

Influence d'une première alimentation différée sur la croissance des larves de sole, *Solea vulgaris*, et l'accroissement de leurs otolithes

Françoise LAGARDÈRE et Gilles CHAUMILLON

Résumé — Les otolithes de larves de sole, élevées au laboratoire et comparés à ceux de larves prélevées en mer, ont permis de valider le premier accroissement journalier et d'identifier la nature des altérations produites par une alimentation différée. Le jeûne se traduit par le développement d'une bande à faible contraste en microscopie optique, du deuxième anneau-témoin (fin de l'embryogenèse et acquisition de l'aptitude à s'alimenter) au niveau $\approx 45 \mu\text{m}$, ce qui correspond à la durée maximale (5 jours) de jeûne compatible avec la survie (limites du PNR). Une bande hyaline analogue existe sur les otolithes de larves de sole prélevées en mer; elle permet d'évaluer, pour les températures régnant *in situ*, la durée maximale du stress équivalent à ≈ 10 jours.

Effects of delayed initial feeding on the growth of sole, *Solea vulgaris* larvae, and on the incremental pattern of their otoliths

Abstract — By comparing the otoliths of hatchery-produced sole larvae with those of sea-sampled larvae, we validated the first daily growth increment and identified the microstructural changes in incremental growth of the otoliths induced by delaying initial feeding. Starvation during 5 days led to the development of low-contrast rings from the second check, which marks the point at which feeding becomes possible at the end of embryogenesis, to a level $\approx 45 \mu\text{m}$, which corresponds to the maximal period of starvation compatible with survival (PNR, or point of no return). Similar hyaline bands were observed on the otoliths of sea-sampled sole larvae which indicate that the maximal stress duration was about 10 days.

Abridged English Version — Otoliths of hatchery-produced sole larvae were compared (Fig. 1) with those of larvae sampled in the field for age study, in order to validate the first daily growth increment, to identify the microstructural changes in the deposition of incremental growth rings induced by a delayed initial feeding and to relate such changes with larval growth.

Samples were taken using Bongo oblique hauls during march-april 1985-1987 in the North-Biscay Bay. Sea-water temperatures increased from the coastal area to the middle shelf (march 1985: 8-11°C; march 1987: 7-10°C). In the laboratory, sole larvae were reared under conditions of constant temperature (19°C) and photoperiod (LD 18:6) during 22 days. Feeding normally started as soon as the mouth was opened (2 days) and metamorphosis occurred on the 14th day (control larvae). Starvation for periods of 2 to 5 days was used to obtain different levels of stress. Only the 5 day starvation was used for the otolith data in the present study (starved larvae).

When initial feeding was delayed by 2 to 4 days, the final survival rate remained at a high level (72.3%). However, the rate of larval development was slowed without compensation during the period of the experiment. After 5 days of starvation, the final survival rate fell drastically to only 1.3%, the PNR [2] being reached with 6-7 days old larvae (i.e. 3-4 days after yolk-sac resorption). On the 7th day, 80% of the remaining larvae had food in the gut but they were no longer than 3 days old larvae, and showed a high mortality level until the 11th day. Growth resumed during the 10-13th days, but with a lower growth rate (0.2 to 0.4 mm.day⁻¹) than in control larvae (0.4 to 0.6 mm.day⁻¹) and the starved larvae had not metamorphosed at the end of the experiment (Fig. 2).

Note présentée par Lucien LAUBIER.

The relationship between larval length and otolith diameter varied according to growth conditions. Under optimal feeding conditions, the incremental pattern of the otoliths did not reflect larval growth and starvation did not result in a complete cessation of otolith growth. The first well-defined increments were associated with the end of embryogenesis and marked the moment of hatching ($T1 \approx 15 \mu\text{m}$), mouth-opening ($T2 \approx 25 \mu\text{m}$) and yolk-sac resorption ($T3 \approx 37 \mu\text{m}$, *Fig. 2*). For control larvae daily increment deposition followed the second check ($T2$, *Fig. 1 G-H-J*), generally considered to be the first daily ring [8]. Starvation did not modify the size of this ring which in fact became more visible (*Fig. 1 E-F-I*) because of the development of bands (S) of low-contrast between the incremental (hyaline) and discontinuous (dark) zones. Low-contrast rings, without a reduction of the increment width, have already been obtained in older larvae submitted to short periods of starvation [9]. In the early stages, these bands resulted from growth increments which were too closely spaced to be discerned with the light microscope and were often correlated with non daily increments or underestimated counts ([6], [7]). In starved sole larval otoliths, the hyaline deposition continued until growth resumption (R) suggesting a relation between the development of this band and the critical level of starvation. In the experimental conditions used, the largest diameter ring ($R \approx 45 \mu\text{m}$) indicated that the point of no return (PNR) had been reached. These bands contributed to the otolith increment during cessation or reduction of the larval growth so that in fact, starved early stage larvae produced larger otoliths than control larvae of the same size.

A similar pattern of reference and low-contrast ring deposition was observed in otoliths of sea-sampled sole larvae (*Fig. 1 A-D*). The more simple incremental pattern (*Fig. 1 C-D*) allowed us to estimate the lowest age according to the same developmental stage. However, most of the larvae exhibited low-contrast bands associated with the first-feeding stage (*Fig. 1 A-B*) and gave higher age estimation. In other species, deposition of thin first-daily increments has been linked with a period of adjustment to active feeding [10]. Interruption in ring deposition could be dependent of low water temperature [11] and/or starvation [13]. Used as an alternative starvation index ([14], [15]) in marine sole larvae, counts of these low-contrast rings indicate that the maximal stress duration is about 10 days.

INTRODUCTION. — Les larves de poissons marins issues d'œufs pélagiques commencent à s'alimenter normalement tandis que s'épuise le vitellus. La dénutrition à ce stade est l'une des causes majeures de la mortalité larvaire. Elle entraîne des altérations du développement (réduction du taux de croissance et lésions des tissus), qui ont pour conséquence de rendre les larves plus vulnérables à la prédation [1]. Ces altérations peuvent aller jusqu'à un seuil critique ou point de non retour (PNR) [2] à partir duquel la survie est gravement affectée : les larves sont trop faibles pour se nourrir ou ne peuvent digérer les proies absorbées.

Les otolithes des larves de poissons s'accroissent par dépôts alternés d'une zone large, hyaline (zone d'accroissement, riche en carbonate de calcium) et d'une marque étroite et sombre (zone discontinue, riche en matrice protéique) [3]. En croissance normale, ces deux zones (ou accroissement journalier) se déposent en 24 h et leur nombre permet l'évaluation de l'âge [4]. Ce rythme dépend de la photopériode, des cycles thermiques et du nombre de repas. Synchrones et circadiens, ces facteurs induisent un renforcement des marques journalières alors que leurs fluctuations entraînent soit la multiplication (accroissements sub-journaliers) soit l'absence de marques, notamment lors d'un jeûne

total prolongé [4]. Au stade de l'ouverture buccale, on note le plus souvent un retard dans le dépôt de la première marque journalière [5] qui peut conduire à sous-estimer l'âge ([6], [7]). C'est pourquoi il est apparu nécessaire, en préliminaire à l'étude de l'âge et de la croissance des larves de sole *in situ*, d'identifier le niveau à partir duquel l'accroissement des otolithes de larves normalement nourries est journalier, de préciser la nature des altérations dues à une première alimentation différée (largeur des accroissements et définition des marques) et de rechercher les liens existant entre ces altérations et les retards de croissance observés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — Les larves proviennent d'expérimentations réalisées au Centre IFREMER de Brest en mars-avril 1987 et du milieu naturel (Campagnes SOLDET du Centre IFREMER de Nantes) (1).

1. *Protocole expérimental.* — L'élevage se fait à 19°C, à raison de 12 larves/l. La photopériode est de type LO 18 : 6, l'éclairement de 2000 lux en surface et l'oxygène à 90-95% de saturation. Les larves sont nourries de *nauplii* frais d'*Artemia salina* dès l'ouverture buccale (jour 2) pour les témoins et avec un retard de 2 à 5 jours pour provoquer différents états de dénutrition. La fixation se fait *in vivo* à l'alcool à 95%. L'analyse a porté sur une partie des larves ayant subi le jeûne de 5 jours ($n=32$ larves) et sur les témoins de stades équivalents ($n=35$ larves). L'expérimentation a été arrêtée au jour 22, ce qui va au-delà de la métamorphose (jour 14) pour les témoins seulement.

2. *Prélèvements en mer.* — Ils sont réalisés depuis 1985 en mars et avril sur le plateau continental du golfe de Gascogne, entre l'île d'Yeu et Belle-Ile. En mars 1985, les températures moyennes de la colonne d'eau varient de 8°C, en zone côtière, à 11°C sur les fonds de 80 m, avec une température de 9-10°C sur les stations centrales à la frayère. En mars 1987, les eaux sont plus froides (de 7°C en zone côtière à 10°C au large). Les larves sont prélevées en traits obliques au moyen d'un filet de type Bongo-60 cm (0,315 mm de vide de maille), triées dès la pêche et fixées à l'alcool à 95%.

3. *Préparation des otolithes.* — Les larves sont mesurées et le volume du sac vitellin évalué : $VVI = 4/3 \pi (r/2)^2 \times R/2$ (r et R : petit axe et grand axe du sac vitellin). Extraits des capsules otiques, les otolithes sont observés en lumière transmise verte (filtre monochromatique 546 nm) avec un grossissement de 1250× et mesurés sur microphotographies. Le pouvoir de résolution du système optique est évalué à 0,28 µm, ce qui donne une largeur de $\approx 0,5$ µm au plus petit accroissement ainsi discriminé. Les mesures se réfèrent au diamètre moyen de la *sagitta* et des principaux niveaux-témoins (T). Leur signification ontogénique est celle du stade de développement des larves ayant des otolithes de diamètre équivalent à ces niveaux.

RÉSULTATS. — Deux paires d'otolithes (*sagittae* et *lapilli*) sont présents et de taille équivalente à l'éclosion.

Les otolithes des larves de sole prélevées en mer ont un *nucleus* délimité par une première marque (T1 ≈ 18 µm, *fig. 1*) qui correspond à la taille des otolithes de larves à l'éclosion. Elle est suivie d'une bande hyaline et d'une deuxième marque (T2 ≈ 28 µm) déposée à l'ouverture buccale. A partir de T2, la *sagitta* s'accroît plus vite que le *lapillus* et deux modèles peuvent être considérés selon que se développe ou non une deuxième bande hyaline (S). De largeur variable, elle contient à sa largeur maximale une dizaine d'accroissements peu définis, ce qui correspond à des otolithes de 40-45 µm de diamètre (*fig. 1 B*) et à des larves munies d'une mâchoire fonctionnelle. En l'absence de cette

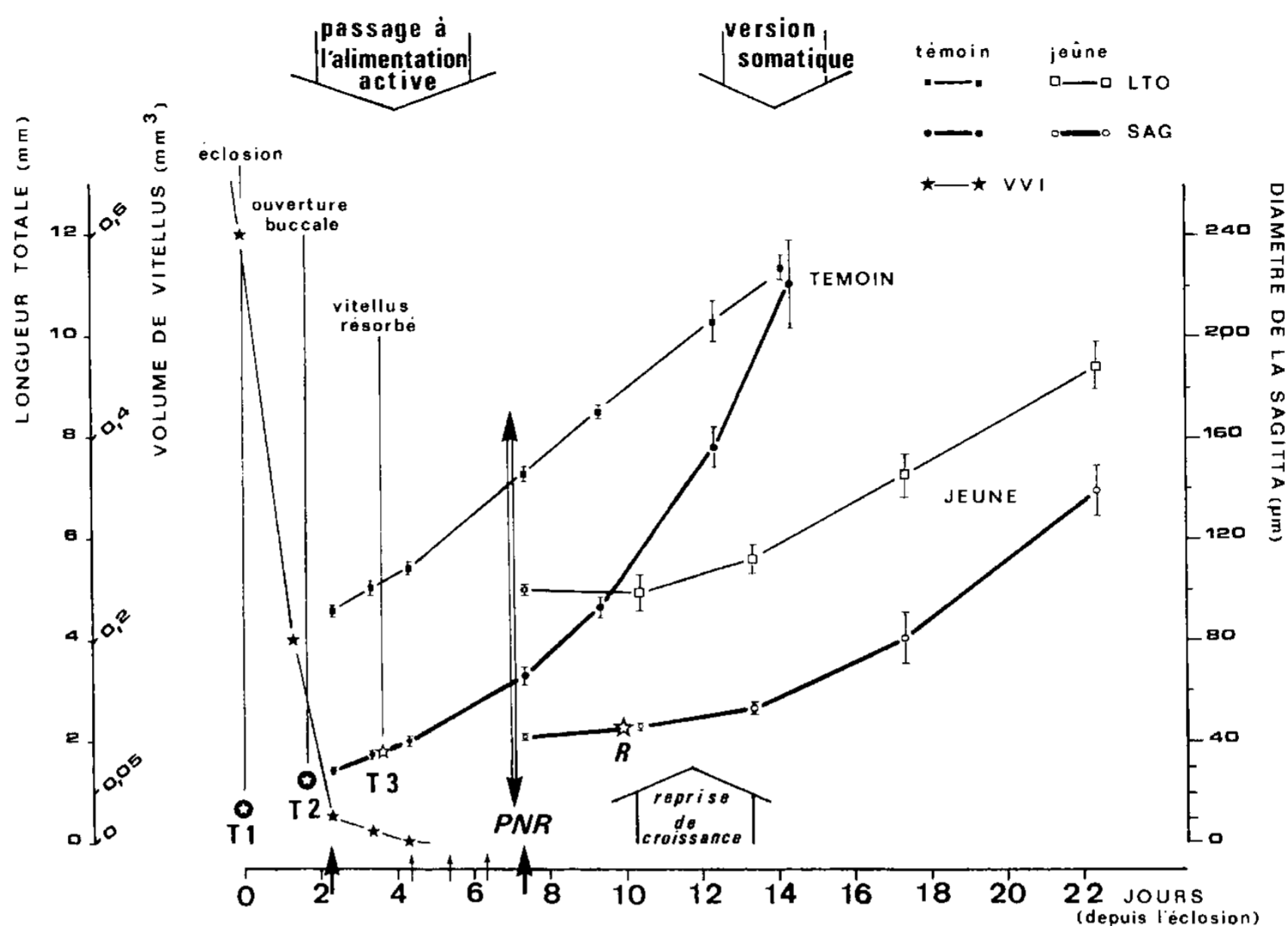


Fig. 2. — Accroissement moyen de la *sagitta* et séquence d'apparition des anneaux-témoins (T1, T2, T3 et R, voir fig. 1) en relation avec la croissance moyenne des larves de sole (les flèches sur l'échelle du temps correspondent à la première distribution de nourriture; les barres verticales donnent l'intervalle de confiance à 95%).

Fig. 2. — Sagittal mean increment and sequence of check deposition (T1, T2, T3 and R, see Fig. 1) related to mean growth of sole larvae (arrows on the time scale give the first food availability; vertical bars give the 95% confidence limit).

bande, la structure est plus simple, avec accroissement régulier de l'otolithe à partir de T2 (fig. 1 C).

En conditions expérimentales, le vitellus est épuisé entre les jours 3 et 4, soit 1 à 2 jours après l'alimentation du témoin (fig. 2). A ce stade est acquise l'alimentation active, ce que réalisent sur les seules réserves vitellines les larves dont l'alimentation est différée. Un jeûne de 2 à 4 jours retarde d'autant la métamorphose sans affecter la survie finale (72,3%). Avec 5 jours de jeûne, celle-ci tombe à 1,3%; le PNR est atteint entre le 6^e et le 7^e jour, 3 à 4 jours après l'épuisement du vitellus et si 80% des larves survivantes ingèrent de la nourriture, elles ont la taille de larves de 3 jours, la mortalité restant élevée jusqu'au 11^e jour. La reprise de croissance intervient entre le 10^e et le 13^e jour mais à une vitesse de croissance inférieure (0,2 à 0,4 mm.jour⁻¹) à celle du témoin (0,4 à 0,6 mm.jour⁻¹). En alimentation différée, l'accroissement moyen de la *sagitta*, bien que réduit, ne s'annule pas (fig. 2). Les trois premiers accroissements distincts se déposent à l'éclosion (T1 ≈ 15 µm), à l'ouverture buccale (T2 ≈ 25 µm) et en fin d'utilisation du vitellus (T3 ≈ 37 µm) chez le témoin et les larves non alimentées. Le dépôt de T2 et T3 ne dépend pas de la prise de nourriture : ils se distinguent d'autant mieux que les accroissements qui les encadrent sont peu ou pas définis, cas des otolithes de larves non alimentées (fig. 1 E, F et I). Il s'en suit un dépôt hyalin (S) dont le développement est maximal après 5 jours de jeûne (R ≈ 45 µm, reprise de croissance en longueur, jour 10),

c'est-à-dire lorsque les limites du PNR ont été atteintes. Il contribue à l'accroissement des otolithes qui, chez les larves dénutries, sont plus gros que ceux des larves normalement nourries de même taille (*fig. 2*).

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Les conditions de passage à l'alimentation exogène déterminent la croissance et la survie des larves de poissons [2] et modifient le mode d'accroissement de leurs otolithes [7]. Dans quelle mesure les images obtenues peuvent-elles représenter un moyen d'identifier des états de dénutrition?

Au laboratoire, un retard de croissance dû à une première alimentation différée s'accompagne d'un renforcement des anneaux-témoins de la fin de l'embryogenèse et de la réduction des accroissements journaliers qui leur font suite. Ainsi T2 a le même niveau chez les larves nourries et dénutries et représente pour la plupart des espèces le premier accroissement journalier dénombré, attribué tantôt à la première alimentation, tantôt à la résorption du vitellus, bien qu'il ne semble pas y avoir de lien direct avec ces événements ([7], [8]). En conditions optimales, la vitesse d'accroissement des otolithes est plus élevée que la vitesse de croissance larvaire et ne reflète pas directement celle-ci. En alimentation différée, on observe la réduction de la largeur des accroissements déposés et l'atténuation des zones discontinues autres que les anneaux-témoins. Le développement de bandes à faible contraste (S), sans réduction de la largeur des accroissements, a déjà été signalé chez des larves plus âgées [9] soumises à une courte période de jeûne. Au stade de l'ouverture buccale et pour la température d'expérimentation, cette bande résulte de la juxtaposition d'accroissements trop étroits pour être tous valablement discriminés. De ce fait, l'âge peut être sous-évalué pour de simples raisons de limite du pouvoir de résolution des microscopes optiques [7].

Sur les otolithes de larves prélevées en mer apparaissent les mêmes accroissements faiblement définis de T2 au niveau 40-45 μm . Des analogies existent entre cette bande hyaline et une zone d'accroissements étroits reliée avec une période de transition vers l'alimentation active chez d'autres espèces [10]. Par ailleurs, l'effet des basses températures et la situation des jeunes larves dans le bas de la colonne d'eau ne peuvent être exclus ([11], [12]). Cependant, les larves de sole trouvent les eaux les plus froides en surface et en zone côtière où elles sont rares en stade précoce. De plus, il est difficile *in situ* de séparer clairement le rôle des facteurs thermique et photopériodique de celui du facteur nutritionnel [13].

Ces altérations se manifestent, à des degrés divers et à un stade critique du développement, chez un grand nombre de larves de sole prélevées en mer. Elles permettent d'identifier les larves présentant un risque de sous-évaluation de l'âge et, utilisées comme indice de dénutrition, d'estimer la durée maximale du stress équivalent à ≈ 10 jours. L'étude des otolithes de larves offre ainsi une méthode conservative dont l'intérêt réside en ce que, contrairement aux indices histologiques [14] et biochimiques [15], l'information reste stockée après disparition des effets du jeûne.

⁽¹⁾ Travaux ayant bénéficié d'aides à la recherche (contrat PIROCEAN n° 139; contrat IFREMER n° 875511010).

Note reçue le 4 février 1988, acceptée le 31 mars 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] M. P. SISENwine, *Exploitation of marine communities*, R. M. MAY éd., Springer-Verlag, New York, 1984, p. 59-94.

[2] J. H. S. BLAXTER et G. HEMPEL, *J. Cons. int. Explor. Mer*, 28, 1963, p. 211-240.

- [3] Y. MUGIYA, N. WATABE, J. YAMADA, J. M. DEAN, D. G. DUNKELBERGER et M. SHIMIZU, *Comp. Biochem. Physiol.*, 68, 1981, p. 659-662.
- [4] S. E. CAMPANA et J. D. NEILSON, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 1985, p. 1014-1032.
- [5] R. D. METHOT Jr. et D. KRAMER, *Fish. Bull.*, 77, 1979, p. 413-423.
- [6] A. J. GEFFEN, *Mar. Biol.*, 71, 1982, p. 317-326.
- [7] C. JONES et E. B. BROTHERS, *Fish. Bull.*, 85, 1987, p. 171-178.
- [8] C. JONES, *Fish. Bull.*, 84, 1986, p. 91-103.
- [9] J. A. RICE, L. B. CROWDER et F. P. BINKOWSKI, *Trans. Am. Fish. Soc.*, 114, 1985, p. 532-539.
- [10] G. R. BOLZ et R. G. LOUGH, *Fish. Bull.*, 81, 1983, p. 827-836.
- [11] M. D. MCGURK, *Environ. Biol. Fishes*, 20, 1987, p. 33-47.
- [12] H. GJØSAETER et S. TILSETH, *Fisk. Dir. Skr. Ser. HavUnders.*, 17, 1982, p. 287-295.
- [13] D. W. TOWNSEND et J. J. GRAHAM, *Fish. Bull.*, 79, 1981, p. 123-130.
- [14] G. H. THEILACKER, *Fish. Bull.*, 84, 1986, p. 1-17.
- [15] L. J. BUCKLEY et R. G. LOUGH, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 1987, p. 14-25.

C.R.E.M.A., L'Houmeau, C.N.R.S.-IFREMER, Case n° 5, 17137 Nieul-sur-Mer.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Otolithes de larves de sole prélevées en mer (A à D) ou élevées au laboratoire (E à J) et présentant différents modèles d'accroissement au stade de la première alimentation (N : *nucleus*; T1, T2 et T3 : anneaux-témoins de l'éclosion, de l'ouverture buccale et de la résorption du sac vitellin; S : deuxième bande hyaline; R : reprise de croissance; les *lapilli* A-D-E-H confirment le niveau des anneaux-témoins observés sur les *sagittae*). Échelle : 10 μ m. Principaux caractères des larves (LS : longueur standard). Stade préflexion : A-B (5,5 mm LS, 27 jours) et C-D (5,1 mm LS, 23 jours). Stade flexion : E-F-I (9,5 mm LS, 22 jours) et G-H-J (8,8 mm LS, 12 jours).

Fig. 1. — Otoliths of sea-sampled (A to D) or laboratory-reared (E to J) sole larvae with different incremental pattern at the first-feeding stage (N: nucleus; T1, T2 and T3: checks deposited respectively at hatching, mouth opening and yolk-sac resorption stages; S: 2nd hyaline band; R: growth resumption; lapilli A-D-E-H confirm the check level observed on the sagittae). Scale bar = 10 μ m. Main larval characteristics (SL: standard length). Preflexion stage: A-B (5.5 mm SL, 27 days) and C-D (5.1 mm SL, 23 days). Flexion stage: E-F-I (9.5 mm SL, 22 days) and G-H-J (8.8 mm SL, 12 days).

