

Les
publications
de la Direction de l'innovation
et des technologies

Rapport de recherche-développement

N° 156

Optimisation de la diète et de la fixation des larves de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* - Phase 1

Fabrice Pernet
Réjean Tremblay
Edwin Bourget
Marcel Roussy

**Optimisation de la diète et
de la fixation des larves de
pétoncle géant *Placopecten
magellanicus* - phase 1**

Rapport de recherche-développement
n° 156

Fabrice Pernet
Réjean Tremblay
Edwin Bourget
Marcel Roussy

Réalisation

Marc Veillet, responsable du bureau d'édition
Nancy Godin, agente de secrétariat du bureau d'édition

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Bureau d'édition - DIT

96, montée de Sandy Beach, bureau 2.05

Gaspé (Québec) G4X 2V6

publications.dit@mapaq.gouv.qc.ca

Pour une version gratuite (fichier pdf) de ce document, visitez notre site Internet à l'adresse suivante :
<http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche/md/Publications/> ou téléphonez au (418) 368-7639.

ISBN (version papier) : 978-2-550-49669-4

ISBN (version PDF) : 978-2-550-49670-0

Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2007

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Canada, 2007

Optimisation de la diète et de la fixation
des larves de pétoncle géant,
Placopecten magellanicus - phase 1

Fabrice Pernet¹, Réjean Tremblay², Edwin Bourget³, Marcel Roussy⁴

1. CAMGR, MAPAQ, Grande-Rivière (maintenant à l'Institut de recherche sur les zones côtières, Shippagan, Nouveau-Brunswick)
2. Entente MAPAQ-UQAR, Grande-Rivière (maintenant à l'ISMER, UQAR, Rimouski)
3. CAMGR, MAPAQ, Grande-Rivière (maintenant au GIROQ - Université Laval, Québec)
4. CAMGR, MAPAQ, Grande-Rivière (maintenant à la DRG, MAPAQ, Gaspé)

On doit citer ce document comme suit : Pernet, F., R. Tremblay, E. Bourget, M. Roussy. 2007. Optimisation de la diète et de la fixation des larves de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* - phase 1. MAPAQ, DIT, Rapport de R-D n° 156, 19 p.

Sommaire

Afin de soutenir la demande croissante en individus juvéniles de pétoncle géant *Placopecten magellanicus*, les écloséries doivent produire des quantités prévisibles et importantes d'œufs et de larves. Or, la qualité des œufs des pectinidés est extrêmement variable et dépend notamment de l'alimentation des géniteurs. D'autre part, les techniques de production en éclosérie ne permettent pas de prévoir le succès à la métamorphose et le rendement en individus juvéniles d'un groupe d'œufs ou de jeunes larves. Par conséquent, il s'avère que des groupes de larves sont maintenus à coûts élevés sans assurance de rentabilité. Dans le but d'examiner l'impact de la qualité de la diète sur la biologie de la reproduction du pétoncle géant, nous proposons une étude expérimentale détaillée de l'influence de la composition biochimique des algues sur la maturation des gonades, la qualité des œufs produits par les géniteurs, la survie, la masse, le taux de croissance et le succès de métamorphose des larves et la mise au point d'un indicateur biochimique de la qualité des larves applicable à l'industrie. Cet indicateur, basé sur les différentes classes de lipides, permettrait de prévoir le potentiel de survie larvaire ainsi que le succès à la métamorphose d'un groupe d'œufs ou de jeunes larves.

Abstract

Scallop hatcheries need to produce high quantities of eggs and larvae in order to sustain the increasing demand of the industry. However, pectinid egg quality is highly variable and may have profound effects on mortality, growth and the success of metamorphosis. Currently, it is impossible to predict juvenile production after brood-stock spawning. As a consequence, larvae are kept in a hatchery costly system without any benefit at the end of larval cycle. Thus, in order to examine impact of diet quality on reproductive biology of giant scallop, we suggest to study the effect of biochemical composition of microalgae on gonad maturation, egg quality, survival, weight, growth and metamorphosis success of larvae and to set up a reliable biochemical indicator of larval quality, applicable to industry. This indicator, based on lipid class, should forecast survival potential and hatching success of batches of eggs or young larvae.

Mots-clés

pétoncle géant
élevage larvaire
conditionnement
qualité
alimentation

Key words

Giant scallop
larval rearing
broodstock conditioning
quality
diet

Table des matières

Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures	VII
Liste des annexes.....	VIII
Introduction	
Contexte	1
La base de la production : la valeur nutritive des micro-algues	1
Gamétogénèse et conditionnement des géniteurs	2
Nutrition des géniteurs	2
Nutrition larvaire	3
Assimilation des lipides chez les larves	3
Rôle des lipides chez les larves	4
Indicateur biochimique de la qualité des larves.....	4
Objectifs	5
Matériels et méthodes	
Extraction des lipides	6
Qualité des micro-algues.....	6
Conditionnement des géniteurs.....	8
Élevage larvaire.....	8
Résultats	
Extraction lipides	9
Qualité des micro-algues.....	9
Conditionnement des géniteurs.....	10
Élevage larvaire.....	11
Discussion	
Extraction lipides	12
Qualité des micro-algues.....	12
Conditionnement des géniteurs et nutrition larvaire	12
Conclusion.....	13
Remerciements	13
Références bibliographiques	13
Annexe 1 : Techniques d'écloserie.....	16
Annexe 2 : Prélèvement des échantillons.....	17
Annexe 3 : Dosage des classes de lipides.....	18

Liste des tableaux

Tableau 1 : Âge à la première ingestion et taille des larves véligères du pétoncle <i>Argopecten ventricosus circularis</i> en fonction de la taille des micro-algues	3
Tableau 2 : Proportion des différentes classes de lipides et des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels de deux espèces d'algues couramment employées lors de la culture de bivalves	7
Tableau 3 : Proportion des différentes classes de lipides et des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels des mélanges employés lors du conditionnement des géniteurs et de l'élevage des larves	7
Tableau 4 : Indicateurs biochimiques de la qualité des différents régimes alimentaires utilisés pour le conditionnement des géniteurs et l'élevage des larves, calculés à partir des données du tableau 3....	7
Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez le pétoncle géant, <i>Placopecten magellanicus</i>	8
Tableau 6 : Abondance relative des classes de lipides contenus dans la micro-algue <i>Chaetoceros muelleri</i> en fonction du traitement appliqué à l'extraction.....	9
Tableau 7 : Quantité en mg des différentes classes de lipides contenus dans la micro-algue <i>Chaetoceros muelleri</i> en fonction de la durée d'entreposage et du volume de culture filtré après un traitement à l'ultrason et un broyage manuel	9

Liste des figures

Figure 1 : Cycle annuel gamétogénique généralisé indiquant la taille des gonades au cours du développement	2
Figure 2 : Métabolisme reproducteur de <i>Argopecten irradians</i> incluant trois mécanismes de mobilisation de l'énergie dans la gonade.	2
Figure 3 : Quantité des différentes classes de composés extraits de la micro-algue <i>Isochrysis</i> sp. en fonction du traitement appliqué	9
Figure 4 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits des régimes alimentaires A, B et C	10
Figure 5 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits de la micro-algue <i>Isochrysis</i> sp. en fonction du volume de culture	10
Figure 6 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits de la micro-algue <i>Chaetoceros muelleri</i> en fonction du volume de culture.....	10
Figure 7 : Valeur du ratio triglycérides (TAG)/cholestérol (ST) dans les gonades des géniteurs conditionnés selon les régimes alimentaires A, B et C.	10
Figure 8 : Valeur du ratio triglycérides (TAG)/cholestérol (ST) dans les œufs produits par les géniteurs prélevés du milieu naturel aux Îles-de-la-Madeleine.....	11
Figure 9 : Survie des larves produites par les géniteurs prélevés du milieu naturel aux Îles-de-la-Madeleine et en Gaspésie au cours du temps.....	11
Figure 10 : Rapport triglycéride (TAG)/cholestérol (ST) en fonction de l'âge des larves émises par les géniteurs prélevés du milieu naturel en Gaspésie	11

Liste des annexes

Annexe 1 : Techniques d'éclosion	16
Annexe 2 : Prélèvement des échantillons	17
Annexe 3 : Dosage des classes de lipides	18

Introduction

Contexte

La pêche au pétoncle géant date de plus d'un siècle dans l'Atlantique canadien. Toutefois, les débarquements fluctuent de façon marquée d'une année à l'autre et des périodes de fort recrutement tous les 9, 18 ou 21 ans ont été observés (Couturier *et al.*, 1995). Les raisons précises d'une telle variabilité sont aujourd'hui toujours inconnues. Par ailleurs, la surexploitation de certains stocks naturels, tels que ceux des Îles-de-la-Madeleine, est incontestable. La variabilité du recrutement et la surexploitation sont à l'origine d'un intérêt grandissant pour la culture du pétoncle géant depuis les années 1970. Au Québec, un intérêt particulier s'est particulièrement développé en faveur du recrutement en milieu naturel sur des collecteurs artificiels. Toutefois, dans la région de la Basse-Côte-Nord, où le recrutement du pétoncle géant est difficile, la pectiniculture s'est développée via une éclosérie-nurserie commerciale, Pec-Nord inc.

Depuis quelques années, l'éclosérie expérimentale du CAMGR ainsi que celle du producteur privé, Pec-Nord inc., produisent des larves de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus*. Toutefois, les résultats obtenus démontrent une variabilité interponte importante dans le développement larvaire avec des taux de mortalité pouvant atteindre plus de 97 % entre la fécondation et le stade postlarve (Couturier *et al.*, 1995). Il semble que cette importante mortalité et ces grandes variabilités annuelles observées soient liées en grande partie à la qualité des gamètes relâchés (Le Pennec *et al.*, 1998). La qualité des gamètes produits en éclosérie est loin d'être constante (Dorange et Le Pennec, 1989; Le Pennec *et al.*, 1998) et plusieurs paramètres peuvent être responsables de ce niveau élevé de variabilité. Les paramètres exogènes probablement les plus importants sont la qualité de l'eau et les fluctuations temporelles de la qualité nutritionnelle du phytoplancton (Samain *et al.*, 1992). Comme les techniques de production en éclosérie ne permettent pas de prévoir le succès à la métamorphose et le rendement en individus juvéniles d'un groupe d'œufs ou de jeunes larves, il s'avère que des groupes de larves sont conservés à des coûts élevés sans assurance de rentabilité.

La qualité de la nourriture joue un rôle important puisque l'alimentation affecte directement la composition des gamètes et le développement larvaire (Whyte *et al.*, 1991; Soudant *et al.*, 1996; Berntsson *et al.*, 1997; Racotta *et al.*, 1998; Utting et Millican, 1997, 1998). Ainsi, au cours des manipulations de conditionnement des géniteurs, le facteur trophique est primordial puisque l'alimentation des géniteurs est directement responsable de l'abondance et de la constitution des gamètes, qui influencent directement la phase endotrophe larvaire. L'étude des

micro-algues utilisées pour conditionner les géniteurs et alimenter les larves montre que leur composition en lipides varie selon les espèces et les conditions de culture. Or, certains de ces lipides, tels que les acides gras polyinsaturés comme l'acide eicosapentanoïque (EPA, 20:5n-3) et docosahexanoïque (DHA, 22:6n-3) sont essentiels pour la constitution des membranes des ovocytes et des larves (Berntsson *et al.*, 1997; Utting et Millican, 1998). Ces acides gras doivent provenir de l'alimentation, car la capacité de biosynthèse de ces derniers par les mollusques est très faible. Ainsi, la qualité de la nourriture en lipides jouerait un rôle essentiel à toutes les étapes de l'élevage en éclosérie et en nurserie (Séguineau *et al.*, 1993). La composition lipidique des algues n'aurait pas seulement un impact sur la survie larvaire mais également sur la croissance.

La base de la production : la valeur nutritive des micro-algues

La composition en éléments essentiels tels que les acides aminés, les acides gras, les vitamines et les oligo-éléments détermine la valeur nutritionnelle des micro-algues et non la quantité totale de glucides, de protéines ou de lipides (Delaunay, 1992). Les compositions en acides gras et en acides aminés ont été déterminées pour un grand nombre de micro-algues utilisées en aquaculture (Volkman *et al.*, 1989; Brown, 1991; Dunstan *et al.*, 1993). La composition en acides gras des micro-algues est très variable d'une espèce à l'autre (Volkman *et al.*, 1989). En plus d'une grande variabilité interspécifique, il existe une variabilité intraspécifique inhérente aux conditions de culture (Delaunay, 1992, pour revue). La composition en classes de lipides est également affectée par les conditions de culture. Par exemple, lorsque la diatomée *Chaetoceros muelleri* est cultivée dans un milieu pauvre en azote, elle synthétise deux fois plus de triglycérides (TAG) comparativement à la même espèce cultivée sous des conditions optimales (Parrish et Wangersky, 1990). En revanche, la composition en acides aminés des micro-algues est constante entre les différentes espèces couramment employées en aquaculture (Brown, 1991). La plupart contiennent tous les acides aminés essentiels aux mollusques (thréonine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, histidine, arginine et proline). Enfin, les spectres vitaminiques de quelques algues sont disponibles dans la littérature (Seguineau *et al.*, 1993). Ces résultats montrent une grande variabilité interspécifique et intraspécifique en fonction des phases de culture. Ces différences peuvent avoir des implications importantes en terme de valeur nutritionnelle des micro-algues. Bien que les vitamines représentent une fraction mineure de la diète comparativement aux protéines, aux hydrates de carbone et aux lipides, elles demeurent un élément critique pour le maintien des fonctions métaboliques et physiologiques.

Gamétogénèse et conditionnement des géniteurs

Chez le pétoncle géant, les sexes sont séparés et facilement identifiables par la coloration de la gonade qui est blanche chez le mâle, orange chez la femelle. Le cycle reproducteur inclut une période végétative, une période de différenciation, de croissance cytoplasmique, de vitellogénèse (maturation), de frai et enfin, de résorption des gamètes non émis (Figure 1). La ponte est synchronisée et se produit entre juillet et octobre selon la latitude. Une femelle peut émettre jusqu'à 100 millions d'œufs et le mâle deux milliards de spermatozoïdes. Barber et Blake (1991) proposent trois mécanismes impliqués dans le métabolisme reproducteur de *Argopecten irradians concentricus* (Figure 2).

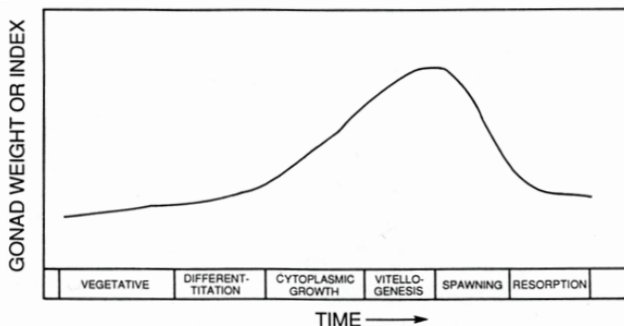


Figure 1 : Cycle annuel gamétogénétique généralisé indiquant la taille de la gonade au cours du développement (tiré de Barber et Blake, 1991).

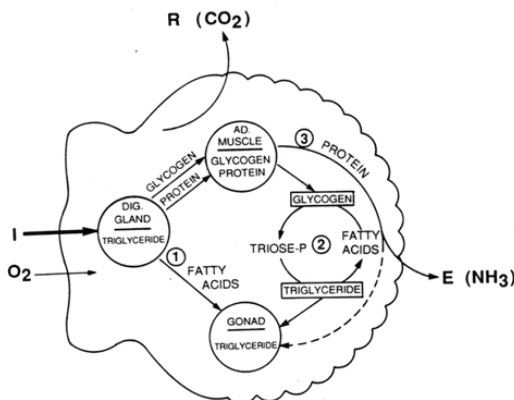


Figure 2 : Métabolisme reproducteur de *Argopecten irradians* incluant trois mécanismes de mobilisation de l'énergie dans la gonade. I = énergie ingérée; R = énergie respirée; E = énergie excrétée (tiré de Barber et Blake, 1991).

Le premier mécanisme consiste en un transfert direct des acides gras stockés ou récemment ingérés, de la glande digestive vers les ovocytes en développement dans la gonade. Le second mécanisme implique la conversion des hydrates de carbone en lipides selon le cycle glucose-acides gras chez les invertébrés. Une perte générale des réserves de glycogène des tissus du muscle adducteur accompagne l'accumulation des lipides dans les gonades. Ce résultat est également noté chez les pétoncles *Argopecten purpuratus* (Martinez et Mettifofo, 1998) et *Placopecten magellanicus* (Robinson, 1981). Enfin, le

troisième mécanisme consiste en l'utilisation de protéines accumulées dans les tissus somatiques pendant la période de croissance afin de supporter la reproduction. Généralement, cette voie est essentiellement utilisée par les populations qui initient la gamétogénèse pendant l'hiver, lorsque les niveaux de nourriture sont faibles et que les réserves en lipides et en hydrates de carbone sont vides.

Le conditionnement des géniteurs consiste à maximiser la fécondité tout en maintenant la qualité des œufs et la viabilité des larves. Pendant le conditionnement, l'environnement physique et la nutrition des géniteurs sont contrôlés pour promouvoir le développement des gonades et la gamétogénèse (Utting et Milican, 1997, pour revue). Un bon conditionnement consiste donc à maintenir des conditions proches de celles du milieu naturel pendant le cycle de reproduction, particulièrement en termes de température et de quantité de nourriture. Chez la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*, les protéines, les hydrates de carbone et les lipides en réserve dans le muscle adducteur et les lipides contenus dans la glande digestive sont mobilisés et transférés vers les gonades en développement pendant le conditionnement (Soudant *et al.*, 1996). La température initie le processus de gamétogénèse mais la fécondité de *P. maximus* et la qualité des œufs produits sont améliorées lorsque des suppléments d'algues sont ajoutés à la diète (Devauchelle et Mingant, 1991).

Nutrition des géniteurs

L'alimentation des géniteurs affecte directement la composition des gamètes et le développement larvaire subséquent (Whyte *et al.*, 1987; Whyte *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 1992; Samain *et al.*, 1992; Caers *et al.*, 1999). En effet, le patron en acides gras des œufs reflète fortement celui des algues dont le géniteur se nourrit. Bien que fragmentaires, les résultats dans la littérature indiquent que la composition biochimique des micro-algues joue un rôle déterminant dans la maturité des gonades (Delaunay, 1992; Soudant, 1995; Soudant *et al.*, 1996); ils montrent que la maturité de *Pecten maximus* et la proportion d'œufs qui produisent des larves-D viables augmentent avec une diète à base de *Isochrysis galbana* riche en acide gras polyinsaturés (AGPI) essentiels. Par ailleurs, une diète qui a un ratio de 22:6n3/20:5n3 > 1 est recommandée en vue de nourrir adéquatement les géniteurs de *P. maximus*. Lors de l'élaboration de la diète en vue de conditionner des géniteurs, il faut tenir compte de la quantité de nourriture disponible. Or, elle varie selon le volume d'eau transporté à travers les branchies et l'efficacité avec laquelle les particules sont retenues par celles-ci. La plupart des bivalves après fixation sont capables de retenir des particules de diamètre supérieur à 3 à 4 µm avec 100 % d'efficacité. L'efficacité de la rétention diminue avec une baisse de la taille de la particule et varie entre 35 et 90 % pour des particules de 2 µm (Møhlenberg et Riisgard, 1978).

Embryogenèse

Les ovocytes de pétoncle géant sont émis au stade de prométaphase de méiose I, mais plus de 80 % de ceux-ci atteignent la métaphase I après moins de 90 minutes d'incubation à 10 °C (Desrosiers *et al.*, 1996). Les ovocytes sont fertiles pendant 3 à 4 h après leur émission et les spermatozoïdes conservés à 4 °C restent actifs pendant plusieurs heures. Suite à la fécondation, les ovocytes poursuivent la maturation méiotique préalablement arrêtée en métaphase I. Les conditions les plus favorables à la fécondation, à la maturation méiotique et à la première division zygotique sont une température de 10 °C, une salinité entre 25 et 28 ‰ et un pH entre 8,0 et 8,5 (Desrosiers *et al.*, 1996). L'embryon atteint rapidement les stades morula et gastrula et se développe par la suite en larve trochophore munie d'un flagelle apical lui permettant de se déplacer. Finalement, la larve atteint le stade véligère 4 à 5 jours après la fécondation. L'embryogenèse repose sur les réserves énergétiques accumulées dans l'œuf par la femelle.

Nutrition larvaire

Dans la mesure où les larves d'invertébrés ont une faible capacité à désaturer les précurseurs pour produire des molécules essentielles comme les acides gras polyinsaturés, les diètes monospécifiques sont moins efficaces que les diètes multispécifiques (Samain *et al.*, 1992). En effet, l'utilisation de diètes multispécifiques permet d'éviter les carences nutritionnelles (Volkman *et al.*, 1989). Un mélange de trois algues est généralement utilisé en éclosion pour prévenir de telles carences. La qualité biochimique des algues varie selon l'espèce, le mode de culture, la période de récolte et les conditions environnementales (Parrish *et al.*, 1998). Cependant, en culture larvaire, il est nécessaire de considérer d'autres facteurs comme la forme, la mobilité, la taille, la production de toxines ainsi que la capacité de la larve à capturer, ingérer et digérer l'algue et à en assimiler les nutriments (Lora-Vilchis et Maeda-Martinez, 1997). Ces auteurs montrent une corrélation positive entre la plus petite dimension géométrique de l'algue ingérée, l'âge et la taille des larves véligères de *Argopecten ventricosus circularis* (Tableau 1). Il y a donc une limite anatomique de la larve à l'ingestion de particules. Par ailleurs, Le Pennec *et al.* (1985) montrent par microscopie à épifluorescence que *Isochrysis galbana* et

Tableau 1 : Âge à la première ingestion et taille des larves véligères du pétoncle *Argopecten ventricosus circularis* en fonction de la taille des micro-algues (extrait de Lora-Vilchis, 1997).

Espèces	Taille min.	Taille Max.	Âge à la première ingestion (d)	Taille moyenne de la coquille (µm)
<i>Chaetocero gracilis</i>	5-6	6-8	7	98.3
<i>Isochrysis sp.</i>	3-4	7-8	3	78.8

Pavlova lutheri sont des algues de premier choix pour l'alimentation des véligères de *Pecten maximus* lors des 50 premières heures de développement. L'ingestion et la digestion de *Dunaliella primolecta* sont plus difficiles, sans doute en raison de sa plus grande dimension. Cependant, Gallager *et al.* (1989) montrent que les larves de pétoncles sont capables de retenir des particules d'un diamètre variant entre 3 et 6 µm avec la même efficacité. Cela a également été démontré pour les larves de la palourde *Mercenaria mercenaria*, qui sont capables de capturer avec une égale efficacité des particules comprises entre 0,5 et 8 µm (Gallager *et al.*, 1988).

Stade véligère

Les larves commencent à s'alimenter suite au développement de la coquille et du vélum, soit environ quatre jours après la fécondation chez *Placopecten magellanicus* (Culliney, 1974). Les larves se développent pendant environ quatre semaines dans la colonne d'eau où elles se nourrissent essentiellement de phytoplancton. Lorsque la larve atteint une longueur de 220 µm, environ 28 jours après la fécondation, elle développe une pigmentation brune visible au microscope (larve œillée) et un pied (larve pédivéligère) (Culliney, 1974).

Métamorphose

La métamorphose des larves en laboratoire à 15 °C a généralement lieu après 35 jours, bien que celles-ci puissent retarder leur fixation pendant un mois. Le processus de métamorphose implique plusieurs transformations physiques dont le détachement du vélum, le repositionnement du pied, le développement de branchies rudimentaires et la calcification des deux valves donnant au mollusque sa forme définitive. Le taux de mortalité entre l'œuf et le stade postlarve peut atteindre 97 % (Couturier *et al.*, 1995).

Les stades de développement les plus critiques sont le passage de l'œuf à la larve-D (jour 4), pendant lequel 40 % de mortalité est observé (Couturier *et al.*, 1995), et la métamorphose. Ces taux élevés de mortalité sont associés à des périodes pendant lesquelles les larves reposent sur des sources énergétiques endogènes.

Assimilation des lipides chez les larves

Les lipides alimentaires des animaux sont essentiellement constitués de TAG et de phospholipides. La digestion des lipides est assurée par les lipases dont les activités ont été mesurées dans l'estomac de plusieurs espèces de bivalves. Il semble que l'estomac soit le lieu principal de l'absorption des TAG alimentaires. Ils traversent les parois sous forme d'un mélange d'acides gras libres, de monoglycérides, de diglycérides et de TAG. Chez les poissons et les vertébrés

supérieurs, les lipides alimentaires sont transportés essentiellement sous forme de TAG associés à des lipoprotéines. Les lipides sont captés par le foie et les tissus adipeux où un arsenal de lipases hydrolysent les TAG en acides gras et en glycérol, assimilables par ces tissus. Dans la majorité des tissus, les acides gras servent directement de source d'énergie. Cependant, dans les tissus adipeux, ils sont éventuellement réestérifiés par le glycérol et les TAG sont mis en réserve dans les adipocytes. Ces cellules sont occupées par un énorme globule de graisse constitué presque exclusivement de TAG. Dans les tissus musculaires, les acides gras peuvent être conservés sous forme de TAG dans des gouttelettes graisseuses entourées de mitochondries dans la mesure où la glycolyse subvient aux besoins énergétiques.

Rôle des lipides chez les larves

Triglycérides

Les triglycérides forment le groupe principal de lipides de réserve des cellules animales (Lehninger *et al.*, 1993) et par conséquent de plusieurs espèces de bivalves (Gallager *et al.*, 1986). Deux groupes ont montré que les TAG sont les réserves énergétiques principales des larves de *Ostrea edulis* (Holland et Spencer, 1973) et de *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1987). Gallager *et al.* (1986) ont calculé que 69 et 71 % des lipides ovocytaires, principalement les TAG, sont consommés durant le développement des œufs de la palourde *Mercenaria mercenaria* et de l'huître *Crassostrea virginica*. Les TAG contiennent un tiers des acides gras totaux sous forme polyinsaturée (AGPI). Il s'agit principalement des acides gras à longues chaînes carbonées dont 20:5n3 et 22:6n3. Ces AGPI sont des nutriments diététiques essentiels à la croissance pour des raisons associées à leur structure spécifique, par opposition aux acides gras saturés et monoinsaturés qui sont généralement non essentiels (Langdon et Waldo, 1981). Ainsi, les TAG jouent probablement un rôle double. Ils stockent de grandes quantités d'acides gras à des fins d'approvisionnement en énergie et ils sont un réservoir temporaire d'AGPI (Napolitano *et al.* 1988).

Phospholipides et les stérols

Ces composés sont essentiels à la constitution et au fonctionnement des membranes cellulaires (Lehninger *et al.*, 1993). Les mollusques bivalves ont une faible capacité à synthétiser et à transformer les stérols (Holden et Patterson, 1991). Le rôle des stérols (ST) dans les membranes est exclusivement architectural, leurs fonctions principales étant restreintes à la mobilité des chaînes d'acides gras de la bicouche lipidique. Les ST en particulier sont très utilisés par les embryons pour construire les membranes cellulaires (Delaunay, 1992). Håkanson (1989) montre que, pendant les périodes de carence alimentaire, le contenu en ST des larves d'anchois est

constant alors que le contenu en lipides polaires diminue lentement. Ainsi, bien qu'impliqués dans la structure de la membrane cellulaire, ces composés ont une capacité à être utilisés en vue de satisfaire des besoins métaboliques qui diffèrent.

Indicateur biochimique de la qualité des larves

Le terme « qualité » est lié à toute caractéristique physiologique d'un organisme qui contribue à augmenter sa croissance ou sa survie. À cet effet, de nombreux indicateurs ont été utilisés pour estimer la qualité des organismes aquatiques. Ces indicateurs intègrent une ou plusieurs variables biochimiques en vue de dresser un portrait de l'activité métabolique de l'animal et reflètent, avec plus ou moins d'exactitude, l'adéquation entre différentes variables environnementales et les besoins spécifiques de l'organisme étudié (Lucas et Beninger, 1985).

Notre intérêt à développer un indicateur biochimique de la qualité des larves est la mise en place d'un outil de prédiction de la survie et de la croissance des larves. Pour la survie, les travaux démontrent que les phases critiques sont l'embryogenèse et la métamorphose (Couturier *et al.*, 1995), qui sont deux stades pendant lesquels les larves dépendent directement des réserves énergétiques accumulées. En effet, durant l'embryogenèse, les réserves endogènes de l'ovocyte sont utilisées par l'embryon jusqu'à ce que la larve commence à s'alimenter. Pendant cette période, les réserves en lipides, en protéines et en hydrates de carbone fournissent respectivement 47,6, 44,9, et 7,5 % de l'énergie nécessaire au développement des embryons chez *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1991). La plupart de ces besoins énergétiques concernent la formation de la coquille. Les jeunes larves doivent donc puiser dans leurs réserves, ce qui peut avoir des conséquences sur leur développement ultérieur. Chez *Pecten maximus*, le contenu lipidique des larves diminue pendant les cinq premiers jours après la fécondation (Delaunay *et al.* 1992; Marty *et al.* 1992). Durant la métamorphose, les lipides et les protéines sont également les principales ressources énergétiques utilisées chez *Ostrea chilensis*, contribuant respectivement à 69,3 et à 24,3 % des besoins énergétiques (Videla *et al.*, 1998). Holland et Spencer (1973) montrent que les larves de l'huître *Ostrea edulis* catabolisent une large proportion de triglycérides accumulés pendant la phase larvaire pélagique afin de satisfaire les besoins énergétiques inhérents à la métamorphose. Par ailleurs, une étude récente menée sur *Pecten maximus* montre que les réserves lipidiques, particulièrement celles contenant des lipides neutres, sont employées pour répondre à la demande énergétique liée à la métamorphose bien que le constituant majeur des larves pédivelligères soit les protéines (Dwiono *et al.*, 1991). Ces auteurs suggèrent également l'existence d'un seuil minimum en deçà duquel la larve ne se métamorphose pas.

Ainsi, l'utilisation des lipides et particulièrement des triglycérides semble intéressante comme indicateur physiologique servant à prédire la survie et la croissance des larves de pétoncles géants. Toutefois, la quantité de triglycérides ne peut être utilisée seule en raison de la dépendance de cette mesure avec la taille (Gallager *et al.*, 1986). La littérature mentionne plusieurs ratios, plus ou moins fiables, permettant d'estimer la condition physiologique des larves d'organismes aquatiques. Ainsi, certaines études suggèrent l'emploi du rapport triglycérides/stérol comme indicateur lipidique de la qualité des larves (Fraser, 1989; Hakanson *et al.*, 1994). Cette proposition s'appuie sur des données indiquant une corrélation positive forte entre le contenu en stérol et le poids sec chez les larves de homard et de hareng (Fraser, 1989). Les rapports triglycérides/stérol sont différents selon que les larves sont exposées ou non à un stress alimentaire ou à une pollution (Fraser, 1989). Delaunay *et al.*, (1992) montrent que les larves de *Pecten maximus* ayant un faible taux triglycérides/matière organique ont une croissance faible. Cependant, un taux élevé ne confère pas forcément une croissance élevée. Un autre indice de condition, reposant sur une fonction discriminante de triglycérides, de phospholipides et du poids sec après dégraissage, a permis de distinguer des larves en bonne et en mauvaise condition et de déterminer l'état des larves de morue recueillies en mer (Lochmann *et al.*, 1995). Ces auteurs suggèrent que la quantité de phospholipides est une meilleure approximation de la taille que la quantité de stérol. Enfin, le rapport triglycérides/poids humide semble être un outil puissant pour estimer la condition des larves de crevettes en laboratoire (Ouellet et Taggart, 1992) et sur le terrain (Ouellet *et al.*, 1995).

Le lien entre la probabilité de survie et un indice lipidique basé sur les différentes classes a été mis en évidence pour les larves de crevettes (Ouellet et Taggart, 1992). Par ailleurs, lorsque la condition physiologique des larves de morues est bonne, le risque de mortalité est bas, mais lorsqu'elle est faible, le risque de mortalité est variable (Lochmann *et al.*, 1995).

Nous avons donc commencé un projet de trois ans au printemps 2000 avec l'objectif d'optimiser la diète pour accroître le conditionnement et l'élevage larvaire de pétoncle géant. La première étape consistait à obtenir un bon indicateur de qualité physiologique. Nous avons opté pour des ratios de différentes classes de lipides. En effet, même si ces ratios se sont déjà révélés utiles comme indicateur physiologique, aucun travail dans ce sens n'avait été réalisé sur le pétoncle géant. Nous croyions que ces ratios pouvaient être de bons indicateurs du succès de l'embryogenèse et de la métamorphose. La gamme d'utilisation de cet indicateur de condition larvaire reste donc à démontrer chez le pétoncle géant.

Objectifs

Durant ce projet, nos objectifs globaux ont été de :

1. Mettre au point un indicateur biochimique de la qualité des larves basé sur les classes de lipides;
2. Déterminer l'effet du régime alimentaire sur la maturation des gonades pendant le conditionnement des géniteurs;
3. Déterminer l'effet du régime alimentaire des géniteurs sur la fécondité, la fertilité et la qualité des œufs;
4. Déterminer l'effet du régime alimentaire des géniteurs ou des larves sur la qualité, la survie, le taux de croissance et le succès de métamorphose des larves.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons développé une série d'expériences. La première consistait à valider notre technique biochimique.

Dans la mesure où en plus d'une grande variabilité interspécifique, il existe une variabilité intraspécifique inhérente aux conditions de culture (Delaunay, 1992, pour revue), il convient de caractériser la qualité des micro-algues produites à l'écloserie du Centre aquacole marin de Grande-Rivière et de connaître les facteurs qui influencent cette qualité. Cette étape préliminaire est indispensable en vue d'établir des régimes alimentaires à valeurs nutritionnelles différentes et d'alimenter les larves et les géniteurs de façon constante au cours de l'expérience. Nous avons donc caractérisé la composition lipidique du régime alimentaire des géniteurs et des larves et établi un suivi de la composition lipidique des micro-algues pendant tout le processus de culture.

Le conditionnement des géniteurs permet de déterminer l'effet du régime alimentaire sur la maturation des gonades et sur le contenu énergétique du muscle adducteur pendant le conditionnement des géniteurs ainsi que sur la fécondité, la fertilité et la qualité des œufs produits.

L'élevage larvaire a pour objectif de déterminer l'effet du régime alimentaire des géniteurs ou des larves sur la qualité, la survie, le taux de croissance et le succès de métamorphose des larves et mettre au point d'un indicateur biochimique de la qualité des larves. Enfin, l'élevage des larves issues des géniteurs matures prélevés du milieu naturel permet de comparer la qualité des gonades, des œufs et des larves avec les larves provenant des géniteurs conditionnés et renforce, si les résultats convergent, la validité de l'indicateur biochimique de la qualité larvaire.

Matériels et méthodes

Extraction des lipides

L'extraction des lipides des échantillons microscopiques (micro-algue et larves) nécessite une étape préliminaire qui consiste à extraire les organismes du filtre. À cet effet, nous avons testé trois méthodes couramment employées. La première consistait à appliquer un traitement aux ultrasons; la seconde à broyer le filtre manuellement dans un homogénéisateur verre sur verre de 7 ml; la dernière méthode consistait à combiner les deux traitements. Ces trois méthodes étaient appliquées dans un solvant d'extraction. Ainsi, une expérience à plusieurs facteurs nous a permis de mesurer l'efficacité de ces trois traitements en fonction de la quantité des lipides recueillis et de la durée d'entreposage des échantillons. Cette comparaison des méthodes d'extraction a été réalisée sur des cultures de micro-algues.

Les échantillons ont été prélevés sur des filtres en fibre de verre Watman GF/C (25 mm de diamètre) préalablement traités au four à 450 °C pendant 24 h. Les échantillons étaient conservés dans une solution de CH₂CL₂-MeOH (2:1; v/v) à -20 °C sous azote jusqu'à l'extraction des lipides. L'extraction, la séparation et le dosage des différentes classes de lipides ont été réalisés tel que décrit en annexe. Chaque combinaison de traitement était analysée en pentaplicat. Afin de quantifier les différentes classes de lipides, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur par ionisation de flamme (FID, Iatroscan MK-V).

Effet des trois traitements (ultrasonication, broyage et combinaison des deux traitements) en fonction de l'espèce et de la quantité filtrée sur la teneur en classes de lipides

Nous avons choisi de comparer deux espèces de micro-algue : *Chaetoceros muelleri* et *Isochrysis* sp. (clone T-iso). Pour chaque espèce et chaque traitement, des échantillons en pentaplicat d'une même culture en phase exponentielle de croissance ont été prélevés (5, 10 et 15 ml). Ces échantillons étaient entreposés pendant 1 à 3 jours avant l'extraction et l'analyse des lipides. Les extraits lipidiques obtenus de chacun des traitements étaient déposés sur le même groupe de chromarodes. Une chromarode était disponible pour recevoir échantillon un standard ou échantillon un témoin.

Effet de la durée d'entreposage

Comme vu précédemment, des échantillons de 5, 10 et 15 en pentaplicat ont été prélevés, mais sur une seule espèce d'algue : *C. muelleri*. Les échantillons étaient préservés pendant 1 à 3 jours, 28 à 31 jours et 183 à 186 jours avant l'extraction et l'analyse lipidique. L'extraction était réalisée par la technique combinée d'ultrasonication et de broyage.

Qualité des micro-algues

Caractérisation des régimes alimentaires

Nous avons utilisé trois mélanges à base de *Chaetoceros muelleri* (Chagra) et *Isochrysis* sp. (T-Iso) en proportions variables. Ces espèces sont couramment employées pour la culture de bivalves (Enright *et al.*, 1986; Napolitano *et al.*, 1988; Volkman *et al.*, 1989; Parrish *et al.*, 1998) et sont complémentaires. En effet, *C. muelleri* est particulièrement riche en TAG et en AGPI 20:5n3, par opposition à *Isochrysis* sp. qui produit des taux élevés de lipides polaires et de 22:6n3 (Tableau 2). D'autre part, chaque espèce est assimilée par les géniteurs (Bourne *et al.*, 1989; Utting et Millican, 1998) et les larves (Le Pennec et Rangel-Davalos, 1985; Bourne *et al.*, 1989; Bricelj et Shumway, 1991; Lora-Vilchis et Maeda-Martinez, 1997; Lu et Blake, 1997; Parrish *et al.*, 1998), compte tenu de leurs tailles relativement similaires (Tableau 1). Cependant, il est probable que les larves aient une préférence pour *Isochrysis* sp. pendant les premiers jours d'alimentation, cette dernière étant plus facilement ingérée par les petites larves (Lora-Vilchis et Maeda-Martinez, 1997). Le régime alimentaire A consistait en un mélange 50:50 (Chagra : Iso, p/p). Les régimes B et C contenaient le même mélange dans des proportions respectives de 20:80 et de 5:95 (Chagra : Iso; p/p). Les proportions de TAG et les ratios qui en découlent devraient différer théoriquement dans chacun des trois mélanges (Tableaux 3 et 4). Les trois régimes alimentaires étaient caractérisés dans les bassins de mélange servant à l'alimentation des géniteurs hebdomadairement, durant toute la durée du conditionnement, soit 16 semaines. Les algues pour les bassins de mélange provenaient des cultures en « kawals » de 200 L.

Suivi des cultures

La composition lipidique de *Chaetoceros muelleri* (Chagra) et *Isochrysis* sp. (T-Iso) était déterminée pendant tout le processus de culture sur trois cultures de chaque espèce maintenues simultanément. Des échantillons de chaque espèce étaient prélevés à chaque repiquage, pendant la phase exponentielle de croissance, dans les cultures de 125 ml, de 500 ml, de 15 L et de 180 L. En parallèle, les concentrations cellulaires étaient mesurées à six reprises par un compteur de particules électronique.

Tableau 2 : Proportion des différentes classes de lipides et des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels de deux espèces d'algues couramment employées lors de la culture de bivalves (extrait de Volkman *et al.*, 1989* et Parrish *et al.*, 1998**).

Espèces	Classes de lipides*						AGPI**	
	HC	TAG	AG	ST	POL	Autres	20:5n3	22:6n3
<i>Chaetoceros gracilis</i>	1.3	34	14.4	6	44.2	-	18.39	0.89
<i>Isochrysis sp.</i>	0.4	2.8	TR	0.2	83.0	13.5	2.67	20.47

HC : hydrocarbure et cire estérifiée; triglycéride : TAG; AG : acide gras; ST : stérol et alcool; POL : lipide polaire et chlorophylle. TR < 0.2 %.

Tableau 3 : Proportion théorique des différentes classes de lipides et des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels des mélanges employés lors du conditionnement des géniteurs et l'élevage des larves (calculée à partir des données de Volkman *et al.*, 1989*, et Parrish *et al.*, 1998**).

Mélange Iso : Chagra	Classes de lipides *						AGPI **	
	HC	TAG	AG	ST	POL	Autres	20:5n3	22:6n3
50:50	0.85	18.40	7.20	3.10	63.60	6.75	9.64	11.57
20:80	0.58	9.04	2.88	1.36	75.24	10.80	4.39	16.91
5:95	0.45	4.36	0.72	0.49	81.06	12.83	1.77	19.58

HC : hydrocarbure et cire estérifiée; triglycéride : TAG; AG : acide gras; ST : stérol et alcool; POL : lipide polaire et chlorophylle. TR < 0.2 %.

Tableau 4 : Indicateurs biochimiques de la qualité des différents régimes alimentaires utilisés pour le conditionnement des géniteurs et l'élevage des larves, calculés à partir des données du tableau 3.

Mélange Iso : Chagra	TAG (ST+POL)	TAG ST	(TAG+AG) (ST+POL)	(TAG+AG) ST	22:6n3 20:5n3
50:50	27.6	5.9	39.4	8.3	1.20
20:80	11.8	6.6	15.6	8.8	3.85
5:95	5.3	8.9	6.2	10.4	11.09

Triglycéride : TAG; AG : acide gras; ST : stérol et alcool; POL : lipide polaire et chlorophylle. TR < 0.2 %.

Conditionnement des géniteurs

Le dispositif expérimental nécessitait 168 pétoncles géants géniteurs de d'une taille variant entre 90 et 130 mm; ils ont été récoltés en plongée sous-marine à Percé (Québec, Canada) entre le 25 octobre et le 1^{er} novembre 1999, à une profondeur comprise entre 27 et 33 m. Ces individus ont été maintenus en eau brute à température ambiante au Centre aquacole marin de Grande-Rivière jusqu'au 14 février 2000. Par la suite, les individus ont été conditionnés à 12 °C et 28 ppm selon les trois régimes alimentaires A, B et C (voir page 6). Cinquante-quatre géniteurs étaient conditionnés pour chaque diète. Les géniteurs étaient placés en bassins de 1,13 x 0,58 x 0,15 m. Vingt-sept bassins étaient répartis en deux rangées. Chaque bassin était alimenté en eau et possédait un drain indépendant. Des pompes péristaltiques fournissaient les diètes en continu dans les lignes d'alimentation d'eau des bassins à un ratio de 0,75 % de la masse sèche par pétoncle. À l'issue de la période de conditionnement de 16 semaines, trois à cinq géniteurs de chaque groupe étaient induits à pondre.

Suivi du conditionnement

L'examen des gonades de trois mâles et de trois femelles était effectué au début, au milieu et à la fin du conditionnement. Nous avons déterminé leur niveau de maturité selon une échelle comprise entre I et V (Desrosiers

et Dubé 1993, Tableau 5). Enfin, des échantillons de gonade étaient prélevés en vue de la détermination des classes de lipides. La qualité des gonades était évaluée individuellement pour chaque femelle par un rapport de TAG/ST, déterminé par Iatroskan MK-V.

Fécondité, fertilité et qualité des œufs émis

La fécondité est la quantité d'œufs produits par une femelle. Elle était estimée par cinq décomptes successifs. L'estimation de la fertilité était basée sur le nombre de larves-D produites à partir du nombre d'œufs émis (Salaün, 1994 dans Le Pennec *et al.*, 1998). La qualité des œufs était évaluée pour chaque femelle par un rapport de TAG/ST, déterminé par Iatroskan MK-V.

Élevage larvaire

Nous avons élevé des larves obtenues des géniteurs matures prélevés en milieu naturel. Afin d'accroître les probabilités d'observer des différences de qualité dans les gonades, les géniteurs issus du milieu naturel provenaient de deux sites : les Îles-de-la-Madeleine (Chaîne-de-la-Passe) et la Gaspésie (Percé). De plus, les géniteurs de la Gaspésie ont été capturés à deux périodes, le 27 juillet et le 11 septembre 2000. La ponte était induite le 17 juillet 2000 pour les géniteurs provenant des Îles-de-la-Madeleine. Après la ponte, les géniteurs étaient sacrifiés afin de déterminer la composition lipidique des sections de gonades encore pleines. Les larves étaient nourries avec le régime alimentaire A, préalablement décrit (cf. qualité des micro-algues). Chaque combinaison de traitement était en triplicata.

Qualité, survie et taux de croissance

Nous avons prélevé des larves aux jours 4, 8, 13 et 20 après la fécondation. La survie larvaire était évaluée dans chaque bassin durant toute la durée de l'expérience. Le comptage des larves contenues dans un sous-échantillon de volume connu, prélevé en triplicata directement du milieu de culture a été complété. Enfin, le taux de croissance des larves était calculé à partir de la longueur de la coquille de 30 individus.

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez le pétoncle géant *Placocecten magellanicus* (adapté de Desrosiers et Dubé, 1993).

Stade	Aspect des gonades	Canal alimentaire	Couleur des gonades
I Indifférencié	Petites, contractées et molles.	Visible.	Translucides, brunâtres ou grisâtres.
II En différenciation	Plus grosses, mais molles et angulaires.	Peu visible.	Testicules faiblement blanchâtres et ovaires orange très pâle.
III En développement	Nette augmentation de la taille, mais molles car contenant de l'eau. Artères visibles.	Seulement la boucle visible.	Testicules blancs, ovaires orangés.
IV En maturation	Plus grandes et plus fermes, car elles ont peu d'eau, les extrémités pointent, aspects granuleux.	Boucle difficile à voir.	Testicules blanc crème, ovaires orange.
V Mature	Tailles maximales, fermes et sans eau. Surfaces luisantes et uniformes artères bien visibles et induisant des sillons.	Boucle invisible.	Testicules blancs crèmes et ovaires orange vif.

Résultats

Extraction des lipides

Effets des trois traitements d'extraction et de la quantité d'algues filtrées.

Le coefficient de variation moyen pour chaque classe de lipides était de 21 %. Pour les lipides totaux obtenus par sommation des différentes classes de lipides, le coefficient de variation moyen était de 12 %. Lors des extractions lipidiques réalisées sur la diatomée *C. muelleri* récoltée sur filtre, nous avons observé que les trois traitements, soit l'ultrasonication, le broyage ou la combinaison des deux n'avaient pas d'effet sur les mesures de composition relative des classes de lipides quelle que soit la quantité d'algues filtrées (Tableau 6). En revanche, nous avons observé un effet significatif sur la composition relative de quelques classes de lipides chez *I. galbana* entre le traitement d'ultrasonication et le traitement d'ultrasonication combiné au broyage (Figure 3). Lors de l'extraction, le broyage du filtre combiné à l'ultrasonication a entraîné une augmentation de la quantité de triglycérides (TAG), d'acides gras libres (FFA) et de pigments (AMPL).

Effets de la durée d'entreposage

L'efficacité de l'extraction, exprimée par la quantité de chaque classe de lipides obtenue, était inférieure lorsque les échantillons de *C. muelleri* étaient conservés pour une période de six mois (Tableau 7). Cette diminution de la masse lipidique était observée sur toutes les classes de lipides, quelle que soit la quantité d'algues filtrées sauf pour les acides gras libres (FFA) où une augmentation importante était observée. Toutefois, un entreposage

Tableau 6 : Abondances relatives des classes de lipides contenus dans la micro-algue *Chaetoceros muelleri* en fonction du traitement appliqué à l'extraction (ultrasonication, S; broyage, B; et ultrasonication+broyage).

Qt	Données	S+B	B	S
5	TAG	35,1 ± 2,7	38,7 ± 1,7	37,0 ± 3,1
	FFA	10,2 ± 3,8	12,1 ± 4,4	12,8 ± 4,3
	ST	8,4 ± 1,7	8,94 ± 1,9	7,9 ± 1,7
	PL	22,6 ± 5,4	30,2 ± 11,1	21,6 ± 12,8
	Total (µg)	4,2	4,6	4,2
10	TAG	43,8 ± 2,5	43,9 ± 1,1	46,3 ± 5,3
	FFA	7,2 ± 1,7	7,2 ± 4,2	8,5 ± 4,2
	ST	5,3 ± 0,5	5,9 ± 1,0	5,3 ± 0,7
	PL	23,1 ± 9,4	29,3 ± 10,1	28,7 ± 14,7
	Total (µg)	7,7	8,45	8,48
15	TAG	53,2 ± 5,8	50,2 ± 1,2	49,5 ± 2,3
	FFA	7,6 ± 3,7	7,8 ± 1,2	8,3 ± 3,5
	ST	5,1 ± 0,8	4,6 ± 0,6	4,6 ± 0,9
	%PL	30,7 ± 20,5	19,1 ± 6,5	19,4 ± 5,8
	Total (µg)	11,9	11,7	12,5

de 30 jours n'a eu aucun effet sur la quantité de lipides extraits, indépendamment de la classe de lipides et de la quantité d'algues filtrées (Tableau 7).

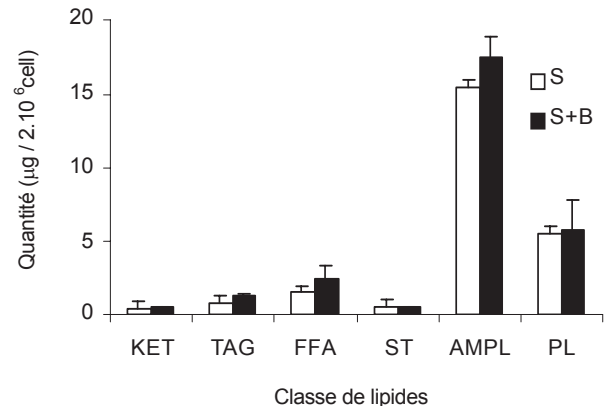


Figure 3 : Quantité des différentes classes de lipides (KET : cétone; TAG : triglycéride; FFA : acide gras; ST : stérol; AMPL : pigment; PL : phospholipide) extraits de la micro-algue *Isochrysis* sp. (± écart-type) en fonction du traitement appliqué (ultrasonication, S; ultrasonication+broyage, S+B)

Tableau 7 : Quantité en mg des différentes classes de lipides contenues dans la micro-algue *Chaetoceros muelleri* (•10⁶ cells) en fonction de la durée d'entreposage (en jour) et du volume de culture filtré (en mL) après un traitement aux ultrasons et un broyage manuel.

Volume ml	Classes de lipides	Temps (jour)					
		1-3		28-31		180-183	
		Moy	Ec	Moy	Ec	Moy	Ec
5	TAG	1,04	0,10	1,06	0,17	1,08	0,11
	FFA	0,35	0,14	0,28	0,08	2,38	1,12
	ST	0,29	0,07	0,38	0,25	0,49	0,10
	PL	2,63	0,30	0,97	0,37	1,18	0,12
	Total	5,09	0,34	4,14	1,06	7,58	1,50
10	TAG	3,24	0,63	3,64	0,18	3,04	0,38
	FFA	0,45	0,12	0,36	0,08	4,17	1,62
	ST	0,33	0,04	0,34	0,07	0,80	0,26
	PL	2,72	0,27	2,12	0,25	1,91	0,05
	Total	8,36	1,67	8,94	1,18	13,39	2,56
15	TAG	6,29	0,56	6,98	0,97	5,69	0,25
	FFA	0,69	0,35	0,66	0,13	7,06	4,39
	ST	0,48	0,12	0,43	0,10	1,18	0,17
	PL	3,39	0,67	3,17	0,85	2,78	0,25
	Total	13,98	2,32	14,61	3,66	23,11	5,34

Qualité des micro-algues

Caractérisation des régimes alimentaires

Les régimes A, B et C échantillonnés dans les bassins de mélange servant de nourriture aux géniteurs ne présentaient pas de différences du point de vue de la composition en classes de lipides (Figure 4). Bien que nous

avons noté un enrichissement de la diète A en triglycéride (TAG), celui-ci n'était pas significatif. Toutefois, il est intéressant de noter que la variabilité temporelle du contenu en TAG de la diète A mesurée sur 16 semaines de culture était nettement supérieure à la variabilité en TAG observée pour les diètes B et C (Figure 4).

Suivis des cultures

Quel que soit le volume de culture, la composition lipidique de l'algue *I. galbana* est demeurée constante (Figure 5). Nous avons observé que cette algue était essentiellement constituée de phospholipides. En revanche, lorsque l'on considère la diatomée *C. muelleri*, la composition lipidique est très variable selon le volume de culture (Figure 6). Aucune variation n'était observée du côté des stérols (ST) pour tous les volumes de cultures et les valeurs en triglycérides (TAG), en acides gras libres (FFA) et en phospholipides (PL) étaient similaires entre les volumes de 0,125 L et de 0,500 L et entre les volumes de 15 et de 200 L. Toutefois, une diminution importante des TAG et des FFA s'est produite lorsque les cultures ont passé des volumes de 0,5 L aux volumes de 15 L et de 200 L. Ces diminutions étaient concomitantes avec une augmentation du contenu en PL.

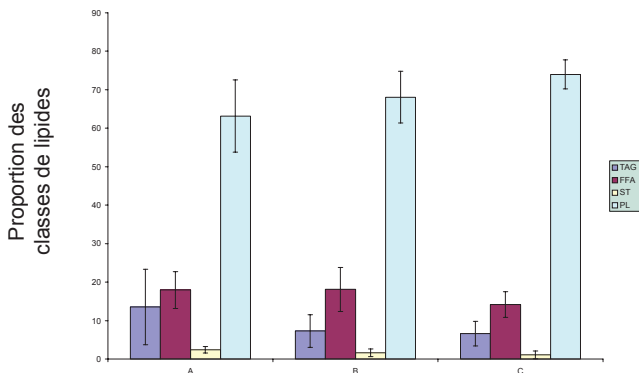


Figure 4 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits des régimes alimentaires A, B et C (TAG : triglycéride; FFA : acide gras; ST : stérol; PL : phospholipide).

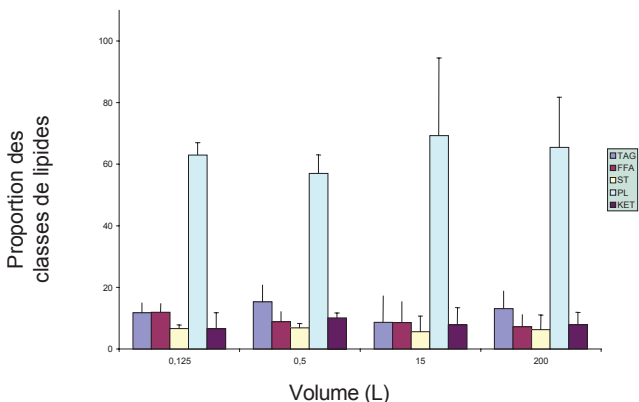


Figure 5 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits de la micro-algue *Isochrysis* sp. en fonction du volume de culture (TAG : triglycéride; FFA : acide gras; ST : stérol; PL : phospholipide; KET : cétone).

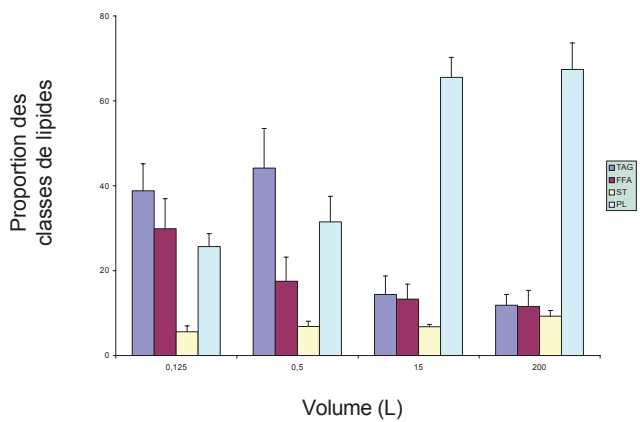


Figure 6 : Abondance relative des différentes classes de lipides extraits de la micro-algue *Chaetoceros muelleri* en fonction du volume de culture (TAG : triglycéride; FFA : acide gras; ST : stérol; PL : phospholipide)

Conditionnement des géniteurs

Suivi du conditionnement

Après quatre mois de conditionnement, la maturation des gonades était insuffisante pour déclencher des pontes massives, quel que soit le régime alimentaire. En effet, nous avons observé une maturation incomplète des gonades. Cette maturation semblait toutefois suffisante pour qu'on puisse noter des différences au plan de la qualité des gonades, évaluée en termes de ratio triglycérides/stérol (Figure 7).

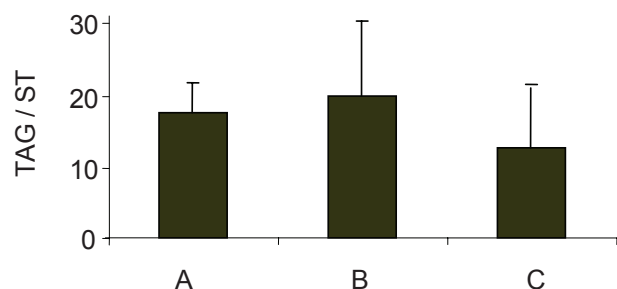


Figure 7 : Valeur du ratio triglycérides (TAG)/cholestérol (ST) dans les gonades des géniteurs conditionnés selon les régimes alimentaires A, B et C.

Fécondité, fertilité et qualité des œufs émis

Devant l'insuccès des pontes avec les géniteurs conditionnés, nous avons utilisé des géniteurs matures provenant du milieu naturel. Les pontes ont été réalisées le même jour que la récolte, soit le 17 juillet, le 27 juillet et le 11 septembre. L'indice visuel indiquait que les pétoncles récoltés les 17 et 27 juillet étaient matures (indice V) alors que ceux du 11 septembre avaient commencé la résorption de leurs gonades. La qualité des gonades lors des trois séries de pontes étaient différentes selon le ratio TAG/ST. Nous avons observé que la qualité des gonades des géniteurs provenant de la ponte du 27 juillet était supérieure à celle du 11 septembre. Ces différences se sont reflétées dans la qualité des œufs

produits (Figure 8). En effet, nous avons observé que la qualité des œufs en terme de ratio TAG/ST provenant de la ponte du 27 juillet était supérieure à la celle de la ponte du 11 septembre.

Élevage larvaire

Qualité, survie et taux de croissance

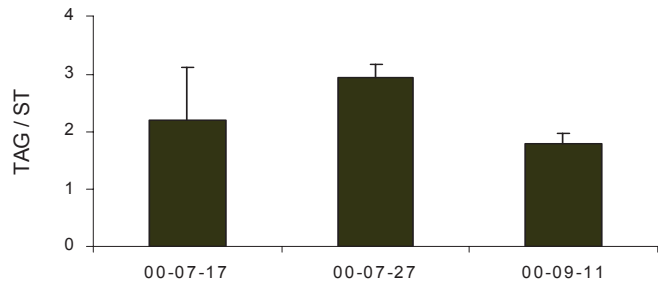


Figure 8 : Valeur du ratio triglycérides (TAG)/cholestérol (ST) dans les œufs émis par les géniteurs prélevés du milieu naturel aux Îles-de-la-Madeleine (17 juil.) et en Gaspésie (27 juil. et 11 sept.)

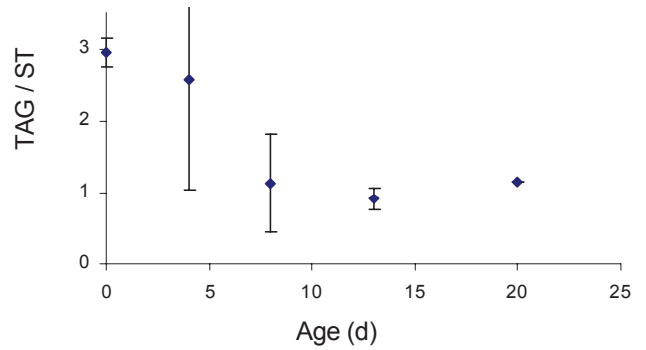


Figure 10 : Rapport triglycéride (TAG)/cholestérol (ST) en fonction de l'âge des larves émises par les géniteurs prélevés du milieu naturel en Gaspésie (27 juil.).

Les pontes du 17 juillet, du 27 juillet et du 11 septembre ont donné naissance à des populations de larves qui ont survécu respectivement 8, 20 et 4 jours (Figure 9). De plus, nous avons observé, pour la ponte du 27 juillet (celle dont les larves ont survécu plus longtemps) que la qualité des larves exprimée par le ratio TAG/ST diminuait avec l'âge de celles-ci (Figure 10).

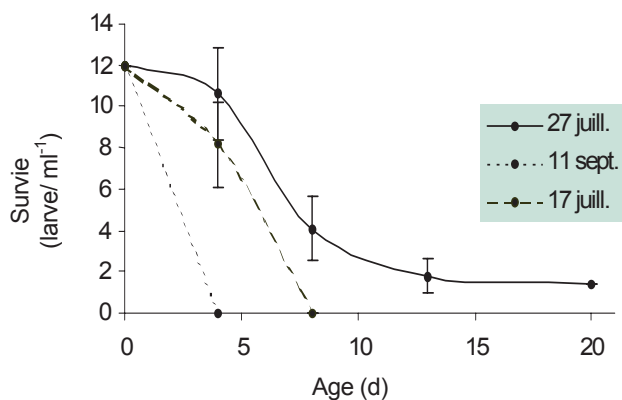


Figure 9 : Survie des larves émises par les géniteurs prélevés du milieu naturel aux Îles-de-la-Madeleine (17 juil.) et en Gaspésie (27 juil. et 11 sept.) au cours du temps (\pm écart-type).

Discussion

Extraction des lipides

La récolte d'organismes microscopiques aquatiques à des concentrations importantes et avec une quantité d'eau réduite au maximum entraîne certaines difficultés. Nous avons retenu une solution très simple pour la récolte d'algues, d'œufs et de larves soit la filtration. Toutefois, la présence d'un filtre peut-elle réduire la capacité d'extraction des lipides? Nous pouvons remarquer dans la littérature que deux méthodes sont largement utilisées pour l'extraction de lipides d'organismes ayant été filtrés, soit l'ultrasonication et le broyage par l'utilisation d'un homogénéisateur (Parish, 1987; Volkman *et al.*, 1989; 1993; Dunstan *et al.*, 1992, 1993; Parish *et al.*, 1998). Bien que ces traitements soient couramment employés, leurs effets potentiels sur l'efficacité d'extraction lipidique n'ont jamais été documentés. Nos travaux démontrent clairement un effet de ces traitements en fonction de l'espèce d'algue considérée. L'utilisation combinée des deux techniques permet une meilleure extraction de certaines classes de lipides chez *I. galbana*. Sur cette algue, nous observons que l'ultrasonication seule, telle qu'utilisée par Volkman *et al.* (1989; 1993), sous-estime la proportion de certaines classes de lipides telles que les triglycérides, les acides gras libre et les AMPL sans influencer sur les autres telles que les cétones, les stéroïdes et les phospholipides. Toutefois, il est intéressant de noter que sur la diatomée *C. muelleri*, les techniques d'extraction de lipides donnent toutes le même rendement pour l'ensemble des classes de lipides. Nous avons démontré également qu'une conservation de longue durée (six mois) a un impact sur la quantité de lipides extraits pour l'ensemble des classes de lipides. Une extraction avec moins de 30 jours de conservation n'a aucun impact sur les proportions de classes de lipides et la quantité totale de lipides extraits.

Qualité des micro-algues

Nos résultats démontrent que l'élevage semi-continu de micro-algues entraînent de la variabilité dans la structure lipidique de *C. muelleri* sans toutefois que l'on observe le même phénomène chez *I. galbana*. Lors du passage des volumes de culture inférieurs à 0,5 L aux volumes plus grands de 15 L et de 200 L, nous observons une baisse marquée de triglycérides et d'acides gras libres compensée par une hausse de phospholipides. Cette perte de TAG chez *C. muelleri* pourrait être associée au volume de culture, à l'addition de silicate ou à la présence de CO₂. Parrish et Wangersky (1990) ont démontré que lorsque cette espèce de diatomée éprouve un manque en azote ou en lumière, la composition en TAG augmente. Ce phénomène est également observé lorsque cette algue est maintenue à très haute densité. Dans ce dernier cas, cela est expliqué par le fait que la division cellulaire est interrompue et que les

micro-algues emmagasinent des TAG. Ainsi, l'augmentation des TAG semble être une réponse biochimique indirecte à des conditions environnementales stressantes. Le niveau élevé de TAG dans les cultures de 0,125 L et de 0,5 L observé ici pourrait s'expliquer par le maintien de conditions environnementales défavorables pour les algues (carence en Si, CO₂ faible et pH élevé).

Le manque de concordance dans la structure lipidique de nos trois diètes par rapport aux valeurs théoriques élaborées avec les données de Volkman *et al.* (1989) est lié directement à la structure lipidique de *C. muelleri* observé dans les « kawals » de 200 L qui ont servi à remplir les bassins de mélange. En effet, comparativement aux valeurs de Volkman *et al.* (1989), la culture de *C. muelleri* utilisée pour le mélange des diètes avait un contenu en TAG beaucoup plus faible. Nous suggérons que cette différence serait reliée à l'un des facteurs inhérents à l'augmentation de volume des cultures : ajout de silicate, de CO₂ ou baisse du pH. En effet, nous avons utilisé des algues cultivées en volume de 200 L pour caractériser les diètes alors que Volkman *et al.* (1989) avaient caractérisé *C. muelleri* dans des volumes beaucoup plus petits.

Conditionnement des géniteurs et nutrition larvaire

L'échantillonnage visait à mettre l'accent sur l'embryogenèse et la métamorphose puisqu'il s'agit de deux phases endotrophes pendant lesquelles la qualité du conditionnement et de l'alimentation des larves est la plus critique. En effet, les œufs et les larves pédivéligères (le stade précédant la métamorphose) doivent accumuler de grandes quantités d'énergie afin que l'embryogenèse et la métamorphose soient complétées avec succès. Chez la plupart des larves d'organismes marins, les lipides neutres comme les TAG sont la première réserve énergétique endogène utilisée pour le métabolisme (Gallager *et al.*, 1986; Ouellet et Taggart, 1992; Whyte *et al.*, 1987). Ainsi, ils sont un bon indicateur de la viabilité et plus particulièrement de la capacité des larves à survivre aux phases critiques comme l'embryogenèse et la métamorphose, pendant lesquelles elles reposent sur les réserves endogènes de nourriture.

En utilisant les stéroïdes comme indice pondéral tel que décrit par Fraser (1989), nous avons observé des différences dans la qualité des gonades qui ont servi aux trois pontes. Ces différences se sont reflétées dans la qualité des œufs relâchés qui à leur tour ont contribué à la survie larvaire. Plus le ratio TAG/ST était élevé dans les gonades, les œufs et les larves, meilleure était la survie larvaire. Cependant, aucun de nos élevages larvaires n'a atteint la métamorphose. Le ratio TAG/ST diminuait également avec l'âge des larves, témoignant de larves élevées dans des conditions de stress et en

mauvaise condition physiologique (Fraser, 1989). Nous suggérons que le volume des bassins utilisé pour la culture des larves (15 L) était trop petit pour les besoins des larves de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus*. Les élevages qui ont du succès avec cette espèce utilisent des bassins de 1 000 L. Il est possible que des volumes de 15 L permettent un contact trop grand des larves avec les parois des bassins et le biofilm bactérien qui s'y développe. Contrairement aux larves de moule bleue, *Mytilus edulis*, dont l'élevage peut se réaliser dans des volumes aussi petits qu'un litre (Qiu *et al.*, 2002), les larves de pétoncle géant semblent plus sensibles aux volumes de culture.

Conclusion

Nos résultats ont permis de conclure que la meilleure façon de s'assurer d'une extraction efficace de lipides est de combiner broyage et ultrasonication. Nous suggérons également qu'en « stressant » les cultures de *Chaetoceros muelleri* par une carence en silicate ou en CO₂, il pourrait être possible d'obtenir une culture d'algues enrichies en triglycérides. Finalement, cette étude semble établir une relation entre qualité des gonades, qualité des œufs et survie larvaire tel que le montre le ratio TAG/ST. Nous avons donc de bons indices de croire que ce ratio ouvre des voies intéressantes pour les pratiques en éclosion comme indicateur de survie larvaire. Toutefois, des études plus approfondies doivent être entreprises pour valider cet indicateur de qualité.

Remerciements

Nous désirons remercier M^{me} Suzanne Bourget du CAMGR pour la production d'algues, M^{me} Sonia Belvin (entente MAPAQ-UQAR) pour son aide durant l'élevage larvaire et finalement toute l'équipe système du CAMGR pour nous avoir permis de réaliser ce projet. Celui-ci était financé par une subvention du CORPAQ et une subvention « Technopole Maritime » octroyées au professeur Edwin Bourget et au docteur Réjean Tremblay.

Références

Ackman, R. G. (1981). Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *General analytical methods*. A. press: 205-252.

Ackman, R. G., C. A. McLeod, A. K. Banerjee (1990). "An overview of analyses by Chromarod-latroscan TLC-FID." *Journal of Planar Chromatography* 3: 450-490.

Barber, B. J., N. J. Blake (1991). *Reproductive physiology. Scallops: Biology, ecology and aquaculture*. S. E. Shumway. Amsterdam, Elsevier. 21: 377-428.

Bayne, B. L. (1965). "Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.)." *Ophelia* 2: 1-47.

Bell, M. V., J. R. Sargent (1996). "Lipid nutrition and fish recruitment." *Marine Ecology - Progress Series* 134: 315-316.

Bergeron, J. P., J. P. Ruyet, Le, C. Koutsikopoulos (1997). "Use of carbon rather than dry weight to assess the DNA content and nutritional condition index of sole larvae." *ICES Journal of Marine Science* 54(1): 148-151.

Berntsson, K. M., P. R. Jonsson, S. A. Wänberg, A. S. Carlsson (1997). "Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the european flat oyster, *Ostrea edulis*." *Aquaculture* 154: 139-153.

Bourne, N., C. A. Hodgson, J. N. C. Whyte (1989). *A manual for scallop culture in British Columbia*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, Department of Fisheries and Oceans.

Bricelj, V. M., S. E. Shumway (1991). *Physiology: energy acquisition and utilisation. Scallops: Biology, ecology and aquaculture*. S. E. Shumway. Amsterdam, Elsevier. 21: 305-346.

Brown, M. R. (1991). "The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145(1): 79-100.

Buckley, L. J. (1984). "RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea." *Marine Biology* 80: 291-298.

Buckley, L. J., R. G. Lough (1987). "Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges bank." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44: 14-25.

Budge, S. M., C. C. Parrish, R. J. Thompson, C. H. McKenzie (1998). "Essential fatty acids in plankton from cold ocean coastal environments." *Bulletin of the aquaculture association of Canada* 2: 56-58.

Bulow, F. J. (1987). *RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. Age and growth of fish*. R. C. Summerfelt et G. E. Hall, Iowa state University Press: 45-64.

Caers, M., P. Coutteau, K. Cure, V. Morales, G. Gajardo, P. Sorgeloos (1999). "The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet." *Comparative Biochemistry and Physiology* 123: 97-103.

Clemmesen, C., T. Doan (1996). "Does otolith structure reflect the nutritional condition of a fish larvae? Comparison of otolith structure and biochemical index (RNA/DNA ratio) determined on cod larvae." *Marine Ecology - Progress Series* 138: 33-39.

Couturier, C., P. Dabinett, M. Lanteigne (1995). *Scallop culture in Atlantic Canada. Cold-water aquaculture in Atlantic Canada*. A. D. Boghen. Moncton, The Canadian institute for research on regional development: 297-340.

Culliney, J. L. (1974). "Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin)." *Biological Bulletin* 147: 321-332.

Davis, M. W., B. L. Olla (1992). "Comparison of growth, behavior and lipid concentrations of walleye pollock *Theragra chalcogramma* larvae fed lipid-enriched, lipid deficient and field-collected prey." *Marine Ecology - Progress Series* 90: 23-30.

Delaunay, F. (1992). *Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire*. Océanologie biologique. Brest, Brest: 192.

Delaunay, F., Y. Marty, J. Moal, J.-F. Samain (1992). "Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 163: 209-219.

Delaunay, F., Y. Marty, J. Moal, J.-F. Samain (1993). "The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 173: 163-179.

Desrosier, R. R., F. Dubé (1993). "Flowing seawater as an inducer of spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791)." *Journal of Shellfish Research* 12(2): 263-265.

- Desrosiers, R. R., J. Désilets, F. Dubé (1996). "Early developmental events following fertilization in the giant scallop *Placopecten magellanicus*." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 1382-1392.
- Desrosiers, R. R., F. Dubé (1993). Rôle de la température et de la nutrition sur la maturation des gonades chez le pétoncle géant *Placopecten magellanicus*. Rimouski, Fondation de l'Université du Québec à Rimouski.
- Devauchelle, N., C. Mingant (1991). "Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture." Aquatic Living Resources 4: 41-51.
- Dorange, G., M. Le Penne (1989). "Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieux." Marine Biology, 103: 339-348.
- Dunstan, G. A., J. K. Volkman, S. M. Barrett, C. D. Garland (1993). "Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture." Journal of Applied Phycology 5(1): 71-83.
- Dunstan, G. A., J. K. Volkman, S. W. Jeffrey, S. M. Barrett (1992). "Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae: 2. Lipid classes and fatty acids." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 161(1): 115-134.
- Dwiono, S. A. P., M. Diouris, M. Le Penne, J.-F. Samain, J.-C. Cochard (1991). Some biochemical and nutritional aspects of the metamorphosis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). 8th International pectinid workshop, Cherbourg (France).
- Enright, C. T., G. F. Newkirk, J. S. Craigie, J. D. Castell (1986). "Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 96: 1-13.
- Folch, J., M. Lees, G. H. Sloane-Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". J. Biol. Chem., 226, 497.
- Fraser, A. J. (1989). "Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 46(11): 1868-1873.
- Fraser, A. J., D. R. Tocher, J. R. Sargent (1985). "Thin-layer chromatography - Flame ionization detection and the quantitation of marine neutral lipids and phospholipids." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 88: 91-99.
- Gallager, S. M., R. Mann (1981). "Use of lipid-specific staining techniques for as-saying condition in cultured bivalve larvae." Journal of Shellfish Research 1(1): 69-73.
- Gallager, S. M., R. Mann, G. C. Sasaki (1986). "Lipid as an Index of growth and viability in three species of bivalve larvae." Aquaculture 56: 81-103.
- Gallager, S. M., D. K. Stoeckert, V. M. Bricelj (1989). Effects of brown tide alga on growth, feeding, physiology and locomotory behavior of scallop larvae (*Argopecten irradians*). A novel phytoplankton bloom. Causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms, Lectures notes on coastal and estuarine studies. E. M. Cosper, V. M. Bricelj et E. J. Carpenter. New-York, Springer-Verlag: 551-542.
- Gallager, S. M., J. Waterbury, D. K. Stoeckert (1988). Efficient capture, ingestion and assimilation of *Synechococcus* sp. by larvae of marine bivalve molluscs. AGU/ASLO winter meeting.
- Hakanson, J. L. (1989). "Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*." Marine Biology 102: 143-151.
- Hakanson, J. L. (1989). "Condition of larval anchovy (*Engraulis mordax*) in the southern California bight, as measured through lipid analysis." Marine Biology 102: 153-159.
- Hakanson, J. L., S. H. Coombs, P. Re (1994). "Lipid and elemental composition of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae at mixed and stratified sites in the German Bight of the North Sea." ICES Journal of Marine Science 51(2): 147-154.
- Holden, M. J., G. W. Patterson (1991). "Absence of sterol biosynthesis in oyster tissue culture." Lipids 26: 81-82.
- Holland, D. L., B. E. Spencer (1973). "Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth." Journal of Marine Biology Ass. U.K. 53: 287-298.
- Hovenkamp, F., J. I. Witte (1991). "Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the north sea 1987 to 1989." Marine Ecology - Progress Series 70: 105-116.
- Innis, S. M., M. T. Clandinin (1981). "Separation of phospholipids on chromarods." Journal of Chromatography 205: 490-492.
- Labarta, U., M. J. Fernandez-Reiriz, A. Rézecz-Camacho (1999). "Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 218: 225-242.
- Langdon, C. J., M. J. Waldock (1981). "The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat." Journal of Marine Bio-logy Ass. U.K. 61: 431-448.
- Le Penne, M., C. Rangel-Davalos (1985). "Observation en microscopie à epifluo-rescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez les jeunes lar-ves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia)." Aquaculture 47: 39-51.
- Le Penne, M., R. Robert, M. Avendano (1998). "The importance of gonadal de-velopment on larval production in pectinids." Journal of Shellfish Research 17(1): 97-101.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox (1993). Lipids. Principles of Biochemistry. I. Worth publisher. New York, Worth publisher, Inc.: 240-266.
- Lochmann, E., L. Maillet Gary, T. Frank Kenneth, T. Taggart Christopher (1995). "Lipid class composition as a measure of nutritional condition in individual larval Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52(6): 1294-1306.
- Lora-Vilchis, M. C., A. N. Maeda-Martinez (1997). "Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with tem microalgae species." Aquaculture Research 28: 905-910.
- Lu, Y. T., N. J. Blake (1997). "Clearance and ingestion rates of *Isochrysis galbana* by larval and juvenile bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* (Say)." Journal of Shellfish Research 16(1): 47-54.
- Lucas, A., P. G. Beninger (1985). "The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture." Aquaculture 44: 187-200.
- Lucas, A., L. Chebab-Chalabi, P. Beninger (1986). "Variation of relative organic matter in *Mytilus edulia* L. larvae and postlarvae." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 95: 99-103.
- Lucas, M. I., G. Walker, D. L. Holland, D. J. Crisp (1979). "An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of *Balanus balanoides* (Crustacea: Cirripedia)." Marine Biology 55: 221-229.
- Martinez, G., L. Mettifogo (1998). "Mobilization of energy from adductor muscle for gametogenesis of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck." Journal of Shellfish Research 17(1): 113-116.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal, J.-F. Samain (1992). "Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 163: 221-234.

- Massapina, C., S. Joaquim, D. Matias, N. Devauchelle (1999). "Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal." *Aquatic Living Resources* 12(5): 327 - 333.
- McFadzen, I. R. B., S. H. Combs, N. C. Halliday (1997). "Histological indices of the nutritional condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum) larvae off the north coast of Spain." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 212: 239_258.
- Miron, G., B. Boudreau, E. Bourget (1999). "Intertidal barnacle distribution: a case study using multiple working hypotheses." *Marine Ecology Progress Series* 189: 205 - 219.
- Møhlenberg, F., H. U. Riisgard (1978). "Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves." *Ophelia* 17(2): 239-246.
- Napolitano, G. E., B. A. MacDonald, R. J. Thompson et R. G. Ackman (1992). "Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats." *Marine Biology* 113: 71-76.
- Napolitano, G. E., W. M. N. Ratnayake, R. G. Ackman (1988). "Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve." *Comparative Biochemistry and Physiology* 90B(4): 875-883.
- Olivier, F., R. Tremblay, E. Bourget, D. Rittschof. "Barnacle settlement: field experiments on the influence of larval supply, tidal level, biofilm quality and age of *Balanus amphitrite* (Darwin) cyprids." *Marine Biology* (sous presse).
- Ouellet, P., T. Taggart Christopher, T. Frank Kenneth (1995). "Early growth, lipid composition, and survival expectations of shrimp *Pandalus borealis* larvae in the northern Gulf of St. Lawrence." *Marine Ecology Progress Series* 126(1-3): 163-175.
- Ouellet, P., C. T. Taggart (1992). "Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 369-378.
- Parrish, C. C. "Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples."
- Parrish, C. C. (1987). "Separation of Aquatic Lipid Classes by Chromatod Thin-Layer Chromatography with measurement by latroscan Flame Ionization Detection." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44: 722-731.
- Parrish, C. C., P. J. Wangersky (1990). "Growth and lipid class composition of the marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, in laboratory and mass culture turbidostats." *Journal of Plankton Research* 12(5): 1011-1022.
- Parrish, C. C., J. S. Wells, Z. Yang, P. Dabinett (1998). "Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*." *Marine Biology* 133: 461-471.
- Qiu J.-W., R. Tremblay, E. Bourget (2002). "Comparative ontogenetic changes in hyposaline tolerance in mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*: implications for distribution". Sous presse dans *Marine Ecology Progress Series* 228:143-152.
- Raae, A. J., I. Opstad, P. Kvenseth, B. T. Walther (1988). "RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L.) larvae." *Aquaculture* 73: 247-259.
- Racotta, I.S., J.L. Ramirez, S. Avila, A.M. Ibarra (1998). "Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems". *Aquaculture* 163: 111-122.
- Samain, J.-F., C. Séguineau, J.-C. Cochard, F. Delaunay, J.-L. Nicolas, Y. Marty, R. Galois, M. Mathieu, J. Moal (1992). "What about growth variability for *Pecten maximus* production?" *Océanis* 18(1): 49-66.
- Sargent, J. R. (1976). The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. *Biochemical and biophysical perspectives in marine Biology*. D. C. Malins et J. R. Sargent. New-York, Academic Press. 3: 149-212.
- Sargent, J. R. (1995). Broodstock management and egg and larval quality. N. R. Bromage et R. J. Roberts. Cambridge, Blackwell science: 353-372.
- Seguineau, C., A. Lashie-Loquerie, M. Leclercq, J.-F. Samain, J. Moal, V. Fayot (1993). "Vitamin transfer from algal diet to *Pecten maximus* larvae." *Journal of Marine Biotechnology* 1: 67-71.
- Shumway, S.E., R. Seluin et D.F. Shick. (1987) Foud ressources related to habitat in the scallop, *Placopecten magellanicus*, (Gmelin,1791): A qualitative study. *Journal of shellfish Research*.89-95
- Soudant, P. (1995). Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). relation avec la nutrition. *Océanologie biologique*. Brest.
- Soudant, P., Y. Marty, J. Moal, R. Robert, C. Quéré, J. R. Le Coz, J. F. Samain (1996). "Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process." *Aquaculture* 143: 361-378.
- Utting, S. D., P. F. Millican (1997). "Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability." *Aquaculture* 155: 45-54.
- Utting, S. D., P. F. Millican (1998). "The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review." *Aquaculture* 165: 167-178.
- Videla, J. A., O. R. Chaparro, R. J. Thompson, I. I. Concha (1998). "Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early juvenile development of the oyster *Ostrea chilensis*".
- Volkman, J. K., M. R. Brown, G. A. Dunstan, S. W. Jeffrey (1993). "The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae." *Journal of Phycology* 29(1): 69-78.
- Volkman, J. K., S. W. Jeffrey, P. D. Nichols, G. I. Rogers, C. D. Garland (1989). "Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128: 219-240.
- Watanabe, T. (1982). "Lipid nutrition in fish." *Comparative Biochemistry and Physiology* 73B(1): 3-15.
- Webb, K. L., F.-L. E. Chu (1983). Phytoplankton as food source for bivalve larvae. *Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*. G. D. Pruder, C. J. Langdon et D. E. Conklin. Baton rouge: 272-291.
- Whyte, J. N. C., N. Bourne, N. G. Ginther (1991). "Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay)." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 149(1): 67-80.
- Whyte, J. N. C., N. Bourne, C. A. Hodgson (1987). "Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 113(2): 113-124.
- Whyte, J. N. C., N. Bourne, C. A. Hodgson (1990). "Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets." *Aquaculture* 86: 25-40.
- Zenitani, H. (1999). "Size-specific changes in amount of lipid and daily growth rate of early larval sardine, *Sardinops melanostictus*, in the main Kuroshio current and its offshore waters off eastern Japan." *Marine Biology* 134(4): 645-652.

Annexe 1 : Techniques d'écloserie

Les élevages larvaires sont réalisés à l'écloserie expérimentale du Centre aquacole marin de Grande-Rivière (48°20'N; 65°30'O), situé en Gaspésie (Québec, Canada)

Culture des micro-algues

Les algues utilisées dans le cadre du projet sont *Chaetoceros muelleri* (anciennement *Chaetoceros gracilis* var. *muelleri*) (synonyme CHGRA) et *Isochrysis* sp. (synonyme TISO). Ces souches proviennent du « Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton » (CCMP). Les algues sont produites selon la méthode semi-continue, en tube « Kawals », dans une chambre à température contrôlée, par l'équipe du Centre aquacole marin de Grande-Rivière.

Conditionnement des géniteurs

Les pétoncles sont captés dans la baie de Percé (48°30'N; 65°15'O) puis transférés au laboratoire pour être nourris avec une diète correspondant à 0,75 % du poids sec des animaux en poids sec d'algues (Utting et Millican, 1998) à une concentration de 55 000 cellules/ml. La qualité de l'eau est assurée par l'arrivée d'eau nouvelle à un débit de 250 ml/min. Les bassins sont inspectés tous les jours et nettoyés, au besoin, à l'aide d'un siphon. La photopériode de 16:8 est assurée par des ampoules incandescentes. L'attribution des diètes et des géniteurs dans chaque bassin est aléatoire.

Induction de la ponte

Après avoir déterminé le niveau de maturité des gonades selon une échelle comprise entre I et V, en fonction de leur aspect, de leur couleur et du degré de recouvrement du canal alimentaire (Desrosiers et Dubé, 1993, Tableau 7, Figure 2), les individus matures sont transférés dans des récipients de 18 L où la ponte est induite par l'élévation de la température à 14 °C et une circulation d'eau alternée (Couturier *et al.*, 1995). Le temps écoulé entre l'induction et la ponte est noté car il s'agit d'un indicateur de la maturité des pétoncles (Utting et Millican, 1998). Seul les gamètes relâchés dans une période d'une heure après la tentative d'induction de la ponte sont conservés. Lorsque la ponte des femelles est achevée, les mâles sont induits de la même façon avec en plus une injection de sérotonine (0,4 ml de 5-hydroxytryptamine à 2 mM) dans la gonade (Desrosiers et Dubé, 1993).

Fécondation

Un ratio de 10:1 (spermatozoïde/œuf) assure une fécondation optimale (Couturier *et al.*, 1995).

Élevage larvaire

Les larves sont élevées dans des récipients cylindriques de 15 L, en circuit fermé, à une densité de 12 larves/ml maintenues à une température variable de 12 à 14 °C par un système de bain-marie. Neuf récipients sont disposés dans des bassins de 1 000 L qui serviront de bain-marie. L'homogénéisation du milieu de culture des larves est assurée par un faible bullage régulier. Les diètes avec lesquelles les larves sont alimentées seront identiques à celles des géniteurs mais les concentrations varient entre 5 000 et 20 000 cellules/ml selon le stade considéré (Bourne *et al.*, 1989). Les larves sont nourries tous les deux jours.

Annexe 2 : Prélèvement des échantillons

Micro-algue

Un volume de 15 ml est prélevé par pompe à vide sur filtre en fibre de verre Watman GF/C (25 mm de diamètre) préalablement nettoyé par un séjour de 24 h au four à 450 °C. Les algues récoltées sont conservées dans une solution de CH₂CL₂-MeOH (2:1; v/v) à -20 °C sous azote jusqu'à l'extraction et le dosage des lipides. Chaque échantillon est prélevé en triplicata.

Gonade

Classes de lipides

Quelque 100 mg de tissu sont prélevés et conservés dans une solution de CH₂CL₂-MeOH (2:1; v/v) à -20 °C sous azote jusqu'à l'extraction et le dosage des lipides. Chaque échantillon est prélevé en triplicata.

Larve et ovocyte

Classes de lipides

Quelque 2 000 larves ou ovocytes sont prélevés sur filtre en fibre de verre Watman GF/C (25 mm de diamètre) préalablement nettoyé par un séjour de 24 h au four à 450 °C. Les larves et ovocytes récoltés sont conservés dans une solution de CH₂CL₂-MeOH (2:1; v/v) à -20 °C sous azote jusqu'à l'extraction et au dosage des lipides. Chaque échantillon est prélevé en triplicata.

Mesure de croissance

Les larves sont concentrées avant d'être déposées dans une solution de formaldéhyde 10 % (v/v). La croissance larvaire est estimée à partir de la longueur de la coquille.

Annexe 3 : Dosage des classes de lipides

Extraction

Les échantillons prélevés sur filtre subissent un traitement aux ultrasons 3×10 min dans un bain de dichlorométhane (CH_2Cl_2)/méthanol (MeOH)(2 : 1; v/v) maintenu à environ 10°C . Ce traitement a pour effet d'extraire les organismes du filtre. Les trois extraits sont ensuite repris pour être broyés avec le filtre. Nous avons ajouté une solution de KCl (0,88 %; p/p) de façon à obtenir un mélange final CH_2Cl_2 -MeOH-KCl (2 : 1 : 1; v/v/v) qui conduit à la formation d'un système biphasique. L'extrait est agité puis centrifugé 2 min à 2 000 g. La phase inférieure contenant les lipides est prélevée par double pipetage alors que la phase supérieure contenant les protéines, les hydrates de carbone et le filtre sont lavés avec du CH_2Cl_2 -MeOH. L'extrait total est évaporé sous azote à température ambiante et les lipides sont suspendus dans 10 à 400 μl de CH_2Cl_2 (selon la quantité de lipides).

Lorsque les échantillons sont prélevés directement du milieu de culture, sans filtration préalable, ils sont préalablement lyophilisés afin d'extraire l'eau, puis hydratés avec 200 μl d'eau ultrapure. Les lipides sont extraits selon la méthode modifiée de Folch *et al.* (1957).

Séparation

Les lipides sont séparés par chromatographie sur couche mince. Le support consiste en baguette de quartz de 150 mm \times 0,9 mm, enrobée de fines particules de silice calibrées à 60 Å. Après avoir déposé un volume de 2 à 8 μl par fraction de 2 μl d'extrait de lipide à l'aide d'une seringue Hamilton (5 μl), les chromarodes sont placées dans des chambres de migration contenant des solvants de polarité connue. Dans le cadre de ces expériences, nous avons employé la méthode de Parrish (1987) pour séparer les lipides neutres et celle de Innis (1981) pour séparer les lipides polaires. Les lipides neutres sont développés deux fois dans un mélange hexane-diethylether-acide formique (99 : 1 : 0,05; v/v/v) pendant 25 min, puis pendant 20 min. Ce développement permet la séparation des acides gras aliphatiques (HC), des ester méthyliques (ME), des cires estérifiées (WE) et des cétones (KET). Après avoir brûlé 80 % des chromarodes, un second développement dans un mélange hexane-diethylether-acide formique (80 : 20 : 0,1; v/v/v) pendant 40 min assure la séparation des TAG, acides gras libres (FFA), ST et diglycérides (DG). Le troisième développement dans 100 % d'acétone permet la migration des lipides mobiles dans l'acétone (AMPL), consistant essentiellement en pigments photosynthétiques. Enfin, le dernier développement dans un mélange chloroforme-méthanol-eau (80 : 30 : 5; v/v/v) permet de séparer les lipides polaires en phosphatidyl-éthanolamine (PE), phosphatidyl-choline (PC), lysophosphatidyl-

éthanolamine (LPE), lysophosphatidyl-choline (LPC), phosphatidyl-inositol (PI), phosphatidyl-sérine (PS) et sphingolipide (SPM). Entre chaque élution, les chromarodes sont séchées 1 min et transférées sur le cadre mobile de l'analyseur.

Quantification

Les classes de lipides sont dosées par l'analyseur Iatroscan Mark-V (Latron Laboratories inc., Tokyo, Japon) par un système de détection par ionisation de flamme (FID). La vitesse de balayage est fixée à 30 sec. chromarode-1, le débit d'air à $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ et le débit d'hydrogène à $160 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($0,9 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$). Le brûlage des chromarodes est partiel (80 %) entre chaque solvant, sauf après la dernière migration où il est complet. Les chromarodes sont préalablement nettoyés par deux balayages successifs à vitesse réduite (60 sec/chromarodes) dans la flamme du brûleur. Par la suite, un balayage des chromarodes avant le dépôt des échantillons est réalisé afin de vérifier qu'elles soient exemptes de contamination.

Les différentes classes de lipides sont identifiées par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standard. Pour chaque série d'analyse, une chromarode est occupée par un extrait de solution standard afin d'identifier les classes de lipides, alors qu'une autre est occupée par un témoin complet. La quantification est assurée par le dépôt d'une solution de standard, renouvelée chaque semaine, dans des gammes de quantité de 0,14 à 2 μg . La réponse du détecteur varie suivant les classes et s'exprime pour chacune d'elle par une fonction linéaire. La reproductibilité est en moyenne de 14 % (coefficient de variation moyen des pentes par classe de lipide).

