

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

DIPLOME D'AGRONOMIE APPROFONDIE SPECIALISATION HALIEUTIQUE

**EVALUATION DE LA QUALITE DES OEUFS ET LARVES DE TURBOT
(*Scophthalmus maximus* L.), MISE AU POINT D'UN TEST
DISCRIMINANT DE LA QUALITE DES LARVES.**

**Unité Reproduction
Laboratoire de Physiologie des Poissons
Direction des Ressources Vivantes
IFREMER Centre de Brest**

**Bruno NOGUERRA
Octobre 1994**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon maître de stage, J.L Gaignon, pour m'avoir accueilli et guidé tout au long de ce stage. Son sens aigu de la critique, sa capacité à cerner les problèmes à résoudre et sa grande expérience de la zootechnie m'ont aidé à réaliser le sujet de ce stage.

Je remercie tous les autres membres de l'unité de reproduction du laboratoire de physiologie des poissons de l'IFREMER de BREST aussi bien pour leur aide technique que morale.

A/INTRODUCTION GENERALE	4
B/LA QUALITE DES OEUFS	5
I CONCEPTS ET DEFINITION	5
II L'EVALUATION DE LA QUALITE DES OEUFS.....	5
II.1 Généralités.....	5
II.2 Les principaux facteurs ayant un effet sur la qualité des oeufs	5
II.3 Les différentes méthodes d'évaluation	6
C/UNE NOUVELLE APPROCHE DE L'EVALUATION DE LA QUALITE DES OEUFS ET LARVES DE POISSONS MARINS: LE CHOIX DU CHALLENGE	7
I. DEFINITION, PRINCIPES.....	7
II. LES DIFFERENTES POSSIBILITES	7
II.1 Les contraintes du challenge appliqué aux larves de poissons marins.....	7
II.2 Sélection du type d'épreuve à cumuler à la mise à jeun.....	7
III LE CHOIX EFFECTUE	8
D/ ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES PRINCIPAUX FACTEURS DU CHALLENGE	10
I LUMIERE.....	10
I.1 Intensité.....	10
I.2 Spectre	10
I.3 Choc lumineux.....	11
II LES RESERVES EMBRYONNAIRES	11
II.1 Quantité	11
II.2 Composition.....	12
III LA NON ALIMENTATION DES LARVES	14
III.1 Conséquences de la mise à jeun	14
III.2 Notion de point de non retour	14
III.3 Spécificités du comportement des larves non alimentées	14
IV FACTEURS DE SURVIE LORS DE LA MISE A JEUN	15
E/ MISE AU POINT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES D'INCUBATION PREPARANT LE CHALLENGE	16
I METHODOLOGIE POUR LE RECUEIL DES DONNEES	16
I.1 Contraintes liées à un suivi d'effectif.....	16
I.2 Observations d'essais préliminaires et résultats.....	17
II RECHERCHE DES EFFETS DE CERTAINS FACTEURS	18
II.1 Effets de la lumière	18
II.1.1 Spectres	18
II.1.2 Intensité.....	20
II.2 Remarques à propos des facteurs hydrauliques	21
III CONCLUSIONS SUR LA PHASE INCUBATION.....	22
F/ MISE AU POINT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES POUR LE CHALLENGE: LA PHASE LARVAIRE	23
I ASPECTS METHODOLOGIQUES	23
I.1 Les contraintes de la phase larvaire	23
I.2 Les essais effectués et la mise au point de l'outil	23
II. RECHERCHE DES EFFETS DE LA LUMIERE	25
II.1 Objectifs:	25
II.2 Matériels et méthode.....	25
II.3 Résultats et discussion.....	25
III TEST DE DISCRIMINATION DE PONTE	30
III.1 Objectifs	30
III.2 Matériel et méthodes.....	30
III.3 Résultats et discussion	31
IV ESSAI DE VALIDATION DU CHALLENGE	41
IV.1 Objectifs.....	41

IV.2 Matériel et méthodes.....	41
IV.3 Résultats et discussion.....	41
V CONCLUSIONS SUR LA PHASE LARVAIRE.....	43
G/ CONCLUSIONS GENERALES	45
I CONCLUSIONS SUR LA MISE AU POINT DU TEST	45
I.1 La standardisation.....	45
I.2 Paramétrage de la réponse.....	45
I.3 Optimisation du protocole	46
II LIMITES DE LA METHODE.....	46
II.1 Effet de l'environnement.....	46
II.2 Élégance de l'expérimentation.....	46
III PERSPECTIVES D'UTILISATION.....	46
III.1 Pour une meilleure connaissance de la phase larvaire du turbot.....	46
III.2 Pour l'évaluation de la qualité des larves.....	47
III.3 Insertion dans le programme "Qualité"	47
BIBLIOGRAPHIE	48

A/INTRODUCTION GENERALE

Le turbot (*Scophthalmus maximus* L.) est un poisson marin plat et de grande taille, de la famille des Bothidae, traditionnellement apprécié sur toute la façade Atlantique de l'Europe et de valeur commerciale élevée. En France, comme en Espagne la demande est forte et les apports de pêche en légère diminution. Il est relativement abondant en mer du Nord, en Baltique et le long des côtes d'Islande. Il remonte jusqu'à 68° N le long des côtes de Scandinavie; vers le Sud il est encore commun sur les côtes du Maroc. On le retrouve aussi en Méditerranée.

Le cycle biologique a été décrit en détail par Deniel (1981) pour la Bretagne. Ce poisson benthique fréquente principalement les substrats de pierre, de graviers et de sable. L'année de sa naissance, le jeune turbot se trouve sur les estrans sableux dans la zone de balancement des marées puis s'éloigne d'autant plus de la côte qu'il est âgé. De 3 à 6 ans (30-45 cm), il est surtout abondant de 20 à 50 m et à partir 6 à 7 ans (46 cm) sur les fonds de 10 à 150 m. La première maturité sexuelle est atteinte à 3 ans (30 cm) pour les mâles et vers 4 à 5 ans (40-50 cm) pour les femelles. C'est un poisson très fécond qui pond de mai à juillet sur les côtes bretonnes et vers la fin de l'hiver et le début du printemps en Méditerranée. Le turbot est essentiellement pêché en Manche-Est et dans le golfe de Gascogne, au chalut de fond et à un moindre degré à la palangre. La taille minimale autorisée est de 30 cm (poisson de 3 à 4 ans).

Au début des années 70, au moment où l'aquaculture des poissons marins a été envisagée sérieusement en Asie et en Europe, un avenir prometteur fut attribué au turbot. Des programmes de recherche ont donc été initiés, au Royaume-Uni et en France essentiellement; afin de maîtriser le cycle biologique de l'espèce en captivité. Mais par la suite, celle-ci a surtout été freinée par l'insuffisance de juvéniles provenant des écloséries.

Une des nécessités majeures du développement à venir de la production aquacole de turbot est la diminution de la variabilité de la qualité des oeufs. En effet la qualité des oeufs a un impact sur l'incubation, mais aussi sur l'élevage larvaire. La démarche de résolution de ces problèmes s'inscrit dans la volonté de mieux contrôler toutes les phases de la production aquacole. A l'heure actuelle la production d'alevins est largement suffisante et c'est le problème de la réduction des coûts et par delà de la qualité des oeufs et des larves qui devient prépondérant pour la viabilité économique des écloséries.

D'autre part les spécificités propres du turbot en matière de production d'oeufs qui sont principalement: une production d'oeufs étalée sur plusieurs pontes (en conditions de captivité) et la prépondérance du phénomène de vieillissement des ovules in-vivo, incitent à développer des méthodes de gestion rationnelle des pontes artificielles par pression abdominale. Cette gestion rationnelle ayant pour but d'améliorer la qualité des pontes et de diminuer la variabilité, elle doit s'appuyer sur la possibilité d'évaluer la qualité.

Le programme de recherche de l'unité reproduction du Laboratoire Physiologie des Poissons de l'IFREMER de Brest a pour intitulé " Reproduction et stades précoces chez les poissons marins: la qualité des oeufs " et a fixé des objectifs qui passent par la mise au point de tests et de critères de qualité.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude en visant à mettre au point un outil de recherche qui permettrait d'évaluer la qualité et pourrait constituer avec d'autres tests une base solide pour envisager des études sur le contrôle de la qualité.

B/LA QUALITE DES OEUFS

I Concepts et définition

La qualité est souvent évoquée comme un problème crucial de l'incubation et de l'élevage larvaire, donc de l'aquaculture en général. Les auteurs ayant travaillé sur le sujet ont utilisé diverses méthodes d'évaluation de la qualité (composition, taille de l'oeuf, aspect, etc...). Ces critères sont généralement des mesures instantanées d'une caractéristique de l'oeuf pouvant avoir un lien avec la qualité.

Nous utiliserons désormais la notion de qualité définie comme suit selon Kjorsvik et al. (1990): la qualité d'un oeuf correspond à l'aptitude à fournir une bonne larve (en termes de viabilité). Ce choix implique que l'on s'intéresse à un système vivant et dynamique (l'oeuf ou la larve). Ainsi on considère que sa qualité va s'exprimer à travers son évolution et non pas par son état à un instant donné. De plus, la qualité que l'on cherche à évaluer correspond à une aptitude à la viabilité en conditions d'élevage et cela revient à tester les performances d'élevage.

II L'évaluation de la qualité des oeufs

II.1 Généralités

L'évaluation de la qualité des oeufs a été menée par de nombreux chercheurs à l'aide de critères divers, ceux-ci n'ont pas toujours fait apparaître de relations et les contradictions sont nombreuses.

D'autre part, la diversité des modèles biologiques utilisés fait apparaître la variabilité interspécifique des caractéristiques des oeufs.

II.2 Les principaux facteurs ayant un effet sur la qualité des oeufs

Plusieurs phénomènes font obstacle à l'évaluation de la qualité des oeufs en augmentant la variabilité des caractéristiques des oeufs: surmaturation, diminution de la taille de l'oeuf, conditions de maintenance des géniteurs. La mise au point d'un test fiable d'évaluation de la qualité permettra de mieux cerner ces phénomènes.

***La surmaturation**

Phénomène important chez les poissons qui ne pondent pas naturellement en conditions d'élevage et qui doivent faire l'objet de stripping, la surmaturation a été décrite par Escaffre & Billard (1979) chez les salmonidés. La surmaturation est associée à des changements de la composition et de la morphologie de l'oeuf (Springate et al., 1984, Craik & Harvey, 1984).

Chez le turbot la surmaturation est très rapide (une dizaine d'heures contre une semaine à deux semaines chez les salmonidés) et pose donc des problèmes importants. Ainsi la majorité des pontes de turbot jugées mauvaises le sont pour des raisons de surmaturation.

Les travaux de Fauvel et al. (1993) ont montré que la surmaturation, chez le turbot, peut être évaluée par une mesure de pH du fluide ovarien. D'autres travaux: Barton (1981), Mc Evoy (1984) et Fauvel et al. (1992) préconisent de rationaliser les méthodes de pontes artificielles par pression abdominale en augmentant la fréquence pour éviter d'obtenir des pontes surmatures.

*** Diminution de la taille de l'oeuf au cours de la saison de ponte**

Observée et décrite chez les salmonidés (Bagenal, 1971) et chez le turbot (Barton, 1981, Mc Evoy & Mc Evoy, 1991, Mc Evoy, 1993). La diminution de la taille de l'oeuf au cours de la saison pourrait être une adaptation naturelle à la différence de température entre le début de saison et la fin

de saison de ponte (température plus élevée en fin de saison). Ainsi, la taille des oeufs est inférieure en fin de saison car pour une même durée d'incubation les réserves sont moins importantes (Ware, 1975 et Barton, 1981).

*** La maintenance des géniteurs et ses effets**

De nombreux travaux ont cherché à évaluer les effets des différentes conditions de maintenance des géniteurs sur la qualité des oeufs. Les conditions générales de maintenance des géniteurs de turbot et leur impact sur la production de gamètes ont été étudiées (Devauchelle et al., 1988).

* alimentation: la qualité de l'alimentation distribuée aux femelles en maturation pourrait être une des principales causes de la variabilité de la composition en éléments essentiels (Lavens & Sorgeloos, 1991) chez le turbot. Chez les salmonidés, la diminution de la ration des géniteurs peut entraîner la diminution du nombre et de la taille des oeufs produits (Bagenal, 1969) mais pas de différences de composition significatives (Knox et al., 1988). Pour Springate & Bromage (1985) et Barton (1981), la ration influence le nombre mais pas leur taille.

Chez la morue, la mise à jeun doit être très sévère pour affecter la fécondité (Kjesbu et al., 1981); en règle générale, la femelle mobilise l'énergie et les éléments nécessaires pour produire des oeufs viables même s'ils sont de petite taille ou peu nombreux, néanmoins, la diminution de la ration pour des futurs géniteurs peut repousser l'âge de première maturation et perturber la différenciation ovocytaire et donc diminuer le nombre d'oeufs (Luquet et Watanabe, 1986)

*acclimatation: l'acclimatation dans le cas des géniteurs sauvages permet d'augmenter considérablement la quantité d'oeufs produite (Bromley et al., 1986), le stress appliqué sur les géniteurs diminue la fertilité, par contre elle n'affecte pas la survie larvaire de manière évidente (Ayson, 1989)

* facteurs du milieu: les conditions de température ont un effet sur la viabilité des oeufs de bar (Carrillo et al., 1989)

II.3 Les différentes méthodes d'évaluation

A l'heure actuelle, les critères utilisés dans la littérature sont les suivants:

- les critères morphologiques sont les plus employés en routine ("aspect" de la ponte et taux de viabilité) malgré leur caractère empirique

- les critères biochimiques c'est à dire de composition de l'oeuf n'ont pas fourni de résultats probants sauf la teneur en eau d'après Devauchelle & Cladas (1982).

- les autres critères tels que le pH pour évaluer le degré de surmaturation (Fauvel et al., 1993) ou la durée de la réaction corticale (Kjørsvik & Lønning, 1983) sont fiables mais sont loin de fournir des renseignements sur l'aptitude de la ponte à être mise en incubation et à supporter les conditions d'élevage

- les critères zootechniques fournissent une évaluation de la qualité des oeufs plus adaptée aux nécessités de l'aquaculture mais il faut rester prudent. Ainsi Craik & Harvey (1984) affirment que la meilleure façon de tester la viabilité d'un oeuf est la tentative de fertilisation alors que Kato & Kamler (1983) soulignent l'indépendance entre la qualité des oeufs et la fertilisation.

Le tableau ci-joint illustre la diversité et la multitude des critères utilisés par les auteurs pour tenter d'évaluer la qualité des oeufs. Ces critères ont été utilisés et n'ont pas toujours été discriminants (Tableau 1).

Une approche de type zootechnique sur une période prolongée présente l'avantage de mesurer exactement ce que l'on cherche à évaluer: l'aptitude de l'oeuf à fournir une larve ayant de bonnes performances en condition d'élevage, elle s'inscrit dans la volonté d'obtenir une vision dynamique de la qualité. Il reste à préciser dans quel cadre s'effectuerait l'évaluation de la qualité par le biais zootechnique.

	Critères	Brown, 1992	Carillo, 1989	Planas, 1993	Olin, 1990	Kjørsvik, 1991	Peleitero, 1993	Kjørsvik, 1983	Devauchelle, 1982	Bruce, 1993	Fauvel, 1992	Fauvel, 1993	Kato, 1983	Mårstøl, 1993	Luquet, 1986	Srivastava, 1992	Srivastava, 1993	
Biométrique	Diamètre												X				X	
	Taille					X							X			X		
Biochimique	Teneur en eau	X							X							X	X	
	Teneur en lipides	X		X													X	
	Teneur en glucides			X														
	Teneur en protéines			X	X													X
	Teneur en cendres																	X
	Teneur en acides aminés libres														X		X	
Morphologique	Taux de viabilité						X				X							
	Symétrie du blastomère									X								
Zootechnique	Rendement de fertilisation											X						
	Taux de fertilisation					X	X			X		X						
	Taux d'éclosion						X		X		X							
	Taux de survie						X						X					
	Taux de malformations					X			X									
	Succès de l'incubation									X								
Autres	Degré de surmaturation					X						X						
	Flottaison		X												X			
	Contenance calorique	X																
	Durée de la réaction corticale							X										
	Densité calorimétrique	X											X					

Tableau 1: Récapitulatif des principaux critères de qualité rencontrés dans la littérature

C/UNE NOUVELLE APPROCHE DE L'EVALUATION DE LA QUALITE DES OEUFs ET LARVES DE POISSONS MARINS: LE CHOIX DU CHALLENGE

I. Définition, principes

Le "Challenge" est une méthode expérimentale issue des travaux sur les salmonidés et qui consiste à faire subir aux poissons un cumul d'épreuves. La réponse des poissons fournit une évaluation des facultés d'adaptation des poissons soumis au challenge.

L'aptitude à supporter des conditions d'élevage correspond à la faculté de tolérer un environnement donné et le stress occasionné; le challenge est l'outil le plus adapté à la mesure de la tolérance du poisson aux facteurs de stress (Clarke, 1982). Il apparaît donc que le challenge est intéressant pour évaluer l'aptitude de l'oeuf et des larves à bien démarrer l'élevage et donc la qualité comme nous l'avons définie (Kjørsvik et al., 1990).

II. Les différentes possibilités

II.1 Les contraintes du challenge appliqué aux larves de poissons marins

Pour choisir le type d'épreuve à appliquer, il convient de tenir compte à la fois des contraintes pratiques et biologiques:

- rester si possible dans le cadre de l'incubation et de l'élevage larvaire de routine
- choisir un facteur de stress utilisable en pratique et discriminant
- ne pas nourrir les larves car la difficulté de produire une qualité constante de proies vivantes est une des sources majeures de variabilité de l'élevage larvaire. Cousin et al. (1987) ont comparé le développement et la mise en place des activités enzymatiques chez des larves de turbot à jeun et nourries et n'a pas observé de différences. Les animaux nourris qui mouraient possédaient la même activité enzymatique que ceux qui survivaient et se nourrissaient. Cela permet de conclure que les pics de mortalité lors du démarrage de l'alimentation exogène ne sont pas dus à des déficiences digestives.

Ces éléments appuient le choix d'éliminer l'alimentation puisque les différences d'aptitude à la survie en conditions d'élevage larvaire ne proviennent pas de différences d'aptitude à l'alimentation ou à la digestion.

La suppression de ce facteur éminemment variable dans le temps, permettra la reproductibilité des challenges à l'identique et facilitera la comparaison de résultats obtenus tout au long d'une saison de production, si l'on s'intéresse à la qualité selon le rang de ponte, par exemple.

En conclusion, la mise à jeun doit être cumulée avec un facteur de stress (ou épreuve) contrôlable et reproductible dans des conditions proches de celles de l'élevage larvaire.

II.2 Sélection du type d'épreuve à cumuler à la mise à jeun

Les différentes possibilités envisageables sont les suivantes, Wedemeyer & Mc Leay (1981) ont effectué une revue intéressante des méthodes de détermination de la tolérance des poissons aux facteurs de stress et citent, entre autres facteurs intéressants:

- un choc thermique provoque une situation de stress mais pour des raisons techniques cette situation est difficilement reproductible à l'identique
- une concentration anormale d'un gaz dissous ou d'un soluté, une modification de la salinité peuvent induire le stress chez les larves mais pour des raisons techniques l'utilisation de ces

facteurs est inconcevable à l'échelle à laquelle on a décidé de travailler. Jelmert & Naas (1990) ont testé l'effet de différentes concentrations en O₂ et H₂S dissous sur les oeufs de flétan, dans le but d'étudier les malformations

- une situation de surdensité (phénomène de "over-crowding") est envisageable mais la nécessité d'opérer dans un volume restreint impose d'éviter les problèmes de pollution qui se déclencheraient inévitablement

- le déclenchement d'une pathologie par injection dans le milieu d'un pathogène présente l'avantage d'offrir une réponse rapide mais pose des problèmes de contrôle sanitaire. Gatesoupe (1991) a effectué des infections expérimentales avec des souches de *Aeromonas hydrophila*, dans l'optique de tester l'effet pathogène de ces bactéries.

Plus généralement on peut dire que les facteurs du milieu de nature chimique et biologique sont très difficilement contrôlables et reproductibles et doivent être mis de côté. Le choix du facteur de stress doit être opéré parmi les facteurs physiques du milieu.

III Le choix effectué

Pour choisir les épreuves du challenge, nous nous sommes inspirés de résultats obtenus à l'Ifremer de Brest au cours de manipulations prospectives sur le challenge menées dans les structures d'élevage larvaire classique. Ces manipulations (Gaignon & Petton, com. pers.) ont permis de tester la suppression de l'alimentation pour éliminer les facteurs de variabilité de l'alimentation par des proies vivantes et l'intérêt de cumuler à la mise à jeun un facteur de stress.

Les principales conclusions de ces manipulations sont les suivantes:

- les larves mises à jeun sont sensibles à l'application de facteurs pouvant engendrer un stress et cela se traduit par la réduction du temps de survie, ceci confirme les observations de Quantz (1985)

- deux facteurs physiques du milieu techniquement contrôlables ont été retenus: débit et lumière. Différents débits ont été testés sans succès, la lumière, par contre, semble avoir un effet important sur les larves de turbot puisque des larves à jeun placées en conditions d'obscurité totale présente une durée de survie supérieure (environ 20%)

D'autre part, la comparaison de la réaction de 3 pontes différentes (issues de parents différents) à ces conditions de challenge (non alimentation et facteur de stress lumineux), toujours dans les structures d'élevage larvaire, a fourni des indications précieuses sur la pertinence des choix à effectuer dans le protocole du challenge dans l'optique du test de la qualité des larves. Ainsi la Figure 1 illustre les possibilités de discrimination des pontes puisque l'on observe une cinétique de mortalité différente entre les 3 pontes (notées P1, P2 et P3) placées dans les conditions de lumière (18/6 correspondant à 18 h de lumière et 6 h d'obscurité) alors que la réponse des 3 pontes placées à l'obscurité (notée N) est similaire. De plus, la différence de durée de survie entre les traitements (N et 18/6) indique que le traitement lumineux correspond bien à l'application d'un facteur de stress ayant pour conséquence l'accélération de la consommation des réserves.

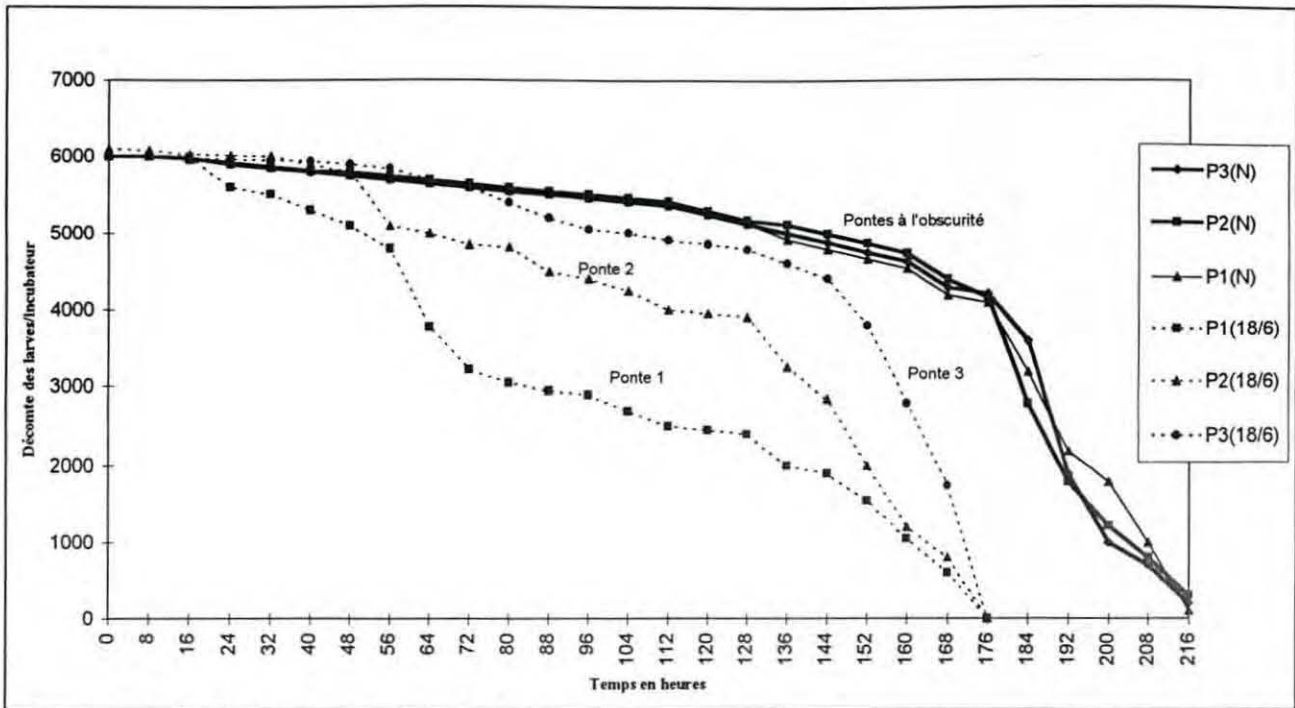


Figure 1: Evolution du nombre de larves par incubateur, courbes représentant la moyenne de 3 réplicats, comparaison entre les 3 pontes pour les 2 conditions de lumière

C'est donc sur la base de ces données expérimentales qu'il a été décidé d'orienter les travaux visant à mettre au point le challenge dans une structure adaptée différente de celle de l'élevage larvaire. La nécessité de mieux cerner les effets de la lumière sur la survie en conditions de jeûne et en particulier les effets liés au choc allumage-extinction comme facteur de stress. D'autre part, les possibilités de discrimination des pontes étaient un préalable à la mise au point du challenge.

D/ ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES PRINCIPAUX FACTEURS DU CHALLENGE

I Lumière

I.1 Intensité

Chez le bar, les fortes intensités de lumière sont létales pour les larves non encore pigmentées (Barahona-Fernandes, 1979). Chez le turbot, il n'y a pas de différences de taux d'éclosion entre des pontes incubées avec 24h de lumière (54 lux) et des pontes incubées à l'obscurité (Iglesias et al., 1991). D'autre part les larves ayant été incubées à l'obscurité accroissent leur activité pour un éclairage de 300 lux, celles qui ont été incubées à la lumière (300 lux) accroissent leur activité à 900 lux. Il existe des réactions à la lumière chez les larves avant la pigmentation des yeux: la lumière serait perçue par des organes extra-rétiniens (Hansen & Pittman, 1994).

Chez le flétan en grossissement, Hole & Pittman (1994) ont étudié l'effet de la lumière sur la croissance (poissons de 1,85 g). La plus faible intensité lumineuse (500 lux) donne les meilleurs résultats. L'hypothèse explicative serait l'augmentation du coût métabolique par le biais du niveau d'activité avec des illuminations de plus en plus fortes. Skiftesvik et al. (1990) ont montré que la lumière a des effets sur le développement, l'activité et la mortalité des larves de flétan. D'autre part, le poids sec des larves en fin d'expérimentation est supérieur dans des conditions d'intensité faible (1 & 10 lux). Ainsi les conditions d'intensité forte (1000 lux) nuisent à l'utilisation des réserves vitellines. Bolla & Holmefjord (1988) se sont intéressés aux taux de malformations des larves en fonction des intensités lumineuses et ont montré que l'obscurité totale fournit un nombre significativement supérieur de larves normales.

Skiftesvik et al. (1990) considèrent la vitesse de nage moyenne comme un indicateur de la consommation d'énergie et le niveau d'activité et la vitesse de nage pendant les périodes actives comme une indication sur le mode de consommation. L'activité (méthode d'observation décrite par Huse & Skiftesvik, 1985) des larves est plus intense dans le noir complet mais la vitesse de nage est plus faible. La différence d'activité entre les larves à l'obscurité et les larves soumises à de fortes intensités de lumière pourrait être un artefact.

A travers cette hypothèse, Skiftesvik et al. (1990) font le lien entre lumière et stress des larves: la lumière engendre une mauvaise condition qui réduit les capacités de la larve de flétan et par conséquent les capacités de réponse. Toutes ces observations ne sont probablement pas extrapolables aux larves de turbot; en effet la profondeur à laquelle se reproduisent les flétans est de plusieurs centaines de mètres et les conditions naturelles de lumière rencontrées par les oeufs de flétan et les oeufs de turbot peuvent être très différentes (la profondeur à laquelle se déroule la reproduction du turbot est de quelques dizaines de mètres).

De manière plus générale, Skiftesvik et al. (1990) soulignent le fait que le comportement des larves est considérablement influencé par la lumière (intensité, longueur d'onde, polarisation, variation journalière et saisonnière et contraste). En élevage, la larve ne peut pas sélectionner l'intensité à laquelle elle doit se développer et cela pourra affecter la bonne utilisation de la vésicule.

I.2 Spectre

Chez les salmonidés les pigments pourraient avoir un rôle dans la protection contre la lumière (Craik, 1985). Chez la truite, les oeufs sont sensibles à la lumière visible, la mortalité peut être totale s'il y a exposition au stade le plus sensible. La lumière bleue et la lumière violette (400 et 500 nm) seraient plus dangereuses que la lumière jaune ou rouge (Craik, 1985). Dey & Damkaer (1990) ont montré que la lumière visible est nocive pour les oeufs de saumon mais que la lumière issue d'un tube rose fluorescent a un effet bénéfique sur la croissance pondérale des juvéniles de saumon.

I.3 Choc lumineux

Peu de données sont disponibles à ce sujet, Helvik & Pittman (1990) ont montré l'existence d'autres effets importants de la lumière sur les oeufs et les larves de flétan. Une exposition brutale à la lumière permet d'obtenir une éclosion dans un délai de 90 à 120 minutes alors que si les oeufs sont incubés à l'obscurité l'éclosion se déroule sur une période de 2 jours. Les auteurs font l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme photochimique pour le déclenchement des enzymes impliquées dans l'éclosion.

II Les réserves embryonnaires

L'intérêt du challenge par la mise à jeun à laquelle est combinée un facteur de stress lumineux demande à être précisé par l'étude de l'importance des réserves vitellines sur les performances larvaires et dans un second temps par l'étude de la mise à jeun et des facteurs de survie impliqués. Pour pouvoir interpréter les performances larvaires il faut connaître les mécanismes impliqués dans le déroulement de l'éclosion et le développement de la larve.

II.1 Quantité

La taille de l'oeuf est un critère qui a souvent été utilisé pour évaluer la qualité d'une ponte. En effet les oeufs les plus gros fourniront les larves les plus grosses et donc les plus aptes à bien démarrer en conditions d'élevage. Bagenal (1971) a montré l'importante variabilité de la taille des oeufs inter mais aussi intraspécifiques (jusque 100% de variation) pour 46 espèces marines et 27 espèces d'eau douce. Mais on trouve des données variées et contradictoires sur le sujet:

- chez les salmonidés, la taille de larves est corrélée à la taille des oeufs, 8 semaines après la fertilisation, il existe une relation positive entre la taille de l'oeuf et la taille des alevins, mais l'avantage est perdu 4 semaines après la première prise alimentaire (Springate & Bromage, 1985)

- chez *Coregonus clupeaformis* la longueur à l'éclosion est corrélée au contenu calorique et l'aptitude à la nage (déterminée par la taille) est primordiale pour le passage de l'alimentation endogène à l'alimentation exogène (Brown & Taylor, 1992).

- chez le bar, les oeufs les plus hydratés donnent les meilleurs taux et les oeufs dont le poids sec est le plus petit sont de meilleure qualité. Globalement, les petits oeufs bien hydratés sont de meilleure qualité chez le bar (Devauchelle & Cladas, 1982). A ce titre il faut citer l'observation de Bagenal (1969) qui recommande d'utiliser le poids sec pour caractériser la taille de l'oeuf puisque le poids humide dépend du degré d'hydratation.

- chez le turbot, Barton (1981) a observé une relation entre la taille de l'oeuf et la longueur de la larve à l'éclosion. Il y a une relation inverse entre la taille de l'oeuf et l'indice de réserve vitelline, c'est à dire que les petits oeufs contiennent proportionnellement plus de réserves vitellines. Jusqu'à J10, les petites larves ont les mêmes performances larvaires que les grosses, par contre, les larves les plus grosses ont une plus grande marge de manoeuvre pour le passage à l'alimentation exogène. Pour Kjørsvik et al. (1990), une seule chose est sûre à ce sujet: les larves de grande taille peuvent survivre plus longtemps sans alimentation. Ainsi les grandes larves ont-elles des capacités de survie supérieures en conditions d'élevage défavorables; néanmoins le taux de croissance des petites larves de bar est supérieur à celui des larves les plus grandes (Devauchelle & Cladas, 1982). En 1991, Mc Evoy & Mc Evoy (1991) soulignent le fait que l'influence de la taille de la larve est variable

- de plus il existe une importante difficulté pour différencier l'effet de la taille de l'oeuf de l'effet de l'âge des femelles qui ont pondu (Kamler & Kato, 1983). Chez la truite arc-en-ciel, en général, les plus grandes et les plus vieilles femelles produisent le plus grand nombre d'oeufs, mais comme ces oeufs sont plus petits, il est difficile d'isoler l'effet de l'âge de la femelle (Gall, 1974).

Il demeure délicat d'évaluer l'effet de l'importance des réserves vitellines sachant que les moyens utilisés pour la mesure (taille de l'oeuf, poids humide ou sec) peuvent être biaisés par les phénomènes d'hydratation. La contenu calorique, rarement utilisé s'est révélé corrélé aux taux de

survie chez *Coregonus clupeaformis* (Brown & Taylor, 1992) et inefficace pour les oeufs de truite (Kato & Kamler, 1983).

II.2 Composition

La composition de l'oeuf a souvent fait l'objet de prospections. Les essais ayant pour but de rechercher un critère biochimique discriminant de la qualité nous fournissant des informations sur les relations (si elles existent) entre la composition de l'oeuf et différents processus physiologiques. Il semble raisonnable d'envisager que la variabilité de la qualité des oeufs puisse s'expliquer par la variabilité de la composition, étant donné la nature endogène de l'alimentation au cours des stades précoces.

Devauchelle & Cladas (1982) et Mc Evoy et al. (1993) ont analysé la composition biochimique des oeufs de turbot, il n'y a pas de différences significatives entre les oeufs produits en début de saison et en fin de saison de ponte.

*Protéines

Olin & Von Der Decken (1990) ont montré l'existence d'un métabolisme protéique dans l'oeuf, certaines protéines mal représentées seraient à l'origine de mauvais taux de viabilité chez les salmonidés.

Chez le turbot, Planas et al. (1991) ont étudié la mise à jeun des larves et ont constaté l'utilisation rapide des lipides et protéines de réserve à laquelle succède l'autolyse des tissus et particulièrement des protéines.

*Lipides et glucides

- chez le turbot, Planas et al. (1993) ont observé des changements dans la composition chimique des oeufs au cours du développement. Le lot ayant les meilleures performances était le lot où les oeufs contenaient le plus de glycogène et le moins de lipides. Les auteurs soulignent l'importance du glycogène comme source d'énergie dans les stades précoces. Il existe une importante variation intraspécifique de la composition des oeufs en acides gras au sein d'une même ponte. Des travaux antérieurs de Planas et al. (1991) avaient montré la prépondérance des lipides et particulièrement des triacylglycerols comme source énergétique durant l'embryogenèse.

- chez le flétan, des pontes viables et non viables ne présentent pas de différences significatives pour les compositions en lipides et acides gras (Bruce et al., 1993). Whyte et al. (1993) ont observé une croissance linéaire de la teneur en glucides et une décroissance linéaire des lipides totaux et cendres au cours du développement

- Soivio et al. (1989) ont comparé la composition en acides gras des larves de *Coregonus muksum* nourries et à jeun. Pour les larves à jeun le pourcentage en acides gras saturés augmente alors que pour les larves nourries le pourcentage de monoènes et de polyinsaturés augmente

*Acides aminés libres

Chez le turbot, les acides aminés libres jouent un rôle énergétique majeur pendant l'incubation (80% des acides aminés libres présents dans l'oeuf sont consommés pendant l'incubation), ensuite, c'est la gouttelette lipidique qui serait impliquée dans les processus de consommation énergétique (Rønnestad, 1989, Rønnestad et al., 1992, Rønnestad & Fyhn, 1993). Un oeuf contient 53 nmoles d'acides aminés libres:

- 40 nmoles disparaissent pendant l'incubation
- 10 nmoles disparaissent pendant la résorption

Globalement, 25% des acides aminés libres sont polymérisés en protéine et 75% sont utilisés en énergie. D'autre part la teneur en acides aminés libres diminue au cours de la saison de ponte mais il n'a pas été observé de différences qualitatives. Les différences de teneur pourraient permettre d'établir un critère de qualité car la pauvreté en acides aminés libres signifie que l'oeuf dispose de moins d'énergie et risque d'être moins viable (Mårstøl et al., 1993).

De manière plus générale les oeufs pélagiques contiennent de fortes teneur en acides aminés libres mais pas les ovocytes, par contre ces derniers contiennent beaucoup de protéines. Les oeufs de turbot qui sont pélagiques contiennent 92% d'eau, l'influx massif d'eau dans les ovocytes se fait pendant la maturation et est dû au rôle d'osmo-effecteurs des ions inorganiques, mais aussi aux acides aminés libres qui sont issus de la protéolyse des protéines de la vésicule (Craik & Harvey, 1987).

Thorsen et al. (1993) et Fyhn (1993) ont décrit le rôle d'osmo-effecteurs des acides aminés libres mais ceux-ci ont aussi un rôle dans la régulation de la flottabilité, sont une source d'énergie et représente l'élément de base de la synthèse des protéines.

Eventuellement la teneur en acides aminés libres serait indicatrice de la quantité d'énergie disponible, dans les oeufs pélagiques de poissons marins, pour l'incubation (Mårstøl et al., 1993)

*Evolution de la composition au cours du développement

Heming (1982), Fukuhara (1990) ont montré que la vésicule est résorbée d'autant plus tôt que la température est élevée, les températures élevées entraînant une diminution de la quantité totale d'énergie disponible pour la croissance tissulaire.

Selon Planas et al. (1993), le taux de croissance spécifique des larves de turbot est négatif au stade vésiculé, ce qui signifie qu'il y a un déficit énergétique.

Chez les larves de *Siganus guttatus* la disparition de la vésicule coïncide avec le développement rapide du système digestif (Avila & Juario, 1987), alors que chez la daurade il n'y a pas de juxtaposition de l'alimentation exogène et de l'alimentation endogène. La daurade consomme des composés riches en carbone (lipides) pendant les stades prétrérophiques. Quand les réserves sont épuisées, il y a catabolisme des tissus corporels (Yufera et al., 1993).

*Effets de traitements hormonaux

En ce qui concerne les effets de certains traitements des géniteurs sur la composition des oeufs, des larves et leur viabilité:

- dans le cas des traitement aux hormones thyroïdiennes, Brown et al.(1988) ont montré l'existence d'un transfert de l'hormone T3 des géniteurs vers les oeufs chez *Morone saxatilis*. De plus il existe des différences significatives de taille des larves, de taux de vessié et de taux de survie entre des oeufs issus de géniteurs injectés et des géniteurs témoins (à l'avantage de ceux traités). Il y a une corrélation significative entre la concentration en T3 au stade ovocytes non fécondés et le taux de survie au sein des cohortes. Ayson & Lam (1993) confirme le transfert de T3 et T4 des géniteurs vers les oeufs chez *Siganus guttatus*.

- dans le cas des traitements à la testostérone, Srivastava & Brown (1992 & 1993) ont comparé la qualité des oeufs issus de poissons traités et non traités. Les oeufs issus de poissons traités sont plus légers et de diamètre inférieur, contiennent moins d'acides aminés et la teneur en acides aminés libres est supérieure lors de la première prise alimentaire. Les acides aminés totaux diminuent au cours du développement, mais la teneur en acides aminés libres augmente (de manière plus considérable pour les oeufs et alevins issus de poissons traités). Ainsi les embryons et alevins de poissons traités mobilisent plus d'acides aminés libres, les alevins sont donc plus gros et plus lourds à la première prise alimentaire (effet anabolique de la testostérone).

En conclusion, il faut souligner la complexité des mécanismes qui s'enchaînent et la multitude des éléments impliqués qui ne semblent pas permettre, en l'état de nos connaissances, l'évaluation de la qualité des oeufs (en fait leur aptitude à se développer et donc à utiliser l'énergie disponible) par les seules analyses biochimiques. L'existence de contradictions confirme cet état de fait.

III La non alimentation des larves

III.1 Conséquences de la mise à jeun

Au cours de l'élevage larvaire le passage de l'alimentation endogène à l'alimentation exogène est une étape critique. Il est impératif d'offrir aux larves des proies vivantes (rotifères) dès la résorption de la vésicule. Chez le turbot, d'après Person-Le Ruyet (1989) la date de première distribution de nourriture influence substantiellement les taux de survie à partir de J3 (après l'éclosion).

Il y a des conséquences histologiques telles que l'atrophie ou la desquamation du tube digestif liées au jeûne. 72 h après J3, si les larves de turbot n'ont pas été nourries, elles ne s'alimenteront plus (Cousin, 1986). Chez la daurade, Yufera et al. (1993) ont montré que le pourcentage de larves contenant un estomac visible est maximal quand la nourriture est distribuée 5 jours après l'éclosion. Yufera et al. (1993) ont observé une diminution forte de la taille du foie chez les larves mises à jeun mais aussi des dégénérescences histologiques généralisées:

- pigmentation plus pauvre
- apparition de cristaux dans la vessie urinaire
- le foie devient noir et compact
- dégénérescence du tube digestif

III.2 Notion de point de non retour

Le point de non retour (PNR) correspond au délai maximum de première alimentation qui autorise la survie d'au moins 50% des larves. Arul (1991) a effectué une revue des durées de résorption des vésicules vitellines et PNR pour 31 espèces. Støttrup (1993) a comparé la survie des larves de turbot à jeun et nourries, cet auteur souligne la difficulté de bien cerner les conditions de l'élevage larvaire et de leurs effets sur l'aptitude à la première prise alimentaire, à la résistance à la mise à jeun.

III.3 Spécificités du comportement des larves non alimentées

Les données sur le développement, l'apparition de certaines fonctions chez les larves et surtout des comportements larvaires peuvent justifier une approche zootechnique en lieu et place des analyses biochimiques classiquement opérées.

Jones (1972), Skiftesvik et al. (1990) et Huse & Skiftesvik (1985) ont montré qu'il existe une modification de l'activité et de la vitesse de déplacement au moment de la résorption de la vésicule et au moment prévu de la première prise alimentaire (y compris dans le cas de larves mises à jeun). Neave (1984) a observé le développement de l'acuité visuelle des larves de turbot, celle-ci augmente brutalement à la fin de la période de résorption.

Ainsi doit-on souligner l'importance du bon déroulement de la mise en place du comportement de prise alimentaire lors du passage à l'alimentation exogène étant donné que ce ne sont pas des déficiences digestives qui peuvent être incriminées. On constate que la mise en place de ce comportement et l'aptitude globale de la larve à supporter les conditions d'élevage sont les caractéristiques de qualité décrites par Kjørsvik et al. (1990).

Huse & Skiftesvik (1985) ont comparé le comportement des larves de turbot à jeun et nourries. On a déjà cité l'augmentation de l'activité au moment présumé de la première prise alimentaire. Les larves qui sont à jeun nagent plus vite mais ont des périodes d'activité plus courtes.

IV Facteurs de survie lors de la mise à jeun

Les facteurs influençant la survie en conditions de jeûne sont mal cernés. Seuls 2 facteurs sont cités dans la littérature:

- la température: Strüssmann & Takashima (1989) ont recherché l'interaction entre la température et la mise à jeun et a montré que le PNR est atteint plus vite si les températures sont hautes, de plus chez *Odonthestes bonariensis*, les larves mises à jeun à 17,5°C sont plus grosses de 8% que des larves mises à jeun à 21,5°C. Fukuhara (1990) a montré, sur 4 espèces de poissons appartenant à des familles différentes que la vésicule est résorbée d'autant plus tôt que la température est élevée. En outre la température n'a pas un effet évident sur la croissance maximale des larves mais a un impact clair sur le temps de mortalité par mise à jeun. Chez le turbot, les travaux de Quantz (1985) ont montré que la diminution du poids de la vésicule est corrélée à la température.

- les tailles de l'oeuf et de la larve, souvent utilisées comme critères potentiels de qualité en terme de viabilité ont parfois été reliées à la capacité de survie en conditions de jeune. Ainsi Kjørsvik & Lønning (1991) affirme que les larves de grande taille peuvent survivre plus longtemps sans alimentation. Pour Devauchelle & Cladas (1982) la plus grande différence entre grandes larves et petites larves réside essentiellement dans leur capacité de survie à des conditions d'élevage défavorables. Selon, Barton (1981), les larves les plus grosses ont une plus grande marge de manoeuvre pour le passage à l'alimentation exogène.

En conclusion, il apparaît que la survie en conditions de jeûne peut être influencée par un facteur externe comme la température et on a vu l'existence des effets d'un stress occasionné par la lumière. Pour Quantz (1985), les larves souffrent de déficiences énergétiques pendant les 24 h précédant la première prise alimentaire; tout facteur abiotique qui influence l'utilisation de la vésicule peut modifier la survie pendant cette période dite critique.

Les conséquences en termes d'évaluation de la réponse sont les suivantes

- les paramètres qualitatifs ayant déjà été testés par différents auteurs avec peu de succès et ne permettant pas le plus souvent un suivi continu, on ne s'intéressera qu'au poids des larves (humide et sec). Le poids présente aussi des difficultés vu la très faible masse des larves (poids humide inférieur à 0,2 mg) mais peut apporter des informations intéressantes sur l'état de forme général des larves et sera donc testé à titre prospectif.

- la réponse mesurée doit être choisie parmi les critères zootechniques applicables au larves. La mortalité a été sélectionnée car la mesure de cette quantité est une des seules que l'on soit capable d'effectuer précisément sur des poissons aussi petits que des larves de turbot (taille à l'éclosion comprise entre 2,7 et 3 mm), même si les contraintes sont importantes.

E/ MISE AU POINT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES D'INCUBATION PREPARANT LE CHALLENGE

*Introduction: le challenge porte sur la phase larvaire c'est-à-dire après l'éclosion. Néanmoins, il est important de cerner les effets de la lumière lors de l'incubation sur l'état initial des larves puisque c'est ce facteur que l'on a retenu pour la mise au point du challenge.

De plus, il est nécessaire d'envisager une dérive de la qualité initiale des oeufs au cours de l'incubation due aux effets grandissants de l'environnement. Ainsi pour démarrer le challenge il serait nécessaire de standardiser l'incubation par rapport aux facteurs qui peuvent avoir un impact sur ce que l'on pourrait appeler l'état de forme générale au moment du démarrage du challenge.

I Méthodologie pour le recueil des données

I.1 Contraintes liées à un suivi d'effectif

*Répartition initiale des oeufs: le choix de la ponte à répartir est effectué après qualification par le taux de viabilité. Celui-ci est estimé par examen à la loupe binoculaire d'un lot d'oeufs:

$$\text{Taux de viabilité} = \frac{\text{Nb viable d'aspect}}{\text{Nb total}}$$

La répartition des oeufs dans les incubateurs au démarrage de l'incubation est effectuée selon la méthode décrite par le CER fécondation n° 1/1994 (rapport interne Ifremer).

Les conditions expérimentales de référence (CER) pour l'année 94 concernant les protocoles de fécondation sont l'aboutissement de toutes les manipulations visant à obtenir les conditions les plus fiabilisées. Le contrôle technique maximal et la standardisation de certaines phases de la fécondation artificielle permet d'envisager la reproductibilité des expérimentations à partir de ces références. Pour répartir les oeufs dans les incubateurs de manière fiable nous avons utilisé les techniques de prélèvement et de comptage des ovules des CER 94.

Les ovules sont prélevés dans une bassine contenant la ponte à l'aide d'une pipette à déplacement positif qui permet de prélever des volumes constant (C.V = 2,1% pour 10 prélèvements de 1 ml). Le prélèvement est effectué avant fécondation car les oeufs dans l'eau de mer ne peuvent être prélevés de manière aussi précise.

La fécondation des ovules est opérée dans un pilulier d'un volume utile de 30 ml. Ces piluliers sont ensuite transférés vers les incubateurs après la fécondation. Le nombre précis réparti est obtenu en comptant 3 faux-piluliers qui ont été tirés au sort parmi une série de piluliers et sont destinés à évaluer le nombre d'oeufs. La moyenne fournit une estimation précise du nombre d'oeufs répartis

*Problèmes des manquants: pour évaluer la réponse des oeufs, nous avons décidé de suivre précisément la mortalité et de nous intéresser uniquement à ce paramètre; nous verrons plus loin que pour la phase larvaire, le suivi de la mortalité a parfois été complété par des mesures de poids des larves.

Le suivi de la cinétique de mortalité impose de récupérer les oeufs morts à intervalles réguliers. Le comptage des oeufs morts permet de calculer la mortalité au sein de la population restante. Cette méthode est utilisée classiquement en incubation de production, mais le comptage se fait en termes de volume au détriment de la précision.

Le souci de fiabilité nécessite de minimiser le taux de manquants et les différences d'effectifs au cours des 6 jours de l'incubation (pour une température comprise entre 13 et 14 °C). Le taux de

manquants correspond à la différence entre le nombre d'individus disposé dans la structure et la somme des mortalités et des vivants récupérés en fin de manipulation:

$$\text{Taux de manquant} = \frac{\text{Nb départ} - (\sum \text{mortalités} + \text{Nb Vivants fin})}{\text{Nb départ}}$$

*** Incubateurs utilisés**

Un incubateur expérimental de volume égal à 1000 ml a été utilisé. L'évacuation a été modifiée avec la mise en place d'un robinet permettant d'effectuer des purges. Le principe d'utilisation étant la séparation des oeufs morts des vivants par gravité. L'alimentation en eau et en air est effectuée grâce à une pompe péristaltique multicanaux qui permet d'obtenir un débit homogène pour tous les incubateurs (environ 5% de variation).

I.2 Observations d'essais préliminaires et résultats

La méthode de prise de mortalité a été améliorée au cours des manipulations de manière à réduire le taux de manquant. La fréquence des prélèvements a été fixée à 3 fois/jour, le volume des purges a été fixé à 30 ml (incubateurs de 1000 ml) pour éviter de prélever des oeufs vivants.

Le nombre d'oeufs utilisés doit être inférieur ou égal à 1000 non pas pour un problème de densité, des incubations pouvant être réussies à des densités largement supérieures (Omnès, com. pers.), mais pour éviter les forts taux de manquants. En effet, des essais effectués avec des nombres d'oeufs supérieurs à 2000 ont abouti à des taux de manquants inacceptables. Une forte densité peut favoriser le développement de champignons en cas de mortalité massive. De plus, un nombre d'oeufs important au départ entraîne un comptage fastidieux de la mortalité favorisant ainsi le risque d'erreur.

D'autre part, la nécessité de travailler avec une eau finement filtrée et débarrassée de matières en suspension est apparue, le dépôt d'une couche de matières en suspension sur le cône de l'incubateur fait apparaître des difficultés dans l'évacuation des morts.

Toutes ces améliorations de la gestion des prises de mortalités ont permis d'aboutir à des taux de manquants moyens sur 15 incubateurs inférieurs à 5%.

A titre de remarque il faut signaler qu'au cours de ces tests certaines pontes présentant des taux de viabilité supérieurs à 90% ont eu tendance à présenter une flottabilité négative à J2/J3 à 16°C et J3/J4 à 13°C tout en poursuivant un développement normal. Des oeufs vivants peuvent donc être récupérés parmi les morts. Ce phénomène rare mais normal chez certains poissons marins (Person, com. pers) complique notablement le suivi de la mortalité de pontes présentant de telles caractéristiques et pose une restriction majeure au suivi de la mortalité par séparation en fonction de la flottabilité des oeufs.

Il faut souligner que les contraintes du calendrier ont imposé de démarrer certaines expérimentations sur la recherche des effets des facteurs lumineux avant d'avoir pu optimiser la méthodologie. Ainsi, les essais de méthodologie ont souvent été menés parallèlement aux manipulations visant à comparer les traitements. Celles-ci, décrites plus loin ainsi que certaines expérimentations ont pâti de ce manque de temps pour pouvoir procéder par ordre.

II Recherche des effets de certains facteurs

II.1 Effets de la lumière

L'objectif final étant d'évaluer la qualité des oeufs en termes d'aptitude à fournir une bonne larve, il faut essayer de mesurer les effets de l'environnement et donc de l'incubation sur les larves qui débiteront le challenge. Les principales modalités du facteur lumière ont été testées (spectres et intensité).

La structure utilisée est une série de 15 incubateurs expérimentaux de volume égal à 1000 ml isolés en groupe de 3 (5 triplicats) permettant de tester 5 conditions de lumière. La pompe péristaltique permet de tester différentes conditions de débit d'air et d'eau. Une unité de filtration (25 μ et 5 μ), un filtre U.V. et une colonne de désaturation offre une qualité d'eau convenable. La température contrôlable est comprise dans une gamme de 13 à 16°C et régulée par un échangeur thermique.

II.1.1 Spectres

Trois groupes de traitement ont été appliqués avec 3 réplicats par groupe. Les spectres sont obtenus avec des tubes du commerce (tube bleu Philipps TL03, tube blanc industrie, tube grolux). Le nombre de réplicats effectifs décrits dans le tableau correspond au nombre de réplicats qui ont pu être utilisés comme résultats puisque des réplicats ont parfois été perdus pour raisons accidentelles (non fermeture des vannes de purge, par exemple).

N° groupe	Spectres	Nombre de réplicats effectif
1	Philipps TL03, lumière bleue	2
2	Blanc industrie, lumière froide	2
3	Grolux, spectre proche du solaire	3

Tableau 2: Caractéristiques des traitements utilisés

Les intensités ne sont pas précisément mesurables et comparables étant donné que les spectres sont différents (avec les moyens à disposition du centre Ifremer de Brest). On a décidé de fixer l'intensité au seuil de perception minimal pour l'oeil humain et à peu près identique entre les groupes dans la gamme de lecture du luxmètre.

Les autres facteurs sont fixés à:

- renouvellement d'eau: 100 %/heure
- débit d'air: environ 800 ml/h
- température moyenne: 15,5 °C ($\sigma = 0,25$)
- densité: 1000 oeufs/litre
- suivi de la mortalité: 2 fois/jour

Le taux de manquants moyen est inférieur à 5% ce qui correspond à un suivi satisfaisant de la mortalité. La figure 2 illustre le décompte du nombre d'oeufs restant par incubateur.

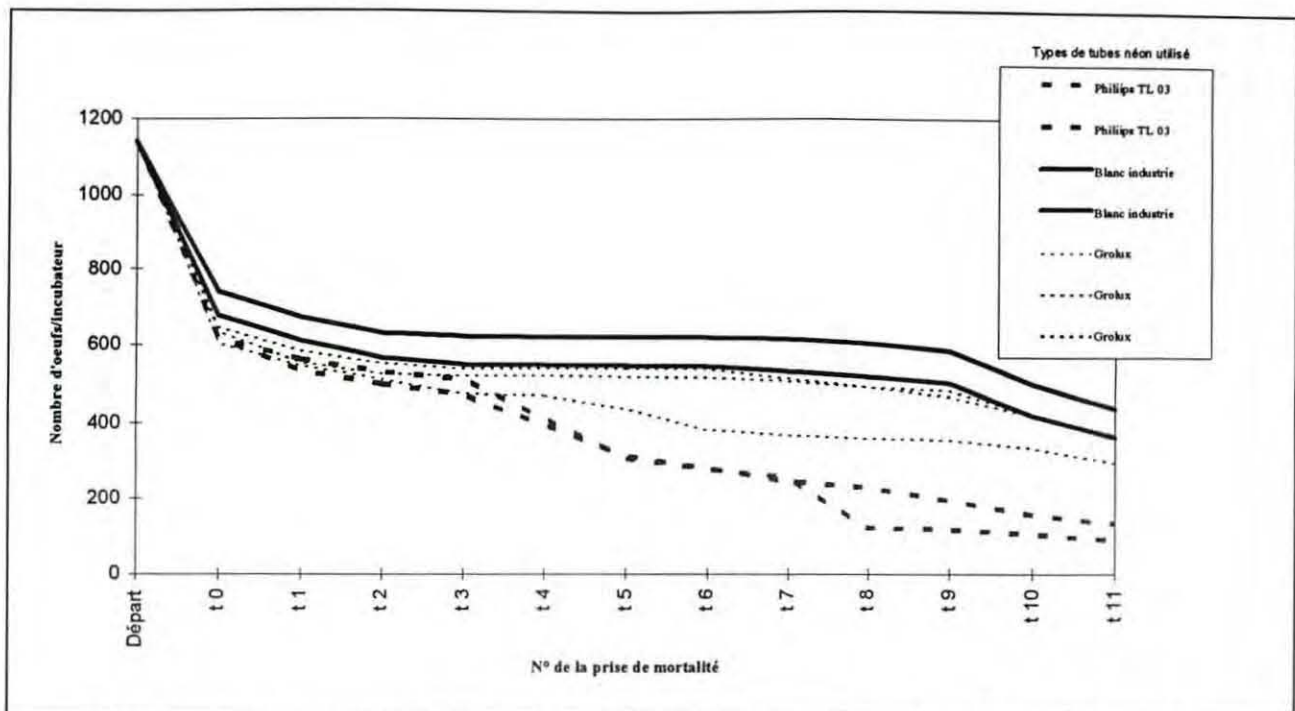


Figure 2: Evolution du nombre d'oeufs par incubateur, comparaison entre les 3 conditions de spectre lumineux

L'examen de la figure permet de conclure à la nocivité de la lumière bleue émise par le tube Philips. Les tubes Grolux et blanc industrie fournissent un type de réponse similaire avec un avantage en termes de survie pour le blanc industrie.

Le traitement statistique des données par une Analyse Factorielle Discriminante confirme la netteté de la réponse des réplicats soumis à la lumière bleue. De plus, l'AFD reclasse les observations dans leur groupe d'appartenance, si les réplicats se trouvent proches de la moyenne du groupe (voir en annexe la justification du choix de traitement statistique).

Si l'on considère chaque "prise de mortalité" comme une variable indépendante (de t0 à t11) on peut traiter les données après transformation par la racine carrée pour se rapprocher d'une répartition normale. Le tableau 3 présente les résultats de la vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett ainsi que la probabilité présentée par chaque variable de faire apparaître une différence non significative entre les groupes.

Variable	Test Bartlett	F(2/4) à 5%	Proba (%)
t0	ok	7.24	4.84
t1	ok	6.91	5.18
t2	ok	4.63	9.17
t3	ok	3.64	12.61
t4	ok	13.5	1.86
t5	ok	7.99	4.17
t6	ok	12.62	2.07
t7	ok	14.63	1.64
t8	ok	14.44	1.68
t9	ok	21.67	0.9
t10	ok	30.87	0.53
t11	ok	33.71	0.46

Tableau 3: Caractéristiques de l'AFD

Ainsi sur les 12 variables, 9 font apparaître une différence significative entre les groupes. Les axes discriminants retenus par l'AFD effectuée sur 6 variables (une par jour) ont les caractéristiques décrites dans le tableau 4.

Axe	Inertie (%)	Pseudo-F
1	71,8	3876,23
2	28,2	1521,68

Tableau 4: Caractéristiques des axes issus de l'AFD

La représentation dans le plan des axes discriminants de l'AFD permet de séparer les groupes et de conclure à l'existence d'un effet du spectre sur la mortalité en phase d'incubation (figure 3).

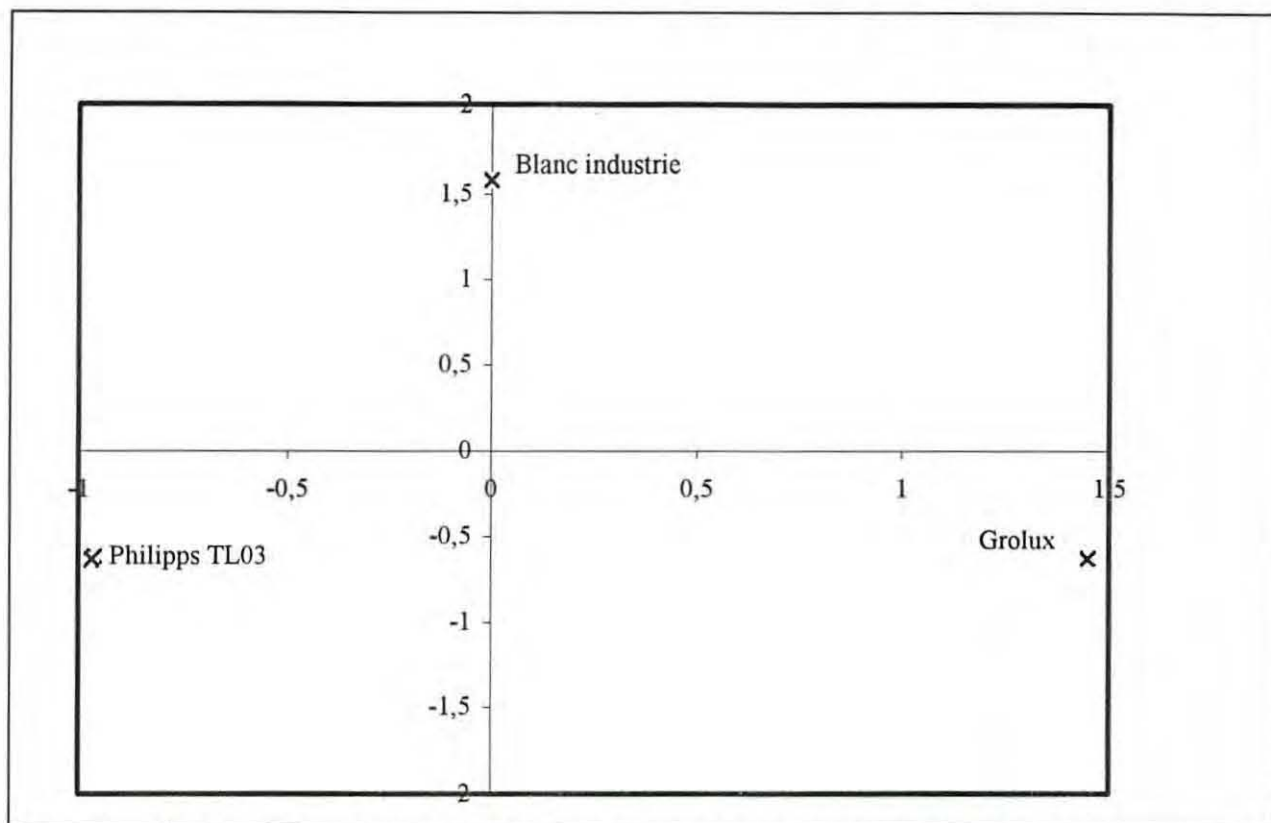


Figure 3: Représentation des réplicats des 3 traitements dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

Les réplicats sont si proches les uns des autres dans cette représentation que l'on ne voit apparaître qu'un point au lieu des 2 ou 3 correspondant au nombre de réplicats.

Les conclusions de cette expérimentation sont confirmées par la littérature sur le sujet (Craik, 1985 et Dey & Damkaer, 1990). L'existence potentielle de rayonnements U.V. dans les tubes Philipps TL03 et dans une moindre mesure dans les tubes Grolux peut être l'explication la plus simple à cette constatation. En tout état de cause, le Blanc industrie est utilisé en production et ces résultats ne remettent pas en cause son utilisation puisque ce spectre semble être le moins nocif des spectres utilisés pour le test.

II.1.2 Intensité

Trois groupes de traitement ont été appliqués avec 3 réplicats par groupe. Le spectre choisi est celui délivré par les tubes de type blanc industrie.

N° groupe	Intensité	Nombre de réplicats effectifs
1	Noir complet	3
2	30 lux	3
3	150 lux	3

Tableau 5: Caractéristiques des traitements utilisés

Les autres facteurs sont fixés comme suit:

- renouvellement d'eau: 100 %/heure
- pas de débit d'air
- température moyenne: 15,4 °C ($\sigma = 0,46$)
- densité: 2000 oeufs/litre
- suivi de la mortalité: 2 fois/jour

Les résultats de cette manipulation sont inexploitable en raison d'un taux de manquants trop important (moyenne voisine de 50%) car elle comprenait des essais de méthodologie et la densité testée s'est avérée trop importante. Les contraintes du calendrier ont interdit la reproduction de cette manipulation. Néanmoins, cette manipulation qui s'était poursuivie jusqu'au 13ème jour, c'est à dire 7 jours après l'éclosion avait laissé apparaître une survie larvaire plus importante pour les larves placées à l'obscurité. Nous verrons plus loin que cette observation empirique fut confirmée par les expérimentations consacrées à la phase larvaire.

II.2 Remarques à propos des facteurs hydrauliques

Nous avons essayé de tester les effets de l'hydraulique, principalement l'importance de la présence et de l'absence de bullage. Deux groupes de traitements avec 3 réplicats ont été mis en place.

N° groupe	Hydraulique	Nombre de réplicats effectifs
1	Eau: 100% /heure/ Air: 830 ml/h	3
2	Eau: 100%/heure / Air: 0	3

Tableau 6: Caractéristiques des traitements utilisés

Les autres facteurs ont été fixés comme suit:

- température moyenne: 15,4 °C ($\sigma = 0,46$)
- densité: 2000 oeufs/litre
- suivi de la mortalité: 2 fois/jour

La manipulation visant à tester la nécessité du brassage par l'air n'est pas exploitable pour la même raison que ci-dessus. Néanmoins des observations intéressantes ont pu être faites:

- les oeufs placés dans les incubateurs du groupe brassé par l'air ont éclos 24 h avant les autres (5ème jour au lieu du 6ème jour à 15,5°C).

- il semble que la mortalité soit moins importante lors de l'éclosion en présence d'un brassage d'air

D'autre part le brassage par l'air pose d'importants problèmes techniques. En effet il est très difficile d'obtenir un brassage homogène entre les réplicats que ce soit en débit d'air ou en taille et nombre de bulles. L'unique solution dont on dispose est l'utilisation de canaux de la pompe péristaltique pour le pompage de l'air mais le nombre de canaux étant limité à 40, on ne peut envisager de dépasser le nombre de 20 incubateurs.

III Conclusions sur la phase incubation

Les résultats obtenus ont été marqués par des problèmes méthodologiques. En effet, les méthodes de prise de mortalité n'ont pas été optimisées dès le départ et les impératifs du calendrier ont imposé de lancer certaines manipulations sur la recherche des effets de certains facteurs avant de maîtriser totalement les problèmes techniques. En tout état de cause, il était intéressant de voir apparaître les principaux problèmes de la structure afin de mieux gérer la suite des manipulations sur la phase larvaire.

L'objectif de standardisation du conditionnement des oeufs lors de l'incubation n'a pas été atteint. Par contre on peut légitimement émettre les hypothèses suivantes:

- la lumière a un effet sur l'incubation et l'effet du spectre a été démontré
- l'hydraulique et le brassage par l'air en particulier ont un effet sur l'éclosion et ceci peut être expliqué par le nombre de chocs subis par les oeufs. Le choix du suivi exclusif de la mortalité pourrait être complété par un suivi de critères qualitatifs et permettre ainsi de mieux cerner l'effet du brassage par l'air sur l'éclosion par exemple.

Dans l'attente de l'établissement de conditions expérimentales de référence, on a donc décidé de fixer des conditions d'incubation qui permettraient d'obtenir un conditionnement le plus homogène possible pour soumettre les larves au challenge. Ce type de standardisation ne demande qu'une valeur acceptable de chacun des facteurs pour les oeufs.

En conséquence il a été décidé d'aménager les conditions d'incubation de production:

- incubateurs cylindro-coniques de 40 litres
- température de 13,5°C
- lumière: jour continu, intensité de 800 lux environ, tubes blanc industrie
- hydraulique: renouvellement de 300%/heure en eau, brassage minimal en air, homogénéisé approximativement
- densité: inférieure ou égale à 4000 oeufs/litre

Cette décision implique que le challenge s'effectue alors sur un produit ponte x incubation. En effet ces conditions d'incubation sont reproductibles mais il faut admettre l'existence d'une importante marge d'erreur lors du contrôle des facteurs due notamment à des problèmes de structure d'incubation.

Le principe du challenge est de tester la qualité des larves, celle-ci devient alors le produit d'une ponte et d'une incubation au cours de laquelle les effets de l'environnement sont grandissants. Ainsi la standardisation arbitraire décidée représente l'unique solution dans l'attente des CER incubation qui devraient rapprocher les facteurs d'élevage de leur optimum.

F/ MISE AU POINT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES POUR LE CHALLENGE: LA PHASE LARVAIRE

*Introduction: nous avons vu comment, sur des bases bibliographiques et expérimentales, a été effectué le choix des épreuves. L'objectif des manipulations décrites ci-après est la mise au point de la structure expérimentale et du protocole du challenge.

On abordera successivement les points suivants:

- le suivi de mortalité de larves pose des problèmes de récupération qui sont différents de ceux rencontrés sur les oeufs, une méthodologie nouvelle doit alors être mise en place.

- dans le but d'optimiser le protocole, les hypothèses sur l'existence d'un stress causé par la lumière doivent être vérifiées

- la possibilité de distinguer des pontes par le challenge a été testée.

I Aspects méthodologiques

I.1 Les contraintes de la phase larvaire

La mortalité constitue le principal paramètre auquel on s'intéresse pour le suivi du challenge (le poids sera également utilisé). Les enseignements de la phase incubation ont été complétés par les observations faites en élevage larvaire classique. Les larves ont tendance à couler après leur mort, le temps de lyse étant relativement court (de 12 à 20 h suivant le brassage et la température), il faut donc éviter le stationnement des larves sur le cône car le dépôt de matière organique pose d'importants problèmes d'évacuation. On a donc tout intérêt à augmenter la fréquence de prélèvement pour les prises de mortalité.

Il faut cependant tenir compte d'un facteur majeur: le comportement des larves. En effet la séparation des morts en fonction de la flottabilité n'est pas aussi nette que pour les oeufs. Pendant la période qui suit le transfert de la structure d'incubation vers la structure d'élevage larvaire ou de challenge, les larves ont tendance à occuper tout le volume du bac. Ainsi les purges effectuées pendant cette période peuvent être à l'origine de la récolte de larves vivantes ce qui fausse l'expérimentation.

Les objectifs de l'étude de la méthodologie sont:

- l'optimisation de la méthode de prise de mortalité qui minimisera le taux de manquant et évitera le prélèvement de larves vivantes

- l'optimisation de la structure expérimentale qui doit être conçue pour permettre un suivi précis de la mortalité et l'application des facteurs de stress lumineux. De plus cette structure tout en restant proche des conditions d'élevage larvaire doit permettre de réduire le nombre et de mieux contrôler les facteurs autres que la lumière.

I.2 Les essais effectués et la mise au point de l'outil

* **Méthode de prise de mortalité et répartition:** pour éviter la lyse des larves mortes plus rapide que celle des oeufs, il semblait nécessaire d'augmenter la fréquence de prise de mortalité. D'autre part pour éviter de prélever trop de vivantes pendant les 72 premières heures du challenge, plusieurs essais ont visé à permettre l'établissement d'un calendrier des prises de mortalité.

La méthode de prise de mortalité dans les incubateurs classiques (volume de 1000 ml), modifiée à partir de celle mise au point en phase incubation a fourni de très bons résultats:

- volume: 30 ml, pour des volumes plus importants le risque de prélever des larves vivantes augmente

- fréquence: 4 fois/jour

- calendrier: jusqu'à 100 heures, purge 1 fois/jour; après 100 heures, purge 4 fois/jour

Pour gagner en précision, il a été décidé de compter les larves précisément au départ du challenge, différents nombres de larves ont été testés sachant que la densité ne pose pas de problèmes.

Les 3 premières manipulations de mise au point du challenge ont été effectuées avec cette structure. Les taux de manquants obtenus étaient très satisfaisants proches de 0% avec la méthode décrite ci-dessus.

* **La structure expérimentale:** la mise au point du challenge a nécessité la construction d'une série de 36 incubateurs expérimentaux isolés par groupe de 12. Cette structure permettant de comparer 3 ou 4 pontes, sous 3 conditions de lumière en conservant au minimum des triplicats (3x3x4 ou 4x3x3) présente l'avantage de fournir des résultats sérieux et puissants du point de vue statistique.

Cette structure a été mise en place après 2 essais de challenge effectués dans la structure utilisée pour l'incubation expérimentale. Les nouveaux incubateurs ont été conçus avec une colonne d'eau supérieure (volume de 3700 ml, diamètre de 100 mm, hauteur 600 mm) qui permet d'éviter de récupérer des larves vivantes en début de challenge. Les caractéristiques de ces nouveaux incubateurs en pièces de PVC collées, sont issues de la synthèse des principaux avantages des différents types d'incubateurs testés tout en tenant compte des impératifs économiques.

Mais l'installation de la nouvelle structure a été trop tardive et les impératifs du calendrier n'ont pas laissé de temps à des expérimentations de méthodologie. Il faut souligner la dépendance entre méthodologie mise au point et la structure utilisée. L'effet de l'hydrodynamisme d'une structure donnée a un impact sur les prises de mortalité. Le transfert d'une méthode (fréquence, volume et calendrier) mise au point sur une structure vers une autre structure nous posa quelques problèmes.

Ainsi le premier challenge effectué dans la structure de 36 incubateurs de volume 3700 ml a fourni des résultats inexploitable en raison de taux de manquants supérieur à 50% en moyenne.

La fréquence de prise de mortalité a donc été augmentée jusqu'à 6 fois/jour pour la manipulation suivante; des taux de manquants inférieurs à 20% en moyenne ont permis l'exploitation des résultats.

La structure finale est donc constituée de 36 incubateurs expérimentaux alimentés par une pompe péristaltique. L'application de la lumière est effectuée avec des rampes de tube néon (blanc industrie), l'isolation lumineuse grâce à des bâches opaques. Les conditions expérimentales sont décrits ci-dessous:

- renouvellement en eau: 10 %/heure
- pas de débit d'air, pour éviter la variabilité de ce facteur
- température comprise entre 14,5 et 16°C
- intensité lumineuse de 1300 lux
- réglage de l'allumage extinction par une horloge électromécanique
- prise de mortalité 6 fois/jour, début des purges 12 h après le départ du challenge, volume de purge augmenté progressivement de 100 ml à 350 ml pendant les 3 premiers jours
- le nombre de larves répartis dans chaque incubateur a été fixé à 200. Des chiffres supérieurs (500 et 600) ont entraîné un comptage fastidieux à la répartition et à la récolte des morts constituant alors une source d'erreur potentielle.

II. Recherche des effets de la lumière

II.1 Objectifs:

Nous avons vu plus haut l'existence d'effets de la lumière sur la durée de survie des larves de turbot (Gaignon & Petton, com. pers.). Nous avons décidé de vérifier ces observations dans les structures utilisées pour le challenge. L'objectif étant de tester les différents traitements lumineux qui ont été appliqués sur une seule ponte afin de sélectionner les traitements les plus intéressants pour permettre de continuer la mise au point du challenge. Ainsi ces manipulations correspondent à la vérification d'un effet de l'allumage-extinction et de son pouvoir de discrimination par rapport à une situation de noir complet.

II.2 Matériels et méthode

Ces manipulations ont été menées dans la série de 15 incubateurs de volume 1000 ml. L'isolation lumineuse en 5 groupes de 3 nous a permis de comparer 5 traitements lumineux avec 3 réplicats.

Les 5 traitements lumineux choisis sont décrits dans le tableau 7 pour des tubes blanc industrie et une intensité fixée à 150 lux.

Groupe	Traitement	Nombre réplicats effectif
1 (JC)	Jour continu	3
2 (12F)	12 Flashs (12 flashs de 1 h, 12 périodes d'obscurité de 1 h)	3
3 (3F)	3 Flashs (3 flashs de 4 h, 3 périodes d'obscurité de 4 h)	3
4 (1F)	1 Flash (1 flash de 12h, 1 période d'obscurité de 12h)	3
5 (NC)	Noir complet; isolation lumineuse totale	3

Tableau 7: Caractéristiques des traitements utilisés

Les facteurs contrôlés sont fixés comme suit:

- renouvellement d'eau: 100 %/heure
- température moyenne: 17,3°C ($\sigma = 0.32$)
- prélèvements 3 fois/jour
- nombre de larves réparties au départ: 500

Les cinétiques de mortalité ont été comparées entre les traitements et les significativités des différences observées graphiquement ont été testées par l'AFD. Des prélèvements de 25 larves ont été effectués après 120 heures dans chaque incubateur. Des mesures de poids humide et de poids après dessiccation ont été effectuées à l'aide d'une balance de précision (au 1/1000 de mg).

II.3 Résultats et discussion

Une première manipulation a été réalisée et a permis de faire apparaître des différences. Cette manipulation a été reproduite de manière à confirmer les résultats obtenus, les taux de manquants sont très faibles (voisins de 0%). Ce sont les résultats de cette seconde manipulation qui sont présentés ci-dessous.

La réponse des larves aux conditions de lumière a été différente selon les traitements:

- en termes de durée de survie (les taux de mortalité de 100% ne sont pas atteints au même moment pour chaque traitement)
- en termes de cinétique de mortalité; c'est à dire de répartition de la mortalité au cours du temps (certains pics de mortalité ne sont pas observables pour tous les traitements)

Pour représenter la cinétique de mortalité nous avons choisi de calculer le pourcentage de mortalité par rapport aux effectifs restants. Cette représentation permet de mieux visualiser l'apparition des pics de mortalité. La figure 4 représentant la moyenne des triplicats pour chaque traitement laisse apparaître des différences:

- la répartition de la mortalité: les 3 conditions de flash engendrent des pics de mortalité dès le départ du challenge

- la durée de survie: le traitement JC atteint 100% de mortalité environ 12 h avant le traitement NC

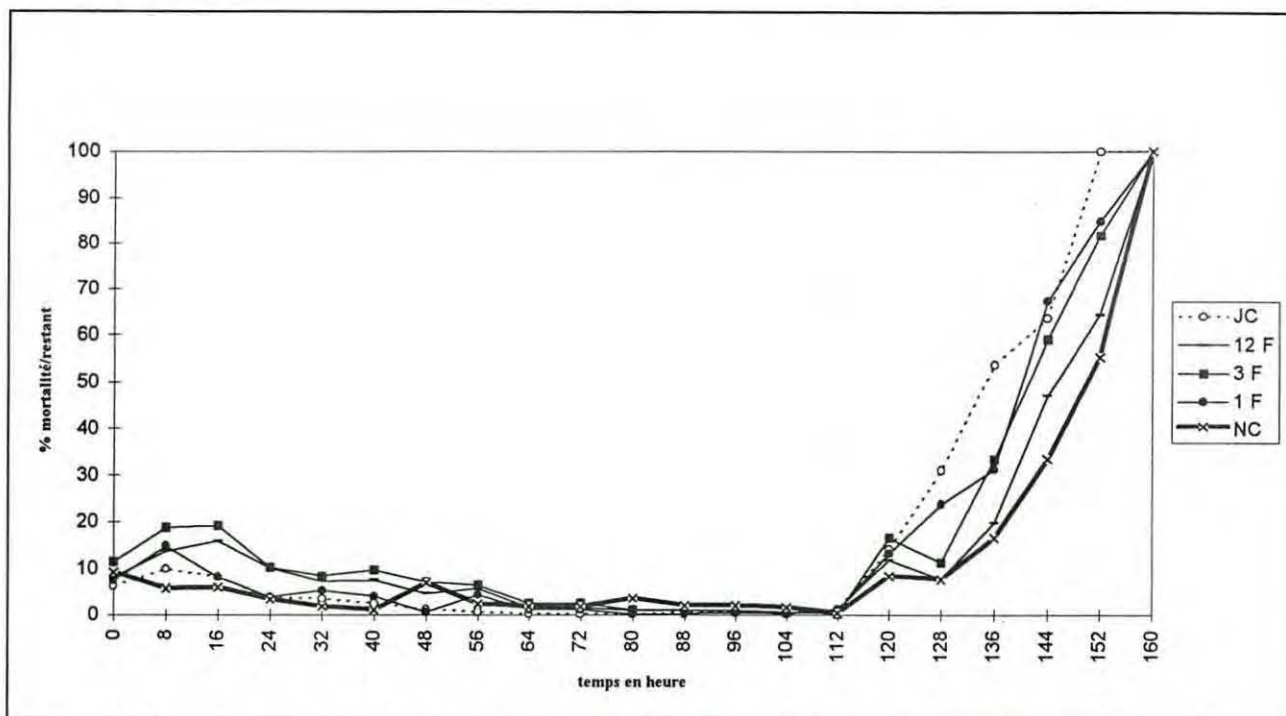


Figure 4: Evolution de la mortalité par rapport aux effectifs restants, courbes représentant la moyenne de 3 réplicats, comparaison entre les 5 conditions de lumière

Ces différences sont confirmées par une AFD. Toutes les variables sont préalablement transformées par la fonction $\text{ArcSin}\sqrt{\cdot}$. Ce traitement des proportions permet d'obtenir une variance plus homogène. Le test de Bartlett sur l'homogénéité des variances des moyennes des groupes au sein des variables est positif. Les résultats sont résumés dans le tableau 8:

N° Variable	Intitulé	Test Bartlett	F (4/10) (5%)	Proba (%)
1	0 h	ok	1.81	20.22
2	8 h	ok	9.95	0.18
3	16 h	ok	9.09	0.25
4	24 h	ok	4.65	2.24
5	32 h	ok	6.35	0.85
6	40 h	ok	24.90	0.01
7	48 h	ok	57.02	0.00
8	56 h	ok	17.03	0.02
9	64 h	ok	5.22	1.59
10	72 h	ok	4.91	1.91
11	80 h	ok	6.99	0.62
12	88 h	ok	7.85	0.42
13	96 h	ok	2.56	10.35
14	104 h	ok	1.08	41.80
15	112 h	ok	2.75	8.81
16	120 h	ok	5.51	1.34
17	128 h	ok	15.58	0.03

18	136 h	ok	14.02	0.05
19	144 h	ok	4.48	2.49
20	152 h	ok	2.32	12.76
21	160 h	-	0.00	100.0

Tableau 8: Caractéristiques de l'AFD

On a donc 15 variables sur 20 qui sont discriminantes. Si on effectue une AFD pas à pas les 3 variables les plus discriminantes (proba de 0.00, 0.01 et 0.02) suffisent à reclasser les répliquats dans leur groupe théorique.

Si on effectue une AFD sur l'ensemble des prises de mortalité (en prenant une variable toutes les 16 h), les axes discriminants retenus ont les caractéristiques résumées dans le tableau 9.

Axe	Inertie (%)	Pseudo-F
1	86.9	491.08
2	8.1	46.03

Tableau 9: Caractéristiques des axes discriminants de l'AFD

L'homogénéité des répliquats est illustrée par la représentation de la figure 5, il existe donc des différences significatives provoquées par les traitements lumineux.

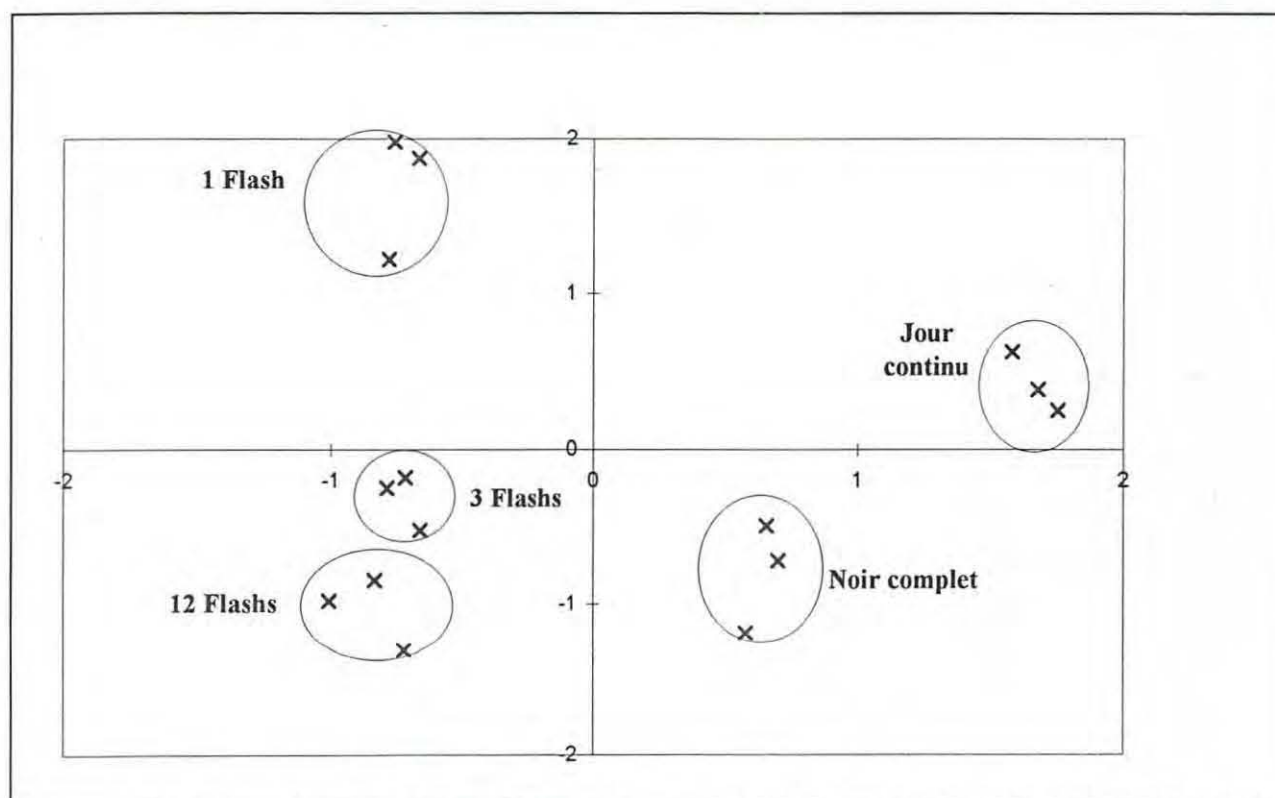


Figure 5: Représentation des répliquats des 5 traitements dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

L'effet de la lumière sur la durée de survie est clairement démontré lorsqu'on compare l'évolution du pourcentage de mortalité par rapport aux effectifs restant entre les traitements de jour continu et du noir complet. L'installation de la mortalité massive (à 120 heures environ à cette température) est retardée de 16 heures dans le noir complet. La figure 6 fait aussi apparaître l'homogénéité des répliquats.

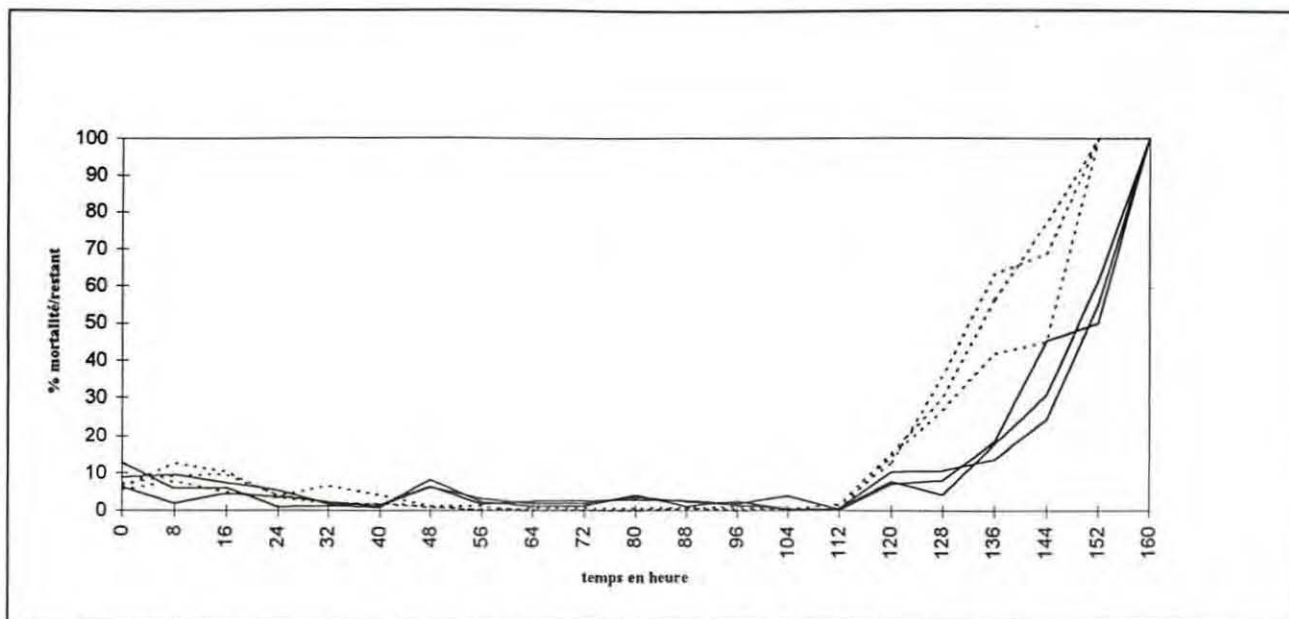


Figure 6: Evolution de la mortalité par rapport aux effectifs restants, comparaison entre les conditions "Jour continu" et "12 Flashes" (JC en traits continus et 12 F en pointillés)

Il faut noter que la différence de réaction entre les deux traitements s'exprime sur la fin de la période de survie des larves, ce qui peut laisser supposer que la lumière entraîne une consommation énergétique supérieure, réduisant ainsi la durée de survie. Ce résultat va dans le sens des travaux préliminaires de Gagnon & Petton ainsi que dans celui des travaux de Skiftesvik et al. (1990) qui ont montré qu'il existait une relation entre la lumière et l'activité ou le comportement des larves.

D'autre part il est intéressant de comparer l'effet du traitement Jour Continu au traitement 12 Flashes. Si l'on examine les courbes de la figure 7, on constate l'existence d'un pic de mortalité plus important dès les premières heures pour le traitement 12 flashes. En contrepartie la mortalité finale s'installe légèrement plus tard.

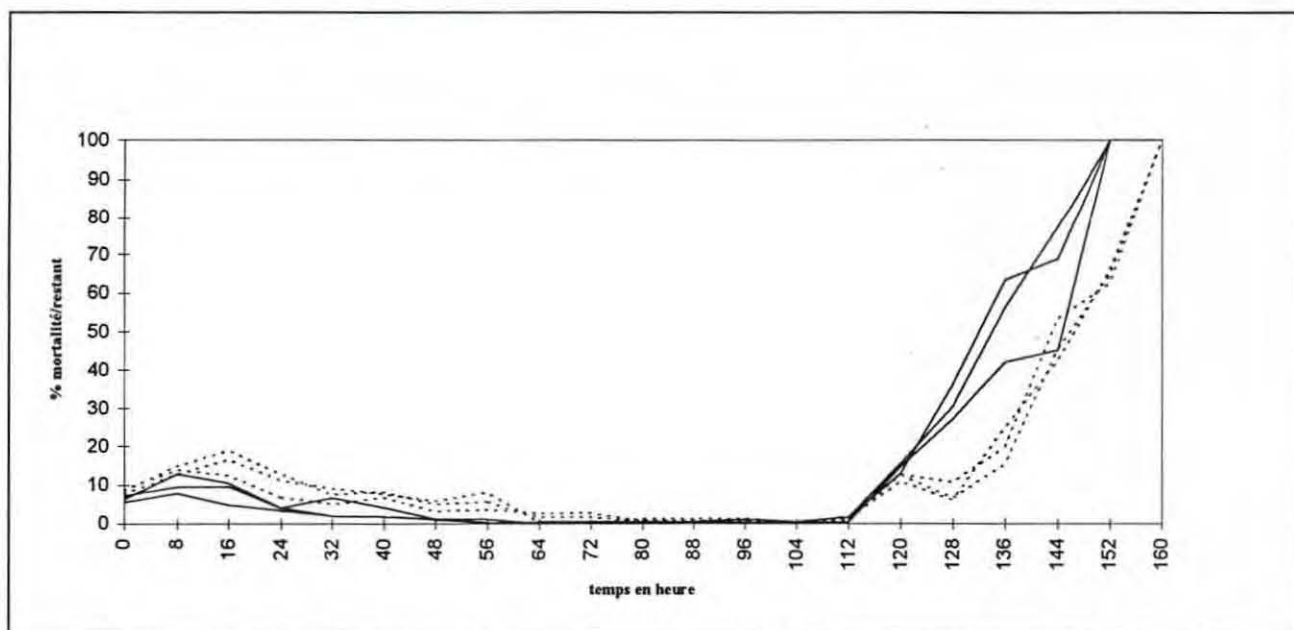


Figure 7: Evolution de la mortalité par rapport aux effectifs restants, comparaison entre les conditions "Jour continu" et "12 Flashes" (JC en traits continus et 12 F en pointillés)

On peut donc envisager l'existence d'un facteur de stress initial supérieur pour le "12 flashes", cela expliquerait l'apparition de cette mortalité précoce. D'autre part les larves bien que soumises à

des allumages-extinctions répétitifs reçoivent moins de lumière, ce qui peut expliquer ce léger retard lors de la mortalité finale et nous conduit à émettre l'hypothèse suivante: la consommation des réserves chez les larves de turbot serait davantage fonction de la quantité de lumière à laquelle elles sont soumises que dépendante des stress répétitifs.

Les mesures de poids humide exprimées en moyennes obtenues à 120 heures du départ sont reproduites ci-dessous (tableau 10). Chaque moyenne est obtenue avec 3 échantillons de 25 larves correspondant à des échantillonnages dans chaque incubateur.

Durée de l'éclairage (h)	Traitement	poids humide moyen / larve à 120 h (mg)	Variance
24	JC	0.1785	0.005336
12	12 F	0.1833	0.004419
12	3 F	0.1910	0.001210
12	1 F	0.1940	0.009036
0	NC	0.2001	0.006063

Tableau 10: Poids des larves échantillonnées dans chaque traitement

Le test d'homogénéité de la variance de Bartlett étant positif, le test de Newman-Keuls, le plus approprié pour ce type de mesure, a fourni les résultats suivants présentés sous forme du tableau 11.

	JC	12 F	3 F	1 F	NC
JC		N.S.	N.S.	S	S
12 F	0.334		N.S.	N.S.	S
3 F	0.059	0.13		N.S.	N.S.
1 F	0.034	0.10	0.527		N.S.
NC	0.072	0.022	0.180	0.231	

Tableau 11: Résultats du test de Newman-Keuls

Les chiffres indiqués correspondent à la probabilité de l'existence d'une différence non significative, (N.S pour différence non significative et S pour différence significative au seuil 5%). Il existe donc des différences significatives au seuil 5% entre:

- le noir complet et le jour continu: poids humide NC > poids humide JC
- le noir complet et le 12 flashes: poids humide NC > poids humide 12 F
- le jour continu et le 1 flash: poids humide 1 F > poids humide JC

Ces résultats ne font pas apparaître de relation claire entre le poids humide et la quantité de lumière perçue par les larves. Par contre, les deux conditions De jour continu et de 12 flashes fournissent les poids humides les plus faibles, mais il est impossible de séparer l'effet de la quantité de lumière de l'effet de l'allumage extinction. Les pesées d'échantillons de larves passées au four à 100°C pendant 24 h n'ont pas fourni de résultats exploitables.

Les résultats de cette manipulation visant à mettre en évidence les effets de la lumière sur les larves non alimentées permettent d'établir 3 conclusions principales:

- **il y a un effet de la lumière sur la survie des larves en conditions de non alimentation et les réponses sont fiables**
- **les allumages-extinctions semblent provoquer un stress supplémentaire induisant une mortalité dès les premières heures après l'éclosion et l'effet du nombre d'allumages-extinctions n'est pas clairement établi. L'analyse des causes de cette mortalité est complexe et nécessite de s'assurer de la reproductibilité des réponses**

- le noir complet se présente comme la condition de référence idéale alors que les conditions dures du JC et du 12 F peuvent être proposées comme les conditions sélectives et discriminantes pour la comparaison des pontes

Ces observations sont originales et complètent toutes les observations effectuées sur l'effet de la lumière sur les phases larvaires trophiques chez les poissons marins soulignant encore l'importance de la lumière sur la phase larvaire du turbot.

III Test de discrimination de ponte

III.1 Objectifs

La mise au point du test a pour objectif principal de comparer la survie larvaire en conditions de challenge entre différentes origines de larves. De plus ce test permettra de s'assurer de la reproductibilité de la réponse des 3 conditions retenues (dont les 2 extrêmes).

Le choix effectué sur le conditionnement au cours de l'incubation permet de comparer les produits d'une ponte et de l'incubation. En l'état de nos connaissances sur la phase incubation, l'unique conclusion retenue en cas d'apparition de différence entre les pontes est l'existence de différences de qualité entre les larves mais nous utiliserons le vocable "ponte" en lieu et place de produit "ponte x incubation". D'ailleurs c'est bien dans ce sens que nous avons choisi de définir la qualité des oeufs; c'est à dire leur aptitude à fournir une bonne larve capable de bien démarrer en conditions d'élevage (Kjørsvik et al., 1991).

III.2 Matériel et méthodes

Trois pontes différentes issues de géniteurs différents (pontes de femelles différentes obtenues le même jour et fécondées avec le sperme prélevé dans un pool de mâles) ont été incubées dans les conditions d'incubation choisies et décrites plus haut. Les caractéristiques des pontes sont décrites dans le tableau 12.

Ponte	Taux de viabilité (%)
P1	81.9
P2	90.7
P3	90

Tableau 12: Caractéristiques des pontes utilisées

Des lots de 25 larves issues des différentes pontes ont été prélevées 24 heures après l'éclosion dans les incubateurs de production au moment du transfert vers la structure du challenge. Les larves ont été conservées dans le formol pendant 3 semaines. On a mesuré le poids humide et le poids sec après dessiccation au four à 100° C pendant 24 heures.

Les pontes ont été transférées vers la structure du challenge 24 heures après l'éclosion, le choc thermique de 13,5 à 16°C a été évité en augmentant la température à 15°C pendant les dernières 24 h de l'incubation.

La structure de 36 incubateurs de 3700 ml a été utilisée pour cette manipulation:

- 3 conditions de lumière ont été réalisées: 12F, JC et NC
- 3 pontes ont été comparées, 4 réplicats par ponte et par traitement lumineux (3x4x3 = 36), la répartition des larves issues des différentes pontes dans les incubateurs au sein de chaque traitement a été effectuée par tirage aléatoire.

Traitement	Ponte	Nombre de réplicats effectifs
Jour continu	P1	4
	P2	4
	P3	3
12 Flashs	P1	4
	P2	4
	P3	3
Noir complet	P1	4
	P2	4
	P3	4

Tableau 13: Caractéristiques du protocole expérimental

Les autres facteurs contrôlés sont:

- renouvellement en eau de 10%, alimentation par une pompe péristaltique
- température moyenne: 16,0°C ($\sigma = 0,20$)
- prise de mortalité: 6 fois/jour
- 200 larves réparties par incubateur

En parallèle un challenge a été effectué sur des larves issues des même pontes dans une série de 12 incubateurs classiques (volume 1000 ml) et soumis au même traitement lumineux: 12 flashs. On a donc 4 réplicats par ponte au départ de l'expérimentation.

Traitement	Ponte	Nombre de réplicats effectifs
12 Flashs	P1	4
	P2	4
	P3	3

Tableau 14: Caractéristiques du protocole expérimental

Les autres facteurs contrôlés sont:

- renouvellement en eau de 30%, alimentation gravitaire
- température moyenne: 15,3°C ($\sigma = 0,11$)
- prise de mortalité: 6 fois/jour
- 200 larves réparties par incubateur

III.3 Résultats et discussion

Les taux de manquants moyens sont voisins de 20% (moyenne: 18,52%, $\sigma = 9,53$) mais la représentation des décomptes au lieu des pourcentage de mortalité par rapport aux restants permet de visualiser l'homogénéité des réplicats et celle-ci demeure convenable en conditions de jour continu et de noir complet. Les problèmes de récupération sont liés à la mortalité finale et ne sont pas gênants dans ce cas précis où les différences sont importantes et apparaissent dès le début du challenge; l'homogénéité des réplicats indique que le taux de manquants a peu d'effet sur la forme de la réponse.

La comparaison des pontes sous un seul traitement (12 flashs) mais dans la structure de 12 incubateurs de 1000 ml (taux de manquants proche de 0%) fournira des renseignements complémentaires sur les possibilités de discrimination des pontes

***Jour continu (nouvelle structure):** la figure 8 permet d'affirmer l'existence d'une différence de capacité des larves des différentes pontes à supporter le challenge en conditions JC.

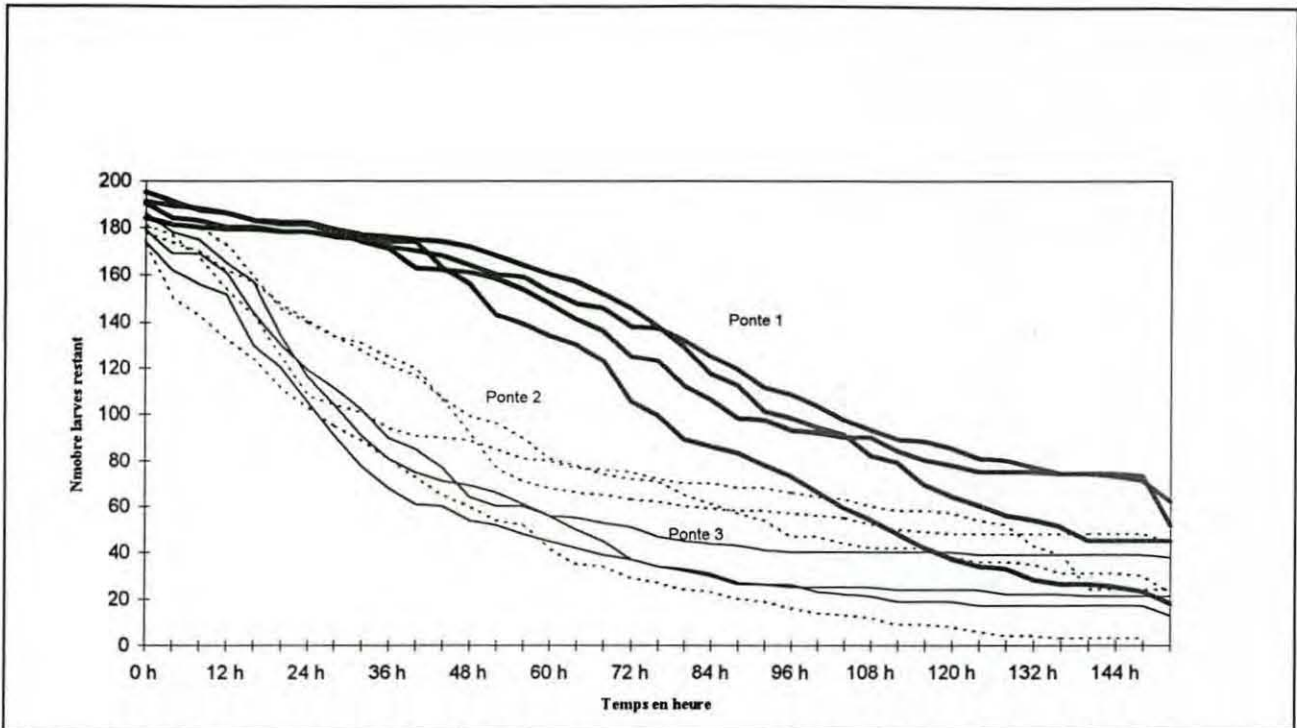


Figure 8: Evolution du nombre de larves par incubateur, comparaison entre les 3 pontes pour la condition "Jour continu" (P1 en traits continus épais, P2 en pointillés et P3 en traits continus fins)

Il faut noter l'inflexion des courbes de survie aux environs de 80 heures. On peut donc envisager que la ponte P1 a des capacités supérieures à supporter le stress des conditions globales du challenge à celles des pontes P2 et P3, par contre après environ 80 heures, elle rejoint les niveaux de survie des deux autres pontes.

L'AFD effectuée sur les données transformées par la racine carrée pour se rapprocher d'une répartition normale, confirme l'existence de différences de réponse entre les pontes. Le test de Bartlett sur l'homogénéité des variances est positif, 7 variables (une toute les 20 h) suffisent à discriminer les pontes (tableau 15).

Variable	Test Bartlett	F(2/8) 5%	Proba (%)
0 h	ok	5.78	2.80
16 h	ok	10.35	0.63
36 h	ok	33.37	0.02
56 h	ok	49.88	0.01
76 h	ok	18.96	0.11
96 h	ok	10.24	0.65
116 h	ok	3.74	7.07

Tableau 15: Caractéristiques de l'AFD

Les caractéristiques des axes discriminants retenus par l'AFD sont décrits dans le tableau 16.

Axe	Inertie	Pseudo-F
1	99.3	466.21
2	3.07	2.85

Tableau 16: Caractéristiques des axes issus de l'AFD

La représentation de la figure 9, des répliqués dans le plan des axes discriminants de l'AFD permet de visualiser l'homogénéité des répliqués. Il convient de souligner que l'homogénéité des

réplicats peut s'accompagner de la proximité des moyennes, ainsi P2 et P3 sont proches avec un léger avantage pour P2 alors que P1 est nettement détachée des autres courbes.

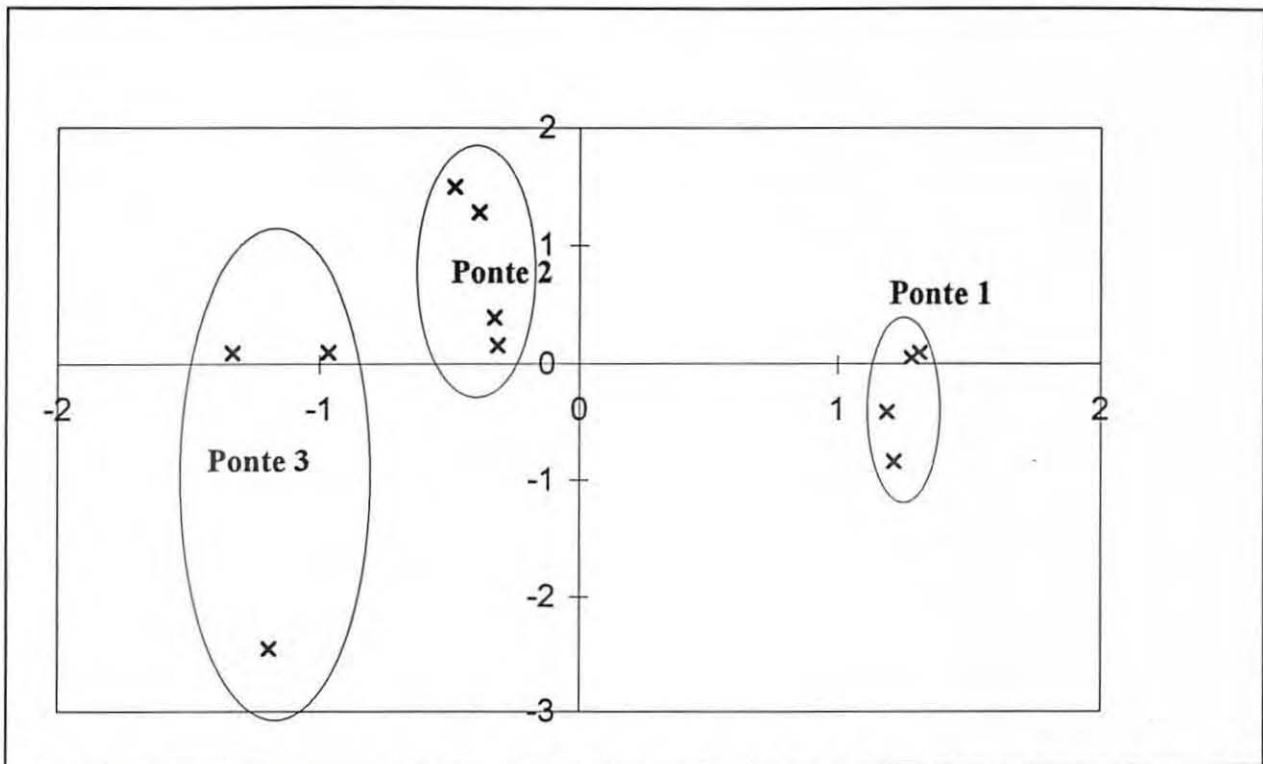


Figure 9: Représentation des réplicats des 3 pontes en conditions "Jour continu" dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

* **Noir complet (nouvelle structure)**: la figure 10 confirme la meilleure survie de P1; par contre, il existe une différence dans l'allure de la courbe représentant le décompte avec la condition JC. En effet on n'observe pas le point d'inflexion à 80 heures. On peut supposer que, dans les conditions d'obscurité, la consommation des réserves est moins importante, ce qui laisse P1 en tête tout au long du challenge.

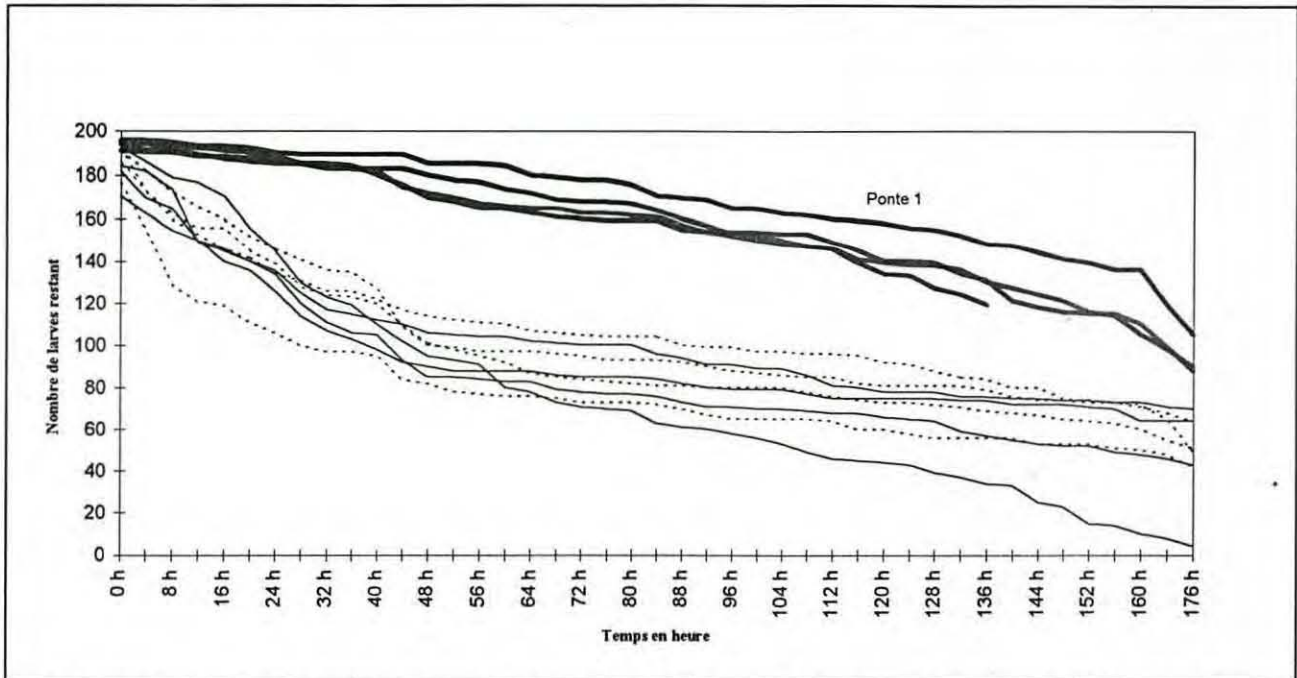


Figure 10: Evolution du nombre de larves par incubateur, comparaison entre 3 pontes pour la condition "Noir complet" (P1 en traits continus épais, P2 en pointillés et P3 en traits continus fins)

L'AFD effectuée sur les données transformées sur 8 variables (toutes les 20 heures) fournit les résultats suivants, résumés dans les 2 tableaux ci-dessous (tableaux 17 et 18). La représentation des réplicats dans le plan des axes discriminants permet de visualiser l'existence de différence significatives entre les pontes (figure 11).

Variable	Test Bartlett	F(2/9) 5%	Proba (%)
0 h	ok	3.29	8.37
16 h	ok	11.48	0.35
36 h	ok	45.99	0.00
56 h	ok	58.59	0.00
76 h	ok	50.03	0.00
96 h	ok	39.81	0.01
116 h	ok	29.21	0.02
132 h	ok	22.11	0.04

Tableau 17: Caractéristiques de l'AFD

Axes	Inertie	Pseudo-F
1	79.9	108.93
2	320.1	27.48

Tableau 18: Caractéristiques des axes discriminants de l'AFD

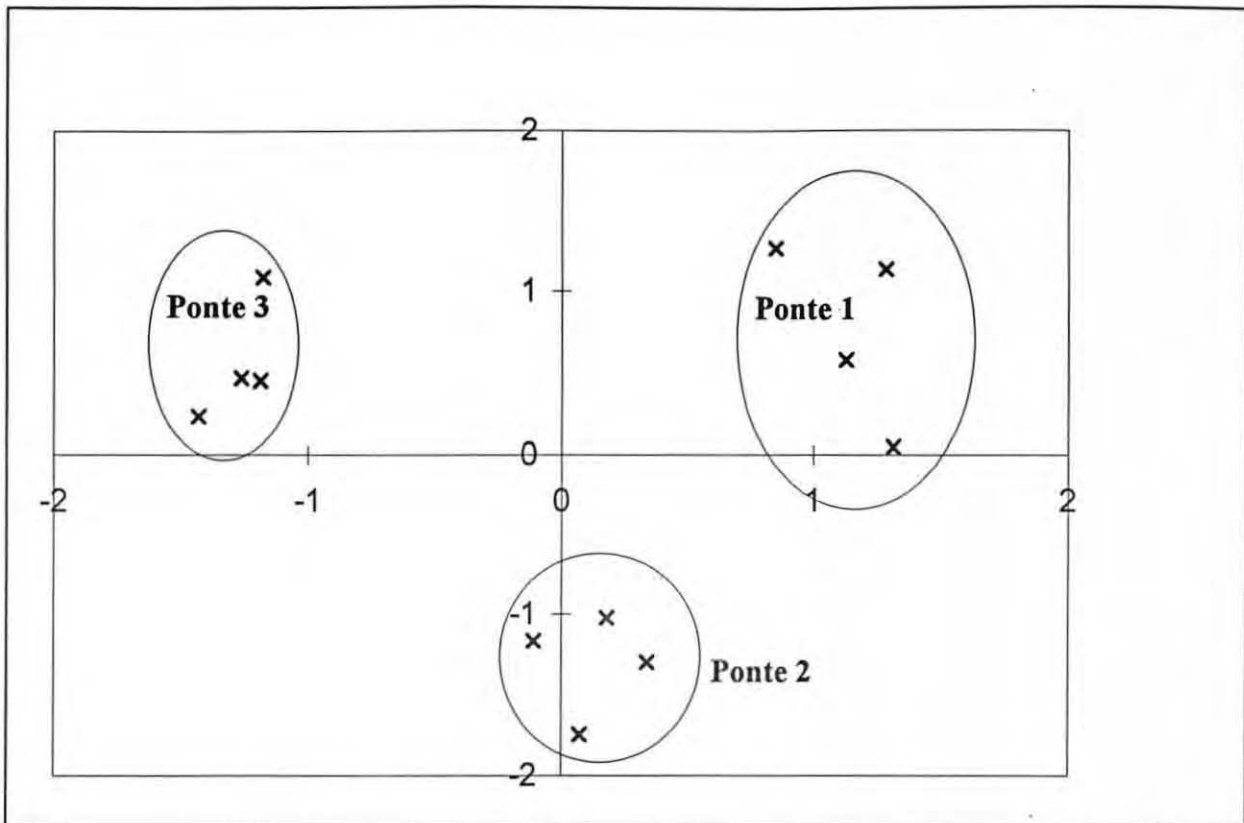


Figure 11: Représentation des réplicats des 3 pontes en conditions "Noir complet" dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

Les traitements "jour continu" et "noir complet" font donc apparaître des différences entre les pontes pour plusieurs caractéristiques. Le jour continu impose une consommation des réserves plus rapide: le fait que P1 connaisse un point d'inflexion à 90 heures laisse supposer que les larves issues de P1 ont une meilleure aptitude à supporter les conditions imposées. La réponse en phase finale laisse à penser qu'elles sont, soit dotées de réserves énergétiques plus limitées, soit initialement, plus grandes consommatrices de leur réserves.

Les résultats du noir complet semblent confirmer ces hypothèses; en effet, si on n'accélère pas le processus de consommation des réserves, P1 garde l'avantage toute la durée du challenge. Le traitement 12 flashes a fourni des réplicats moins homogènes mais la meilleure survie de P1 a été observée également.

***12 Flashes (structure classique):** l'essai effectué dans la structure d'incubateurs de volume 1000 ml a permis des observations intéressantes. On constate que P1 présente une durée de survie moindre puisque la mortalité finale s'installe 16 h avant celle de P2 et P3; par contre; on ne constate pas de différence dans la mortalité jusqu'à 100 heures.

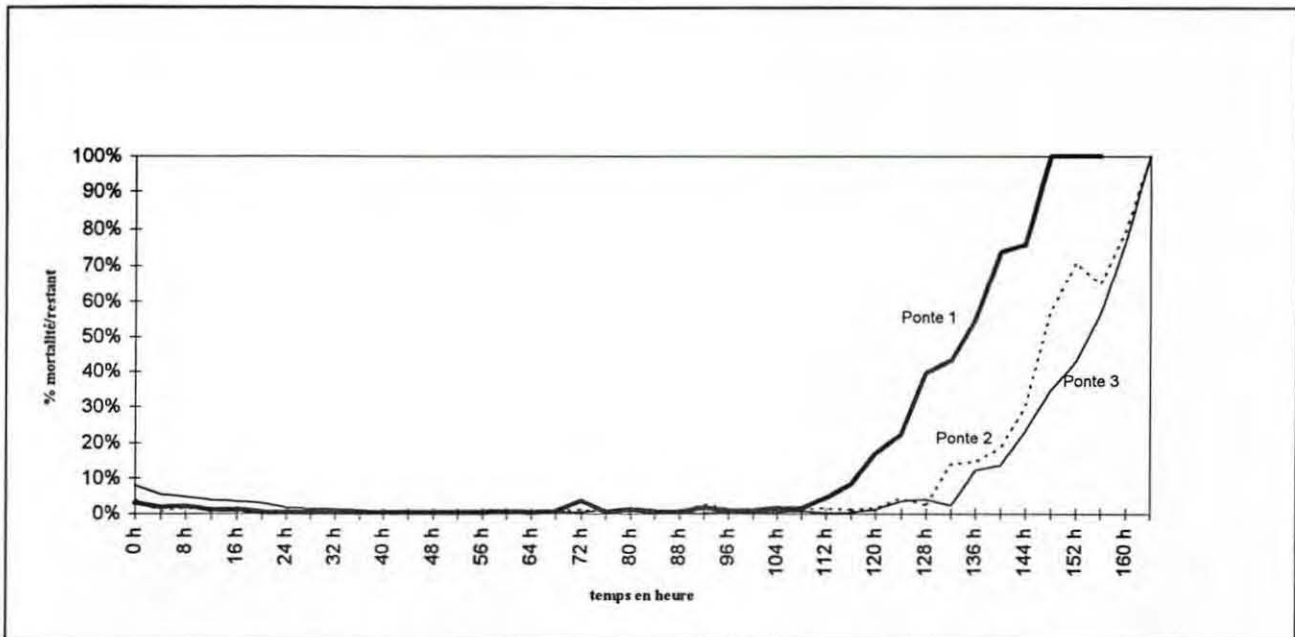


Figure 12: Evolution de la mortalité par rapport aux effectifs restants, courbes représentant la moyenne de 4 réplicats, comparaison entre les 3 pontes pour la condition "12 flashes" (incubateurs classiques) (P1 en traits continus épais, P2 en pointillés et P3 en traits continus fins)

Les prises de mortalité jusqu'à 112 h ne permettent pas de discriminer les pontes. L'AFD a été effectuée sur les variables à partir de 120 heures, on note que la ponte P1 est bien discriminée alors que P3 est plus mal discriminée de P2. Le reclassement des réplicats dans leur groupe théorique n'est que de 90%, en effet un des réplicats de P3 est plus proche de la moyenne des réplicats de P2 que de la moyenne de son propre groupe. Les tableaux 19 et 20 résument les résultats de l'AFD, la représentation dans le plan des axes discriminants illustre les propos qui précèdent (figure 13).

Variable	Test Bartlett	F(2/8) 5%	Proba (%)
120 h	ok	10.19	0.66
128 h	ok	15.74	0.19
136 h	ok	20.30	0.09
144 h	ok	12.47	0.37
152 h	ok	11.41	0.48

Tableau 19: Caractéristiques de l'AFD

Axes	Inertie (%)	Pseudo-F
1	88.3	31.09
2	11.7	4.13

Tableau 20: Caractéristiques des axes discriminants de l'AFD

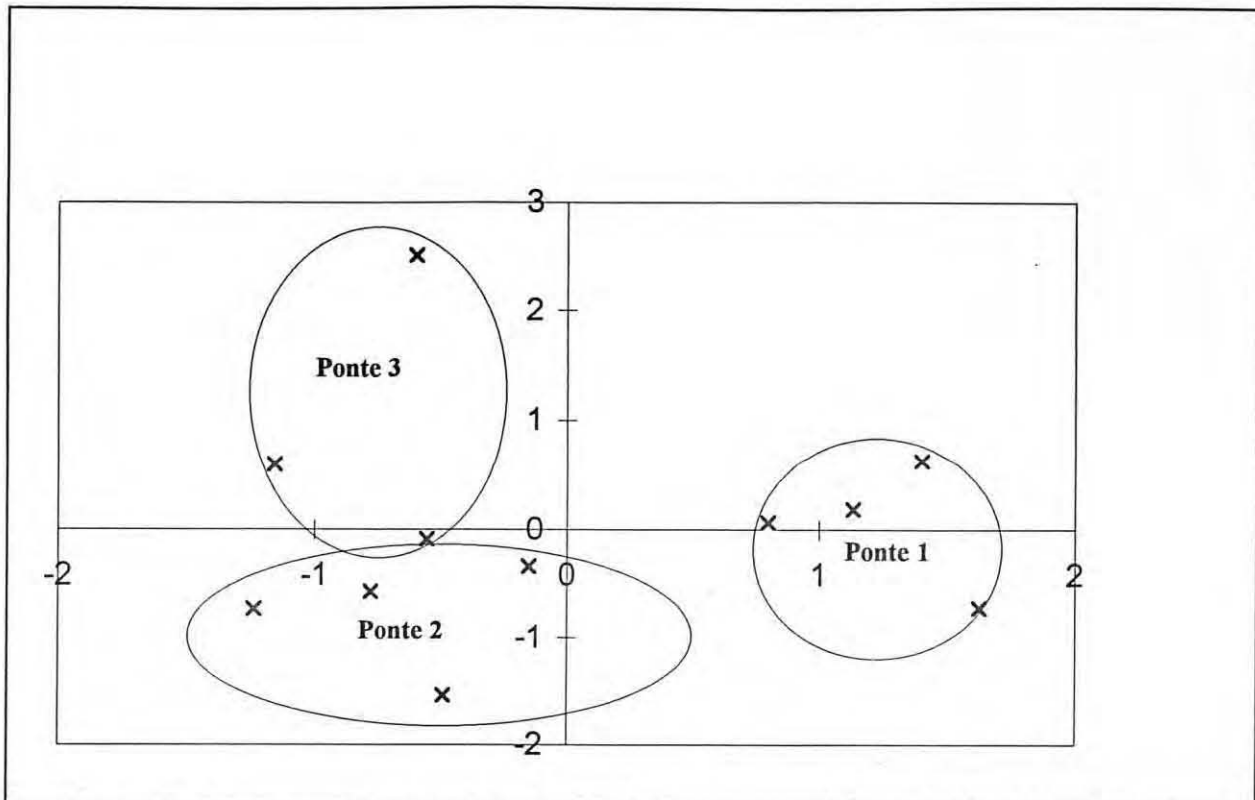


Figure 13: Représentation des réplicats des 3 pontes en conditions "12 Flashes" (incubateurs classiques) dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

En conclusion l'essai effectué dans la structure d'incubateurs classiques n'a pas permis de faire apparaître une différence entre les pontes dans leur aptitude à supporter les conditions du challenge jusqu'à 120 heures. La mortalité est quasiment nulle jusqu'à l'apparition brusque de la mortalité finale; celle-ci déclenchant d'abord pour P1. Cela semble confirmer l'hypothèse de la consommation plus rapide des réserves énergétiques de ces larves qui pourrait être due à la faiblesse relative de la quantité de réserves, à une vitesse relative de consommation des réserves supérieure ou encore à un phénomène insoupçonné. Les mesures de poids vont permettre d'éclaircir ce dernier point.

***Mesures de poids sur des larves issues des différentes pontes (24 heures après l'éclosion):**

- les poids humides obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous (tableau 21).

Ponte	Poids humide (en mg)
P1	0.198
P2	0.198
P3	0.156

Tableau 21: Poids humides des larves issues des différentes pontes

La variance est homogène (test de Bartlett), les résultats du test de Newman-Keuls sont résumés dans le tableau 22 (N.S pour différence non significative et S pour différence significative).

	P1	P2	P3
P1		N.S	S
P2	0.8092		S
P3	0.0011	0.0010	

Tableau 22: Résultats du test de Newman-Keuls

Ainsi les larves issues de P1 et P2 ont des poids humides identiques, par contre les larves de P3 ont un poids humide plus faible et significativement différent de P1 et P2 (inférieure de 20%).

- les résultats des mesures de poids secs sont reportés dans le tableau 23.

Ponte	Poids sec (en mg)
P1	0.0309
P2	0.0332
P3	0.0308

Tableau 23: Poids secs des larves issues des différentes pontes

La variance est homogène (test de Bartlett) et les résultats du test de Newman-Keuls font apparaître des différences significatives (tableau 24).

	P1	P2	P3
P1		S	N.S
P2	0.0108		S
P3	0.8807	0.0207	

Tableau 24: Résultats du test de Newman-Keuls

On a donc P1 et P3 identiques en termes de poids sec alors que les larves issues de P2 présente un poids sec nettement supérieur. Il faut remarquer que le classement est différent de celui présenté par les poids humides.

Pour tirer des conclusions de ces mesures et comparaisons de poids de larves issues de différentes pontes, nous avons décidé de nous intéresser à la teneur en matière sèche des larves, c'est à dire au rapport poids sec/poids humide. Le tableau 25 fait apparaître les différences de teneur entre les pontes.

Ponte	Teneur en MS (%)
P1	15.6
P2	16.7
P3	19.7

Tableau 25: Teneur en matière sèche des larves issues des différentes pontes

Si l'on considère que le taux de matière sèche est un indicateur de la quantité de réserves, on peut dire que ces pesées concordent avec les résultats du challenge effectué dans la structure de 12 incubateurs classiques. En effet, la durée de survie indique que P1 a succombé environ 16 heures en avance (figure 12) alors que P2 et P3 sont proches avec une mortalité légèrement en avance pour P2. Ces résultats demandent confirmation par la reproduction et éventuellement par un suivi précis du poids des larves tout au long du challenge.

Les larves issues de P3 présentent le plus faible poids humide et un poids sec identique à celui de P1, on peut envisager que sa mauvaise aptitude à supporter les conditions du challenge, en comparaison des capacités de P1, soit reliée avec la faiblesse relative de son taux d'humidité (c'est à dire le complément de sa teneur en matière sèche).

Les larves issues de P1 présentent un poids humide élevé et un poids sec faible et ont présenté une bonne aptitude à supporter les conditions du challenge. Cette constatation concorde avec les observations de Devauchelle & Cladas (1982) qui avaient été effectuées sur les oeufs. D'autre part la relative faiblesse du poids sec, dans l'hypothèse d'un lien avec la quantité de réserves disponibles, peut expliquer la durée de survie plus faible de ces larves. Par contre, il ne semble pas que l'aptitude à supporter les conditions du challenge soit reliée avec la quantité de réserves.

Ces résultats font apparaître que la qualité des larves ne dépend pas uniquement de la durée de survie et de la quantité de réserves disponibles. Ceci avait déjà été évoqué par Kjorsvik et al.(1990), Mc Evoy & Mc Evoy (1991): les grosses larves ont sûrement une plus grande marge de manoeuvre pour le passage à l'alimentation exogène mais on peut difficilement relier qualité et taille des larves.

*** Conclusions concernant la valeur relative des pontes:**

- **P1 a des capacités d'adaptation aux conditions du challenge dans la structure de 36 incubateurs, supérieures à celles des autres pontes. Par contre sa durée de survie semble plus faible, ce qui est confirmé par l'inflexion de la courbe à 90 heures représentant le décompte en conditions de jour continu, et par la plus grande précocité du pic final de mortalité observée dans la structure de 12 incubateurs.**

- **P2 semble supporter légèrement mieux que P3 les conditions du challenge car 3 réplicats sur 4 sont au dessus de P3 en termes de survie au jour continu dans la structure de 36 incubateurs**

- **P3 obtient les plus mauvais résultats dans la structure de 36 incubateurs mais présente une durée de survie légèrement supérieure dans la structure de 12 incubateurs.**

*** Comparaison de l'effet JC/NC sur la ponte P1:**

La représentation (figure 14) du décompte du nombre de larves par incubateur pour la ponte P1 soumise à deux conditions: NC (représentant le témoin) et JC (la condition dure qui a été sélectionnée au cours des manipulations précédentes) fait apparaître une différence nette qui est confirmée par l'AFD dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 26. Les résultats d'une démarche identique sur les pontes P2 et P3 sont identiques.

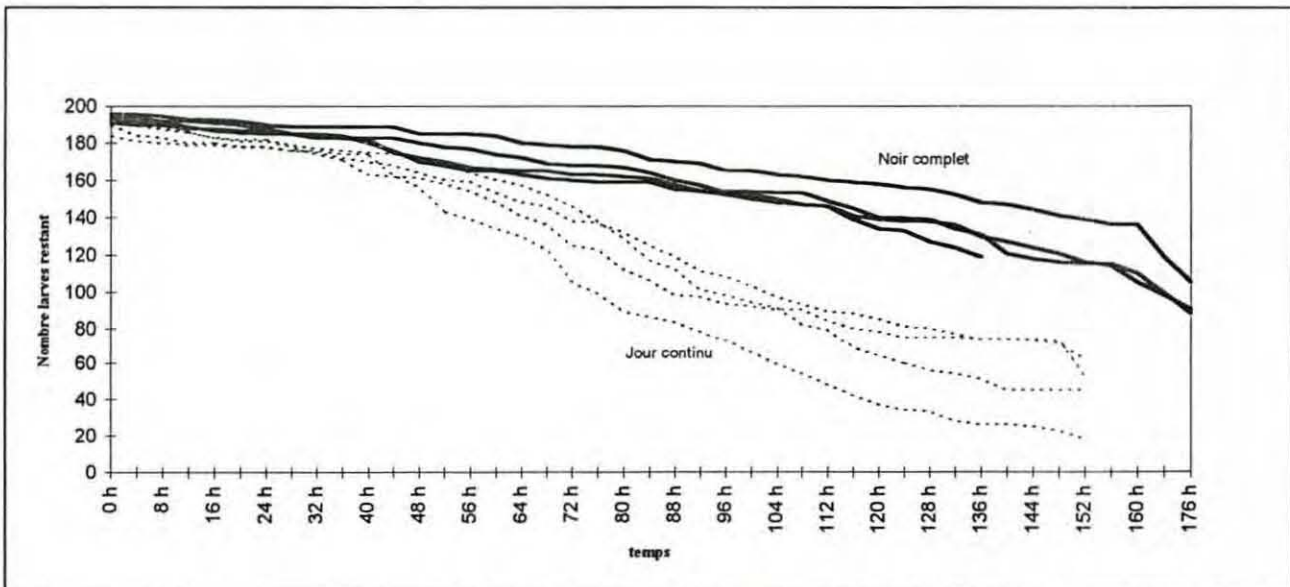


Figure 14: Evolution du nombre de larves par incubateur pour la Ponte 1, comparaison entre les traitements "Jour continu" et "Noir complet" (réplicats au NC en traits continus et réplicats au JC en pointillés)

Variables	Test de Bartlett	F(1/6) (5%)	Proba (%)
0 h	ok	2.60	15.59
16 h	ok	23.49	0.32
36 h	ok	39.81	0.10
56 h	ok	7.34	3.46
76 h	ok	16.16	0.72
96 h	ok	49.16	0.06
116 h	ok	32.71	0.15

Tableau 26: Caractéristiques de l'AFD

L'AFD effectuée sur une variable toutes les 20 heures (données transformées) suffit à reclasser les répliqués dans leur groupe. Le premier axe possède une inertie de 100% et un pseudo-F de 142 778.81, les répliqués sont confondus dans la représentation sur l'axe discriminant. Cette représentation n'est pas reproduite, les coordonnées de chaque répliqués sur l'axe sont si proches que l'on ne voit apparaître qu'un point. Cela permet de confirmer l'existence d'une différence entre les deux traitements.

Ces résultats confirment la manipulation qui avait fait apparaître des différences entre les traitements dans la précédente structure (incubation). De plus on s'aperçoit que dans cette structure, la réponse d'une ponte pendant les premières heures du challenge est du même type quelles que soient les conditions de lumière. La figure 14 fait apparaître une différence de réaction nette entre les 2 conditions, pour la ponte P1, à partir de 80 h. Les effets de la lumière sur la ponte P1 n'apparaissent donc dans cette situation qu'après un certain délai. Pourtant la comparaison des pontes pour un traitement (JC ou NC) a fait apparaître une différence de réaction dès le départ du challenge.

La différence de réponse en fonction de la structure conduit à envisager que les facteurs qui sont à l'origine de la discrimination des pontes ne sont pas seulement lumineux et peuvent aussi être d'origine hydrodynamique par exemple. L'hydrodynamisme est d'ailleurs un facteur prépondérant en élevage larvaire (Gaignon & Petton, com. pers.).

* Conclusions générales:

- la qualité des pontes ne semble pas pouvoir se comparer ni se juger uniquement en termes de durée de survie puisqu'une même ponte peut présenter des capacités supérieures d'adaptation aux facteurs de stress lors de la première phase du challenge et survivre moins longtemps

- le type de réponse obtenu lors du challenge dépend fortement de la structure utilisée. Ainsi, il semble qu'il y ait une interaction complexe entre les différents facteurs lumineux, hydraulique et de forme de l'incubateur sur le stress engendré sur les larves tout au long du challenge. En effet, la structure de 36 incubateurs de 3700 ml permet de discriminer les pontes dès les 48 premières heures alors que la structure de 12 incubateurs classiques ne permet d'observer des différences qu'en termes de durée de survie.

IV Essai de validation du challenge

IV.1 Objectifs

Nous avons vu que les manipulations de test de discrimination de pontes ont fait apparaître des différences entre les pontes; ces différences pouvant être plus ou moins nettes selon la structure utilisée et s'exprimer de manière différente.

Ainsi, il est intéressant de comparer le résultat obtenu au cours du test de discrimination de pontes avec les résultats d'un élevage larvaire. Cette étape correspond à la validation du challenge vis-à-vis de la seule référence actuelle permettant de juger la qualité des larves.

IV.2 Matériel et méthodes

En parallèle du test de discrimination de pontes sur P1, P2 et P3, un élevage larvaire a été mené jusqu'au 10ème jour dans une structure de 15 bacs d'élevage larvaire. Le standard utilisé correspond aux conditions expérimentales de référence (CER) en élevage larvaire (Gaignon & Petton, com. pers.). Les caractéristiques du standard utilisé sont les suivantes:

- nature du bac: 150 litres, cylindro-conique, parois blanches
- lumière: 100 lux à J1 et J2, puis 1000 lux jusqu'à la fin
- hydraulique: eau: 600 ml/mn, air 10 ml/mn jusqu'à J3 puis 30 ml/mn jusqu'à la fin.
- température et séquence thermique: 14°C après le transfert puis augmentation progressive jusqu'à 18°C
- proies vivantes: rotifères *Brachionus plicatilis*, pas de nourriture à J1 et J2, distribution de 50 rotifères/larve à J3 (ouverture de la bouche), augmentation progressive du nombre de rotifères pour atteindre 150 rotifères /larve à J8, quantité maintenue jusqu'à J10.
- nombre de larves réparties au départ, estimation volumique, bonne précision à l'aide de faux bacs
- suivi de la mortalité: 2 fois/jour, comptage précis
- nombre de réplicats effectifs: 5 par ponte

IV.3 Résultats et discussion

Les résultats du test de discrimination de pontes ont déjà été présentés plus haut.. La figure 15 représente les résultats de l'élevage larvaire sur les 10 premiers jours caractérisés par le pourcentage journalier de mortalité par rapport aux effectifs restants.

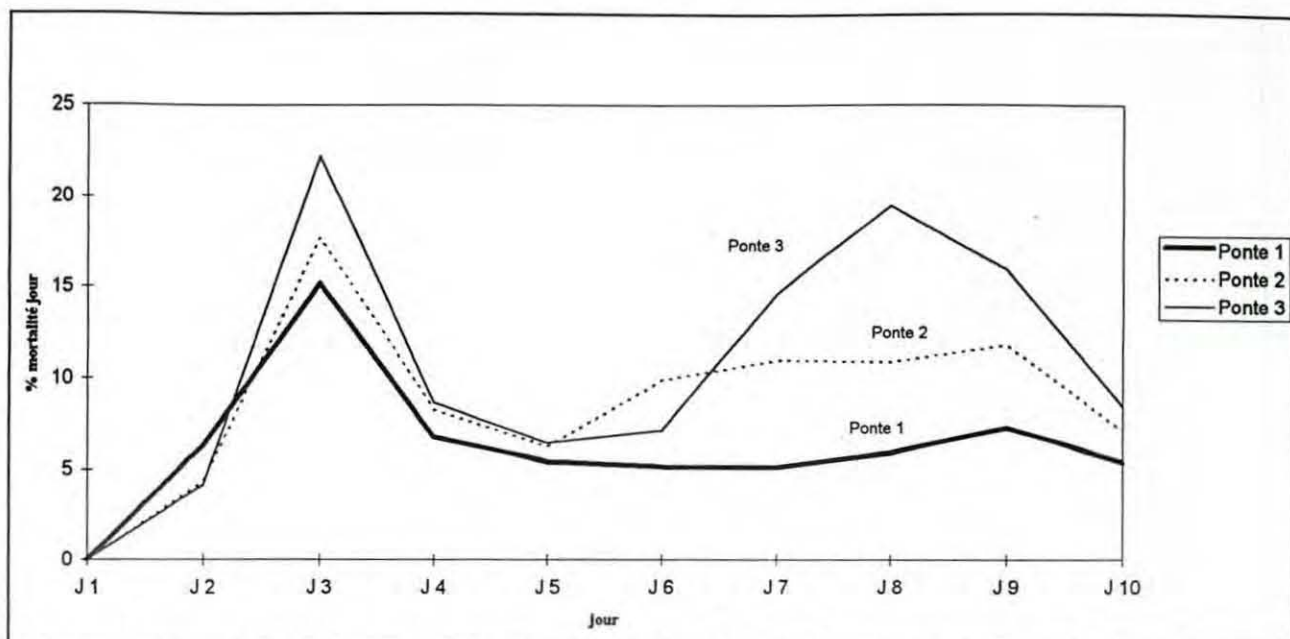


Figure 15: Evaluation de la mortalité journalière, observée en élevage larvaire, courbes représentant la moyenne de 5 réplicats, comparaison entre les 3 pontes.

On observe l'existence d'un pic de mortalité à J3 pour les 3 pontes alors que P1 ne connaît pas de pic de mortalité à J8 comme P2 et P3. Au vu de ces résultats on peut conclure que la ponte P1 permet d'obtenir les meilleurs résultats en élevage larvaire, P2 étant classée seconde et P3 dernière.

L'AFD effectuée sur les données transformées n'a pu inclure les variables J7 et J8 qui présente un fort pouvoir discriminant mais le test de Bartlett rejette l'hypothèse d'homogénéité des variances. Les résultats de l'AFD, résumés dans les tableaux 27 et 28, font apparaître que la séparation des pontes sur la représentation dans le plan des axes discriminants est moins nette que celle obtenue lors du test de discrimination de pontes (cf. paragraphe précédent).

Variable	Test Bartlett	F(2/12) 5%	Proba (%)
J2	ok	1.81	20.45
J3	ok	2.23	14.87
J4	ok	1.73	21.71
J5	ok	0.49	63.16
J6	ok	8.52	0.51
J7	-	11.83	0.15
J8	-	16.80	0.04
J9	ok	4.58	3.28

Tableau 26: Caractéristiques de l'AFD

Axes	Inertie	Pseudo-F
1	84.8	52.35
2	15.2	9.39

Tableau 27: Caractéristiques des axes discriminants issus de l'AFD

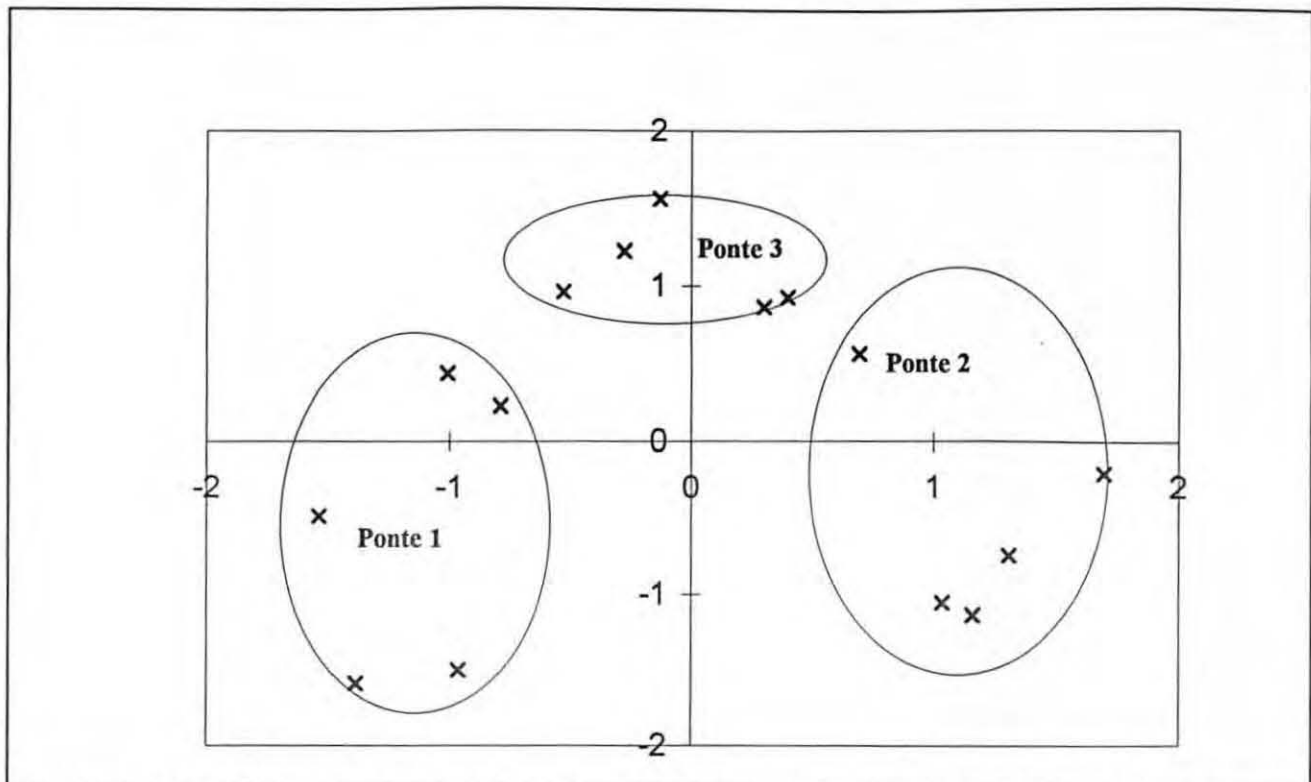


Figure 16: Représentation des réplicats des 3 pontes en élevage larvaire dans le plan des axes discriminants de l'AFD (axe 1 horizontal, axe 2 vertical)

P1 apparaît comme étant la meilleure ponte en élevage larvaire sur le graphique 10. Les taux de survie moyen à J 10 sont les suivants:

- pour la ponte P1, taux de survie moyen de 41,3% ($\sigma = 8,7$)
- pour la ponte P2, taux de survie moyen de 29,7% ($\sigma = 4,9$)
- pour la ponte P3, taux de survie moyen de 19,9% ($\sigma = 4,1$)

Le challenge dans la structure de 36 incubateurs avait fourni les mêmes résultats. On peut donc émettre l'hypothèse que P1 était la plus apte à supporter les conditions du challenge et à bien démarrer en élevage larvaire. La structure de 12 incubateurs avait indiqué que P1 avait une durée de survie moindre en conditions 12 Flashes, il semble que cette caractéristique ne soit pas de première importance en ce qui concerne l'aptitude des larves à bien supporter les conditions d'élevage. Les résultats obtenus lors du challenge et en élevage larvaire vont dans le même sens.

En conclusion sur la validation du challenge: les résultats obtenus laisse supposer l'existence d'une relation entre l'aptitude des larves à supporter les conditions d'un challenge discriminant et leurs performances en élevage larvaire.

V Conclusions sur la phase larvaire

La mise au point de la structure expérimentale pour le challenge ne s'est pas faite sans problèmes mais cela a eu l'intérêt de faire apparaître des éléments nouveaux qui dépassent le cadre du challenge:

- le comportement des larves et leur réaction face au stress: le fait que les larves occupent tout le volume pendant environ 48 heures après le transfert et qu'elles se concentrent sous la surface ensuite reste inexpliqué
- l'importance de l'hydrodynamisme: les différences enregistrées dans les 2 structures utilisées laissent à penser que le renouvellement et les courants créés dans la masse d'eau ont une

importance prépondérante puisque ce facteur peut conduire à l'apparition de mortalité en conditions de challenge

D'autre part, en ce qui concerne le challenge, il apparaît que la comparaison des larves issues de pontes différentes est possible à l'aide de cet outil et qu'elle donne des résultats similaires à ceux de l'élevage larvaire. Il faut même souligner le fait que la différence de capacité d'adaptation est déjà clairement visible à 48 heures dans le challenge alors qu'il faut attendre J7 en élevage larvaire pour voir apparaître les premières différences dans les pics de mortalité.

Ces résultats demandent à être confirmés par la reproduction de ces expériences mais d'ores et déjà l'intérêt du challenge est réel et malgré les difficultés de sa mise au point, l'outil semble intéressant pour la comparaison des pontes et l'évaluation de la qualité au sens large.

G/ CONCLUSIONS GENERALES

I Conclusions sur la mise au point du test

I.1 La standardisation

Il faut rappeler que le principal problème de l'établissement d'un test zootechnique comme le challenge est la standardisation. En effet, tous les facteurs doivent être contrôlés à des fins de reproductibilité.

Nous avons montré l'importance de l'effet de la structure, on doit donc concevoir la standardisation en fonction de la structure utilisée. L'outil a été conçu pour une fiabilité maximale en optant pour la réduction du nombre de facteurs. Dans l'optique de pouvoir comparer précisément des durées de survie, il serait nécessaire de mieux contrôler la température, ce qui n'est pas le cas actuellement pour les raisons suivantes: impact fort de la température atmosphérique et de ses variations et contraintes de l'alimentation en fluides thermorégulés commune pour différentes expérimentations.

D'autre part, les problèmes soulevés lors de la phase incubation nous ont conduits à adopter une solution provisoire d'aménagement des conditions de production. Ce choix représente un standard mais qui est nettement moins bien contrôlé que celui du challenge, toujours à cause de problèmes de structure.

En ce qui concerne la phase larvaire proprement dite, la standardisation de challenge est bien plus aisée que la standardisation en élevage larvaire. Les nombreux facteurs de l'élevage sont plus difficilement contrôlables et la variabilité de la qualité des proies vivantes (principalement des rotifères) interdit d'envisager une standardisation complète de l'élevage permettant la reproductibilité.

I.2 Paramétrage de la réponse

Le paramétrage de la réponse correspond à la recherche des points caractéristiques de la courbe de mortalité qui permettent de distinguer les réponses des différentes pontes. Nous avons vu que les réponses étaient différentes selon la structure utilisée. Le paramétrage ne peut donc s'effectuer que pour une structure donnée et dépend d'une standardisation stricte.

Le paramétrage demande de nombreuses reproductions des manipulations mais on peut envisager que dans le cas du test de discrimination de pontes, certains points caractéristiques soient retenus. Si la discrimination est déjà apparente après 48 heures de challenge, ces résultats concordant avec la totalité de la réponse, il peut être judicieux de stopper le challenge à 48 heures et d'effectuer le bilan. Cela aurait pour effet d'alléger considérablement la manipulation et de fournir une réponse dans un délai beaucoup plus court que les 170 heures d'un challenge complet à 16 °C.

Dans l'état de nos connaissances sur les types de réponse au challenge on ne peut se permettre de limiter le suivi de la mortalité à quelques points. D'autre part, le paramétrage de la réponse sera différent pour chaque condition de lumière. En effet, les réponses aux différentes conditions fournissent le même classement mais les courbes peuvent présenter des allures différentes:

- les allumages-extinctions provoque un stress supplémentaire induisant des pics de mortalité dès le départ du challenge
- la condition d'obscurité totale est moins discriminante et fait plutôt apparaître des différences de durée de survie

En conclusion, on peut dire que les larves sont sensibles à la lumière et cela a été démontré plusieurs fois mais les différences de réponse, qui font encore obstacle au

paramétrage, selon la quantité de lumière ou le nombre de flashes sont peu claires et complexes étant donné le nombre d'interactions qui peuvent s'établir.

I.3 Optimisation du protocole

L'optimisation du protocole est en relation étroite avec la structure dont on dispose et qui a été mise en place. Cette structure de 36 incubateurs permet de comparer 3 pontes, sous 3 conditions avec 4 réplicats. Les informations délivrées par le jour continu et le noir complet sont proches mais peuvent être complémentaires. En conséquence, il ne semble pas nécessaire de réduire le nombre de conditions étant donné que les résultats sont déjà statistiquement satisfaisants. On conservera donc le NC comme traitement témoin et les deux traitements JC et 12 F, c'est entre ces deux dernières conditions que l'on aurait pu effectuer un choix.

La méthodologie de prise de mortalité demande à être légèrement améliorée pour arriver à des taux de manquants inférieurs à 10%. En ce qui concerne les prélèvements de larves dans l'optique d'effectuer des mesures de poids, il apparaît clairement que le suivi de ce paramètre qualitatif peut être riche d'enseignements.

En conclusion, on peut dire que le protocole optimal actuel du challenge est proche de celui décrit lors du test de discrimination de pontes après de légères modifications visant à diminuer le taux de manquants.

II Limites de la méthode

II.1 Effet de l'environnement

En travaillant sur les larves, on n'est plus en mesure d'affirmer que la qualité évaluée correspond à la qualité initiale des oeufs; en effet, il faut tenir compte de l'effet de l'environnement lors de la phase incubation et de l'éclosion.

Le choix de travailler sur un produit de l'incubation et d'une ponte donnée est justifiable vis-à-vis de la démarche adoptée: l'évaluation de la qualité des oeufs et larves dans une optique dynamique.

II.2 Elégance de l'expérimentation

Le fait de mettre les larves à jeun, de les soumettre à un facteur de stress ne va pas sans poser des problèmes éthiques. En effet, le but même de ces expérimentations est d'obtenir l'installation de la mortalité et les expérimentations sont stoppées lorsqu'on s'approche d'une mortalité totale.

Devant la frustration des critères disponibles pour l'évaluation de la qualité des larves, le choix du suivi de la mortalité au cours du challenge représente une des seules alternatives si l'on envisage d'étudier le problème de la qualité des larves.

D'autre part, les larves de turbot peuvent être considérées comme des organismes simples et les souffrances engendrées par la mise à jeun ne sont pas comparables à celles que pourrait occasionner une mise à jeun chez des animaux endothermes (Boeuf, com. pers).

III Perspectives d'utilisation

III.1 Pour une meilleure connaissance de la phase larvaire du turbot

La mise au point du challenge a fait apparaître des éléments nouveaux sur l'importance de certains facteurs sur la survie en phase larvaire. Les effets de la lumière ont été clairement établis et vont dans le sens des travaux de Skiftesvik (1990), ceux de l'hydrodynamisme ont été observés.

Certains facteurs non trophiques ont donc une importance majeure sur la survie en phase larvaire. Ces constatations sont originales et complètent les observations faites en élevage larvaire sur les effets de la lumière et de l'hydrodynamisme sur la possibilité pour chaque larve de saisir des proies vivantes.

Par delà l'intérêt du challenge, de telles manipulations sont intéressantes pour mieux cerner la sensibilité des larves à leur environnement, l'intérêt de tels travaux avait déjà été souligné par Støttrup (1993). Le choix du suivi privilégié de la mortalité s'est imposé dans le cadre des objectifs fixés par la mise au point du challenge mais les quelques données enregistrées sur le poids laissent supposer que d'autres paramètres qualitatifs (biométrie, taux de malformations, niveau de pigmentation et éventuellement composition) pourraient aider à la compréhension des phénomènes qui régissent la survie des larves après l'éclosion. Il faut rappeler que cette phase dite critique, est de toute première importance pour un bon démarrage en élevage larvaire.

III.2 Pour l'évaluation de la qualité des larves

L'outil et le protocole mis au point demandent une standardisation plus rigoureuse de la phase incubation mais les possibilités de discrimination de pontes sont réelles. Les résultats obtenus doivent être confirmés par de nouvelles comparaisons de larves issues de différentes pontes.

D'autre part, il serait très intéressant de caractériser des différences entre les pontes avant de les soumettre à l'incubation et de comparer leur évolution. Cela reviendrait à comparer, à l'aide du challenge, des pontes ayant des différences présumées ou a priori; par exemple, la comparaison de pontes de différents niveaux de vieillissement permettront d'évaluer l'impact de la surmaturation sur la qualité des larves.

Ce type de démarche est répétable avec tous les critères dont on dispose, la comparaison des résultats du challenge avec ceux d'une évaluation de la qualité par un autre critère fournira des renseignements sur la corrélation entre les caractéristiques de l'oeuf décrites par le critère et l'aptitude des larves issues de cette ponte à supporter les conditions du challenge. Dans l'attente de critères à plus court terme ou même instantanés, le challenge fournit une base pour l'évaluation de la qualité des larves permettant de s'affranchir des importantes contraintes de l'élevage larvaire.

III.3 Insertion dans le programme "Qualité"

La mise au point du challenge, dans sa démarche originale et intégratrice a fait apparaître des éléments intéressants sur l'approche de la qualité des oeufs et larves. A ce titre, il faut souligner que la méthode de qualification des pontes utilisée en routine par l'estimation des taux de viabilité n'a jamais parue être reliée à l'aptitude des larves à supporter les conditions du challenge.

Le taux de viabilité permet de séparer les oeufs franchement mauvais (surmaturation prononcée) de ceux qui sont fécondables mais les oeufs fécondés peuvent évoluer de manière très différente et fournir des larves de qualité très variable. Le taux de viabilité constitue un outil grossier de par sa subjectivité et la faiblesse de sa discrimination mais reste actuellement le seul utilisé en routine pour la simplicité de sa mise en oeuvre et la rapidité de sa réponse.

Ce type de constatation effectuée au cours de la mise au point de l'outil montre que toute démarche visant à développer les connaissances sur la qualité des oeufs et des larves fait apparaître de nouveaux problèmes soulignant encore la pertinence du programme "Qualité" et les grandes perspectives de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ARUL, V., 1991.** Effects of delayed feeding on growth and survival of *Channa striatus* (Bloch) larvae. *Aquacult. fish. manage.*, 22: 423-434.
- AVILA, E. M. & J. V. JUARIO, 1987.** Yolk and oil globule utilization, and developmental morphology of the digestive tract epithelium in larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture*, 65: 319-331.
- AYSON, F. G., 1989.** The effect of stress on spawning of broodfish and survival of larvae of the rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture*, 80: 241-246.
- AYSON, F. G. & T. J. LAM, 1993.** Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock : changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 109: 83-93.
- BAGENAL, T. B., 1969.** The relationship between food supply and fecundity in brown trout *Salmo trutta* L.. *J. Fish Biol.*, 1: 67-82.
- BAGENAL, T. B., 1971.** The interrelation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *J. Fish Biol.*, 3: 207-219.
- BARAHONA-FERNANDES, M. H., 1979.** Some effects of light intensity and photoperiod on the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*(L.)) reared at the Centre Oceanologique de Bretagne. *Aquaculture*, 17: 311-321.
- BARTON, L. A., 1981.** Egg quality of turbot kept in captivity conditions. Ph. D. Dissertation Univ. of Liverpool, 128 pp.
- BILLARD, R., 1976.** Effet de l'agitation des ovules et des oeufs de truite arc-en-ciel sur la fécondabilité et le début du développement embryonnaire. *Bull. Fr. Piscic.*, 262: 5-11.
- BOLLA, S. & I HOLMEFJORD, 1988.** Effect of temperature and light on development of atlantic halibut larvae. *Aquaculture*, 74: 355-358.
- BROMLEY, P. J., P. A. SYKES & B. R. HOWELL, 1986.** Egg production of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) spawning in tank conditions. *Aquaculture*, 53: 287-293.
- BROWN, C. L., S. I. DOROSHOV, J. M. NUNEZ, C. HADLEY, J. VANEENENNAAM, R. S. NISHIOKA & H. A. BERN, 1988.** Maternal triiodothyronine injections cause increases in swimbladder inflation and survival rates in larval striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.*, 248 : 168-176.
- BROWN, R. W. & W. W. TAYLOR, 1992.** Effects of eggs composition and prey density on the larval growth and survival of lake whitefish (*Coregonus chupeaformis* Mitchell). *J. Fish Biol.*, 40: 381-394.
- BRUCE, M. P., R. J. SHIELDS, M. V. BELL & N. R. BROMAGE, 1993.** Lipid class and fatty acid composition of eggs of atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 417-422.
- CARILLO, M., N. BROMAGE, S. ZANUY, R. SERRANO & F. PRAT, 1989.** The effects of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 81: 351-365.
- CLARKE, W., 1982.** Evaluation of the seawater challenge test as an index of marine survival. *Aquaculture*, 28: 177-183.

- COUSIN, J. C., 1986.** Etude histologique, histochimique et histopathologique du turbot *Scophthalmus maximus* au cours de son développement. Thèse Doctorat, Univ. Bret. Occ., 128 pp.
- COUSIN, J. C. B., F. BAUDIN-LAURENCIN & J. GABAUDAN, 1987.** Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L.. *J. Fish Biol.*, 30: 15-33.
- CRAIK, J. C. A. & S. M. HARVEY, 1984.** Biochemical changes associated with overripening of the eggs of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquaculture*, 37: 347-357.
- CRAIK, J. C. A., 1985.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47: 61-88.
- CRAIK, J. C. A. & S. M. HARVEY, 1987.** The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 67: 169-182.
- DENIEL C., 1981.** Les poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez. Reproduction, croissance et migration des Bothidae, Scophthamidae, Pleuronectidae et Soleidae. Thèse, Univ. Bretagne Occidentale, Brest, 476 pp.
- DEVAUCHELLE, N. & Y. CLADAS, 1982.** Influence de la taille, du poids et du taux d'humidité d'oeufs de trois espèces de poissons marins sur les taux d'éclosion et d'anomalies des larves. ICES paper C.M. 1982/F: 19.
- DEVAUCHELLE, N., J. C. ALEXANDRE, N. LE CORRE & Y. LETTY, 1988.** Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, 69: 159-184.
- DEY, D. B & D.M. DAMKAER, 1990.** Effects of spectral irradiance on the early development of chinook salmon. *The progressive fish culturist*, 52(3): 141-154.
- ESCAFFRE, A. M. & R. BILLARD, 1979.** Evolution de la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* laissés dans la cavité abdominale au cours de la période post-ovulatoire. *Bull. Fr. Piscic.*, 272: 56-70.
- ESCAFFRE, A. M. & P. BERGOT, 1990.** Résorption de vitellus chez les alevins de truite commune (*Salmo trutta* L.) gardés à jeun ou nourris. *Bull. Fr. Piscic.*, 317: 58-67.
- FAUVEL, C., M.H. OMNES, M. SUQUET & Y. NORMANT, 1992.** Enhancement of the production of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae by controlling overripening in mature females. *Aquacult. Fish. Manage.*, 23: 209-216.
- FAUVEL, C., M. H. OMNES, M. SUQUET & Y. NORMANT, 1993.** Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. *Aquaculture*, 117: 107-113.
- FUKUHARA, O., 1990.** Effects of temperature on yolk utilization, initial growth, and behaviour of unfed marine fish-larvae. *Mar. Biol.*, 106: 169-174.
- FYHN, H. J., 1993.** Multiple functions of free amino-acids during embryogenesis in marine fishes. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*, Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn editors. University of Bergen, Norway, pp. 299-308.
- GALL, G. A. E., 1974.** Influence on size of eggs and age of female on hatchability and growth in rainbow trout. *Calif. Fish and Game*, 00(1): 26-35.
- HANSEN S.H. & K. PITTMAN, 1994.** Ontogeny of the photoresponse of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae incubated in constant darkness or constant light. Résumé des contributions présentées au Congrès International BORDEAUX AQUACULTURE'94.
- HELVIK, J. V. & K. PITTMAN, 1990.** Lights affects hatching, development and pigmentation of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). ICES paper C.M 1990/F:40

- HEMING, T. A., 1992.** Effects of temperature on utilization of yolk by chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*) eggs and alevins. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 184-190.
- HOLE G. & K. PITTMAN, 1994.** Behaviour, growth and survival of young juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) under different light and temperature conditions. Résumé des contributions présentées au Congrès International BORDEAUX AQUACULTURE'94.
- HUSE, I. & A. B. SKIFTESVIK, 1985.** Qualitative and quantitative behaviour studies in starving and feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. ICES paper C.M. 1985/F:33. P
- IGLESIAS, J., G. RODRÍGUEZ-OJEA & J. B. PELETEIRO, 1991.** Effect of light and temperature on the development of turbot eggs (*Scophthalmus maximus* L.). ICES paper C.M. 1991/F: 51.
- JONES, A., 1972.** Studies on egg development and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus* L., and brill *Scophthalmus rhombus* L., in the laboratory. *J. Mar. biol. Ass. U.K.*, 52: 965-986.
- KAMLER, E. & T. KATO, 1983.** Efficiency of yolk utilization in relation to incubation temperature and egg size. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 30(3): 271-306.
- KANIS, E., T. REFSTIE & T. GJEDREM, 1976.** A genetic analysis of egg, alevin and fry mortality in salmon (*Salmo salar*), sea trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 8: 259-268.
- KATO, T. & E. KAMLER, 1983.** Criteria for evaluation of fish egg quality, as exemplified for *Salmo gairdneri* (Rich.). *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 4: 61-78.
- KJESBU, O. S., J. KLUNGSØYR, H. KRYVI, P. R. WITTHAMES. & M. GREER WALKER, 1991.** Fecundity, atresia, and egg size of captive atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 2333-2343.
- KJØRSVIK, E. & S. LØNNING, 1983.** Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L.. *J. fish Biol.*, 23: 1-12.
- KJØRSVIK, E., A. MENGOR-JENSEN & I. HOLMEFJORD, 1990.** Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.*, 26: 71-113.
- KNOX, D., N. R. BROMAGE, C.B. COWEY & J. C. R. SPRINGATE, 1988.** The effect of broodstock ration size on the composition of rainbow trout eggs (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 69: 93-104.
- LUQUET, P. & T. WATANABE, 1986.** Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish Physiol. Bioch.*, 2(1-4): 121-129.
- MÅRSTØL, M. J., H. J. FYHN, O. S. KJESBU & P. SOLEMDAL, 1993.** Free amino acid content as a potential criterion of egg quality in atlantic cod (*Gadus morhua*). In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn editors. University of Bergen, Norway, pp. 99-103.
- Mc EVOY, L. A., 1984.** Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L.. *J. Fish Biol.*, 24: 437-448.
- Mc EVOY, L. A., 1989.** Reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in captivity. Cuadernos da Área de Ciências Mariñas, Seminario de Estudos Galegos, 3: 9-28.
- Mc EVOY, L. A. & J. Mc EVOY, 1991.** Size fluctuation in the eggs and newly hatched larvae of captive turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. biol. Ass. U.K.*, 71: 679-690.

- Mc EVOY, L. A., D. HOLLAND & J. Mc EVOY, 1993.** Effect of spawning fast on lipid and fatty acid composition of eggs of captive turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 114: 131-139.
- Mc GEER, J., L. BARANYI & G. K. IWAMA, 1991.** Physiological responses to challenge tests in six stocks of coho salmon (*Onchorynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1761-1771.
- MUNILLA, R., M. J. FERREIRO, M.J. FERNANDEZ-REIRIZ, U. LABARTA & M. PLANAS, 1993.** Effects of environmental factors on lipid digestion during early turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae development. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn editors. University of Bergen, Norway, pp. 167-171.
- NEAVE, D. A., 1984.** The development of visual acuity in larval plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 78: 167-175.
- OLIN, T & A. VON DER DECKEN, 1990.** Yolk proteins in salmon (*Salmo salar*) oocytes, eyed eggs, and alevins differing in viability. *Can. J. Zool.*, 68: 895-900.
- PASCUAL, E. & M. YÚFERA, 1993.** Energy content and chemical composition of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., eggs. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 423-429.
- PERSON-LE RUYET, J., 1989.** The hatchery rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). Cuadernos da Área de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos, 3: 57-91.
- PELETEIRO, J. B., P. LAVENS, G. RODRIGUEZ-OJEA & J. IGLESIAS, 1993.** Relationship between egg quality of various turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstocks and its fatty acid content. ICES 1993 Symposium on mass rearing of juvenile fish.
- PLANAS M., A. ESTEVEZ & J.L. GARRIDO, 1991.** Energy metabolism during early ontogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus*) and the effect of starvation. LARVI'91 - FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM, P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (Eds). European Aquaculture Society, Special publication N°15, Gent, Belgium, 1991.
- PLANAS, M., U. LABARTA, M. J. FERNANDEZ-REIRIZ, M. J. FERREIRO, R. MUNILLA & J. L. GARRIDO, 1993.** Chemical changes during development in turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs and larvae. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn, editors. University of Bergen, Norway, pp. 269-278.
- QUANTZ, G., 1985.** Use of endogenous energy sources by larval turbot *Scophthalmus maximus*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114: 558-563.
- RØNNESTAD, I., 1989.** Ammonia excretion, oxygen uptake, free amino acids and oil globule resorption during embryonic development of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Proc. Third. Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Toba, Aug. 28 - Sept. 1, Japan, 1989, pp. 357-365.
- RØNNESTAD, I., H. J. FYHN & K. GRAVNINGEN, 1992.** The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.*, 114: 517-525.
- RØNNESTAD, I., H. J. FYHN, 1993.** Importance of free amino acids in embryonic energy production of three marine flatfishes as revealed by measurements of oxygen consumption and ammonia production. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn, editors. University of Bergen, Norway, pp. 285-289.
- SKIFTESVIK, A. B., 1992.** Changes in the behaviour at onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 1570-1572.

- SKIFTESVIK, A. B., I. OPSTAD, Ø. BERGH, K. PITTMAN, & L. H. SKJOLDDAL, 1990.** Effects of light on the development, activity and mortality of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae. ICES paper C.M. 1990/F:43
- SOIVIO, A., M. NIEMISTÖ & M. BÄCKSTRÖM, 1989.** Fatty acid composition of *Coregonus muksun* Pallas: changes during incubation, hatching, feeding and starvation. *Aquaculture*, 79: 163-168.
- SPRINGATE, J. R. C., N. R. BROMAGE, J. A. K. ELLIOTT & D. L. HUDSON, 1984.** The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 43: 313-322.
- SPRINGATE, J. R. C. & N. R. BROMAGE, 1985.** Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 47: 163-172.
- SRIVASTAVA, R. K. & J. A. BROWN, 1992.** Assessment of egg quality in atlantic salmon *Salmo salar*, treated with testosterone-II. amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A(2): 397-402.
- SRIVASTAVA, R. K. & J. A. BROWN, 1993.** Assessment of egg quality in atlantic salmon *Salmo salar*, treated with testosterone: biochemical composition. *Can. J. Zool.*, 70: 109-115.
- STØTTRUP, J. G., 1993.** First feeding in marine fish larvae: nutritional and environmental aspects. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn, editors. University of Bergen, Norway, pp. 123-131.
- STRÜSSMAN, C. A. & F. TAKASHIMA, 1989.** PNR, histology and morphometry of starved pejerrey *Odontheistes bonariensis* larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(2): 237-246.
- STRÜSSMAN, C. A. & F. TAKASHIMA, 1989.** Effects of temperature upon survival and histological changes of starved pejerrey *Odontheistes bonariensis* larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(2): 247-254
- THORSEN, A., H. J. FYHN & R. A. WALLACE, 1993.** Free amino acids as osmotic effectors for oocyte hydration in marine fishes. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Bernt T. Walther & Hans Jørgen Fyhn, editors. University of Bergen, Norway, pp. 94-98.
- ULVUND, K. A. & O. GRAHL-NIELSEN, 1988.** Fatty acid composition in eggs of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 898-901.
- WARE, D. M., 1975.** Relation between egg size, growth, and natural mortality of larval fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2503-2512.
- WEDEMEYER, G. A. & D. J. Mc LEAY, 1981.** Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In *Stress and fish* (A. D. Pickering, ed.), pp. 247-275. London and New-York: Academic Press.
- WHYTE, J. N. C., W. C. CLARKE, N. G. GINTHER & J. O. T. JENSEN, 1993.** Biochemical changes during embryogenesis of the pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis* (Schmidt). *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 193-201.
- YIN, M. C. & J. H. S. BLAXTER, 1987.** Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 105: 73-83.
- YÚFERA, M., E. PASCUAL, A. POLO & M. C. SARASQUETE, 1993.** Effects of starvation on the feeding ability of glthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 169: 259-272.