



**Ifremer**

## **RAPPORT DE STAGE**

présenté par

**Lucien Thuillier**  
**Promotion (2008-2009)**

OPTIMISATION DE L'INCUBATION DU PARAHA PEUE (*Platax orbicularis*)



Pour l'obtention du :  
**DIPLOME DE CADRE TECHNIQUE EN AQUACULTURE**  
délivré par :  
le Conservatoire national des arts et métiers (Cnam)

Stage placé sous la responsabilité de Eric Gasset,  
effectué du 02/03/09 au 12/06/09, à IFREMER, Tahiti  
Centre Océanologique du Pacifique  
98719 Taravao, Tahiti

# Sommaire

<b>Remerciement</b>	<b>2</b>
<b>Introduction</b>	<b>3</b>
<b>1. Présentation générale</b>	<b>5</b>
A. <i>Présentation de l'organisme d'accueil</i>	5
1. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (Ifremer)	5
2. Le Centre Océanologique du Pacifique	5
3. Activité pisciculture	6
4. Le Centre Technique Aquacole	6
B. <i>Le Paraha Peue</i>	7
C. <i>Etat de l'art zootechnique</i>	8
1. Géniteurs	8
2. Elevage larvaire	9
3. Sevrage et alevinage	10
4. Grossissement	10
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>12</b>
A. <i>Matériel</i>	12
1. Les œufs	12
2. Les installations	13
B. <i>Méthodes</i>	15
1. Récolte des œufs et élimination des œufs non fécondés	15
2. Comptage	15
3. Tests statistiques	16
4. Incubation et mise en élevage	17
<b>3. Résultats</b>	<b>18</b>
A. <i>Comptage</i>	18
1. Oeufs	18
2. Larves	19
B. <i>Incubation</i>	21
1. Répétitivité des résultats	21
2. Eclosion témoin	22
<b>4. Discussion et conclusion</b>	<b>24</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>29</b>
<b>Annexe</b>	<b>30</b>
<i>Annexe 1 : Tests statistiques utilisés</i>	30
1. Khi 2 ( $X^2$ ):	30
2. Comparaison de moyenne et de variance :	30
<i>Annexe 2 : Protocole de mise en incubation en puits</i>	31
<i>Annexe 3 : Protocole de mise en incubation directe</i>	32

## Remerciement

Je remercie Eric Gasset pour sa gentillesse, sa patience et pour avoir partagé son expérience et son savoir-faire.

Je remercie aussi toute l'équipe du Service de la Pêche pour leur accueil et pour m'avoir intégré dans leur équipe.

Je remercie l'ensemble du personnel du COP, sans oublier les gardiens et William, pour leur accueil et pour m'avoir permis de passer un excellent stage dans leurs murs.

# Introduction

L'aquaculture en Polynésie française s'intègre dans une longue tradition de pêche où le poisson est véritablement au cœur de la culture polynésienne. Néanmoins, l'historique de la pisciculture en Polynésie est difficile, les différents projets menés par des investisseurs privés ou publics connaissent de nombreuses difficultés.

C'est dans ce cadre qu'après des essais sur de nombreuses espèces, le service de la pêche polynésien (SPE) en accord avec Ifremer a décidé de recentrer les recherches sur une espèce lagonaire locale, le Paraha Peue (*platax orbicularis*). Tous les efforts sont aujourd'hui centrés sur cette espèce qui bénéficie localement d'une image très positive. Les efforts sont consentis aussi bien sur la recherche appliquée et la maîtrise technique de l'élevage, que sur l'encadrement et l'aide au lancement de la filière de production du Paraha peu.

Le marché local étant restreint, les chances qu'une éclosion privée trouve sa place et perdure sur le territoire polynésien sont limitées. La fourniture des producteurs en alevins de qualité revient donc au service de la pêche. Pour remplir cet objectif, le territoire va se doter (2010) du Centre Technique Aquacole dans lequel sera produit les alevins qui alimenteront la filière. La production d'alevins de qualité est donc au centre du démarrage de la filière de production.

L'incubation et les premiers stades larvaires sont un aspect très important dans la production d'alevins. En effet ces premières phases conditionnent la poursuite de l'élevage. En effet, durant cette période de l'élevage, la larve vit sur ses réserves vitellines jusqu'à l'ouverture de la bouche. Durant cette période le développement de la larve est très rapide. L'animal met en place un grand nombre de mécanismes lourds. La mise en place du système digestif et l'ouverture de la bouche est un aspect très important du développement des larves. En effet, il conditionne la bonne entrée en alimentation du poisson et par conséquent le démarrage de l'élevage larvaire. La larve en pleine transformation durant cette période est donc particulièrement fragile. C'est durant cette période que les mortalités les plus importantes sont enregistrées. Il est donc essentiel de maîtriser la technique de production et de limiter le stress des larves durant ces phases les plus délicates. Il en dépend la survie immédiate mais aussi le développement futur des larves.

Jusqu'à présent l'incubation est menée de manière conventionnelle en incubateur. Les œufs sont déposés dans l'incubateur durant 24 heures. La récupération des larves n'est jamais complète, en effet le comportement de celles-ci rend leur récupération à la surface difficile. Les larves sont ensuite comptées puis réparties dans les bassins d'élevage. Des doutes ont été émis sur cette méthode. En effet dans certain cas, la répartition des larves dans les bassins larvaires s'est montrée imprécise du fait de la difficulté de comptage et de répartition des larves. Cette méthode soulève aussi des doutes sur l'impact de la manipulation sur les larves juste écloses.

Pour réaliser certains protocoles d'élevage larvaire, il pourrait être préférable de mener l'incubation des œufs directement dans les bassins d'élevage. C'est le cas notamment lorsque l'objectif de la phase larvaire est la production de familles, où chaque bassin reçoit une ponte différente. Dans ce cas précis, soit nous disposons d'un grand nombre d'incubateurs expérimentaux, soit l'incubation est réalisée directement dans les bassins d'élevage.

D'après la bibliographie, la mise en place de cette méthode permettra d'envisager un gain de précision et d'efficacité dans la répartition des larves au début de l'élevage larvaire. En effet, d'après Chatain (94) le comptage des œufs est bien plus précis que le comptage des larves plus fragiles et plus difficilement homogénéisables.

De plus il est à espérer un gain de qualité des larves découlant du fait que les larves ne sont jamais manipulées après l'éclosion. Il a été mis en évidence, que les malformations squelettiques, operculaire et de la mâchoire seraient une conséquence de carences en Hypovitaminose C ou une Hypervitaminose D. Les conditions d'élevages auraient selon Chatain (94) un effet aggravant sur ce terrain favorable aux malformations. Des études plus récentes (Verhaegen, 2007 et Koumoundouros, 2007) en démontrant l'indépendance des cotés des malformations avancent que ces malformations seraient d'origine environnementale, et plus particulièrement de stress ou lésion subit durant les premiers stades larvaires. Ces travaux démontrent l'influence certaine, directe ou indirecte, des conditions d'élevage larvaire en général et particulièrement lors des premiers stades.

L'incubation dite « directe » en bassin larvaire pose néanmoins quelques problèmes. Les larves ne sont jamais manipulées et comptées, il nous est impossible de connaître la population du bassin et le taux d'éclosion de la ponte. Une éclosion en bassin larvaire implique une pollution de l'enceinte d'élevage. Comme précédemment décrit, les larves justes écloses sont par nature très fragiles. Il est donc important de surveiller l'évacuation des déchets de l'éclosion (coquilles vides, œufs non-éclos, ...) qui pourraient altérer la qualité de l'eau et avoir des conséquences sur le développement des larves.

la mise en place de cette méthode soulève plusieurs points :

- Précision de la méthode : L'incubation directe engendre t'elle une mise en élevage plus précise des larves en début d 'élevage ? Cette précision est-elle la conséquence d'une meilleure maîtrise de la méthode? Ou découle t'elle du fait que les œufs peuvent être comptés plus facilement que les larves, tel que décrit dans la bibliographie ?
- Eclosion témoin : Est-il possible de mettre en place une méthode d'incubation qui ferait office de témoin ? Le taux d'éclosion de ce témoin sera extrapolé à la population des bassins larvaires et permettrait de connaître la population des bassins.
- L'évacuation des déchets de l'éclosion : La pollution induite par l'éclosion est-elle gênante pour le développement des larves ? Et si oui peut-on récupérer les déchets rapidement ?

# 1. Présentation générale

## A. Présentation de l'organisme d'accueil

### 1. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (Ifremer)

L'Ifremer est un organisme public de recherche. L'institut emploie 1500 personnes répartis sur cinq grands centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), 26 implantations et quatre navires hauturiers en France métropolitaine et dans les DOM-TOM. L'Ifremer possède un budget annuel de 235 millions d'euros. L'institut a pour mission de conduire et de promouvoir des recherches fondamentales et appliquées, des activités d'expertise et de surveillance et des actions de développement technologique et industriel (site Ifremer). Six grands thèmes ont été créés :

- ❖ Grands équipements au service de l'océanographie
- ❖ Surveillance, usage et mise en valeur des zones côtières
- ❖ Surveillance et optimisation des ressources aquacoles
- ❖ Ressource halieutiques, exploitation durable et valorisation
- ❖ Exploration et exploitation des fonds océaniques et de leur biodiversité
- ❖ Circulation et écosystème marin, mécanisme, évolution et prévision

L'action poisson lagonaire sous la responsabilité d'Eric Gasset est intégrée au reste des activités scientifiques d'Ifremer en Outre mer mais aussi en métropole. Le responsable d'une action travaille donc en collaboration avec les responsables des autres actions au sein de son projet.

- ▶ **Thème :** Surveillance et optimisation des ressources aquacoles
- ▶ **programme :** Aquaculture durable
- ▶ **Projet :** Développement durable de la pisciculture d'outre mer
- ▶ **Action :** Poissons lagonaires

## 2. Le Centre Océanologique du Pacifique

Le Centre Océanologique du Pacifique (COP), implantation de l'Ifremer en Polynésie française a été créée en 1972 à Vairao sur la presqu'île de Tahiti. Il a pour vocation essentielle la recherche appliquée au développement de l'aquaculture tropicale, le soutien technique et l'expertise scientifique aux filières de productions aquacoles (site Ifremer). Le COP s'étend sur 7 ha et possède de 2.5 ha de concession maritime. Il héberge 8 agents du service de la pêche, 1 agent du service de la perliculture et 46 employés Ifremer divisés en trois unités : Le service technique et logistique, le service administratif et financier et le département aquaculture en Polynésie (Aquapoly). Aquapoly regroupe deux laboratoires, « le Laboratoire Biotechnologie Qualité de la perle » et le « Laboratoire Domestication de l'Huître Perlière »

et l'équipe « Assistance Technique Transfert » dans lequel est intégrée l'action « poissons lagunaires ».

### **3. Activité pisciculture**

L'activité pisciculture au COP est menée en collaboration avec le service de la pêche de Polynésie française (SPE). L'activité est structurée en convention de collaboration signée entre le SPE et l'Ifremer et renouvelée tous les deux ans. L'Ifremer met à disposition du programme les infrastructures et le matériel lourd et en assure le fonctionnement (maintenance, eau, air, électricité...) ainsi que ses services d'expertise. De l'autre côté, le service de la pêche met à disposition du programme, 6 agents, fournit le budget de fonctionnement et assure l'investissement nécessaire au lancement de la filière.

### **4. Le Centre Technique Aquacole**

Jusqu'à présent, la filière polynésienne de crevette était alimentée en juvéniles par l'Écloserie Polyvalente Territoriale (EPT) située à Taravao. Construite en 1992, l'écloserie est désormais vétuste et mal adaptée. La réflexion où le remplacement de cette infrastructure est donc à l'ordre du jour. Tenant compte des futurs besoins de la filière poisson, le SPE envisage de créer le Centre Technique Aquacole qui intégrerait l'écloserie de crevette (ancien EPT) et la nouvelle écloserie de poisson. Cette infrastructure serait localisée à Vairao à côté du COP un terrain récemment acquis par le territoire. Le projet d'environ 400 millions de francs CFP (3,5 millions d'euros) sera opérationnelle en 2010 et fournira les filières « poisson et crevette » en juvéniles.

## B. Le Paraha Peue



Figure 1 : Photo de Paraha Peue

Classe :	Actinoptérygiens
Ordre :	Perciformes
Famille :	Ephippidae

La distribution des populations sauvages de *Platax orbicularis* dans le monde est localisée dans la région Indo-Pacifique, de la mer Rouge jusqu'à l'Afrique de l'est. Sa limite Nord se situe vers le Japon méridional, et au sud jusqu'à l'Australie et la Nouvelle Calédonie (fishbase.org).

Ce poisson fait l'objet de petites productions, notamment à Taiwan, pour le marché de l'aquariophilie.

Dans la zone indo-pacifique, il n'est pas reconnu pour ces qualités gustatives. Dans certains pays (Australie) il est même porteur d'une image très négative notamment associée à sa présence dans les eaux polluées des ports (même image que le mulot en France).

*Platax orbicularis* n'est malheureusement considéré pour la consommation que très localement en Polynésie française, où en revanche, il jouit d'une très grande réputation. La pression de pêche sur ce poisson lagonaire, en a fait une prise très rare, entraînant son prix de vente vers des sommets. En effet, il n'est pas rare que ce poisson se négocie à 4000 francs CFP (32 euros) la pièce de moins d'un kilogramme.

La raréfaction de ce poisson et l'envol de son prix de vente en ont fait un candidat prioritaire pour l'aquaculture polynésienne. De plus, le Paraha peu bénéficie d'une croissance rapide, 1 kg en 12 mois. La technique d'écloserie désormais maîtrisée a permis la production des premiers alevins de qualité irréprochable depuis 2007.

Une étude de marché effectuée en 2002 situe la demande à environ 100 tonnes sur le marché local polynésien. Néanmoins, elle fixe aussi les limites du marché qui s'avère restreint. En effet, la mauvaise image de ce poisson dans le reste de son aire de répartition, les



coûts de production élevés en Polynésie et l'éloignement des archipels polynésiens rendent difficiles l'exportation du produit. Malgré quelques rares niches commerciales étudiées (hôtellerie d'Hawaii,...), la production du poisson et sa commercialisation doivent être orientées sur un marché local limité.

## **C. Etat de l'art zootechnique**

### **1. Géniteurs**

Les géniteurs sauvages pêchés localement sont d'abord stockés en zone de « quarantaine » ou ils subissent une acclimatation. Aucun traitement des rejets n'est réalisé, la quarantaine n'est donc que partielle. Les animaux sont systématiquement testés pour le Nodavirus par qPCR (David, 2007). Les poissons subissent plusieurs traitements anti-parasitaires (bain d'eau douce, eau oxygénée, dessalure). En cas de développement bactérien, sur d'éventuelles lésions du poisson, un traitement antibiotique est assuré. Lorsque l'état sanitaire apparent des poissons semble bon et les analyses Nodavirus négatives, le cheptel est transféré en zone de maturation.

Lorsque les géniteurs arrivent à Vairao, certains ont déjà subi une captivité plus ou moins longue et sont donc déjà plus ou moins sevrés à l'aliment sec. Dans le cas où les poissons sont issus directement de la pêche, la période d'acclimatation fait aussi office de période de sevrage.

Les poissons atteignent la maturité sexuelle à l'âge de un an pour les mâles et un an et demi à deux ans pour les femelles.

L'écloserie expérimentale dispose de 2 lots de poissons matures qui produisent régulièrement des pontes fécondées de bonnes qualités (taux de fécondation supérieur à 80 %).

Les 2 lots de géniteurs pondent de manière naturelle. Néanmoins, la qualité, le volume et la régularité de ces pontes sont aléatoires.

Les pontes issues des deux lots de géniteurs peuvent également être obtenues par inductions environnementales. Des modifications de salinité (dessalures à 10 ‰) durant 5 jours permettent d'obtenir des pontes 36 heures après le retour à une salinité normale (Boichard, 2008).

Cette méthode a pour avantage d'être relativement facile à mettre en place et engendre une qualité de ponte suffisante mais néanmoins inférieure aux pontes naturelles. En effet, le taux de fécondation de ces pontes est plus faible. Cette méthode est utilisée pour chaque besoin impératif en œufs (lancement d'élevage larvaire,...) car elle présente l'avantage de favoriser la « multi-parentalité » de la ponte récupérée.

## 2. Elevage larvaire

La période d'élevage larvaire dure en fonction de la température entre 17 et 22 jours.  
Les phases importantes sont décrites ci-dessous :

<b>Ouverture de la bouche :</b>	J 2
<b>Formation de la vessie natatoire :</b>	J 3 à J 8
<b>Métamorphose :</b>	J 14 à J 16
<b>Alimentation :</b>	confère le graphe ci-dessous :

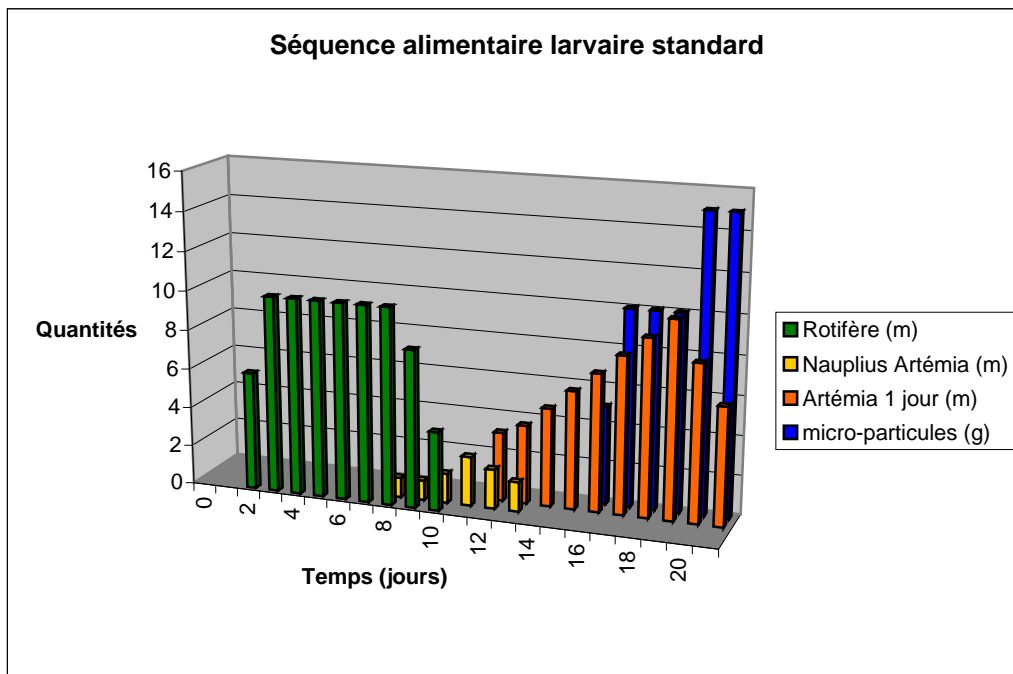


Figure 2 : Séquence alimentaire larvaire

De nombreuses autres séquences sont testées à partir de ce modèle alimentaire standard. En opposition à ce modèle dit « long », il existe un autre grand type de séquences dites « courtes ». La distribution de nauplius d'Artémia peut alors être avancée à J 3, à l'ouverture de la bouche. Cette distribution précoce d'Artémia engendre une meilleure croissance globale, néanmoins elle engendre une forte disparité du lot et des survies moindres. Le taux de survie larvaire moyen est de 35% avec la méthode de référence.

### 3. Sevrage et alevinage

Lorsque les poissons ont atteint une taille suffisante (100 mg), ils sont transférés dans la zone de sevrage. Durant cette période, les proies vivantes (*Artémia*) sont progressivement remplacées par de l'aliment sec inerte (micro-particules).

Jusqu'à cette phase, les poissons n'ont jamais été triés, la dispersion du lot est donc importante (CV pondéral de l'ordre de 40 %). Durant cette période les poissons vont être triés, le plus souvent, la tête et la queue de lot seront éliminées. Néanmoins pour les besoins de certaines manipulations les critères de tris peuvent être modifiés. En effet, comme le démontre des travaux récents (Gasset, 2009) les tris semblent avoir une influence importante sur le sex-ratio et la croissance.

Les animaux atteignent le poids de 8 grammes en environ 35 jours à 27°C. Ils sont alors transférés en cages dans le lagon.

Le taux de survie sur cette période est d'environ 90 %.

### 4. Grossissement

Les alevins sevrés sont transférés en cages à un poids moyen de 8 grammes. Le programme dispose de 3 structures de cages, pouvant accueillir 4 cages de 16 m<sup>3</sup> chacune, prochainement remplacées par une structure Cubi-system®.

Les poissons sont nourris à satiété afin d'établir les tables de nourrissage. Le Paraha Peue atteint le poids d'un kilo après 10 mois d'élevage en cage. L'indice de conversion est encore à l'étude mais il semble être de 1,5 sur la période d'élevage en cage dans le lagon.

La figure suivante illustre l'amélioration de la croissance qui découle d'une meilleure maîtrise de la technique de production.

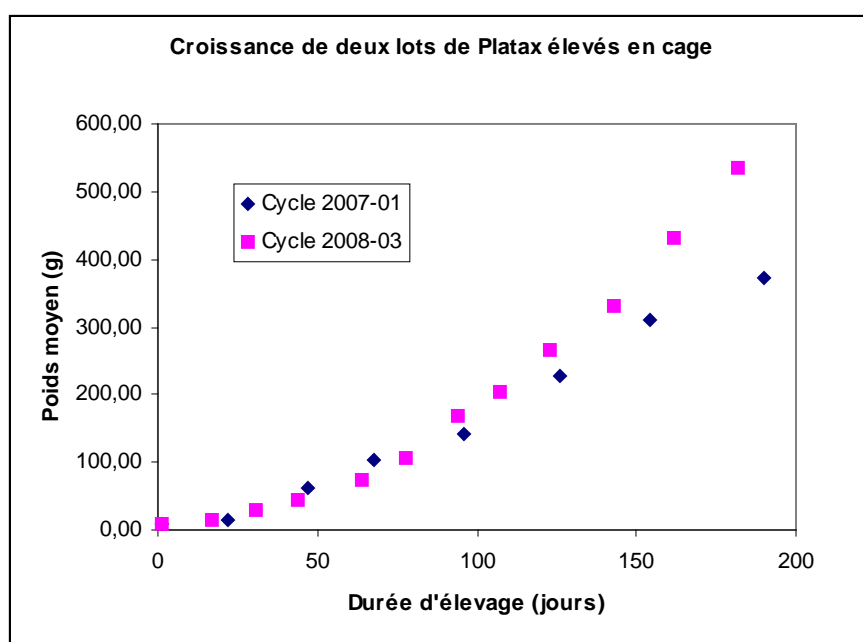


Figure 3 : Courbe de croissance de deux lots de Platax élevés en cage

Les problèmes viraux et bactériologiques ne sont plus à craindre sur la partie élevage en cages, notamment grâce à la bio-sécurisation de l'écloserie. Néanmoins de nombreux problèmes parasitaires ont été à déplorer. Grâce à la mise en place de traitements curatifs puis préventifs à l'eau oxygénée, les mortalités dues au *Néobenedenia* ont été enrayerées.

La phase de grossissement bénéficie aussi de l'expertise Ifremer par l'intermédiaire du département « Sciences et Techniques Alimentaires » de Nantes. Les recherches ont permis de caractériser la qualité du Platax issu d'aquaculture dans le but d'accompagner le développement de la filière de production. Les études ont entre autres mis en évidence le bon rendement au filetage (52% : parés ) ou encore la faible teneur en lipide de la chair du poisson (7% avec la barbe). Au niveau sensoriel, la comparaison effectuée avec d'autres espèces (thon, dorade coryphène, saint-pierre, bar et daurade royale d'élevage) permet de positionner le Platax comme plus proche de la daurade et du bar. Autant d'informations utiles aux producteurs lors de la mise sur le marché du produit et sur le suivi dans le temps de l'évolution de la qualité des animaux produits.

## 2. Matériel et méthodes

### A. Matériel

#### 1. Les œufs



Figure 4 : Œufs de Platax fécondés

Les pontes utilisées lors de mon stage présentent des origines et des caractéristiques différentes en fonction du lot :

- Le lot 7, constitué de 6 femelles et 8 mâles sauvages issus de trois origines géographiques. Le poids moyen de ce lot est de 2,3 kg. Le lot produit une moyenne de 230 000 œufs par ponte, fécondés à 85 %. Ce lot a produit 62 pontes naturelles depuis le 22/11/2008 .

- Le lot G1C constitué de 6 mâles et 8 femelles nés en captivité en 2004. Le poids moyen de ce lot est de 1,9 kg. Le lot produit une moyenne de 148 000 œufs par ponte, fécondés à 48 %. Ce lot a produit 66 pontes naturelles .

Le nombre de pontes des deux lots est comparable. Les pontes issues du lot 7 sont significativement de meilleure qualité (volume et taux de fécondation) que les pontes du lot G1C.

Néanmoins les pontes sont utilisées pour nos expérimentations sans distinction du lot d'origine. En effet, une seule ponte est utilisée par expérimentation et aucune comparaison inter ponte n'est effectuée au cours de notre travail. Ainsi l'effet « origine » n'a aucune influence sur les expérimentations et les résultats obtenus.

Pour les mêmes raisons la méthode d'induction elle non plus ne fait pas l'objet de distinction lors de l'utilisation d'une ponte.

## 2. Les installations

### a. L'eau

Le circuit d'eau est entièrement ouvert. L'eau passe par un filtre à coquillage puis dans deux filtres à sable de granulométrie 0.9 à 1.6 mm, par 2 filtres à poches de 25 et 10  $\mu\text{m}$  et par un réacteur UV.

### b. Géniteur

Les deux lots de géniteurs sont maintenus dans des bassins circulaires de 7,7 m<sup>3</sup> renouvelés à 25 % par heure. Ils sont alimentés à satiété sur self-feeder et la photopériode est calquée sur le rythme naturel.

### c. Incubation

#### d.

La zone d'incubation est dotée de deux incubateurs cylindro-coniques de 200 litres. L'eau est évacuée par le centre grâce à un tamis de 220  $\mu\text{m}$ .



Figure 5 : incubateur de 200 litres

Des incubateurs expérimentaux de plus petites dimensions (50 litres cylindro-coniques) seront utilisés lors de nos essais.

e. Elevage larvaire

La salle larvaire est équipée de 8 bassins cylindro-coniques de 250 litres alimentés en eau par une cuve de mise en charge de 250 litres. Les bassins sont tous équipés de débitmètres sur les arrivées d'eau et d'air.



Figure 6 : Salle larvaire

Figure 7 : Bassin larvaire

## **B. Méthodes**

### **1. Récolte des œufs et élimination des œufs non fécondés**

Les œufs flottants sont récoltés dans un panier en maille à la sortie de la sur-verse du bassin de géniteurs.

Les œufs sont ensuite récupérés dans un seau. Après quelques minutes, les œufs fécondés et flottants sont récupérés par écrémage à l'aide d'un bêcheur.

### **2. Comptage**

#### a. Comptage standard :

##### i. Œufs

Les œufs sont homogénéisés dans un seau de 8 litres avec un bullage d'environ 3 l.min<sup>-1</sup>. Six prélèvements de 2,5 ml sont effectués, à l'aide d'une pipette, et comptés sur cuve de doffuss sous la loupe binoculaire. Les valeurs jugées extrêmes par l'opérateur sont écartées et un nouveau prélèvement est effectué. Le nombre d'œufs total et le taux de fécondation est extrapolé au volume total.

##### ii. Larves

Les larves sont placées dans un volume de 20 litres où elles sont brassées avec un bullage (débit non connu). Six prélèvements de 5 ml sont effectués avec une pipette et comptés sur cuve de doffuss sous la loupe binoculaire. Les valeurs jugées extrêmes par l'opérateur sont écartées et un nouveau prélèvement est effectué. Le nombre total de larves est extrapolé de ces 6 prélèvements.

#### b. Proposition d'amélioration de ces méthodes :

##### i. Œufs

Plusieurs paramètres sont testés afin d'optimiser la méthode :

- Le volume des prélèvements : 2,5 ml et 5 ml
- Le nombre de prélèvements : 6 et 16

##### ii. Larves

Afin d'optimiser le comptage, plusieurs facteurs sont analysés :

- La répartition des larves dans le volume : plusieurs méthodes de d'homogénéisation sont testées : le bêcheur et le bullage

Le brassage avec un bullage est testé avec plusieurs débits d'air : 150, 250 et 500 ml.min<sup>-1</sup>. Une série de 16 prélèvements est réalisée 10 minutes après la mise en place de chaque débit.

La répartition avec le bêcheur est créée à la suite de 20 mouvements identiques de brassage réalisés par le même opérateur avec un bêcheur d'un litre. Une série de 16 prélèvements est rapidement réalisée après le brassage.



En parallèle de ces comptages, 2 fois 30 larves sont disposées dans deux béchers après chaque traitement, en même temps que les comptages. Ces larves sont laissées au noir et le suivi des mortalités est réalisé durant 48 heures.

- Le volume de prélèvement : Différents volumes de prélèvement sont testés : la pipette de 5 ml, le pilulier de 16,5 ml



Figure 8 : Piluliers de 16,5 ml

### 3. Tests statistiques

Afin de vérifier l'homogénéité des prélèvements, les séries d'échantillons sont systématiquement soumises au test du KHI 2 (Elliot, 70). Le test du khi 2 permet de tester l'hypothèse « l'échantillon est homogène » mais le calcul de ce paramètre fournit aussi un indice de dispersion. (Voir annexe 1).

Les comparaisons de moyennes (tableaux 10, 11, 13) ainsi que les analyses de variances (tableaux 3, 5, 6) sont réalisées avec le logiciel XL STAT. Les analyses de variances sont utilisées dans le cas de comparaison des paramètres de dispersion.

Le test khi 2 est utilisé pour comparer la réponse à un traitement (tableaux 3, 4, 5)

Dans certain cas, lorsque l'une des séries comparées ne compte qu'une valeur, les comparaisons de moyenne ou de dispersions sont réalisées en fonction des intervalles de confiance et des différents paramètres de dispersion. Cette méthode est aussi utilisée lorsque la comparaison de variance ou de moyenne s'avère mal adaptée.

## 4. Incubation et mise en élevage

### a. Méthode en place

Les pontes sont comptées selon le protocole habituel décrit plus haut. Le bullage dans le seau de comptage est arrêté et la partie fécondée, flottante des œufs est récupérée et mise en incubation dans un incubateur de 200 litres. Le volume est renouvelé à 24 % par heure, soit  $0,8 \text{ l.min}^{-1}$ . L'éclosion chez *Platax* intervient 26 heures après la ponte (à  $26^\circ\text{C}$ ).

Le lendemain, après l'éclosion le bullage est arrêté et le bac couvert. Après 10 minutes les larves, en partie concentrées à la surface sont récoltées à l'aide d'un bêcheur et mises dans un volume de 20 litres.

Une fois dans le volume de 20 litres, les larves sont comptées selon la méthode précédemment décrite. Elles sont ensuite réparties dans les bacs larvaires. Pour ce faire l'homogénéité est maintenue au maximum et, à l'aide d'un bêcheur, les larves sont réparties dans les bacs larvaires.

Pour obtenir une bonne répartition il est important de maintenir l'homogénéité dans le volume initial. Afin de s'assurer que la mise en élevage est homogène une répartition en quatre parts égales a été testée. Le volume de 20 L est homogénéisé par bullage selon la méthode décrite par le protocole. La répartition dans les seaux est ensuite réalisée par série de prélèvements d'un litre. Cinq séries de prélèvements sont donc effectuées. Les seaux sont ensuite comptés par la méthode de comptage des larves.

### b. Proposition d'amélioration grâce à la mise en incubation directe en bassin larvaire

Les œufs sont déposés directement dans les bassins larvaires, le renouvellement réglé à  $1 \text{ l.min}^{-1}$  (24% du volume par heure) et le débit d'air à  $0.15 \text{ l.min}^{-1}$ . L'incubation se déroule au noir.

Une incubation directe nécessite des témoins d'éclosion. Pour se faire, plusieurs méthodes ont été testées :

- Incubation en 200 litres : L'incubation suit la méthode conventionnelle.
- Incubation en 50 litres : Les œufs sont déposés dans le volume. Le renouvellement est de 48 % par heure ( $0.4 \text{ l.min}^{-1}$ ) et le débit d'air de  $0,5 \text{ l.min}^{-1}$ .
- Incubation en micro-puit de 2 ml : L'incubation individuelle en puits suit le protocole joint en annexe 2.

### 3. Résultats

#### A. Comptage

##### 1. Oeufs

Différentes méthodes de comptage, principalement accès sur le mode de prélèvement, ont été testées.

Le tableau 1 présente les résultats du test de l'effet volume du prélèvement sur les comptages.

Tableau 1 : Moyennes et paramètres de dispersion de deux séries de prélèvements

Type de prélèvement	6 X 2,5ml	6 X 5ml
Effectif compté $\pm$ Intervalle de confiance	153 000 $\pm$ 21 000	157 000 $\pm$ 7500
Coefficient de variation (%)	19	7
Khi 2 / Khi 2 max. (%)	59	27

Les paramètres de dispersion sont meilleurs pour la série de prélèvement de 5 ml.

Les paramètres de dispersion obtenus sur les 4 volumes de prélèvements testés sont présentés dans le tableau 2. Ils sont issus de 7 séries de prélèvements.

Tableau 2 : Moyenne des paramètres de dispersion

Type de prélèvement	6 X 2,5ml	6 X 5ml	16 X 2,5ml	16 X 5ml
Coefficient de variation (%)	18	8	16	7
Intervalle de confiance / moyenne (%)	14	6	8	4
Khi 2 / Khi 2 max. (%)	69	33	71	41

Les paramètres de dispersions des séries d'échantillons de 5 ml sont meilleurs, pour un même nombre de prélèvements, que les séries d'échantillons de 2,5 ml.

La différence entre les séries d'échantillons de même volume mais d'effectifs différents n'est pas significative.

## 2. Larves

Le tableau 3 présente l'ensemble des résultats des tests d'homogénéité obtenus lors des essais de brassage à l'aide des différents bullages.

Tableau 3 : Paramètre de dispersion des séries de prélèvements et mortalité à 48 heures en fonction du débit d'air

Débit d'air	témoin	150 ml. min <sup>-1</sup>	250 ml. min <sup>-1</sup>	500 ml. min <sup>-1</sup>
Moyenne ± intervalle de confiance		20,1 ± 2,4	20,6 ± 2,8	19,3 ± 2,4
Coefficient de variation (%)		24	28	25
test khi 2 (valeur)		Oui ( 17,6 )	Oui ( 23,9 )	Oui ( 18,1 )
Mortalité moyenne ± intervalle de confiance	6,6 ± 6,2	7,3 ± 7,5	13,4 ± 1,7	20,0 ± 7,2

Les paramètres de dispersion des différents débits ( 250 et 500 ml.min<sup>-1</sup>) ne sont pas significativement différents du débit minimum (analyse de variance : *p*-value 0,524 et 1).

En revanche la mortalité à 48 heures du témoin est significativement différente (tableau 4) de celle du débit d'air le plus élevé ( khi 2 : 4,34 ; ddl :1).

Tableau 4 : Comparaison de moyennes et significativité des différences

Débit d'air	témoin	150 ml. min <sup>-1</sup>	250 ml. min <sup>-1</sup>	500 ml. min <sup>-1</sup>
Comparaison de moyenne (khi 2)	Référence	non significative (0,24)	non significative (2,41)	significative (4,34)

La mortalité engendrée par le bullage de 500 ml.min<sup>-1</sup> est significativement différente du témoin. Même si la mortalité engendrée par le bullage de 250 ml.min<sup>-1</sup> n'est pas significativement différente, on remarque une tendance.

Les résultats de la comparaison de cette méthode d'homogénéisation des larves (bullage à 150 ml.min<sup>-1</sup>) à un brassage au bêcheur sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres de dispersion des séries de prélèvements et mortalité en fonction de la méthode d'homogénéisation

Méthode d'homogénéisation	témoin	150 ml. min <sup>-1</sup>	bêcheur
Moyenne ± intervalle de confiance		12,3 ± 2,0	16,3 ± 1,9
Coefficient de variation (%)		32	24
Test KI 2 (valeur)		oui (14,17)	oui ( 17,43)
Mortalité moyenne ± intervalle de confiance (%)	9,0 ± 2,6	5,6 ± 3,6	1,9 ± 3,7

Les mortalités ne sont pas significativement différentes du témoin (khi 2 : 0,53 et 2,4). La répartition créée avec le bêcheur n'est pas significativement meilleure que celle créée par le bullage (p-value : 0,974).

Dans un deuxième temps, le volume du prélèvement a été testé. Le résultat des prélèvements réalisés à la pipette de 5 ml et au pilulier de 16,5 ml est donné dans le tableau 6.

Tableau 6 : Paramètres de dispersion des séries de prélèvements en fonction de la méthode de prélèvement

Méthode de prélèvement	pipette 5 ml	pilulier 16,5 ml
Moyenne ± intervalle de confiance	8,7 ± 1,4	24,7 ± 1,8
Coefficient de variation (%)	33	15
Khi 2	14,4	8,2

L'intervalle de confiance est plus faible pour les séries de prélèvements de 16,5 ml. De plus, les autres paramètres de dispersion sont également meilleurs lors de l'utilisation du pilulier. Les variances sont significativement meilleures pour le pilulier (p-value : 0.023).

## B. Incubation

### 1. Répétitivité des résultats

Le tableau 7 présente les résultats du test de répartition d'un volume de 20 litres de larves au bêcheur dans 4 seaux de 5 litres (protocole n°3) :

Tableau 7 : Nombre de larves par seau.

Nombre de répétition	Seau 1	Seau 2	Seau 3	Seau 4
Moyenne $\pm$ intervalle de confiance	32,3 $\pm$ 2,7	30,0 $\pm$ 2,0	30,7 $\pm$ 2,9	30,3 $\pm$ 2,8
Nombre d'individus $\pm$ intervalle de confiance	8795 $\pm$ 726	8182 $\pm$ 535	8369 $\pm$ 791	8267 $\pm$ 763

Le nombre d'individus par seau n'est pas significativement différent.

Le tableau 8 présente la répétitivité des résultats dans les bassins larvaires après la mise en incubation directe.

Tableau 8 : Nombre de larves par bac

	Bassin 1	Bassin 2	Bassin 3	Bassin 4
Moyenne $\pm$ intervalle de confiance	15 091 $\pm$ 1 275	14 121 $\pm$ 1 561	16 182 $\pm$ 1 433	14 727 $\pm$ 1 066

Les populations de chaque bassin larvaire ne sont pas significativement différentes. La moyenne des 4 bassins est de 15030  $\pm$  848 larves, soit un CV de l'intervalle de confiance de 5.6 %.

Afin d'apporter une réponse plus précise et plus fiable, la répétitivité des résultats a été analysée à partir d'autres manipulations :

Tableau 9 : Nombres de larves par bassins

	Bassin 1	Bassin 2	Bassin 3
Moyenne $\pm$ intervalle de confiance	8 464 $\pm$ 487	8 665 $\pm$ 962	8 550 $\pm$ 954

Les populations de chaque bassin larvaire ne sont pas significativement différentes. La moyenne des 3 bassins est de 8560  $\pm$  114 larves, soit un CV de l'intervalle de confiance de 1.3 %.

## 2. Eclosion témoin

Les premiers essais d'incubation témoin menés dans des micro-puits comparés aux résultats obtenus en incubateur sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Taux d'éclosion en fonction de la méthode d'incubation

Type d'incubation	puits	incubateur
Eclosions viables %	75,4 ± 22,5	77,6 ± 4

Les taux d'éclosion ne sont pas significativement différents (p-value : 0,846), néanmoins on constate que l'intervalle de confiance de l'éclosion en puits est très important. Six comparaisons de ce type ont été réalisées.

Le tableau 11 présente les résultats du test d'incubation témoin :

Tableau 11 : Comparaison du taux d'éclosion en fonction de la méthode d'incubation

Méthode d'incubation	Bassins larvaires			Incubateurs de 50 litres			Incubateur de 200 litres
Nombre de répétition	1	2	3	1	2	3	1
Nombre d'œufs initial	9375	9375	9375	12500	12500	12500	42614
Nombre de larves obtenues	8464 ± 488	8665 ± 963	8550 ± 953	12900 ± 1015	9528 ± 1096	8780 ± 897	32682 ± 1165
Eclosion (%)	90,3 ± 5,2	92,4 ± 10,3	91,2 ± 10,2	103,2 ± 8,1	76,2 ± 8,8	70,2 ± 7,2	76,6 ± 2,7
Eclosion par méthode (%)	91,3 ± 1,2			83,2 ± 19,9			

Les incubations en bassins larvaires ne sont pas significativement différentes. En revanche une éclosion en incubateur de 50 litres est significativement différente des deux autres.

Le taux d'éclosion des incubateurs de 50 litres n'est pas significativement différent des bassins larvaires (p-value : 0,470).

Le tableau 12 présente les résultats du test d'homogénéité des éclosions témoins.

Tableau 12 : Taux d'éclosion en fonction de la méthode d'incubation

Type d'incubation	incubateurs de 50 litres			incubateur de 200 litres	Micro-plaques
Nombre de répétition	1	2	3	1	6
Nombre d'œufs initial	12500 ± 405	12500 ± 405	12500 ± 405	50000 ± 1620	143
Nombre de larves dénombrées	11 227 ± 790	11 112 ± 1 180	11 602 ± 761	48070 ± 4770	126
Éclosion %	89,8 ± 6,3	88,8 ± 9,4	92,8 ± 6,1	96,1 ± 9,5	88,1

Les incubations en volume de 50 litres ne sont pas significativement différentes.

Les essais suivants ont porté sur une éclosion en bassins larvaires comparée avec les incubateurs de 50 litres

Tableau 13 : Taux d'éclosion en fonction de la méthode d'incubation

Type d'incubation	bassin larvaire 250L				incubateur 50L		
Nombre de répétition	1	2	3	4	1	2	3
moyenne par bac	12 753 ± 1 153	12 005 ± 938	11 947 ± 1 213	10 133 ± 958	9 932 ± 1 308	10 105 ± 1 024	10 421 ± 868
moyenne par méthode	11 709 ± 1 091				10 153 ± 243		
taux d'éclosion par bac	85,0 ± 7,69	80,0 ± 6,25	79,6 ± 8,08	67,6 ± 6,38	79,5 ± 10,47	80,8 ± 8,19	83,4 ± 6,94
taux d'éclosion par méthode	78,1 ± 7,3				81,2 ± 2,0		

Les taux d'éclosions des bassins larvaires et des incubateurs de 50 litres ne sont pas significativement différents (p-value : 0,509).



## 4. Discussion et conclusion

Le bilan des comptages d'œufs réalisés durant mon stage, permet d'orienter le choix de la méthode de prélèvement vers 6 prélèvements de 5 ml. En effet, les paramètres de dispersion sont significativement meilleurs pour les prélèvements les plus volumineux. Quant au nombre de prélèvement il convient de prendre 6 échantillons. En effet les paramètres de dispersion ne sont pas significativement meilleurs. L'effort consenti pour le comptage n'est alors pas justifié. L'augmentation de volume engendre une meilleure précision des comptages. En effet, l'effectif par prélèvement est plus important dans les prélèvements de 5 ml (en moyenne une centaine) que dans ceux de 2,5 ml. Comme décrit dans Elliott (70) et Bouget (88), l'augmentation de l'effectif d'un prélèvement en diminue sa disparité.

Le bullage n'est pas un facteur limitant pour les œufs, il n'est pas nécessaire de le tester.

Il serait intéressant de mettre en place une nouvelle méthode de comptage des œufs par volumétrie. La méthode décrite par Chatain (94) sur le bar et la daurade permet d'espérer un gain de précision. L'erreur relative de la méthode volumétrique n'excède pas  $\pm 7\%$  alors que la méthode d'échantillonnage décrite dans cette étude varie de  $\pm 6$  à  $22\%$ . Néanmoins cette méthode reste plus lente. Il conviendrait donc de conserver la méthode d'échantillonnage pour les comptages de routine et de mettre en place la méthode volumétrique plus précise lorsque ces comptages sont suivis de mise en élevage.

Le comptage des larves est plus délicat que les œufs. La fragilité des larves et leur mobilité rend l'homogénéisation plus difficile à obtenir. Une méthode d'homogénéisation trop brutale peut endommager les larves. Au contraire, une homogénéisation trop faible ne crée pas une bonne répartition des larves.

D'après la bibliographie (Chatain, 94), la répartition au bêcheur engendre une meilleure répartition des larves dans le volume. Le bullage le plus efficace en terme d'homogénéité et de survie des larves ( $150 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) a donc été comparée à un brassage au bêcheur. Néanmoins nous ne retrouvons pas les mêmes progrès significatifs. Le bullage est donc conservé comme méthode d'homogénéisation standard.

Des tests ont aussi été réalisés sur la méthode de prélèvement. Ils nous ont permis de mettre en avant les prélèvements au pilulier de 16,5 ml qui engendrent des échantillons plus homogènes. L'amélioration de la précision est certainement apportée, sur le même principe que les œufs, par l'augmentation du volume de prélèvement qui passe de 5 à 16,5 ml. La méthode de prélèvement par elle-même n'apporte selon Chatain aucune différence de précision.

La méthode d'incubation standard peut être améliorée grâce à l'apport des nouvelles méthodes de comptage. La méthode standard d'incubation n'a pas fait l'objet d'amélioration car les bons résultats obtenus lors des expérimentations n'ont pas soulevé de problèmes particuliers.

En revanche récupération des larves dans l'incubateur pose problème, le taux de récupération des larves est de 51 % en moyenne sur les trois dernières années. En effet, le comportement de montée des larves, lors de l'arrêt du renouvellement et du bullage, dans l'obscurité n'est pas aussi marqué que chez les autres espèces (Bar et Daurade en particulier ; Ounais-Guschemenn, 89). Lors des expérimentations le taux de récupération des larves est de 40 à 70 %. Plusieurs pré-tests (dessalure, lumière, obscurité, hydrodynamisme) n'ont pas donné de résultats assez probants pour justifier la mise en place de tests. La bibliographie (châtain, 94) témoigne d'un comportement de descente des larves chez le loup et la daurade en réponse à un stress pouvant être occasionnée par le bullage. Il faudrait près de 2 heures à l'obscurité pour dissiper les effets du stress. Ce phénomène est peut être à l'origine des difficultés de récupération des larves de platax chez qui ce phénomène est peut être particulièrement exacerbé. Il serait intéressant d'allonger la durée de mise au noir des larves qui pourrait alors récupérer de ce stress et monter à la surface. Néanmoins, la charge importante dans les incubateurs (jusqu'à 1000 oeufs au litre) pourrait engendrer une chute de l'oxygène dans le volume et entraîner des lésions sur les larves en cas d'arrêt prolongé de l'air et de l'eau.. Car même si la biomasse n'est pas importante, les larves sont particulièrement fragiles et la concentration en oxygène dissous à 28°C est déjà faible (7,8 mg.l<sup>-1</sup> à saturation).

Les résultats d'éclosion de l'incubation directe en bassin larvaire semblent être corrects et dans la moyenne des résultats obtenus auparavant ( 67 à 94% d'éclosion). Le taux d'éclosion est fonction de la qualité de la ponte. Les résultats d'éclosion ne sont pas en amélioration avec le temps et la maîtrise de la technique. Aucune constatation de facteurs limitants pouvant être amélioré n'a été faite. Ainsi les différents paramètres d'incubation (débit, bullage,...) n'ont pas fait l'objet de test pour amélioration. Des essais préliminaires avaient en effet permis de s'approcher des optimum.

Le point fort de cette méthode réside dans la répétitivité des résultats comme le montre les tableaux 5 et 6. De plus, elle est en amélioration en fonction du temps, on constate que le coefficient de variation de l'intervalle de confiance de la manipulation du tableau 6 (16 mai) est meilleur que celui du tableau 5 ( 26 mars).

Afin de connaître la population du bassin il est nécessaire de mener en parallèle des incubations témoins à partir desquelles seront extrapolées les taux d'éclosion. Ces incubations témoins se doivent d'être les plus représentatives possible des bassins d'incubation directe. De nombreuses méthodes ont été envisagées :

Les micro-plaques : D'après la bibliographie, il est possible de mener des incubations dans des micro puits de 200 µl (Panini, 2001). Le volume n'étant pas renouvelé durant la période d'incubation, un effort particulier est consenti sur la qualité de l'eau introduite dans les puits. Les tests menés en puits n'ont pas été concluants. En effet, nous ne maîtrisons pas la technique pour que le résultat soit fidèle aux bassins larvaires. Nous ne maîtrisons pas l'ensemble des facteurs influant sur le résultat. En effet, le taux d'éclosion obtenu n'est pas caractéristique de la ponte, il est le résultat d'un trop grand nombre de facteurs non maîtrisés. La qualité de l'eau étant écartée, les variations de température pourraient être à l'origine des problèmes. Le chargement des plaques est une manipulation assez longue, de plus elle a lieu en même temps que la répartition des œufs dans les bassins larvaires. Ces manipulations ont

lieu dans un laboratoire climatisé. Les œufs sont stockés et chargés dans des petits volumes qui ont donc une inertie thermique très faible.

Il n'est pas exclu que durant cette période plus ou moins longue les œufs subissent des variations de température. Il serait judicieux de travailler en bain-marie et de limiter au maximum les écarts de température.

Incubateur de 200 litres : L'incubateur de 200 litres est la méthode standard utilisée depuis longtemps et par conséquent bien maîtrisée. Elle pourrait être utilisée pour l'éclosion témoin. Les essais menés ne sont néanmoins pas toujours concluant. Même si l'éclosion, de par l'effectif important mis en incubation, est précise, les résultats sont parfois significativement différents des bassins larvaires. De plus, il est préférable d'utiliser l'incubateur dans des conditions standards ce qui implique qu'il doit être chargé à densité standard, soit 250 larves au litre (50000 larves). La demande en œufs importante pour chaque utilisation et surtout le nombre d'incubateurs limités empêche la conduite de répliquats.

Incubateur de 50 litres : L'utilisation d'incubateur de 50 litres permet l'utilisation de répliquats. Ainsi les éclosions témoins menées en volume de 50 litres ont fourni des résultats positifs. Dans un premier temps, les résultats se sont montrés aléatoires (tableau 8) néanmoins avec la maîtrise de la méthode, l'homogénéité des résultats s'est améliorée jusqu'à présenter des résultats (tableau 9) homogènes et significativement proches des éclosions en bassins larvaires (p-value :0,136).

Un historique des incubations menées durant mon stage met en évidence la similarité des résultats d'éclosions obtenues en bassins larvaires et en incubateurs de 200 litres. Aucune différence significative ( p-value : 0,503) d'éclosion moyenne n'est remarquée entre la méthode standard et la méthode mise en place.

Néanmoins le gain est ailleurs, la répétitivité des résultats et leur fiabilité sont en effet augmentées grâce à l'incubation directe. Le tableau 9 présente le bilan des paramètres de dispersion des comptages d'œufs et de larves conduits durant mon stage.

Comptage	œufs	larves
Intervalle de confiance / moyenne (%)	8,0	13,9
Coefficient de variation (%)	16,2	28,3
Khi 2	14,2	18,5

On constate que les paramètres de dispersion sont meilleurs pour les comptages d'œufs. En ne comptant et répartissant que les œufs un gain de précision est donc attendu. Les erreurs de comptage, plus fréquentes sur les larves sont donc évitées.

La mise en place de l'incubation directe simplifie la création de famille. En effet, il est possible de mettre en élevage séparément plusieurs pontes d'origine différente. Cet aspect est particulièrement utile au programme de recherche car une des priorités dans le programme de reproduction du platax concerne l'obtention de pontes mono-parentales. Ces lots constitueraient les futurs lots de géniteurs et permettront la fermeture du stock de géniteurs.

Grâce à la mise en place de l'incubation directe, les larves justes écloses ne sont jamais manipulées. Il en résulte une facilité et une précision de manipulation, liée aux œufs mais on peut aussi s'attendre à une meilleure qualité des larves. En effet on peut supposer que le bullage important que subissent les larves dans l'incubateur, la manipulation de récupération, les comptages puis la répartition dans les bassins larvaire engendrent un stress voir des lésions sur ces larves. En effet des manipulations lors de mon stage ont montré que le taux de mortalité à 48 heures est de 7 % pour des larves n'ayant même pas subit le comptage et la répartition. Il a été démontré durant mon stage, l'effet d'un bullage important durant les comptages sur la mortalité immédiate des larves. Même s'il a été prouvé que le bullage utilisé lors des comptages de larves n'implique pas de mortalité supplémentaire, il est à redouter qu'il implique tout de même un stress auquel vient s'ajouter la gêne occasionnée par le reste des manipulations. Gêne qui on peut s'en douter provoque certaines lésions qui pourraient être à l'origine de l'apparition de malformations durant l'élevage larvaire.

Un inconvénient de cette méthode est la pollution des bassins larvaires qu'elle engendre. L'évacuation des déchets de l'éclosion (coquilles vides, œufs non éclos,...) et l'une des problématiques de l'incubation directe. Afin de garantir l'homogénéisation des larves et la décantation des déchets, l'arrivée d'eau est assurée par le fond. Grâce à l'hydrodynamisme du bassin, les œufs se concentrent en amas, faciles à récupérer. Lors de la conduite de tous les essais, le siphonnage des déchets s'est montré suffisant. La pollution est facilement évacuée et même si nous ne disposons pas d'analyse de la qualité physico-chimique de l'eau, la qualité de l'eau ne semble pas être altérée par l'éclosion.

L'autre inconvénient de cette méthode est que l'on ne peut prévoir le taux d'éclosion. En effet une fois la quantité d'œufs mis en place, l'éclosion n'est pas contrôlée. La population de larves mise en place ne peut être choisie avec précision. Il serait intéressant de mettre en évidence des relations entre le taux d'éclosion d'une ponte avec un facteur déterminé (origine, taux de fécondation, taille de l'œuf ou du globule...) qui permettrait de donner une orientation sur le taux d'éclosion. En fonction de ce taux approximatif, nous pourrions mettre en place une population d'œufs qui nous permettrait d'avoir un degré de contrôle plus important sur la population de larves mises en place. Des études (Avery, 2009) ont été menées notamment sur la morue sur la caractérisation de la qualité d'une ponte et les relations existantes entre les différentes caractéristiques des œufs et le taux d'éclosion, développement précoce et la qualité des larves plus généralement. Par exemple, Kjorsvik (2003) met en évidence sur le turbot une conformation des cellules, lors du développement embryonnaire, synonyme de non-éclosion de l'œuf. Il serait intéressant de conduire ce genre d'étude sur les œufs de platax. Néanmoins le platax étant une espèce élevée en eau chaude, le développement embryonnaire est beaucoup plus rapide et donc plus difficile à observer et à étudier. En effet lorsque la ponte est récupérée, la plus part du temps les larves sont visibles dans l'œuf. Les œufs comportant des défauts de conformations cellulaires, tels que décrites dans les études précédentes sont déjà morts. Il faudrait être capable de différencier, quelques heures avant l'éclosion, une larve viable d'une larve non-viable. Une étude plus simple et moins ambitieuse pourrait être menée sur la caractérisation du taux d'éclosion en fonction du lot d'origine. Cette relation est indéniable et permettra faute de mieux d'estimer très aléatoirement le taux d'éclosion en fonction des géniteurs impliqués dans la ponte.

Une étude du développement embryonnaire permettra aussi de caractériser les différents stades de développement et de mettre en évidence les stades les plus fragiles. En effet, lors de mon stage, les différentes pontes étaient à différents stades de développement lors des manipulations, et il est arrivé qu'une ponte éclore lors de la manipulation. On peut se douter qu'il existe d'éventuels stades critiques, similaires au stade pré-œillet chez la truite, accentué par la rapidité du développement, durant lesquels les œufs ne doivent pas être manipulés. La mise en évidence de l'absence ou de l'existence de tels stades permettrait l'adaptation de la méthode et d'apporter des réponses sur les doutes qui pèsent sur l'impact de manipulations sur la qualité des œufs.

## Bibliographie

- Avery T, Killen S, Hollinger T, 2009. The relationship of embryonic development, mortality, hatching success, and larval quality to normal or abnormal early embryonic cleavage in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* N°289
- Benetti D, Sardenberg B, Welch A, Hoenig R, Orhun R, Zink I, 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* N°281
- Bouget J.F, 88. Synthèse des données sur la gestion d'un stock de reproducteur de loups et daurades. Rapport MEREA 176pp
- Chatain B, 1994. Estimation et amélioration des performances zootechniques de l'élevage larvaire de *Dicentrarchus labrax* et de *Sparus auratus*. Thèse de doctorat présentée à l'université d'Aix Marseille. 199 p
- David R, Van Cam A, Soupé M, Cochenec-Laureau N, 2007. Prophylaxie des poissons lagunaires en élevage. Rapport final de la convention N° 7.0022 du 23 mai 2007
- Elliott J M, 1970. Statistical analysis of samples of Benthic Invertebrates.
- Gasset E, Remoissenet G, Coves D, Maamaatuaiahutapu M, Jouffouques V, Teissier A, Nedelec G, David R, Cochenec-Laureau N, 2006. Maîtrise technique de la production de poissons lagunaires. Rapport final de convention N°6.0175 du 24 mai 2006 et annexes ( Bilan des expérimentations)
- Koumoundouros G, Oran G, Divanach P, Stefanakis S, Kentouri M, 1997. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus auratus*) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* N°156
- Kjørsvik E, Hoehne-Reitan K, Reitan K, 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* N°227
- Moran D, Smith C, Gara B, Poortenaar C, 2006. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture* N°262
- Ounais-guschemann N, 1989. Définition d'un modèle d'élevage larvaire intensif pour la daurade *Sparus auratus*. Thèse de doctorat présenté à l'université d'Aix Marseille. 182 p
- Panini E, Mylonas C, Zanuy S, Carrillo M, Ramos J, Bruce M, 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquaculture International* 9: 189-195, 2001
- Verhaegen Y, Adriaens D, De Wolf T, Dhert P, Sorgeloos P, 2007. Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture* N°268

## Annexe

### Annexe 1 : Tests statistiques utilisés

#### 1. Khi 2 ( $\chi^2$ ):

##### a. Test d'homogénéité

Le test du khi 2 appliqué à la mesure de l'homogénéité est issu de la référence « Elliot 70 ». Pour les échantillon de petites taille (nombre de prélèvement  $<30$ ), la valeur du khi 2 est calculée selon la formule suivantes :

$$\chi^2 = \frac{s^2 (n-1)}{\bar{X}}$$

ou

$$\chi^2 = \frac{\sum (x - \bar{X})^2}{\bar{X}}$$

où  $\bar{X}$  est la moyenne des prélèvements et  $s^2$  la variance

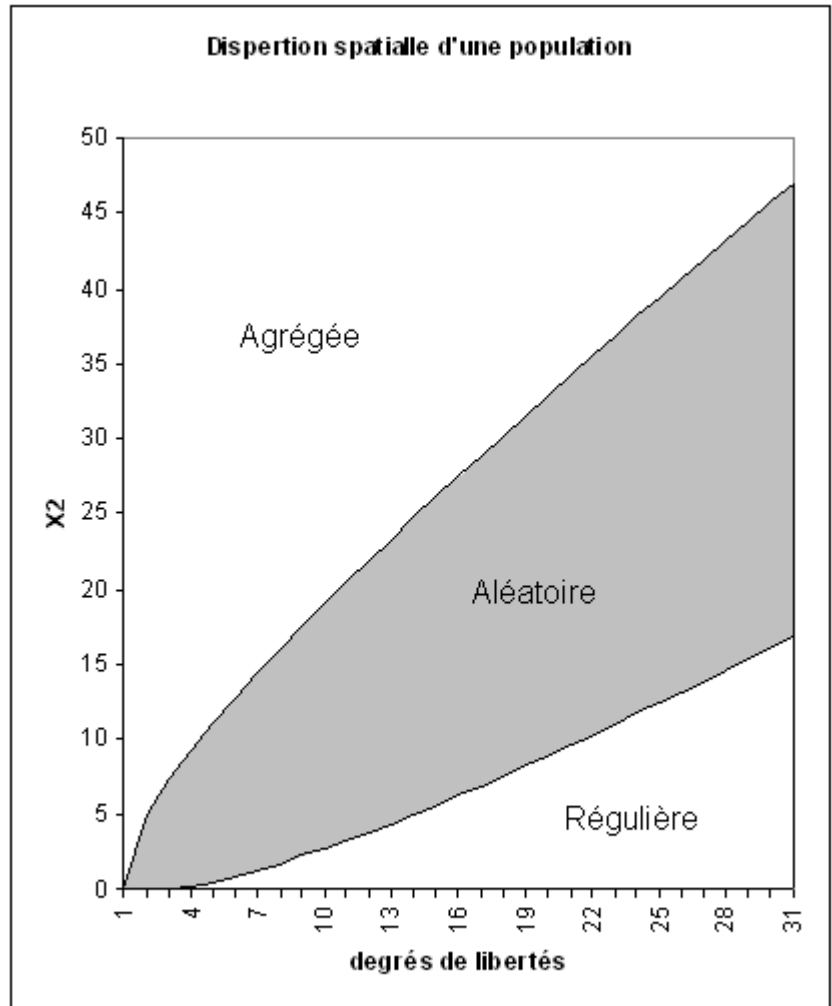


figure 9 : graphique de répartition du  $\chi^2$  en fonction du degrés de liberté ( P=0,05 )

##### b. Test de réponse à un traitement

Le test du  $\chi^2$  peut aussi servir à analyser la réponse de plusieurs échantillons à un traitement. On test alors la normalité de la répartition des données (Eliott, 70).

#### 2. Comparaison de moyenne et de variance :

Les analyses de moyenne et de variance sont réalisées à l'aide du logiciel « XL STAT »

## **Annexe 2 : Protocole de mise en incubation en puits**



Figure 10 : photo de micro-plaque

Dans un premier temps l'eau est oxygénée durant 10 minutes par un bullage d'oxygène. Elle est ensuite filtrée à 0.22  $\mu\text{m}$ .

Les œufs pour être comptés sont déposés dans un sot de 8 L. Après le comptage le bullage est arrêté, les œufs flottent alors à la surface. On prélève un volume de quelques millilitres représentant quelques centaines d'œufs.

Les œufs prélevés sont versés dans un bêcher d'eau filtrée à 0.22. Ainsi la quasi-totalité de l'eau du volume a été filtré. Hors mis les quelques millilitres du prélèvement ( 3 ml sur 400 ml soit 0.75% du volume).

On remplit chaque puits à la moitié de leur contenance avec de l'eau filtrée.

A partir du bêcher, on charge les plaques de puits avec un œuf dans chaque puits de 2 ml soit 24 œufs par micro plaques.

De l'eau est rajoutée dans les puits pour compléter le volume de 2 ml

Les plaques sont disposées dans un bain-marie afin d'assurer la stabilité thermique de l'incubation.



Figure 11 : Photo des plaques dans le bain-marie



### **Annexe 3 : Protocole de mise en incubation directe**

#### **Comptage :**

Le bullage de la ponte est arrêté pour permettre la décantation des œufs morts. Après quelques minutes, les œufs surnageant sont récupérés et placés dans un seau de 8 litres d'eau de mer filtrée. Ils sont à nouveau brassés à l'aide d'un bullage de 3 l.min<sup>-1</sup>. Une série de 16 prélèvements de 5 ml est comptés sur cuve dolfuss. Les comptages seront soumis au test du khi 2, et si le comptage ne s'avère pas homogène, 16 prélèvements sont réalisés à nouveau et comptés.

#### **Répartition :**

Une fois la ponte comptée, le volume du seau est réparti en fonction de la concentration dans les volumes d'incubation afin d'obtenir la répartition souhaitée.

La répartition a lieu par série. Une première série de volumes fixes, déterminés en fonction de la concentration, est versée à l'aide d'un béccher de 0.5 litre dans des bécchers correspondant à chaque incubateur.

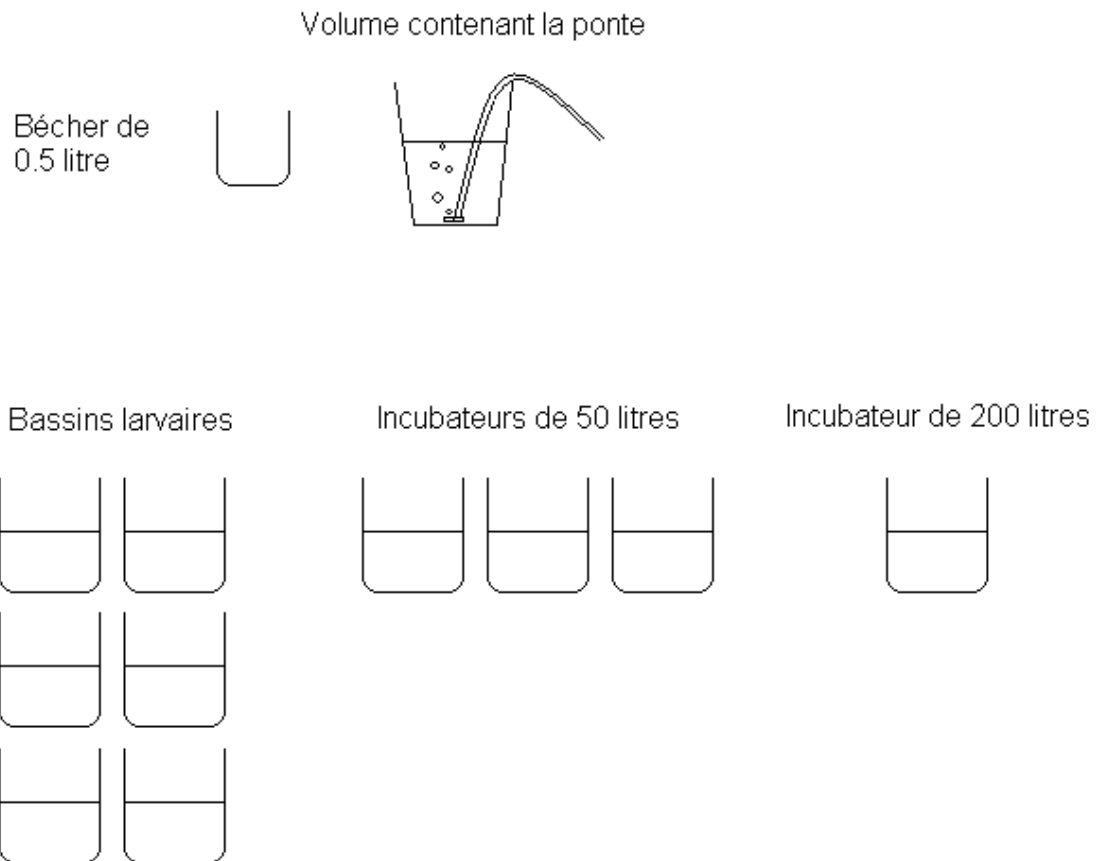


figure 12 : Schéma de la manipulation de répartition des oeufs

Une deuxième série est réalisée, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du volume désiré par type d'incubateur.

Il est préférable de prélever dans le seau d'œufs de petits volumes qui seront ensuite versés intégralement dans un bécher. Il faut éviter le prélèvement d'un volume qui sera ensuite réparti dans plusieurs récipients. Car même si l'homogénéité dans le seau a été testée et s'avère convenable, l'homogénéité des œufs une fois dans le bécher n'est plus assurée. Ainsi une fois les œufs prélevés dans le bêcheur de 0.5 litres, ils doivent être intégralement versés dans un seul bécher ou remis dans le seau.

### **Estimation du taux d'éclosion :**

Après éclosion, tous les incubateurs sont siphonnés sur un tamis de 220  $\mu\text{m}$ . Les larves ainsi récupérées sont placées par incubateur dans des seaux de 8 litres d'eau de mer filtrée. La population de chaque seau est alors comptée par échantillonnage de 16 prélèvements de 16.5 ml effectués à l'aide d'un pilulier.

La série de comptage est alors soumise au test du KHI 2. Si une série de prélèvements ne s'avère pas homogène, elle est écartée et une nouvelle série de prélèvements est réalisée.

Les taux d'éclosion sont calculés en fonction des populations de chaque seau. Les moyennes d'éclosion par volume seront réalisées.

A partir du taux d'éclosion moyen en incubateur de 50 litres, le taux d'éclosion des bassins larvaires est extrapolé, ce qui permet d'estimer la population de larves juste écloses au démarrage de l'élevage larvaire.

Les déchets de l'éclosion agrégés dans le fond du bassin, œufs non-éclos et coquilles, sont siphonnés le premier jour suivant l'éclosion.

## Résumé

L'objectif de ce travail est la définition d'une méthode d'incubation des œufs de *platax orbicularis* garantissant une estimation plus précise et plus sûre du nombre d'animaux réalisée au démarrage des élevages larvaires

Afin de pouvoir améliorer la précision de la répartition, nous avons fait l'hypothèse qu'il est préférable de mettre en place une incubation des œufs directement dans les bassins d'élevage. En effet les œufs sont plus facilement manipulables que les larves, ce qui présente un avantage important lors de leur comptage. Cette méthode faciliterait aussi la conduite de certains protocoles d'élevage larvaire, notamment la production de familles. Un gain de qualité des larves est aussi attendu découlant du fait que les larves ne sont plus manipulées après l'éclosion. Mais cette méthode présente l'inconvénient de ne pas pouvoir connaître directement le taux d'éclosion et l'effectif post-éclosion présent dans les bassins. Il est donc nécessaire de mettre en place en parallèle une méthode d'incubation témoin.

Les résultats de comptage montrent qu'il est plus sûr de compter des œufs que des larves et six prélèvements de 5ml sont suffisant pour avoir une précision de 8 % et cela de façon reproductible.

La mise en place d'éclosion témoin en incubateur de 50 litres a permis d'estimer l'éclosion avec un intervalle de confiance de 3 %. Ce qui a permis la mise en place de la méthode « directe » engendrant un gain de précision dans la répartition de l'ordre de 40 %.

Au final, il serait préférable de compter les œufs, puis de les répartir par volumétrie dans les bassins d'élevage. Il est préférable d'utiliser en parallèle des incubateurs de 50 litres pour conduire une incubation témoin précise et sûre. Les taux d'éclosion de ces témoins seront appliqués aux bassins larvaires et permettront de connaître la population de chaque bassin.