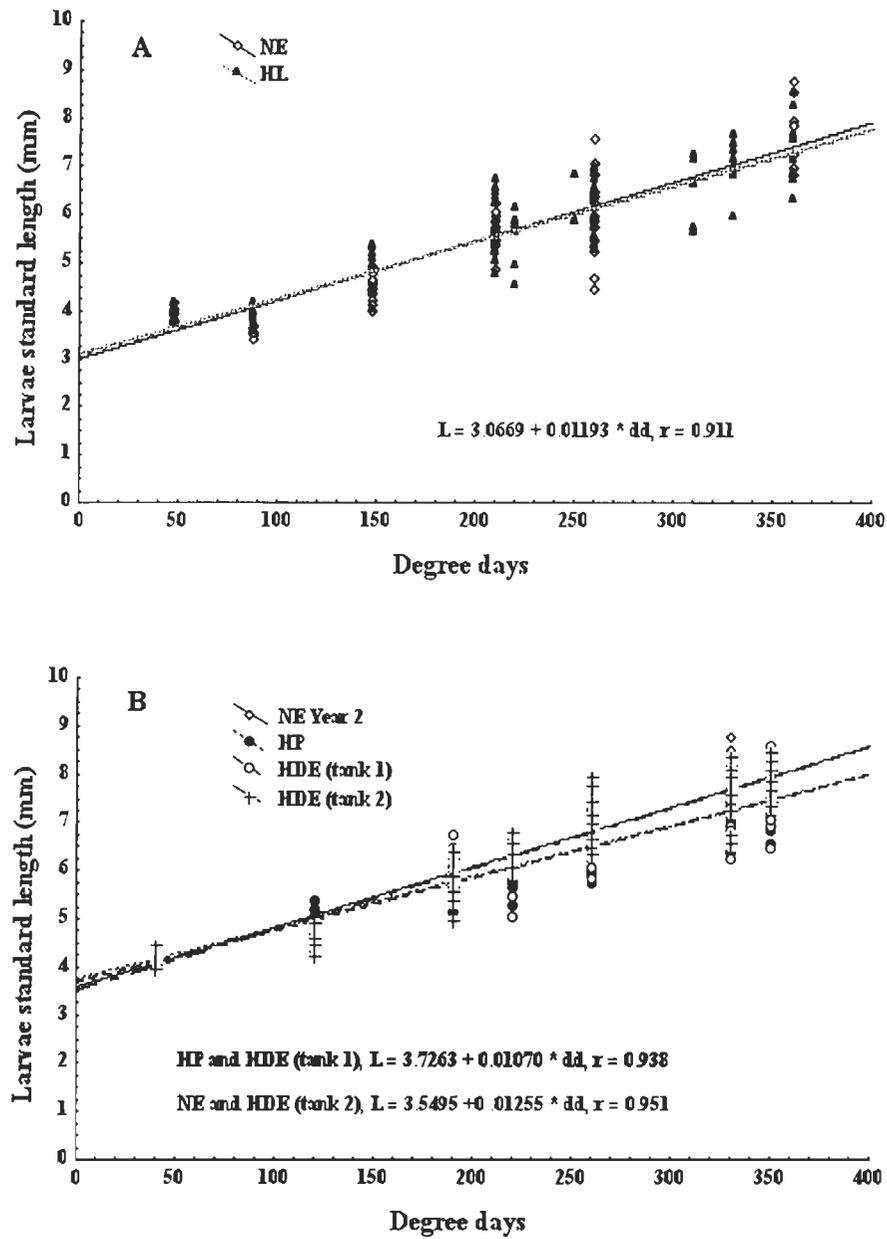


Figure 9 : Growth as measured by standard length (mm) for years 1 (a) and 2 (b).

NE = non-enriched; HL = high total lipids; HP = high protein; HDE = high DHA:EPA.

Table 6 : Juvenile production resulting from larvae fed different enrichment formulae.

	Enrichment	Replicate (tank)	Density	Juvenile production
Year 1	NE	#1 (n=7000)	190 L ⁻¹	3.2% (n=224)
		#2 (n=7000)		7.1% (n=497)
Year 2	NE	#1 (n=4500)	125 L ⁻¹	4.5% (n=202)
	HP	#1 (n=4500)		7.4% (n=333)
	HP	#2 (n=4500)	7.4% (n=335)	
	HDE	#1 (n=4500)	125 L ⁻¹	12.7% (n=511)
	HDE	#2 (n=4500)		14.1% (n=634)

NE = non-enriched; HL = high total lipids; HP = high protein; HDE = high DHA:EPA.

The percentage of juvenile survival was highest in larvae fed the HDE-enriched prey (highest DHA:EPA). In controls (NE), juvenile survival was very low for both years.

In year 2, we evaluated juvenile condition based on fin erosion and pigmentation indices. Almost no fin erosion was detected and no difference among treatments was noted. In year 2, the pigmentation index was higher in juveniles fed the HDE and NE prey and lower in those fed the HP enriched ones (figure 10)

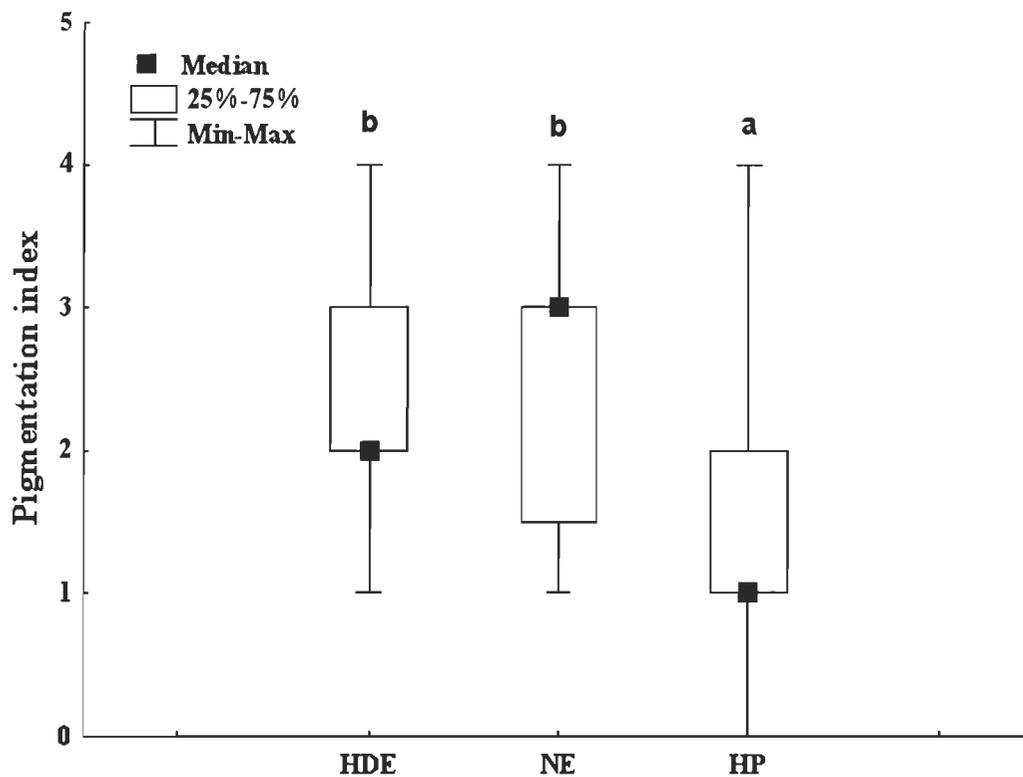


Figure 10 : Pigmentation index of newly metamorphosed juveniles.

HDE = high DHA:EPA ratio, NE = non-enriched; HP = high protein.

Discussion

Juvenile survival at the end of the larval period was relatively low in all treatments. However, the percentage of survival in tanks fed HDE-enriched rotifers (DHA:EPA in prey = 3.24) was higher than in all other treatments. Copeman *et al.* (2002) also found a positive correlation between survival of yellowtail flounder larvae and the DHA:EPA ratios in their diet at first feeding. Though standard lengths were comparable, larvae fed HDE-enriched rotifers appeared more developed at the onset of metamorphosis. Furuita *et al.* (1999) also found better vitality in Japanese flounder larvae that had received high amounts of DHA in their diet following exposure to stress tests (% survival after 120 min at high salinity water [65‰]) even though they detected no significant effects on growth.

One of our goals was to modify the DHA:EPA ratio of live feed to determine the importance of the proportion of these fatty acids on ontogeny of winter flounder larvae. However, it seems that variations in larval DHA:EPA ratios were related not only to the DHA:EPA ratio of the prey, but also to the DHA content of the prey. The use of different enrichment mixtures for rotifer rearing does not mean that the rotifer content will be easily modified: rotifers are not inert bags of nutrients, but organisms with their own metabolic and nutritional requirements.

In the present study, we were clearly able to modify rotifer content in terms of both DHA and the DHA:EPA ratio even though the ratios observed in rotifers were lower than those

present in the enrichments. This may be explained by a higher incorporation rate of EPA in rotifers compared to DHA (Estevez *et al.* 1999). The retro-conversion of DHA to EPA that has been observed in *Artemia* (Navarro *et al.* 1999; Han *et al.* 2001) could not explain these results because rotifers were sampled following enrichment and were not starving. In comparison, non-enriched rotifers had a low DHA content and low DHA:EPA ratio. This natural paucity of DHA in rotifers has already been reported (Rodriguez *et al.* 1997; Sargent *et al.* 1999; Copeman *et al.* 2002). On the other hand, the rotifers' total lipid content did not reflect the proportion of total lipids present in the enrichments we used. It is also relevant to note that rotifers enriched with HL had a significantly higher phospholipid content compared to rotifers enriched with HP or HDE, which allowed us to compare the effects of other lipid classes on larval development.

The broad ranges of DHA contents and DHA:EPA ratios in prey were mirrored in the fatty acid profiles of larvae. During rotifer feeding, HDE larvae contained three times more DHA. The inability of marine fish larvae to synthesize docosahexaenoic acid (22:6 ω 3; DHA) from polyunsaturated fatty acids (PUFA) was reported by Sargent *et al.* (1999; 2002) in reviews of lipids in fish nutrition. In our second year of experiments, the larval DHA:EPA ratio decreased at 260 dd in all experimental groups. Requirements in turbot larvae are high during that period because of a major incorporation of phospholipids in the cell membranes of brain, heart and eyes during ontogeny (Mourente *et al.* 1991; Mourente & Tocher 1992). In turbot, larval DHA is preferentially incorporated compared to EPA into the brain phospholipids (Estevez *et al.* 1999). Our results suggest that enrichment of rotifers

during the first-feeding phase was not sufficient to maintain high DHA levels and high DHA:EPA ratios until larval metamorphosis. The co-feeding period with *Artemia* and the commercial micro-diet was associated with a decrease in the content of DHA, a fatty acid that is essential for the completion of metamorphosis. Nevertheless, enrichment of rotifers with DHA resulted in a high DHA:EPA ratio, as in HDE, and allowed larvae to maintain a higher level of this component at 260 dd.

Prey lipid contents could drop and the DHA:EPA ratio be modified once prey were transferred to the larval rearing tanks (McEvoy *et al.* 1998a), but at 10°C, rotifers lose only 10% per day of their ω 3 fatty acids (Rainuzzo *et al.* 1989). DHA can be retro-converted into EPA after a starvation period (Navarro *et al.* 1999). Our larval rearing tanks were maintained at $10 \pm 0.4^\circ\text{C}$ and the complete overnight water renewal removed all residual prey by the following day. We thus assume that rotifers eaten by larvae had a similar biochemical profile as those in the rotifer culture tanks.

We have seen that prey composition did not reflect the lipid content in the enrichments; similarly, larvae did not directly reflect the phospholipid contents of their prey. The larval phospholipid content was similar at 260 dd in all treatments. It is generally believed that marine fish larvae need an external source of phospholipids during first feeding to meet their metabolic requirements due to their inability to synthesize new phospholipids in sufficient quantity (e.g., Bell *et al.* 2003). However, the uptake efficiency of dietary phospholipids declines with age and the development of digestive ability (turbot: Munilla-

Moran & Stark 1989; summer flounder: Bisbal & Bengtson 1995). In winter flounder larvae, the presence of lipase and trypsin as early as mouth opening suggests that they are able to digest lipids and proteins at the beginning of first feeding (Murray *et al.* 2003; Mercier *et al.* 2004).

The results obtained with control larvae highlight the fact that differences in initial standard lengths persist during the whole first-feeding period while linear growth rates are similar. This is also confirmed by the observation of similar RNA:DNA ratios. The nucleic acid ratio is a valuable indicator of potential protein synthesis (Buckley 1984). However, in control larvae, initial differences in the protein content and protein/RNA ratio were gradually attenuated through the first feeding period until they disappeared before metamorphosis. In winter flounder, changes in prey composition had no effect on larval growth, and the condition of larvae at hatch seems to be more important in the regulation of growth than was the biochemical composition of prey. Yúfera & Darias (2007) emphasized that the timing of initiation of exogenous feeding in marine fish species may vary among larvae resulting from a single spawning. However, a short delay in the initiation of exogenous feeding does not seem to affect the anatomical structures and the capacity for growth and development. We may then hypothesize that the same could be true for larvae from different spawning events.

Our results agree with those of Furuita *et al.* (1999), who studied the influence of DHA and EPA in Japanese flounder and found no evidence of any effect of these two fatty acids on

larval growth. Similarly, Estevez *et al.* (1999) found no significant difference on growth rates in turbot larvae fed diets with different DHA:EPA ratios (0.1–3.1). In contrast, Copeman *et al.* (2002) found a positive correlation between the DHA:EPA ratio and larval growth in yellowtail flounder larvae, but the ratios were much higher (1–8) because of the use of special emulsions. Experiments on the Senegalese sole also suggest that this species is able to grow when feeding on prey with a low DHA content (Morais *et al.* 2004; Villalta *et al.* 2005b).

While juvenile survival at the end of the larval period was relatively low in all treatments, surviving juveniles appeared to be in good condition. However, the percentage of survival in tanks supplied with HDE-enriched rotifers (DHA:EPA = 3.24) was higher than in all other treatments and the pigmentation index was elevated. Copeman *et al.* (2002) also found a positive correlation between survival of yellowtail flounder larvae and the DHA:EPA ratios in their diet at first feeding. Abnormal pigmentation in juvenile turbot and halibut appears to be improved by increased levels of DHA (Rainuzzo *et al.* 1997; McEvoy *et al.* 1998a, b). An absence of abnormal pigmentation was reported for turbot larvae fed rotifers having DHA:EPA ratios >2 (Reitan *et al.* 1994). Normal pigmentation patterns also developed in Senegalese sole larvae fed with prey characterized by low ARA levels (Villalta *et al.* 2005a). However, in the present study, control larvae (fed rotifers with a very low DHA:EPA ratio) as well as larvae fed rotifers with high DHA:EPA and high ARA contents (HDE) showed similar pigmentations, indicating the importance of other factors in controlling this aspect in juvenile flounder.

In conclusion, the enrichment provided to rotifers had little effect on the growth of winter flounder larvae. The initial condition of hatched larvae seems to be the most important criteria for good growth. However, the use of live prey with high DHA:EPA ratios (3.24) produced higher metamorphosis success. These results suggest that DHA is an essential component for successful metamorphosis and show the importance of DHA supply for winter flounder larvae. However, DHA must be provided throughout the larval development period and not be limited to one phase of first-feeding.

CHAPITRE 2

EFFET DE LA DENSITÉ D'ÉLEVAGE SUR LA CROISSANCE, LA SURVIE ET L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LARVES DE PLIE ROUGE (*PSEUDOPLEURONECTES AMERICANUS*)

Introduction

L'élevage des poissons marins suscite un intérêt grandissant dans le monde. Cependant la production de juvéniles demeure coûteuse en raison des taux de survie relativement faibles durant ou après la métamorphose. En conditions d'élevage intensif, Baskerville-Bridges & Kling (2000) rapportent une grande variabilité des taux de survie pour les larves de *Gadus morhua* (3.6% à 36.5%) alors que Rosenlund *et al.* (1993) rapportent, pour cette espèce, des taux de survie de l'ordre de 20% et Alver *et al.* (2007) des taux oscillant entre 44% et 67%. Pour notre part, nous avons obtenu des taux de survie variant de 3 à 14 % pour la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) (voir chapitre 1) alors que Daniels *et al.* (1996) signalent des taux de survie inférieurs à 20% chez *Paralichthys lethostigma* et que Bolasina *et al.* (2006) ont obtenu des taux de survie variant de 25% à 77% chez *Paralichthys olivaceus*, deux autres espèces de poissons plats.

Une faible densité d'élevage est un autre facteur pouvant contribuer à accentuer les coûts de production. Les producteurs de poissons marins visent donc à augmenter la densité d'élevage larvaire sans affecter le taux de survie et la croissance. Peu de travaux ont porté à

ce jour sur l'effet d'une augmentation des densités d'élevage larvaire. De plus les résultats publiés sont souvent divergents. Les travaux de Daniels *et al.* (1996) [*Paralichthys lethostigma*], de Baskerville-Bridges et Kling (2000) [*Gadus morhua*] et de King *et al.* (2000) [*Paralichthys dentatus*] n'indiquent aucun effet majeur de la densité d'élevage larvaire sur la croissance et la survie, bien que King *et al.* (2000) signalent une tendance à la baisse du taux de croissance. Par contre Dou *et al.* (2003) et Bolasina *et al.* (2006) ont démontré que les larves de *Paralichthys olivaceus*, élevées à haute densité, subissaient une réduction du taux de croissance et du pourcentage de survie juste avant la métamorphose. Chez plusieurs espèces d'eau douce, l'élevage larvaire à densité élevée affecte négativement la survie et/ou la croissance (El Sayed 2002 [*Oreochromis niloticus*]; Gatlin *et al.* 1986 [*Ictalurus punctatus*]; Gress *et al.* 1996 [*Esox lucius*]; Sahoo *et al.* 2004 [*Clarias batrachus*]; Sharma & Chakrabarti 1999 [*Cyprinus carpio*]). Les processus physiologiques et les mécanismes comportementaux intervenant à forte densité d'élevage et agissant sur la survie et la croissance ne sont cependant pas clairement établis.

Parmi les processus mis en cause, on évoque notamment le phénomène du changement de comportement social (Baskerville-Bridges & Kling 2000). À haute densité d'élevage, les comportements de dominance et d'antagonisme seraient sensiblement réduits diminuant ainsi le cannibalisme et les mortalités dues aux blessures. Ce phénomène a été démontré pour *Oreochromis mossambicus* (Macintosh & De Silva 1984), *Perca fluviatilis* (Baras *et al.* 2003) et pour *Micropterus salmoides* (Flemming & Johansen 1984). Le cannibalisme est un phénomène fréquent chez les poissons d'élevage (Smith & Reay 1991; Hetch & Pienaar

1993; Baras & Jobling 2002). Il s'exerce d'abord par la capture de larves de même taille attrapées par la queue et mangées en tout ou en partie (Type I) (Baras *et al.* 2003). Les larves cannibales arrivent ainsi à grossir plus rapidement. Au fur et à mesure que se développe l'hétérogénéité des tailles, le cannibalisme de Type II fait son apparition. Ce type de cannibalisme est essentiellement limité par la taille des bouchées pouvant être avalées. Les travaux de Baras *et al.* (2003) sur les larves de *Percea fluvialis* les amènent à conclure que chez les espèces s'orientant visuellement, l'élevage à densité élevée entraîne de la confusion chez les prédateurs qui sont confrontés à un trop grand nombre de cibles et sont alors moins efficaces à sélectionner leurs proies. Ainsi les pourcentages de survie seraient plus élevés à haute densité d'élevage.

Par contre l'augmentation du pourcentage de survie s'accompagnerait d'une réduction du taux de croissance. King *et al.* (2000) rapportent que l'entassement qui se produit à forte densité peut stresser les larves tant en raison de la mauvaise qualité de l'eau qui en résulte que par le manque d'espace. Le pH, l'oxygène dissous et l'ammoniaque sont des paramètres pouvant affecter l'état physiologique des larves alors que le manque d'espace affecterait la croissance par une diminution de la capacité à se nourrir ou par une réponse endocrinienne (Pankhurst & Van der Kraak 1997; Schreck *et al.* 1997). King *et al.* (2000) suggèrent que la tendance à une réduction du taux de croissance à forte densité serait imputable au stress engendré par le manque d'espace. Baskerville-Bridges & Kling (2000) ont démontré que l'augmentation de la survie à forte densité entraîne une réduction du ratio proies:prédateur et que la disponibilité de la nourriture peut devenir un facteur limitant pour

la croissance. Ainsi en ajustant la quantité de proies pour que celles-ci soient en excès, ils ont réussi à maintenir le même taux de croissance en augmentant par ailleurs la densité d'élevage. L'enjeu principal devient alors la détérioration de la qualité de l'eau en raison de la charge accrue en matière organique.

Signalons que l'une des principales difficultés expérimentales lors d'expériences sur les densités d'élevage larvaire est celle de l'importante mortalité souvent observée au début de la phase de première alimentation (King *et al.* 2000, Yúfera & Darias 2007) et qui est non dépendante de la densité initiale (Dou *et al.* 2003). Cette mortalité, qui survient peu de temps après l'ouverture de la bouche et le début de l'alimentation exogène (Daniels *et al.* 1996; Hatziathanasiou *et al.* 2002; Yúfera & Darias 2007), peut réduire les densités expérimentales d'élevage sous la valeur de la densité initiale la plus faible (King *et al.* 2000) et ainsi réduire la portée des effets « traitement ».

L'objectif de ce chapitre est de déterminer si les larves de plie rouge peuvent être élevées à forte densité sans affecter négativement la croissance larvaire et la survie à la métamorphose. On vise notamment à documenter l'évolution de la composition biochimique des larves élevées à différentes densités, cet aspect étant peu couvert dans les études antérieures consultées.

Matériel et méthodes

Incubation des œufs et élevage larvaire

Des spécimens de plie rouge sexuellement matures ont été capturés durant leur période de reproduction en utilisant une fascine commerciale tendue dans la zone côtière de l'estuaire du Saint-Laurent dans la région de Sainte-Luce. Les poissons ont ensuite été placés dans des bassins rectangulaires (1 m² X 0,2 m) en bois recouverts de résine époxy, alimentés avec de l'eau de mer locale filtrée et dans des conditions de photopériode naturelle. Des œufs de femelles prêtes à pondre ont été fécondés selon la méthode développée par Ben Khemis *et al.* (2000). Les œufs fécondés ont ensuite été placés en incubation dans de l'eau de mer locale (7,0 ± 1°C) alimentant des incubateurs avec une circulation à courant ascendant (up-welling) et dans l'obscurité jusqu'à leur éclosion. Après 12 à 14 jours, les larves nouvellement écloses ont été transférées au hasard dans des bassins d'élevage coniques recouverts d'un revêtement vert foncé. L'élevage des larves a été mené selon la méthode décrite au chapitre 1 en utilisant différentes densités initiales.

Les traitements ont été assignés au hasard pour les différents bassins d'élevage. Pour définir les densités initiales (150 larves L⁻¹, 250 larves L⁻¹, 350 larves L⁻¹, 550 larves L⁻¹), les larves ont été comptées lors de leur transfert de l'écloserie aux bassins d'élevage. Toutefois, les estimés des densités larvaires dans les bassins à l'ouverture de la bouche (40 degrés-jours) indiquaient d'importantes différences en comparaison avec les densités initiales. Les densités ont alors été estimées en période d'obscurité, juste avant l'ouverture matinale de

l'éclairage, alors que les larves étaient bien distribuées dans la colonne d'eau. Pour chacun des réservoirs, trois sous-échantillons d'eau (environ 250 ml) ont été prélevés et toutes les larves qu'ils contenaient comptées individuellement dans des plats de Pétri. Les larves ont ensuite été retournées dans leur bassin d'origine. En notant le volume exact d'eau prélevé, le nombre total de larves par bassin a pu être estimé. Les traitements ont ensuite été définis comme suit : D1 : 50-150 larves L⁻¹, D2 : 150-250 larves L⁻¹, D3 : 250-350 larves L⁻¹, D4 : 450-550 larves L⁻¹, D5 : 550-650 larves L⁻¹ sur la base des densités mesurées à 40 degrés-jours. Tous les traitements ont été réalisés en duplicata.

Les bassins d'élevage ont été alimentés avec de l'eau de mer locale filtrée (5 µm) (9,3 ± 0,9°C à 12,0 ± 0,9°C) sous une photopériode de 12 L : 12 N fournie par un éclairage avec ampoules incandescentes (400 lux à la surface de l'eau). Un bullage émanant d'une pierre d'aération placée au centre de chacun des bassins créait un léger courant ascendant. Le renouvellement de l'eau durant la période expérimentale s'effectuait durant la période d'obscurité afin d'éviter la perte de proies par le système de trop plein. L'alimentation en eau de mer se faisait alors à un débit de 0,2 L min⁻¹ pour un renouvellement complet durant la nuit selon les abaques de Sprague (1973). Tous les matins, de la pâte d'algues Starter Formula (Innovative Aquaculture Products Ltd) était ajoutée à chaque bassin, à une concentration de 0,025 g L⁻¹ d'eau de mer, avant la mise en fonction de l'éclairage, afin d'améliorer la qualité optique de l'eau de mer et ainsi éviter le « *wall syndrome* » (Naas *et al.* 1992; Zambonino Infante *et al.* 1998), un comportement caractérisé par l'orientation et l'immobilisation des larves face à la paroi du bassin.

Les proies utilisées durant la première alimentation larvaire, i.e. de l'ouverture de la bouche (40 degrés-jours) jusqu'à l'atteinte d'une taille de 5 – 5,5 mm (190 – 260 degrés-jours) étaient des rotifères marins (*Brachionus plicatilis*) nourris avec du phytoplancton vivant (*Nannocloropsis* sp) et enrichis avec la préparation Culture Selco (INVE Aquaculture, Grantsville, UT, USA). Les rotifères étaient donné à un ratio de 15-20 proies : larve selon Laurence (1977), ratio ajusté deux fois par jour durant la période d'éclairage. À l'atteinte d'une taille de 5 – 5,5 mm, toutes les larves étaient nourries avec des artémies (*Artemia franciscana*) récemment écloses (San Francisco brand, Argent Chemical Laboratories) et avec une diète commerciale de microcapsules (Hatchfry-Encapsulon, Argent Chemical Laboratories) selon Ben Khemis *et al.* (2003).

Des difficultés de nature technique ont mené à la perte des larves dans l'un des bassins du traitement D4 ainsi que dans l'un des bassins du traitement D5 avant la fin de l'expérience. Par conséquent, l'analyse statistique des résultats à 260 degrés-jours et l'évaluation du pourcentage de juvéniles métamorphosés n'ont pu être appliqués à tous les traitements.

Échantillonnage et analyses biochimiques

Le jour moyen d'éclosion a été considéré comme le Jour 0 (0 degré-jour) selon Rogers (1976). Les densités larvaires à 125, 190 et 260 degrés-jours ont été estimées selon la même méthode qu'à l'ouverture de la bouche. La survie dans chacun des bassins a été évaluée selon la formule suivante :

Survie (%) = (densité à l'échantillonnage) (densité initiale – larves échantillonnées L⁻¹)⁻¹ X 100.

La longueur standard a été mesurée sur 20 larves par bassin à 40, 125, 190 et 260 degrés-jours. Les mesures ont été effectuées sous loupe stéréoscopique en utilisant un micromètre oculaire. Pour effectuer ces mesures, les larves ont été fixées avec une goutte (30 µl) de solution de formaldéhyde à 37,6% et les longueurs mesurées ont été corrigées en utilisant l'équation de Hjörleifsson & Klein-MacPhee (1992). L'échantillonnage pour les analyses biochimiques a été effectué au hasard dans chacun des bassins à la fin de la période d'obscurité et avant le premier repas de la journée. Les échantillonnages de larves ont été effectués à l'ouverture de la bouche (40 degrés-jours), à la fin de la période de première alimentation (5 – 5,5 mm) et juste avant la métamorphose (350 degrés-jours). Les larves échantillonnées ont été rincées individuellement à trois reprises dans de l'eau de mer filtrée sur filtre Millipore, regroupées (20 à 60 pour obtenir au moins 0,8 g de masse sèche) dans des microtubes à centrifugation de 1,5 mL, immédiatement congelées sur glace sèche et ensuite entreposées à -80°C. Après leur métamorphose, les juvéniles ont été délicatement retirés du fond des bassins à l'aide d'un siphon et comptés. Cette opération a été répétée tous les deux jours dans chacun des bassins jusqu'à ce que le nombre de juvéniles récoltés quotidiennement soit inférieur à 5 (après approximativement 2 semaines).

La quantité de protéines totales, la concentration en acides nucléiques, la composition en lipides et en acides gras ont été déterminés pour les échantillons récoltés à l'ouverture de la

bouche, à la fin de la période de première alimentation et avant la métamorphose. Les échantillons pour les analyses de protéines et d'acides nucléiques ont été homogénéisés sur glace dans de l'eau distillée stérile en utilisant un appareil à ultrason (Sonicator model XL2010) durant 30 secondes ou plus, à une puissance de 100W. La concentration en protéines totales a été déterminée pour des sous-échantillons en duplicata en utilisant la modification de la méthode de Lowry par Hartree (1972). L'albumine sérique bovine (Sigma A-4503) a été utilisée comme étalon. La concentration en acides nucléiques (ARN, ADN) a été mesurée en utilisant la modification de Munro & Fleck (1966) de la méthode de Schmidt-Thannhauser adaptée par Buckley (1979) pour les microquantités présentes dans les larves de poissons. De l'ARN de type III de levure de boulanger (Sigma R-7125) et de l'ADN de glande thymique de veau (Sigma D-3664) ont été utilisés comme étalon. Les lipides ont été extraits dans une solution chloroforme/méthanol en utilisant la méthode de Folch *et al.* (1957) modifiée par Parrish (1998). Les classes de lipides ont été analysées selon Parrish (1998) par séparation chromatographique sur couche puis quantification par ionisation par flamme avec un appareil Iatroscan Mk V (Iatron laboratories). La composition en acides gras a été déterminée à partir d'esters de méthyle (FAME) obtenus par transestérification des classes de lipides acyl (Morrison & Smith 1964; Budge & Parrish 2003). Les analyses d'acides gras ont été effectuées en utilisant un appareil Varian modèle 3400 GC. Les résultats sont exprimés en μg par larve sauf pour ceux concernant les classes de lipides qui sont exprimés en pourcentage des lipides totaux et les acides gras qui sont exprimés en pourcentage des acides gras totaux.

Analyse des données

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel STATISTICA version 5,1 (édition 1997). La normalité des données a été vérifiée avant chacune des analyses statistiques en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. L'homogénéité des variances a été vérifiée en utilisant un test F-max (Sokal & Rohlf 1995). Les données ont été transformées lorsque requis afin de respecter les conditions de normalité et d'homéoscédasticité sauf pour les données sur la survie et la production de juvéniles post-métamorphiques. La survie des larves à 125, 190, 260 degrés-jours et des juvéniles post-métamorphiques a été exprimée en pourcentage du nombre initial de larves et les résultats entre traitements comparés en utilisant un test ANOVA non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les analyses sur la croissance et les variables biochimiques ont été effectuées en utilisant des ANOVAs à deux facteurs. Le test de Tukey HSD modifié pour des n inégaux ou le test *a posteriori* de Games & Howell ont été appliqués lorsque requis. Pour toutes les analyses statistiques, un seuil $\alpha = 0,05$ a été retenu.

Résultats

Densité larvaire et survie des juvéniles

À 125 degrés-jours les pourcentages moyens de survie larvaire sont supérieurs à 40% quelle que soit la densité initiale (tableau 7). À 190 et 260 degrés-jours, il n'y a pas non plus de différence significative dans le pourcentage de survie larvaire entre les différentes densités.

Tableau 7 : Survie larvaire et production de juvéniles sous différentes densités d'élevage (D)

Densité initiale (Nb L ⁻¹)	n	Survie larvaire à 125 degré-jour (%)	Survie larvaire à 190 degré-jour (%)	Survie larvaire à 260 degré-jour ² (%)	Production de juvéniles ² (%)	Production de juvéniles ² (Nb L ⁻¹)
D1 (50-150)	2	61,92 ± 36,55	13,87 ± 5,62	30,50 ± 26,67	8,45 ± 5,95	7,48 ± 3,79
D2 (150-250)	2	41,43 ± 0,85	14,95 ± 1,39	25,74 ± 9,07	4,15 ± 0,35	8,20 ± 1,67
D3 (250-350)	2	41,20 ± 0,66	16,45 ± 9,70	10,99 ± 9,33	4,20 ± 3,20	11,23 ± 8,34
D4 (450-550)	2	54,01 ± 31,89	24,73 ± 16,68	19,18 ¹	3,5 ¹	16,80 ¹
D5 (550-650)	2	97,96 ± 72,03	33,24 ± 23,33	4,46 ± 1,85	3,7 ¹	21,59 ¹

Moyenne ± écart-type; ¹ n = 1; ² lorsque n=1 les résultats ont été exclus de l'analyse statistique.

Le nombre de juvéniles (acquisition du comportement benthique, modification corporelle et migration de l'œil complétée) en fin d'expérience, exprimé en pourcentage du nombre initial de larves dans les bassins d'élevage, varie de 3,5 % à 8,45 % (tableau 7), sans que l'on détecte de différences en fonction de la densité larvaire de départ. Des résultats similaires sont obtenus si on exprime le nombre de juvéniles en nombre d'individus par litre de bassin d'élevage. La quantité de spécimens récupérés varie alors de 7,48 à 21,59 larves par litre de bassin d'élevage.

Signalons qu'aucun indice de cannibalisme n'a été observé lors de l'examen quotidien de la surface des bassins et lors des échantillonnages destinés à l'évaluation des densités, aux mesures de tailles ou aux prélèvements pour analyses biochimiques.

Taille des larves et indicateurs de croissance

La croissance en longueur des larves varie de façon similaire quelle que soit la densité d'élevage (tableau 8) et les indicateurs de croissance confirment que celle-ci ne semble pas affectée par la densité larvaire de départ. Ainsi, aucune différence significative n'est observée entre les traitements pour la teneur larvaire en protéines ($p = 0,16$, $F = 1,87$, $df = 4$), pour le ratio ARN/ADN ($p = 0,24$, $F = 1,47$, $df = 4$), ainsi que pour le ratio protéines/ARN ($p = 0,29$, $F = 1,30$, $df = 4$) mesurés chez les larves.

Tableau 8 : Longueur standard (mm) pour différentes densités (D) initiales.

	125 degré-jour	190 degré-jour	260 degré-jour
D1	4,60 ± 0,05 (n=39)	5,34 ± 0,10 (n=38)	6,37 ± 0,08 (n=37)
D2	4,66 ± 0,07 (n=34)	5,52 ± 0,06 (n=40)	6,67 ± 0,09 (n=39)
D3	4,70 ± 0,07 (n=32)	5,57 ± 0,09 (n=37)	6,63 ± 0,14 (n=27)
D4	4,55 ± 0,07 (n=41)	5,68 ± 0,10 (n=40)	6,69 ± 0,11 (n=20)
D5	4,58 ± 0,06 (n=40)	5,92 ± 0,08 (n=40)	6,97 ± 0,12 (n=20)

Moyenne ± écart-type; n = nombre d'individus

Tableau 9 : Indicateurs de croissance, lipides totaux, classes de lipides et composition en acide gras des larves à l'ouverture de la bouche, à la fin de la première alimentation et à la fin de la période larvaire.

	À l'ouverture de la bouche (40 degré-jour)	À la fin de la première alimentation (5-5.5 mm)	À la fin de la période larvaire (350 degré-jour)
Protéines totales *	8,83 ± 0,38 ^a (n=17)	38,85 ± 2,58 ^b (n=20)	115,62 ± 7,17 ^c (n=16)
ARN/ADN	2,31 ± 0,17 (n=15)	3,15 ± 0,21 (n=20)	4,03 ± 0,13 (n=16)
Protéines/ARN	7,15 ± 0,51 (n=15)	8,67 ± 0,83 (n=20)	7,34 ± 0,64 (n=16)
Classes de lipides**			
Triacylglycerols	5,05 ± 2,38 ^b (n=16)	8,83 ± 1,94 ^b (n=20)	1,67 ± 1,09 ^a (n=19)
Acides gras libres	55,43 ± 6,40 ^b (n=16)	23,96 ± 3,34 ^a (n=20)	12,48 ± 3,56 ^a (n=19)
TAG / Stérols	0,77 ± 0,63 ^a (n=16)	0,58 ± 0,14 ^a (n=20)	1,23 ± 0,10 ^b (n=19)
Lipides polaires mobiles dans l'acétone	4,46 ± 1,10 ^b (n=16)	2,12 ± 0,37 ^a (n=20)	1,72 ± 0,24 ^a (n=19)
Phospholipides	12,16 ± 2,68 ^a (n=16)	44,98 ± 2,85 ^b (n=20)	48,49 ^b ± 2,15 (n=19)
Composition en acides gras***			
ΣSFA	33,92 ± 0,78 ^a (n=16)	26,83 ± 0,35 ^b (n=20)	23,89 ^c ± 0,37 (n=19)
ΣMUFA	24,37 ± 0,66 ^a (n=16)	33,45 ± 0,45 ^b (n=20)	37,78 ± 0,54 ^c (n=19)
ΣPUFA	41,71 ± 0,98 (n=16)	39,74 ± 0,33 (n=19)	38,34 ± 0,75 (n=19)
Σω3	34,39 ± 1,04 ^b (n=16)	27,17 ± 0,26 ^a (n=20)	26,71 ± 0,87 ^a (n=19)
Σω6	6,09 ± 0,51 (n=16)	11,78 ± 0,17 (n=20)	11,19 ± 0,19 (n=19)
AA	2,05 ± 0,15 ^a (n=16)	3,21 ± 0,06 ^b (n=20)	2,03 ± 0,04 ^a (n=19)
EPA	11,83 ± 0,76 ^b (n=16)	10,66 ± 0,11 ^b (n=20)	4,77 ± 0,11 ^a (n=19)

Moyenne ± écart-type; n = nombre de groupements; * Résultats en mg / larve; ** Résultats en % des lipides totaux; *** Résultats en % des acides gras totaux; La présence de lettres différentes en exposant indique des différences significatives entre les traitements

Le tableau 9 présente les résultats pour chacun des temps d'échantillonnage tous traitements confondus.

Pour toutes les densités d'élevage, la teneur en lipides totaux est significativement plus élevée à la fin de la période larvaire qu'en fin de première alimentation (Tableau 10). On observe également des différences significatives entre les densités d'élevage pour chacune des tailles larvaires étudiées. Cependant ces différences ne correspondent pas au gradient des densités initiales. Ainsi pour chacune des tailles de larves considérées, soit à la fin de la période de première alimentation et juste avant la métamorphose, les lipides totaux sont moindres aux densités de niveau D4 et plus élevés au niveau de densité D5, celles observées pour D1, D2 et D3 étant intermédiaires.

La classe de lipides la plus importante est celle des phospholipides (tableau 9) qui représente près de 50% des lipides totaux à la fin de la période de première alimentation et de la phase larvaire. Aucune différence significative n'est observée pour cette classe de lipides entre les différentes densités d'élevage ($p = 0,41$, $F = 1,04$, $df = 4$), mais le pourcentage moyen de phospholipides à l'ouverture de la bouche est significativement plus faible qu'en fin de première alimentation et en fin de phase larvaire. Les acides gras libres et les lipides polaires mobiles ne varient pas non plus en fonction de la densité (FFA : $p = 0,36$, $F = 1,14$, $df = 4$; AMPL : $p = 0,54$, $F = 0,79$, $df = 4$), mais leur pourcentage est significativement plus élevé à l'ouverture de la bouche qu'à la fin de la période de première alimentation et de la phase larvaire.

Tableau 10 : Composition des larves en lipides totaux, stérols, DHA et DHA:EPA à différentes densités d'élevage (D) initiales.

	D1 50-150	D2 150-250	D3 250-350	D4 450-550	D5 550-650
Lipides totaux* 5-5.5 mm	5,20 ± 0,82 ^{ab} (n=4)	5,40 ± 0,88 ^{ab} (n=5)	4,62 ± 0,78 ^{ab} (n=4)	4,31 ± 2,26 ^a (n=3)	7,28 ± 2,73 ^b (n=4)
350 degré-jour	20,63 ± 3,49 ^{cd} (n=4)	21,04 ± 1,02 ^{cd} (n=4)	16,02 ± 7,26 ^{cd} (n=4)	11,66 ± 6,36 ^c (n=4)	27,45 ± 14,52 ^d (n=3)
Stérols ** 5-5.5 mm	0,16 ± 0,04 ^{ab} (n=4)	0,15 ± 0,03 ^{ab} (n=5)	0,17 ± 0,02 ^{ab} (n=4)	0,21 ± 0,06 ^b (n=3)	0,14 ± 0,03 ^a (n=4)
350 degré-jour	0,13 ± 0,01 ^{ab} (n=4)	0,14 ± 0,02 ^{ab} (n=4)	0,16 ± 0,04 ^{ab} (n=4)	0,19 ± 0,06 ^b (n=4)	0,12 ± 0,01 ^a (n=3)
DHA*** 5-5.5 mm	9,13 ± 0,06 ^{cd} (n=4)	9,03 ± 0,32 ^c (n=5)	10,11 ± 0,28 ^d (n=4)	8,02 ± 0,32 ^{bc} (n=3)	7,80 ± 0,23 ^b (n=4)
350 degré-jour	2,34 ± 0,10 ^a (n=4)	2,37 ± 0,12 ^a (n=4)	2,44 ± 0,19 ^a (n=4)	2,91 ± 0,08 ^a (n=4)	1,90 ± 0,26 ^a (n=3)
DHA/EPA 5-5.5 mm	0,84 ± 0,03 ^c (n=4)	0,83 ± 0,02 ^c (n=5)	0,95 ± 0,02 ^d (n=4)	0,78 ± 0,02 ^c (n=3)	0,75 ± 0,03 ^c (n=4)
350 degré-jour	0,50 ± 0,01 ^{ab} (n=4)	0,50 ± 0,01 ^{ab} (n=4)	0,51 ± 0,03 ^{ab} (n=4)	0,58 ± 0,03 ^b (n=4)	0,42 ± 0,03 ^a (n=4)

Moyennes ± écart-type; n = nombre de groupements; * Résultats en mg / larve; ** Résultats en % des lipides totaux; *** Résultats en % des acides gras totaux; la présence de lettres différentes en exposant indique des différences significatives entre les jours d'échantillonnage et/ou les traitements.

Le pourcentage en triacylglycerols (tableau 9), des lipides de réserve, ne varie pas de façon significative en fonction de la densité d'élevage ($p = 0,36$, $F = 1,14$, $df = 4$). Par contre, les pourcentages de stérols (tableau 10), des lipides de structure, présentent de légères différences significatives en fonction des densités, la valeur la plus faible étant observée pour le niveau de densité D5 et la plus élevée pour D4, avec des teneurs intermédiaires pour D1, D2 et D3. Il faut cependant garder à l'esprit qu'un des deux bassins expérimentaux a été perdu en cours de route pour D4, de même que pour D5. Le ratio TAG/Stérols est similaire entre les cinq traitements ($p = 0,08$, $F = 2,31$, $df = 4$).

Les résultats sur la composition des acides gras ne présentent également que peu de différences significatives en fonction des densités d'élevage. Ainsi il n'y a pas d'effet de densité pour les pourcentages d' $\omega 3$ totaux ($p = 0,44$, $F = 0,97$, $df = 4$), d' $\omega 6$ totaux ($p = 0,00$, $F = 0,05$, $df = 4$), de Σ SFA ($p = 0,34$, $F = 1,19$, $df = 4$), de Σ MUFA ($p = 0,19$, $F = 1,66$, $df = 4$) et de Σ PUFA ($p = 0,05$, $F = 2,75$, $df = 4$). Cependant les pourcentages en $\omega 3$ totaux sont significativement plus élevés à l'ouverture de la bouche alors que ceux des $\omega 6$ totaux ne varient pas significativement en fonction de la taille des larves. Les pourcentages de Σ SFA et de Σ MUFA augmentent significativement lors de la croissance alors que ceux de Σ PUFA demeurent identiques entre celles-ci (tableau 9).

Les pourcentages en acide arachidonique (ARA) et en acide eicosapentaénoïque (EPA) ne varient pas significativement en fonction de la densité d'élevage (ARA : $p = 0,55$, $F = 0,77$, $df = 4$; EPA : $p = 0,73$, $F = 0,52$, $df = 4$). On remarque cependant une baisse significative

d'EPA entre la fin de la première alimentation et la fin de la phase larvaire (tableau 9). Par contre on remarque un effet combiné de la densité d'élevage et de la taille des larves sur la proportion en acide docosahexaénoïque (DHA) et sur le ratio DHA:EPA (tableau 10). L'effet du traitement ne correspond cependant pas au gradient des densités initiales.

Discussion et conclusion

Le but de ce chapitre était de vérifier s'il est possible d'élever les larves de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) à forte densité sans affecter leur croissance, leur taux de survie et la production de juvéniles.

L'une des difficultés des travaux portant sur les densités d'élevage larvaire est la forte mortalité souvent observée durant les premiers jours d'élevage, mortalité qui réduit la portée des traitements expérimentaux que l'on cherche à appliquer. Ces fortes mortalités pourraient notamment résulter de l'incapacité de certaines larves à passer à une alimentation exogène après l'ouverture de la bouche (Daniels *et al.* 1996; King *et al.* 2000; Hatzithanasiou *et al.* 2002; Yúfera & Darias 2007). Chez la plie rouge, les travaux réalisés par Ben Khemis *et al.* (2000) sur des larves maintenues à jeun ont permis d'observer qu'une mortalité massive survenait au 9^{ème} jour (75 degré-jours) après l'éclosion, ce qui correspond au 3^{ème} jour après l'ouverture de la bouche et au début de l'alimentation exogène. Si les larves n'arrivent pas à se nourrir par elle-même, une importante mortalité est donc à prévoir à ce stade de développement, mortalité qui pourrait ainsi modifier les

densités initiales de traitement. Les conditions expérimentales s'en verraient donc affectées dès le premier échantillonnage à 125 degré-jours (9^{ième} jour après l'ouverture de la bouche). Lors de cet échantillonnage, les pourcentages de survie moyens observés pour chacune des densités dépassaient les 40%, sans relation apparente avec la densité d'élevage initiale. Ce pourcentage de survie est nettement supérieur à celui de 25% observé par Daniels *et al.* (1996) au 5^{ième} jour de la première alimentation des larves de *Paralichthys lethostigma*. Il est à noter que les densités initiales les plus élevées ne sont pas tombées sous des valeurs plus faibles que celles choisies pour les traitements à plus faible densité et donc que le gradient expérimental de faible à forte densité a été maintenu même s'il s'est trouvé modifié en intensité.

La présente étude ne montre aucun effet de la densité d'élevage sur les pourcentages de survie moyens tout au long de la phase larvaire. Par contre, ceux-ci diminuent considérablement pour atteindre des valeurs égales ou inférieures à 30% à la fin de la période de première alimentation (260 degrés-jours) et inférieures à 10% après la métamorphose. L'absence d'effet de la densité d'élevage sur le taux de survie a également été observé pour les larves de *Paralichthys dentatus* (King *et al.* 2000) et celles de *Gadus morhua* (Baskerville-Bridges & Kling 2000). Par contre d'autres travaux réalisés avec des larves de *Gadus morhua* ont au contraire démontré un taux de survie significativement plus élevé, seize jours après l'éclosion, chez des larves élevées à faible densité (Alver *et al.* 2007) indiquant ainsi que d'autres variables pourraient avoir de l'importance, du moins pour cette espèce.

La grande variabilité des pourcentages de survie entre les réplicats d'un même traitement observée dès 125 degré-jours pour certaines densités a aussi été remarquée à forte densité pour d'autres espèces de poissons marins (Alves *et al.* 1999 [*Paralichthys dentatus*]; King *et al.* 2000 [*Paralichthys dentatus*]; Baskerville-Bridges et Kling 2000 [*Gadus morhua*]). Les très faibles taux de survie, pouvant aller jusqu'à l'hécatombe, pourraient être causés par une piètre qualité de l'eau, notamment par une trop forte concentration d'ammoniaque (Alves *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Baskerville-Bridges et Kling 2000; Bolasina *et al.* 2006). Ainsi on pourrait penser que l'interruption du renouvellement d'eau durant les 12 heures d'alimentation pourrait contribuer à la détérioration de la qualité des milieux d'élevage et donc à la variabilité intra-traitement observée. Fraser (1989) a démontré qu'en condition de stress environnemental les larves d'organismes marins pouvaient avoir des difficultés à satisfaire leurs besoins énergétiques à partir de sources exogènes et qu'elles catabolisaient alors leurs réserves de triacylglycérol (TAG). Or chez les larves survivantes, le ratio TAG/Stérols, qui constitue un indice de condition larvaire (Fraser 1989), ne présente pas de différence significative en fonction de la densité d'élevage et cela tout au long de la période expérimentale. Il ne semble donc pas que l'interruption du renouvellement d'eau durant la phase d'alimentation n'affecte pas la qualité de l'eau au point d'entraîner un arrêt d'alimentation exogène et des mortalités massives. Cependant, dans nos installations, les pierres d'aération ne descendaient pas jusqu'au fond des bassins et la couche d'eau se trouvant sous les pierres pourrait ne pas avoir été suffisamment renouvelée durant les périodes d'obscurité. Or on a observé que les larves ont tendance à se

répartir sur toute la colonne d'eau durant la période d'obscurité exposant une partie de celles-ci à cette couche du fond. Les larves occupant les zones les plus profondes des bassins d'élevage pourraient ainsi avoir subi une forte mortalité alors que celles occupant des zones moins profondes auraient continué à croître normalement.

Cette étude démontre que la densité d'élevage larvaire n'affecte pas la croissance linéaire chez la plie rouge et ce tout au long de la période de première alimentation. Cette performance pourrait être attribuable au maintien d'un même ratio proies:prédateur tout au long de l'expérience pour chacune des différentes densités. Baskerville et Kling (2000) ont en effet démontré qu'en l'absence de différences entre les taux de survie à différentes densités, il se produisait une baisse du ratio proies:prédateur dans les bassins à forte densité d'élevage lorsque les proies étaient données en quantité fixe par bassin. Il s'en suivait un ralentissement du taux de croissance quotidien en raison d'une limitation de la quantité de nourriture par larve. La même observation avait été faite auparavant par Macintosh & De Silva (1984) pour les larves de *Oreochomis mossambicus*. Ce ralentissement de croissance pouvait se corriger en administrant des rations de proies qui permettaient aux larves de se nourrir à satiété.

Par contre une quantité fixe de proies par larve se traduit aussi par une plus faible densité de proies dans les bassins d'élevage ayant les plus faibles densités de larves. Ainsi les larves élevées à faible densité pourraient devoir dépenser plus d'énergie pour trouver et attraper leurs proies. Ça ne semble pas avoir été le cas dans le cadre de cette étude puisque

aucune différence significative n'a été observée entre les différentes densités tant en ce qui a trait à la taille des larves qu'à celui de leur ratio TAG/Stérol. Ainsi un ratio proies:prédateur de 15-20 :1 lors de la première alimentation et une densité minimale de 120 proies L⁻¹, correspondant à la densité de proies pour D1 en début d'expérimentation, semblent des conditions d'élevage non limitantes.

Les indicateurs biochimiques de croissance confirment l'absence d'effet « densité » sur le développement des larves. La teneur totale en protéines augmente graduellement avec la taille des larves, mais on ne distingue aucune différence significative liée aux traitements de densité. Aucune différence n'est observée non plus pour le ratio protéines:ARN, ni pour le ratio ARN:ADN, ce qui indique, dans ce dernier cas, que les larves disposent toutes de la même capacité à synthétiser de nouvelles cellules. À température fixe, la disponibilité de la nourriture est le principal facteur affectant le ratio ARN:ADN (Buckley 1984; Bulow 1987). Lorsque bien nourries, le ratio ARN:ADN minimum chez les larves de plies rouge se situerait entre 3,2 et 3,5 (Buckley 1980). Les ratios obtenus dans le cadre de cette étude se situent près ou au delà de ces valeurs confirmant que les larves arrivent à se nourrir normalement à toutes les densités d'élevage utilisées et que les rations administrées étaient non limitantes.

L'une des conséquences d'une difficulté à s'alimenter correctement durant la phase larvaire serait de ne pouvoir accumuler suffisamment de réserves énergétiques et notamment de lipides pour pouvoir se métamorphoser avec succès (Fernandez-Diaz *et al.* 2001).

L'importance de pouvoir accumuler des lipides, et notamment des phospholipides chez les espèces marines, durant la période pré-métamorphique a été mise en lumière chez plusieurs espèces (Youson 1988; Kao *et al.* 1997; Christensen & Korsgaard 1999; Fernandez-Diaz *et al.* 2001). King *et al.* (2000) avancent, en accord avec Beitinger (1990), que le stress résultant de l'entassement à forte densité pourrait affecter l'efficacité d'alimentation des larves et serait la cause d'une tendance à la baisse du taux de croissance qu'ils ont observé lors d'essais en condition commerciale à densité d'élevage élevée (30 et 60 larves L⁻¹) avec des larves de *Paralichthys dentatus*. Le stress dû à l'entassement affecterait l'appétit, les habilités sensorielles et visuelles et la dimension du territoire de chasse. Rappelons que Fraser (1989) a démontré qu'en condition de stress environnemental les larves d'organismes marins pouvaient avoir des difficultés à satisfaire leurs besoins énergétiques à partir de sources exogènes et qu'elles catabolisaient alors leurs réserves de triacylglycérol (TAG). Or le ratio TAG/Stérols (lipides de réserve : lipides de structure) ne diffère pas en fonction de la densité d'élevage et ce tout au long de la période d'expérimentation. La quantité totale de lipides quand à elle présente de légères différences mais celles-ci ne suivent pas le gradient de densité et trouvent peut-être leur origine dans des facteurs circonstanciels au cours des élevages. La perte des répliquats des traitements D4 et D5 ne permet pas en effet une interprétation hors de tout doute. Ainsi les densités d'élevage mises à l'essai lors de ces travaux pourraient ne pas affecter significativement la capacité des larves à accumuler des réserves énergétiques sous forme lipidique.

La synthèse des composantes structurales des membranes cellulaires est d'une importance majeure dans la croissance et le développement des stades larvaires des poissons. Les acides gras, notamment les $\omega 3$ (ex. DHA, EPA) et les $\omega 6$ (ex. ARA) jouent un rôle clé dans l'intégrité et la fluidité des membranes (Harel & Place 1998). Une carence en acide gras dans l'un de ces deux groupes peut se traduire par une réduction de croissance et de l'acuité visuelle réduisant ainsi le succès de chasse (Harel et Place 1998; Beckman et Mustafa 1992). Nous n'avons observé que peu de différences significatives en fonction de la densité d'élevage pour les différentes classes d'acides gras et sur le ratio DHA:EPA. De plus les différences observées ne suivent pas le gradient de densité. Ainsi, sur le plan du profil des acides gras, les larves de plie rouge ont toutes la même capacité de croissance et de développement indépendamment des densités utilisés. Ceci vient corroborer les résultats obtenus pour les indicateurs de croissance.

L'un des problèmes fréquemment rencontré en larviculture des espèces prédatrices est le cannibalisme qui s'exerce dès le passage à une alimentation exogène (Kestemont *et al.* 2003). Les larves cannibales ont alors une croissance plus rapide et l'hétérogénéité des tailles qui s'accroît amplifie le problème (Baras *et al.* 2003). La faible variabilité de la taille des larves de plie rouge observée pour tous les traitements, à chaque période d'échantillonnage, porte à croire que le cannibalisme n'a pas affecté les élevages lors de cette étude. L'absence de différence significative entre les pourcentages de survie aux différentes densités d'élevage vient renforcer cette observation. En effet, lorsque le cannibalisme est présent, la survie est significativement supérieure à forte densité en raison

d'une atténuation des dominances sociales et des antagonismes individuels (Flemming et Johansen 1984; Macintosh & De Silva 1984; Kestemont *et al.* 2003; Baras *et al.* 2003). D'ailleurs aucun cadavre de larve mutilée n'a été observé à la surface des bassins tout au long de l'expérimentation.

La récolte de juvéniles en fin d'expérimentation, exprimée en nombre d'individus par litre de bassin, ne présente pas de différence significative entre les différentes densités utilisées. Cependant l'analyse statistique n'a pu être appliquée que sur les densités D1, D2 et D3 en raison de la perte d'un réplicat aux densités D4 et D5. Ces pertes sont le résultat d'un colmatage des crépines qui s'est traduit par un débordement des bassins. On remarque cependant une tendance à la hausse des nombres moyens récoltés de D1 à D5. Ainsi il semble que des élevages à forte densité puissent éventuellement permettre la récupération d'un plus grand nombre de juvéniles sans pour autant nécessiter plus de travail.

En conclusion il apparaît que l'élevage de larves de plie rouge à forte densité n'affecte ni leur pourcentage de survie, ni leur croissance, ni leur condition générale. Le profil biochimique observé confirme un développement normal des larves.

CHAPITRE 3

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET PARAMÈTRES D'ÉLEVAGE D'UN ROTIFÈRE INDIGÈNE À L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT.

Introduction

La maîtrise complète du cycle d'élevage des poissons marins nécessite que l'on puisse suppléer aux besoins alimentaires de la larve dès son passage à l'alimentation exogène, celle-ci faisant suite à la résorption du sac vitellin (Yúfera & Darias, 2007). À cette étape de leur développement, les larves sont généralement très petites et requièrent des aliments en quantité et en qualité suffisantes et dont la taille est fonction de celle de l'ouverture de la bouche (Hagiwara *et al.* 2007). On admet généralement que le rapport taille de l'aliment / taille de la bouche doit être de 25-50% (Busch, 1996; Fernandez-Diaz *et al.*, 1994; Munk, 1997; Cunha & Planas, 1999). Ainsi une taille d'aliment inférieure à 400 μm est préconisée par Pourriot (1986) pour répondre à la capacité d'ingestion des larves de la plupart des espèces de poissons d'eau marine. C'est notamment le cas pour la plie rouge dont la taille de la larve à l'éclosion n'est que de 3,2 mm (Ben Khemis *et al.* 2000).

Au tout début de cette phase de première alimentation, le tube digestif des larves de poissons marins est généralement peu différencié (Yúfera & Darias, 2007) et la larve peut ne pas être en mesure de digérer des aliments inertes. Ben Khemis *et al.* (2000; 2003) ont en effet démontré que les larves de plie rouge ne peuvent être alimentées avec des

microcapsules inertes qu'après l'atteinte d'une taille de 5,5 mm soit une vingtaine de jours après le passage à une alimentation exogène. De façon générale, des proies vivantes sont donc privilégiées pour les premiers jours de l'alimentation larvaire de plusieurs espèces de poissons marins.

Pourriot (1986) fait valoir, qu'outre sa taille, la proie doit présenter deux autres caractéristiques importantes. Elle doit avoir une flottabilité qui lui permet de rester facilement accessible aux larves qui sont généralement pélagiques. De plus, elle doit aussi être facile à produire en milieu contrôlé afin de disposer des quantités voulues au moment opportun et répondre aux besoins de la production en éclosion. Ces critères limitent alors les groupes taxonomiques d'intérêt aux protozoaires ciliés, aux rotifères, aux stades nauplii de copépodes et aux larves trochophores et véligères d'invertébrés marins. Parmi ces différents groupes, les rotifères se sont avérés être les plus accessibles et les plus faciles à produire.

Rappelons que les rotifères sont les plus petits métazoaires du règne animal et qu'ils se caractérisent par une couronne de cils antérieurs nommée corona (Wallace, 2002). Cette couronne de cils effectue des mouvements ondulatoires qui donnent l'impression que l'animal tourne sur lui-même telle une toupie. De plus de nombreuses espèces sont munies d'un pied articulé qui bouge à la manière d'une pagaie lors du déplacement de l'animal.

Les espèces de rotifères d'eau salée et saumâtre sont peu nombreuses et se retrouvent dans deux types d'habitats (Pourriot 1986). Dans les milieux ouverts comme les estuaires et les zones côtières, différentes espèces du genre *Synchaeta sp* sont fréquemment répertoriées. Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but de maîtriser leur élevage à l'échelle commerciale (Egloff, 1986, 1988; Brownell, 1988; Heinbokel *et al.*, 1988; Oltra & Todoli, 1997; Oltra *et al.* 2000; Bosque *et al.* 2001). Cependant, à ce jour, ils ne sont toujours pas disponibles sur le marché. Dans les milieux fermés tels que les lagunes et les marais salants, on retrouve souvent l'espèce *Brachionus plicatilis*. Cette espèce d'eau tempérée a été rapidement sélectionnée à travers le monde comme proie naturelle produite à l'échelle commerciale en raison de sa rusticité, de sa plasticité physiologique et de la facilité à l'élever (Pourriot, 1986; Coves *et al.* 1986; Hagiwara *et al.* 2007). Les rotifères n'ont cependant qu'une faible valeur nutritive pour les larves de poissons. Il est donc nécessaire de les enrichir, principalement en acides gras, avec différentes préparations commercialisées. Ces enrichissements peuvent varier selon les besoins spécifiques de la larve, besoins qui diffèrent d'une espèce à l'autre (Watanabe *et al.* 1983; Coves *et al.*, 1986; Watanabe 1993; Watanabe & Kiron 1994).

Il n'existe actuellement aucune espèce de rotifère d'eau froide faisant l'objet d'une culture de masse. L'élevage des larves de poissons d'espèces d'eau froide repose encore sur la production de l'espèce *Brachionus plicatilis* dont l'optimum thermique d'élevage se situe aux alentours de 25°C. On admet qu'il serait souhaitable de procéder à la sélection de souches de *Brachionus plicatilis* plus tolérantes aux basses températures afin de supporter

l'élevage des poissons d'eau froide mais à ce jour rien n'a encore été fait en ce sens (Hagiwara *et al.* 2007). Mercier *et al.* (2004) ont vérifié si une acclimatation à 10°C de *Brachionus plicatilis* était susceptible de modifier son intérêt pour l'alimentation larvaire en eau froide. Pour ce faire, ces auteurs ont utilisé le même enrichissement commercial que celui de type HP mentionné au chapitre 1 de cette thèse. Cette acclimatation à basse température se traduisait par une baisse de la population de rotifères d'environ 12% après 12 heures. Assavaaree *et al.* (2001) ont eux aussi observé une mortalité accrue avec des *Brachionus sp* acclimatés à 4°C. Sur le plan biochimique, les rotifères acclimatés à 10°C présentaient une teneur en DHA de 6,9% plus élevée que celle de rotifères non acclimatés et le ratio DHA:EPA augmentait de 0,38 à 0,66 (Mercier *et al.* 2004). L'augmentation de la teneur en acides gras hautement insaturés (HUFA), dont fait partie le DHA, chez les rotifères d'eau chaude acclimatés à basse température est un phénomène signalé dans la littérature scientifique (e.g. Minkoff 2000). Ce taux accru en DHA est en soi un aspect intéressant, puisque, tel que discuté précédemment, les larves de poissons requièrent une plus grande quantité de cet acide gras essentiel au tout début de leur développement. Notons cependant que ces valeurs demeurent relativement faibles en comparaison avec le ratio généralement prescrit dans la littérature et qui doit préférentiellement être supérieur à 2 (Harel & Place 1998; Blair *et al.* 1998). Cette teneur plus élevée en DHA a également permis de modifier le profil biochimique des larves (Mercier *et al.* 2004). Ainsi, celles nourries avec les rotifères acclimatés à 10°C présentaient un pourcentage de DHA significativement plus élevé que celles nourries avec les rotifères non acclimatés.

Cependant aucun effet significatif n'a été constaté sur la croissance (indicateurs biochimiques et taille) entre ces deux groupes de larves.

L'utilisation d'un rotifère indigène à l'habitat de la plie rouge et naturellement acclimaté à l'eau froide apparaissait donc comme une avenue à explorer dans l'objectif de trouver une proie au profil biochimique plus approprié en regard des besoins nutritionnels des larves de cette espèce. De plus, il pourrait offrir de bonnes performances de production en eau froide.

Un métazoaire planctonique indigène à l'estuaire du Saint-Laurent, non formellement identifié, a fait l'objet de tentatives d'élevage à la Station aquicole de Pointe-au-Père à la fin des années 90 (données non publiées). Cependant, au début des travaux de cette thèse, il n'était toujours pas possible d'assurer une production permettant de conduire des expériences alimentaires en l'administrant aux premiers stades larvaires de la plie rouge faute de pouvoir maîtriser ses paramètres de production.

Les connaissances acquises à ce jour sur les modalités d'élevage des rotifères portent principalement sur l'espèce *Brachionus plicatilis* en raison de son utilisation universelle pour la première alimentation larvaire chez les poissons marins (Lubzens *et al.* 2001; Lubzens *et al.* 1989; Lubzens 1987). Coves *et al.* (1986) offrent une bonne synthèse des techniques et paramètres d'élevage intensif mis au point au cours des années 70 et 80 pour l'élevage de *Brachionus sp.* Ce rotifère peut être élevé avec succès dans des bassins d'eau de mer préalablement filtrée à 5-25 μm afin d'éviter la contamination par les ciliés.

L'homogénéisation du milieu d'élevage peut être assurée par un léger bullage au fond du bassin créant un courant ascendant (up-welling). Pour être optimale, la production de *Brachionus plicatilis* doit se faire à une température de 25-27°C. Afin d'éviter l'effondrement rapide des populations, il faut effectuer un repiquage des élevages dans des bassins propres une fois par semaine. Le régime alimentaire de base de *Brachionus plicatilis* et des rotifères en général comprend des microalgues et les espèces utilisées influenceraient la production (Kostopoulou & Vadstein 2007; Suchar & Chigbu 2006). Les genres *Nannochloropsis sp*, *Pavlova sp* et *Chlorella sp* sont souvent utilisés et contribuent aussi à modifier le profil en acides gras des rotifères. Cependant, pour réduire les besoins en production de microalgues lors d'élevages intensifs, on remplace une partie du régime alimentaire algal par de la levure de boulangerie, facilement disponible à faibles coûts, ou par des préparations alimentaires commerciales permettant aussi « d'enrichir » les rotifères. En production intensive de *Brachionus plicatilis*, il est recommandé de prélever quotidiennement 25% du volume de production et de le remplacer par de l'eau de mer fraîche (Coves et al. 1986). L'expérience acquise avec *Brachionus plicatilis* à la Station aquicole de Pointe-au-Père confirme que le taux de renouvellement quotidien du milieu de culture joue effectivement un rôle important. Cependant l'habitat de *Brachionus plicatilis* étant lagunaire et tempéré, il est fort probable que les paramètres d'élevage d'une espèce estuarienne, d'eau froide de surcroît, diffèrent quelque peu.

Le genre *Synchaeta sp* est typique des milieux estuariens (Pourriot, 1986) et les paramètres régissant sa production en milieu contrôlé pourraient servir de référence pour tenter la

production de rotifères issus de l'estuaire du Saint-Laurent. Une revue de la littérature scientifique sur ce genre confirme cependant que sa production de masse n'est pas encore maîtrisée malgré différentes tentatives effectuées à travers le monde (Egloff 1986; 1988; Heinbokel *et al.* 1988; Brownell 1988; Oltra et Todoli 1997; Oltra *et al.* 2000; Bosque *et al.* 2001) et les informations disponibles ne donnent que peu de pistes pour trouver la cause de ces insuccès et ainsi les éviter. On signale cependant que les meilleurs résultats sont obtenus en nourrissant des élevages de *Synchaeta sp* avec un mélange de différentes espèces de microalgues plutôt qu'avec une seule espèce (Brownell 1988; Egloff 1988).

Des résultats encourageants avec le rotifère prélevé dans l'estuaire du Saint-laurent ont été obtenus lors d'essais préliminaires de maintien d'un élevage à long terme (*cf* section Résultats). L'importance de l'ajout d'un enrichissement commercial de même que la nature de l'ajout de la diète algale n'ont cependant pas été étudiés de façon systématique. Il importait également de préciser le taux de renouvellement optimum.

L'objectif spécifique de ce chapitre est de préciser les paramètres permettant de soutenir une production de masse d'un rotifère indigène à l'estuaire du Saint-Laurent. Ceci permettrait de vérifier à moyen terme l'hypothèse selon laquelle une proie zooplanctonique, issue du même environnement, constitue une meilleure source alimentaire pour les larves de plies rouges qu'un rotifère d'eau chaude que l'on a enrichi à l'aide d'additifs alimentaires.

Matériel et méthodes

Obtention d'une souche de rotifères indigènes

La méthode permettant l'obtention d'une souche de rotifères indigènes à l'estuaire du Saint-Laurent a été mise au point à la fin des années 90 à la Station aquicole de Pointe-au-Père (R. Fournier, données non publiées) et s'inspire de celle de Pourriot (1980). Elle consiste à récolter environ 150 litres d'eau de mer non filtrée et à provoquer une floraison phytoplanctonique, notamment de diatomées, par l'ajout d'une solution nutritive F/2 (Guillard & Ryther, 1962) et l'exposition à un éclairage fluorescent de photopériode 12:12. L'environnement est maintenu à environ 10°C (température d'élevage des larves de plie rouge) et un système de bullage assure une homogénéisation constante de la colonne d'eau. La densité de rotifères indigènes, généralement mono-spécifique, connaît une importante augmentation suite à la chute de la floraison phytoplanctonique.

L'étape subséquente consiste à mettre les rotifères en élevage. Pour ce faire on transfère des volumes d'eau de mer de 18 litres du cylindre-mère dans une série de bidons de plus petite taille. La figure 11 illustre les étapes de cette mise en élevage.

Le rotifère indigène à l'estuaire du Saint-Laurent qui a pu être isolé pour procéder aux essais d'élevage est issu d'échantillons d'eau de mer prélevés en octobre et novembre 2002 dans la zone littorale de Pointe-au-Père. Son identification taxonomique a été réalisée en appliquant la clé d'identification de Thane-Fenchel (1968) et avec la collaboration du Dr

Serge Parent du Biodôme de Montréal et du Dr Gesche Winkler de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski. Les photographies de l'animal ont été prises à un grossissement de 400X à l'aide d'un microscope de modèle Olympus BX50 à partir d'échantillons préservés dans un mélange de paraformaldéhyde et de glutéraldéhyde (Tsuji & Yanagita, 1981).

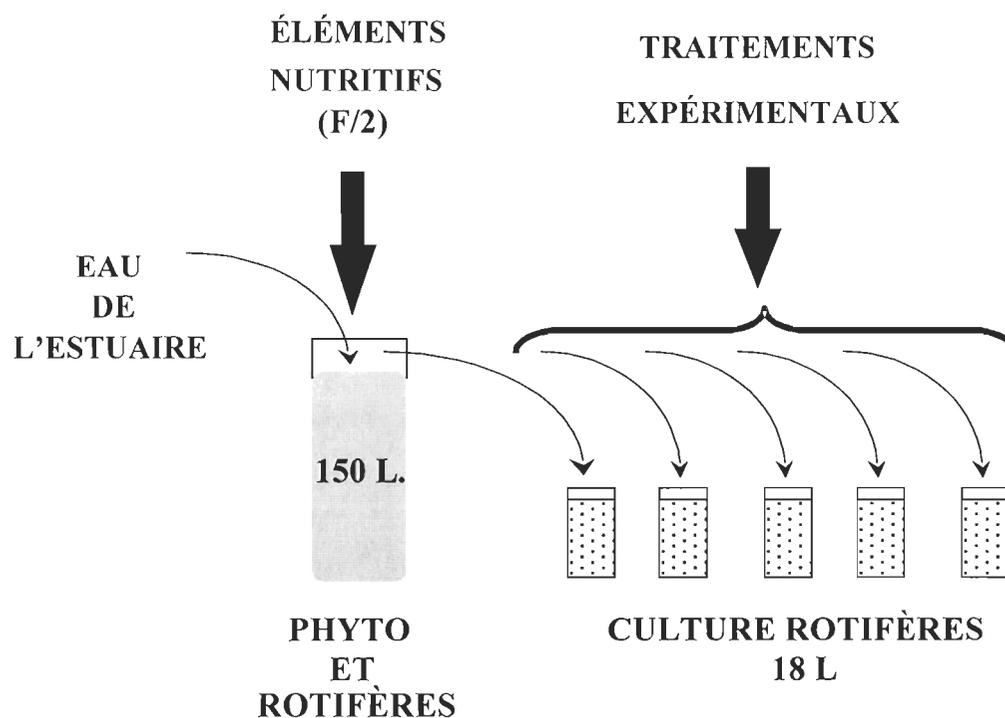


Figure 11 : Mise en élevage des rotifères indigènes

Concept expérimental

Une fois le rotifère obtenu à haute densité dans le cylindre-mère, des essais de maintien à long terme d'un élevage ont été réalisés en utilisant un régime alimentaire composé d'un mélange algal de l'eustigmatophycée *Nannochloropsis* sp et de la diatomée *Thalassiosira pseudomonas* (50:50) ainsi que d'un ajout quotidien de 0,1 g de DHA-Protein Selco (INVE Aquaculture). Cette ration correspond à la quantité minimale ajoutée à un volume équivalent d'élevage du rotifère *Brachionus plicatilis*. Les volumes de renouvellement quotidien du milieu d'élevage ont varié de 1 à 2 L (soit 5,5 et 12,2 % respectivement des 18 L du milieu d'élevage) et un repiquage dans des bidons propres était réalisé sur une base hebdomadaire.

Les travaux visant à préciser les paramètres d'élevage ont consisté à vérifier l'effet du taux de renouvellement quotidien du milieu d'élevage, de la ration quotidienne de phytoplancton ajoutée au milieu d'élevage, des espèces de microalgues composant la ration quotidienne de phytoplancton, de la ration quotidienne d'enrichissement pour rotifères ajoutée au milieu d'élevage, de la composition biochimique des rations d'enrichissement et de la fréquence quotidienne des repas (tableau 11). Tout comme pour le cylindre-mère, un système de bullage était installé dans chacun de ces bidons d'élevage et ceux-ci étaient maintenus à 10°C, sous un éclairage fluorescent de photopériode 12:12. Tous les traitements décrits dans les lignes qui suivent ont été appliqués en duplicata sur une durée de 8 ou 9 jours.

Tableau 11 : Synopsis du concept expérimental

Expériences	Traitements	Paramètres				
		Phytoplancton	Qté. phyto.	Enrichissement	Renouvellement	Fréquence
taux de renouvellement	1 L / jour (5,5 %)	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	1 L/j (5,5 %)	4 X par jour
	3 L / jour (16,7 %)	"	"	"	3 L/j (16,7 %)	"
	5 L / jour (27,8 %)	"	"	"	5 L/j (27,8 %)	"
quantité de phytoplancton	Phytoplancton 1X	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	3 L/j (16,7 %)	4 X par jour
	Phytoplancton 2X	"	1,9 x 10 ⁵ ml ⁻¹	"	"	"
	Phytoplancton 3X	"	2,8 x 10 ⁵ ml ⁻¹	"	"	"
type phytoplancton	100% <i>Nanno.</i>	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	3 L/j (16,7 %)	4 X par jour
	100% <i>Thalassio.</i>	<i>Thalassio.</i> ²	"	"	"	"
	50% / 50%	2 espèces	"	"	"	"
quantité d'enrichissement	0,1 g enrichissement	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	3 L/j (16,7 %)	4 X par jour
	0,3 g enrichissement	"	"	0,3 g C. Selco	"	"
	0,5 g enrichissement	"	"	0,5 g C. Selco	"	"
type d'enrichissement	Culture Selco	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	3 L/j (16,7 %)	4 X par jour
	Algamac 2000	"	"	0,1 g Algamac	"	"
	Rotimac	"	"	0,1 g Rotimac	"	"
fréquence d'alimentation	4 repas / jour	<i>Nanno.</i> ¹	9,3 x 10 ⁴ ml ⁻¹	0,1 g C. Selco	3 L/j (16,7 %)	4 X par jour
	2 repas / jour	"	"	"	"	2 X par jour
	1 repas / jour	"	"	"	"	1 X par jour

¹ *Nanno.* pour *Nannochloropsis sp.*; ² *Thalassio.* pour *Thalassiosira pseudomonas*

La première série d'expériences visait à déterminer le taux optimal de renouvellement du milieu de culture. Le traitement consistait à prélever quotidiennement 1L (5,5 %), 3L (16,7 %) et 5L (27,8 %) du milieu d'élevage et à le renouveler avec de l'eau de mer naturelle filtrée à 0,8 μm , traitée aux UV et préalablement refroidie à 10°C durant une nuit complète. Tous les bidons recevaient quotidiennement 80 ml de culture de *Nannochloropsis sp.*, à raison d'environ 21×10^6 cellules ml^{-1} de milieu de culture phytoplanctonique, (pour un total de $1,7 \times 10^9$ cellules, soit $9,3 \times 10^4$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage), elle aussi indigène à l'estuaire du Saint-Laurent, et 0,1 g de Culture Selco (INVE Aquaculture) en quatre repas donnés durant la période d'éclairage.

Par la suite nous avons vérifié l'effet de la quantité de cellules phytoplanctoniques en n'utilisant que la souche de *Nannochloropsis sp.* isolée à la Station aquicole de Pointe-au-Père. Trois traitements ont été appliqués soit l'ajout quotidien de 80 ml (1X, pour un total de $1,7 \times 10^9$ cellules, soit $9,3 \times 10^4$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage), de 160 ml (2X, pour un total de $3,4 \times 10^9$ cellules, soit $1,9 \times 10^5$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage) et de 240 ml (3X, pour un total de $5,0 \times 10^9$ cellules, soit $2,8 \times 10^5$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage) de culture phytoplanctonique. Tous les bidons d'élevage recevaient également 0,1 g de Culture Selco (INVE Aquaculture) en quatre repas donnés durant la période d'éclairage. Pour cette expérience, le renouvellement quotidien de tous les milieux d'élevage était de 3L (16.7 %). Nous avons aussi mené une expérience afin de vérifier l'effet sur les élevages de rotifères de la composition spécifique de la ration quotidienne de phytoplancton. Pour ce faire, nous avons utilisé deux souches d'algues, soit l'eustigmatophycée du genre *Nannochloropsis sp.*,

ainsi que la diatomée *Thalassiosira pseudomonas*. Les trois traitements appliqués consistaient à fournir 80 ml de culture composée de 100% de *Nannochloropsis sp.* (pour un total de $1,7 \cdot 10^9$ cellules, soit $9,3 \cdot 10^4$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage), de 100% de *Thalassiosira pseudomonas* (dont la concentration en culture est 20 fois moins dense mais la taille 5 fois plus grande que *Nannochloropsis sp.*) ou un mélange composé de 40 ml de chacune des deux cultures. Ces rations phytoplanctoniques, ainsi que celles de 0,1 g de Culture Selco (INVE Aquaculture) pour tous les bidons étaient données en quatre repas durant la période d'éclairage.

L'importance de l'ajout d'un enrichissement pour rotifères a d'abord été vérifiée en ce qui a trait à la quantité fournie aux milieux d'élevage. Les préparations commerciales d'enrichissement contiennent en effet des lipides et des protéines pouvant être utilisés comme aliment par les rotifères. Pour cette expérience, l'enrichissement utilisé a été le Culture Selco (INVE Aquaculture). Des quantités de 0,1, 0,3 et 0,5 g ont été ajoutées quotidiennement aux milieux d'élevage, en quatre repas, en plus de la ration d'algues elle aussi distribuée en quatre repas, durant la période d'éclairage. À chacun de ces repas, une culture de *Nannochloropsis sp.* était aussi ajoutée pour un total de 80 ml par jour. Le renouvellement du milieu était de 3L j^{-1} . Par ailleurs, nous avons aussi mis à l'essai différents enrichissements commerciaux présentant différentes teneurs en lipides et en acides gras, soit le Culture Selco (INVE Aquaculture), l'Algamac 2000 (Aquafauna Bio-marine) et le Rotimac (Aquafauna Bio-marine), tous ayant sensiblement la même teneur en protéines (tableau 12). Pour cette expérience la quantité d'enrichissement ajoutée aux

milieu d'élevage était de $0,1 \text{ g j}^{-1}$ en plus d'une ration quotidienne de 80 ml de culture de *Nannochloropsis sp.* donnée en quatre repas durant la période d'éclairage. Le renouvellement du milieu était de 3L j^{-1} .

Tableau 12 : Composition des préparations d'enrichissement.

Marques	Culture Selco	Rotimac	Algamac 2000
Protéine (%)*	35	37	39
Lipides (%)*	15	12	32
DHA :EPA*	1	65	40

* Selon les valeurs présentées par le manufacturier

Finalement l'effet de la fréquence des repas quotidiens a été vérifié en administrant les rations de phytoplancton (80 ml de *Nannochloropsis sp.*) et d'enrichissement (0,1 g de Culture Selco, INVE Aquaculture) en un seul, en deux ou en quatre repas durant la période d'éclairage. Le renouvellement du milieu d'élevage était de 3L j^{-1} pour cette expérience.

La densité des rotifères dans chacun des bidons a été estimée aux jours J3, J6 (ou J7) et J8 (ou J9) pour chacune des expériences. Pour ce faire, nous avons prélevé dans un godet, à l'aide d'une pipette, environ 10 ml du milieu d'élevage au centre du bidon. Après agitation de ce volume, 3 ml ont été prélevés en triplicata à l'aide d'une seringue et répartis en gouttelettes sur un plat de Pétri. Le compte des rotifères contenus dans ces 3 ml s'est

effectué sous loupe stéréoscopique. Le résultat des comptes a permis d'estimer par simple règle de trois la densité de rotifères au litre.

Analyse des données

Les résultats ont été exprimés en nombre de rotifères au litre lors de chaque échantillonnage. S'inspirant de travaux sur la production de microalgues (Vonshak 1992; Tomaselli 1997; Karar 2005) et sur d'autres espèces de rotifères (Kostopoulou & Vadstein 2007; Hotos 2003; Bosque *et al.* 2001; Oltra *et al.* 2000), une valeur de taux instantané de production (μ) a été calculée. Celle-ci se définit par l'équation $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) * (t_2 - t_1)$ où x_1 et x_2 sont les densités observées aux temps t_1 et t_2 . Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel STATISTICA version 5,1 (édition 1997). La normalité des données a été vérifiée avant chacune des analyses statistiques en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. L'homogénéité des variances a été vérifiée en utilisant un test Chi-deux de Bartlett (Sokal & Rohlf 1995). Les données ont été transformées lorsque requis afin de respecter les conditions de normalité et d'homéoscédasticité. Les résultats entre traitements ont été comparés en utilisant des ANOVAs à deux facteurs. Le test de Tukey HSD modifié pour des n inégaux ou le test *a posteriori* de Games & Howell ont été appliqués lorsque requis. Pour toutes les analyses statistiques, un seuil $\alpha = 0,05$ a été retenu.

Résultats

Des échantillons d'eau d'environ 150 litres chacun ont été récoltés de septembre à mai de chaque année, durant trois années consécutives, dans l'estuaire du Saint-Laurent. Seuls les échantillons récoltés en automne ont permis l'obtention d'organismes zooplanctoniques ayant les caractéristiques d'un rotifère de taille supérieure à 50 μm . À tous les autres moments de l'année, aucun rotifère de cette taille n'était observé ou encore observé en très faibles densités après le bloom phytoplanctonique dans le cylindre en culture.

Classification taxonomique de l'organisme

L'organisme zooplanctonique isolé à partir de ces échantillons présente les caractéristiques typiques d'un rotifère telles que décrites par Wallace (2002) et Turner (1988). La figure 12 montre un spécimen grossi à 400 X préservé dans un mélange de paraformaldéhyde et de glutéraldéhyde. On y distingue clairement une couronne de cils dans sa partie supérieure. À l'état vivant, cette couronne est déployée et ondule donnant l'impression que l'animal pivote sur lui même lorsqu'il se déplace. On note aussi la présence d'un pied à la base de l'animal mais il n'est pas possible de préciser si ce pied est muni d'orteils. Celui-ci bouge à la manière d'une pagaie lorsque l'animal se déplace. La présence d'un pied articulé est une autre pièce anatomique caractérisant une majorité d'espèces de rotifères (Thane-Fenchel 1968). Les spécimens mesurés sous loupe stéréoscopique avaient une taille oscillant entre 80 et 100 μm .

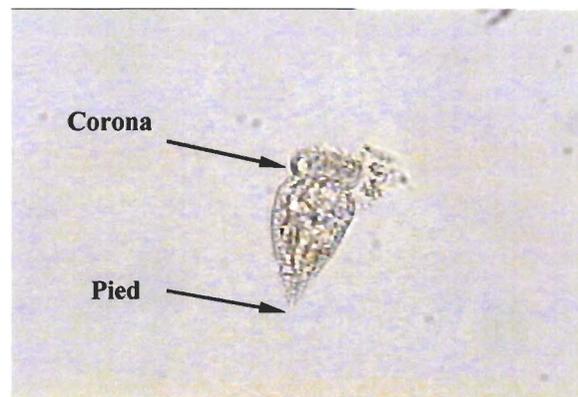


Figure 12 : Rotifère indigène à l'estuaire du Saint-Laurent (400 X).

En appliquant la clé d'identification proposée par Thane-Fenchel (1968) pour les rotifères d'eaux marines et saumâtres, nous retrouvons les caractéristiques du genre *Pleurotrocha sp.* de l'ordre des Monogonontes. Il s'agit d'organismes ne vivant pas en colonie. Il est à noter que l'on ne distingue pas de lorica entourant le corps de l'animal ce qui constitue une caractéristique distinctive pour sa classification taxonomique. Tous les spécimens observés se déplaçaient librement et individuellement. La partie supérieure de l'animal ne présente pas d'auricules sous la corona, ce qui aurait été une caractéristique du genre *Synchaeta sp.* Les orteils ne pouvant se distinguer clairement, il semble certain que l'animal n'en présente pas qui soient plus longues que le corps, auquel cas le genre aurait été différent (*Monommata sp.*). Une identification complète aurait nécessité que l'on puisse distinguer le mastax (pièces anatomiques internes servant à broyer la nourriture). Celui du genre *Pleurotrocha sp.* est symétrique.

Maintien d'un élevage à long terme

Un élevage de ce rotifère a été maintenu durant 6 semaines consécutives (avec une série de repiquages successifs) à des densités pouvant dépasser 100 000 rotifères au litre (figure 13). Les densités représentées sur la figure sont les valeurs maximales mesurées parmi les bidons d'élevage pour la journée correspondante. Les importantes chutes de densité observées au 14^{ème} et au 25^{ème} jour ont fait respectivement suite à un repiquage trop tardif et à un arrêt momentané du bullage dans les bidons en raison d'une interruption de courant électrique. Dans les deux cas il a été possible de retrouver des densités importantes. La possibilité de maintenir un élevage durant plusieurs semaines étant démontrée, il restait à préciser les paramètres de production.

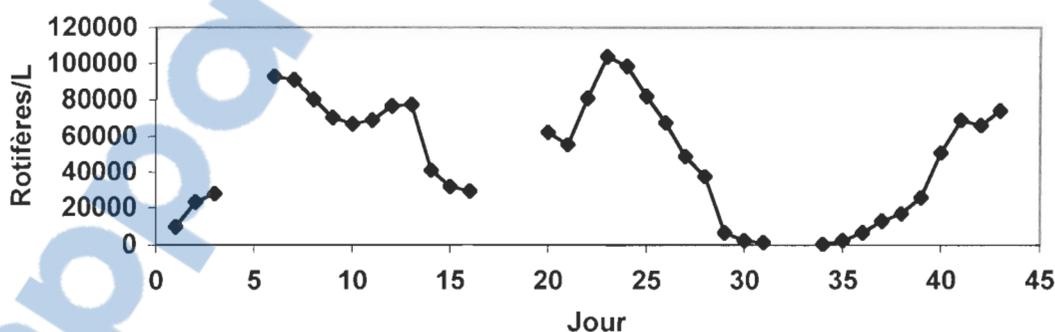


Figure 13 : Évolution des densités maximales d'un élevage de rotifères d'eau froide durant une période de 6 semaines

Paramètres des conditions d'élevage

Les modifications du volume quotidien de renouvellement du milieu ne se sont pas traduits par des densités de rotifères différentes dans les bidons de production après 3 jours d'élevage ($p = 0,053$, $F = 9,06$, $df = 2$; figure 14). Cependant, après une semaine, la densité moyenne dans les bidons n'ayant subi qu'un renouvellement de 1 L j^{-1} (soit un peu plus de 5% du volume total) était significativement supérieure ($p = 0,0005$, $F = 243,63$, $df = 2$), avec $69\ 833$ rotifères L^{-1} , à celles des bidons ayant subi un renouvellement de 3 L j^{-1} et 5 L j^{-1} . La densité moyenne pour le traitement 1 L j^{-1} était alors quatre fois plus importante que celle observée dans les bidons où un peu plus de 15% du volume d'eau avait été renouvelé (3 L j^{-1}). Cette différence était toujours présente à J9 alors que la densité moyenne du traitement avec renouvellement à 1 L j^{-1} était de $124\ 000$ rotifères L^{-1} ($p = 0,003$, $F = 68,44$, $df = 2$).

En ce qui a trait aux taux instantanés de production μ (tableau 13), ceux calculés pour les renouvellements à 1 et 3 L j^{-1} sont significativement plus élevés que celui calculé pour les bidons de production ayant un volume de renouvellement quotidien à 5 L j^{-1} sauf à J9 alors qu'ils ne sont pas significativement différents. Signalons d'ailleurs que pour un renouvellement de 5 L j^{-1} , les taux instantanés de production moyens sont négatifs à chaque jour de production, ce qui indique une baisse constante de la densité en rotifères.

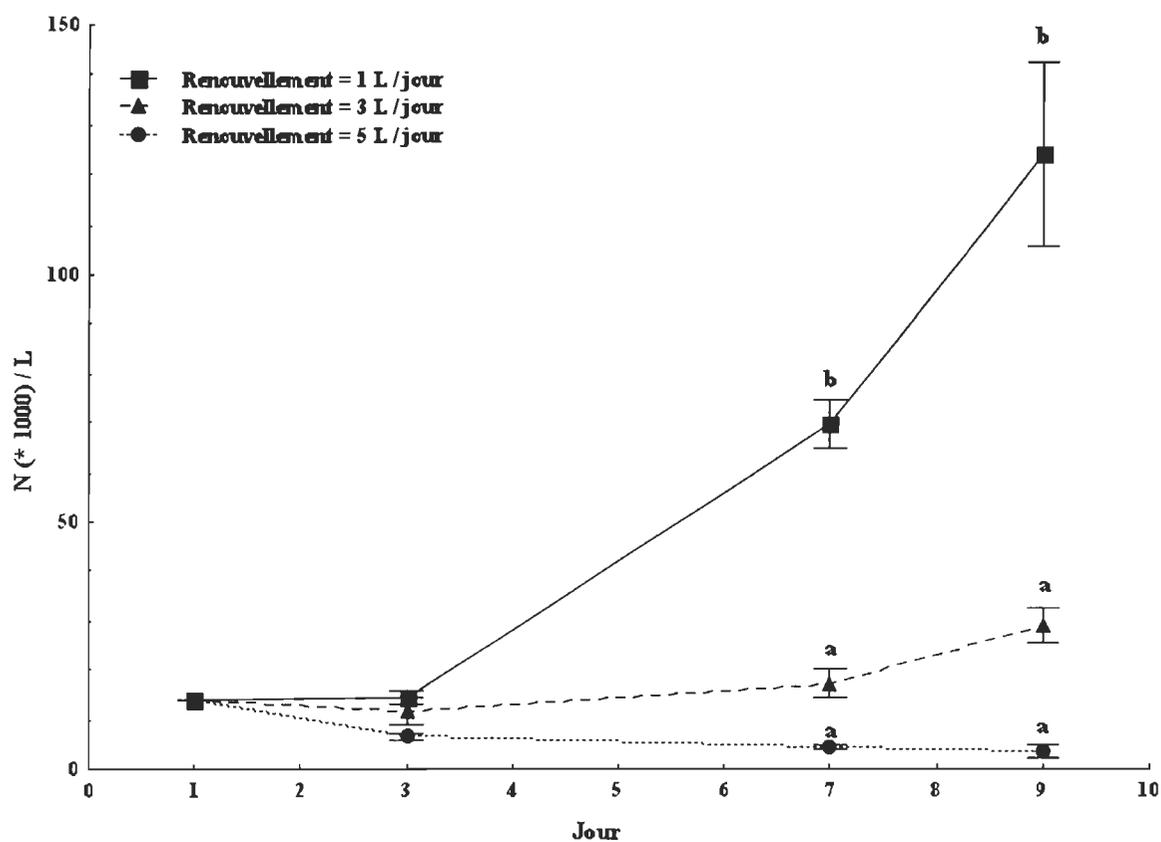


Figure 14 : Évolution de la densité des rotifères selon le taux de renouvellement quotidien du milieu.

Moyenne \pm écart-type; des lettres différentes indiquent des différences significatives.

Tableau 13 : Taux instantanés de production (μ) lors des différentes expériences d'élevage du rotifère indigène au Saint-Laurent.

Expérience	Traitement	J3	J6*	J8*
Renouvellement journalier en eau de mer	1 L / jour	0,019 ± 0,049 ^b	0,396 ± 0,041 ^c	0,285 ± 0,106
	3 L / jour	- 0,091 ± 0,122 ^{ab}	0,098 ± 0,016 ^b	0,267 ± 0,150
	5 L / jour	- 0,377 ± 0,054 ^a	- 0,101 ± 0,055 ^a	- 0,101 ± 0,143
Quantité de phytoplancton dans le bidon	1X (9,3 10 ⁴ /ml)	0,198 ± 0,130	- 0,039 ± 0,004	- 0,047 ± 0,005
	2X (1,9 10 ⁵ /ml)	0,190 ± 0,136	- 0,037 ± 0,066	- 0,029 ± 0,025
	3X (2,8 10 ⁵ /ml)	0,116 ± 0,209	0,002 ± 0,003	- 0,110 ± 0,033
Espèces de microalgues ajoutées	100% <i>N.</i> ¹	0,073 ± 0,039	0,173 ± 0,006	0,269 ± 0,027
	100% <i>T.</i> ²	- 0,048 ± 0,033	0,230 ± 0,038	0,270 ± 0,162
	50% <i>N.</i> ¹ -50% <i>T.</i> ²	- 0,224 ± 0,581	- 0,146 ± 0,471	- 0,208 ± 0,434
Quantité d'enrichissement commercial	0,1 g / jour	- 0,182 ± 0,024	- 0,133 ± 0,154	
	0,3 g / jour	- 0,349 ± 0,017	- 1,021 ± 0,011	
	0,5 g / jour	- 0,422 ± 0,151	- 1,759 ± 1,729	
Type d'enrichissement commercial	Culture Selco	0,012 ± 0,007	0,027 ± 0,011	0,305 ± 0,015 ^b
	Algamac 2000	- 0,214 ± 0,015	- 0,270 ± 0,112	- 0,002 ± 0,029 ^a
	Rotimac	0,074 ± 0,136	- 0,069 ± 0,219	0,415 ± 0,096 ^b
Distribution de l'enrichissement commercial	4 repas / jour	0,488 ± 0,148	0,231 ± 0,018	- 0,915 ± 1,743
	2 repas / jour	0,487 ± 0,035	0,232 ± 0,058	0,211 ± 0,259
	1 repas / jour	- 0,089 ± 0,669	- 0,043 ± 0,728	- 1,635 ± 2,572

Moyenne ± écart-type; * à J7 et J9 pour l'expérience sur le renouvellement quotidien; ¹ *N.* pour *Nannochloropsis sp.*; ² *T.* pour *Thalassiosira pseudomonas*; la présence de lettres différentes en exposant indique des différences significatives entre les traitements pour un même jour.

Les deux expériences portant sur l'ajout quotidien de phytoplancton n'ont montré aucune différence significative entre les traitements. Ainsi des rations quotidiennes de $9,3 \cdot 10^4$, $1,9 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ou $2,8 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$ de cellules de *Nannochloropsis sp* par ml de milieu de culture n'ont pas eu d'effet sur la densité des rotifères en élevage ($p = 0,85$, $F = 0,16$, $df = 2$; figure 15). Les densités moyennes se sont maintenues à environ $85\ 000 \text{ rotifères L}^{-1}$. Les taux instantanés de production correspondant ne présentent eux aussi aucune différence significative ($p = 0,76$, $F = 0,28$, $df = 2$; tableau 13). La composition spécifique des diètes algales utilisées, soit *Nannochloropsis sp* seule ou *Thalassiosira pseudomonas* seule ou un mélange à 50%-50% de *Nannochloropsis sp* et *Thalassiosira pseudomonas*, n'a pas non plus modifié la densité des rotifères en élevage ($p = 0,34$, $F = 1,24$, $df = 2$; figure 16), ni les taux instantanés de production ($p = 0,11$, $F = 2,90$, $df = 2$; tableau 13). Les densités de rotifères sont passées d'une moyenne d'environ $62\ 000 \text{ L}^{-1}$ à J3 à une moyenne d'environ $190\ 000 \text{ L}^{-1}$ à J8 indiquant une augmentation croissante de la densité dans chacun des cas.

Les essais portant sur la quantité d'enrichissement (Culture Selco, INVE Aquaculture) ajoutée quotidiennement aux élevages de rotifères n'ont démontré aucune différence significative entre des rations de $0,1 \text{ g jour}^{-1}$, de $0,3 \text{ g jour}^{-1}$ et de $0,5 \text{ g jour}^{-1}$ ($p = 0,11$, $F = 2,85$, $df = 2$; figure 17). On note cependant que les densités ont décliné tout au long de l'expérience partant de $14\ 390 \text{ rotifères L}^{-1}$ au départ et passant successivement à une moyenne d'environ $8\ 000 \text{ rotifères L}^{-1}$ à J3 à une moyenne d'environ 400 L^{-1} à J8 pour les rations de $0,3 \text{ g jour}^{-1}$ et de $0,5 \text{ g jour}^{-1}$. Les taux instantanés de production sont demeurés similaires et négatifs entre les traitements ($p = 0,25$, $F = 1,73$, $df = 2$; tableau 13).

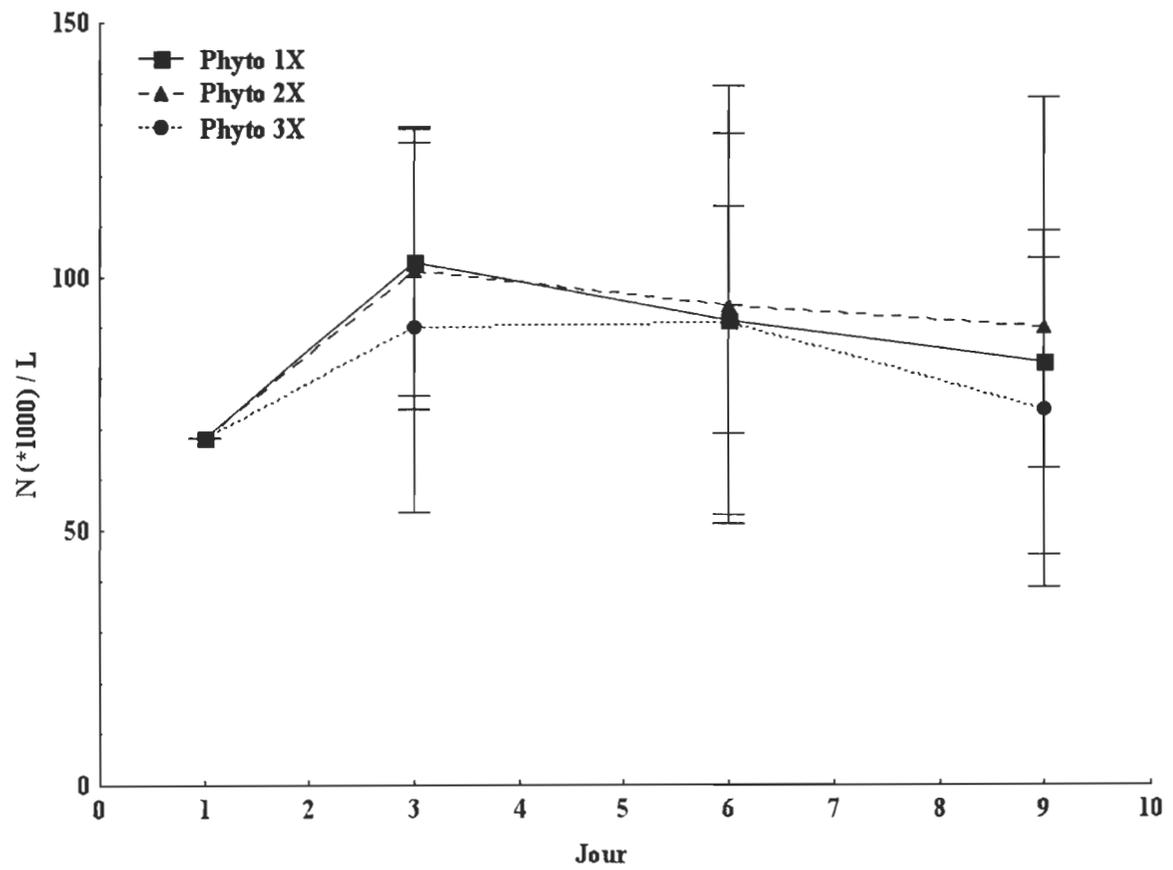


Figure 15 : Évolution de la densité des rotifères selon la concentration de *Nannochloropsis sp.*

Moyenne \pm écart-type; 1X: $9,3 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$; 2X: $1,9 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$; 3X: $92,8 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$.

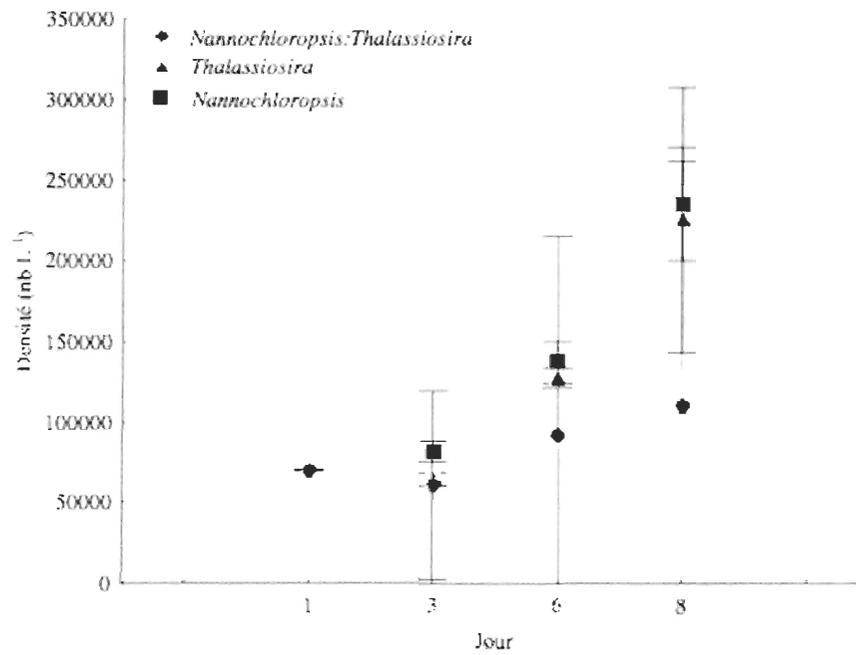


Figure 16 : Évolution de la densité de rotifères selon les espèces de microalgues.

Moyenne \pm écart-type.

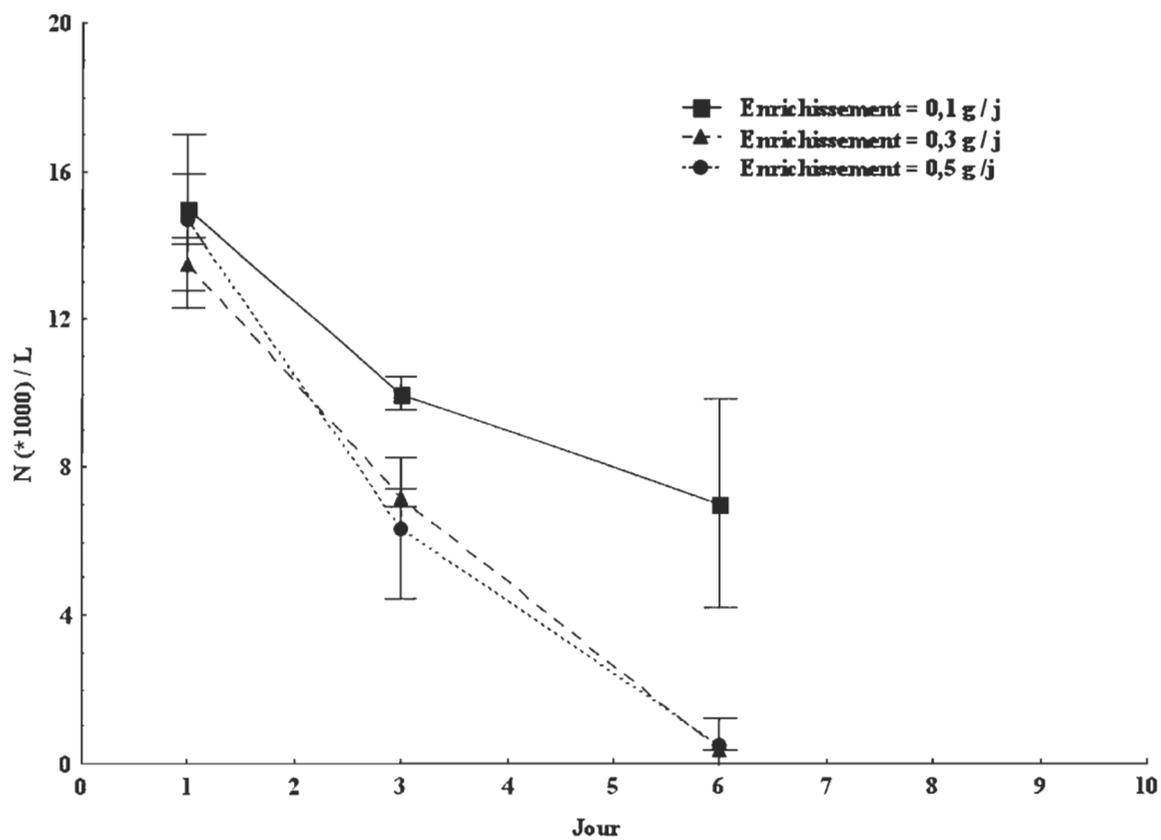


Figure 17 : Évolution de la densité des rotifères selon la ration quotidienne de l'enrichissement Culture Selco.

Moyenne \pm écart-type.

Cependant, le type d'enrichissement a eu un effet significatif sur la densité des rotifères à la fin de l'expérience à J8 ($p = 0,00003$, $F = 41,44$, $df = 2$). Les élevages ayant reçu des rations d'Algamac 2000, soit l'enrichissement présentant la plus grande proportion en lipides selon les indications des fournisseurs, présentaient une densité moyenne significativement inférieure à ceux ayant reçu des rations de Culture Selco et de Rotimac (figure 18). Le taux instantané de production à J8 avec l'Algamac 2000 est également significativement inférieur à celui obtenu avec le Rotimac et le Culture Selco ($p = 0,012$, $F = 27,31$, $df = 2$; tableau 13).

Finalement l'étalement des rations quotidiennes en algues et en enrichissement commercial en 4, 2 ou 1 repas par jour n'a pas eu d'effet significatif tant sur les densités des élevages ($p = 0,87$, $F = 0,14$, $df = 2$; figure 19) que sur le taux instantané de production ($p = 0,40$, $F = 1,03$, $df = 2$; tableau 13).

Discussion et conclusion

Les travaux réalisés avec le rotifère prélevé dans l'estuaire du Saint-Laurent démontrent qu'il est possible de maintenir une culture durant plusieurs semaines en la repiquant sur une base hebdomadaire. De plus les densités obtenues sont relativement élevées. Ainsi, l'élevage à long terme a donné par moments des densités de plus de 100 000 rotifères L^{-1} et certaines des expériences menées sur une semaine ont permis de dépasser 200 000 rotifères L^{-1} et même d'atteindre un maximum de 235 000 rotifères L^{-1} . Lors des élevages à court terme, les densités les plus fortes ont été obtenues avec un renouvellement

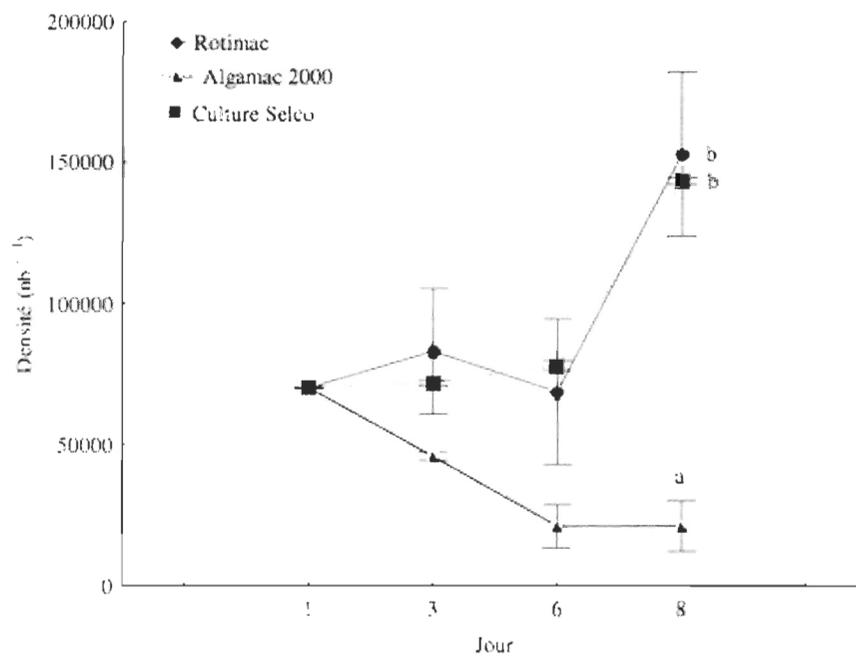


Figure 18 : Évolution de la densité de rotifères en fonction du type d'enrichissement.

Moyenne \pm écart-type.

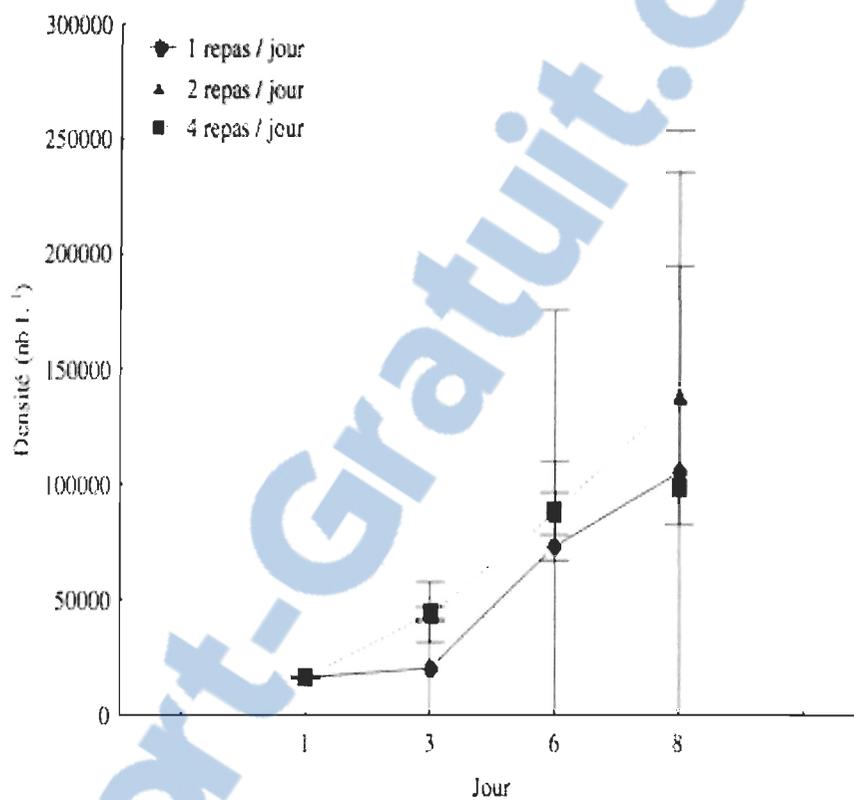


Figure 19 : Évolution de la densité des rotifères selon le nombre de repas quotidiens.

Moyenne \pm écart-type.

de 3 L jour⁻¹ et ajouts quotidiens de 0,1 g de Culture Selco et 80 ml (soit 1,7 10⁹ cellules) d'un mélange de *Nannochloropsis sp* et *Thalassiosira pseudomonas* (50:50) donné en 4 repas. À titre de comparaison, Brownell (1988), qui semble être le seul à avoir réalisé une culture de masse de *Synchaeta hutchingsi*, a maintenu une densité de 15-20 000 rotifères L⁻¹ pour une période n'ayant pas dépassé 3 semaines. Les élevages du rotifère *Brachionus plicatilis* réalisés avec le même type d'équipement afin de subvenir aux besoins en première alimentation des larves de plie rouge (chapitres 1 et 2) fournissaient généralement des densités de 50 000 à 150 000 rotifères L⁻¹. Ainsi les densités atteintes avec le rotifère indigène au Saint-Laurent permettraient de supporter une expérience de première alimentation larvaire à la condition de pouvoir maintenir ces niveaux de densité sur une base constante. Malheureusement, les densités obtenues fluctuent grandement dans le temps ce qui constitue une contrainte majeure pour actuellement garantir la bonne conduite d'expériences de première alimentation sur une période d'environ 20 jours.

Les taux instantanés de production journalière obtenus durant la série d'expériences réalisés sur de courtes périodes (1 semaine) sont très variables allant de valeurs négatives (diminution de la population) à des valeurs maximales par bidon d'élevage de 0,20 à 0,92. Les valeurs de μ rapportées dans la littérature lors de travaux avec *Synchaeta sp* vont de < 0 à 1,12 (Bosque *et al.* 2001; Oltra *et al.* 2000; Oltra & Todoli 1997; Egloff 1986) alors que celles pour *Brachionus plicatilis* vont de 0,10 à 1,57 (Kostopoulou & Vadstein 2007; Lubzens & Zmora 2003; Miracle & Serra 1989). Il est également intéressant de comparer nos valeurs avec celles obtenues par Suchar & Chigbu (2006) qui ont travaillé avec le

rotifère *Colurella dicentra*. Il s'agit en effet d'une espèce de petite taille (49 – 93 μm) semblable à celle du rotifère du Saint-Laurent et ces auteurs ont utilisé un mélange de microalgues *Nannochloropsis oculata* et d'une diatomée (*Chaetoceros gracialis*), soit un régime algal très comparable au nôtre. Ces auteurs ont calculé des valeurs de μ variant de < 0 à 0,40. Ainsi l'élevage du rotifère du Saint-Laurent présente, sous certaines conditions expérimentales, des taux instantanés de production semblables à ceux des autres espèces étudiées notamment *Brachionus plicatilis* d'usage courant en éclosion. Le maintien à moyen terme de taux de production parmi les meilleurs mesurés pourrait permettre de supporter une expérience de première alimentation larvaire. Pour mieux cibler la combinaison de paramètres de production pouvant permettre de maintenir une densité élevée et un taux de production instantanée satisfaisant, il faut examiner plus en détails les résultats de la série d'expériences sur courte durée.

Le taux de renouvellement du milieu d'élevage est un facteur particulièrement important. C'est en effet les rotifères contenus dans le volume prélevé quotidiennement qui constituent « la production » et qui sont utilisés comme proies vivantes pour nourrir les élevages larvaires. Il importe que ce prélèvement de rotifères ne dépasse pas la production nette (somme des naissances moins les mortalités par unité de temps) de la population afin de ne pas la faire régresser. Par ailleurs le prélèvement d'un nombre optimum d'individus dans toute population permet d'y maintenir un niveau maximal de production. C'est sur ce principe qu'est basée la gestion des stocks des ressources halieutiques (Cushing 1981; Ricker 1975; Gulland 1977). Pourtant nous n'avons pas trouvé de littérature scientifique

portant sur l'effet des quantités prélevées, ou du pourcentage du volume renouvelé, sur la dynamique des rotifères d'élevage. Rappelons que le cycle de reproduction des rotifères de l'ordre des monogonontes, dont fait partie le genre *Pleurotrocha sp.*, est de type parthénogénétique. Les femelles amictiques produisent des œufs femelle 2N. Des phases de reproduction sexuée peuvent à l'occasion ponctuer le cycle améiotique sous l'effet de stimuli exogènes ou endogènes. Les femelles produisent alors soit des mâles de très petite taille ou des œufs fécondés diapauses qui éclosent avec un certain délai. Cette stratégie reproductive permet la survie de l'espèce lors de conditions environnementales défavorables (Pourriot 1986).

Lors de nos travaux, seul un prélèvement quotidien de 5,5% (1 L jour⁻¹) du volume du milieu d'élevage a permis d'obtenir une progression importante de la densité. Des prélèvements plus importants (16,7% et 27,8%) se traduisaient par une densité stable ou légèrement augmentée. Il est instructif d'examiner les taux instantanés de production (μ) puisque ceux-ci intègrent l'ensemble des facteurs régissant la dynamique des populations de rotifères (Oltra & Todoli 1997) soit la natalité, la mortalité naturelle et la mortalité par prélèvements. Avec un renouvellement de 1 L jour⁻¹, les μ moyens sont constamment positifs ce qui se traduit par une augmentation continue de la population et donc une augmentation de la densité. À l'inverse les μ moyens calculés avec un renouvellement de 27,8% (5 L jour⁻¹) sont toujours négatifs indiquant une réduction constante de la population. Un tel prélèvement dépasse donc la production nette de la population. Le prélèvement quotidien de 16,7% (3 L jour⁻¹) du volume du milieu d'élevage se traduit par une situation

intermédiaire; à J3, le μ est négatif mais proche de 0; à J7, il devient positif et toujours proche de 0; à J9, le taux instantané de production est nettement positif et non différent de celui obtenu avec un prélèvement de 1 L jour⁻¹. Ces résultats laissent croire que compte tenu du niveau de la population au début de l'expérience, le prélèvement de 16,7% récoltait l'équivalent de la production nette dans le bidon. Ainsi, il serait souhaitable de laisser augmenter la population de rotifères jusqu'à l'atteinte d'une certaine densité au début des élevages, en n'effectuant qu'un renouvellement minimal, jusqu'à ce que le taux instantané de production soit suffisant pour supporter des prélèvements plus importants.

L'effet de la concentration de cellules phytoplanctoniques ajoutées quotidiennement dans le milieu, ainsi que celui des espèces de microalgues utilisées, sont mieux documentés notamment pour *Brachionus plicatilis*. Les gammes de concentrations de microalgues utilisées dans les travaux consultés varient de $2,5 \cdot 10^3$ à $2,0 \cdot 10^7$ cellules ml⁻¹ (Oltra *et al.* 2000; Bosque *et al.* 2001; Hotos 2003; Suchar & Chigbu 2006; Kostopoulou & Vadstein 2007). Des travaux réalisés avec deux souches de *Brachionus plicatilis* ont démontré qu'une augmentation de la concentration de microalgues dans le milieu se traduit d'abord par une augmentation du taux de filtration des rotifères et du taux d'ingestion jusqu'à l'atteinte d'une valeur maximale. Au delà de la concentration correspondant au pic d'activité, tant la filtration que l'ingestion diminuent avec l'accroissement de la concentration de microalgues (Hotos 2003). D'autres auteurs ont observé des variations du taux instantané de production en fonction des concentrations de microalgues. Kostopoulou & Vadstein (2007), qui ont utilisé trois souches de *Brachionus plicatilis*, ont montré en

effet que les μ augmentent d'abord rapidement avec l'augmentation des concentrations de microalgues pour ensuite atteindre un plateau à des valeurs de 1,12 à 1,57. Ainsi au delà d'une certaine concentration de microalgues, l'augmentation de cette dernière ne se traduit plus par l'accroissement du taux instantané de production dans la population de rotifères. Suchar & Chigbu (2006) ont remarqué, au contraire, que les μ de *Colurella dicentra* chutaient lorsque de fortes concentrations de microalgues étaient utilisées. Ils attribuent ce phénomène à une probable accumulation de trop grandes quantités de métabolites lorsque les algues sont ajoutées en forte concentration. Oltra *et al.* (2000) rapportent également que *Synchaeta cecilia valentina* serait sensible aux trop fortes concentrations de microalgues dans les milieux d'élevage. Hotos (2003) avait déjà proposé qu'il pourrait y avoir des concentrations optimales de microalgues, concentrations variables en fonction de l'état physiologique de *Brachionus plicatilis*.

Les concentrations utilisées dans nos travaux entrent donc dans la gamme des valeurs utilisées par d'autres auteurs ayant travaillé sur différentes espèces de rotifères. Cependant pour notre part, nous n'avons observé aucun effet de la concentration de microalgues ajoutées sur les densités de rotifères et leur évolution, ni sur les taux instantanés de production. On peut donc supposer que la plus faible concentration utilisée n'était pas limitante dans les conditions expérimentales utilisées. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bosque *et al.* (2001) qui ont utilisé sensiblement les mêmes concentrations de microalgues pour nourrir des élevages de *Synchaeta littoralis*. On ne peut cependant avancer l'hypothèse que l'absence d'effet des concentrations de microalgues ajoutées serait

imputable au fait que celles-ci se situaient toutes dans la partie asymptotique de la courbe d'augmentation de μ rapportée par Kostopoulou & Vadstein (2007). En effet certaines valeurs de μ observées avec l'ajout d'une concentration de $1,7 \cdot 10^9$ cellules de *Nannochloropsis sp.*, soit $9,3 \cdot 10^4$ cellules ml^{-1} de milieu d'élevage, (concentration IX) lors d'autres expériences de courte durée (rapportées au tableau 13) sont supérieures à celles calculées lors des essais effectués avec différentes concentrations de microalgues.

La composition spécifique de la diète algale présente de l'importance dans la production de certaines espèces de rotifères. Suchar & Chigbu (2006) font valoir que le comportement alimentaire ainsi que la structure et la taille de la corona, du mastax et de la bouche des rotifères imposent les limites en ce qui a trait aux aliments que les rotifères peuvent ingérer. Ces auteurs ont remarqué, après avoir mis à l'essai six espèces de microalgues, que les meilleurs taux instantanés de production de *Colurella dicentra* étaient obtenus avec *Nannochloropsis oculata* et avec *Chaetoceros gracilis*, les deux seules parmi les six espèces utilisées qui n'étaient pas motiles. À l'inverse, Hotos (2002) avance que la motilité des microalgues est de nature à augmenter la probabilité de rencontre entre un rotifère et sa proie favorisant ainsi leur alimentation et la production. Les résultats de nos travaux menés avec *Nannochloropsis sp.*, la diatomée *Thalassiosira pseudomonas*, deux espèces non motiles, et un mélange des deux n'ont cependant pas permis de détecter un effet significatif de la composition de la diète algale. Ces résultats, jumelés avec ceux sur la concentration de la diète algale, portent à considérer que d'autres facteurs sont possiblement limitant dans notre système. Une vérification minutieuse de la quantité et de la dynamique des

microalgues dans les milieux d'élevage tout au long de l'expérimentation aurait sans doute permis de vérifier cette hypothèse.

Il n'existe pas à notre connaissance d'autres travaux qui se sont intéressés à l'effet des enrichissements commerciaux donnés à titre d'aliments sur le taux de production des rotifères. Seules les modifications au profil biochimique des rotifères ont fait l'objet de recherches ciblées (*cf* chapitre 1). Les différentes quantités d'enrichissement (Culture Selco) ajoutées aux élevages ne se sont pas traduites pas des différences significatives, ni des densités, ni des valeurs de μ . On note cependant que les densités de rotifères ont chuté dès le début de l'expérience au point où celle-ci a du être interrompue à J6. Pourtant le traitement consistant à donner 0,1 g de Culture Selco a été appliqué dans le cadre d'autres expériences de cette série sans entraîner l'effondrement des élevages. D'autres facteurs indépendants des conditions expérimentales, telle une contamination des bidons d'élevage, pourraient expliquer cet échec. On dénote néanmoins que la chute de la valeur moyenne de la densité des rotifères pour le traitement utilisant 0,1 g d'enrichissement est moins prononcée, bien que non significativement différente, qu'avec les rations plus importantes. Il en va de même de la valeur moyenne de μ qui tout en étant négative est moins faible que pour les rations plus importantes. Par ailleurs, les trois types d'enrichissements commerciaux utilisés ont eu des effets différents sur la production de rotifères. L'ajout de Culture Selco ou de Rotimac a permis aux populations de rotifères d'augmenter tout au long de l'expérience et de façon similaire. Par contre les élevages ayant reçu les ajouts d'enrichissement Algamac 2000 ont vu leur densité diminuer de façon marquée jusqu'à un

niveau significativement inférieur à J8 à ceux observés avec les deux autres enrichissements. Il en va de même des différences observées à J8 pour les taux instantanés de production. Ces trois types d'enrichissements commerciaux se distinguent par leur ratio DHA:EPA et leur teneur en lipides (informations des fabricants). L'Algamac 2000 présente un ratio de ces acides gras dont la valeur est intermédiaire et ce ratio ne peut donc expliquer la mauvaise performance obtenue avec cet enrichissement. Par contre, la teneur en lipides de l'Algamac 2000 est 2,1 fois supérieure à celle du Culture Selco et 2,6 fois supérieure à celle du Rotimac. Une détérioration de la qualité du milieu d'élevage consécutive à une augmentation de la charge en matière grasse pourrait être en cause. Notons cependant qu'aucune présence accrue de ciliés n'a été observée. Il est également à souligner que les élevages des *Brachionus plicatilis* enrichis avec l'Algamac 2000 destinés aux travaux décrits au chapitre I de cette thèse avaient eux aussi fourni des densités de rotifères plus faibles qu'avec les autres enrichissements utilisés. En se basant sur les résultats des deux expériences qui ont fait intervenir la quantité et le type d'enrichissement ajouté, on peut se demander si ces enrichissements entrent directement dans l'alimentation du rotifère. Une analyse du profil biochimique des rotifères en lipides et en acides gras, notamment leur ratio DHA:EPA, permettrait de vérifier si l'enrichissement est effectivement ingéré et assimilé. Le cas échéant le profil nutritif des rotifères varierait en fonction des caractéristiques des enrichissements tel que nous l'avons démontré au chapitre I de cette thèse.

Le pourcentage de renouvellement du volume d'élevage et le type d'enrichissement ajouté aux élevages ont donc été les deux facteurs, parmi ceux mis à l'essai, qui agissent significativement sur la production du rotifère indigène au Saint-Laurent. Avec les volumes de milieu d'élevage (18 L) et les densités de départ utilisés, une combinaison qui consisterait à effectuer un prélèvement minimal de 1 L jour⁻¹ (5,5%) au début pour ensuite passer à 3 L jour⁻¹ (16,7%) ainsi que l'ajout de 0,1 g jour⁻¹ d'un enrichissement de type Culture Selco ou Rotimac donnerait les meilleurs résultats. On ne peut cependant affirmer hors de tout doute que la diète algale peut être complètement omise puisque cette alternative n'a pas été mise à l'essai.

Cependant il faut noter que la combinaison consistant à renouveler 3 L jour⁻¹ du milieu et à ajouter quotidiennement 0,1 g de Culture Selco (et $1,7 \times 10^9$ cellules de *Nannochloropsis sp*) a été utilisée dans chacune des six expériences de courte durée mais avec des résultats variables. On ne peut vraiment comparer les densités mesurées puisque les densités de départ étaient variables d'une expérience à l'autre, mais l'examen des valeurs moyennes des taux instantanés de production est éloquent. À J6, les valeurs de μ oscillent entre -0,039 et 0,231 alors qu'à J8 elles oscillent entre -0,915 et 0,305. Ainsi d'autres facteurs dans les conditions d'élevage entrent vraisemblablement en jeu.

Il faut souligner que les résultats obtenus lors des expériences faisant intervenir la composition de la diète en microalgues et le type d'enrichissement posent l'hypothèse que ces ajouts n'entrent peut-être pas directement dans le régime alimentaire des rotifères ayant

fait l'objet de nos travaux. Rappelons que Suchar & Chigbu (2006) font valoir que des facteurs tel le comportement alimentaire du rotifère ou des contraintes anatomiques telle la structure et la taille de la corona, du mastax et de la bouche des rotifères peuvent imposer des limitations en ce qui a trait aux caractéristiques des aliments pouvant être ingérés. Le rotifère du Saint-Laurent utilisé lors de ces travaux présente une taille parmi les plus petites rapportées pour ce taxon. Pourtant la densité des rotifères a augmenté dans la majorité des élevages et un essai à long terme a permis de conserver des élevages sur six semaines à partir de repiquages successifs de la même souche. Plusieurs auteurs rapportent qu'il existe une forte corrélation entre le taux de reproduction des rotifères et l'abondance de nourriture dans le milieu (Hotos 2002; Snell *et al.* 1983). Ainsi les rotifères utilisés trouvent peut-être une autre source alimentaire présente dans l'eau de mer utilisée. La piste de la boucle microbienne (Mann 1982) pourrait être considérée.

Soulignons que les élevages du rotifère de l'estuaire du Saint-laurent ont été réalisés en chambre froide à la même température que celle requise pour l'élevage des larves de plie rouge soit 10°C. Or cette espèce apparaît dans les échantillons d'eau prélevés dans le milieu à une époque de l'année où la température de l'eau de mer décroît rapidement de 9 à 1°C. Ainsi une température de 10°C ne constitue peut-être pas l'optimum thermique pour cette espèce. Notons également que l'apparition de ce rotifère dans les échantillons d'eau se fait à l'automne, plus précisément en octobre et novembre. Cette période de l'année ne correspond pas à la période d'apparition des larves de plie rouge dans le milieu. Le pic de reproduction de l'espèce dans l'estuaire du Saint-Laurent étant de la fin mai au début juin

(Vaillancourt 1982), les larves sont donc présentes dans le milieu aux mois de juin et juillet. Ainsi le rotifère isolé et ayant fait l'objet des élevages n'entre vraisemblablement pas dans le régime alimentaire des larves sauvages. Par contre, il peut définitivement être considéré comme une proie d'eau froide et des analyses biochimiques comparatives avec *Brachionus plicatilis* dont l'optimum thermique est élevé serait l'étape ultérieure à envisager.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux décrits dans les trois chapitres de cette thèse sont complémentaires et tous convergent vers l'optimisation de l'élevage du stade larvaire de la plie rouge. Nous avons d'abord précisé le profil biochimique de la proie vivante, notamment son ratio DHA:EPA, convenant pour améliorer la survie à la métamorphose lorsque l'on utilise l'approche la plus répandue dans le monde soit celle consistant à enrichir le rotifère *Brachionus plicatilis* avec des produits commerciaux vendus à cette fin. Ensuite nous avons démontré qu'il est possible d'élever les larves de plie rouge à des densités élevées sans affecter son développement ou la survie à la métamorphose. Cette démonstration ouvre des perspectives intéressantes pour optimiser les équipements d'élevage larvaire en éclosérie. Finalement l'isolement et la production d'une proie zooplanctonique indigène à l'estuaire du Saint-Laurent permettent dorénavant d'explorer les possibilités d'amélioration de l'état nutritionnel des larves et de la qualité des juvéniles récemment métamorphosés que pourrait offrir l'utilisation d'un aliment vivant issu de l'habitat naturel de la plie rouge.

En effet, sur le plan des besoins alimentaires, nos travaux décrits dans le premier chapitre démontrent qu'il nous a été possible de modifier avec succès le profil nutritionnel du rotifère *Brachionus plicatilis*. Cependant on constate que celui-ci ne reflète pas exactement celui des enrichissements utilisés. Les rotifères sont en effet des organismes complexes ayant leur propre métabolisme agissant sur leur composition biochimique (Estevez *et al.* 1999). Néanmoins il nous a été possible d'influencer de façon importante leur teneur en

acides gras, principalement celle en DHA, acide gras pour lequel le rotifère est naturellement pauvre (Rodriguez *et al.* 1997; Sargent *et al.* 1999; Copeman *et al.* 2002) et par conséquent leur ratio DHA:EPA. Ce ratio constitue une caractéristique du régime alimentaire particulièrement importante pour le développement des larves et joue aussi un rôle dans la pigmentation ultérieure des juvéniles récemment métamorphosés.

De la même façon, le profil biochimique des larves de plie rouge a pu être modifié avec succès lors de la première alimentation grâce au profil nutritionnel induit chez les rotifères. Tout comme ce fût le cas pour les rotifères, le profil des larves de plie rouge ne reflète pas exactement celui des proies ingérées. Un régime alimentaire riche en DHA avec un ratio DHA:EPA de 3,24 entraîne un meilleur succès de production de juvéniles. De plus, on constate que ce régime alimentaire se traduit également par une incidence élevée de pigmentation, l'absence de celle-ci (individus albinos) étant un problème courant en élevage de poissons plats (Bell *et al.* 2003; Estevez *et al.* 1999; McEvoy *et al.* 1998a, b). Ces retombées positives d'un régime alimentaire riche en DHA ont aussi été observées chez d'autres espèces de poissons plats (Reitan *et al.* 1994; Rainuzzo *et al.* 1997; MacEvoy *et al.* 1998a, b; Copeman *et al.* 2002).

Par ailleurs, on constate que les apports plus élevés en DHA (et ratio DHA:EPA) induits durant la première alimentation n'ont pas été maintenus jusqu'à la fin de cette phase. Ainsi la phase ultérieure d'alimentation larvaire (régime alimentaire mixte de nauplii d'artémie non enrichis et d'aliments inertes) entraîne vraisemblablement leur réduction de façon plus

marquée. Les besoins en DHA sont élevés chez la larve durant les premiers jours du développement des poissons marins (Bazan 1990) et cet acide gras est métabolisé plus rapidement que l'EPA. Ainsi il pourrait être utile de maintenir un régime alimentaire riche en DHA durant la période d'alimentation mixte et d'en vérifier les effets sur la survie et la pigmentation des juvéniles nouvellement métamorphosés.

Si le profil nutritionnel des proies en acides gras se répercute sur la survie et la pigmentation des juvéniles, il n'en va pas de même en ce qui concerne la croissance des larves. Aucun des régimes alimentaires constitués de rotifères offrant différents ratio DHA:EPA n'a permis de modifier la croissance linéaire des larves. Ces résultats morphométriques sont corroborés par différents indicateurs biochimiques de condition des larves. Par contre, on constate que les différences de taille au début de la période de première alimentation se maintiennent tout au long de la phase larvaire. Ainsi l'état des larves à l'éclosion semble avoir une influence plus importante sur la taille que le régime alimentaire. Il serait intéressant de vérifier la relation pouvant exister entre la qualité des œufs et la taille des larves à l'éclosion. Butts & Litvak (2007) ont d'ailleurs démontré l'existence d'un effet du stock parental sur la croissance et la morphométrie des larves de plie rouge. Ils soulèvent eux aussi l'hypothèse qu'outre les différences imputables au bagage génétique, des différences de qualité de vitellin et de réserves lipidiques entre des œufs issus de femelles différentes puissent se répercuter sur le développement ultérieur de la larve.

Si le ratio DHA:EPA n'a pas eu d'effet sur la croissance, nous avons cependant observé que les larves de plie rouge nourries avec les rotifères présentant un ratio DHA:EPA élevé étaient visuellement mieux développées juste avant d'amorcer leur métamorphose. Des travaux portant sur la résistance au stress chez les larves de plie japonaise (Furuita *et al.* 1999) ont aussi démontré une plus grande vitalité des larves ayant reçu une plus grande quantité de DHA bien qu'aucune différence dans la taille n'ait été induite.

Différents facteurs peuvent influencer la croissance et la condition larvaire. Le régime alimentaire en est un, la densité d'élevage en est un autre. Nous nous sommes donc intéressé au second chapitre aux effets de la densité d'élevage sur la croissance larvaire et la survie à la métamorphose.

Le passage à une alimentation exogène suite à la résorption complète du sac vitellin peut s'accompagner d'une mortalité très importante chez les larves de poissons marins (Yúfera & Darias 2007). Cette importante réduction des effectifs, si elle était variable en fonction de la densité initiale et plus importante aux densités élevées, pourrait mener à une stratégie d'élevage larvaire consistant à devoir augmenter le nombre de bassins d'élevage larvaire lorsque le succès d'éclosion des œufs est grand et ce afin de conserver une mortalité la plus faible possible. Pareille situation serait de nature à compliquer les opérations en éclosérie. Le suivi des effectifs dans les bassins d'élevage de plie rouge n'indique aucune différence significative du taux de survie des larves élevées à différentes densités initiales. Les gradients de densité se sont maintenus au cours de l'expérience bien que les densités elles-

mêmes aient constamment diminué. Cette absence d'effet de la densité sur le taux de survie est également rapportée pour d'autres espèces de poissons marins (King *et al.* 2000; Baskerville-Bridges & Kling 2000). Le taux moyen de survie larvaire pour la plie rouge observé durant la seconde partie de nos travaux est de l'ordre de 30% à l'issue de la première alimentation et de 10% juste avant la métamorphose.

Il faut signaler cependant que l'on a observé une grande variabilité des pourcentages de survie entre les réplicats pour certaines densités, notamment les plus élevées. D'autres auteurs avant nous avaient fait le même constat avec différentes espèces de poissons marins (Alves *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Baskerville-Bridges & Kling 2000). Une hypothèse pour expliquer cette situation pourrait être une baisse de qualité d'eau dans la couche profonde des bassins d'élevage. En effet nous avons constaté que la position des pierres d'aération, entraînant l'homogénéisation de la colonne d'eau, créait une couche d'eau profonde moins susceptible d'être renouvelée par des apports en oxygène. On veillera donc, en éclosion, à s'assurer que l'ensemble de la colonne d'eau soit constamment bien homogénéisée.

Les différentes densités d'élevage larvaire n'ont pas induit de différences de croissance durant la période de première alimentation des larves. Cela est corroboré par le ratio TAG/Stérol, le ratio protéines/ARN, et le ratio ARN:ADN, tous des indicateurs biochimiques de l'état physiologique des larves. Ces résultats indiquent vraisemblablement que les larves ne subissent pas de stress pouvant être causé par l'entassement. En effet,

King *et al.* (2000) et Beitinger (1990) font valoir qu'un tel stress peut affecter l'efficacité de l'alimentation chez les larves de poissons marins et se traduire par une baisse du taux de croissance. Lorsque la larve éprouve de la difficulté à satisfaire ses besoins énergétiques à partir de sources exogènes, elle catabolise ses réserves de triacylglycérol, des lipides de réserve. Or le ratio TAG/Stéroïdes est similaire chez les larves produites aux différentes densités d'élevage. Le ratio proies:prédateur de 15-20:1 et la densité minimale de 120 proies L⁻¹ que nous avons maintenus tout au long de la première alimentation semblent donc rencontrer les besoins alimentaires des larves de plie rouge.

Un autre problème pouvant affecter les élevages larvaires d'espèces prédatrices est le cannibalisme qui se développe au moment du passage à une alimentation exogène (Kestemont *et al.* 2003). Une telle situation peut s'avérer difficile à gérer en écloserie commerciale et est de nature à fragiliser l'opération. Chez certaines espèces, la solution consiste à augmenter la densité d'élevage larvaire afin de réduire les dominances sociales et les antagonismes individuels (Flemming & Johansen 1984; Macintosh & De Silva 1984; Wallace *et al.* 1988; Brown *et al.* 1992; Kestemont *et al.* 2003; Baras *et al.* 2003). L'inconvénient de cette solution est qu'elle peut être la source d'une détérioration de la qualité de l'eau en raison d'un accroissement de la charge organique. Lorsque le cannibalisme est présent dans les bassins, on observe une hétérogénéité des tailles qui s'accroît avec le temps (Baras *et al.* 2003). La faible variabilité des tailles de larves tout au long de cette seconde phase de nos travaux laisse croire à une absence de cannibalisme et ce à toutes les densités d'élevage. D'ailleurs aucun cadavre de larves n'a été observé à la

surface des bassins lors des inspections quotidiennes et aucun comportement de cannibalisme n'a été observé.

Puisque l'augmentation de la densité ne modifie pas à la baisse le taux de survie des larves avant ou au moment de la métamorphose, non plus que l'état physiologique des larves et leur croissance, une éclosionnerie aurait donc avantage à optimiser l'utilisation des bassins en utilisant des densités larvaires élevées. Nous avons constaté que la somme de travail requise pour entretenir un bassin ne varie que très peu en fonction de la densité larvaire s'y trouvant. Alors un bassin à forte densité produira plus de juvéniles par unité de volume qu'un bassin à faible densité pour une somme de travail, et donc des coûts, équivalents.

Nos travaux et ceux de nos prédécesseurs (eg Ben Khemis *et al.* 2000, 2003; Mercier 2004) ont démontré que les larves de plie rouge peuvent être nourries durant la phase de première alimentation en utilisant le rotifère *Brachionus plicatilis* d'usage courant dans les éclosionneries de poissons marins partout dans le monde. On peut cependant supposer que cette espèce d'eau chaude ne rencontre pas de façon naturelle les besoins nutritionnels de la plie rouge. Une proie indigène à l'habitat de la plie rouge pourrait éventuellement permettre à une éclosionnerie de s'affranchir de l'étape de l'enrichissement artificiel. Nos travaux présentés au troisième chapitre ont donc exploré la possibilité de réaliser une production de masse d'un rotifère d'eau froide indigène au Saint-Laurent. Il a été possible de maintenir à long terme un élevage qui a donné par moments des densités de plus de 100 000 rotifères L⁻¹.

La production de proies vivantes demeure un travail délicat qui requiert temps et main d'œuvre. Ainsi l'un des paramètres d'élevage importants est le pourcentage du volume d'élevage de rotifères qu'il est possible de prélever quotidiennement afin de nourrir les élevages larvaires. Plus ce pourcentage sera élevé et moins il sera nécessaire pour l'écloserie de maintenir de grands volumes d'élevage de rotifères réduisant d'autant ses coûts d'opération. Selon les travaux que nous avons réalisés avec le rotifère indigène à l'estuaire du Saint-Laurent, un prélèvement quotidien représentant un peu plus de 25% du volume serait trop important. Il se traduit par une réduction constante de la densité des rotifères. C'est donc dire que ce prélèvement dépasse la production quotidienne, du moins celle des densités d'élevage avec lesquelles nous avons travaillé. Au contraire, un prélèvement correspondant à un peu plus de 5% du volume d'élevage se traduit par une progression constante de la densité des rotifères. Cependant, compte tenu des densités de rotifères maximales obtenues, un prélèvement aussi faible imposerait le maintien d'importants volumes d'élevage pour être en mesure d'alimenter correctement des élevages larvaires. Le prélèvement d'un volume intermédiaire représentant un peu plus de 15% du volume offrirait toutefois des possibilités intéressantes. En effet on a remarqué qu'un tel prélèvement quotidien se traduit par des taux instantanés de production faibles mais qui augmentent sensiblement après une semaine. Ainsi un prélèvement quotidien minimal de 5% au début de l'élevage permettrait à la population de rotifères de progresser rapidement et après une période, ou une certaine densité, qu'il reste à déterminer, il serait possible de prélever 15% du volume. Ce pourcentage, bien que relativement limité, permettrait selon

notre expérience de fournir le nombre de rotifères requis par la phase de première alimentation avec des densités de plus de 100 000 rotifères L⁻¹.

La modification de l'espèce de microalgues et des concentrations utilisées pour nourrir les rotifères n'a eu aucun impact sur la densité dans les bidons d'élevage ni sur les taux instantanés quotidiens de production. Il serait cependant prématuré de conclure que ce rotifère indigène ne requiert pas une espèce algale particulière. Suchar & Chigbu (2006) soulignent que l'ajout de microalgues est essentiel mais que les limites en ce qui a trait aux aliments que les rotifères peuvent ingérer sont imposées par le comportement alimentaire ainsi que par la structure et la taille de la corona, du mastax et de la bouche des rotifères. D'autres travaux sont sans doute requis pour préciser les limites et les particularités de l'espèce que nous avons isolée. Les mêmes considérations s'appliquent pour l'ajout d'aliments commerciaux pour rotifères destinés à les enrichir. Les différences observées lors de nos travaux avec différents types d'enrichissement pourraient être le fait d'une détérioration de la qualité du milieu autant que de la valeur intrinsèque de l'enrichissement en tant qu'aliment. En effet l'enrichissement dont la teneur en lipides était la plus élevée a entraîné la chute des populations de rotifères contrairement aux deux autres types mis à l'essai.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de préciser les conditions d'élevage des larves de plie rouge en ce qui a trait à la première alimentation et

aux densités d'élevage. De plus ils ouvrent d'intéressantes perspectives pour la production d'une proie zooplanctonique d'eau froide.

Par ailleurs ce projet de doctorat m'aura appris que la réalisation de travaux de recherche portant sur du matériel vivant dans sa phase de développement la plus critique est une aventure risquée mais ô combien formatrice. Chercher à se substituer à la nature en tentant de recréer en milieu contrôlé les conditions permettant à la vie de se développer normalement constitue un défi de taille pour l'ingéniosité humaine mais également un défi des plus enthousiasmants.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alver, M.O., Alfredsen, J.A. & Oie, G. (2007). Estimating larval density in cod (*Gadus morhua*) first feeding tanks using measurements of feed density and larval growth rates. *Aquaculture* 268, 216-226.
- Alves, D., Specker, J.L. & Bengtson, D.A. (1999). Investigations into the causes of early larval mortality in cultured summer flounder *Paralichthys dentatus* L. *Aquaculture* 16, 155-172.
- Anonyme (1999). No small fry. Pages 3-17. *Biotechnology*, Fall 1999.
- Assavaaree, M., Hagiwara, A., Ide, K., Maruyama, K. & Lubzens, E. (2001). Low-temperature preservation (at 4°C) of marine rotifer *Brachionus*. *Aquaculture Research* 32, 29-39.
- Baras, E. & Jobling, M. (2002). Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fishes. *Aquaculture Research* 33, 461-479.
- Baras, E., Kestemont, P. & Mélard, C. (2003). Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. *Aquaculture* 219, 241-255.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J. (2000). Larval culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at high stocking densities. *Aquaculture* 181, 61-89.
- Bazan N. G. (1990). Nutrition and the brain Pages 1-24. *In* Wurtman R.J. & Wurtman J.J., éditeurs. Raven Press, New-York.
- Beckman, B. & Mustafa, T. (1992). Arachidonic acid metabolism in gill homogenate and isolated gill cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of osmolarity, electrolytes and prolactin. *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 213-222.
- Beitinger, T.L. (1990). Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. *Journal of Great Lakes Research* 16, 495-528.
- Bell, M. V., Henderson R. J., Pirie B. J. S. & Sargent J. R. (1985). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fishery Biology* 26, 181-191.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. & Sargent, J.R. (2003). Optimising lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211-220.

- Ben Khemis, I., de la Noüe, J. & Audet, C. (2000). Feeding larvae of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) with live prey or microencapsulated diet: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquaculture Research* 31, 377-386.
- Ben Khemis, I., Audet, C., Fournier, R. & de la Noüe, J. (2003). Early weaning of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) larvae on a commercial microencapsulated diet. *Aquaculture Research* 34, 445-452.
- Bigelow, H. B. & Schroeder, W. C. (1953). Fishes of the gulf of Maine. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. Washington, 577 pages.
- Bisbal, G.A. & Bengtson, D.A. (1995). Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal Fish Biology* 47, 277-291.
- Blair T., Batt J., Melanson R., Kirk S. & Castell J. (1998) Evaluation of several commercial enrichment media for enhancing the nutritional value of rotifers fed to winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 4, 35-37.
- Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y. & Tanaka, M. (2006). Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 259, 432-443.
- Bosque, T., Hernandez, R., Pérez, R., Todoli, R. & Oltra, R. (2001). Effects of salinity, temperature and food level on the demographic characteristics of the seawater rotifer *Synchaeta littoralis* Rousselet. *Journal of Experimental. Marine Biology and Ecology* 258, 55-64.
- Brownell, C. L. (1988). A new pelagic marine rotifer from the southern Benguela, *Synchaeta hutchingsi*, n. sp. with notes on its temperature and salinity tolerance and methods of culture. *Hydrobiologia* 162, 225-233.
- Buckley, L.J. (1979). Relationship between RNA-DNA ratio, prey density and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 36, 1497-1502.
- Buckley, L.J. (1980). Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and the effect of starvation. *Fishery Bulletin U.S.* 77, 703-708.
- Buckley, L.J. (1984). RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology* 80, 291-298.

- Budge, S.M., Parrish, C.C. (2003). Fatty acid determination in cold water marine samples. *Lipids* 38 781-791.
- Bulow, F. J. (1987). RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish. Pages 45-64. *Dans* Summerfelt R. C. & Hall G. H. éditeurs. Age and growth of fish, University Press, Iowa.
- Busch, A. (1996). Transition from endogenous to exogenous nutrition: larval size parameters determining the start of external feeding and size of prey ingested by Rügen spring herring *Clupea harengus*. *Marine Ecology Progress Serie* 130, 39-46.
- Butts, I.A.E., Litvak, M.K. (2007). Parental and stock effects on larval growth and survival to metamorphosis in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Aquaculture* 269, 339-348.
- Cahu, C. & Zambonino Infante, J. (1997). Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International* 5, 151-161.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., Le Gall, M.M. & Quazuguel, P. (1995). Early weaning of sea bass: are digestive enzymes limiting? Pages 268-271. *Dans* Lavens, P., Jaspers, E. & Roelandts, E. éditeurs. Larvi'95: Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Genet, Belgium. Special Publication of the European Aquaculture Society (No 24), Belgium.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J. & Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
- Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R. & Sargent, J. R. (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128, 315-353.
- Christensen, M. N. & Korsgaard, B. (1999). Protein metabolism, growth and pigmentation patterns during metamorphosis of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 237, 225-241.
- Copeman, L.A. & Parrish, C.C. (2002). Lipid composition of malpigmented and normally pigmented newly settled yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Aquaculture Research* 33, 1209-1219.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. & Harel, M. (2002). Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285-304.

- Cousin, J.C.B., Beaudin –Laurencin, F. & Gabaudan, J. (1987). Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology* 30, 15-33.
- Coves, D., Audineau, P. & Nicolas, J.L. (1986). Les rotifères. Technologie d'élevage. Pages 223-238. *Dans* Barnabé, G. éditeur. *Aquaculture*, vol. 1. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
- Cunha I. & Planas M. (1999). Optimal prey size for early turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) based on mouth and ingested prey size. *Aquaculture* 175, 103-110.
- Cushing, D.H. (1981). *Fisheries biology, a study in population dynamics*. Seconde édition. The University of Wisconsin Press. 295 pages.
- Dabrowski, K. & Glogowski, J. (1977a). A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. *Aquaculture* 12, 349-360.
- Dabrowski, K. & Glogowski, J. (1977b). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54, 129-134.
- Daniels, H.V., Berlinsky, D.L., Hodson, R.G. & Sullivan, C.V. (1996). Effects of stocking density, salinity, and light intensity on growth and survival of southern flounder *Paralichthys lethostigma* larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 153-159.
- De Araujo, A.B., Gallardo, W.G., Snell, T.W. & Hagiwara, A. (1998). Enzyme activity as a tool for assessing the cultured condition of rotifers and fish larvae – A preliminary study. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 4, 30-34.
- De Montgolfier B., Audet, C. & Lambert, Y. (2005). Growth of early juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Aquaculture Research* 16, 1595-1601.
- Dhert P., Divanach P., Dentouri, M. & Sorgeloos, P. (1998). Rearing techniques for difficult marine fish larvae. Pages 48-55. *World Aquaculture*, March 1998.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G. & Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129-146.
- Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M. & Tsukamoto, K. (2003). Identification of factors affecting the growth and survival of the settling Japanese flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 218, 309-327.
- Douglas, S.E., Gawlicka A., Mandla S. & Gallant J.W. (1999). Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterisation and expression of the pepsinogen and proton

- pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology* 55, 897-915.
- Egloff, D.A. (1986). Effects of *Olisthodiscus luteus* on the feeding and reproduction of the marine rotifer *Synchaeta cecilia*. *Journal of Plankton Research* 8, 263-274.
- Egloff, D.A. (1988). Food and growth relations of the marine microzooplankter, *Synchaeta cecilia* (Rotifera). *Hydrobiologia* 157, 129-141.
- El-Sayed, A-F.M. (2002). Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture Research* 33, 621-626.
- Estevez, A., Ishikawa M. & Kanazwa A. (1997). Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research* 28, 279-289.
- Estevez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G. & Sargent, J.R. (1999). Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 120, 321-343.
- Estevez, A., Kaneko, T., Seikai, T. Tagawa, M. & Tanaka, M. (2001). ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture* 161, 213-223.
- FAO (2006). Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Fisheries department, 180 pages.
- Fairchild, E.A. & Howell, W.H. (2001). Optimal stocking density for juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32, 300-308.
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. & Yúfera, M. (1994). Feeding behaviour and prey selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Marine Biology* 118, 323-328.
- Fernandez-Diaz, C., Yúfera, M., Canavete, J.P., Moyano, F.J., Alarcon, F.J. & Diaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58, 1086-1097.
- Flemming, I.A. & Johansen, P.H. (1984). Density and agonistic behavior in young-of-the-year Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), *Canadian Journal of Zoology* 62, 1454-1455.

- Fletcher, G. L. (1980). Evidence for permanent population differences in the annual cycle of plasma "antifreeze" levels of winter flounder. *Canadian Journal of Zoology* 58, 507-512.
- Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Davies, P. L. & Hew, C. L. (1988). Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 352-357.
- Finn, R. N., Fyhn H. J. & Evjen M. S. (1995). Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. *Marine Biology* 124, 355-369.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Fraser, A.J. (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 1868-1873.
- Furuita, H., Konishi, K. & Takeuchi, T. (1999). Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival, and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 170, 59-69.
- Garcia, A.S., Parrish, C.C. & Brown, J.A. (2005). Effect of different live food enrichments on early growth and lipid composition of Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *European Aquaculture Society, Special publication* 36, 164-167.
- Gatlin, D.M., Poe, W.E., Wilson, R.P., Ainsworth, A.J. & Bowser, P.R. (1986). Effects of initial stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture* 56, 187-195.
- Gress, P., Lim, P. & Belaud, A. (1996). Effects of initial stocking density of larval pikes *Esox lucius* L. 1758 on survival growth and daily food consumption (Zooplankton, Chaetophoridae) in intensive culture. *Bulletin de la pisciculture française* 343, 153-174.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8, 229-239.
- Gulland, J.A. (1977). *Fish population dynamics*. John Wiley, New-York. 372 pages.

- Hagiwara, A., Suga, K., Akazawa, A., Kotani, T. & Sakakura, Y. (2007). Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. *Aquaculture* 268, 44-52.
- Han, K., Geurden, I. & Sorgeloos, P. (2001). Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture* 199, 93-105.
- Harel, M. & Place, A.R. (1998). The nutritional quality of live feeds for larval fish. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada* 4, 6-11.
- Harmin, S. A. & Crim, L. W. (1992) Gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 399-407.
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48, 422-427.
- Hatziathanasiou, A., Paspatis, M., Houbart, M., Kestemont, S., Stefanakis, S. & Kentouri, M. (2002). Survival, growth and feeding in early life stages of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) intensively cultured under different stocking densities. *Aquaculture* 205, 89-102.
- Heinbokel, J. F., Coats D. W., Henderson, K.W. & Tuler, M. A. (1988). Reproduction rates and secondary production of three species of the rotifer genus *Synchaeta* in the estuarine Potomac River. *Journal of Plankton Research* 10, 659-674.
- Hetch, T. & Pienaar, A.G. (1993). A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 246-261.
- Hjörleifsson, E. & Klein-MacPhee, G. (1992). Estimation of live standard length of winter flounder *Pleuronectes americanus* larvae from formalin-preserved, ethanol-preserved and frozen specimens. *Marine Ecology Progress Series* 82, 13-19.
- Houlihan, D. F., Mathers, E. M. & Foster, A. (1993). Biochemical correlates of growth rate in fish. Pages 45-71. *Dans*, Rankin J.C. & Jensen F.B. éditeurs. *Fish Ecology*. Chapman & Hall, London.
- Hotos, G.N. (2002). Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algae species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research* 33, 949-957.
- Hotos, G.N. (2003). Growth, filtration and ingestion of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. *Aquaculture Research* 34, 793-802.

- Howell, B. R. (1998) Development of turbot farming in Europe. Bulletin of Aquaculture Association of Canada 1, 4-10.
- Kao, Y., Youson, J. H. & Sheridan, M. A. (1997). Differences in the total lipid and lipid class composition of larvae and metamorphosing sea lampreys, *Petromyzon marinus*. Fish Physiology and Biochemistry 16, 281-290.
- Karar, M.M. (2005). Contribution à la production de spiruline: Recherche d'un milieu naturel pour la culture de la microalgues *Spirulina platensis* en vue de réduire le coût de production et d'optimiser la croissance. Thèse de doctorat présentée à l'UQAR. 156 pages.
- Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Mélard, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Cuvier, A., Kentouri, M. & Baras, E. (2003). Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. Aquaculture 227, 333-356.
- King, N.J., Howell, W.H., Huber, M. & Bengton, D.A. (2000). Effects of larval stocking density on laboratory-scale and commercial-scale production of summer flounder *Paralichthys dentatus*. Journal of the World Aquaculture Society 31, 436-445.
- Klein-MacPhee, G. (1978). Synopsis of biological data for the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). NOAA Technical report NMFS Circular 414.
- Kolkovski, S., Tandler, A. & Izquierdo, M. S. (1997). Effect of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 148, 313-332.
- Kostopoulou V. & Vadstein, O. (2007). Growth performance of the rotifers *Brachionus plicatilis*, *B. 'Nevada'* and *B. 'Cayman'* under different food concentrations. Aquaculture 273, 449-458.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M. & Suzuki, T. (1998). Quantification of exogenous proteases derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. Aquaculture 161, 491-499.
- Laroche, W. A. (1981). Development of larval smooth flounder, *Liopsetta putnami*, with a redescription of development of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Family *Pleuronectidae*). Fishery Bulletin 78, 897-909.
- Lauff, M. & Hofer, R. (1984). Proteolytic enzymes in the fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.

- Laurence, G.C. (1977). A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. *Fishery Bulletin* 75, 529-546.
- Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold & C.R. (2000). Ontogeny of pancreas enzyme in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition* 6, 183-192.
- Lee, G. W. Y. & Litvak, M. K. (1996a). Weaning of metamorphosed winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) reared in the laboratory: comparison of two commercial artificial diets on growth, survival and conversion efficiency. *Aquaculture* 144, 251-263.
- Lee, G. W. Y. & Litvak, M. K. (1996b). Weaning of wild young-of-the-year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) on a dry diet: effects on growth, survival and feed efficiency ratios. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 30-38.
- Le Milinaire, C., (1984). Étude des besoins en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifère *Brachionus plicatilis* (O.F. Muller). Thèse de 3ième cycle. Univ. Bretagne Occidentale. 167 pp.
- Litvak, M. K. (1994). Winter flounder. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 94, 4-8.
- Litvak, M. K. (1996). Development of winter flounder for aquaculture (*Pleuronectes americanus*), state of the art. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 96, 24-26.
- Litvak, M.K. (1999). The development of winter flounder (*Pleuronectes americanus*) for aquaculture in Atlantic Canada: current status and future prospects. *Aquaculture* 176, 55-64.
- Lubzens, E. (1987). Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147, 245-255.
- Lubzens, E., Tandler, A. & Minkoff, G. (1989). Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia* 186/187, 387-400.
- Lubzens, E., Zmora, O. & Barr, Y. (2001). Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia* 446/447, 337-353.
- Lubzens, E. & Zmora, O. (2003). Production and nutritional value of rotifers. Pages 17-64. *Dans* Stottrup, J.C. & McEvoy, L.A. éditeurs. *Life feeds in marine aquaculture*. Blackwell Science, Limited, Madlen, MA.

- Mann, K.H. (1982) Ecology of coastal water, a systems approach. University of California Press, 322 pages.
- MAPAQ (2007). L'état de la mariculture au Québec. Édition 2007 du Ministère de l'Agriculture des Pêches et de Alimentation du Québec, 36 pages.
- Macintosh, D.J. & De Silva, S.S. (1984). The influence of stocking density and food ration on fry survival and growth in *Oreochromis mossambicus* and *O. niloticus* female X *O. aureus* male hybrids reared in a closed circulated system. *Aquaculture* 41, 345-358.
- McEvoy, L. A., Naess, T., Bell J. G. & Lie, O. (1998a). Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163, 237-250.
- McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B. & Sargent, J.R. (1998b). Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 98, 17-20.
- Mercier, L. (2001). Tentative d'optimisation des conditions alimentaires des larves de *Pleuronectes americanus*, par acclimatation du rotifère *Brachionus plicatilis*, à la température des élevages des larves. Mémoire de Maîtrise présenté à l'Université du Québec à Rimousi, 65 pages.
- Mercier, L., Audet, C., de la Noüe, J., Parent, B., Parrishm C. & Ross, N.W. (2004). First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. *Aquaculture* 229, 361-376.
- Milke, L.M., Bricelj, V.M. & Parrish, C.C. (2006). Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. *Aquaculture* 260, 272-289.
- Minkoff, G. (2000). Reaping the rewards of rotifers. *Hatchery magazine*, February, 21-22.
- Miracle, M.R. & Serra, M. (1989) Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* 186/187, 81-102.
- Moore, M.J., Shea, D., Hillman, R.E. & Stegeman, J.J. (1996). Trends in hepatic tumours and hydropic vacuolation, fin erosion, organic chemicals and stable isotope ratios in winter flounder from Massachusetts, USA. *Marine Pollution Bulletin* 32, 458-469.

- Morais, S., Narciso, L., Dores, E. & Pousao-Ferreira, P. (2004). Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquaculture International* 12, 281-298.
- Morais, S., Caballero, M.J., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M.S. & Dinis, M.T. (2006). Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: Effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 144, 57-69.
- Morrison, W.R. & Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of Lipid Research* 5, 600-608.
- Mourente, G., Tocher, D.R. & Sargent, J.R. (1991). Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids* 26, 871-877.
- Mourente, G. & Tocher, D.R. (1992). Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 105, 363-377.
- Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. & Sarasquete, M.C. (1996). Characterization of the digestive enzyme activities during the larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 121-130.
- Munilla-Moran, R. & Stark, J.R. (1989). Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 81, 315-327.
- Munk. (1997). Prey size spectra and prey availability of larval and small juvenile cod. *Journal of Fish Biology* 51(suppl. A), 340-351.
- Munro, H.N. & Fleck, A. (1966). The determination of nucleic acids. Pages 113-176. *Dans* Glick D. éditeur. *Methods of biochemical analysis*, vol XIV. Interscience, New-York.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., Perez-Casanova, J.C., Johnson, S.C. & Douglas, S.E. (2003). Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *Journal of Fish Biology* 62, 816-833.
- Naas, K.E., Naess, T. & Harboe, T. (1992). Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in green water. *Aquaculture* 105, 143-156.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V. & Amat, F. (1999). Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.

- New, M. B. (1997). Aquaculture and the capture fisheries – balancing the scale. Pages 11-30. *World Aquaculture*, June 1997.
- Oltra, R. & Todoli, R. (1997). Effects of temperature, salinity and food level on the life history traits of the marine rotifer *Synchaeta cecilia valentina*, n. subsp. *Journal of Plankton Research* 19, 693-702.
- Oltra, O., Todoli, R., Bosque, T., Lubian, L.M. & Navarro, J.C. (2000). Life history and fatty acid composition of the marine rotifer *Synchaeta cecilia valentina* fed with different algae. *Marine Ecology Progress Series* 193, 125-133.
- Pankhurst, N.W. & Van der Kraak, G. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. Pages 73-93. *Dans* Iwama, J.K. & Pickering, A.D. éditeurs. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Parrish, C.C. (1998). Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. Pages 4-20. *Dans* Arts, M.T. & Wainman, B.C. éditeurs. *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer-Verlag, New York.
- Parrish, C.C., Whitticar, M. & Puvanendran, V. (2007). Is $\omega 6$ docosapentaenoic acid an essential fatty acid during early ontogeny in marine fauna. *Limnology and Oceanography* 52, 476-479.
- Pfeiler, E. (1999). Developmental physiology of *Elopomorph leptocephali*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 123, 113-128.
- Planas, M. & Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish : problems and perspectives. *Aquaculture* 177, 171-190.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y. & de la Noüe, J. (2002). The effects of two rearing salinities on survival and stress of winter flounder broodstock. *Journal of Aquatic Animal Health* 14, 281-287.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y. & de la Noüe, J. (2003). Comparison of stress in wild and captive winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) broodstock. *Aquaculture Research* 34, 803-812.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y. & de la Noüe, J. (2005). Alternative methods for measuring energy content in winter flounder. *North American Journal of Fisheries Management* 25, 1-6.
- Pourriot, R. (1980). Workshop on culture technique of rotifers. *Hydrobiologia* 73, 33-35.
- Pourriot, R. (1986) Les rotifères. Biologie. Pages 201-221. *Dans* Barnabé, G. éditeur. *Aquaculture*, vol. 1, Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.

- Rainuzzo, J.R., Olsen, Y. & Rosenlund, G. (1989). The effects of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 79, 157-161.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. & Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. & Olsen, Y. (1994). Influence of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International* 2, 33-48.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. & Dinis, M.T. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465-473.
- Ricker, W.E. (1975) Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*. No 191, 382 pages.
- Rodriguez, C., Perez, J.A., Diaz, M., Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H. & Lorenzo, A. (1997). Influence of EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture* 150, 77-89.
- Rogers, C.A. (1976). Effect of temperature and salinity on the survival of winter flounder embryos. *Fishery Bulletin* 74, 52-58.
- Rønnestad, I., Thorsen, A. & Finn, R.N. (1999). Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 155, 201-216.
- Rosenlund, G., Meslo, I., Rodsjo, R. & Torp, H. (1993). Large-scale production of cod. Pages 141-146. *Dans* Reinertsen, H., Dahle, L., Jorgensen, L. & Tvinnereim, K. éditeurs. *Proceeding of the First International Conference of Fish farming technology*. Trondheim, Norway, 9-12 August 1993, Balkema, Rotterdam.
- Sahoo, S.K., Giri, S.S. & Sahu, A.K. (2004). Effect of stocking density on growth and survival of *Claria batrachus* (Linn.) larvae and fry during hatchery rearing. *Journal of Applied Ichthyology* 20, 302-305.
- Sargent, J.R. (1995). Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. Pages 353-372. *Dans* Bromage, N.R. & Roberts, J.R. éditeurs. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford University Press, Cambridge, UK.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. & Bell, J.G. (2002). The lipids. Pages 181-257. *Dans* Halver, J.E. & Harry, R.W. éditeurs. *Fish Nutrition 3rd*. Academic Press, New York.

- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future direction. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Sawyer, P. J. & Hoornbeck, F. K. (1980). Pilot attempt to grow winter flounder commercially. New Hampshire Fish and Game Department Completion Report for project 3-275-R for the period 15 February 1977 - 30 June 1980, 70 pages.
- Schreck, C.B., Olla, B.L. & Davis, M.W. (1997). Behavioral responses to stress. Pages 145-170. *Dans* Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. & Schreck, C.B. éditeurs. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Scott, W. B. & Scott, M. G. (1988). Atlantic fishes of Canada. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences* 219, 731 pages.
- Seoka, M., Kurata, M. & Kumai, H. (2007). Effect of docosahexaenoic acid enrichment in *Artemia* on growth of Pacific bluefin tuna *Thunus orientalis* larvae. *Aquaculture* 270, 193-199.
- Sharma, J.G. & Chakrabarti, R. (1999). Larval rearing of common carp *Cyprinus carpio*: A comparison between natural and artificial diets under three stocking densities. *Journal of the World Aquaculture Society* 30, 490-495.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S. Gara, B. Bomage, N.R. & Sargent, J.R. (1999). Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary fatty acids. *Journal of Nutrition* 129, 1186-1194.
- Sicheri, F. & Yang, D.S.C. (1995). Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* 375, 427-431.
- Smigielski, A.S. & Arnold, C.R. (1972). Separating and incubating winter flounder eggs. *Progressive Fish culturist* 34, 113.
- Smith, C. & Reay, P. (1991). Canibalism in teleost fishes. *Review of Fish Biology* Fish. 1, 41-64.
- Snell, T.W., Bieberich, C.J., Fuerst, R. (1983) The effects of green and blue-green diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 31, 21-30.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1995). *Biometry: The Principals and Practice of Statistics in Biological Research*, 3ème édition, Freeman, New-York. 887 pages.

- Sprague, J.B. (1973). The ABC's of pollutant bioassay using Fish Biological Methods for the Assessment of Water Quality. Pages 6-30. ASTM Special Technical Report., vol. 528. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (USA).
- Suchar, V.A. & Chigbu, P. (2006). The effects of alga species and densities on the population growth of the marine rotifer, *Colurella dicentra*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 337, 96-102.
- Tacon, G.J., P. & Cowey, C.B. (1985). Protein and amino acid requirements. Pages 155-183. Dans Tytler P. & Calow, P. Fish Energetics: New perspectives. Croom Helm, London.
- Takeuchi, T., Zheng, F., Yosheda, K., Hirokaea, J. & Watanabe, T. (1994). Nutritive value of DHA-enriched rotifer for larval cod. Nippon Suisan Gakkaishi 60, 641-652.
- Thane-Fenchel, A. (1968). A simple key to the genera of marine and brackish-water rotifers. Ophelia 5, 299-311.
- Tocher, D.R. & Sargent, J.R. (1984). Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes from some northwest European marine fish. Lipids 19, 492-499.
- Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Pages 1-17. Dans Vonshak, A. éditeur. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell biology and biotechnology*. London, U.K..
- Tsuji, T. & Yanagita, T. (1981). Improved fluorescent microscopy for measuring the standing stock of phytoplankton including fragile components. Marine Biology 64, 207-211.
- Turner, P.N. (1988). Rotifera. Pages 312-317. Dans Higgins R.P. & Thiel, H. éditeurs. Introduction to the study of Meiofauna. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., London.
- Vaillancourt, R. (1982). Contribution à l'étude biologique de la population de plies rouges, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), de la région de Saint-Fabien sur mer, Québec. Mémoire de Maîtrise présenté à l'Université du Québec à Rimouski #41 172 pp.
- Vaillancourt, R., Brêthes, J.-C. F. & Desrosiers, G. (1985). Croissance de la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) de l'estuaire du Saint-Laurent. Journal Canadien de Zoologie 63, 1610-1616.

- Villalta, M., Estévez, A. & Bransden, M.P. (2005a). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. & Bell, J.G. (2005b). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249, 353-365.
- Vonshak, A. (1992). Microbial biotechnology: is it an economical success? Pages 70-80. *Dans* Ratledge, C., Sasson, A. & Da Silva, E.J. éditeurs. *Biotechnology: economic and social aspects*. Cambridge University Press, U.K..
- Wallace, R.L. (2002). Rotifers: Exquisite metazoans. *Integrated and Comparative Biology* 42, 660-667.
- Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish : a review. *Aquaculture* 34, 115-143.
- Watanabe, T. (1993). Importance of docosahexaenoic acid in marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 152-161.
- Watanabe, T. & Kiron, V. (1994). Prospects in larval fish dietetics (review). *Aquaculture* 124, 223-251.
- Weiser, W. (1994). Cost and growth I cell and organisms: general rules and comparative aspects. *Biological Reviews* 69, 1-33.
- Youson, J. H. (1988). First metamorphosis. Pages 135-196. *Dans* Hoar, W. S. & Randall, D. J. éditeurs. *Fish Physiology*, vol. XIB. Academic Press, New-York.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C. & Pascual, E. (1995) Feeding rates of gilthead seabram (*Sparus aurata*) larvae on microcapsules. *Aquaculture* 134, 257-268.
- Yúfera, M. & Darias, M.J. (2007). The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268, 53-63.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., Quazuguel, P. & Le Gall, M.M. (1998). Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture* 161, 479-489.