



**SODIM**

Société de développement de l'industrie maricole inc.

*Optimisation de la production de juvéniles de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* : effet de l'utilisation des antibiotiques en relation avec la composition lipidique et analyse des stéroïdes dans des microalgues utilisées dans la nutrition des pétoncles*

*Rapport final*

---

*Dossier n° 710.31*

*Rapport commandité par la SODIM*

*Septembre 2005*

**Conseil National de la Recherche Canada**

**Institut des Biosciences Marine**

**Optimisation de la production de juvéniles de Pétoncle géant  
*Placopecten magellanicus* : effet de l'utilisation des  
antibiotiques en relation avec la composition lipidique et  
analyse des stérols dans des microalgues utilisées dans la  
nutrition des pétoncles**

**Rapport final**

Présenté à

Sylvain Lafrance

Directeur

Société de Développement de l'Industrie Maricole (SODIM)

137-3, rue de la reine

Gaspé (Québec) G4X 1T5

De la part de

V. Monica Bricelj (Senior Researcher, IMB/NRC)

Fabrice Pernet (postdoctoral visiting fellow)

Chris C. Parrish (Professeur, Memorial University, NFD)

National Research Council – Institute of Marine Biosciences

1411 Oxford Street, Halifax NS B3H 3Z1

Dans le cadre d'une Entente de services

Entre la SODIM et IMB

Septembre 2005



National Research  
Council Canada

Conseil national  
de recherches Canada

**IMB·IBM**  
Institute for Marine  
Biosciences

## Note

Ce rapport présente les résultats de la recherche conduite à IMB au cours des exercices 2003-2005 visant à améliorer le rendement des élevages larvaires de Pétoncle géant *Placopecten magellanicus*. Dans le cadre de cette recherche, les auteurs se sont intéressés à certains aspects de nutrition larvaire pouvant influencer les patrons de croissance et de survie. Ces aspects ont été décrits dans un précédent rapport d'étape faisant état des activités pour l'exercice 2003-2004. Brièvement, ce travail montre que la microalgue *Pavlova* sp. (souche 459, P459) combiné avec la diatomée *Chaetoceros muelleri* assurent une croissance larvaire et une survie supérieure au régime classique utilisé en éclosion commerciale. Par conséquent, des échantillons de P459 ont été envoyés de IMB à l'éclosion commerciale Pec-Nord Inc. afin d'être testée à l'échelle industrielle. Il semble que les résultats obtenus avec cette espèce de microalgue furent excellent (Côté comm. Pers.). Au cours de la seconde année, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'usage des antibiotiques dans les élevages de Pétoncle géant, en relation avec la composition lipidique des larves. Des groupes de larves ont subi un traitement antibiotique non sélectif (chloramphénicol) à partir de la période pré métamorphique (25 d post-fertilisation, PF) jusqu'à 43 d PF; et la performance et la composition lipidique des larves sont comparées à celles de groupes contrôles non traités. Le chloramphénicol a permis d'obtenir des élevages exempts de *Vibrio*. De plus, les groupes de larves traités aux antibiotiques ont démontrés une survie post-métamorphique 43 d PF de 84% comparée à 43% (par rapport à 25 d PF) pour les groupes non traités. D'autre part, la condition nutritionnelle des larves, évaluée à l'aide de la quantité de triglycéride (TAG) accumulé dans les larves pré-métamorphiques est deux fois supérieure dans les groupes traités vs non traités. En revanche, le succès de métamorphose évalué 43 d PF avec antibiotique est similaire à celui observé sans antibiotique (~9% par rapport à 25 d PF). Nous travaillons actuellement à séparer les lipides neutres et polaires afin d'examiner les profils en acides gras dans les PLs. Ces résultats ont été présentés à l'Association Aquacole du Canada à Québec (AAC 2004). Les deux rapports soumis à la SODIM constituent l'ébauche de deux articles scientifiques :

Pernet, F., V.M. Bricelj and C.C. Parrish. 2005. Effect of varying dietary levels of  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 327:115-133.

Pernet, F., V.M. Bricelj, S. Cartier. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics J. Exp. Mar. Biol. Ecol., sous presse (acceptée Aout 2005).

## **Introduction et objectifs**

L'aquaculture au Canada est à présent devenue une activité commerciale fournissant des bénéfices directs et indirects importants au niveau local et régional (Fisheries and Oceans Canada, 2000). Ces 20 dernières années, la production commerciale s'est développée avec le saumon, l'omble chevalier, la moule, et le pétoncle. L'approvisionnement de Pétoncle géant *Placopecten magellanicus* dans l'Est du Canada repose essentiellement sur la pêche et la collecte de naissain en milieu naturel, souffrant ainsi d'une grande variabilité inter annuelle à la fois en terme de qualité et de quantité (Couturier, et al., 1995). La production de juvéniles en éclosérie a ainsi été identifiée comme étant une voie prometteuse afin de s'affranchir des contraintes du milieu naturel (Le Penec, 1997). D'autre part, la maîtrise des techniques de production en éclosérie est la condition *sine qua non* à la domestication de l'espèce.

Les élevages larvaires de *P. magellanicus* en éclosérie sont sujets à des mortalités élevées et variables en fonction des lots de larves et des années de production. Par exemple, Neima (1997) rapporte des survies moyenne de 20% du stage D-véligère à pédivéligère. Dans un rapport faisant état de six années d'activité de l'éclosérie commerciale Pec-Nord Inc., Wang et al. (2002) montrent également des survies de 1.6 à 45% du stade D à pédivéligère. Plus récemment, Pernet et al. (2003) montrent que la survie varie de 0 à 30% en fonction du régime alimentaire pendant cette même période. Finalement, Pernet et al. (2005) ont obtenu des survies de la larve D à la pédivéligère entre 0 et 60% en fonction de l'alimentation et des lots de larves, toujours suivies de pertes majeures au moment de la métamorphose (ca. 97%). Des observations préliminaires suggèrent que les mortalités larvaires de *P. magellanicus* seraient associées à des infections bactériennes naturelles. En effet, les épisodes de mortalité ci décrit coïncident généralement avec (1) des périodes de croissance larvaire ralentie ou arrêtée, (2) la diminution des activités de nage (nage circulaire) et d'alimentation (vélum partiellement rétracté), et (3) l'apparition de lésion et de morceaux de vélum libres dans l'eau, symptomatiques du développement de bactéries pathogènes dans les cultures larvaires (Elston, 1984). Plusieurs genres bactériens sont connus pour induire des mortalités massives en éclosérie, soit *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Vibrio* ce dernier représentant le groupe bactérien le plus dangereux à la fois pour les larves et les juvéniles de mollusques et crustacés (Bachere, 2003). Les maladies bactériennes sont périodiquement observées dans les cultures larvaires de mollusques bivalves (Elston, 1984; Nicolas, et al., 1996), mais ne sont pas censées affecter la production post-larvaire lorsque les précautions nécessaires sont prises (désinfection du matériel et des bassins au chlore et utilisation d'eau filtrée et stérilisée à l'UV). Ces précautions sont suffisantes pour élever des larves de palourdes ou d'huîtres, mais des mortalités importantes ont été enregistrées sur les larves de coquilles *Pecten maximus* à l'éclosérie d'Argenton en France (Robert, et al., 1996). Pour cette espèce, l'usage d'antibiotique s'est avéré nécessaire afin de mener à bien les élevages larvaires.

La seconde source importante de mortalité de *P. magellanicus* est associée à la métamorphose. A ce stade, les larves présentent une vulnérabilité accrue aux infections bactériennes (Elston, 1984). Le processus de métamorphose implique plusieurs transformations physiques dont le détachement du vélum, le repositionnement du pied, le développement de branchies rudimentaires et la déposition d'une coquille juvénile.

L'alimentation seule n'est généralement pas suffisante pour soutenir la demande énergétique élevée associée au remaniement tissulaire occasionné par la métamorphose (Baker and Mann, 1994). Il existe une période de transition pendant laquelle le vélum est partiellement ou complètement résorbé et que les branchies sont rudimentaires, voire absentes. Une étude détaillée des changements ontogéniques de *P. magellanicus* pendant la métamorphose montre que les branchies ne sont complètement formées que lorsque l'animal atteint une longueur de ~ 2 mm, suggérant ainsi que le mode d'alimentation suspensivore est auparavant inefficace (Veniot, et al., 2003). Ainsi, pendant la métamorphose, les larves pédivéligères reposent sur leurs réserves énergétiques, essentiellement lipidiques et protéiques (Holland and Spencer, 1973; Gallager, et al., 1986; Rodriguez, et al., 1990), soulignant ainsi l'importance de la nutrition larvaire dans un contexte d'approvisionnement en juvéniles.

Les objectifs de la présente recherche sont de : (1) caractériser la composition en classes de lipide de cinq groupes de larves de pétoncle géant *Placopecten magellanicus* afin d'examiner la relation entre les niveaux de classes de lipide et la performance des larves, un terme générique utilisé dans cette étude qui inclut la croissance larvaire, la survie et le succès de métamorphose, et (2) déterminer si un contrôle bactérien via un traitement antibiotique pendant la métamorphose influence la condition nutritionnelle et la performance des larves.

## **Matériel et méthodes**

### **Procédures d'élevage**

Cette étude a été menée à la Station de Recherche en Aquaculture du Conseil National de la Recherche du Canada (CNRC) à Sambro en Nouvelle-Écosse. Les géniteurs de Pétoncle géant *Placopecten magellanicus* proviennent de deux fermes d'élevage à Mahone Bay (EXP I, année 2003) et Lunenburg en Nouvelle-Écosse (EXP II, III, année 2003, IV et VI', année 2004). Les animaux ont été maintenus en système ouvert à 8-10°C pendant au moins 10 jours et alimentés en continu avec un mélange de *Isochrysis galbana* (Clone T-ISO) et *Pavlova pinguis* à ~ 40,000 cellules ml<sup>-1</sup>. Mâles et femelles ont été induits à pondre par une augmentation de température à 16°C. Les gamètes de 5 à 10 individus ont été mélangés à un ratio de 10 spermatozoïdes pour 1 œuf. Les œufs fécondés sont conservés à 14°C pendant 24 h dans un bassin Xactic<sup>®</sup> de 1000 L. Les larves trocophores sont par la suite transférées dans un autre bassin et maintenues dans la colonne d'eau avec une aération modérée. Quatre jours après la fécondation, les larves D-véligères sont tamisées à 21 µm. Les larves sont élevées dans des chambres à température contrôlée à 14°C dans de l'eau de mer filtrée à 0.2 µm traitée à l'UV pour les expériences I, II et III, et dans de l'eau de mer filtrée à 1 µm non traitée à l'UV pour les expériences IV et IV'. L'eau est aérée avec de l'air filtrée à 0.2 µm et renouvelée tous les 3-4 jours. Aussitôt que les larves sont prêtes à se fixer, elles sont transférées en système «downweller» en recirculation.

Les microalgues proviennent du Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) à Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (West Boothbay Harbor, ME., USA). Les cultures sont conduites sur milieu f/2, sans silicate pour les flagellés (Guillard, 1975). Les

microalgues sont cultivées dans des volumes de 20 L placés dans des incubateurs à température contrôlée à 20°C sous illumination continue avec CO<sub>2</sub>.

## Plan expérimental

La Fig. 1 illustre le schéma expérimental. Quatre lots indépendants de larves de pétoncle ont été élevées entre juin 2003 et juillet 2004. Les larves du lots I ont été élevées dans des bassins coniques de 450L à une densité initiale de 0.9 larves par litre. Les larves du lot II ont été élevées dans des bassins Xactic® de 1000L jusqu'au jour post fertilisation (jpf) 21 où les larves ont été séparées dans trois bassins coniques de 450L. Les larves du lot III ont été élevées dans des bassins Xactic® de 1000L. Finalement, les larves du lots IV ont été élevées dans des bassins Xactic® de 1000L jusqu'au jpf 25 où elles ont été séparées dans 6 bassins Xactic® de 1000L. Trois bassins ont reçu une dose de 4mg/L de chloramphénicol. Trois jours après le changement d'eau, quelques gouttes d'eau provenant des bassins incluant des larves ont été déposées sur des plaques TCBS pour détecter la vibriose. Les plaques ont été incubées à 20°C pendant 24 h avant l'examen visuel. Les larves ont été transférées dans des systèmes à courant descendant au jpf 32 avec des densités initiales variant de 90 à 200 larves cm<sup>-2</sup>. La longueur de la coquille et la survie ont été évaluées à chaque changement d'eau et les larves ont été échantillonnées pour analyse lipidique selon le schéma de la Fig 1. Après le jpf 43 les larves du lots IV et IV' ont été séparées à l'aide d'un filtre de 202 µm et échantillonnées pour la longueur de la coquille et l'analyse lipidique.

Les larves des lots I, II, II ont été nourrit avec *Pavlova* sp. (Flagellée) et *Chaetoceros muelleri* (diatomée) tandis que celles des lots IV et IV' ont été nourrit avec la diète précédente en plus d'*Isochrysis* sp. (Flagellé) en proportion égale. Le diamètre moyen de ces algues varie de 3 et 5 µm et l'ingestion sélective des larves basées sur la taille n'est pas à prévoir. Cependant, cette étude démontre que le taux ingestion et de disparition des diatomées étais plus bas que les autres espèces. La possibilité que certaines espèces d'algues soient sélectionnées selon d'autres critères que la taille ne peut être éliminés.

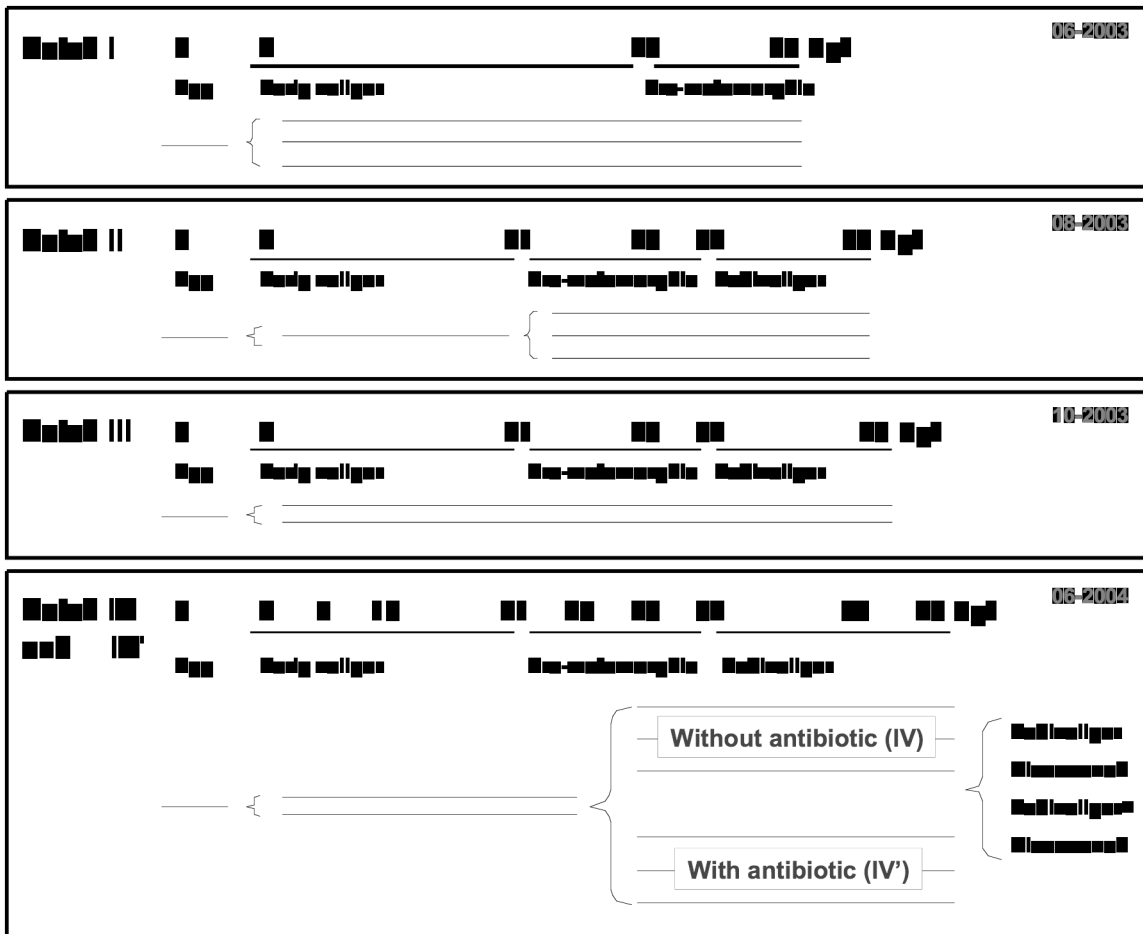


Figure 1. Plan expérimental

## Croissance et survie

La longueur de la coquille et la survie étaient déterminées à chaque changement d'eau. Les larves sont transférées dans un seau de 20 L. Trois sous échantillons de 1 ml sont placés dans un puits et examinés sous une loupe binoculaire à 10-30 x pour évaluer la survie. Par la suite, les larves sont placées sur une lame et filmées à 40x avec une caméra analogique (Pulnix TMC7-DSP) couplée à un microscope. Les films sont enregistrés sur K7 vidéo Sony DVCAM (DSR - V10). Un minimum de 60 larves vivantes sont mesurées à chaque date d'échantillonnage. La longueur de la coquille est mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image Optimas 6.5 (Media cybernetics, Silver Spring, MD).

## Analyses lipidiques

Le volume d'algue échantillonné pour les analyses lipidiques correspond à 10-20 ml, en fonction de la concentration de la culture. La composition des régimes binaires est calculée à partir de celle des espèces individuelles. Le nombre de larves échantillonnées varie de 5,000 pédivéligrères à 50,000 œufs ou larves véligères. Les algues et les larves sont filtrées sur des filtres Whatman GF/C préculés à 480°C. Les échantillons sont conservés dans des vials ambrés dans 1 ml de chloroforme à -80°C.

Les lipides sont extraits selon la méthode modifiée de Folch (Folch et al., 1957), tel que décrit par Parrish (1999). Les extraits sont déposés sur les Chromarods S-III et les classes de lipide sont séparées par chromatographie sur couches minces et quantifiées avec le Iatroscan MK-VI.

## Resultats

### Croissance et survie

Le taux de croissance entre les cinq lots de pétoncles de l'œuf à la métamorphose était différents, le taux de croissance du lot IV' traité avec les antibiotiques était supérieure de  $5.0 \mu\text{m jour}^{-1}$  (Table 1). Les lots IV et IV' provenant du même groupe initiale de larves au jpf 25 ont présenté le meilleur taux de survie pré et post métamorphique (Table 1 et Fig. 2). Cependant, la proportion de larves dissoconches en comparaison avec les larves vivantes au jpf 43 est plus petite chez les larves traitées au antibiotique. Alors basé sur le nombre initial de larves vivantes au jpf 25, le rendement de dissoconche au jpf 43 est comparable indépendamment du traitement (Fig.3). Les plaques de TCBS inoculés avec l'eau de culture et les larves révèlent que les bassins traités avec les antibiotiques étaient exempts de vibriose comparés aux bassins contrôles qui exhibaient un développement massif de vibriose (Fig.4).

**Table1.** Caractéristiques des performances des larves de pétoncle des lots I, II, III, IV et IV' au stade pré métamorphique au jpf 32.

Groupes	I	II	III	IV	IV'
<i>Survie (%*)</i>					
Pré métamorphique	5.3 <sup>c</sup> ± 7.5	38.2 <sup>b</sup> ± 4.6	44.8 <sup>ab</sup> ± 2.3	49.0 <sup>a</sup> ± 1.0	49.2 <sup>a</sup> ± 2.2
Post métamorphique	0.0 ± n.d.	0.0 <sup>c</sup> ± 0.0	<1.0 <sup>c</sup> ± 0.0	31.9 <sup>b</sup> ± 1.6	56.8 <sup>a</sup> ± 3.1
<i>Taille et croissance **</i>					
longueur (µm)	216.1 ± n.d.	222.0 <sup>c</sup> ± 5.0	223.0 <sup>bc</sup> ± 8.1	237.4 <sup>ab</sup> ± 5.8	243.7 <sup>a</sup> ± 2.3
Croissance (µm·d <sup>-1</sup> )	3.6 ± n.d.	4.5 <sup>bc</sup> ± 0.2	4.3 <sup>c</sup> ± 0.1	4.7 <sup>ab</sup> ± 0.1	5.0 <sup>a</sup> ± 0.1
<i>Lipide (ng·larve<sup>-1</sup>) pré métamorphique</i>					
Triacylglycerols	0.8 ± n.d.	2.8 <sup>c</sup> ± 0.8	1.3 <sup>c</sup> ± 0.1	10.4 <sup>b</sup> ± 3.7	24.4 <sup>a</sup> ± 5.0
Stérols	0.5 ± n.d.	1.3 <sup>b</sup> ± 0.6	0.6 <sup>b</sup> ± 0.2	1.4 <sup>b</sup> ± 0.6	2.5 <sup>a</sup> ± 0.1
AMPL	2.1 ± n.d.	2.5 <sup>b</sup> ± 0.3	2.3 <sup>b</sup> ± 0.4	4.2 <sup>ab</sup> ± 1.6	6.1 <sup>a</sup> ± 0.1
Phospholipides	9.8 ± n.d.	12.3 ± 2.0	12.1 ± 1.8	8.0 ± 3.7	14.6 ± 1.4
Lipides totaux	13.2 ± n.d.	18.8 <sup>b</sup> ± 3.6	16.3 <sup>b</sup> ± 2.6	24.0 <sup>b</sup> ± 9.6	47.5 <sup>a</sup> ± 5.4
<i>Lipide (% des lipides totaux)</i>					
Triacylglycerols	6.0 ± n.d.	14.5 <sup>c</sup> ± 1.5	7.8 <sup>d</sup> ± 0.6	43.8 <sup>b</sup> ± 2.3	51.0 <sup>a</sup> ± 5.0
Stérols	3.7 ± n.d.	6.7 <sup>a</sup> ± 0.9	3.8 <sup>c</sup> ± 0.5	5.7 <sup>ab</sup> ± 0.1	5.3 <sup>b</sup> ± 0.6
AMPL	15.7 ± n.d.	13.3 <sup>b</sup> ± 1.7	14.1 <sup>b</sup> ± 0.4	17.7 <sup>a</sup> ± 0.9	12.8 <sup>b</sup> ± 1.2
Phospholipides	74.7 ± n.d.	65.4 <sup>b</sup> ± 3.2	74.3 <sup>a</sup> ± 0.3	32.9 <sup>c</sup> ± 2.1	30.8 <sup>c</sup> ± 3.4



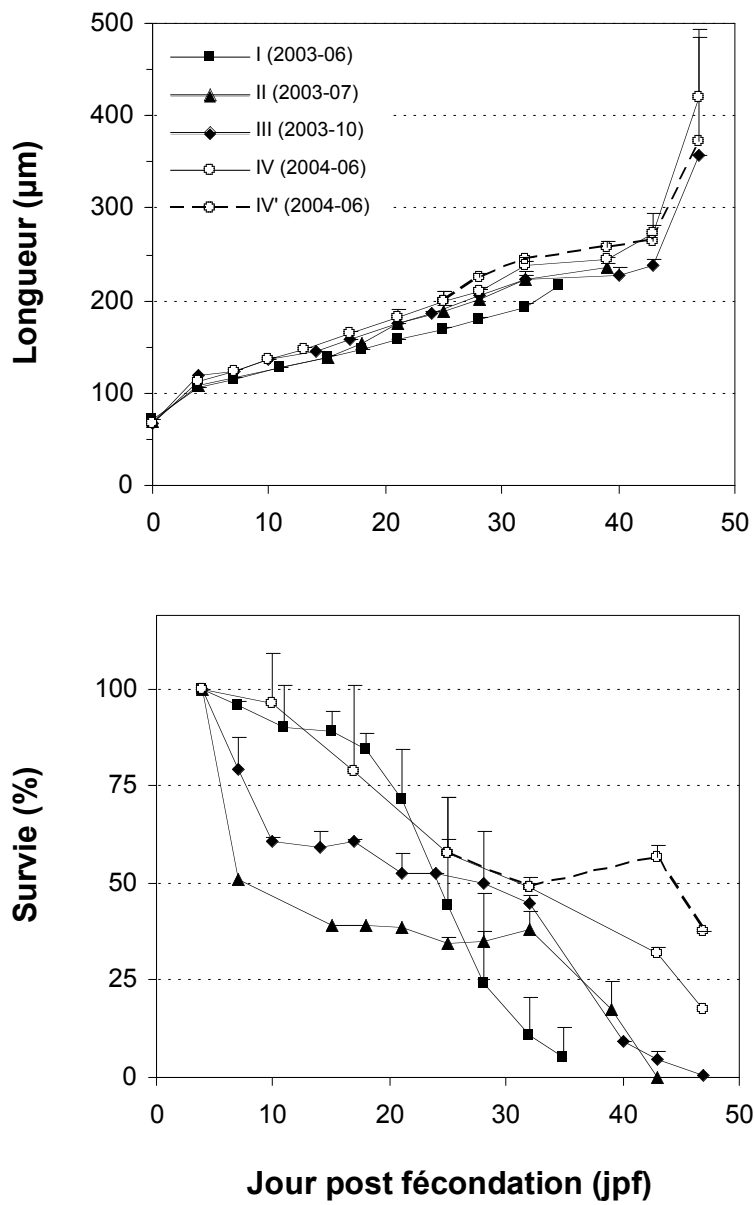


Fig. 2. Trajectoires de croissance et survie des larves de pétoncles des lots I, II, III, IV et IV' en fonction du temps.

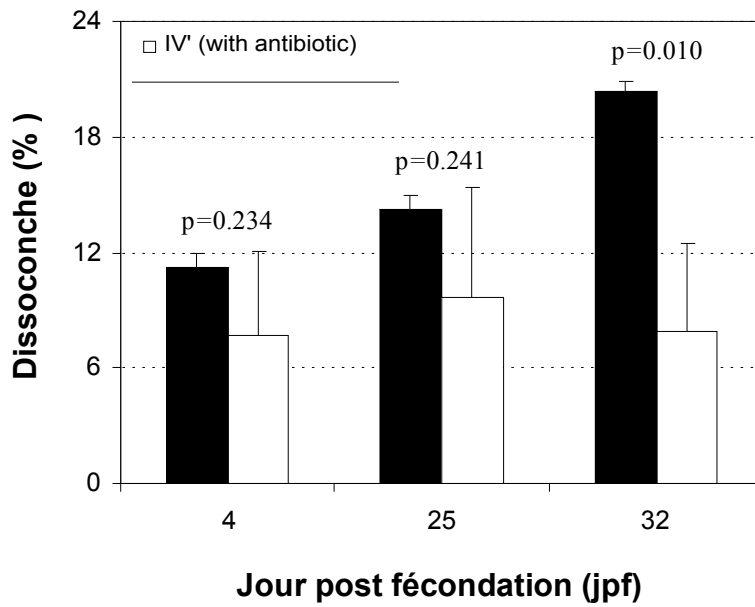


Fig. 3 Pourcentage de dissections dans les cultures larvaires au jpf 43 selon le nombre total de jpf pour les lots IV et IV' (traité).

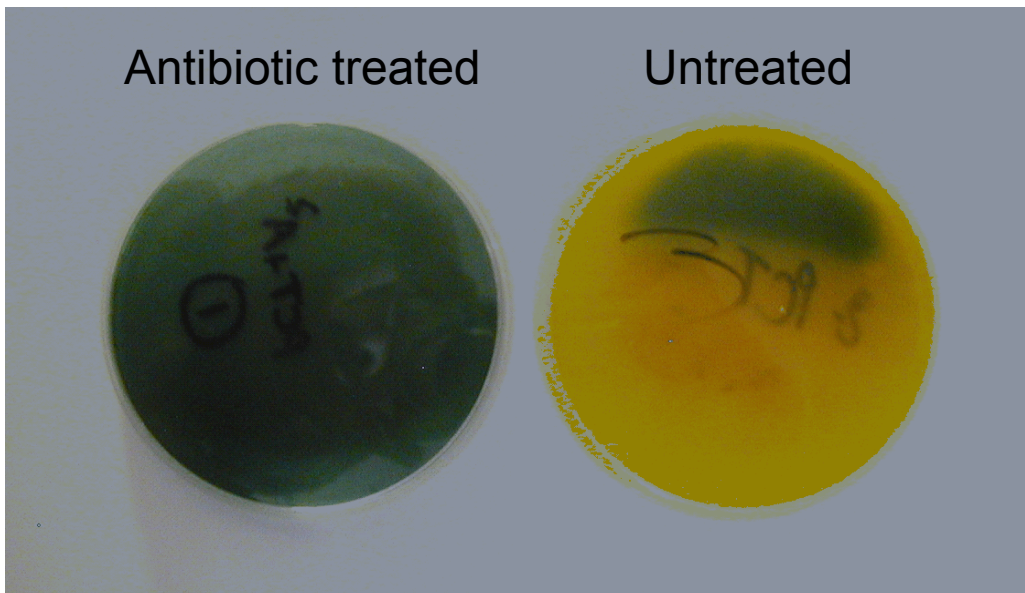


Fig. 4 Suspension d'eau, d'algues et de larves déposées sur TCBS 3 jours après le changement d'eau (jpf 43). Gauche : lot IV' traité au antibiotique, droite : lot IV non traité.

## Composition lipidique des larves de pétoncle

Les classes de lipides détecté dans les larves de pétoncles lors de cette étude sont les triacylglyceroles (TAG), stérols (ST), lipides polaire acétone mobile (AMPL) et des phospholipides (PL). Les larves sont caractérisées par un niveau de TAG initial dans les œufs non fécondé de 1.0-3.7 ng.œuf<sup>-1</sup> et 0.6-1.8 ng.larve<sup>-1</sup> au jpf 4 (Fig.5). Les taux d'utilisation de TAG durant l'embryogenèse ont variés de 0.008 ng.jour<sup>-1</sup> pour les pétoncles du lot II et de 0.65 ng.jour<sup>-1</sup> pour les pétoncles du lot I. Des taux intermédiaires d'utilisation de TAG de 0.13 et 0.16 ng.jour<sup>-1</sup> ont été observés durant l'embryogenèse pour les pétoncles du lot III et IV respectivement. Les lots IV et IV' ont été caractérisés par une accumulation de TAG durant la période pré métamorphique entre 21 et 32 jpf, immédiatement suivi par l'utilisation des TAG durant la métamorphose. Le traitement antibiotique a amplifié par 2.3 X l'accumulation de TAG.

Des accumulations de stérols, de 6 à 36 X selon le lot, ont été observées chez les pétoncles de l'œuf au stade métamorphique (Fig.5). Les pétoncles pré métamorphique traité au antibiotique (IV') ont exhibé les taux de stérol les plus élevé (Fig. 5 et Table 1). Cependant les niveau de stérols chez les larves au jpf 43 était semblable dans tous les lots peu importe leur stade de développement (Fig. 6). Chez les pétoncles étudiés, le contenu en stérol (en ug larves<sup>-1</sup>) était corrélé positivement à la longueur de la coquille.

Une augmentation des phospholipides (PL), de l'ordre de 3 à 13 X, a été observée chez les pétoncles de l'œuf au stade métamorphique (Fig.5). Des niveaux de PL similaires ont été observé chez certains lot de pétoncles cependant les lot IV et IV' ont démontrés une utilisation marquée durant la période pré métamorphique entre 28 et 32 jpf (Fig. 5 et Table 2).

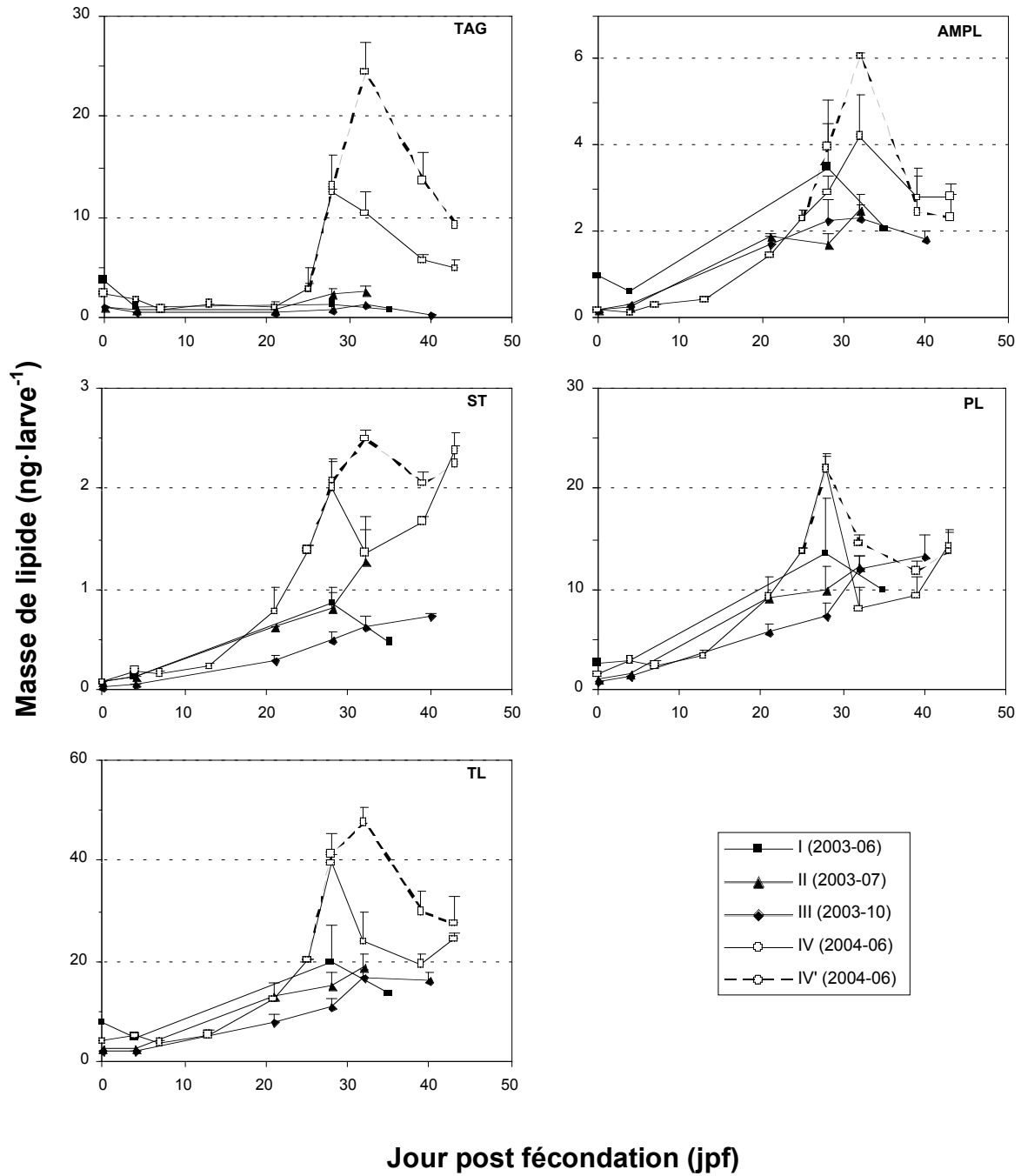


Fig. 5. Concentration absolue de triacylglycéroles (TAG), stérols, lipide polaire acétone mobile (LPAM), phospholipides (PL) et lipides totaux (LT) dans les larves des lot I, II, III, IV et IV' en fonction du temps de développement.

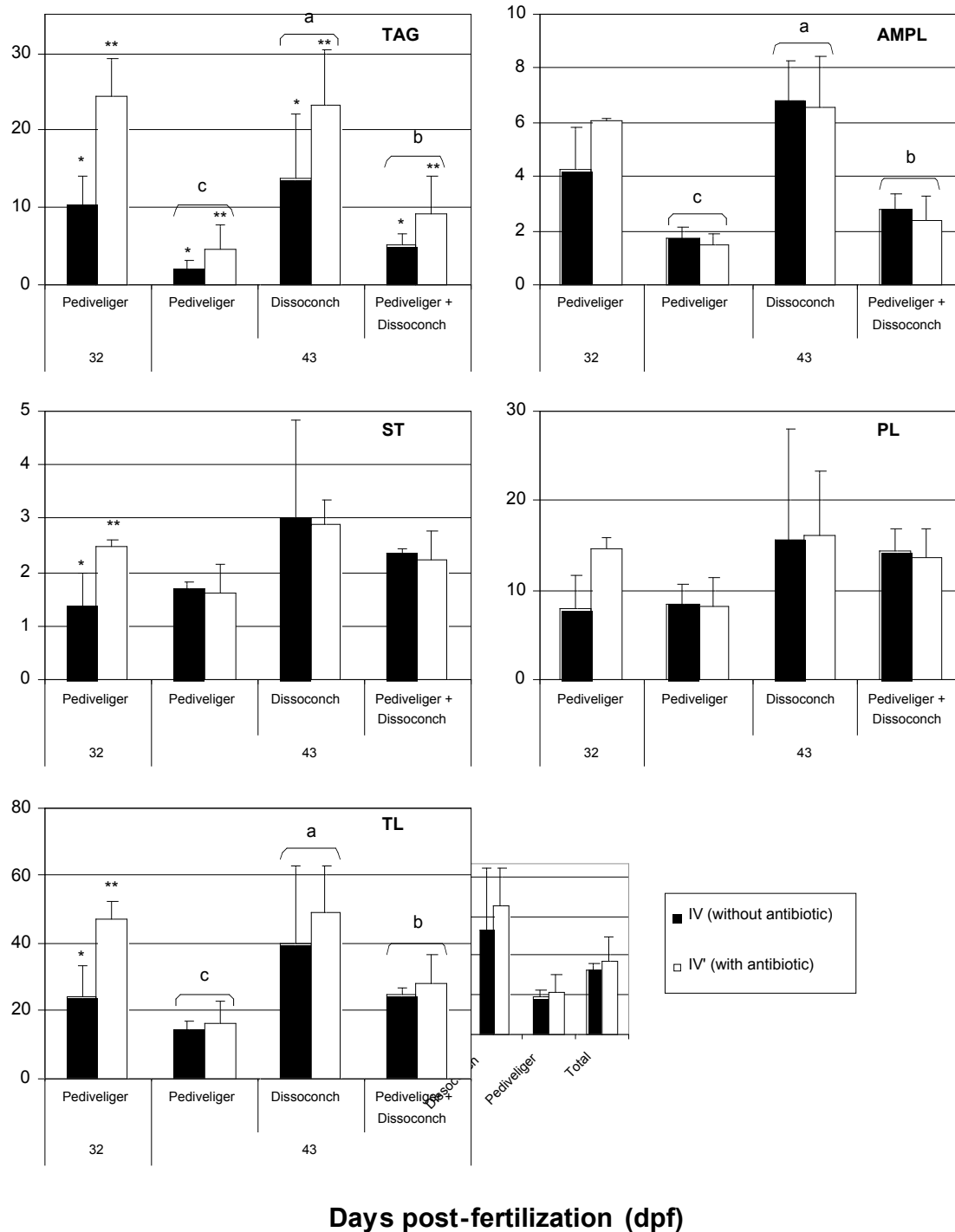


Fig. 6. Concentration absolue de triacylglycérols (TAG), stérols, lipide polaire acétone mobile (AMPL), phospholipides (PL) et lipides totaux dans les larves pré métamorphiques et post métamorphiques à 32 et 43 jpf en fonction du stade de développement.

## **Concentrations relatives des classes de lipides**

Tous les lots de pétoncles ont démontré une diminution progressive du % de TAG durant l'embryogenèse et le développement larvaire initiale jusqu'au jpf 21 (lots II, III, IV, IV') ou 28 (Lot I, Fig.7). Une augmentation du TAG durant la périodes pré métamorphique, entre 21 et 32 jpf, et une diminution durant la métamorphose ont été observés chez les lots les plus performants (IV et IV', Fig. 7). Le pourcentage de TAG chez les pétoncles pré métamorphiques à 32 jpf (43.8-51.0%) a atteint des niveaux comparables au % de TAG contenue dans les œufs (57.9%). Les pétoncles des lots I et II ont démontrés peu de capacité à récupérer le % de TAG durant la période pré métamorphique, tandis que ceux du lot I ont exhibé une diminution progressive tout au long de l'ontogénie (Fig. 7 et Table 1). Le traitement antibiotique a augmenté le % de TAG chez les pétoncles pré métamorphiques de 1.2X comparé au contrôle à 32 jpf (Fig. 7 et Table 1).

Cette différence dans le % de TAG entre les pétoncles traités et non traités a été maintenue durant la métamorphose (Fig. 7 et Table 2) et était apparente chez les dissochonches et les pédiveligères à 43 jpf (Fig. 8). Le pourcentage de TAG chez les pédiveligères au jpf 43 était de 1.8-2.6X plus bas que le % de TAG chez les dissochonches (Fig. 8). Les pourcentage de TAG chez les pétoncles du lot IV et IV' étaient corrélés linéairement et négativement avec le % de PL et à un moindre degré avec le % de ST.

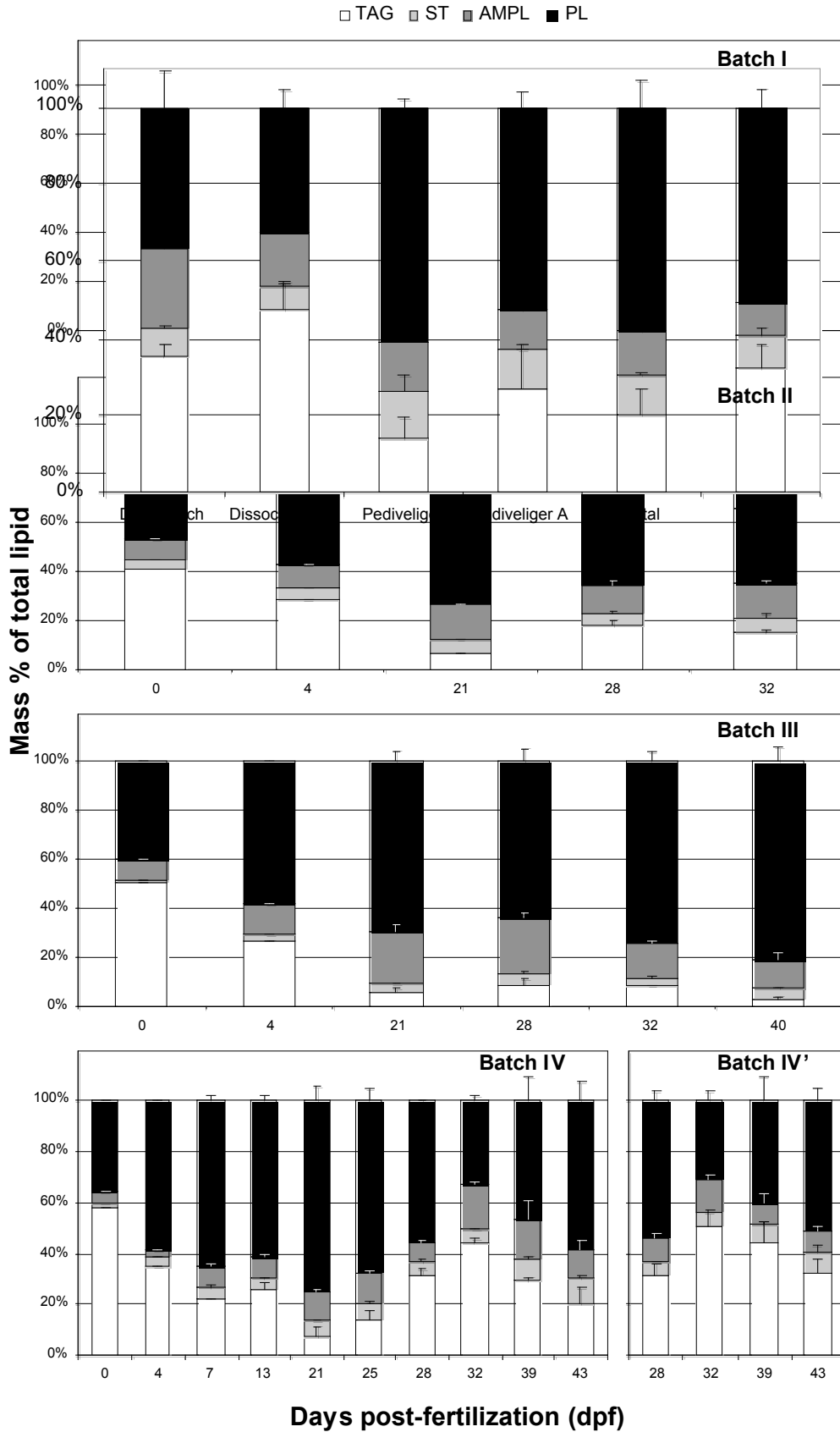


Fig. 7. Concentrations relatives de triacylglycérols (TAG), stérols (ST), lipide polaire acétone mobile (AMPL) et de phospholipides (PL) dans les larves de pétoncles du lot I, II, III, IV et IV' en fonction du temps de développement.

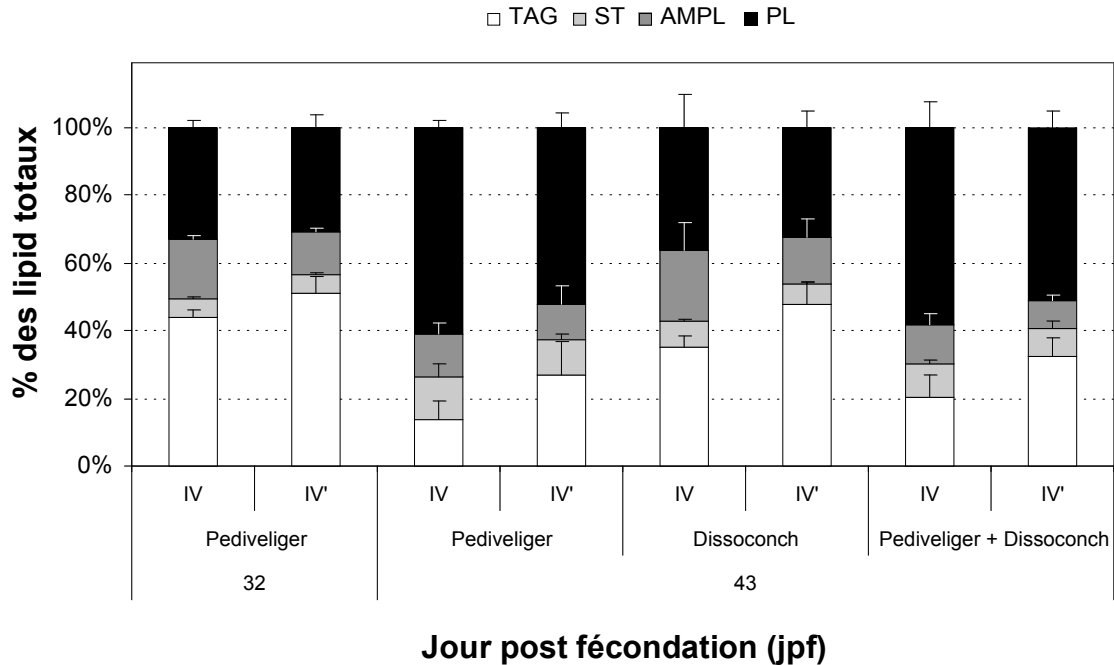


Fig. 8. Concentrations relatives de triacylglycérols (TAG), stérols (ST), lipide polaire acétone mobile (AMPL) et de phospholipides (PL) dans les larves de pétoncles pré et post métamorphiques à 32 et 43 jpf en fonction du stade de développement.

## Discussion

### Performances des larves de pétoncles

Les taux de croissance de *Placopecten magellanicus*, de l'œuf à la métamorphose, obtenus dans cette étude (3.6 - 5.0  $\mu\text{m jour}^{-1}$ ) étaient similaires à ceux obtenus par Pernet et al. (2003b) et Pernet et Tremblay (2004), qui variaient entre 3.9 et 5.2  $\mu\text{m jour}^{-1}$ , mais supérieurs à ceux obtenus par Feindel (2000, 0.8-1.8  $\text{mjour}^{-1}$  entre 9 et 18 jpf), et Jackson et al. (2003, 0.8-2.7  $\text{mjour}^{-1}$  de l'éclosion à la métamorphose). La survie des pétoncles jusqu'au stade pédivéligné était hautement variable (0-50%) et les mortalités ont eu lieu durant la métamorphose tel que reporté précédemment (Neima et Kenchington, 1997 ; wang et al., 2002 ; Pernet et al., 2003b ; Pernet et Tremblay, 2004). La variabilité dans les taux de survies exhibée par les pétoncles des cinq lots décrits dans cette étude a été obtenue durant les deux années de production à la station de recherche. Les larves des lots IV et IV' ont exhibées les taux de croissance (4.7 à 5.0  $\mu\text{m jour}^{-1}$ , respectivement) et la survie post métamorphique (31.9% et 53.6%, respectivement, entre jpf 4 et 43) les plus élevées et par le fait représentent les larves les plus performantes. Même si les taux de



croissance entre les lots I, II, III n'ont pas différés beaucoup des lots IV et IV', la survie post métamorphique était négligeable, et ces lots peuvent être considérés comme peu performant.

Nous supposons que la performance supérieure des pétoncles des lots IV et IV' pourrait être relié à la valeur nutritionnelle de la nourriture. Dans une publication antérieure Pernet et al. (Soumis) ont suggérés que l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 $\omega$ 3), un acide gras essentiel pour la croissance optimale de plusieurs espèces de bivalves, était déficient dans la diète binaire des larves du lot I, II et III. DHA est un acide gras essentiel pour le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires durant le développement larvaire et la métamorphose des pétoncles (Whyte et al., 1992 ; Delaunay et al., 1993 ; Nevejan et al., 2003 ; Pernet et al., soumis). En conséquence, l'addition de TISO, une algue riche en DHA (Volkman et al., 1989 ; Delaunay et al., 1993 ; Pernet et al., 2003c) à la diète des pétoncles du lot IV et IV' a pu contribuer à leur performance supérieure.

Une hypothèse alternative serait que la variabilité dans la survie, entre les lots de pétoncles, serait attribuable à d'autres facteurs environnementaux comme la qualité de l'eau. La culture des lots démontrant une performance supérieures a été effectuée dans de l'eau filtré à 1 $\mu$ m tandis que celles des lots moins performant a été effectuée dans de l'eau filtrée à 0.22  $\mu$ m. Les petites particules et bactéries associées à l'eau dans la fraction située entre 0.22-1  $\mu$ m ont favorisées la croissance et la survie des larves de *Pecten maximus* (Samain et al., 1987). De plus, les larves du pétoncle *Argopecten purpuratus* cultivées dans de l'eau filtrée à 5  $\mu$ m exhibent une meilleure croissance et survie que les larves cultivées dans de l'eau filtrée à 0.22  $\mu$ m, due à la présence de bactéries qui améliorent la valeur nutritionnelle de la diète (Riquelme et al., 1997).

## **Effets de l'antibiotique sur la performance des pétoncles**

Le traitement antibiotique augmente les concentrations absolues et relatives de TAG chez les pétoncles pré métamorphiques (Fig. 5) et a contribué à l'augmentation de la survie des post métamorphiques (Fig.2). Même si l'effet positif de l'utilisation d'antibiotique a été rapporté auparavant (Sutton et Garrick, 1993 ; Nicolas et al., 1996 ; Sugumar et al., 1998), c'est la première fois que l'utilisation d'antibiotique est clairement associée avec une augmentation de la condition des larves de bivalve, comme le reflète les réserves de lipide.

Les pétoncles cultivés sans antibiotique étaient infectés par *Vibrio* et exhibaient une réduction de velum qui a probablement entravée l'alimentation et l'acquisition de nourriture. Les larves de pétoncles métamorphiques des lots I, II, III et IV ont pu être atteintes par des bactéries pathogéniques ou opportunistes étant donné l'augmentation du nombre de larves moribondes à partir de 32 jpf.

Une hypothèse alternative est que le traitement antibiotique améliore la survie des pétoncles en réduisant la quantité d'énergie attribuée à la défense. Même si le coût énergétique de la réponse immunitaire des bivalves n'a jamais été étudié, l'accumulation de lipides dans la tube digestif de *Argopecten ventricosus* (Sainz et al., 1998) infectée avec *Vibrio* suggère que les lipides jouent un rôle dans la réponse aux pathogènes. Les

résultats de la présente étude soulèvent le besoin d'être prudent dans l'extrapolation des résultats de la dynamique des lipides en relation avec les larves traitées aux antibiotiques et celles retrouvées dans le milieu naturel.

Même si les pétoncles traités aux antibiotiques ont exhibés une meilleure survie suivant la métamorphose il faut noter que la proportion de dissoconche / larves vivantes à 43 jpf est plus faible avec le traitement antibiotique, résultant ainsi en des rendement de larves dissoconches similaires indépendamment du traitement. Il est aussi possible que le traitement aux antibiotiques retarderait seulement la métamorphose et que les larves se seraient métamorphosées plus tard. Cependant, du côté pratique (aquaculteur) et écologique, ceci représente un dénouement indésirable.

Nous émettons l'hypothèse que le traitement aux antibiotiques peut avoir réduit le succès métamorphique des larves de pétoncles en éliminant les signaux bactériens nécessaires à l'établissement des larves. Par exemple, des extraits de culture bactérienne de *Alteromonas colwelliana* et *Vibrio cholerae* induisent le comportement de fixation et améliore le succès de la métamorphose des huîtres *Crassostrea gigas* (Fitt et al., 1989,1990). Les mécanismes responsables de l'arrêt ou du délais de la métamorphose observée dans la présente étude avec le traitement antibiotique requièrent des études plus approfondies.

## Conclusions

D'un point de vue pratique, ce travail nous a permis de montrer que :

- **Un regime alimentaire incluant la microalgue *Isochrysis aff. galbana* (clone TISO) a *Chaetoceros muelleri* (clone CHGRA) et *Pavalova* sp. (clone CCMP 459) a permis d'obtenir des élevages pérformants de pétoncle géant, probablement grace à l'ajout de 22 :6n-3.**
- **Nous avons trouvé que l'augmentation de la quantité de TAG pendant la période pré-métamorphique est un bon indicateur de succès de métamorphose des larves de pétoncle géant.**
- **L'usage des antibiotiques dans les élevages larvaires de pétoncle géant pendant la période pré-métamorphique et métamorphique conduit a une augmentation importante de la survie et de la condition nutritionnelle des larves sans pour autant augmenter le succès de métamorphose pendant la période d'étude. Ce traitement n'apparaît donc pas avantageux. En revanche, il est important de tempérer ces résultats par le fait que la suivi des larves métamorphiques a duré seulement une semaine. Il est possible que les larves pediveligeres se seraient finalement metamorphosées plus tard, mais un delai n'est pas optimum du point de vue de la production commerciale.**

## Composition en stérols des microalgues utilisées dans les expériences de nutrition des pétoncles géants

## Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette portion d'étude était de caractériser la composition en stérols des espèces microalgales utilisées dans les études nutritionnelles précédentes effectuées à l'IBM avec les pétoncles géants et des postlarves de pétoncles de baie. Nous avons aussi comparé la composition en stérols des régimes algaux avec celle dans les tissus des pétoncles pour obtenir une compréhension préliminaire de l'accumulation, de la rétention et de l'utilisation relative des stérols alimentaires individuels par postlarves de pétoncle. Seulement les données sommaires sont présentées ici et une analyse plus complète sera l'objet d'une publication ultérieure. Toutes les analyses de stérols ont été effectuées dans le laboratoire de C. Parrish au Centre d'Océanographie (Ocean Sciences Centre) de l'Université Memorial de Terre-Neuve.

## Méthodes

Des extraits de lipides méthylés ont été évaporés jusqu'à la sécheresse sous hydrogène et ont été triméthysilatés en utilisant quatre gouttes de *N,O*-bis (triméthylsilyl) acétamide (BSA) et huit gouttes de *N,O*-bis (triméthylsilyl) trifluoacétamine (BSFA). Des échantillons ont été chauffés à 85 °C pendant quinze minutes. Après ce temps, les agents dérivatisants ont été évaporés sous hydrogène et l'extrait a été suspendu dans de l'hexane. Toutes les analyses ont été complétées moins de 48 heures après la triméthylisation.

Pour l'identification maximale, les échantillons ont été effectués sur un Varian Saturn 3800 GC branché sur un Varian 2000 MS. La colonne GC était une colonne Varian CP sil-8, d'une longueur de 30 m, 0,32 mm i.d., et d'une épaisseur de film de 0,25 µm. Le profil de température GC a commencé à 60 °C et a gardé cette température pendant une minute. Puis, la température a augmenté à 100 °C à un rythme de 25 °C/min. L'augmentation suivante était à 250 °C à un rythme de 3 °C/min. La température s'est maintenue à 315 °C pendant 1,73 minute. Le gaz vecteur était He à une pression constante de 10 psi. Des échantillons ont été effectués en mode EI et CI. Pour l'EI, les balayages étaient 70 eV sur une étendue de 60 à 520 m/z et balayant à un taux de 0,75 seconde/balayage. Pour le CI, de l'isobutylène a été utilisé en tant que gaz réactif. L'identification maximum a été faite avec une combinaison d'étalons (cholestérol, campestérol et sitostérol, acheté de Sigma) et a fourni des données de spectre de masse (Jones et al. 1994).

Pour l'identification maximum, les échantillons ont été effectués sur un HP GC avec un FID utilisant une colonne de capillaire de silice fondue SPB-5, d'une longueur de 30 m, 0,32 mm i.d. et d'une épaisseur de film de 0,25 µm. Le programme de température était le même que pour le GC/MS avec la température du détecteur réglée à 320 °C et une pression de colonne de 10 psi. L'identification maximum a été effectuée en comparaison avec des étalons et les chromatogrammes GC/MS.

## Résultats et Discussion

L'étude a fourni une sélection de la composition en stérols de huit espèces microalgales qui ont été utilisées dans nos études nutritionnelles des pétoncles géants et de pétoncles de baie dans les stades précoces de développement (Figs. 9 et 10). La composition en stérols dans l'espèce algale analysée était généralement très variée, sauf pour *Rhodomonas lens* qui est dominé (~95%) par le brassicastérol. La diatomée *Chaetoceros muelleri* (CHGRA), identifié dans nos études comme un excellent composant de régimes pour les larves et les postlarvaires de pétoncles géants, est caractérisée par un profil stérol unique, dominé par le cholestérol (~36%), suivi du sitostérol et de l'isofucostérol. Les deux autres diatomées testées, *Fragilaria familica* and *Thalassiosira weissflogii*, contenaient de faibles niveaux de cholestérol (< 3%) et contenaient 24-méthylénecholestérol (Fig. 10).

Comparaison de trois espèces Pavlova : *Pavlova pinguis* and *Pavlova* sp. (CCMP 459) ont donné des taux de croissance comparables de pétoncles géants post-larvaires lorsque utilisé dans le régime en combinaison avec *Chaetoceros muelleri* (CHGRA) (Milke et al., 2004 and unpublished data). Les deux algues ont démontré des compositions en stérols très semblables (Fig. 9). Les deux étaient caractérisés par des niveaux relativement élevés de stigmastérols et de stigmastérols, qui ensemble ont contribué à environ 50 % du total des stérols et les deux espèces avaient des taux relativement faibles de cholestérol (< 5%) lorsque comparé à *C. muelleri*.

Par opposition, *Pavlova lutheri*, une espèce qui a produit de faibles taux de croissance de post-larves de pétoncles géants et de pétoncles de baie lorsque combiné avec CHGRA, comparé au régime mélangé Pavlova 459/CHGRA (Milke et al., 2004) a démontré des différences marquées dans la composition en stérols lorsque comparé à deux autres espèces de *Pavlova* à haute performance testées. Particulièrement, *P. lutheri* n'a pas montré de niveaux perceptibles de cholestérol et les trois stérols dominants dans cette souche se classait comme suit : stigmastérol > sitostérol > dinostérol (Fig. 10).

Notre travail précédent a également montré une relation positive entre le taux de croissance des postlarves de pétoncles géants et la concentration de stérols alimentaires (Milke et al., 2004). L'analyse de stérols effectuée dans le cadre de cette étude indique que les postlarves de pétoncles géants montre une augmentation considérable de cholestérol dans leurs tissus en comparaison au régime offert. Donc, aucune différence significative trouvée en pourcentage dans les niveaux de cholestérol des postlarves n'a fourni un régime unialgale de *P. pinguis*, *Pavlova* sp. (CCMP 459), malgré le fait que le contenu en cholestérol de ces régimes variait grandement. On a observé une tendance similaire dans les pétoncles de baie lorsqu'on leur a offert sept régimes binaires ayant des niveaux de cholestérol alimentaire très différents.

Fig. 9. Comparaison de la composition des stérols dans trois microalgues utilisées dans des études nutritionnelles des pétoncles: *Chaetoceros muelleri*, *Pavlova pinguis* and *Pavlova* spp. (CCMP459).

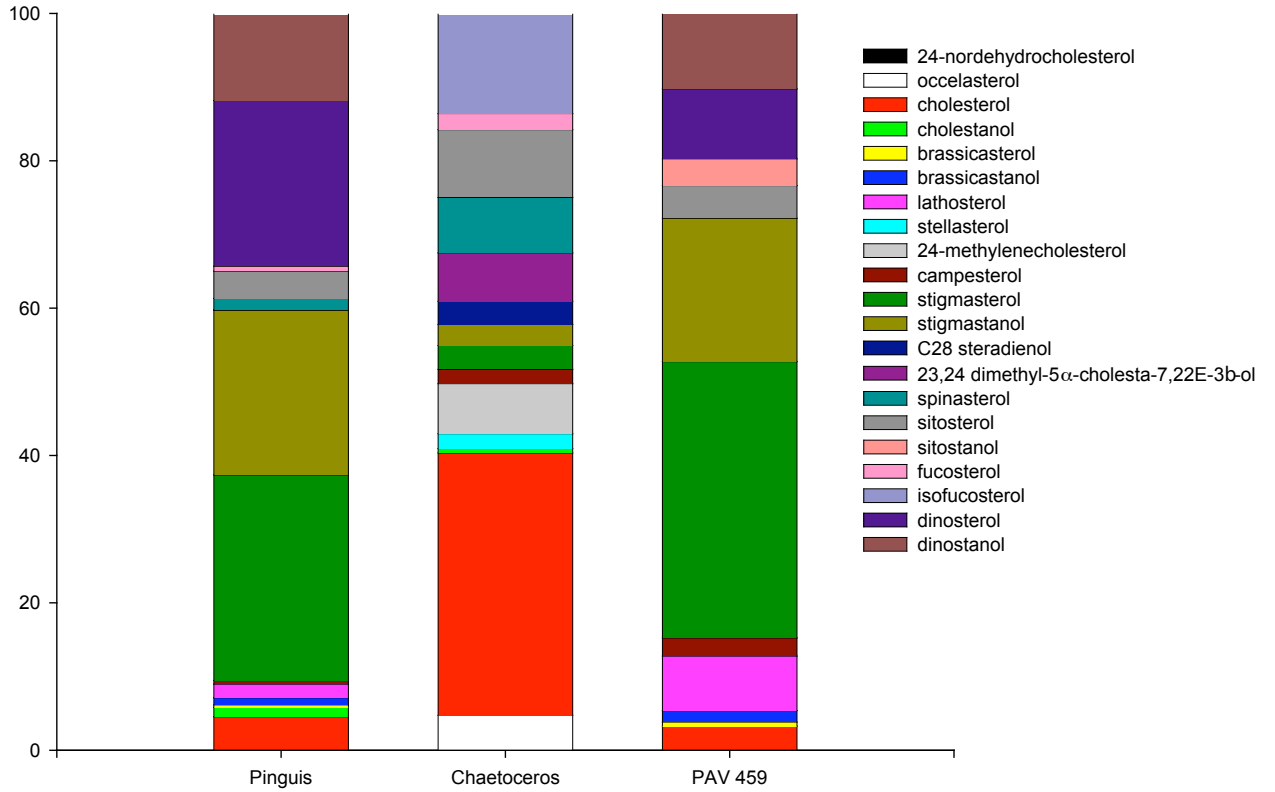
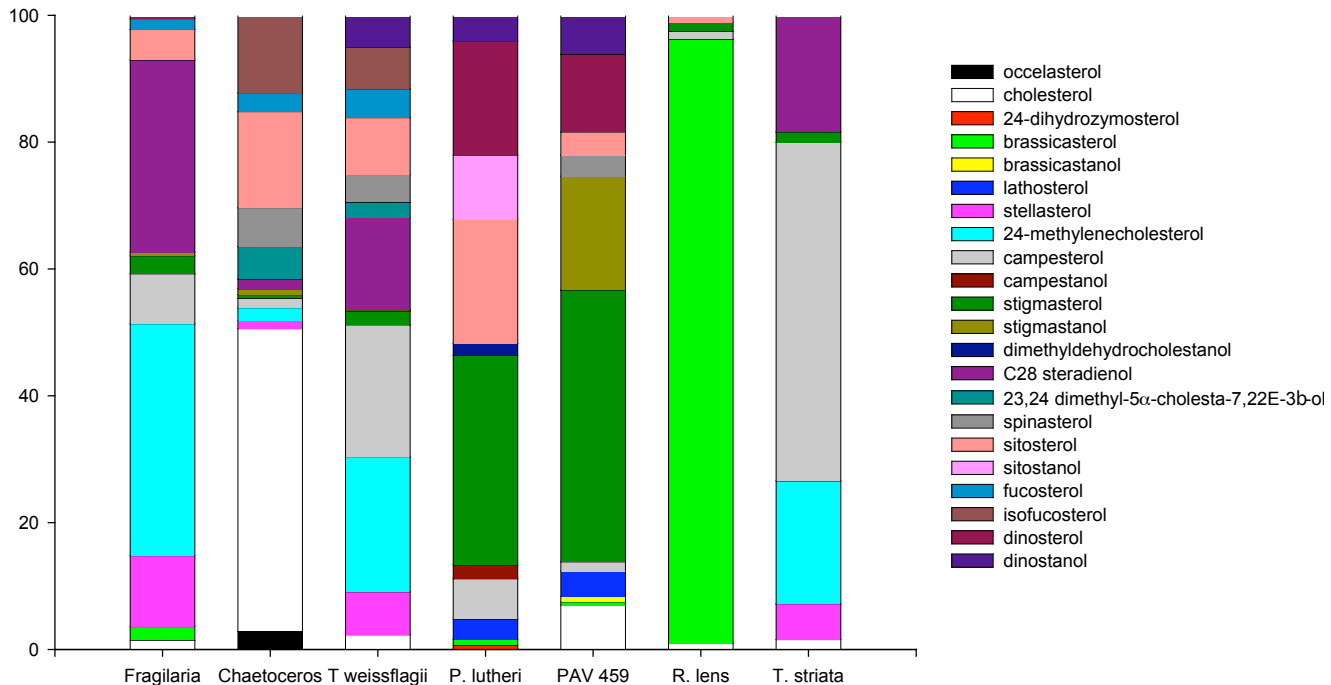


Fig. 10. Composition des stérols dans trois microalgues utilisées dans des études nutritionnelles des pétoncles: *Fragilaria famolica*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Pavlova lutheri*, *Pavlova* sp. (CCMP 459), *Rhodomonas lens* et *Tetraselmis striata*.



## Références

- Baker, S.M., Mann, R., 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181, 239-253.
- Couturier, C., Dabinett, P., Lanteigne, M., 1995. Scallop culture in Atlantic Canada. In: Boghen, A.D. (Ed.), *Cold-water aquaculture in Atlantic Canada*. The canadian institute for research on regional development, Moncton, pp. 297-340.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 163-179.
- Elston, R.A., 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J. World Maricult. Soc.* 14, 284-300.
- Feindel, S.C., 2000. Optimization of hatchery cultures of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791): dietary lipid quality and fatty acid requirements. Memorial University, St. John's, Newfoundland, Canada.

- Fitt, W.K., Coon, S.L., Walch, M., Weiner, R.M., Colwell, R.R., Bonar, D.B., 1990. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar. Biol.* 106, 389-394.
- Fitt, W.K., Labare, M.P., Fuqua, W.C., Walch, M., Coon, S.L., Bonar, D.B., Colwell, R.R., Weiner, R.M., 1989. Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 17, 287-298.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Gallager, S.M., Mann, R., Sasaki, G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56, 81-103.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 29-60.
- Holland, D.L., Spencer, B.E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53, 287-298.
- Le Pennec, M., 1997. Molluscan bivalve hatcheries: Directions for use. *Bull. Aquac. Assoc. Can.* 97, 31-37.
- Milke, L., V.M. Bricelj and C. Parrish, 2004. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture*, 234, 1-4:293-317.
- Neima, P.G., Kenchington, E., 1997. Report on commercial scallop hatchery design. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2176, pp. 55.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67-76.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, pp. 5-20.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 73-86.
- Pernet, F., Tremblay, R., Bourget, E., 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: larval rearing, competency and settlement. *J. Shellfish Res.* 22, 377-388.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., Roussy, M., 2003c. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture* 221, 393-406.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Rodriguez, J.L., Sedano, F.J., Garcia-Martin, L.O., Perez-Camacho, A., Sanchez, J.L., 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Mar. Biol.* 106, 109-111.

- Sainz, J.C., Maeda-Martínez, A.N., Ascencio, F., 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb. Ecol.* 35, 188-192.
- Samain, J.F., Cochard, J.C., Chevelot, L., Daniel, J.Y., Jeanthon, C., Le Coz, J.R., Marty, Y., Moal, J., Prieur, D., Salaun, M., 1987. Effet de la qualité de l'eau sur la croissance larvaire de *Pecten maximus* en éclosion: observations préliminaires. *Haliotis* 16, 363-381.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D., Muroga, K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 33, 111-118.
- Sutton, D.C., Garrick, R., 1993. Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 16, 47-53.
- Veniot, A., Bricelj, V.M., Beninger, P., 2003. Ontogenic changes in gill morphology and potential significance for food acquisition in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Mar. Biol.* 142, 123-131.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128, 219-240.
- Wang, C., Côté, J., Joncas, P.A., Miller, J., 2002. Travaux en éclosion et opérations d'élevage de la compagnie Pec-Nord, Compte rendu du programme REPERE II. Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec (MAPAQ), pp. 50-55.