

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

ÉVALUATION DE LA CONTRIBUTION PATERNELLE ET DES EFFETS DE LA
PHOTOPÉRIODE SUR LES PERFORMANCES DE CROISSANCE DES JEUNES
STADES DE PLIE ROUGE (*PSEUDOPLEURONECTES AMERICANUS*) D'ORIGINES
DIFFÉRENTES

THÈSE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

comme exigence partielle du programme de doctorat conjoint en Océanographie

à l'obtention du grade de

PHILOSOPHIAE DOCTOR (OCÉANOGRAPHIE)

PAR

ERWANN FRABOULET

Décembre 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

À mon père,

Yvan Fraboulet, publicitaire,
décédé le 18 mai 1998 pendant ma première année universitaire à Nantes.

"Le poisson est un animal dont la croissance est excessivement rapide entre le moment où il est pris et le moment où le pêcheur en fait la description à ses amis"

(Anonyme)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, ce projet n'aurait pas pu être réalisé sans l'appui de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski et de l'Université du Québec à Rimouski. Je tiens donc à remercier Serge Demers, directeur de l'ISMER, Jean-François Dumais, directeur des programmes de l'ISMER, ainsi que Michel Ringuet, recteur de l'UQAR, de m'avoir permis de réaliser ce doctorat en océanographie.

Je tiens à remercier vivement ma directrice de recherche, Céline Audet, qui m'a accepté comme étudiant sur ce projet. Merci pour son soutien permanent jusqu'à des heures tardives, que ce soit les mains dans l'eau à la station ou bien dans les corrections de mes travaux. Merci pour cette incroyable réactivité pendant les problèmes d'élevage ou d'analyse. Finalement, merci pour toute cette formation sur l'étude de la biologie des poissons et pour cette patience.

Merci à Yvan Lambert, mon co-directeur de recherche, qui a toujours su m'encourager et me conseiller habilement tout au long de ce projet. Merci pour ce calme rassurant et cette magnifique complémentarité avec Céline.

Merci aux autres membres de mon comité de thèse, Réjean Tremblay et Patrick Ouellet, qui m'ont suivi et encouragé pendant les moments importants du programme de doctorat. Un merci particulier à Réjean, qui a coordonné les analyses de lipides dans son laboratoire et qui m'a finalement fait suffisamment confiance pour m'accepter sous sa direction pour un post-doctorat.

Merci aux chercheurs partenaires de ce projet, Vanya Ewart et Matthew Litvak, qui se sont intéressés et qui m'ont apportés leur appui scientifique pendant certains volets de ce projet. Merci à Edward Trippel (SBSA, MPO) d'avoir accepté d'être examinateur externe sur cette thèse et d'y avoir apporté des remarques pertinentes, ainsi que Jean-Claude Brêthes (ISMER) pour avoir présidé le jury d'évaluation.

Il va de soi que ce projet est basé sur l'élevage de poissons. Je dois énormément à tous ceux qui ont mis les mains dans l'eau pour faire en sorte que les poissons soient dans les meilleures conditions possibles. Un merci particulier à Laurent Seychelles et Michel Bélanger qui ont donné beaucoup d'énergie avec mes poissons et qui ont partagé d'intenses journées la tête dans les bassins. Merci aux étudiants d'été sans qui les élevages à la station n'auraient pas pu se faire correctement: Étienne, Joannie, Caroline, Francis, Marie, Karine, Audrey, Annick et Simon. Merci aux étudiants sous contrat ou en stage: Aurélie, Élodie, Antoine, Stéphanie, Lisa. Merci aux assistants de recherche des mes directeurs, Dominique Lavallée et Mario Péloquin, qui ont toujours su m'assister efficacement; Mario s'étant particulièrement bien occupé des plies conservées à l'Institut Maurice-Lamontagne. J'ai une pensée pour les employés des magasins spécialisés qui ont su me conseiller sur certains aspects techniques de mon projet (Plomberie Gérard Lebond, Quincaillerie Home Hardware, BMR, Canadian Tyre, Animalerie Dyno, Épicerie BG). Merci à l'ébéniste Daniel Saint-Pierre pour la réalisation des bassins de juvéniles.

Un grand merci aux responsables successifs de la station aquicole, Réal Fournier et Nathalie Morin, pour leur grande aide technique dans la gestion des problèmes soudains et

leurs précieux conseils sur l'élevage en milieu marin. Merci à ceux qui m'ont aidé au laboratoire; Iften Redjah pour l'apprentissage de la technique d'analyse des lipides et Gisela Martinez pour celui du dosage de gènes par PCR. Un merci particulier à Gisela pour son accueil à Halifax.

J'adresse également mes remerciements aux étudiants de mon bureau à l'ISMER qui ont partagé mes angoisses et mes coups de gueule: Matthieu, Émilie, Christine, Marion, Souad, Nassim, Sébastien, Reynald, Cyril, Maya. Merci aux autres étudiants qui m'ont soutenu pendant mes pauses ou aidé pour des problèmes ponctuels: Nico, Tyco, JB, Jonathan, Magdalena, Oscar, Andréane, Amandine, *etc.* Merci aux employés de l'ISMER qui ont su résoudre bien des énigmes pour moi, que ce soit à l'administration (Sylvie, Nycole, Joceline, Marielle) ou à l'appui technique (Sylvain, Mélanie). Merci à tous ceux que j'ai oublié de citer qui ont fait avancer mon projet, ne serait-ce que par une simple discussion autour d'un verre.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier Sarah, qui m'accompagne depuis plus de trois ans maintenant et qui m'a soutenu et encouragé au quotidien, partageant les peines, les angoisses et les succès de mon projet. Merci à ma mère, Françoise, de m'avoir soutenu dans cette aventure qui a pourtant poussé son fils à partir loin d'elle. Je te serai toujours reconnaissant de ces efforts qui m'ont permis de concrétiser mes choix d'orientation scolaire. Je tiens à remercier ma sœur, Isabelle, qui a toujours cru en moi et qui s'émerveille de ce qu'est capable de faire son petit frère. Merci de m'avoir donné mon premier neveu, Arsène. Merci aussi à Laure, qui a partagé les premiers moments hésitants

de cette aventure et qui m'a encouragé dans mes choix malgré la distance. Merci à Solenn d'être toujours attentive à mes projets depuis nos débuts conjoints dans la science au lycée et de veiller à ma santé mentale. Merci à Charles et Orlane qui m'ont grandement assisté et encouragé depuis le début de ce projet. J'ai une pensée pour tout le reste de ma famille et de mes amis que j'ai laissé en France ou ailleurs pour aller vivre cette expérience québécoise; merci de m'avoir encouragé dans ce choix même si il a pu vous paraitre obscur à certains moments.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a pour objectif de vérifier si les jeunes stades de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus* W.) (larves et juvéniles) de différentes régions géographiques présentent des différences de croissance qui soient attribuables à leur origine lorsqu'ils sont soumis à un même environnement. Cette thèse consiste également à évaluer si l'origine géographique des pères influence le déterminisme des performances de croissance. Les expériences ont été réalisées dans des conditions considérées comme "froides" afin de rencontrer les exigences requises pour le développement de la diversification des productions aquacoles au Canada.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une subvention stratégique conjointe du Conseil de Recherche en Sciences Naturelle et Génie du Canada (STPGP 307483-04) octroyée à des chercheurs de différentes provinces de l'est du Canada: Matthew Litvak (responsable), du Centre d'études côtières et d'aquaculture de l'Université du Nouveau-Brunswick à Saint-John (Nouveau-Brunswick); Vanya Ewart, de l'Institut des biosciences marines du Conseil national de recherches à Halifax (Nouvelle-Écosse); Yvan Lambert, de l'Institut Maurice-Lamontagne du Ministère des Pêches et Océans à Mont-Joli (Québec); et Céline Audet, de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski de l'Université du Québec à Rimouski (Québec). Cette subvention ayant été attribuée dans le but d'identifier une souche de plie rouge performante dans les conditions environnementales canadiennes et de

développer les bases de l'élevage, des expériences ont également été réalisées pour optimiser la croissance des juvéniles puisqu'il s'avère que des difficultés sont rencontrées en culture lors de cette étape.

Commencé au printemps 2005, ce projet a nécessité la collecte et le maintien sur plusieurs années de trois stocks de géniteurs (environ 300 individus initialement), lesquels ont été réalisés avec l'appui d'Yvan Lambert, co-directeur de recherche sur cette thèse, à l'Institut Maurice-Lamontagne. Pour réaliser nos objectifs, trois séries d'élevages expérimentaux (représentant un total de 24 mois d'expérimentation) furent réalisées à la station aquicole de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski sous la responsabilité de Céline Audet, directrice de recherche sur cette thèse. Ce projet a également nécessité différentes périodes d'analyses biochimiques qui furent réalisées dans les laboratoires de l'ISMER sous la direction de Céline Audet, ainsi que du chercheur Réjean Tremblay, titulaire de la chaire de recherche du Canada en aquaculture, pour ce qui a trait aux dosages de lipides. Réalisée dans le cadre d'un cours du programme de doctorat, une partie de ce projet a été effectuée lors d'un stage dans le laboratoire de biologie moléculaire de la chercheuse Vanya Ewart à Halifax. Les résultats obtenus lors de cette collaboration sont présentés en annexe de cette thèse.

La thèse débute par une introduction générale visant à détailler l'avancée des connaissances sur la croissance des poissons et la plie rouge. Le cœur de la thèse est

constitué de trois articles soumis pour publication dans des revues scientifiques. Le premier chapitre s'intitule: "*The effects of latitudinal origin and paternal contribution on larval growth of winter flounder in a northern environment*" (publié dans: *Transactions of the American Fisheries Society*). Le deuxième chapitre s'intitule: "*Assessment of paternal effect and physiological cost of metamorphosis on growth of young winter flounder juveniles in a cold environment*" (accepté pour publication dans: *Journal of Fish Biology*). Le troisième et dernier chapitre s'intitule: "*Growth and lipid composition of winter flounder juveniles reared under variable photoperiod and temperature conditions*" (soumis à: *North American Journal of Aquaculture*). Une discussion générale et une conclusion générale terminent cette thèse.

RÉSUMÉ

La plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus* W.) est une espèce de poisson plat que l'on retrouve communément le long du littoral de l'océan Atlantique Nord-Ouest. Au Canada, elle est un candidat intéressant pour le développement des productions aquacoles mais il s'avère que les performances de croissance des populations présentes sur le territoire sont peu caractérisées, surtout au niveau des jeunes stades. Chez les poissons, différentes stratégies de croissance peuvent être développées en réponse à des variations géographiques de conditions environnementales rencontrées le long de leur aire de répartition. Si l'environnement joue un rôle essentiel dans le contrôle des processus physiologiques pendant les premiers stades de développement, la croissance peut être également déterminée par des facteurs transmis par les parents. Cependant, chez les poissons, les travaux antérieurs ont été majoritairement menés dans le but de caractériser les effets maternels. Les effets paternels ayant été négligés, ils sont peu connus.

Cette thèse avait comme objectifs d'étudier les performances de croissance des larves et des juvéniles de plies rouges originaires de régions différentes, d'évaluer l'implication de facteurs paternels dans le déterminisme de la stratégie de croissance, et d'optimiser l'élevage des juvéniles. Les individus étudiés provenaient de trois différents sites géographiques: la baie de Passamaquoddy (Nouveau-Brunswick), la baie des Chaleurs (Québec) et l'estuaire maritime du Saint-Laurent (Québec). Toutes les expériences ont été réalisées dans les conditions de température et de salinité rencontrées dans l'habitat de la population la plus septentrionale, c'est-à-dire celle de l'estuaire maritime du Saint-Laurent.

Dans la première partie de cette thèse, nous voulions vérifier si les larves de plie rouge des différentes régions testées présentaient des différences de croissance en milieu froid et si les pères contribuaient à ces différences. Nous avons suivi la croissance de familles issues de croisements de type "plein-frère" (année 1) et de type "demi-frère" (année 2) réalisés entre les trois populations étudiées. La capture des géniteurs sauvages dans les différentes régions nous a permis de constater que dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent, les mâles étudiés étaient plus petits et en meilleure condition que dans les deux autres régions étudiées, mais aussi que les femelles produisaient de plus petits œufs. Cependant, ces différences n'ont pas eu d'effets sur la qualité des gamètes puisqu'aucune différence du pourcentage de fécondation, du pourcentage de survie ou de la taille à l'éclosion n'a pu être observée entre les trois populations. Nous avons aussi démontré que les plies de l'estuaire du Saint-Laurent présentaient une croissance larvaire inférieure à celles des deux autres régions et que cette différence était une caractéristique transmise partiellement par le père. Malgré des croissances différentes pendant la phase pélagique, les larves ont adopté un comportement benthique (déposition) au même âge physiologique (exprimé en degrés jours) et ne présentaient pas de différence de taille une fois atteint le stade de déposition. Chez la plie rouge, la déposition nous est apparue dépendante de la taille et davantage gouvernée par des facteurs environnementaux que par des facteurs parentaux.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons voulu vérifier si l'origine des mâles pouvait engendrer des différences de croissance après la déposition. Nous avons réalisé le suivi de juvéniles issus de croisements de type "demi-frère" jusqu'à un mois et demi après la déposition. Au cours de cette période, les différentes familles hybrides n'ont pas présenté de différence de taille, de condition (*e.g.*, pigmentation, indice de Fulton), ou de valeurs de différents indicateurs biochimiques de croissance (*e.g.*, ARN/ADN, triglycérides/stérols), révélant ainsi l'absence de contribution paternelle à cette étape. Cependant, nos résultats ont démontré que les juvéniles avaient épuisé leurs réserves en lipides énergétiques (*i.e.*, triglycérides) à la fin de cette période de croissance. Il semble que les processus ontogénétiques associés à la finalisation de la métamorphose aient pu limiter l'expression de stratégies de croissance déterminées génétiquement au début de la vie pélagique.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons voulu vérifier si l'utilisation d'une longue photopériode pouvait améliorer la croissance des jeunes juvéniles. Entre la déposition et le printemps suivant, aucune différence de croissance notable n'a pu être observée entre les juvéniles exposés aux conditions environnementales naturelles et ceux exposés continuellement à une longue photopériode (14,5L:9,5D). Cependant, les juvéniles exposés à la photopériode naturelle jusqu'à l'automne puis subitement transférés sous une longue photopériode pour tout l'hiver ont présenté une croissance hivernale nettement supérieure à ceux exposés aux conditions naturelles. Au printemps suivant, ces juvéniles étaient 25% plus long, deux fois plus lourd et contenaient deux fois plus de lipides, dont cinq fois plus de triglycérides que ceux exposés aux conditions naturelles. Ces résultats démontrent qu'il est possible d'améliorer les performances de croissance hivernale des juvéniles de plie rouge en manipulant le régime saisonnier de photopériode.

Dans la partie annexe de cette thèse, nous avons voulu évaluer si la résistance au gel pouvait varier entre les hybrides de type "demi-frère" précédemment obtenus. Des analyses génétiques nous ont permis de mesurer un nombre supérieur de copies du gène codant pour la protéine antigel hyperactive HYP AFP I ainsi que des gènes codant pour les petites isoformes HPLC-6 et HPLC-8 chez les juvéniles fécondés par les mâles de l'estuaire du Saint-Laurent, leur procurant ainsi une meilleure capacité de résistance au gel l'hiver.

Au cours de cette thèse, nous avons identifié d'importantes différences de traits d'histoire de vie relatifs à la croissance laissant présager que la population de l'estuaire maritime du Saint-Laurent est distincte des deux autres populations testées. Nous avons également détecté la présence d'effets paternels pour certains traits qui pourraient être utilisés comme outils de sélection dans des programmes aquacoles. De plus, l'amélioration consécutive de la croissance hivernale des juvéniles obtenue à la suite de la manipulation du régime de photopériode ouvre de réelles perspectives pour le développement de la production de la plie rouge au Canada.

* * *

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
AVANT-PROPOS	v
RÉSUMÉ.	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES	xv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
La croissance des poissons.....	1
Généralités et mécanismes adaptatifs.....	1
Les indicateurs biochimiques de croissance.....	3
Les gradients géographiques	5
Impacts sur la structure des populations.....	8
Rôle de la photopériode.....	10
Rôle des parents.....	11
La plie rouge.....	13
Généralités.....	13
Traits d'histoire de vie	16
La résistance au froid.....	19
Les populations de plie rouge.....	21

Le défi aquacole.....	24
Hypothèses et objectifs de cette thèse.....	26
CHAPITRE I. THE EFFECTS OF LATITUDINAL ORIGIN AND PATERNAL CONTRIBUTION ON LARVAL GROWTH OF WINTER FLOUNDER IN A NORTHERN ENVIRONMENT	30
I.1 INTRODUCTION	31
I.2 MATERIALS AND METHODS.....	34
Populations	34
Pure strain families	36
Hybrid families	38
Data analysis.....	40
I.3 RESULTS	41
Pure strain families	41
Hybrid families	46
I.4 DISCUSSION.....	47
CHAPITRE II. ASSESSMENT OF PATERNAL EFFECT AND PHYSIOLOGICAL COST OF METAMORPHOSIS ON GROWTH OF YOUNG WINTER FLOUNDER JUVENILES IN A COLD ENVIRONMENT.....	52
II.1 INTRODUCTION	53
II.2 MATERIALS AND METHODS	56
Experimental design.....	56
Growth analysis	59
Biochemical analyses	60

Statistical analyses.....	61
II.3 RESULTS.....	63
II.4 DISCUSSION.....	70
Paternal effect.....	70
Ontogeny effect.....	74
CHAPITRE III. GROWTH AND LIPID COMPOSITION OF WINTER FLOUNDER JUVENILES REARED UNDER VARIABLE PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE CONDITIONS	79
III.1 INTRODUCTION.....	80
III.2 MATERIALS AND METHODS.....	84
Post-settlement experiment.....	84
Winter experiment.....	86
Growth monitoring.....	87
Lipid class analyses.....	88
Statistical analysis.....	89
III.3 RESULTS.....	91
Post-settlement experiment.....	91
Winter experiment.....	91
III.4 DISCUSSION.....	98
Post-settlement experiment.....	98
Winter experiment.....	98
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	104
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	113

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	115
ANNEXE. ÉVALUATION DU NOMBRE DE COPIES DES GÈNES CODANT POUR LES PROTÉINES ANTIGEL CHEZ LES JUVÉNILES DE PLIE ROUGE HYBRIDES.....	153
A.1 INTRODUCTION.....	154
A.2 MÉTHODES	155
Matériel biologique.....	155
Échantillonnage	155
Analyses par PCR quantitative.....	156
Analyses statistiques.....	157
A.3 RÉSULTATS	158
Croissance.....	158
Nombre de copies de gènes	160
A.4 INTERPRÉTATION.....	164
A.5 REMERCIEMENTS	165

LISTE DES TABLEAUX

Table I.	Biological characteristics of breeders, embryos, and newly settled winter flounder larvae (NSL) in pure and hybrid cross-type experiments..	42
Table II.	Mean values (\pm standard deviation) of biological indices of winter flounder paternal half-sib juveniles between settlement and 45 days after settlement.	64
Table III.	Review of fish studies (freshwater and marine fish) that have shown significant paternal effects on specific developmental stages.....	72
Table IV.	Lipid composition of winter flounder juveniles at the beginning (fall) and end (spring) of the winter experiment.	95
Table V.	Biological characteristics of winter flounder juveniles during the winter experiment.....	97
Tableau VI.	Caractéristiques biologiques des juvéniles de plie rouge issus de croisements de type demi-frère.	158
Tableau VII.	Nombre moyen de copies des gènes codant pour les protéines antigél chez les juvéniles fécondés par les mâles des trois origines.	160
Tableau VIII.	Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de la baie des Chaleurs.....	161
Tableau IX.	Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de la baie de Passamaquoddy.....	162
Tableau X.	Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de l'estuaire du Saint-Laurent.....	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Illustration d'une plie rouge (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>) adulte.....	14
Figure 2.	Illustration de l'aire de répartition de la plie rouge (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>) le long des côtes de l'Atlantique Nord-Ouest et définition actuelle des stocks.....	15
Figure 3.	Illustration du cycle vital de la plie rouge.	17
Figure 4.	Origine géographique des trois populations sélectionnées.....	27
Figure 5.	Mean sea surface temperature profiles for the three locations from which winter flounder were obtained.	35
Figure 6.	Regression equation ($P < 0.001$) relating the lengths of live (nonfixed) winter flounder larvae 0–38 d posthatch and those of larvae of the same age that were fixed in 2% solution of formalin.....	39
Figure 7.	Panel (A) shows the mean \pm SD egg diameters of the different pure-strain winter flounder crosses studied. Panel (B) shows the time to hatch for eggs from these crosses.	43
Figure 8.	Regression equations relating the pelagic growth in total length of winter flounder larvae and the number of degree-days among the three populations studied.	45
Figure 9.	(A) Location of spawning grounds and (B) mean sea-surface temperature profiles for the three locations where winter flounder were obtained.	56
Figure 10.	Mean relative proportions of lipid classes (in % of total lipids) in winter flounder paternal half-sib juveniles at settlement and 45 days post-settlement.	66
Figure 11.	Fin erosion and pigmentation indices estimated 45 days after settlement by half-sib groups.	68
Figure 12.	Survival of the three half-sib groups sorted by time interval from settlement (in days post-settlement).....	69
Figure 13.	Photoperiod (DL: daylight duration in hours) and temperature ($^{\circ}\text{C}$) regimes applied during the two experimental periods.	85

Figure 14. Standard length (A) and body width (B) of winter flounder juveniles reared under natural (NP) and long photoperiod (LP) from settlement to 45 days post-settlement (DPS).....	92
Figure 15. Fin erosion and pigmentation indices of juvenile winter flounder at 45 days post-settlement (DPS) at the beginning (fall) and end (spring) of the winter experiment.	93
Figure 16. Standard length (A) and body width (B) variations of juvenile winter flounder during the winter experiment.....	94
Figure 17. Indices de pigmentation et d'érosion de nageoire des juvéniles de plie rouge issus de croisements de type "demi-frère" en janvier.	159

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La croissance des poissons

Généralités et mécanismes adaptatifs

Bien qu'il s'agisse d'un phénomène facilement observable et rapidement mesurable, la croissance est l'activité la plus complexe d'un organisme. Elle résulte d'une série de processus physiologiques et comportementaux débutant par l'acquisition de l'énergie (*e.g.*, alimentation) et aboutissant à la biosynthèse de tissus (Brett, 1979). Ce tissu peut être accumulé dans l'organisme pour la croissance somatique ou disséminé sous forme de gamètes pendant la période de reproduction. Chez les poissons, la principale caractéristique de la croissance est d'être indéterminée (*i.e.*, continue) tout au long du développement (Weatherley et Gill, 1987). Cependant, les taux de croissance peuvent varier en fonction du stade de développement. Par exemple, pendant la période de reproduction, l'énergie est préférentiellement allouée à la synthèse de gamètes ce qui peut engendrer une diminution des taux de croissance somatique chez certaines espèces (Wootton, 1998). Chez les poissons plats, l'importante métamorphose physique des larves pélagiques (symétrie bilatérale) en juvéniles benthiques (symétrie latérale) nécessite beaucoup d'énergie et peut également entraîner une diminution voire un arrêt de la croissance en longueur (Geffen *et al.*, 2007). Dans les milieux tempérés et subpolaires,

les taux de croissance varient selon la saison, avec le plus souvent une alternance de périodes de croissance rapide en été et lente en hiver (Wootton, 1998).

Une autre caractéristique fondamentale de la croissance des poissons est d'être flexible. Ainsi, quand les conditions environnementales rencontrées dans son milieu présentent une forte hétérogénéité spatiale et temporelle, une même espèce peut répondre à ces variations par différentes stratégies de croissance dont les ajustements peuvent se faire selon deux grands processus (Stearns, 1989): (1) la plasticité phénotypique, qui permet une réponse adaptative aux changements environnementaux au cours de la vie d'un individu par des changements physiologiques et comportementaux; et (2) l'adaptation génétique, qui permet à un génotype d'être mieux adapté aux changements environnementaux que les autres et qui permet à leur descendance de représenter une proportion supérieure dans les générations successives. La plasticité phénotypique comprend les modifications phénotypiques produites par un génotype donné en réponse aux changements des conditions du milieu (normes de réaction) et les changements épigénétiques transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne provoquant pas de changement génotypique au sein de la population (Pigliucci, 2005). Elle peut être considérée comme une réponse tactique individuelle aux fluctuations des conditions du milieu (*i.e.*, acclimatation) (Wootton, 1998). L'adaptation génétique, quant à elle, cause des changements de fréquences allélique et génotypique dans la population et représente une réponse évolutive. Il s'agit d'une réponse stratégique observable à l'échelle de la

population (considérée ici comme un pool génétique), mais guidée par des différences adaptatives entre les individus (Falconer et Mackay, 1996).

Comme tous les ectothermes, les poissons ne sont pas capables de réguler eux-mêmes leur température ce qui rend leur développement extrêmement dépendant des conditions du milieu. Les facteurs déterminant la vitesse de croissance d'un poisson peuvent être divisés en facteurs exogènes (imposés par l'environnement) et endogènes (reliés au génotype et à la condition physiologique du poisson) (Wootton, 1998). Parmi les facteurs environnementaux (ou encore: "abiotiques"), on distingue particulièrement la température, la lumière, la salinité et l'oxygène. Pour les facteurs d'ordre biologique (ou "biotiques"), on considère surtout la ration alimentaire (qualité et quantité), le stade de développement (*i.e.*, la taille) et les interactions sociales avec les congénères (*i.e.*, compétition) (Brett, 1979). De plus, la croissance d'un individu est contrôlée intrinsèquement par des mécanismes de régulation impliquant le système neuroendocrinien qui sont déterminés génétiquement (Wootton, 1998).

Les indicateurs biochimiques de croissance

D'une façon générale, la mesure de la croissance en longueur quantifie la croissance axiale alors que la mesure de la croissance en poids quantifie la croissance en volume, ces deux mesures étant souvent corrélées (Wootton, 1998). À partir des mesures de poids et de longueur d'un poisson, il est également possible d'évaluer sa condition grâce au facteur de condition de Fulton qui renseigne sur l'état physiologique "général"

de l'individu en fonction du rapport de sa masse avec sa taille ($K = \text{masse} \cdot \text{longueur}^{-3} \times 100$) (Ricker, 1980). Il n'en reste pas moins que la croissance doit être considérée dans le cadre d'un bilan bioénergétique comme une augmentation du contenu énergétique d'un organisme (Jobling, 1994). Historiquement, la croissance pondérale des poissons a souvent été mesurée en termes de gain de poids en supposant que la composition des tissus était constante et qu'un changement de poids devait refléter les changements en contenu énergétique de l'organisme. Cependant, il s'avère que la composition corporelle n'est pas constante au cours de la croissance et que les proportions relatives de protéines, de lipides, de sucres et d'eau vont varier avec l'alimentation et le stade de développement (Jobling, 1994).

Pendant les stades larvaires, des études ont démontré que l'énergie utilisée en période de jeûne provenait majoritairement du catabolisme des protéines (74%), suivi par celui des triglycérides (21%) et des sucres (glycogène, 5%) (Ehrlich, 1974, Buckley *et al.*, 1990, Ferron et Leggett, 1994). Les poissons étant constitués majoritairement de protéines, l'augmentation de biomasse se fait avant tout par la synthèse de protéines (Love, 1970) ce qui rend leur quantification essentielle dans l'étude de la croissance. Comme les protéines sont synthétisées à partir de l'ARN, le ratio protéines / ARN permet d'évaluer la capacité de synthèse protéique. Basé sur l'observation que la quantité d'ADN reste stable au sein d'une cellule et que c'est la quantité d'ARN (produit de la transcription de l'ADN) qui varie en fonction du statut physiologique, de la nécessité de synthèse protéique, et donc de la croissance, le ratio ARN / ADN s'avère un indicateur

biochimique permettant de mesurer précisément la croissance des jeunes poissons et leur réponse à des variations environnementales (Buckley *et al.*, 1999). Chez les larves, les triglycérides (TAG) sont aussi une source d'énergie importante rapidement utilisée en cas de courte période de jeûne comparativement aux stérols (ST) et autres lipides polaires constituant la membrane cellulaire, qui ne sont utilisés qu'en cas de stress sévère (Fraser *et al.*, 1988). Depuis l'amélioration des systèmes de mesure permettant la détection des faibles quantités présentes chez les larves, le rapport TAG / ST s'avère être un indice de condition renseignant précisément de l'évolution des réserves de lipides énergétiques lors du développement des jeunes stades d'organismes marins (Fraser, 1989, Parrish, 1999).

Les gradients géographiques

Chez les espèces ayant une grande distribution, les conditions environnementales rencontrées le long de leur aire de répartition varient selon certains gradients géographiques. Parmi ces gradients, les gradients latitudinaux de température et de longueur de saison sont ceux affectant le plus la dynamique de croissance des poissons (Belk *et al.*, 2005). Dans l'hémisphère nord, les individus vivant sous de hautes latitudes rencontrent généralement des températures plus froides et des périodes de croissance plus courtes que ceux vivant sous de plus basses latitudes, ce qui, *a priori*, limiterait leur croissance et donc le gain de taille obtenu chaque année (Conover, 1990). Puisque la sélection naturelle semble favoriser des individus de grande taille pour les avantages que cela procure (plus grande fécondité, meilleur succès reproducteur, faible risque de mortalité = augmentation du *fitness*) (Sogard, 1997, Yamashita *et al.*, 2001), les poissons

vivant sous de hautes latitudes se retrouvent confrontés à un défi. Ce défi s'avère particulièrement délicat à gérer pour les jeunes de l'année (0+) des régions septentrionales qui doivent affronter leur premier hiver (longue période à faible température) et se reflète par de nombreux cas de mortalité hivernale chez les 0+ de plusieurs espèces (Hunt, 1969, Oliver *et al.*, 1979, Toney et Coble, 1979).

La loi de Bergman, qui prédit des individus de plus grande taille aux latitudes élevées chez les espèces homéothermes, semble être applicable aux espèces ectothermes (Lindsay, 1966). Bien que ce gradient géographique semble simplement être la conséquence d'une variation de l'âge à la maturité, la loi de Bergman nous laisse suggérer que l'augmentation de la taille avec la latitude serait adaptative (Mayr, 1963). Cependant, à l'époque, peu d'études sur les variations de croissance individuelle au sein des populations avaient été réalisées car il était admis que la sélection favoriserait systématiquement les organismes de grande taille (Schultz *et al.*, 1996). Des travaux récents ont démontré que les variations de taux de croissance individuels sont assez répandues chez les populations septentrionales poïkilothermes (Conover, 1990, Belk *et al.*, 2005). On observe généralement chez les populations de hautes latitudes de plus hauts taux métaboliques que chez celles de basses latitudes pour une température identique (revue dans Cossins et Bowler, 1987).

En 1983, Levinton proposait la théorie de "l'adaptation thermique" et expliquait que les variations génétiques des taux de croissance le long de ce gradient latitudinal

résultaient d'une adaptation aux différents régimes locaux de température. Ainsi, d'après Levinton, les organismes devraient présenter un taux de croissance maximal aux températures similaires à leur environnement d'origine. Par la suite, Conover (1990) a proposé un modèle d'adaptation aux courtes périodes de croissance plutôt qu'aux basses températures, qui serait caractérisé par une variation à contre gradient de la croissance. L'évolution vers cette variation à contre gradient serait caractérisée par des taux de croissance supérieurs dans les environnements ayant un fort effet négatif sur la croissance. Cette théorie s'est développée à la suite d'observations réalisées sur de nombreux poissons de milieux tempérés subissant des périodes de croissance de longueur variable le long de leur aire de répartition et dont la taille à la fin de la première période de croissance ne diffère pas d'une population à l'autre (Conover, 1990). Les espèces des hautes latitudes se seraient adaptées aux courtes saisons de croissance en développant des processus biologiques plus performants, ce qui augmenterait leur *fitness*. A l'heure actuelle, la corrélation positive entre la croissance et la latitude, indiquant une variation de la croissance à contre gradient, a été mise en évidence chez de nombreuses espèces de poissons d'Amérique du Nord, comme par exemple chez le bar rayé *Morone saxatilis*, W., l'alose savoureuse *Alosa sapidissima*, L., la capucette *Menidia menidia*, L. ou encore le choquemort *Fundulus heteroclitus*, L. (Conover, 1990, Present et Conover, 1992, Schultz *et al.*, 1996, Conover *et al.*, 1997). Ces phénomènes de compensation latitudinale pourraient être une norme de réaction transmissible de leur plasticité phénotypique, ce qui constituerait alors une adaptation génétique liée à l'action prolongée de la sélection naturelle (*i.e.*, réponse évolutive).

Impacts sur la structure des populations

La question de l'adaptation génétique à un type d'habitat dénote une certaine idée de ségrégation. En effet, les conditions environnementales qui diffèrent d'une région à l'autre peuvent engendrer d'importantes différences phénotypiques qui peuvent alors représenter de véritables barrières biologiques si elles rendent impossible les échanges d'individus entre les groupes de ces différentes régions (*e.g.*, désynchronisation des périodes de reproduction) (Begg et Waldman, 1999). Ces différents groupes constituent alors de véritables sous-populations qui, dans le cadre des programmes de gestion des ressources naturelles, sont souvent considérées comme étant des "stocks". Néanmoins, un stock peut être composé d'une ou plusieurs sous-populations. Ainsi, la définition des stocks est fondamentale pour mieux comprendre la dynamique des populations et permettre une gestion appropriée de la ressource (quotas de pêche, protection des zones de reproduction, *etc.*). Cependant, la définition d'un stock est soumise à de nombreux débats portant sur l'importance des facteurs génétiques et phénotypiques (Begg *et al.*, 1999).

Un stock de poisson peut être défini comme étant un ensemble d'individus de la même espèce habitant une aire géographique donnée. Bien que cela ne soit pas une condition, les individus d'un stock peuvent présenter des différences génétiques par rapport à ceux des autres stocks en conséquence de leur adaptation (MacLean et Evans, 1981). Cependant, l'identification des stocks se fait plus souvent en fonction de caractères phénotypiques que par la mesure directe des différences génétiques (Swain et

Foote, 1999). Un stock peut donc exhiber un ou plusieurs traits d'histoire de vie différents comparés aux autres stocks de la même espèce. Comme leur évaluation reste simple, ces différences sont depuis longtemps utilisées comme base pour l'identification des stocks. En plus des critères morphologiques et méristiques, les caractéristiques les plus étudiées sont la croissance, la survie, l'âge à la maturité et la distribution géographique (Ihssen *et al.*, 1981), car ils représentent l'expression phénotypique des interactions entre les influences environnementales et génotypiques (Begg *et al.*, 1999). L'identification de traits d'histoire de vie différents démontrant un isolement géographique ou reproducteur d'une sous-population permet alors une gestion plus adaptée de ce stock (Ihssen *et al.*, 1981).

Il existe deux méthodes pour mesurer les composantes génétiques et environnementales dans une réponse phénotypique à une différence d'habitats (Present et Conover, 1992): (1) l'expérience en environnement similaire, qui consiste à élever des représentants de chaque origine dans un environnement identique et contrôlé; et (2) l'expérience de transferts réciproques, où les représentants de chaque origine sont élevés dans chacun des environnements des autres origines comparées. L'expérience en environnement commun est la plus adaptée pour mesurer les normes de réaction à la variation du paramètre environnemental suspecté d'avoir la plus forte influence sur le caractère étudié, la seconde approche étant plus adaptée pour mesurer les réponses phénotypiques de différents géotypes face à diverses conditions environnementales. La

seconde approche nécessite toutefois des précautions particulières afin de prévenir l'introduction d'individus exogènes dans la nature.

Rôle de la photopériode

Parmi les facteurs abiotiques, bien qu'il soit difficile de discriminer les effets des variations de la température et de la photopériode de par le fait que ces deux facteurs suivent souvent les mêmes cycles saisonniers, la photopériode apparaît comme un facteur primordial dans la synchronisation des processus de croissance. En effet, la photopériode est considérée comme un facteur directionnel (Brett, 1979, Björnsson *et al.*, 2000) qui contrôle la croissance en agissant sur les rythmes endogènes du système neuroendocrinien (Boeuf et Le Bail, 1999). La plupart des poissons ont un rythme circadien proche de 24 heures, un rythme circannuel de un an, et sont capables de prédire et d'anticiper les changements environnementaux (Falcón *et al.*, 2007). La principale hormone impliquée dans la régulation des rythmes chronobiologiques est la mélatonine. Synthétisée à partir de la sérotonine, elle est sécrétée par la glande pinéale en réponse à l'absence de lumière. Chez les poissons, la mélatonine est impliquée dans la régulation de processus physiologiques annuels comme la croissance, la reproduction ou la smoltification chez les salmonidés, mais aussi dans de nombreux processus quotidiens comme la nage, la nutrition, les migrations verticales, l'osmorégulation et le métabolisme (revue dans Falcón *et al.*, 2007). La photopériode est principalement connue pour stimuler la sécrétion hypophysaire de l'hormone de croissance (GH, pour "*Growth Hormone*") qui est impliquée dans de nombreux processus anaboliques (*i.e.*, de synthèse)

(Björnsson, 1997, Boeuf et Le Bail, 1999). En règle générale, les effets biologiques peuvent résulter d'un changement de photopériode, où la vitesse et la direction du changement jouent un rôle important (effet différentiel), ou juste de la durée quotidienne d'exposition à la lumière (effet proportionnel) (Clarke *et al.*, 1978, Eriksson et Lundqvist, 1980). On observe le plus souvent une augmentation de la consommation de nourriture, du métabolisme et donc de la croissance au cours des périodes d'augmentation de la photopériode (*e.g.*, printemps) (Boehlert, 1981, Woiwode et Adelman, 1991). Cependant, les études portant sur l'influence de la lumière sur la croissance des poissons sont souvent complexes et confuses tant les voies par lesquelles la lumière peut agir sont multiples (*e.g.*, qualité, quantité, périodicité) (Boeuf et Le Bail, 1999).

Rôle des parents

Comme les processus de croissance présentent un fort déterminisme génétique, les parents contribuent à la croissance de leur descendance principalement par la transmission de leurs gènes, résultat de leur évolution. Cependant, chez les poissons, les mères apportent une contribution supplémentaire au bon déroulement des premiers stades de développement car la qualité des ovocytes (communément appelés "œufs") qu'elles produisent détermine le succès du développement précoce de leur descendance (Kjørsvik *et al.*, 1990). En effet, entre la fécondation et le début de l'alimentation exogène des larves (résorption du sac vitellin), le vitellus constitue la seule réserve d'énergie disponible pour réaliser les processus de croissance. Parmi les facteurs inhérents à la mère, il a été démontré que son âge, son alimentation, sa condition physiologique et son

statut hormonal au moment de la synthèse des œufs jouaient un rôle décisif dans la qualité du vitellus et donc dans la survie de sa descendance (Kjørsvik *et al.*, 1990, Brooks *et al.*, 1997). La capacité à observer des effets paternels pendant les jeunes stades de développement a longtemps été diminuée par le fait que les chercheurs utilisaient des mélanges de sperme de plusieurs mâles pour féconder les œufs (Rideout *et al.*, 2004, Kamler, 2005). Cependant, de récentes avancées technologiques ont permis la mise en relation de la qualité des spermatozoïdes (*e.g.*, concentration, taille, vigueur, motilité) avec certains traits d'histoire de vie précoce (*e.g.*, taux de fécondation, taille à l'éclosion) (Evans et Geffen, 1998, Trippel, 2003). Dans la dernière décennie, les études visant à évaluer la contribution paternelle dans la dynamique de croissance des jeunes stades se sont multipliées et soulignent majoritairement que les effets paternels jouent un rôle important dans le déterminisme du potentiel de croissance (*e.g.*, Bang *et al.*, 2006, Lister et Neff, 2006, Butts et Litvak, 2007a). Cependant, pour les poissons marins, peu d'études des effets paternels ont été réalisées sur des juvéniles (voir la revue de littérature présentée dans le second chapitre de cette thèse), alors qu'à cette étape les effets initiaux engendrés par la qualité du vitellus sont rendus négligeables, laissant autant la place au génome issu du père de s'exprimer qu'à celui issu de la mère (Kamler, 2005).

La plie rouge

Généralités

Avec ses deux yeux du côté droit, la plie rouge *Pseudopleuronectes americanus* W. (Figure 1) est un poisson plat marin de la famille des Pleuronectidés (Cl: Actinoptérygiens, O: Pleuronectiformes) que l'on retrouve dans les eaux littorales de l'Atlantique Nord-Ouest, du sud du Labrador (Canada, ~53°N) au nord de la Géorgie (États-Unis, ~33°N) (Scott et Scott, 1988) (Figure 2). Poisson côtier sédentaire, la plie rouge se retrouve généralement dans des eaux d'une profondeur inférieure à 40 m sur des substrats vaseux ou sableux lui permettant de s'enfouir (protection contre les prédateurs, stratégie de chasse) (McCraken, 1963, Scott et Scott, 1988). Véritable omnivore opportuniste, la plie rouge est capable de se nourrir de pratiquement tout ce qu'elle trouve dans le compartiment benthique, comme des mollusques (siphons de *Mya arenaria* L.), des polychètes (*Nereis virens* S.), des copépodes (*Gammarus* sp.), ou encore des crustacés, des algues, ou des œufs d'autres espèces (capelan *Mallotus villosus* M., hareng *Clupea harengus* L.) (Wells *et al.*, 1973, Langton et Bowman, 1981, Vaillancourt *et al.*, 1985, Coad, 1993). Espèce eurythermique (-1,9°C à 23°C) et euryhaline (salinité de 3 à 40), les plies rouges sont capables de s'adapter aux différents environnements nécessaires à l'accomplissement de leur cycle vital (Pereira *et al.*, 1999). Les plies rouges vivent généralement jusqu'à 15 ans et mesurent en moyenne 58 cm, mais peuvent atteindre près de 70 cm (Pereira *et al.*, 1999).

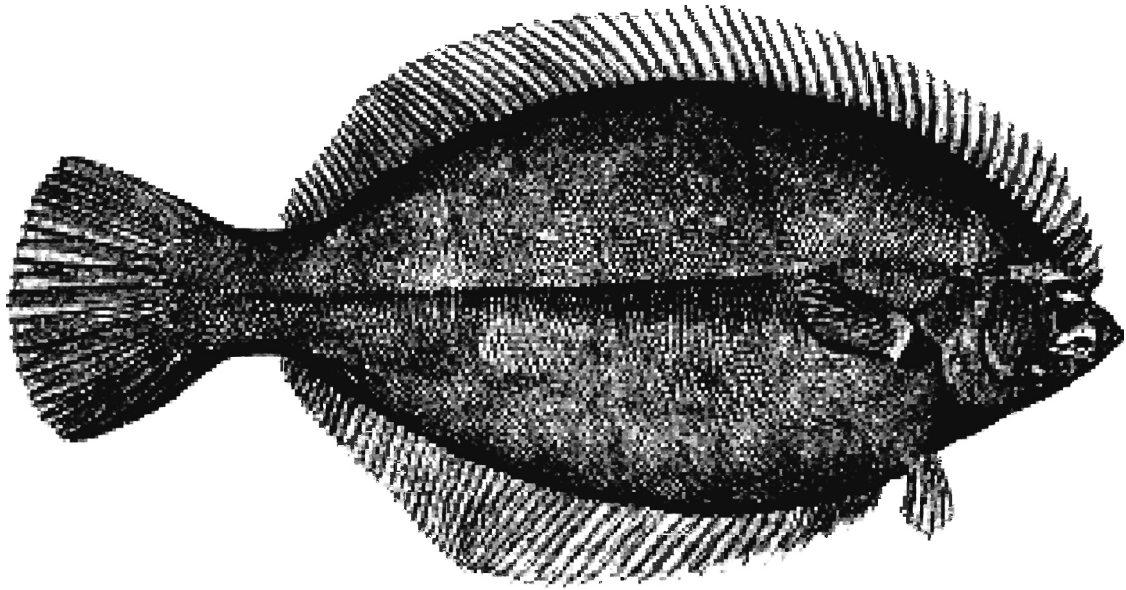


Figure 1. Illustration d'une plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) adulte (tiré de Nitschke *et al.*, 2000).

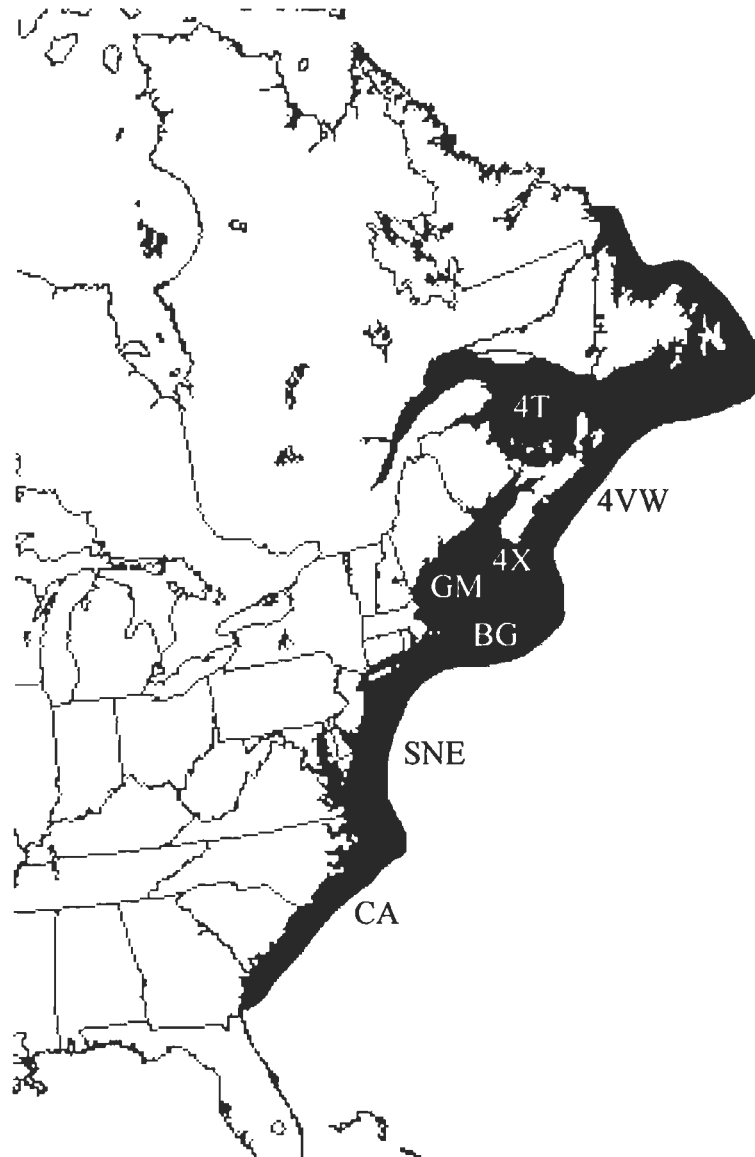


Figure 2. Illustration de l'aire de répartition de la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) le long des côtes de l'Atlantique Nord-Ouest (réalisé d'après Scott et Scott, 1988) et définition actuelle des stocks: 4T, sud du Golfe du Saint-Laurent; 4VW, plateau écossais; 4X, baie de Fundy banc Browns; GM, Golfe du Maine; BG, Banc Georges; SNE, Sud Nouvelle-Angleterre; CA, centre Atlantique (d'après DeCelles et Cadrin, 2007).

Traits d'histoire de vie

La biologie de la plie rouge est étroitement liée à la recherche d'un habitat adapté aux différentes étapes de son cycle vital. Les adultes matures vivant plus au large durant l'année effectuent une courte migration vers le littoral à la fin de l'hiver pour venir se reproduire dans des baies ou des estuaires à fonds sableux et peu profonds (6-15 m) (Pereira *et al.*, 1999) (Figure 3). Cette migration est initiée en fonction de la température, des ressources trophiques et de l'état de maturation des gonades (Van Guelpen et Davis, 1979). La reproduction est étroitement liée aux conditions environnementales, et si les plies jugent les conditions mauvaises, elles sont capables de sacrifier cette étape au profit du maintien de leur condition (Tyler et Dunn, 1976, Burton et Idler, 1987).

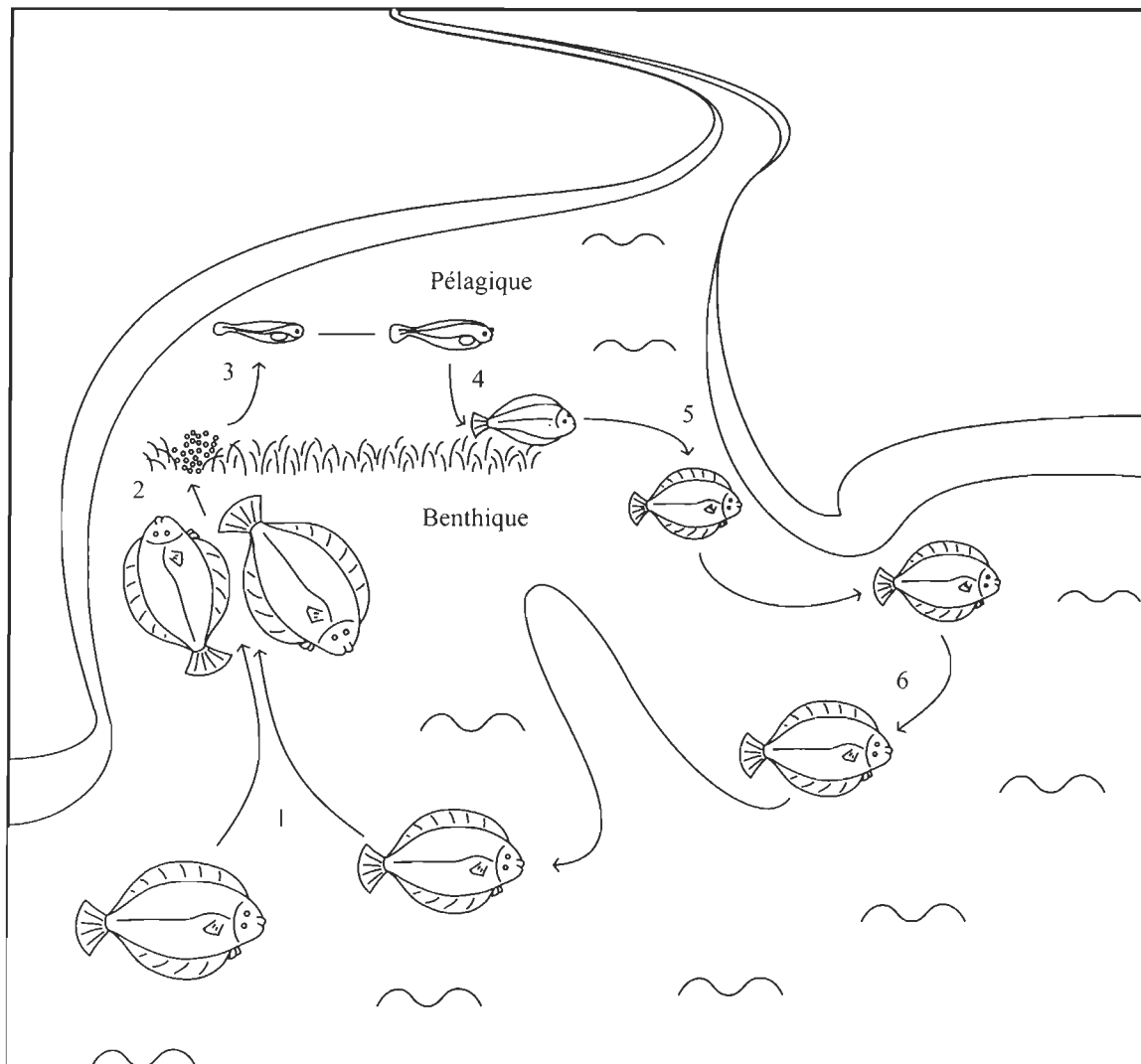


Figure 3. Illustration du cycle vital de la plie rouge. (1) migration côtière, (2) fécondation, (3) éclosion, (4) déposition, (5) premier hiver, (6) maturation (d'après Pereira *et al.*, 1999).

Afin d'assurer un bon succès reproducteur, les plies rouges pondent de nombreux petits œufs, 500 000 en moyenne (Scott et Scott, 1988), d'environ 800 μm de diamètre (Smigielski et Arnold, 1972) qui une fois fécondés vont se déposer sur le substrat (roche,

sable, végétaux) et y adhérer en formant de petits amas (Batt, 1998, Solbakken et Pittman, 2004) (Figure 3). L'éclosion intervient après un mois d'incubation et les larves, alors pélagiques, ne mesurent que 2,4 à 3,2 mm (Figure 3). Cinq jours après l'éclosion, les yeux sont déjà pigmentés et la bouche s'ouvre, ce qui permet aux larves de chasser activement le zooplancton (Laroche, 1981, Batt, 1998). Après avoir atteint une taille de 7-8 mm, soit après environ 1 mois de développement pélagique selon la température du milieu ambiant (Litvak, 1996, Batt, 1998), les larves entament une importante métamorphose associée à leur déposition (*i.e.*, transition d'un mode vie pélagique à un mode de vie benthique) (Bishop *et al.*, 2006, Geffen *et al.*, 2007) (Figure 3). À ce moment, les larves vont changer de symétrie (*e.g.*, rotation du crâne, migration de l'œil gauche, aplatissement) et réorganiser leur tractus digestif (*e.g.*, formation de *cæca* pyloriques, involution hépato-pancréatique) en prévision de leur future vie benthique (*e.g.*, locomotion, nutrition) (Ballard *et al.*, 1987, Tanaka *et al.*, 1996, Yamashita *et al.*, 2001).

Dans les régions septentrionales, la reproduction a lieu au printemps (mai – juin), ce qui permet aux larves nouvellement écloses de pouvoir profiter rapidement de conditions optimales pour leur développement (*e.g.*, nourriture abondante, température élevée, photopériode longue). La métamorphose intervient généralement au début de l'été (juillet) et les larves nouvellement déposées ("juvéniles") cherchent alors le substrat le plus adapté à leur développement (protection, nutrition), leurs sites de déposition ne semblant pas correspondre aux zones utilisées par les juvéniles plus tard (Curran et Able,

2002). A l'automne, les plies adultes retournent en mer pour reprendre leur gamétogenèse alors que les juvéniles semblent rester dans des eaux moins profondes (Scott et Scott, 1988) (Figure 3). Pendant l'hiver, les plies sont confrontées à des températures avoisinant les 0°C, ce qui diminue leur activité. La qualité et la quantité des réserves accumulées avant l'hiver jouent donc un rôle décisif pour survivre en hiver, surtout pour les jeunes de l'année qui y sont confrontés pour la première fois (Sogard, 1997). Les juvéniles passent alors les années suivantes le long du littoral jusqu'à la maturité sexuelle (Figure 3) qui est atteinte en fonction de la taille des individus (20 cm en général) et intervient généralement après 3 à 6 ans selon la population étudiée (Pereira *et al.*, 1999).

La résistance au froid

Les plies rouges ont l'extraordinaire capacité de survivre dans des eaux glacées grâce à la production de différentes protéines antigel inhibant la progression des cristaux de glace dans leurs tissus (Percy, 1961, Duman et Devries, 1974, Fletcher, 1977) et provoquant un abaissement non colligatif du point de congélation de leur plasma (initialement à -0,7°C) (Ewart et Hew, 2002). La plie rouge synthétise différentes protéines antigel (AFP, pour "*antifreeze proteins*") grâce à une large famille de gènes dont 40 copies peuvent être présentes dans tout le génome (Fletcher *et al.*, 2001); un nombre plus important de copie de ces gènes procurant une plus grande résistance au gel. Jusqu'ici, la forme la plus connue de protéine antigel est la forme sérique (AFP-I) produite par le foie (Duman et Devries, 1974, Harding *et al.*, 1999). Récemment, une nouvelle protéine antigel sérique a été isolée (Marshall *et al.*, 2004) et semble provoquer

une hystérèse thermique nettement supérieure (1,2°C) à celle provoquée par l'AFP-I seule (0,7°C) pour des concentrations 50 fois inférieures (Marshall *et al.*, 2004, Gauthier *et al.*, 2005). Dénommée "HYP TYPE I" (pour "*hyperactive AFP Type I*") (Graham *et al.*, 2008), cette protéine antigel illustre parfaitement la réelle capacité que possède la plie rouge à vivre dans des eaux allant jusqu'à -1,9°C (température de congélation de l'eau de mer).

Cependant, survivre au froid pendant l'hiver n'est pas sans conséquences sur la croissance. En effet, la production de protéines antigel est régulée négativement par la GH dont la concentration varie selon la photopériode et la température (régulation hypophysaire) (Idler *et al.*, 1989). Ainsi, pendant l'hiver, la production de protéines antigel est déclenchée à la suite de la diminution de la concentration en GH, mais cette diminution entraîne également un ralentissement voire un arrêt de la croissance (Fletcher *et al.*, 2001). On comprend donc que les populations de plie rouge qui ont dû s'adapter aux différentes conditions environnementales rencontrées dans leur aire de répartition (durée de l'hiver, températures minimales) puissent présenter des activités antigel différentes selon le risque encouru dans leur habitat d'origine. Par exemple, en 1985, l'équipe du professeur G. Fletcher a démontré que les plies vivant dans les eaux peu profondes de la baie de Shinnecock (New-York, É.U.) produisaient plus et plus tôt des protéines antigel que celles vivant dans les eaux profondes de la baie de Passamaquoddy (Nouveau-Brunswick, Canada), ce qui correspond bien à la réalité du risque de gel qui est supérieur dans des eaux proches de la surface (Fletcher *et al.*, 1985). De plus, ces

différences semblent persister lorsque les différentes populations sont élevées dans un environnement commun (Fletcher et Smith, 1980).

Les populations de plie rouge

Historiquement, les plies rouges ont été séparées, à l'initiative des États-Unis, en trois grands stocks représentatifs des populations présentes sur leur territoire (Brown et Gabriel, 1998): le premier au nord de Cap Cod (Massachusetts, É.U.) (Golfe du Maine), le second au sud (sud Nouvelle-Angleterre et centre Atlantique), et le troisième sur le banc Georges (Pereira *et al.*, 1999, DeCelles et Cadrin, 2007) (Figure 2). Cette différenciation s'est faite suivant le nombre de rayons de nageoire et les profils de migration (Lux *et al.*, 1970, Pierce et Howe, 1977, Fairchild et Howell, 2001). Une attention particulière a été apportée à la population du banc Georges qui est la seule exclusivement hauturière. Les plies rouges du banc Georges ont une croissance nettement supérieure à celles des autres stocks et présentent une formule méristique et un profil de migration différents qui seraient imputables à la température de leur région océanique (Lux *et al.*, 1970, Lux, 1973).

Au Canada, les ressources en plies rouges sont gérées depuis le milieu des années 1990 d'après les patrons de distribution géographique observés lors de missions scientifiques estivales sur le plateau écossais (Stobo *et al.*, 1997) et dans le sud du golfe du Saint-Laurent (Morin *et al.*, 2002). Espèce difficilement différenciable lors des débarquements, la plie rouge est confondue avec la limande à queue jaune *Limanda*

ferruginea S. et la plie canadienne *Hippoglossoides platessoides* F. et elles sont toutes les trois gérées selon trois divisions de l'Organisation des pêches de l'Atlantique Nord-Ouest (OPANO) (Figure 2): celle du banc Browns, de la baie Sainte-Marie et de la baie de Fundy (Div. 4X), celle du plateau écossais (Div. 4VW) et celle du sud du golfe du Saint-Laurent (Div. 4T) (DeCelles et Cadrin, 2007).

Les populations canadiennes restent cependant très peu caractérisées alors que certains chercheurs ont depuis longtemps suggéré qu'il pourrait y avoir différents stocks qui seraient caractérisés par des âges à la maturité (Kennedy et Steele, 1971) ou des habitudes de migrations différentes (McCraken, 1963, Van Guelpen et Davis, 1979). Quelques études ont montré que certains traits d'histoire de vie différaient d'une population à une autre et pouvaient constituer des indicateurs de la présence de différents stocks. Au moins deux populations de plie rouge semblent exister dans l'ouest du plateau écossais (Div. 4X). McClelland *et al.* (2005) rapportèrent que les plies du banc Browns possèdent des microsatellites et des parasites différents de celles de la baie Sainte-Marie. De plus, Hayes *et al.* (1991) ont noté des différences dans l'expression et le nombre de copies du gène codant pour l'AFP-I entre les plies du banc Browns et celles du fond de la baie de Fundy. Dans l'est du plateau écossais, la population de plie rouge du banc de l'île de Sable (Div. 4VW), qui est isolée géographiquement, possède des parasites différents de celles du sud du golfe du Saint-Laurent (Div. 4T) et du banc Browns (Div. 4X) et semble génétiquement distincte de toutes les autres populations canadiennes (McClelland *et al.*, 2005). Les plies du sud du golfe du Saint-Laurent sont également isolées

géographiquement de celles de l'est du plateau écossais et présentent des assemblages de parasites et des microsattellites différents de ceux des autres populations.

Vaillancourt *et al.* (1985) ont rapporté qu'au Canada, les plies de l'estuaire du Saint-Laurent (Québec) et de Long-Pond (Terre-Neuve) présentaient des croissances plus lentes et une taille maximale inférieure à celles de Nouvelle-Angleterre et du banc Georges (É.-U.). Ils ont toutefois souligné que les populations de Long Pond et de l'estuaire présentaient des croissances et des tailles similaires alors que la période d'alimentation semblait plus courte au niveau de l'estuaire. Chambers *et al.* (1995) ont démontré numériquement que les juvéniles de la baie de Passamaquoddy (Canada) présentaient une croissance à l'âge d'un an nettement inférieure à ceux du New-Jersey (É.-U.) (4,4 cm contre 10,5 cm) mais présentaient des taux de survie supérieurs. Plus récemment, Butts et Litvak (2007a, b) ont démontré à l'aide d'expériences en conditions identiques que les plies rouges de la baie de Passamaquoddy présentaient une croissance larvaire inférieure à celles du banc Georges. De plus, en croisant des femelles de la baie de Passamaquoddy avec des mâles des deux origines, ils ont démontré la présence d'effets paternels sur des caractères morphologiques comme la taille de la mâchoire et de la tête, et dans le potentiel de développement (taux de fécondation, âge à l'éclosion). Ces différents travaux laissent penser que l'étude de certains traits d'histoire de vie comme la croissance pendant les jeunes stades de développement ou le potentiel de résistance au gel permettrait de distinguer plus précisément certaines populations de l'est du Canada.

Le défi aquacole

Au Canada, la pisciculture est essentiellement basée sur l'élevage de salmonidés (e.g., saumon Atlantique *Salmo salar* L., saumon Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* W., truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* W.); le saumon Atlantique représentant environ 85% de la production. En plus de l'augmentation de la concurrence mondiale qui réduit le prix de vente, l'élevage du saumon Atlantique rencontre de nombreux problèmes de mortalités liés aux froids hivernaux (King *et al.*, 1989, Page et Robinson, 1992) ou aux différentes épizooties (Hogans, 1995, Getchell, 1998), entraînant une baisse significative de la production et des profits (Litvak, 1999). Alors que les stocks sauvages de poissons marins sont pour la plupart sur le déclin, certaines espèces font l'objet d'activité de recherche et de développement afin de diversifier la production maricole au Canada, comme par exemple la morue franche *Gadus morhua* L., l'aiglefin *Melanogrammus aeglefinus* L., le loup tacheté *Anarhichas minor* O., ou encore le flétan Atlantique *Hippoglossus hippoglossus* L. (Vaillancourt, 2008).

Grâce à ses capacités de croissance dans des conditions variées et son extraordinaire résistance au gel, la plie rouge s'avère également être une espèce prometteuse pour la diversification de l'aquaculture dans de nombreuses régions d'Amérique du Nord et particulièrement dans l'Est du Canada (Litvak, 1996, 1999, Plante *et al.*, 2002). En effet, il s'avère nécessaire de développer une espèce adaptée aux conditions locales tolérant les eaux froides à salinité variable et pouvant s'y développer

avec une croissance suffisante pour arriver rapidement sur les marchés (Litvak, 1999). De plus, la constatation du récent déclin des ressources naturelles de plie rouge du plateau écossais (Brown et Gabriel, 1998) ou du sud du golfe du Saint-Laurent (Morin *et al.*, 2002) ne fait qu'appuyer la nécessité de développer localement la production de cette espèce.

Le développement d'un élevage nécessite cependant la maîtrise des principales étapes du cycle vital en captivité. Au Canada, des travaux ont permis de maîtriser la gestion des géniteurs (nutrition, stress; Plante *et al.*, 2002, Plante *et al.*, 2003) et leur reproduction (induction hormonale, cryopréservation du sperme; Smigielski et Arnold, 1972, Rideout *et al.*, 2003). La phase larvaire a aussi bénéficié d'avancées notables relatives à la nutrition (Ben Khemis *et al.*, 2000, Ben Khemis *et al.*, 2003, Mercier *et al.*, 2004). Cependant, malgré le fait que différentes études aient permis des avancées sur l'élevage des stades post-métamorphiques (type de bassin, nutrition; Lee et Litvak, 1996, de Montgolfier *et al.*, 2005), l'élevage des jeunes juvéniles se heurte encore à des épisodes de mortalité au cours des mois suivant la déposition. En effet, la métamorphose représente une difficile épreuve physiologique (Chambers *et al.*, 2001, Geffen *et al.*, 2007) et le fait qu'elle intervienne au milieu de l'été au Canada ne laisse que peu de temps aux juvéniles pour croître suffisamment avant l'arrivée des conditions hivernales qui entraînent souvent de forte mortalités (Sogard, 1997). L'optimisation de l'élevage des juvéniles pendant leur première année de vie représente un défi majeur qu'il est

nécessaire de réussir avant d'envisager le développement de la production de cette espèce à une plus grande échelle.

Hypothèses et objectifs de cette thèse

Pour cette étude, nous avons ciblé trois populations de plie rouge considérées comme isolées les unes des autres et soumises à des différences saisonnières de conditions environnementales pouvant amener à des stratégies d'histoire de vie différentes: celle de la baie de Passamaquoddy (Nouveau-Brunswick – BP), celle de la baie des Chaleurs (Québec – BC) et celle de l'estuaire maritime du Saint-Laurent (Québec – ES). Les conditions environnementales caractéristiques de chaque région sont détaillées dans le premier chapitre de cette thèse et résumées à la Figure 4.

Partant de l'hypothèse que chaque population possède une stratégie de croissance adaptée à son habitat qui soit héritable, notre objectif principal consistait à évaluer le potentiel de croissance des jeunes stades de ces trois populations dans des conditions ayant de forts effets négatifs sur la croissance (courte période de croissance, long hiver froid) et d'y évaluer l'implication d'effets paternels. Toutes nos expériences ont donc été réalisées dans les conditions de température et de salinité de l'estuaire maritime du Saint-Laurent à la station aquicole de Pointe-au-Père (ISMER-UQAR).

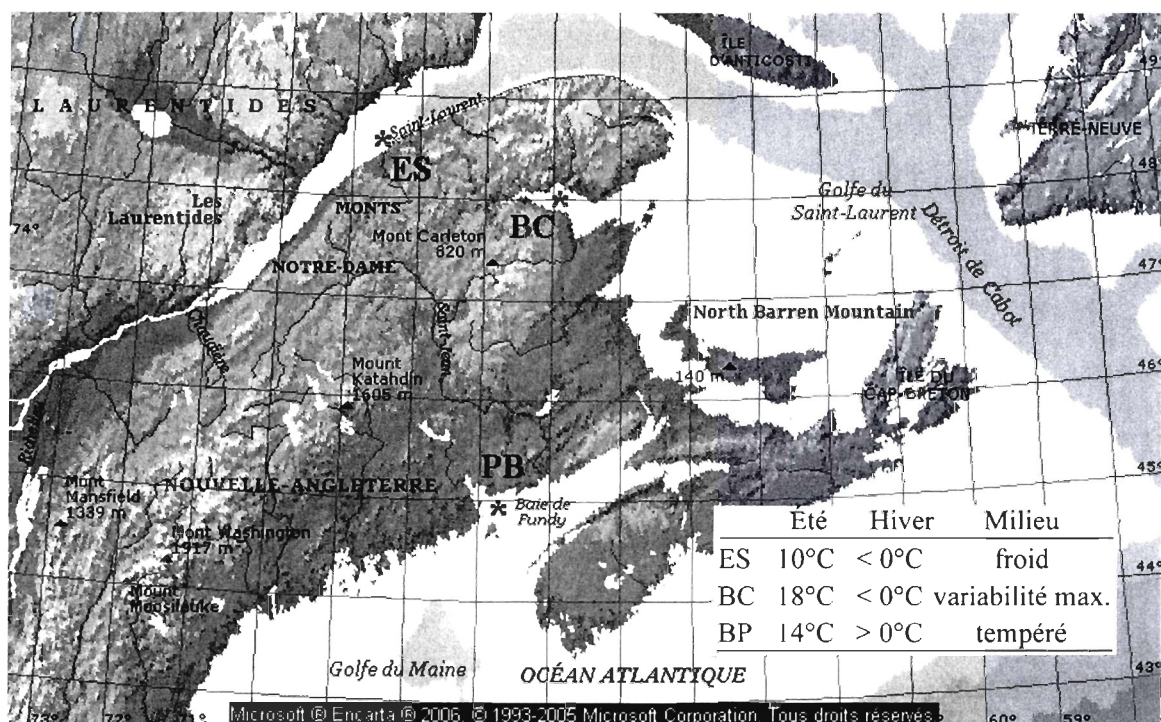


Figure 4. Origine géographique des trois populations sélectionnées. ES: estuaire maritime du Saint-Laurent (Sainte-Luce, Québec), BC: baie des Chaleurs (Carleton, Québec), BP: baie de Passamaquoddy (Saint-Andrews, Nouveau-Brunswick). Les expériences se sont déroulées à la station aquicole de Pointe-au-Père (ES). Les températures moyennes estivales et hivernales illustrent les différences saisonnières rencontrées parmi les populations étudiées.

Parallèlement, l'objectif secondaire de ces travaux consistait à identifier une population présentant les qualités requises pour un élevage en conditions froides et à améliorer l'élevage des jeunes juvéniles.

Plus précisément, nous avons trois objectifs spécifiques, lesquels seront traités dans les trois chapitres de cette thèse.

Notre premier objectif était de déterminer si les larves de populations de plie rouge d'origines différentes soumises aux mêmes conditions expérimentales présentent des différences de croissance. Notre hypothèse de travail H_0 était: les larves de différentes populations ne présentent pas de croissance différente dans un milieu similaire.

Notre second objectif consistait à déterminer si l'origine du mâle intervient de manière significative dans le déterminisme de la croissance des jeunes stades (larves et juvéniles) dans des conditions similaires. Notre hypothèse de travail H_0 était: l'origine du mâle n'influence pas la croissance des larves et des juvéniles en conditions similaires.

Notre troisième objectif consistait à mesurer l'influence des conditions environnementales sur la prise alimentaire et les caractéristiques de croissance des juvéniles pendant leur premier hiver. Une série d'expériences a été réalisée dans le but d'évaluer les effets d'une photopériode longue associée à une température contrôlée pendant l'hiver sur la croissance des jeunes juvéniles. Notre hypothèse de travail H_0 était: l'utilisation d'une photopériode longue n'influence pas la stratégie hivernale de croissance des juvéniles de plie rouge.

Un objectif supplémentaire a pu être réalisé dans le cadre d'un cours du programme de doctorat en océanographie et sera présenté en annexe de cette thèse. Cet objectif consistait à déterminer si l'origine du mâle pouvait influencer le nombre de copies des gènes codant pour les principales protéines antigél sériques présentes chez les juvéniles de plie rouge. Notre hypothèse de travail H_0 était: l'origine du mâle n'influence pas le nombre de copies des gènes AFP.

* * *

CHAPITRE I. THE EFFECTS OF LATITUDINAL ORIGIN AND PATERNAL
CONTRIBUTION ON LARVAL GROWTH OF WINTER FLOUNDER IN A
NORTHERN ENVIRONMENT

EFFETS DE LA LATITUDE D'ORIGINE ET DE LA CONTRIBUTION
PATERNELLE DANS LA CROISSANCE LARVAIRE DE LA PLIE ROUGE EN
ENVIRONNEMENT NORDIQUE

I.1 INTRODUCTION

The study of life history traits is essential for understanding population ecology and dynamics, a species' response to exploitation, and the suitability of a given species for stocking or aquaculture (Weatherley and Gill, 1987). The most studied traits are growth, survival, age at maturity, fecundity, distribution and abundance (Ihssen *et al.*, 1981) – traits that represents a phenotypic expression of interactions between environmental and genotypic influences (Begg *et al.*, 1999). Even though the importance of genetic and phenotypic factors in stock identification is highly debated (Begg *et al.*, 1999), differences in life history traits are commonly used to assess stock structure. In ectotherms, the annual cycle is often partitioned into “growing” (summer) and “nongrowing” (winter) seasons, the lengths of these being inversely related over a latitudinal gradient (Conover, 1992).

For winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, one of the most studied fish in North America, the populations structure and dynamics of stocks in Canadian waters are still not very well known (Morin *et al.*, 2002, DeCelles and Cadrin, 2007). This species inhabits coastal waters from Georgia (~33°N) to Newfoundland and southern Labrador (~53°N) (Buckley, 1989). Three main stocks – one north of Cape Cod, Massachusetts, one south of it, and a third on Georges Bank – are usually distinguished according to movement patterns and differences in fin ray counts (Lux *et al.*, 1970,

Pierce and Howe, 1977, Pereira *et al.*, 1999). The southern stocks have received more attention than the northern one (Brown and Gabriel, 1998), though the latter has long been suspected to be composed of various smaller stocks (Kennedy and Steele, 1971, Van Guelpen and Davis, 1979).

Studies on parental contribution to early growth of fishes have usually focused on maternal effects, but recent works have shown that the paternal contribution during early development may be higher than previously expected. Paternal effects were detected during larval growth of masu salmon *Oncorhynchus masou* (Yamamoto and Reinhardt, 2003), European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Saillant *et al.*, 2001), Atlantic herring *Clupea harengus* L. (Bang *et al.*, 2006), and haddock *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.*, 2004, Probst *et al.*, 2006). Recently, Butts and Litvak (2007a, b) detected a paternal contribution during the larval stage of winter flounder (from fertilization to 28 days post-hatch [DPH]) for some morphological traits (*e.g.*, jaw length, head depth) and survival, but these contributions were principally expressed as parental interactions. By using populations from two locations from different latitudes (Passamaquoddy Bay, New Brunswick, and Georges Bank), they also demonstrated that larvae from their northern location (Passamaquoddy Bay) displayed slower growth than larvae from the southern location (Georges Bank).

Our objective was to determine whether the geographical origin of breeders influences larval growth strategy in a cold environment (*e.g.*, short growing season with low temperatures), with a special emphasis on paternal contribution. Wild winter flounder were captured at three locations along a latitudinal gradient within the northern area of distribution: Passamaquoddy Bay (PB); baie des Chaleurs (BC), which lies between New Brunswick and Quebec; and the St. Lawrence estuary (ES) in Quebec. We conducted two series of experiments in which we crossed these breeders to obtain pure-strain families (year 1) and hybrid families (year 2), and then compared larval growth performance under environmental conditions typical of the ES, the northernmost site of our study.

I.2 MATERIALS AND METHODS

Populations

The three studied populations encounter different seasonal temperature patterns (Figure 5). In the northernmost location (ES), surface water temperature is generally below 0°C for most of the winter (January until the end of March) and can rise to 12°C–13°C for a short period in the summer (July and August). Fish from this location were caught in Sainte-Luce, Quebec, (48°36'N, 68°17'W), and spawned in June. Temperature conditions in BC, in the western part of the Gulf of St. Lawrence, are quite similar to those encountered in ES during winter, but here we find the highest summer temperatures (18–19°C from June until the end of September) of the three locations. Fish from BC were caught between Carleton and Nash Creek, Quebec, (47°55'N, 66°00'W), and were the first to spawn (beginning of May). Water temperatures in the southernmost location (PB) in the Bay of Fundy rarely decrease below 0°C during winter, giving this zone the longest growing season (May through November), with maximal temperatures around 14–15°C at the end of the summer. Fish from PB were caught in the Ste. Croix estuary, New Brunswick, (45°07'N, 67°07'W), and started to spawn during the middle of May. Because larvae live in shallow coastal waters (Pereira *et al.*, 1999), sea-surface temperatures probably represent the temperatures experienced by larvae. From the hatching time and larval development duration for the three populations raised in our laboratory, we calculated the average temperatures in their respective natural habitats (data from Figure 5). We estimated that in the field, larvae would have been exposed to

$9.4 \pm 3.8^{\circ}\text{C}$ (BC), $8.1 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ (PB) and $8.5 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ (ES), which corresponds to the temperature experienced during larval rearing during the experiment ($8\text{-}10^{\circ}\text{C}$). All fish were caught in spring 2005 on their natural spawning grounds and were transferred to the Station aquicole de Pointe-au-Père, Quebec ($48^{\circ}31'\text{N}$, $68^{\circ}28'\text{W}$).

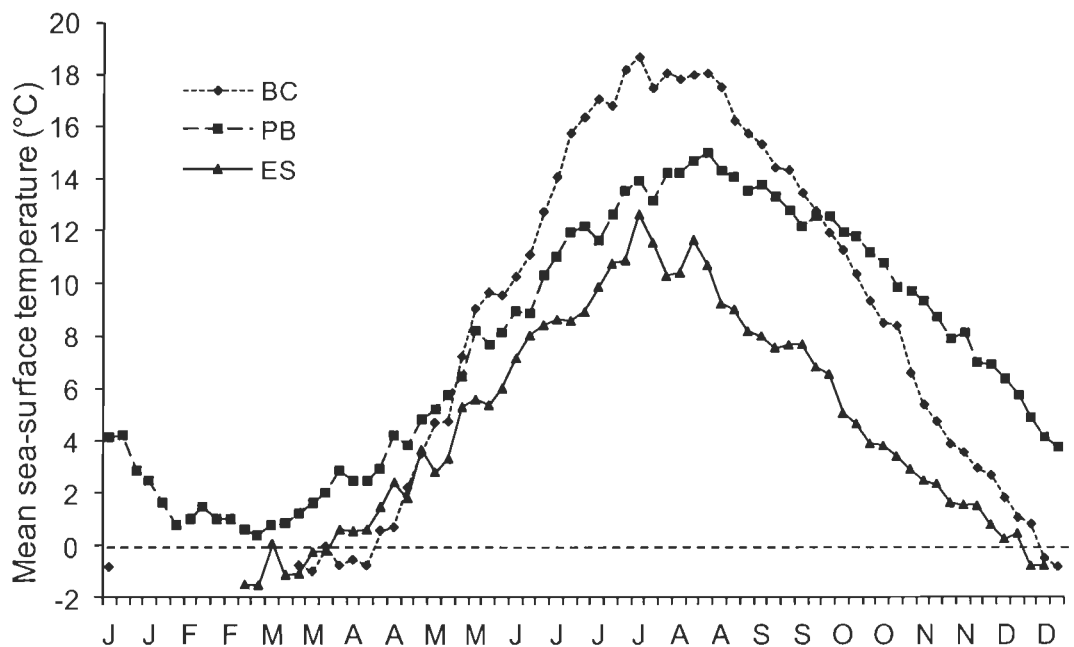


Figure 5. Mean sea surface temperature profiles for the three locations from which winter flounder were obtained: the St. Lawrence estuary (ES), Baie des Chaleurs (BC), and Passamaquoddy Bay (PB). Averaged data (5-d steps) were obtained from satellite measurements made from 2000 to 2005. Letters along the *x*-axis designate months.

Pure strain families

At the rearing facilities, fish from the different locations were kept under conditions characteristic of ES, in flowing ambient sea water (5 L/min), and under natural photoperiod. Flounder were fed daily with wet pellets at 1.5% of their biomass according to Plante *et al.* (2003). Females were checked daily for signs of ovulation (females received no hormonal stimulation). When a ripe female was detected, it was stripped, and the sperm of a male from the same population was used for fertilization by the protocol described in Ben Khemis *et al.* (2000).

Twelve female BC × male BC, 15 female PB × male PB and 11 female ES × male ES crosses were done during May and June (water temperature, 6–9°C). Males used for reproduction were weighed and measured (standard length [SL]). Females were weighed before and after spawning and then measured (SL). Families were raised separately and incubation temperature was recorded daily. Development time was measured in degree-days (DD) by adding the temperatures accumulated each day. For each family, a small subsample of eggs was sampled at 20 DD (*e.g.*, 4 days at 5°C) and stored in 2% formalin before being measured under a dissecting microscope. Measurements were made on 100 eggs per sample. The fertilization rate was calculated after 50 DD of incubation by counting the percentage of embryos in three subsamples of eggs (~100 eggs per subsample) under a dissecting microscope. Hatching rate was calculated by counting larvae and unhatched eggs in three subsamples of approximately 100 eggs sampled at 70 DD and held 1 d at room temperature in a clean Petri dish.

Hatching lasted 3 or 4 d; we defined day 0 as that corresponding to the hatching peak (0 DPH). For each family, all newly hatched larvae were randomly transferred into rearing tanks (cylindroconical polyethylene tanks or Kreisel tanks). Larval rearing was done according to Ben Khemis *et al.* (2003), with slight modifications: rotifers were fed along with *Nannochloropsis* spp. and distributed to larvae starting at 4 DPH. We used the Lansy microdiet (200–400 μm , INVE, Salt Lake City, Utah) from co-feeding (26 DPH, with nauplii of brine shrimp *Artemia franciscana* [Premium *artemia* Cyst, GSL Brine Shrimp, Utah]) until settlement. Tank bottoms were cleaned weekly and temperature was recorded twice a day, at 0900 hours and 1700 hours (beginning and end of feeding time). When metamorphosis occurred, newly settled larvae were collected every 3 d during tank cleaning.

For each family, we sampled 15 pelagic larvae at different developmental stages: hatching (0 DPH), mouth opening (4 DPH), two intermediate larval stages (8 and 12 DPH), the end of the rotifer feeding phase (26 DPH [10 larvae per family]), the beginning of the settlement period (pelagic larvae sampled when settlement occurred), and time of maximum settlement (20 newly settled larvae per family), for a total of 105 larvae per family. For each larva, the total length (TL) and maximal width (W) were measured under a dissecting microscope. For some sampling days, not all measurements could be done on the same day, and we had to fix larvae in 2% formalin. For these

samples, we applied a correction factor based on data from a separate experiment so that our measurements were comparable. To establish this correction factor, we compared the measurements of 360 nonfixed larvae ranging in age and size from 0 to 38 DPH and 3.0 to 6.5 mm with a second set of measurements obtained after fixation in formalin (Figure 6). The linear equation reduced to $TL_{\text{Fixed}} = 0.93023 \times TL_{\text{Nonfixed}}$ since the y -intercept was not significantly different from zero ($P > 0.05$).

Hybrid families

Fish caught in 2005 were kept in captivity for 1 year at the Station Aquicole de Pointe-au-Père under ES environmental conditions and handled as described above. During spring 2006, females were checked daily for signs of ovulation: only females from BC developed gonads in fall 2005 and ovulated in spring 2006 (there was no hormonal stimulation). We thus used this group of females to study paternal contributions. Each spawn was separated into three aliquots and each was fertilized with the sperm of one male from each origin using the protocol described above. Three half-sib cross-types per spawn (eggs from 1 to 3 females were pooled) were obtained (female BC \times male BC, female BC \times male PB, and female BC \times male ES), and five spawns (*i.e.*, 15 hybrid families in all) were monitored until settlement. Males used for reproduction were weighed and measured. Embryos and larvae were reared as in 2005, except that *Artemia* were replaced by rotifers during the co-feeding period. For each family, 20 larvae were sampled at 0, 4, 15, 26, 32, and 38 DPH and when maximum settlement

occurred, for a total of 140 larvae per family. For each larva, TL and W were measured under a dissecting microscope.

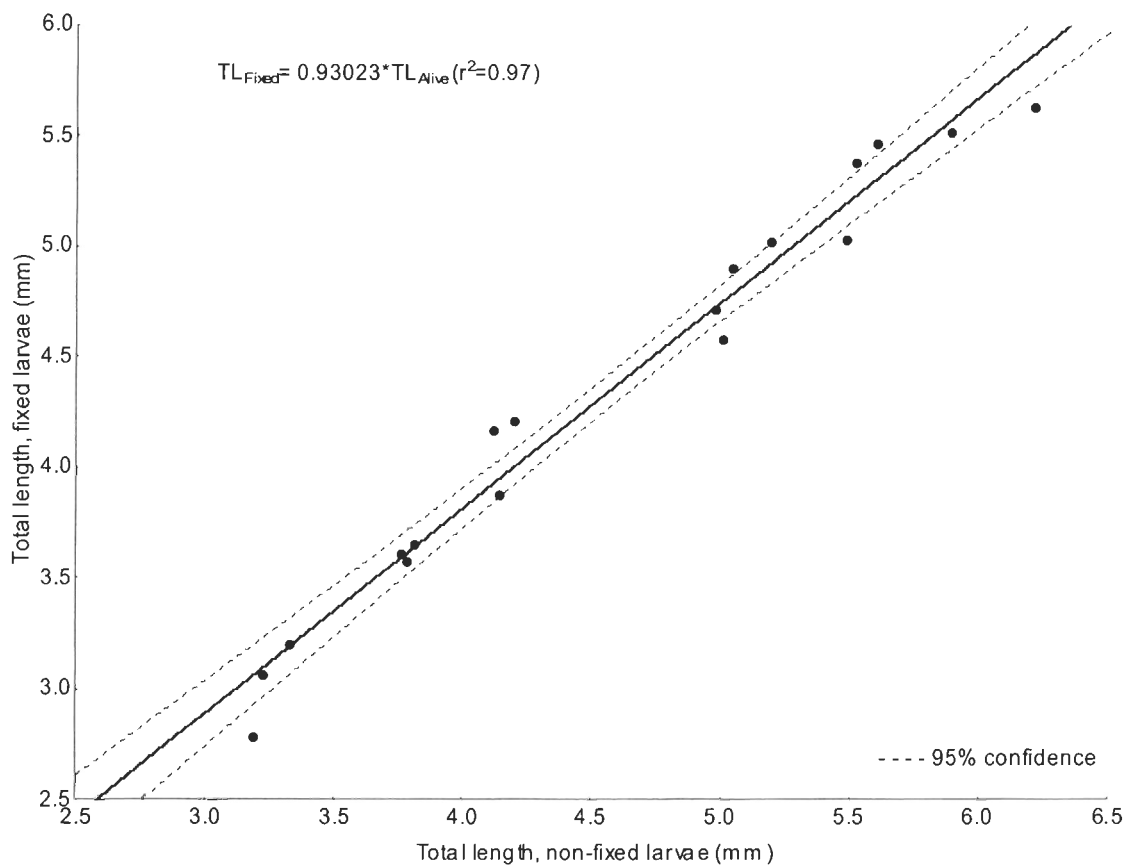


Figure 6. Regression equation ($P < 0.001$) relating the lengths of live (nonfixed) winter flounder larvae 0–38 d posthatch and those of larvae of the same age that were fixed in 2% solution of formalin. Dotted lines indicate the 95% confidence interval.

Data analysis

Measurements obtained from one tank (*i.e.*, one family) were averaged for each day of sampling and, for statistical purposes, the mean was used as the "family" value (n = number of families). All data analyses were done using statistical software (STATISTICA version 6.0; Statsoft) at the 0.05 level of significance. The normality and homoscedasticity of data were verified with the Komolgorov–Smirnov distribution test and the Brown–Forsythe test, respectively (Quinn and Keough, 2002). Percentage data (fertilization and hatch success) were arcsine–transformed to meet the model assumptions. Data that did not meet normality requirements were analyzed by Kruskal–Wallis nonparametric one-way analysis of variance (ANOVA). Differences in parental characteristics were analyzed by using one-way ANOVAs (factor: origin); the variables considered were standard length, body weight (BW), Fulton’s condition factor ($K = 100 \times [BW/SL^3]$), gonadosomatic index ($GSI = 100 \times \text{weight of stripped eggs}/\text{total weight}$), egg diameter (mm), and fertilization and hatching rates (%), these latter two being considered for hybrid crosses only. *A posteriori* analyses were performed with multiple comparison tests (Tukey's honestly significant difference). For each experiment, larval growth in length was analyzed for the three groups from first feeding to settlement by using linear regressions between TL and DD and testing homogeneity of slopes among groups. If slopes were similar, homogeneity of intercepts was tested by an analysis of covariance (ANCOVA), followed by unplanned comparisons among groups. Other comparisons were done by using one-way ANOVA as described above.

1.3 RESULTS

Pure strain families

Females captured at the three locations were similar in weight ($F_{2,34} = 1.54$, $P = 0.230$), length ($F_{2,34} = 2.45$, $P = 0.101$), and condition factor ($F_{2,34} = 0.25$, $P = 0.778$; Table I). Males had similar weights ($F_{2,31} = 3.09$, $P = 0.060$), but those from ES were shorter than those from BC and PB ($F_{2,31} = 7.73$, $P = 0.002$). Hence, males from ES had a better condition factor than those from BC and PB ($F_{2,31} = 8.48$, $P = 0.001$). The GSI was significantly different among the three groups of females ($F_{2,34} = 3.85$, $P = 0.031$); however, the a posteriori test failed to show specific differences. ES females produced the smallest eggs, and PB females produced the largest ($F_{2,35} = 22.4$, $P < 0.001$; Figure 7A), but fertilization and hatching rates did not differ among the three sets of crosses ($F_{2,32} = 1.64$, $P = 0.209$, and $F_{2,24} = 1.36$, $P = 0.273$, respectively). Overall, the fertilization rate reached $57 \pm 28\%$ (mean \pm SD) whereas only $20 \pm 16\%$ of the eggs hatched (Table I).

Table I. Biological characteristics of breeders, embryos, and newly settled winter flounder larvae (NSL) in pure and hybrid cross-type experiments. Data are presented as mean \pm SDs. Within rows, different letters indicate significant differences ($\alpha = 0.05$). Abbreviations are as follows: ES: St. Lawrence estuary; BC: Baie des Chaleurs; PB: Passamaquoddy Bay; SL, standard length; K, condition factor; GSI, gonadosomatic index; and DD, degree-days.

Group	Variable	ES	BC	PB
Pure crosses				
Dams	Weight (g)	418.3 \pm 198.2	508.2 \pm 150.0	550.3 \pm 209.7
	SL (cm)	26.8 \pm 3.3	28.8 \pm 2.1	29.1 \pm 2.8
	K	2.05 \pm 0.40	2.08 \pm 0.40	2.15 \pm 0.30
	GSI (%)	13.5 \pm 6.4	14.7 \pm 5.1	19.2 \pm 5.1
Sires	Weight (g)	236.4 \pm 103.7	332.7 \pm 91.4	296.3 \pm 84.5
	SL (cm)	20.8 \pm 3.9 y	25.4 \pm 2.9 z	25.5 \pm 2.7 z
	K	2.41 \pm 0.48 z	2.00 \pm 0.25 y	1.77 \pm 0.34 y
Embryos	% fertilization	45.24 \pm 21.63	69.27 \pm 18.81	55.47 \pm 35.88
	% hatching	13.42 \pm 12.93	25.45 \pm 17.37	17.70 \pm 14.80
	Size at hatch (mm)	2.93 \pm 0.15	2.85 \pm 0.12	2.70 \pm 0.17
NSL	Total length (mm)	7.62 \pm 0.45	7.76 \pm 0.46	7.59 \pm 0.48
	Maximal width (mm)	3.39 \pm 0.32	3.26 \pm 0.26	3.13 \pm 0.39
	First settlement (DD)	453.1 \pm 38.2	406.0 \pm 9.2	444.1 \pm 26.9
	Peak of settlement (DD)	527.5 \pm 4.1	501.0 \pm 59.0	521.5 \pm 36.4
Half-sibs				
Dams	Weight (g)		457.3 \pm 159.1	
	SL (cm)		28.8 \pm 3.36	
	K		1.87 \pm 0.28	
	GSI (%)		23.4 \pm 6.3	
Sires	SL (cm)	22.87 \pm 1.49 y	30.50 \pm 3.76 z	28.50 \pm 2.65 z
	Weight (g)	201.92 \pm 12.50 y	414.17 \pm 164.07 z	327.03 \pm 43.24 zy
	K	1.72 \pm 0.39	1.44 \pm 0.34	1.45 \pm 0.40
Embryos	% fertilization	49.13 \pm 36.46	45.37 \pm 34.13	48.23 \pm 36.83
	% hatching	46.59 \pm 40.65	32.62 \pm 27.75	42.27 \pm 36.52
	Size at hatch (mm)	3.24 \pm 0.11	3.14 \pm 0.07	3.19 \pm 0.09
NSL	Total length (mm)	7.14 \pm 0.06	7.57 \pm 0.40	7.40 \pm 0.19
	Maximal width (mm)	2.61 \pm 0.15	2.83 \pm 0.33	2.76 \pm 0.33
	First settlement (DD)	492.8 \pm 67.1	455.5 \pm 24.9	463.3 \pm 50.6
	Peak of settlement (DD)	606.6 \pm 46.0	579.1 \pm 73.2	579.8 \pm 84.5

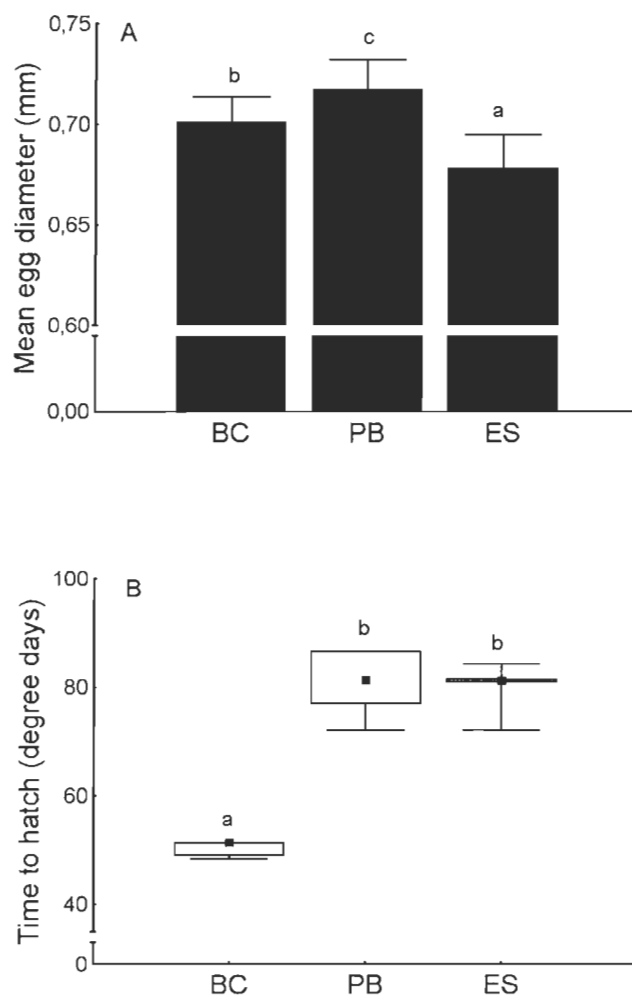


Figure 7. Panel (A) shows the mean \pm SD egg diameters of the different pure-strain winter flounder crosses studied (St. Lawrence estuary [ES], Baie des Chaleurs [BC], and Passamaquoddy Bay [PB]). Panel (B) shows the time to hatch for eggs from these crosses. The small filled squares represent the median values, the large open rectangles the 25–75% quartile dispersions, and the thin vertical lines the full ranges of the data. Different lowercase letters indicate significant differences among groups ($\alpha = 0.05$).

Time to hatch was shorter for BC embryos than for the two other groups ($H_{[2, N=33]} = 22.56, P < 0.001$; Figure 7B). Despite this, the three groups of newly hatched larvae (0 DPH) did not show any difference in TL (2.82 ± 0.16 mm; $F_{2,13} = 3.06, P = 0.082$). Larvae had different growth rates (slope comparison; $F_{2,69} = 5.41, P = 0.007$), the ES group growing more slowly than the PB and BC groups (Figure 8A). *A posteriori* comparisons done between the PB and BC groups showed that larvae from these two locations had similar growth (slope comparison: $F_{1,53} = 0.39, P = 0.537$; ANCOVA: $F_{1,54} = 0.88, P = 0.353$).

The time required to reach settlement was similar among the three populations in terms of degree-days: the beginning of settlement was observed at 436 ± 31 DD ($F_{2,8} = 2.60, P = 0.134$), whereas the peak of settlement occurred at 515 ± 42 DD ($F_{2,10} = 0.43, P = 0.661$). Measurements of newly settled larvae show that they had similar lengths (7.66 ± 0.43 mm; $F_{2,10} = 0.18, P = 0.837$) and maximal widths (3.24 ± 0.32 mm; $F_{2,10} = 0.64, P = 0.547$; Table I).

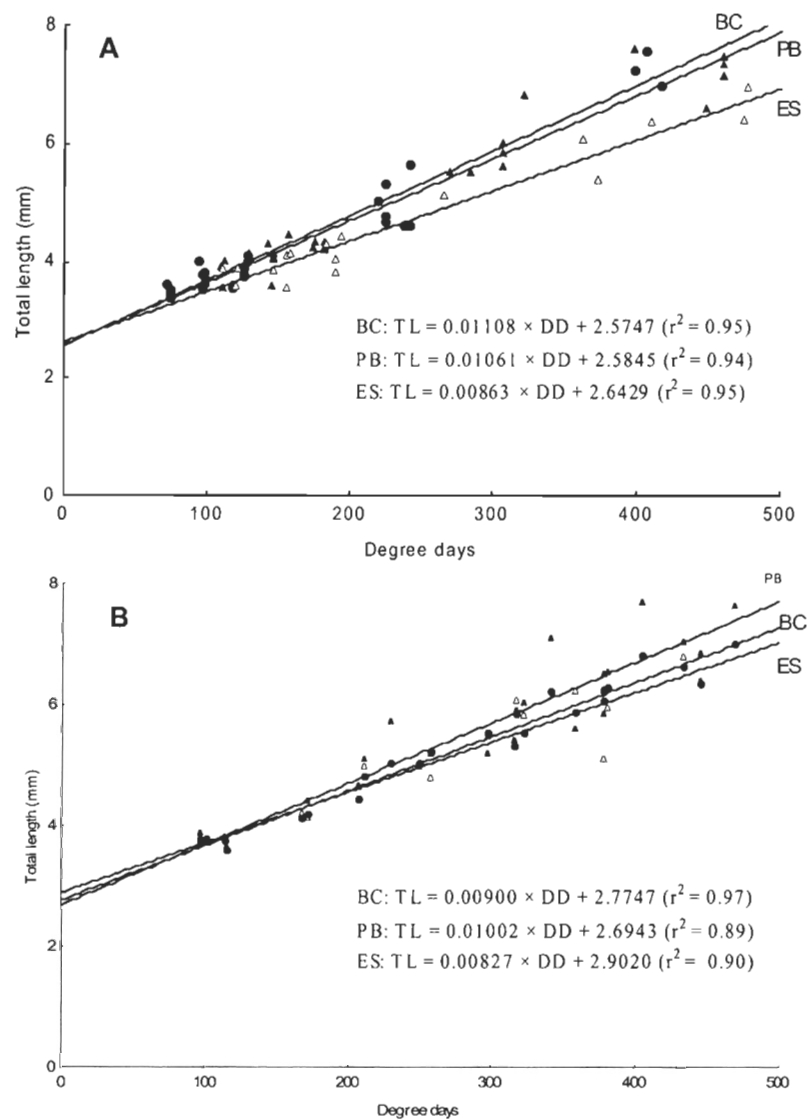


Figure 8. Regression equations relating the pelagic growth in total length of winter flounder larvae and the number of degree-days among the three populations studied (St. Lawrence estuary [ES; open triangles], Baie des Chaleurs [BC; dots], and Passamaquoddy Bay [PB; filled triangles]). Panel (A) pertains to pure-strain families, panel (B) to hybrid families (see text). All of the equations are significant ($P < 0.001$).

Hybrid families

The ES sires that were used for reproduction were smaller ($F_{1,9} = 8.02$, $P = 0.010$) and lighter ($F_{2,9} = 4.72$, $P = 0.040$) than the BC sires, whereas the sires from all three populations showed similar condition factors ($F_{2,9} = 0.73$, $P = 0.506$; Table I). Fertilization and hatching success, which had overall means between 40% and 50%, were similar among the three cross-types ($F_{2,12} = 0.02$, $P = 0.975$ and $F_{2,12} = 0.20$, $P = 0.823$, respectively). At hatch, larvae from the three cross-types had similar lengths (TL = 3.19 ± 0.09 mm; $F_{2,12} = 1.38$, $P = 0.288$). Larvae sired by ES males had slower growth than larvae sired by PB males (ANCOVA: $F_{2,66} = 4.01$, $P = 0.023$; Figure 8B). However, each group took the same average time to reach the settlement (470.0 ± 48.9 DD; $F_{2,10} = 0.62$, $P = 0.600$); Moreover, the peak occurred at 588 ± 65 DD for all three cross-types ($F_{2,10} = 0.21$, $P = 0.816$; Table I). Newly settled larvae also had similar lengths (7.39 ± 0.31 ; $F_{2,10} = 2.66$, $P = 0.118$) and widths (2.74 ± 0.28 mm; $F_{2,10} = 0.69$, $P = 0.525$).

I.4 DISCUSSION

Overall, larvae sired by males from the St. Lawrence estuary had slower pelagic growth, whether resulting from the pure strain cross or the hybrid cross (with BC females), thus strongly supporting a paternal effect on larval growth. However, larvae resulting from the different cross-types (pure strains or hybrids) took similar times (expressed in degree-days) to reach settlement and had similar sizes at this important stage, suggesting the presence of a threshold settlement size.

Slower growth within the same developmental time should result in a smaller size at settlement. Because no such difference was observed, perhaps ES families experienced a higher mortality rate at the onset of the metamorphosis (*i.e.*, the biggest larvae were those that survived and reached the “threshold” settlement size). However, our data set does not allow us to answer this question. Another explanation would be a longer transition period between larval and settlement stages. However, daily records on DPH and the number of settled juveniles showed no difference among groups and thus do not support this hypothesis. As Bertram *et al.* (1993) showed the presence of compensatory growth in winter flounder (*i.e.*, individuals that grew slower as larvae had higher growth as juveniles), it would be interesting to continue these comparisons at the juvenile stage.

The capture of mature females on their spawning ground gave us the opportunity to compare some biological characteristics among these three populations. In marine fish, small egg size (*i.e.*, lower energy reserves) is generally associated with slower growth and survival during embryonic and larval development (Chambers and Leggett, 1996, Marteinsdottir and Steinarsson, 1998, Higashitani *et al.*, 2007). Egg quality (*e.g.*, maternal biochemical content) is also known to play an important role during early development of fish (Kjørsvik *et al.*, 1990, Buckley *et al.*, 1991, Brooks *et al.*, 1997), but the effects are usually less pronounced during later stages of development. The slower growth of ES larvae could thus have been related to a lower availability of important developmental resources. However, the results from half-sib families do not support this hypothesis. In hybrid crosses, we only used females from one origin, which had the advantage of reducing the variations in egg size and quality. We can then assume that the observed differences are essentially attributable to sire genotypes since the only significant contribution of sperm to offspring is DNA (Rideout *et al.*, 2004). The results obtained confirm that the slowest growth rate occurred when ES males were used.

Factors that determine size at settlement usually vary among flatfish species (see: Yamashita *et al.*, 2001), but field and laboratory experiments have shown that length at metamorphosis is less variable than age at metamorphosis. This has been seen in winter flounder larvae from Conception Bay (Newfoundland and Labrador; Chambers et Leggett, 1987) and from Narragansett Bay, Rhode Island (Laurence, 1975), and also in starry flounder *Platichthys stellatus* (Policansky, 1982) and in Japanese flounder

Paralichthys olivaceus (Seikai *et al.*, 1986). In two Tasmanian flounders, *Ammonretis rostratus* and *Rhombosolea tapirina*, length at metamorphosis was similar between two temperature regimes ($\sim 11^{\circ}\text{C}$ and $\sim 17^{\circ}\text{C}$), whereas age at metamorphosis was greater at the cooler temperature (Crawford, 1984). Less variable traits are generally thought to have a higher correlation with fitness; however, because we found no difference in settlement characteristics among groups sired by males from different locations, we conclude that paternal origin does not play a role at this stage. This result is consistent with the conclusions of Chambers and Leggett (1992), who argued that size at metamorphosis was not affected by males in winter flounder.

Butts and Litvak (2007a, b) showed that larvae sired by males from Georges Bank, which is further south than PB, showed higher growth than larvae sired by PB males when reared at 7.8°C . Our study not only confirms their results (slower growth in crosses involving sires from the northern location) but also indicates that the expected latitudinal growth rate compensation in winter flounder is not present during the larval stage. Future studies should test whether this is also the case after metamorphosis and at the beginning of benthic life. Some other flatfishes do not show latitudinal growth compensation at either the larval stage or in further stages of development. On the US East Coast, the northern population of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus* in Delaware had slower growth than the southern population in North Carolina at both 6°C and 18°C (Malloy and Targett, 1994). In Europe, European plaice *Pleuronectes platessa* and dab *Limanda limanda* from the English Channel and North Sea had slower growth

until 7 years of age than did populations in the Bay of Douarnenez, on the west coast of France (Deniel, 1990). In this case, the author concluded that flatfishes found suitable environmental conditions for rapid growth in the Bay of Douarnenez. Dover sole (*Solea solea*) larvae were also found to have larger size at hatch, faster growth rate, and younger age at metamorphosis in the Irish Sea population than in the more northern Norwegian populations (Exadactylos *et al.*, 1999).

In winter flounder, several important biological traits have been reported to vary between different locations. For example, there are well-characterized population differences in the timing of the seasonal cycles of plasma antifreeze production. The cycles seem to be correlated with the ice exposure and freezing risk encountered by the population (Fletcher *et al.*, 1985). These differences, which are maintained when fish from different areas are held in the same environment, suggest that this life history trait can result from genetic differences. Winter flounder caught on Georges Bank have long been reported to grow significantly faster than stocks from other areas (Lux, 1973) and appear genetically distinct (McClelland *et al.*, 2005). A previous study showed that adult winter flounder from ES had slower growth than flounder from Northumberland Strait, St. Mary's Bay (Nova Scotia), or from Georges Bank, but that their weight was higher at equal size (Vaillancourt *et al.*, 1985). The authors concluded that this difference probably resulted from differences in the duration of the feeding period as well as those in energy allocation.

In conclusion, a strong paternal component is present in the regulation of larval growth in winter flounder. In a northern environment, differences in larval growth rates can be related to the seasonal pattern of temperatures encountered across their different habitats. However, settlement is more governed by environmental factors and appears to be size dependant.

**CHAPITRE II. ASSESSMENT OF PATERNAL EFFECT AND
PHYSIOLOGICAL COST OF METAMORPHOSIS ON GROWTH OF YOUNG
WINTER FLOUNDER JUVENILES IN A COLD ENVIRONMENT**

ÉVALUATION DES EFFETS PATERNELS ET DU COÛT PHYSIOLOGIQUE DE LA
MÉTAMORPHOSE DANS LA CROISSANCE DES JEUNES JUVÉNILES DE PLIE
ROUGE EN ENVIRONNEMENT FROID

II.1 INTRODUCTION

In flatfish, metamorphosis is a critical developmental stage that involves profound morphological and physiological changes. During this period, one important step is settlement, a behavioural and ecological change associated with the transition from a pelagic to a benthic existence (Osse & Van den Boogaart, 1997; Schreiber, 2001; Geffen *et al.*, 2007). Physical remodelling associated with metamorphosis is energetically demanding and occurs while food acquisition may be limited (*i.e.* stomach, gut and visual reorganisation), which may interfere with growth (Osse & Van den Boogaart, 1997; Gwak *et al.*, 2003; Geffen *et al.*, 2007). Size and age at metamorphosis as well as the duration and synchrony of metamorphosis with settlement are highly variable among species and sometimes even within a species, making generalizations difficult (Geffen *et al.*, 2007). Because different populations of the same species are exposed to different environmental conditions across their distribution area, many combinations of factors may affect the metamorphosis pattern (Yamashita *et al.*, 2001) and hence the whole juvenile stage, which is defined as the period between settlement and the onset of sexual maturation (Van der veer *et al.*, 1994).

Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* Walbaum is a common flatfish of coastal waters from Georgia (USA, ~33°N) to Newfoundland and southern Labrador (Canada, ~53°N) (Buckley, 1989) that is euryhaline (salinity of 3 to 40) (McCraken, 1963) and eurythermic (-1.9°C to +23°C) (Pearcy, 1961; Duman & Devries, 1974). Its

population structure and dynamics are not fully understood, and little information is available for Canadian populations (Van Guelpen & Davis, 1979; Rose *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 1999; DeCelles & Cadrin, 2007). Some laboratory studies have described *P. americanus* metamorphosis, but these focused mainly on size and age at metamorphosis (*i.e.* settlement) (Chambers & Leggett, 1987, 1992; Chambers *et al.*, 1988). In these studies, variations in size at metamorphosis were found to be lower than variations in age at metamorphosis. Bertram *et al.* (1993; 1997) showed the presence of compensatory growth processes during early juvenile life for individuals that were smaller at the end of the larval stage. Most studies on flatfish have highlighted the importance of environmental effects on size and age at metamorphosis (Seikai *et al.*, 1986; Chambers & Leggett, 1992; Benoît *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2001). In all these studies, temperature appeared to be the most influential environmental factor.

Chambers & Leggett (1992) found that inheritance played a small role in the metamorphic traits of *P. americanus* and that the maternal contribution probably exceeds the paternal one. In the last decade, studies focusing on parental effects have revealed the importance of paternal components in the early life history traits of marine fish (*e.g.* Saillant *et al.*, 2001; Rideout *et al.*, 2004; Green & McCormick, 2005; Bang *et al.*, 2006; Probst *et al.*, 2006). Recently, Butts & Litvak (2007a) found a strong paternal component throughout the *P. americanus* larval period and suggested that paternal effects were probably trait dependent. Moreover, Fraboulet *et al.* (2009) showed a strong paternal

contribution to larval growth rate in winter flounder, but they did not find any paternal effect on size at settlement or time to settle (in degree days).

According to latitudinal location, newly settled larvae have differing lengths of time available to achieve metamorphosis and ensure sufficient growth and reserve accumulation before winter, which is a season of high mortality for juveniles in poor condition (Sogard, 1997). If the sire's genetic contribution affects growth strategies, this could be reflected in energy allocation processes. The objectives of this study were to assess whether paternal effects were still present in the early juvenile stage of *P. americanus* and to determine the energy allocation strategy during metamorphosis. Paternal effects and energy allocation strategy were estimated by measuring changes in the growth characteristics and biochemical composition of newly settled juveniles obtained from paternal half-sib families. More specifically, measurements included RNA:DNA ratio (Buckley *et al.*, 1999; Gwak & Tanaka, 2001), total lipid concentration (Sogard & Olla, 2000; Sabatés *et al.*, 2003), and triacylglycerol:sterol ratio (TAG:ST) (Fraser, 1989; Ferron & Leggett, 1994). These three indicators allowed an accurate assessment of the nutritional condition and growth of larval and juvenile fish.

II.2 MATERIALS AND METHODS

Experimental design

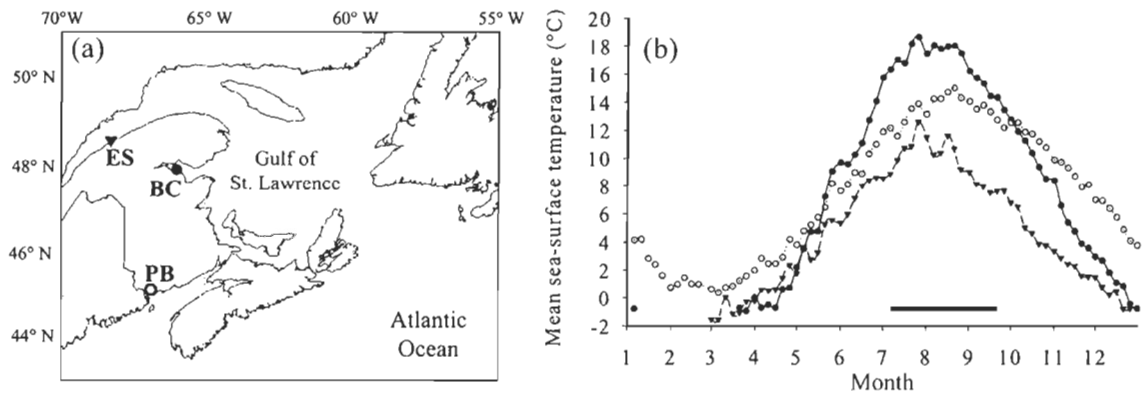


Figure 9. (a) Location of spawning grounds and (b) mean sea-surface temperature profiles for the three locations where *Pseudopleuronectes americanus* were obtained. Averaged temperature data (5 days steps) were obtained from satellite measurements made from 2002 to 2005. In panel b, line above x-axis (months) indicates the experimental period. ●BC: Baie-des-Chaleurs, ○PB: Passamaquoddy Bay, ▼ ES: St. Lawrence estuary.

Wild *P. americanus* breeders came from three different locations (Fig. 9): 1) the Sainte Croix estuary in Passamaquoddy Bay (PB, New Brunswick); 2) the Baie-des-Chaleurs (BC), in the western part of the Gulf of St. Lawrence, offshore of Carleton (Québec); and 3) the St. Lawrence estuary (ES), offshore of Sainte-Luce (Québec). Fish

were captured on their natural spawning ground and transferred to the Station aquicole de Pointe-au-Père (Québec, 48°31'N, 68°28'W). They were kept in captivity for one year in rectangular 200 L tanks (0.8 × 1.25 × 0.2 m) under environmental conditions of the St. Lawrence estuary (ambient filtered sea water flowing at 5 L min⁻¹ and natural photoperiod). Flounder were fed daily with wet pellets at 1.5% of their wet mass and managed according to Plante *et al.* (2003). The next spring, three BC females were used to produce paternal half-sib families: each egg batch was separated into three aliquots, each of which was fertilized with the sperm of one male from a different origin, giving a total of nine different males used. Three half-sib cross-types per spawn were thus obtained: ♀BC×♂BC, ♀BC×♂PB and ♀BC×♂ES. Fertilizations were done according to Ben Khemis *et al.* (2000), and each half-sib family was reared in an individual tank. Eggs were incubated in darkness in cylindrical baskets supplied with flowing filtered (5 µm) ambient sea water. Once hatched, larvae were transferred into a 55 L cylindro-conical tank placed in a temperature-controlled room (10° C) and exposed to a 12L:12D photoperiod cycle (0900–2100 hours). These tanks were also supplied with flowing filtered ambient sea water except during the feeding period (0900–1700 hours), when flow was stopped. A permanent up-welling was maintained in each tank by the aeration system placed at the bottom of a vertical strainer. From the mouth opening stage (4 days post hatch [DPH]) until the end of experiment, larvae were fed daily with rotifers kept in culture over years in our facility and maintained at a constant concentration in the tank (5 ind. ml⁻¹) throughout the feeding period. Rotifers were fed a mixture of microalgae (*Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* and *Pavlova lutheri*, 1:1:1 v/v/v;

Nutrocéan Inc.; www.nutrocean.com) and culture Selco[®] plus (INVE Aquaculture Inc.; www.inve.com). During this period, green water conditions were generated by the addition of the microalga mixture (680×10^6 cells L⁻¹) used with rotifers in order to enhance the rearing conditions and to avoid "wall syndrome." Once larvae reached 26 DPH, Lansy microdiet (200–400 μ m, INVE Aquaculture Inc.; www.inve.com) was delivered in excess on the water's surface. The distribution of rotifers was delayed in order to enhance the consumption of the microdiet (*i.e.* co-feeding). Tank bottoms were cleaned weekly.

At metamorphosis, newly settled larvae were collected every three days and transferred into small rectangular tanks (35.5 × 65 × 6.5 cm). Two replicates of 200 individuals were used for each half-sib family. For each family, stock tanks of juveniles were maintained under similar feeding and rearing conditions (~870 juveniles m⁻²). Rearing was done under natural conditions of the St. Lawrence estuary using flowing filtered sea water (50 μ m, 2 L min⁻¹) and artificial light (400 lx, natural photoperiod); sand (~500 μ m) was used as the substrate. During the experimental period, water temperature and salinity averaged $10.4 \pm 1.0^\circ$ C and 28.8 ± 1.3 respectively (mean \pm S.D.). At settlement, three meals of rotifers (5 ind. ml⁻¹ at 1100 hours, 1300 hours and 1600 hours) and ten microdiet meals (in excess, every 30 minutes between 0900 hours and 1100 hours and then between 1330 hours and 1530 hours) were given each day. To avoid rotifer loss, seawater flow was stopped from 0900 hours to 1200 hours and from

1300 hours to 1700 hours. Water was renewed between 1200 hours and 1300 hours and overnight. For each tank, dead individuals and excess microdiet were removed every two days and tanks were cleaned every two weeks. During tank cleaning, juveniles were counted and their numbers readjusted to 200 using individuals from the corresponding stock tank to maintain the initial density. The third meal of rotifers was stopped after 25 days post-settlement (25 DPS) and the microdiet was delivered until 1630 hours. At 35 DPS, the first meal of rotifers was stopped and the microdiet was delivered until 1200 hours. At 45 DPS, juveniles were completely weaned onto the microdiet.

Growth analysis

When maximum settlement occurred, 20 newly settled larvae from each family were measured under a dissecting microscope (total length, L_T ; and maximum width, W_M). At 45 DPS, 15 juveniles from each family replicate were photographed using a digital camera (Evolution VF; Media Cybernetics; www.mediacy.com) coupled with a dissecting microscope (Olympus SZ61; www.olympusamerica.com) connected to a personal computer. Measurements for L_T , W_M , and standard length (L_S) were made using Image Pro-Plus 5.0 software (Media Cybernetics). Pigmentation and fin erosion were estimated using the qualitative methods described in de Montgolfier *et al.* (2005). Fish manipulations were done according to the Canadian Council of Animal Protection recommendations and protocols approved by the University Animal Care Committee.

Biochemical analyses

Sampling was performed before the first meal to prevent contamination by gut content. Juveniles were rinsed three times in Millipore-filtered sea water immediately after measurements, transferred to 1.5 ml micro tubes and kept frozen at -80° C until analysis. At settlement, six pools of three individuals from each half-sib family were sampled for biochemical analysis (three for nucleic acids and proteins, three for lipids). At 45 DPS, 10 pools of two juveniles (one from each family replicate) were weighed (wet mass, M_w) and sampled for biochemical analysis (five for nucleic acids and proteins, five for lipids). Pools for nucleic acid and protein analyses were weighed and homogenized on ice using an ultrasonic liquid processor (Sonicator XL 2020; www.misonix.com). The nucleic acid content was measured according to the Schmidt-Thannhauser method modified by Munro and Fleck (1966) and adapted for larval fish micro quantities by Buckley (1979). Type III RNA from baker's yeast (Sigma R-7125; www.sigmaaldrich.com) and DNA from calf thymus (Sigma D-3664) were used as nucleic acid standards; the optical density was determined at 260 nm (Beckman spectrophotometer DU-640; www.beckman.com). Total protein content was measured according to the Hartree (1972) modification of the Lowry method. Bovine serum albumin (Sigma A-4503) was used as a protein standard and optical density was determined at 650 nm.

Lipids were extracted in chloroform–methanol according to Parrish (1999) using the modified Folch procedure (Folch *et al.*, 1957). Lipid classes were determined by thin-

layer chromatography with flame ionization detection (TLC-FID) using an Iatroscan MK-6 (Shell USA; www.shell-usa.com) as described by Parrish (1987). Extracts were spotted onto chromarods coated with silica gel (SIII, Shell USA), and a three-stage development system was used to separate lipid classes into triacylglycerols (TAG), free sterols (ST), phospholipids (PL), acetone-mobile polar lipids (AMPL), free fatty acids (FFA), wax esters (WE), ketones (KET) and free aliphatic alcohol (ALC). Chromatograms were recorded using PeakSimple[®] software (v3.21, SRI Inc.; www.srigc.com), and peak areas were quantified using calibration curves obtained from scans of Sigma standards (www.sigmaaldrich.com). Lipid classes were first evaluated as concentrations (in μg of lipids per mg of tissue after freezing), summed, and then expressed in percentages of total lipids.

Statistical analyses

Data obtained from one half-sib family ($n = 20$ at settlement and $n = 30$ at 45 DPS) were pooled for each day of sampling; thus averaged data from half-sib families were compared in the statistical analyses (three half-sib families per sire origin). All data analyses were done using statistical software (STATISTICA v6.0; www.statsoft.com) with the level of significance $\alpha = 0.05$. Normality and homoscedasticity of data were verified with the Komolgorov-Smirnov distribution test and the Brown-Forsythe test, respectively (Quinn & Keough, 2002). No transformation was required to meet ANOVA assumptions except for percentage data (survival and lipid classes), which were arcsine transformed (Sokal & Rohlf, 1995). Total length, maximum width, concentrations of

RNA, DNA and protein, RNA:DNA and protein:RNA ratios, lipid classes, total lipids, and TAG:PL and TAG:ST ratios were compared using factorial two-way ANOVAs to test for potential effects of sire origin and stage of development. At 45 DPS, individual M_W , growth rates in length and width ($G = [L_2 - L_1] [t_2 - t_1]^{-1}$, where L_1 and L_2 refer to L_T or W_M at sampling time t_1 (0 DPS) and t_2 (45 DPS), respectively; in mm day⁻¹) and Fulton's somatic condition factor ($K = 100 [M_W L_S^{-3}]$) were compared using one-way ANOVAs (factor: sire origin). *A posteriori* analyses were performed using multiple comparison tests (Tukey HSD). Averaged pigmentation and fin erosion levels (estimated using a relative scale from one to five) were analysed using Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVAs. Survival was first analysed for the three groups using linear regressions between percentage of survival (arcsine transformed) and days after settlement, and homogeneity of slopes was tested among groups. If slopes were similar, homogeneity of intercepts was tested by ANCOVA. Finally, survival was determined according to regular counts of surviving juveniles. Since the initial density was restored every two weeks with juveniles from the corresponding stock tanks, the counts describe the specific mortality at different time intervals from settlement. Survival was analysed by two-way ANOVA (sire origin and time interval), and subsequent one-way ANOVAs were done for each time interval (factor: sire origin).

II.3 RESULTS

At the end of the experiment, all hybrid groups were found to be feeding, as indicated by microdiet in the gut. Average L_T and W_M increased in the different half-sib groups from settlement until 45 DPS (Table II). Sire origin did not affect the growth of juveniles among hybrid groups and did not change with time during the experiment (Table II; no significant interaction between sire origin and stage factor). The corresponding growth rates in length and width at 45 DPS were similar among hybrid groups (0.09 ± 0.02 mm day⁻¹ and 0.06 ± 0.01 mm day⁻¹ respectively [mean \pm S.D.], one-way ANOVA, d.f. = 2, $P > 0.05$). Individual M_W (17.59 ± 3.35 mg) and K factors (1.17 ± 0.16) were also similar (one-way ANOVA, d.f. = 2, $P > 0.05$).

Between settlement and 45 DPS, significant changes in the biochemical composition were observed (DNA, proteins and the corresponding ratios), but no differences were related to sire origin (Table II). Similar RNA concentrations were observed at settlement and at 45 DPS whereas the DNA concentration significantly decreased by 38% during the same period (Table II). Hence, the RNA:DNA ratio was found to increase during the experimental period by 25% (Table II). Protein content and the protein:RNA ratio also increased by 27% and 34% respectively from settlement to 45 DPS (Table II).

Table II. Mean values (\pm standard deviation) of biological indices of *Pseudopleuronectes americanus* paternal half-sib juveniles between settlement and 45 days after settlement.

	Settlement				45 days post-settlement				Time effect (d.f. = 1)
	BC	PB	ES	Mean	BC	PB	ES	Mean	
L_T	7.56 \pm 0.52	7.31 \pm 0.05	7.17 \pm 0.05	7.35 \pm 0.32*	11.75 \pm 1.06	11.00 \pm 0.75	11.58 \pm 0.73	11.45 \pm 0.82*	$F = 181.01, P < 0.001$
(mm)									
Width	2.80 \pm 0.37	2.63 \pm 0.24	2.61 \pm 0.18	2.68 \pm 0.25*	5.64 \pm 0.38	5.31 \pm 0.44	5.51 \pm 0.51	5.45 \pm 0.41*	$F = 253.10, P < 0.001$
(mm)									
RNA	4.7 \pm 0.8	4.0 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4	4.3 \pm 0.6	4.5 \pm 1.1	4.1 \pm 0.3	3.7 \pm 0.4	4.1 \pm 0.7	$F = 0.40, P > 0.05$
($\mu\text{g mg}^{-1}$)									
DNA	2.7 \pm 0.9	2.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6*	1.6 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1*	$F = 19.51, P < 0.01$
($\mu\text{g mg}^{-1}$)									
Proteins	59.4 \pm 10.6	49.9 \pm 8.9	51.0 \pm 5.7	53.4 \pm 8.7*	68.5 \pm 6.0	68.7 \pm 0.9	65.7 \pm 5.0	67.6 \pm 4.2*	$F = 19.22, P < 0.01$
($\mu\text{g mg}^{-1}$)									
RNA/DNA	2.1 \pm 0.6	2.2 \pm 0.04	2.0 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4*	2.8 \pm 0.6	2.7 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5	2.7 \pm 0.4*	$F = 6.15, P < 0.05$
Proteins/RNA	12.56 \pm 0.55	12.65 \pm 0.69	12.44 \pm 0.82	12.55 \pm 0.61*	15.88 \pm 2.32	17.27 \pm 1.32	17.20 \pm 0.77	16.79 \pm 1.55*	$F = 52.90, P < 0.001$
Total lipids	29.61 \pm 3.14	29.63 \pm 7.01	35.16 \pm 12.12	31.47 \pm 7.69	30.26 \pm 1.76	28.34 \pm 2.65	28.58 \pm 6.21	29.06 \pm 3.61	$F = 0.61, P > 0.05$
($\mu\text{g mg}^{-1}$)									
TAG/ST	0.82 \pm 0.30	1.21 \pm 0.74	0.56 \pm 0.17	0.86 \pm 0.50*	0.22 \pm 0.09	0.24 \pm 0.10	0.34 \pm 0.17	0.26 \pm 0.12*	$F = 13.51, P < 0.01$
TAG/PL	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02*	0.01 \pm 0.004	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01*	$F = 14.68, P < 0.01$

There were no differences related to sire origin and no sire origin \times stage interaction (two-way ANOVA, d.f. = 2, $P > 0.05$). The averaged values of characteristics that differed between the two stages are in bold and marked with asterisks. BC: Baie-des-Chaleurs sires, PB: Passamaquoddy Bay sires, ES: St. Lawrence estuary sires. L_T : total length; W_M : maximum width; TAG:ST; triacylglycerols:sterols; TAG:PL: triacylglycerols:phospholipids.

For the lipid classes and their ratios, no variation was found related to sire origin, although there were significant changes between the two developmental stages (Table II). However, total lipid concentrations did not differ from settlement to 45 DPS for any of the half-sib groups (Table II). The TAG:ST and TAG:PL ratios decreased during growth by 70% and 68% respectively (Table II). Since juveniles had similar total lipid concentrations at the two stages, only the data pertaining to the percentage of total lipids are presented. Overall, phospholipids and AMPL (pigments, glycolipids and monoglycerides) constituted the main lipid classes in *P. americanus* juveniles (Fig. 10). At settlement, phospholipids were predominant, representing around 70% of total lipids while AMPL accounted for 20% on average. During growth, AMPL increased by 154% and became the largest lipid class at 45 DPS. Triacylglycerols represented a small fraction of total lipids and dropped by 79% between settlement and 45 DPS. Relative amounts of sterols also significantly decreased by 52% from settlement to 45 DPS whereas ketones did not vary between the two stages. Statistical tests were not done on wax esters because they made up less than 1% of total lipids.

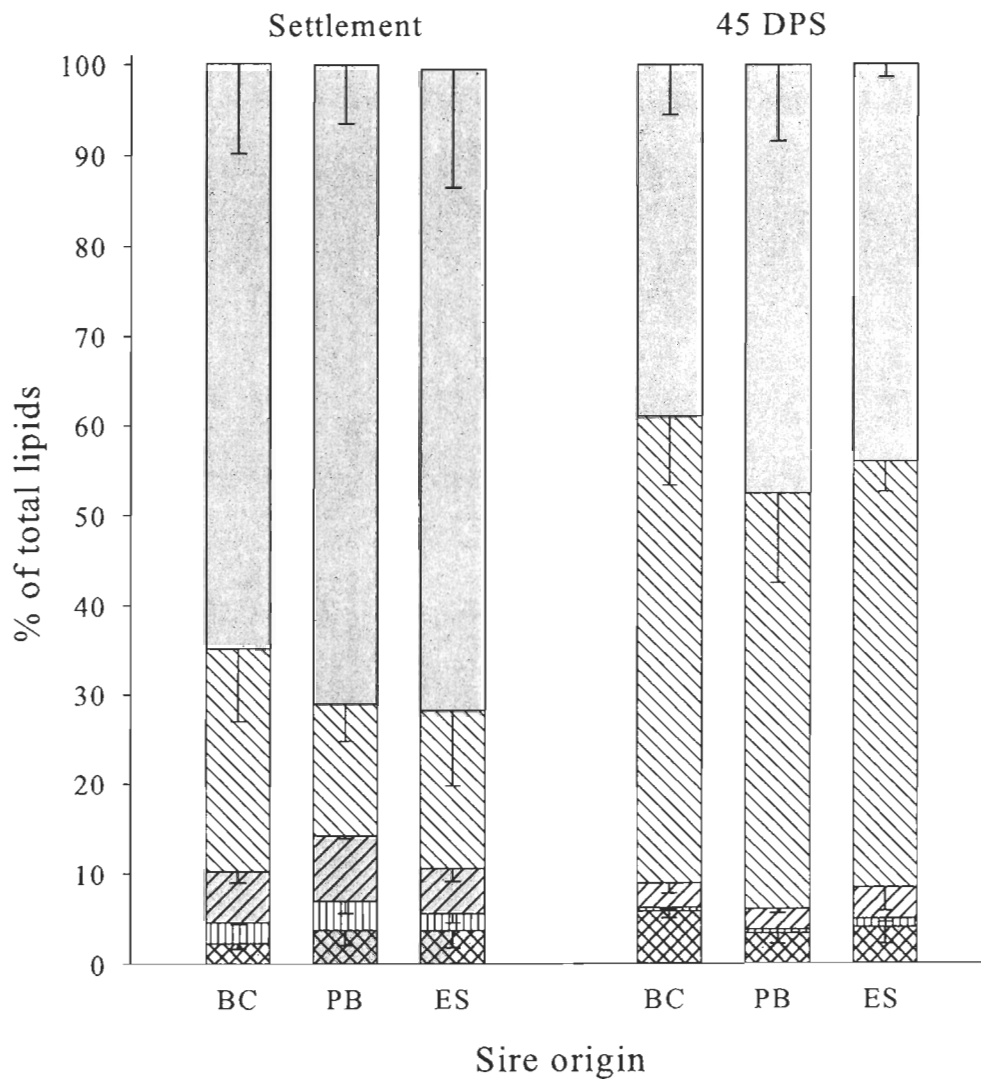


Figure 10. Mean relative proportions of lipid classes (in % of total lipids) in *Pseudopleuronectes americanus* paternal half-sib juveniles (BC: Baie-des-Chaleurs sires, PB: Passamaquoddy Bay sires, ES: St. Lawrence estuary sires) at settlement and 45 days post-settlement. Spreads inside bars represent standard deviation. There are no differences between groups for any lipid classes. □ Phospholipids, ▨ Acetone mobile polar lipids, ▩ Sterols, ▪ Triacylglycerols, ▤ Ketones.

At 45 DPS, fin erosion and pigmentation levels were similar among all half-sib groups (Kruskall-Wallis, $N = 9$, $P > 0.05$) (Fig. 11). The median value of the fin erosion index indicated fin erosion of $\sim 30\%$ while the median value of the pigmentation index indicated pigmentation on $\sim 70\%$ of the body surface. All the half-sib groups showed similar survival slopes, indicating a decrease from 90% to 50% during the experiment ($\% \text{ survival [arcsin transformed]} = 79.95 - 0.72 \times \text{DPS}$; ANCOVA, d.f. = 2, $P > 0.05$). When survival was analysed according to the time interval from settlement (*i.e.* stage survival) (Fig. 12), no significant difference was found related to sire origin or interaction with the time interval (two-way ANOVA, d.f. = 2, $P > 0.05$). Survival decreased by 36% between 15 DPS and 45 DPS.

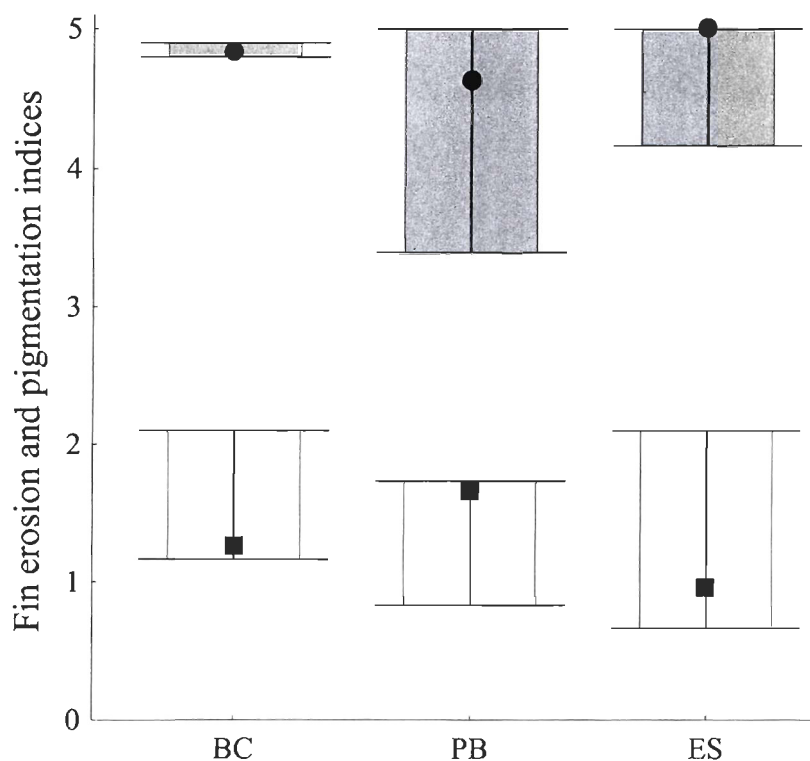


Figure 11. Fin erosion (■) and pigmentation indices (●) displayed 45 days after settlement by half-sib groups. Data are presented as boxplots of medians (plots), quartile dispersions (boxes: 25–75%), and minimum–maximum ranges (spreads), but bars and spreads are superimposed. There are no differences between the fin erosion and pigmentation indices between groups. Estimates of pigmentation development and fin erosion were made using a scale of 0 to 5 (pigmentation: 0 for total lack of pigmentation and 5 for normal pigmentation; fin erosion: 0 for total lack of erosion and 5 for complete fin erosion) (0: 0%, 1: 1–20%, 2: 21–40%, 3: 41–60%, 4: 61–80%, 5: 81–100%). BC: Baie-des-Chaleurs sires; PB: Passamaquoddy Bay sires; ES: St. Lawrence estuary sires.

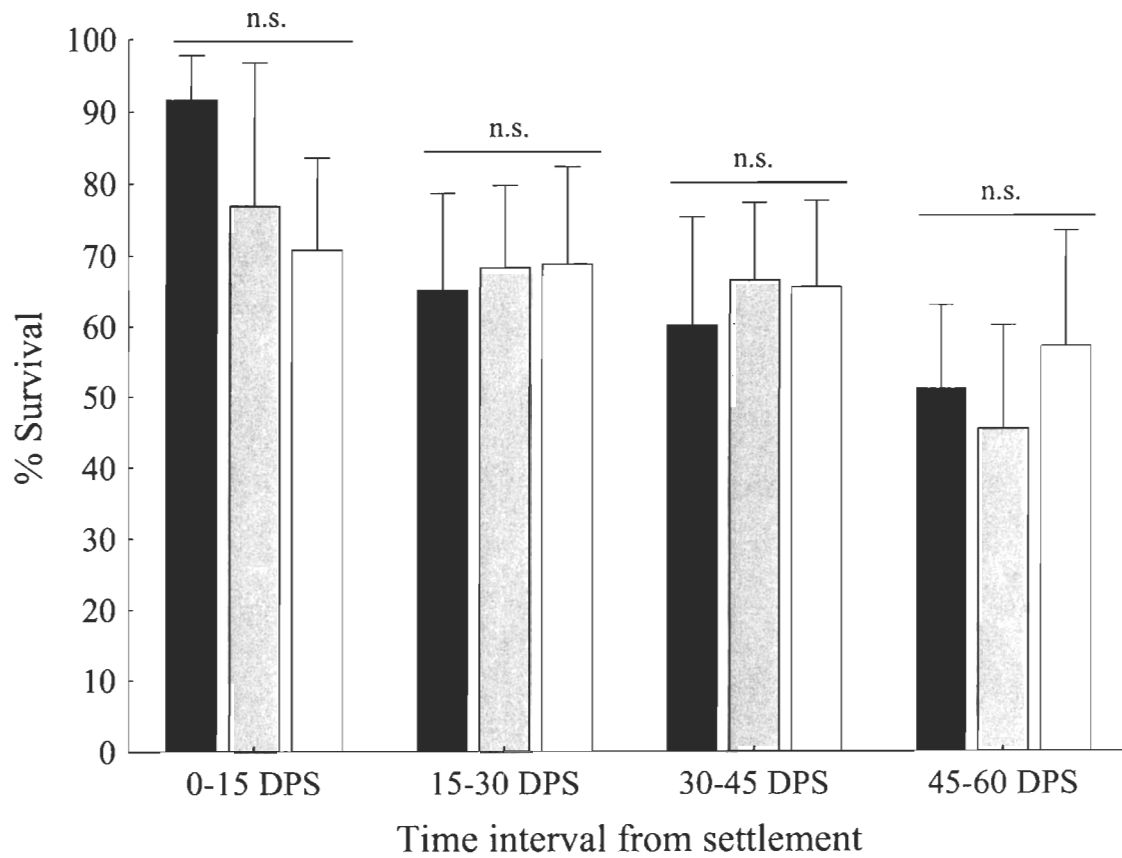


Figure 12. Survival of the three half-sib groups sorted by time interval from settlement (in days post-settlement). Results are expressed as mean \pm S.D. and lines indicate no significant difference between groups. ■ Baie-des-Chaleurs sires; □ Passamaquoddy Bay sires; □ St. Lawrence estuary sires.

II.4 DISCUSSION

This study revealed no evidence of paternal effects on growth characteristics or survival related to sire origin during the early juvenile stage of *P. americanus*. Newly settled larvae may display strong phenotypic plasticity in order to cope with variable environmental conditions at settlement that overshadow parental effects on growth strategies at this stage. Our results highlight the substantial mobilization of energy occurring at metamorphosis (*e.g.* TAG depletion) and indicate similar energy allocation strategies among hybrids within the 45 days that follow settlement.

Paternal effect

Historically, studies on parental effects have mainly focused on maternal effects in the early life history (ELH) of progenies in order to assess the relative importance of additive (genetic) and non-additive (endogenous resource) effects on growth performance (Kamler, 2005). Paternal effects were generally masked since fertilization practices usually used pooled milt. Within the last decade, developments in sperm quality assessment have allowed new findings on paternal effects during fish ELH (Trippel, 2003; Rideout *et al.*, 2004; Kamler, 2005). Paternal effects appeared to be more pronounced in freshwater species that display special reproductive features (*e.g.* dominance in brown trout *Salmo trutta* Linnaeus, ornamentation in whitefish *Coregonus* sp., male reproductive strategies in bluegill *Lepomis macrochirus* Rafinesque) (Table III).

In freshwater fish, paternal effects on growth performance were found to be present from embryonic to juvenile stages and seem to have an important influence on survival. While paternal effects in marine fish have been shown in numerous species, these mostly occurred during ELH (Table III). In flatfishes, no study has described paternal effects at the juvenile stage.

Paternal half-sib designs allow the accurate detection of additive paternal effects (Falconer & Mackay, 1996; Blanc, 2003a). Half-sib designs have been successfully used for the detection of paternal effects on growth of progenies issued from a limited number of breeders in sole *Solea solea* Linnaeus, herring *Clupea harengus* Linnaeus (Panagiotaki & Geffen, 1992), haddock *Melanogrammus aeglefinus* Linnaeus (Rideout *et al.*, 2004), and *P. americanus* (Butts & Litvak, 2007a, b). In this study, breeders were from geographically distinct populations (it was assumed that there was no genetic mixing) that were maintained for one year under similar rearing conditions (*i.e.*, gametogenesis under similar conditions). Maternal extra-nuclear materials (*i.e.* yolk, hormones, immunoglobulin, mRNAs), which are known to play important roles during ELH, were exhausted at metamorphosis, thus sires and dams equally contributed to the juvenile genome. Since females were from the same origin, sires from the different distinct locations offered the only source of genetic variation. Moreover, special attention was paid to apply similar conditions to all groups during the experiment (also at the larval stage), so the same variations in environmental conditions were experienced by all half-sib groups. Under these conditions, sire origin (*i.e.* genetic makeup) was not found to

Table III. Review of fish studies (freshwater and marine fish) that have shown significant paternal effects on specific developmental stages (YOY: young of the year, ELH: early life history).

Common name	Species	Stage	Significant paternal effects in progeny	Reference
Bluegill	<i>Lepomis macrochirus</i>	embryo	Growth rate of embryos sired by cuckolders	Neff, 2004
		larvae	Conversion efficiency (foraging behavior)	Lister and Neff, 2006
		juvenile	Survival	Neff and Lister, 2007
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	YOY	Parental differences in growth and survival	Herbinger <i>et al.</i> , 1995
		1 year	Higher growth performance of progeny	Rinchard <i>et al.</i> , 2003
Brown trout	<i>Salmo trutta</i>	2 generations	Paternal and grand-paternal effects on growth and survival	Blanc, 2003b
		juvenile	Dominant males induce higher growth rate of progeny	Petersson and Jarvi, 2007
		ELH	Larval life span and growth rate until death without food	Vollestad and Lillehammer, 2000
Whitefish	<i>Coregonus</i> sp.	embryo	Better survival to epidemic when sired by ornamented males	Wedekind <i>et al.</i> , 2001
Masu salmon	<i>O. masou</i>	ELH	Otolith size (metabolic rate) in swim-up fry	Yamamoto and Reinhardt, 2003
Pink salmon	<i>O. gorbuscha</i>	embryo	Proportion of variation in developmental rate at hatch	Hebert <i>et al.</i> , 1998
Atl. salmon	<i>Salmo salar</i>	juvenile	Growth rate, mortality and smoltification traits	Thorpe and Morgan, 1978
		juvenile	Males with different tactics have different heritability	Garant <i>et al.</i> , 2003
Chinook salmon	<i>O. tshawytscha</i>	1 year	Paternal component in post-release survival	Unwin <i>et al.</i> , 2003
Guppy	<i>Poecilia reticulata</i>		Growth rate, fecundity, offspring weight	Reynolds and Gross, 1992
Clownfish	<i>Amphiprion melanopus</i>	ELH	Variability in growth rate	Green and McCormick, 2005
Pac. herring	<i>Clupea pallasii</i>	ELH	Higher abnormalities and dead embryos from first spawners	Ojaveer, 2006

Atl. herring	<i>Clupea harengus</i>	ELH	Larval length, yolk sac volume, RNA/DNA, lapillar area	Bang <i>et al.</i> , 2006
		ELH	Sires affected RNA and DNA content	Hoie <i>et al.</i> , 1999
		ELH	Size at hatch vary depending on sperm characteristics	Evans and Geffen, 1998
		ELH	Size at hatch	Panagiotaki and Geffen, 1992
Haddock	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	ELH	Hatching success, larval length, myotome height, jaw length and yolk size	Rideout <i>et al.</i> , 2004
		ELH	Larval length, yolk area, eye diameter, myotome height and growth rate	Probst <i>et al.</i> , 2006
Cod	<i>Gadus morhua</i>	ELH	Embryo survival, larval length, yolk area and utilization, resistance to starvation	Trippel <i>et al.</i> , 2005
Red drum	<i>Sciaenops ocellatus</i>	juvenile	Heritability in growth rate and shape	Saillant <i>et al.</i> , 2007
Eur. sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	ELH	Hatching rate	Saillant <i>et al.</i> , 2001
		1 year	Proportion of females, total length, body weight	Gorshkov <i>et al.</i> , 2003
Striped bass	<i>Morone saxatilis</i>	1 year	Weight, length, growth rate	Wang <i>et al.</i> , 2006
Winter flounder	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	larvae	Time to hatch, jaw length, length, myotome height, body area, head depth	Butts and Litvak, 2007a, b
		larvae	Pelagic growth rate	Fraboulet <i>et al.</i> , 2009

Upper part: freshwater species; lower part: marine species.

affect growth characteristics during the early juvenile stage in contrast to previous findings at the larval stage (Fraboulet *et al.*, 2009). It should be noted that the present study was done using the same half-sib families as those used by Fraboulet *et al.* (2009) and that the paternal effects observed in larvae were no longer present at settlement. Butts & Litvak (2007a) suggested that maternal and paternal effects probably vary and interact according to the specific trait and time through early ontogeny. Chambers & Leggett (1992) demonstrated that parentage had low but significant contributions to metamorphosis (*i.e.* settlement) in *P. americanus*, and that maternal effects probably exceed paternal ones at this stage. It would be interesting to test the effects of environmental conditions *versus* dam genetics on growth in young juveniles. In the wild, strong phenotypic variability in the early juvenile stage may allow newly settled larvae to better "match" their habitat conditions and may enhance recruitment. The parental contribution can be modified by the sum of the genetic effects, the environmental effects, the genetic and environmental interactions, and the genetic and environmental covariance (Conover, 1998), so caution must be used when interpreting data that measure genetic and environmental contributions to phenotypic variation.

Ontogeny effect

All half-sib groups were considered to be in good health, with condition factor values greater than 1.0. In *S. solea*, a Fulton's condition factor below 0.9 has been considered as an indicator of starvation or food limitation in juveniles (Amara *et al.*, 2007). Juveniles had good pigmentation, indicating efficient food assimilation (Sargent *et*

al., 1999; Bolker & Hill, 2000). Fin erosion, which is found in diseased *P. americanus* (Ziskowski & Murchelano, 1975), was low.

Variations in the biochemical indices revealed the high cost of metamorphosis in the early juvenile stage of *P. americanus*. The use of the RNA:DNA ratio as an indicator of growth is based on the premise that although the DNA content of somatic tissues remains relatively stable (index of cell number), the quantity of RNA is closely related to the rate of protein synthesis (index of a cell's capacity for protein synthesis), and thus reflects recent growth and nutritional condition (Buckley, 1984; Clemmesen, 1994; Buckley *et al.*, 1999). The decrease in DNA concentration observed through the experimental period may reflect not only the strong ossification process that occurs at the end of the metamorphosis, but also the prevalence of hypertrophic growth (*i.e.* cells growing without division). This usually occurs in juvenile fish (Mommsen, 2001) and represents an energy-saving way of increasing size (Geffen *et al.*, 2007). The RNA:DNA ratios observed here can be considered as low but are higher than ratios observed in starving early juvenile *P. americanus* reared in controlled conditions (de Montgolfier *et al.*, 2005). In hatchery-reared Japanese flounder *Paralychthys olivaceus* Temminck and Schlegel, juveniles with ratios greater than 2 were considered to be in good condition while lower values corresponded to starving (from 1 to 2) or dying (below 1) juveniles (Gwak & Tanaka, 2001). A ratio of 2 was also observed in fed laboratory-reared juvenile *S. solea* (Richard *et al.*, 1991) and in wild dab *Limanda limanda* Linnaeus and plaice *Pleuronectes platessa* Linnaeus juveniles (Gilliers *et al.*, 2004). Attention must be paid in

the interpretation of inter-species comparisons since the RNA:DNA threshold for starved fish appears to be species-specific (Malloy & Targett, 1994; Fukuda *et al.*, 2001; Gwak & Tanaka, 2001). Other comparisons with older individuals also appear restricted: in a field study conducted in the Magdalen Islands (Gulf of the Saint Lawrence, Eastern Canada), RNA:DNA ratios of around 5 were found in two- to three-year-old juvenile *P. americanus* living below mussel culture structures, which is an optimal habitat for growth (Clynick *et al.*, 2008).

The different lipid components have also been used as a measure of the nutritional and physiological condition of larval and juvenile fishes (*e.g.* Fraser, 1989; Håkanson, 1989a; Bell *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 2001; Dwyer *et al.*, 2003; Amara *et al.*, 2007). Within the 45 days that followed settlement, triacylglycerols, the most important energetic lipids, were almost depleted and the TAG:ST ratio declined by 66%. In *S. solea*, individuals that displayed TAG:ST ratios below 1.0 were considered to be in poor condition (Galois *et al.*, 1990; Amara & Galois, 2004). On the other hand, TAG:ST ratios were also found to be low in *P. americanus* larvae (Mercier *et al.*, 2004) and may be normal for this species in this environment. One could argue that differences in the TAG:ST ratio could be related to variations in environmental temperature, but since temperature did not vary during the experiment ($10.4 \pm 1.0^\circ \text{C}$), this is obviously not the case. These results indicate a strong mobilization of lipids in growth processes without any storage of energy reserves. This is illustrated by the large amount of AMPL present 45 days after settlement, which contain glycolipids and monoacylglycerols (Parrish *et al.*,

1998) and could represent catabolism products of energetic lipid compounds during growth. The AMPL class also includes pigments, and the predominance of this class at 45 DPS may corroborate the high level of pigmentation observed on juveniles.

Total protein content, which can be seen as an indicator of long-term growth (weeks to months), is also a measure of energy storage since proteins can be used as an energy source, particularly under conditions of severe stress (Ferron & Leggett, 1994; Mommsen, 2001). In controlled conditions, de Montgolfier *et al.* (2005) found protein:RNA ratios around 15, which is similar to the values obtained in our study and indicates a good synthesis rate. As an ultimate physiological response, survival was found to decrease slowly within the early juvenile stage; this was also found at the end of the metamorphosis in *P. olivaceus* (Gwak & Tanaka, 2001; Gwak *et al.*, 2003). All these results reveal the importance and the physiological cost of the synthesis processes that occur during the growth of young *P. americanus* juveniles that have to finalize their metamorphosis. They also suggest that the high energy allocation to developmental processes could limit expression of different growth patterns at this stage.

This study is thought to represent the first contribution concerning the paternal influence and physiological growth characteristics for the early juvenile stage of a flatfish in a cold environment. It was demonstrated that within the 45 days following settlement, *P. americanus* juveniles displayed good growth but that this ontogenetic stage was

energetically demanding, as indicated by the strong mobilisation of lipids for growth at the expense of lipid reserve accumulations. Moreover, no effect of sire origin on growth strategy was observed at this stage. Parental contributions to later life history traits should be investigated. In salmonids, after the embryo–alevin boundary had been found to correspond to an ontogenetic shift from the maternal genome influence to the alevin genome control, Perry *et al.* (2004) suggested that parental effects could further contribute to some reproductive traits.

**CHAPITRE III. GROWTH AND LIPID COMPOSITION OF WINTER
FLOUNDER JUVENILES REARED UNDER VARIABLE PHOTOPERIOD AND
TEMPERATURE CONDITIONS**

CROISSANCE ET COMPOSITION LIPIDIQUE DES JUVÉNILES DE PLIE ROUGE
ÉLEVÉS DANS DES CONDITIONS VARIABLES DE PHOTOPÉRIODE ET DE
TEMPÉRATURE

III.1 INTRODUCTION

In ectotherms, seasonal variations of environmental conditions are known to drive important life history traits, such as growth and reproduction. In fish, temperature is considered to be the dominant factor affecting growth rate because it acts as a rate-controlling factor for all chemical processes (Imsland and Jonassen, 2001). However, among other factors such as food availability or salinity, photoperiod appears to play a major role in the synchronization of growth processes (Falcón *et al.*, 2007). Photoperiod is considered as a directional factor (Brett, 1979, Björnsson *et al.*, 2000), controlling growth as a "zeitgeber" through its influence on endogenous rhythms (Stefánsson *et al.*, 1991; Imsland *et al.*, 1995; Boeuf and Le Bail, 1999) and stimulating the endocrine system to produce growth hormone (GH) (Björnsson, 1997). Most fish species display circadian rhythms close to 24 hours and circannual rhythms close to one year (Falcón *et al.*, 2007). They are also able to predict and anticipate environmental changes. It is usually expected that temperate fish species will gradually increase metabolism, feeding activity and growth when moved from short to long day length (Boehlert, 1981, Woiwode and Adelman, 1991).

A large number of photoperiod manipulation experiments have been conducted on salmonids with some emphasis on smoltification (*e.g.*, Clarke *et al.*, 1989, Solbakken *et al.*, 1994, Boeuf and Le Bail, 1999). In flatfishes, findings on the effects of continuous or

extended photoperiods on growth are contradictory. Both the absence (Fuchs, 1978) and presence (Fonds, 1979) of a photoperiod effect on the growth of common sole *Solea solea* (Linnaeus) have been reported. In juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus), an extended photoperiod was found to enhance growth in some experiments (Imsland *et al.*, 1995, Imsland *et al.*, 1997) while others found that it induced chronic stress, which inhibited growth (Stefánsson *et al.*, 2002). In juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Linnaeus), growth enhancement was obtained following the transfer from natural photoperiod to continuous light (Simensen *et al.*, 2000, Imsland *et al.*, 2006). Overall, it has been found that photostimulation enhances fish growth through higher food intake, but also through improved food conversion efficiency (Jobling, 1994, Boeuf and Le Bail, 1999, Jonassen *et al.*, 2000, Simensen *et al.*, 2000). However, sensitivity to photoperiod stimulation changes with season (Clarke *et al.*, 1989) and temperature (Solbakken *et al.*, 1994, Imsland *et al.*, 1995, Jonassen *et al.*, 2000), and both the direction and the rate of change in day length may influence these processes (Clarke *et al.*, 1978, Imsland and Jonassen, 2001).

In the northwest Atlantic, winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) is a common flatfish that lives in coastal waters from Georgia (USA, 33°N) to Newfoundland and southern Labrador (Canada, 53°N) (Buckley, 1989). It is a species that is euryhaline (salinity of 3 to 40) (McCracken, 1963) and eurythermic (−1.9°C to +23°C) (Percy, 1961, Duman and Devries, 1974). It has been identified as a candidate species for the diversification of Canadian aquaculture (Litvak, 1999). During the cold

season, winter flounder produces anti-freeze proteins at levels increasing proportionally with the freezing risk encountered in each region (Fletcher *et al.*, 1985, Harding *et al.*, 1999, Marshall *et al.*, 2004). Moreover, the production of anti-freeze proteins is inhibited by growth hormone production during periods of long day length, making growth rate inversely correlated to freeze resistance (Fletcher *et al.*, 2001). Adult winter flounder are known to cease feeding during winter months in the St. Lawrence estuary (Vaillancourt *et al.*, 1985) and Passamaquoddy Bay (McLeese and Moon, 1989). In the northern part of winter flounder distribution, settlement occurs in summer and metamorphosis causes drastic energy depletion (Fraboulet *et al.*, Chap. II). Thus, juveniles must have undergone sufficient growth and accumulated enough energy reserves during the fall to avoid high mortality in the winter.

We hypothesized that a long photoperiod would enhance growth and energy accumulation. Two experiments were carried out to investigate whether photoperiod and temperature manipulations would affect growth in juvenile winter flounder. Juvenile growth from settlement until 45 days following settlement was measured in natural and fixed long photoperiod conditions. Thereafter, the effects of combinations of natural and fixed long photoperiod and winter temperatures on juvenile growth and nutritional status during winter were studied. The levels of triacylglycerols (TAG), the major energy storage form in marine fish, is a good measure of energy storage and long-term growth potential, particularly in juveniles (Lochman *et al.*, 1995). TAG are the first lipid component to be mobilized during periods of stress while sterols (ST) or phospholipids

(PL) (structural lipids) remain relatively constant under various conditions (Fraser, 1989, Håkanson, 1989b). TAG/ST and TAG/PL ratios are thus widely used as condition indices (Ferron and Leggett, 1994, Parrish, 1999).

III.2 MATERIALS AND METHODS

All rearing experiments were conducted at the Station aquicole de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (48°31'N, 68°28'W, Quebec, Canada). Winter flounder breeders issued from the wild were maintained for two years in captivity under environmental conditions typical of the St. Lawrence estuary in 200 L rectangular tanks (0.8 m × 1.25 m × 0.2 m) with flowing (5 L min⁻¹) ambient filtered sea water. Fish were fed according to Plante *et al.* (2003). In spring, females were stripped and eggs fertilized according to Ben Khemis *et al.* (2000) in order to obtain full-sib families (one male with one female). Eggs and larvae were reared as described in Fraboulet *et al.* (Chap. II).

Post-settlement experiment

When metamorphosis occurred, newly settled larvae were collected every three days and transferred into small rectangular tanks (35.5 cm × 65 cm × 6.5 cm) with flowing filtered seawater (50 µm, 2 L min⁻¹) and substrate (commercial filtration sand). Tanks were loaded to an initial density of 400 individuals. Two photoperiod treatments were applied: natural photoperiod conditions (NP) and a fixed long photoperiod (LP), both with an intensity of 400 lux. For the fixed photoperiod, we used 14.5 hours of daylight, which corresponds to the photoperiod experienced during peak settlement in the study area. Seven tanks were surveyed for the NP treatment and five for the LP treatment. Temperature varied according to natural fluctuations (12°C to 8°C) (Figure 13). Newly

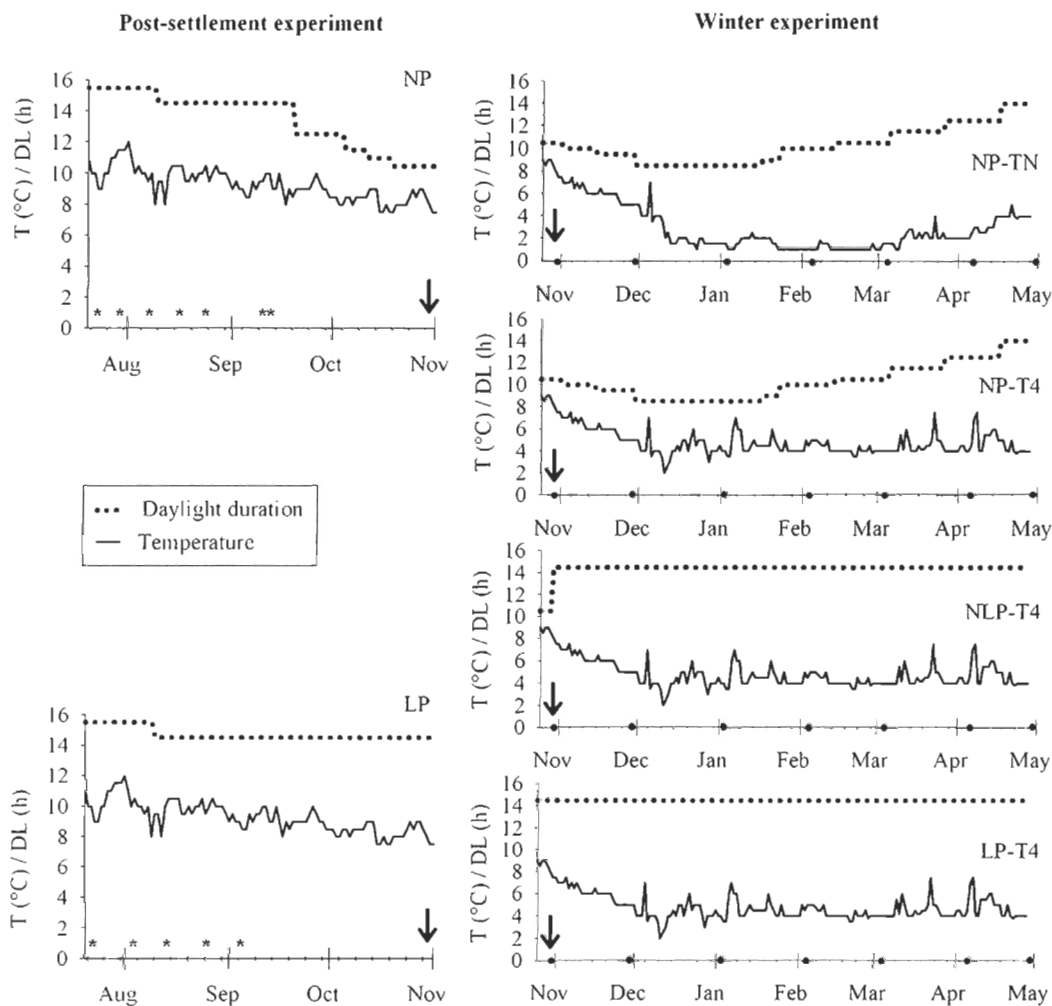


Figure 13. Photoperiod (DL: daylight duration in hours) and temperature ($^{\circ}\text{C}$) regimes applied during the two experimental periods. In the left panels, asterisks indicate replicate tank loading (settlement). Arrows indicate the start of winter experiment. In the right panels, the dots along the x axis indicate sampling times. The different treatments are identified as NP: natural photoperiod, LP: long photoperiod, NLP: transition from natural to long photoperiod for winter, TN: natural temperature and T4: temperature not below 4°C .

settled larvae were fed rotifers and commercial diet as described in Fraboulet *et al.* (Chap. II). In each tank, dead individuals and excess food were removed daily and tank substrate was changed every month. From 45 to 48 days post-settlement (DPS), rotifers were gradually removed and juveniles weaned onto a commercial diet. At 60 DPS, the size of pellets delivered to the juveniles was adjusted from 0.3 mm to 0.5 mm ($0.2 \text{ g day}^{-1} \text{ tank}^{-1}$; Gemma Wean Diamond, Skretting, St. Andrews, NB, Canada).

Winter experiment

At the end of October, juveniles previously exposed to natural photoperiod and temperature conditions were separated into three groups, each one of which was then exposed to different winter rearing conditions: 1) natural photoperiod and temperature (9°C to 1°C) typical of the St. Lawrence estuary (NP-TN); 2) natural photoperiod and a minimum winter temperature of 4°C (9°C to 4°C) (NP-T4); and 3) fixed long photoperiod (14.5L:9.5D) and a minimum winter temperature of 4°C (NLP-T4). Juveniles exposed to the fixed long photoperiod regime during the post-settlement stage was maintained under the same photoperiod and reared under temperature not going below 4°C (LP-T4) (Figure 13). For each treatment, three tanks (20 individuals per tank) were surveyed. Juveniles were fed daily with 0.2 g of the commercial diet. When temperatures dropped below 2°C (~January to March in tanks under natural temperature regime), juveniles were fed once every two weeks while those at 4°C were fed twice a week. Dead individuals and excess food were removed twice a week and the substrate

changed every month. The different photoperiod–temperature treatments were applied until the beginning of May (Figure 13).

Growth monitoring

In the post-settlement experiment, 10 juveniles per replicate tank were randomly sampled and measured at settlement (tank loading) and at 45 DPS using a digital camera (Evolution VF, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) coupled to a microscope (Olympus SZ61). Measurements of standard length (L_S) and body width (W_B ; first anal ray level) were done using Image Pro-Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Growth rates were calculated for each replicate using averaged values per tank ($G = [L_{S\ 45\ \text{DPS}} - L_{S\ 0\ \text{DPS}}] / 45$; in mm day^{-1}). Pigmentation and fin erosion were qualitatively evaluated at 45 DPS (0: 0%, 1: 1–20%, 2: 21–40%, 3: 41–60%, 4: 61–80%, 5: 81–100%; the 0 value corresponds to a total lack of pigmentation or erosion) according to de Montgolfier *et al.* (2005).

In the winter experiment, 10 juveniles from each photoperiod–temperature treatment were randomly sampled and measured (L_S and W_B) monthly as previously described. From February onward, juveniles were monitored individually; identification was based on morphological features (colour pattern, body shape). Thus, individual growth rates in L_S and W_B were calculated for the last three months of the experiment (*e.g.*, for L_S in February; $G_{\text{Feb.}} = [L_{S\ \text{Mar.}} - L_{S\ \text{Feb.}}] / \Delta\ \text{days}$; in mm day^{-1}). At the beginning

and end of the experiment, 10 juveniles per treatment were weighed (wet mass, M_w), rinsed, immediately frozen, and stored at -80°C until further lipid class analysis. Fulton's condition factor ($K = 100 \times [M_w / L_S^3]$) as well as pigmentation and fin erosion indices were also evaluated at these two stages.

Lipid class analyses

Lipid extraction was done on pools of two juveniles for those sampled in fall and on individual juveniles for those sampled in spring. Lipids were extracted in chloroform-methanol according to Parrish (1999) using a modified Folch procedure (Folch *et al.*, 1957). Lipid classes were determined using thin-layer chromatography with flame ionization detection (TLC/FID) by a Iatroscan MK-6 (Shell USA, Fredericksburg, VA, USA). Extracts were spotted on silica gel-coated chromarods (SIII, Shell USA), and three chromatogram periods with four different solvents were used to separate lipid classes into triacylglycerols (TAG), free sterols (ST), free fatty acids (FFA), phospholipids (PL), acetone-mobile polar lipids (AMPL), wax esters (WE), ketones (KET) and free aliphatic alcohols (ALC) (Parrish, 1987). Chromatograms were recorded using PeakSimple[®] software (v3.21, SRI Inc., Torrence, CA, USA) and peak areas were quantified using calibration curves obtained from scans of Sigma standards (Sigma Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA). Lipid classes were evaluated in $\mu\text{g mg}^{-1}$ (wet mass) then summed and expressed in percentage of total lipids.

Statistical analysis

All data analyses were done using statistical software (STATISTICA 7.0, Statsoft Inc. 2004) with a level of significance $\alpha = 0.05$. Normality and homoscedasticity of data were verified with the Komolgorov-Smirnov and the Brown-Forsythe tests, respectively (Quinn and Keough, 2002). Percentage data (lipid classes) were arcsine transformed to meet the model assumptions (Sokal and Rohlf, 1995). In the post-settlement experiment, L_S and W_B were analyzed by factorial two-way ANOVA (DPS \times photoperiod; n = number of replicate tank). Growth rates at 45 DPS were compared using one-way ANOVA (photoperiod) while pigmentation and fin erosion levels were compared using Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA (photoperiod).

In the winter experiment, the two initial groups were compared on Day 0 using one-way ANOVA (photoperiod) for L_S , W_B , K and M_w , and with Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA (photoperiod) for pigmentation and fin erosion levels (n = number of individuals). Standard length and body width were analyzed using two-way ANOVA (month \times photoperiod–temperature; n = number of individuals). From February, measurements were no longer independent because of high mortalities. Survivors were surveyed individually until May. Individual L_S and W_B , as well as their corresponding growth rates, were compared using two-way ANOVA designed for repeated measures (RM) (month \times photoperiod–temperature). The assumption of data sphericity in RM ANOVA was tested by Mauchley's test. When sphericity was not met, F values were

adjusted depending on the *epsilon* (ϵ) value using the Greenhouse-Geisser or the Huynh-Feldt correction of degrees of freedom (Quinn and Keough, 2002). At the end of the winter experiment (May), K factor and wet mass were compared using one-way ANOVA (photoperiod–temperature) while pigmentation and fin erosion levels were compared using Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA (photoperiod–temperature). Lipid classes, total lipids and TAG/PL and TAG/ST ratios were compared using one-way ANOVA in fall (photoperiod; n = number of pools) and in spring (photoperiod–temperature; n = number of individuals). *A posteriori* analyses were performed using multiple comparisons tests (Tukey HSD). When homoscedasticity of data was not met, *a posteriori* analysis was done using the Games and Howell multiple comparisons test (Sokal and Rohlf, 1995).

III.3 RESULTS

Post-settlement experiment

From settlement to 45 DPS, the photoperiod regime did not affect juvenile growth in length or width (Figure 14). Growth rates were identical between the two groups, with an overall average of 0.047 ± 0.014 mm day⁻¹ for L_S and 0.027 ± 0.006 mm day⁻¹ for W_B (one-way ANOVA; d.f. = 1, $P > 0.05$). These values represent increases of 32% in length and 60% in width in the first 45 days following settlement. At 45 DPS, juveniles also showed similar high pigmentation and low fin erosion indices (Figure 15).

Winter experiment

On Day 0, juveniles exposed to natural photoperiod since settlement were significantly longer, larger (Figure 16), and heavier (NP: 17.3 ± 8.6 mg; LP: 9.8 ± 4.1 mg; one-way ANOVA, d.f. = 1, $P < 0.05$) than juveniles reared under the fixed long photoperiod. However, the two groups displayed similar Fulton's condition factor (average 1.32 ± 0.29 ; one-way ANOVA, d.f. = 1, $P > 0.05$) as well as similar pigmentation and fin erosion indices (Figure 15). Juveniles also displayed similar total lipid contents ($\mu\text{g mg}^{-1}$ wet mass), lipid class compositions, and TAG/ST and TAG/PL ratios (Table IV). PL and ST were predominant at this stage, representing respectively about 74% and 21% of total lipids, while TAG, FFA and AMPL represented less than 5%.

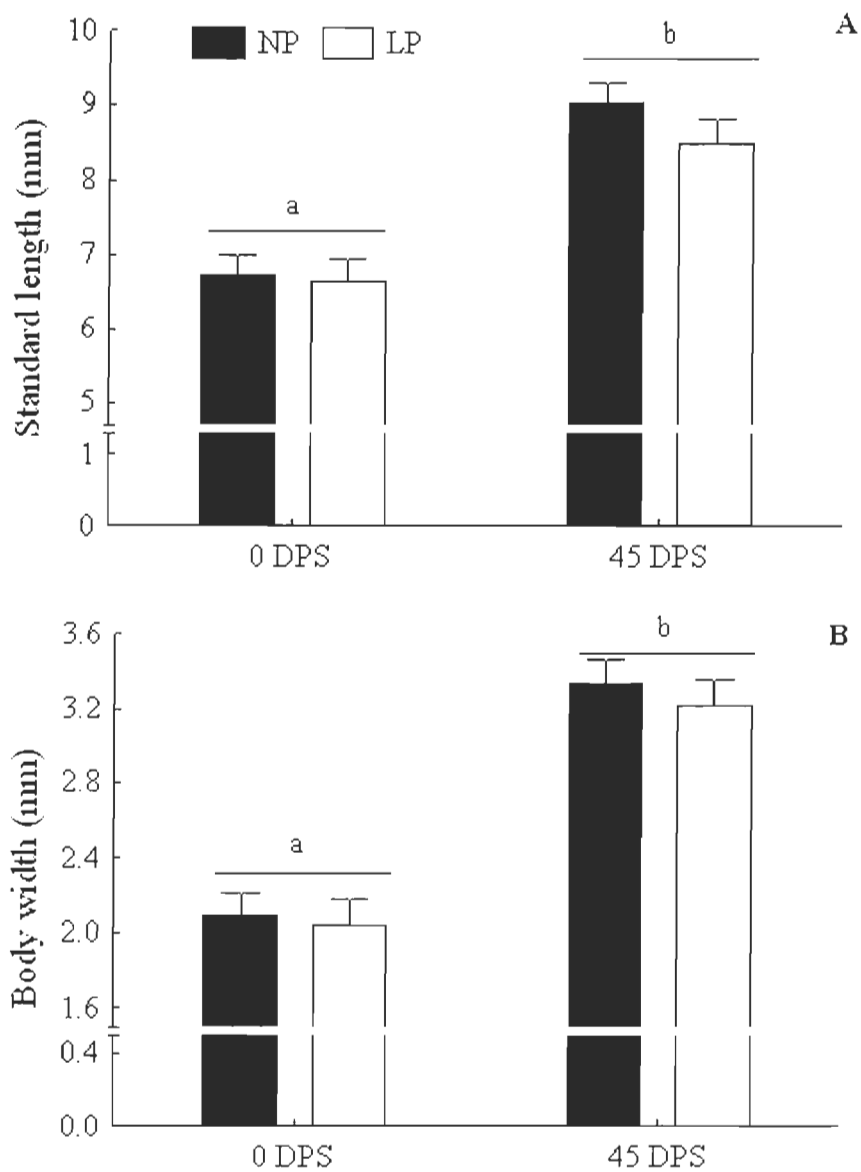


Figure 14. Standard length (A) and body width (B) of winter flounder juveniles reared under natural (NP) and long photoperiod (LP) from settlement to 45 days post-settlement (DPS). Data are expressed as mean \pm sd. Different letters indicate significant differences among stages (two-way ANOVA; d.f. = 1, $P < 0.001$).

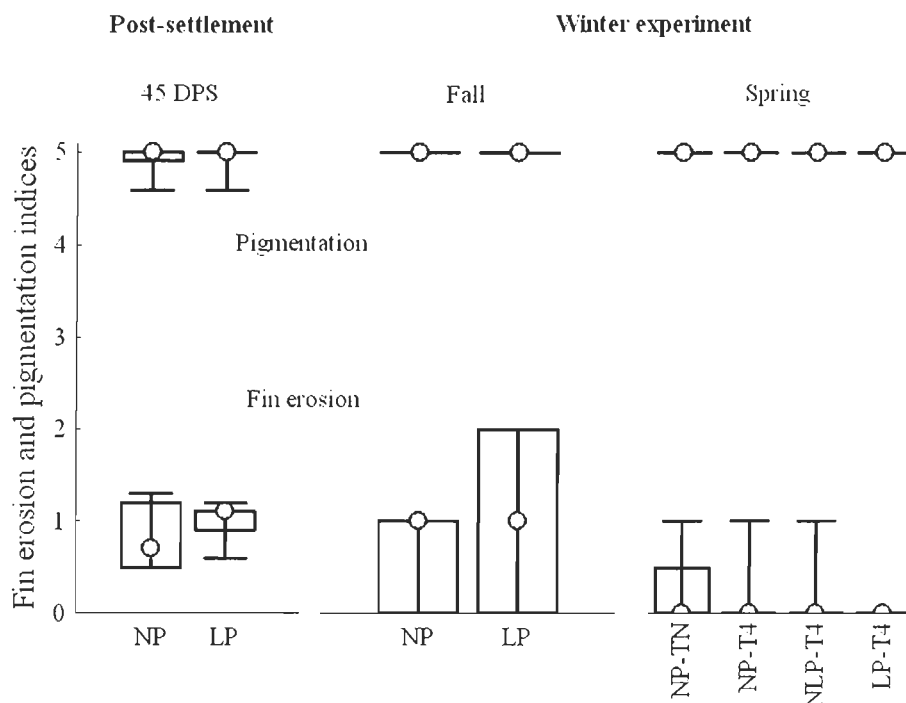


Figure 15. Fin erosion and pigmentation indices of juvenile winter flounder at 45 days post-settlement (DPS) at the beginning (fall) and end (spring) of the winter experiment. The different treatments are identified as NP: natural photoperiod, LP: long photoperiod, NLP: transition from natural to long photoperiod for winter, TN: natural temperature and T4: temperature not below 4°C. Data are presented as median values (\circ), quartile dispersions (bars: 25–75%), and full ranges of the data (spreads). The qualitative scale values are defined in the Materials and Methods section. Kruskal-Wallis tests; $N_{45\text{DPS}} = 12$, $N_{\text{Fall}} = 20$, $N_{\text{Spring}} = 30$, $P > 0.05$. For pigmentation indices in the winter experiment, bars and spreads overlap because all fish were totally pigmented.

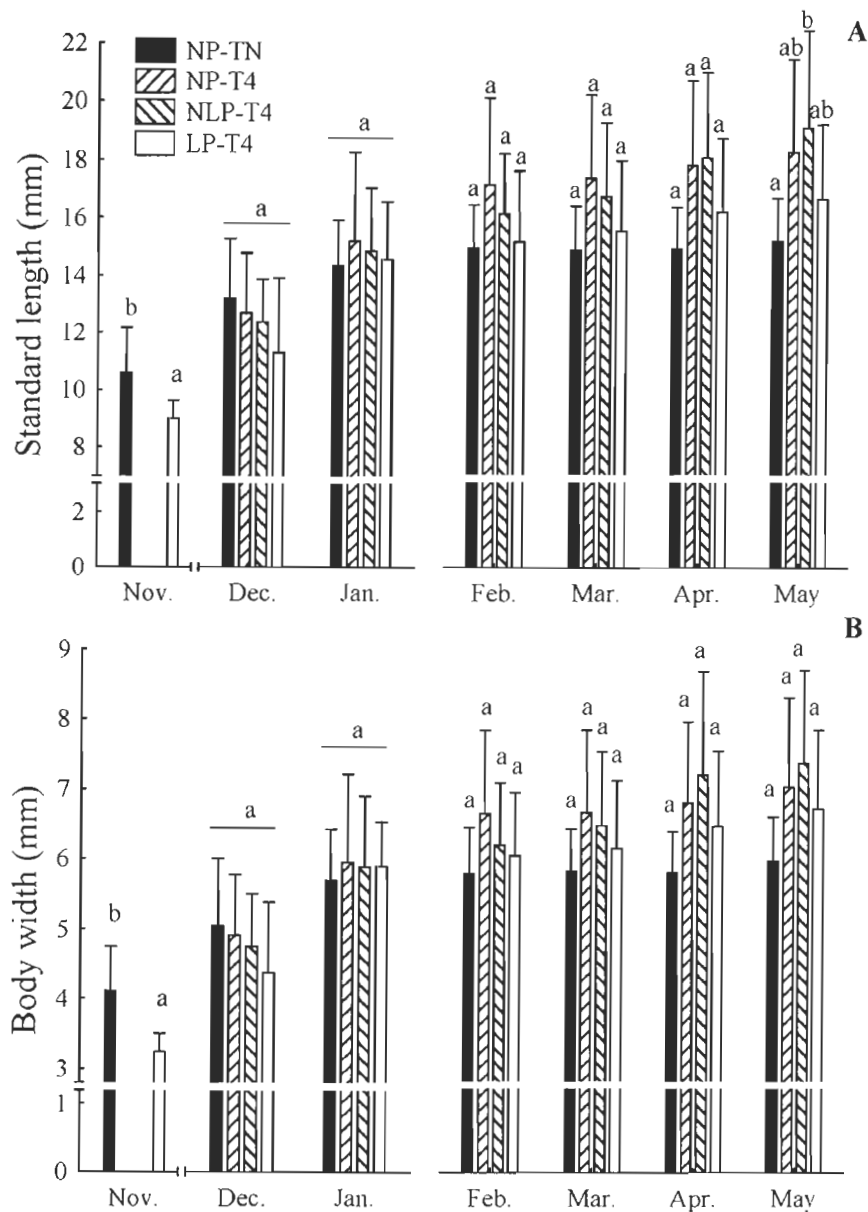


Figure 16. Standard length (A) and body width (B) variations of juvenile winter flounder during the winter experiment. The different treatments are identified as NP: natural photoperiod, LP: long photoperiod, NLP: transition from natural to long photoperiod for winter, TN: natural temperature and T4: temperature not below 4°C. Data are expressed as mean \pm sd. Interruptions in the time axis indicate separate analyses. Different letters indicate significant differences among treatments for each sampling period. (Nov.: one-way ANOVA, d.f. = 1, $P < 0.001$; from Feb. to May: two-way RM ANOVA, d.f. = 3, $P < 0.05$.)

Table IV. Lipid composition of winter flounder juveniles at the beginning (fall) and end (spring) of the winter experiment. Lipid classes are expressed in percentage of total lipids and total lipids in $\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet mass. Data are presented as mean \pm sd. Different letters indicate significant differences among groups (one-way ANOVA; $df = 3, 26$; $P < 0.05$). There is no difference between groups in the fall (one-way ANOVA; $df = 1, 6$; $P > 0.05$).

Fall	NP			LP		
Spring		NP-TN	NP-T4	NLP-T4		LP-T4
% TAG	1.8 \pm 2.9	4.9 \pm 5.3 y	16.3 \pm 12.5 yz	24.4 \pm 13.4 z	0.4 \pm 0.1	16.9 \pm 15.7 yz
% FFA	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4 y	2.2 \pm 1.7 yz	2.9 \pm 1.2 z	0.1 \pm 0.1	1.5 \pm 1.8 yz
% ST	21.0 \pm 3.4	19.1 \pm 4.7 z	13.5 \pm 3.1 yz	10.7 \pm 2.3 y	21.6 \pm 1.9	13.3 \pm 6.0 yz
% AMPL	2.5 \pm 0.7	2.6 \pm 1.3	2.2 \pm 0.8	2.0 \pm 1.2	3.4 \pm 0.5	2.1 \pm 1.2
% PL	74.0 \pm 2.1	72.1 \pm 5.2	65.0 \pm 11.0	59.5 \pm 12.8	73.9 \pm 2.0	65.9 \pm 11.7
Total lipids	527 \pm 51	380 \pm 105 y	680 \pm 170 z	803 \pm 223 z	451 \pm 70	537 \pm 128 yz
TAG/ST	0.11 \pm 0.18	0.29 \pm 0.32 y	1.04 \pm 0.98 yz	1.79 \pm 1.10 z	0.02 \pm 0.004	1.75 \pm 1.86 yz
TAG/PL	0.02 \pm 0.04	0.07 \pm 0.08	0.22 \pm 0.20	0.33 \pm 0.18	0.01 \pm 0.001	0.30 \pm 0.33

NP: natural photoperiod, LP: long photoperiod, NLP: transition from natural to long photoperiod for winter, TN: natural temperature and T4: temperature not below 4°C. TAG: triacylglycerols, FFA: free fatty acids, ST: sterols, AMPL: acetone mobile polar lipids, PL: phospholipids.

In December and January, the photoperiod–temperature conditions did not affect juvenile growth in length or width (two-way ANOVA; d.f. = 3, $P > 0.05$) (Figure 16). During this period, juveniles increased in length by approximately 20–25%. From February to May, length varied differently among the photoperiod–temperature treatments (two-way RM ANOVA, interaction; d.f. = 9, $P < 0.001$) (Figure 16). From February to April, length increase was similar in the different treatments, but NLP-T4 juveniles were 26% longer than NP-TN in May (Figure 16). Width significantly increased from March to May (two-way RM ANOVA; d.f. = 3, $P < 0.001$), but no difference was found among juveniles exposed to the different treatments (Figure 16). From February to May, NLP-T4 juveniles displayed higher individual growth rates in length and width than those from the other groups (Table V). Overall, growth rates in length were higher in May than in February while those in width were similar each month (Table V).

In May, NLP-T4 juveniles were 114% heavier and contained 112% more lipids than NP-TN ones while Fulton's condition factors were similar among groups (Table V). NP-TN juveniles had the lowest concentration of total lipids (Table IV). NLP-T4 juveniles contained more TAG and FFA and lower ST than NP-TN juveniles; thus they also had a higher TAG/ST ratio (Table IV). The different groups had similar TAG/PL ratios (mean = 0.224 ± 0.206) as well as similar proportions of AMPL and PL (Table IV). PL were predominant and represented around 65% of the total lipids. TAG and ST represented around 16% and 14% of total lipids, respectively, while FFA and AMPL represented less than 5% of total lipids.

Table V. Biological characteristics of winter flounder juveniles during the winter experiment. Data are presented as mean \pm sd. G : monthly individual growth rate in standard length (SL) and body width (BW). No significant interaction between factors was present. A significant treatment effect was observed for G_{LS} and G_{BW} in NLP-T4 juveniles, which displayed higher growth rates (in bold) (two-way RM ANOVA, $df = 3, 26$; $P < 0.001$). Different letters indicate significant differences between months (two-way RM ANOVA; $F_{2, 52} = 4.53$; $P = 0.015$). Wet mass and condition factor were measured at the end of the winter experiment. Different letters indicate significant differences among groups (one-way ANOVA; $F_{3, 26} = 3.16$; $P = 0.041$).

	NP-TN	NP-T4	NLP-T4	LP-T4	Mean
G_{SL} (mm/d)					
February	-0.002 \pm 0.003	0.007 \pm 0.011	0.020 \pm 0.017	0.012 \pm 0.004	0.009 \pm 0.014 y
March	0.003 \pm 0.008	0.015 \pm 0.016	0.043 \pm 0.020	0.021 \pm 0.020	0.021 \pm 0.022 yz
April	0.011 \pm 0.016	0.021 \pm 0.020	0.047 \pm 0.047	0.021 \pm 0.020	0.026 \pm 0.032 z
G_{BW} (mm/d)					
February	0.001 \pm 0.005	0.001 \pm 0.006	0.009 \pm 0.008	0.003 \pm 0.003	0.004 \pm 0.007
March	-0.001 \pm 0.004	0.004 \pm 0.006	0.023 \pm 0.020	0.010 \pm 0.009	0.009 \pm 0.015
April	0.008 \pm 0.009	0.011 \pm 0.010	0.008 \pm 0.013	0.012 \pm 0.009	0.009 \pm 0.010
Wet mass (mg)	58.4 \pm 14.4 y	112.2 \pm 52.1 yz	124.9 \pm 58.5 z	89.0 \pm 50.3 yz	
Condition Factor	1.72 \pm 0.15	1.80 \pm 0.17	1.78 \pm 0.19	1.86 \pm 0.31	

NP: natural photoperiod, LP: long photoperiod, NLP: switched from natural to long photoperiod for winter, TN: natural temperature and T4: temperature not below 4°C.

III.4 DISCUSSION

Post-settlement experiment

Following settlement, juvenile growth was not influenced by the photoperiod treatment. The high energy demand of this critical developmental stage could limit growth even under environmental conditions thought to enhance it. In a previous study, we showed that within the 45 days post-settlement, ontogenetic processes (*i.e.*, finalization of metamorphosis) required large amounts of energy reserves, as illustrated by a marked TAG depletion in early juveniles (Fraboulet *et al.*, Chap. II). Moreover, decreases in activity (Jearld Jr. *et al.*, 1993), growth rate (Bertram *et al.*, 1997) and oxygen consumption (Laurence, 1975) have been reported in winter flounder during metamorphosis, and such reductions in growth reflect the cost of physiological changes that occur during flatfish metamorphosis (see review in Geffen *et al.*, 2007).

Winter experiment

Despite small differences in size and weight at the onset of the winter experiment, juveniles exposed to the two photoperiod regimes since settlement had a similar physiological condition. In common sole, a Fulton's condition factor below 0.9 has been considered as an indicator of starvation or food limitation in juveniles (Amara *et al.*, 2007). With an average condition factor of 1.3, juveniles in our experiment appeared to be in good condition. Nevertheless, in the fall, TAG—the most important energy storage

form in young fish (Fraser, 1989)—only represented 1.1% of total lipids. Juvenile growth during the fall must then rely on food acquisition since juveniles did not store energetic lipids before the onset of winter.

The growth of NLP-T4 juveniles at the end of winter was significantly higher than the growth of juveniles subjected to natural conditions. Since LP-T4 juveniles did not show higher growth than NP-T4 juveniles, growth enhancement appeared to be triggered by the photoperiod transition from natural to long photoperiod before winter. Moreover, this growth enhancement did not appear to be related to the difference in temperature conditions between the NLP-T4 and NP-TN treatments, since NP-T4 juveniles did not show higher growth than NP-TN ones at the end of winter. One could argue that juveniles exposed to natural conditions were fed less, but the frequency of food distribution was adjusted according to the quantity of uneaten food, which was more abundant in tanks exposed to natural conditions. Indeed, at very low temperatures (below 2°C), juveniles displayed very low activity and no observable feeding behaviour.

Considering the overall results, juveniles seemed to have reacted to the autumnal transition period as a "reduced" winter and then displayed high feeding activity during winter due to the summer photoperiod signal. In winter flounder, seasonal physiological performance is highly dependent on the GH cycle. In winter, the decrease in GH along with a shortening photoperiod results in reduced growth and an enhanced production of

antifreeze protein (Fletcher *et al.*, 2001). Thus, increased growth is probably achievable by respecting this endogenous dependence to seasonal signal variations. Photoperiod effects in fish are either the result of the rate and direction of changes in day length (differential effects) (Eriksson and Lundqvist, 1980) or the absolute day length (proportional effects) (Clarke *et al.*, 1978). However, the mechanisms involved in photostimulation of growth are not clear. The endocrine system appears to be involved, particularly through GH and insulin-like growth factor production (see reviews in Boeuf and Le Bail, 1999, Imsland and Jonassen, 2001). Melatonin (considered to be a "time-keeping" molecule) is also involved in annual physiological processes including growth, reproduction and smoltification (for migrating salmonids) as well as in numerous daily processes such as locomotor and feeding activities, vertical migration, osmoregulation and metabolism (see review in Falcón *et al.*, 2007). Further studies are needed to assess the hormonal role in this positive response to photoperiod manipulation in winter flounder juveniles.

Lipid contents observed at the end of winter may support the hypothesis of higher foraging and greater lipid metabolism during winter since NLP-T4 juveniles contained twice as much total lipids and stored five times more TAG and FFA than NP-TN ones. Total lipids and TAG contents have been shown to be related to the long-term growth potential and survival in fish (*e.g.*, Fraser, 1989, Sogard and Olla, 2000, Norton *et al.*, 2001, Sabatés *et al.*, 2003). Thus, high concentrations of lipids could represent an

important physiological advance at the onset of the next growing season and could be interesting for juvenile stock enhancement.

NLP-T4 juveniles also displayed higher TAG/ST ratios than NP-TN juveniles, which could support the hypothesis of its higher feeding activity during winter. Sterols (ST) and phospholipids (PL) are structural lipids and are generally directly related to the mass of individuals (Fraser, 1989), as observed in this study. Sterol incorporation in cellular membranes is related to temperature variations, a process known as homeoviscous adaptation (HVA), *via* changes in phospholipid headgroups, fatty acid composition and/or cholesterol content (Hazel, 1995, Crockett, 1998). The differences in TAG/ST ratios observed among treatments could then be related to different HVA processes. No difference in energy accumulation was observable among groups through TAG/PL ratios, but this ratio could also have been biased because PL, as well as ST, may be used in metabolic processes during periods of stress (Fraser, 1989, Håkanson, 1989b).

In the second experiment, treatment effects were only observed after three months. Juveniles probably needed time to react physiologically to such a sudden photoperiod change. In another Pleuronectidae, Simensen *et al.* (2000) found positive effects on growth in juvenile halibut transferred from a photoperiod of 8L:16D to continuous light. They also observed a delay of at least 21 days in the response to the photoperiod manipulation that reflected the necessity of an adaptation period. Moreover, this delay

may be linked to the temperature decrease experienced by juveniles from both groups in November and December (from 9°C to 4°C or 1°C). In juvenile haddock *Melanogrammus aeglefinus* (Linnaeus), Trippel and Neil (2003) observed that the effects of photoperiod on growth declined as temperature decreased in late fall and winter. Further studies are required to assess the effects of the rate and seasonal timing of such a photoperiod transition on the intensity and time-lag in the physiological response.

Juveniles in all treatments were in good condition at the end of the winter. They displayed Fulton's factors of about 1.8 in May, which was 38% higher than during the fall. In juvenile turbot (*S. maximus*), a 25% increase in the condition factor was observed between January and April, independent of the photoperiod and temperature conditions experienced (Imsland *et al.*, 1995). Juveniles also showed low fin erosion and complete pigmentation of the ocular side; successful pigmentation is generally associated with good food assimilation (Sargent *et al.*, 1999, Bolker and Hill, 2000) while high fin erosion is characteristic of disease in winter flounder (Ziskowski and Murchelano, 1975).

Improved growth was observed in juveniles that experienced fall photoperiod and temperature decrease before to be exposed to a fixed long photoperiod and a minimum winter temperature of 4°C, indicating the necessity to respect some endogenous cycles. Further studies should be conducted to optimize the photoperiod transition procedure (*e.g.*, seasonal timing, rate of change) in order to decrease the lag in the response time.

Long-term effects of photoperiod manipulations should also be assessed because they may influence the maturity schedule, as has been observed in turbot (Imsland *et al.*, 1997) and Atlantic cod *Gadus morhua* (Linnaeus) (Imsland *et al.*, 2007).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette thèse comportait différents objectifs relatifs à l'étude de la croissance des jeunes stades de plie rouge originaires de différentes régions géographiques ainsi qu'au développement de leur élevage dans des conditions pouvant présenter des effets négatifs sur la croissance. Comme certains aspects précis de ces objectifs ont été discutés au cours des différents chapitres de cette thèse, nous ne reviendrons dans cette discussion que sur les aspects plus généraux.

À la suite de plusieurs séries d'expériences conduites dans les conditions environnementales rencontrées par la population la plus septentrionale de notre étude (estuaire maritime du Saint-Laurent : ES), nous avons pu mettre en évidence certaines différences de traits d'histoire de vie entre les différentes populations étudiées. Premièrement, il nous a été possible d'étudier les géniteurs capturés dans leur milieu naturel au moment de la reproduction. Nous avons remarqué chez les plies de ES que les mâles étaient plus petits et que les femelles, malgré l'absence apparente de différence de taille ou de condition, produisaient de plus petits œufs que celles de la baie des Chaleurs (BC) et de la baie de Passamaquoddy (PB). Cependant, nous n'avons pas observé de différence de pourcentage de fécondation, de pourcentage de survie ou de taille à l'éclosion qui auraient pu indiquer une différence de qualité des gamètes entre les populations (Kjørsvik *et al.*, 1990, Brooks *et al.*, 1997, Kamler, 2005). Deuxièmement, nous avons également noté que les plies de BC et PB se reproduisaient dès le début du

mois de mai alors que les femelles de ES n'ovulaient qu'à partir du mois de juin. Cette différence a persisté au fil des années alors que les trois populations étaient maintenues en captivité dans les conditions environnementales de ES (température, photopériode, salinité). Chez les poissons, la période de reproduction est connue pour être déclenchée à la suite de l'intégration par l'axe gonado-hypothalamo-hypophysaire des changements dans les cycles de température et de photopériode (*e.g.*, Bromage *et al.*, 2001). La persistance d'une telle différence dans des conditions environnementales fluctuantes dénote cependant un important déterminisme endogène reflétant une réponse évolutive spécifique à chaque population testée.

Avec la période de reproduction la plus tardive des trois régions étudiées, les plies de ES se retrouvent confrontées à la plus courte saison de croissance ainsi qu'à des températures estivales plus faibles. Ces différences nous laissaient présager que les larves de ES avaient dû développer des processus de croissance plus performants pour contrebalancer les effets négatifs que ces conditions représentent pour la croissance, comme cela a été observé chez différentes espèces de poissons marins (*e.g.*, Conover et Schultz, 1995). Cependant, nous avons observé que les plies originaires de ES présentaient une croissance larvaire inférieure à celles issues de populations plus méridionales. Dans une étude réalisée sur des larves de plie rouge issues de PB et du Banc Georges, deux populations bien distinctes géographiquement, Butts et Litvak (2007a, b) ont démontré que celles de PB présentaient une croissance larvaire inférieure à celles du Banc Georges et ont conclu que la théorie de variation de la croissance à

contre-gradient (Conover, 1992) ne semblait pas s'appliquer à cette espèce. Nos résultats pourraient venir appuyer cette conclusion, mais il serait judicieux d'étudier la croissance larvaire de ces trois populations dans les conditions environnementales représentatives des deux autres régions étudiées avant de conclure sur la dynamique de croissance des jeunes stades de plie rouge dans nos régions (Present et Conover, 1992).

Les expériences effectuées dans le cadre du second chapitre avec les familles demi-frères ne nous ont pas permis de discerner de différences de croissance pendant les six premières semaines de vie benthique des juvéniles qui avaient préalablement présenté des croissances différentes pendant la phase larvaire. Lors d'études réalisées avec des plies de la baie de Passamaquoddy, Bertram *et al.* (1993, 1997) avaient remarqué la présence d'un phénomène de croissance compensatoire chez les juvéniles ayant présenté une croissance inférieure pendant la phase larvaire. Cependant, ils ont souligné que la croissance des juvéniles restait globalement parallèle quelque soit les différences de croissance larvaire et d'âge à la métamorphose, et que l'évaluation de ces phénomènes compensatoires nécessitait une analyse individuelle (Bertram *et al.*, 1997). Dans notre étude, les indicateurs biochimiques de croissance (*i.e.*, les ratios ARN / ADN et TAG / ST) relevés durant la période suivant la déposition indiquent que la croissance durant les premières étapes de vie benthique nécessite beaucoup d'énergie. Ainsi, il semble qu'au début de la vie des juvéniles de plie rouge, l'expression de différentes stratégies de croissance pouvant être déterminées par des génotypes différents soit limitée par les importants processus ontogéniques associés à la finalisation de la métamorphose. De

plus, dans le troisième chapitre, nous avons également constaté que, même au cours de l'automne suivant la déposition, les jeunes juvéniles semblaient encore allouer toute l'énergie disponible dans leur croissance, sans pouvoir accumuler de réserves lipidiques en prévision de l'hiver. Toutes ces observations nous conduisent à penser que la croissance des jeunes juvéniles de plie rouge est d'avantage contrôlée par des facteurs environnementaux (*e.g.*, température, disponibilité de nourriture) que par des facteurs endogènes héréditaires illustrant une adaptation spécifique à un régime de conditions environnementales donné.

Si nous n'avons pu observer de différences de croissance entre les différentes populations testées qu'au stade pélagique, nous avons toutefois pu vérifier que cette différence était une caractéristique en partie déterminée par des facteurs transmis par le père. En effet, l'un des objectifs de cette thèse consistait à évaluer l'implication des mâles dans le déterminisme de la dynamique de croissance des jeunes stades de plie rouge. Jusqu'ici, des effets paternels avaient été majoritairement détectés au travers d'interactions d'effets paternels \times maternels dans des expériences aux designs factoriels, le plus souvent au cours des premières étapes de développement larvaire. Cependant, il s'avère que peu d'effets paternels ont été détectés chez des juvéniles de poissons marins. Notons que nos conclusions sur la limitation de l'expression de différentes stratégies de croissance par les contraintes ontogénétiques de la métamorphose illustrent ce manque d'observations. On y constate également que dans l'étude de Butts et Litvak (2007a, b), la différence de croissance observée entre les larves issues de PB et du Banc Georges a pu

être attribuée à des facteurs paternels, mais soulignons que ces effets n'ont été observés que sur certains traits morphologiques et seulement à certaines étapes du développement larvaire.

Dans cette thèse, nous avons clairement démontré, à l'aide de deux séries d'expériences en milieu similaire, que la plus faible croissance larvaire de ES était une caractéristique héritable des pères pouvant être observée tout au long de la phase pélagique. À notre connaissance, c'est la première fois qu'un effet paternel lié à l'origine géographique est observé aussi nettement chez un poisson marin. Cette démonstration fut toutefois réalisée par l'utilisation de croisements de type demi-frère où ce ne sont que les femelles de BC qui ont été fécondées par des mâles de différentes origines. Or nous pouvons observer que dans l'expérience avec les plein-frères, les larves ♀BC × ♂BC présentaient une croissance supérieure à celles de ♀ES × ♂ES alors que pendant l'expérience avec les demi-frères, les larves ♀BC × ♂BC présentaient une croissance similaire aux larves ♀BC × ♂ES, indiquant probablement la présence d'effets maternels. La réalisation d'une série de croisements au design factoriel complet (chacune des femelles des trois origines croisées avec chacun des mâles des trois origines) nous aurait permis de séparer les effets paternels des effets maternels et d'évaluer leurs interactions (Falconer et Mackay, 1996), mais notons qu'il nous a été impossible de réaliser l'intégralité de ces croisements en raison des niveaux de maturation très variables chez les plies de ES et PB.

Bien que préliminaires, des résultats intéressants ont été obtenus lors de l'analyse génétique des juvéniles hybrides présentée en annexe de cette thèse. En effet, sans pouvoir conclure sur des différences parentales de transmission des gènes, nous avons toutefois mesuré un nombre plus important de copies des gènes codant pour la protéine antigel hyperactive (HYP TYPE I) et l'isoforme HPLC-6 dans le génome des juvéniles fécondés par des mâles de ES que dans celui de ceux fécondés par les mâles des autres régions. Rejoignant les observations de Hayes *et al.* (1991) sur la présence d'un nombre variable de copies du gène codant pour les protéines antigel de type I entre les différentes populations de plie rouge des régions atlantiques, l'importante différence de potentiel de résistance au gel entre les trois populations testées dénote une importante différence de réponse évolutive. De plus, nos résultats semblent indiquer que la population de l'estuaire maritime du Saint-Laurent possède le meilleur potentiel de résistance au gel. Cependant, cette observation ne pourra être vérifiée qu'après la finalisation des travaux de G. Martinez et V. Ewart sur les souches pures.

Dans un contexte où encore peu d'études ont été réalisées dans le but de caractériser les différentes populations de plie rouge présentes dans les eaux canadiennes (DeCelles et Cadrin, 2007), les différences de traits d'histoire de vie mesurées au cours de cette thèse (*i.e.*, période de reproduction, croissance larvaire, résistance au gel) semblent toutes être liées à une différence d'adaptation locale et permettent d'émettre l'hypothèse que la population de plie rouge présente dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent se distingue des populations de la baie des Chaleurs et de la baie de

Passamaquoddy. Alors qu'à l'heure actuelle, toutes les populations de plie rouge de la zone 4T de l'OPANO (sud du golfe du Saint-Laurent) sont gérées comme une seule entité (Morin *et al.*, 2002), nos résultats suggèrent que les plies de la zone 4Tm (baie des Chaleurs) et celles de la zone 4Tq (estuaire maritime du Saint-Laurent) pourraient être considérées comme constituant deux stocks distincts.

Étant donné que ce projet fut également réalisé dans une optique de développement aquacole, un des objectifs de cette thèse consistait à optimiser l'élevage des juvéniles au cours de leur première année. Un dispositif expérimental constitué de trois modules séparés contenant chacun 12 petits bassins plats individuellement alimentés en eau fut spécialement mis en place pour ce projet et fut utilisé avec succès. La première amélioration fut constatée après l'arrêt de l'utilisation d'artémies comme proies vivantes jusqu'au sevrage complet des juvéniles. Cette modification fut apportée en raison de l'importante mortalité post-métamorphique rencontrée lors de la première année d'expérimentation. En effet, les *nauplii* d'artémies non enrichis présentaient des concentrations importantes en acide gras de faible valeur nutritionnelle (Seychelles, 2008) et étaient très contraignants à maintenir en production. Les rotifères enrichis, quant à eux, présentaient un très bon profil lipidique (Seychelles, 2008). De plus, la présence de plus petites proies vivantes semblait favoriser la capture des particules de moulée commerciales par les plies en alimentation mixte (proies vivantes + moulée). L'utilisation de rotifères enrichis comme proies vivantes semble être un moyen efficace d'améliorer la consommation de moulée chez les jeunes juvéniles de plie rouge. D'après notre

expérience personnelle et les travaux réalisés en parallèle par Michel Bélanger sur le protocole de sevrage (Bélanger, 2008), le meilleur moment pour sevrer les juvéniles de plie rouge semble intervenir entre le premier et le second mois suivant la déposition.

Cependant, l'amélioration majeure apportée à l'élevage des juvéniles au cours de cette thèse résulte de la manipulation du régime de photopériode pendant la saison "froide" (automne et hiver). Alors que nous supposions que l'élevage des juvéniles avec une photopériode longue et fixe depuis la déposition entraînerait une augmentation de leur croissance (d'après Litvak, 1999), les résultats obtenus au cours du troisième chapitre de cette thèse n'ont pas révélé d'effets positifs d'une telle pratique comparativement à l'usage de régimes naturels de photopériode et de température. Cependant, nous avons démontré que le fait d'appliquer une photopériode longue et fixe pendant l'hiver sur des juvéniles ayant été préalablement exposés à la diminution naturelle de photopériode pendant l'automne provoquait une augmentation significative de leur croissance associée à une accumulation importante de lipides énergétiques. Une réponse similaire avait déjà été observée chez des juvéniles de flétan de l'Atlantique (*H. hippoglossus*) transférés subitement d'une photopériode courte à une photopériode longue (Hallaråker *et al.*, 1995, Simensen *et al.*, 2000). Cependant, c'est la première fois qu'un effet positif de la manipulation du régime de photopériode est observé sur la croissance de la plie rouge. Nos travaux suggèrent donc qu'il est possible de s'affranchir de la diminution de croissance hivernale naturelle en modifiant artificiellement les cycles de température et de photopériode auxquels sont soumis les juvéniles de plie rouge. Ces

observations peuvent ainsi s'avérer pertinentes dans le cadre du développement de l'élevage de cette espèce au Canada.

CONCLUSION GÉNÉRALE

D'une manière générale, cette thèse visait à étudier la croissance des jeunes stades de plie rouge originaires de différentes régions géographiques dans le but d'améliorer la caractérisation de certaines populations présentes au Canada. Les expériences en milieu similaire réalisées au cours de cette thèse nous ont permis d'identifier d'importantes différences de traits d'histoire de vie entre les différentes populations testées. Ainsi, la population de plie rouge vivant dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent présente notamment une période de reproduction plus tardive, une croissance larvaire inférieure et un potentiel de résistance au gel supérieur à celles de la baie des Chaleurs et de la baie de Passamaquoddy, indiquant probablement que cette population est distincte des deux autres.

Nos travaux ont permis de démontrer d'une façon claire que la plus faible croissance larvaire des plies de l'estuaire maritime du Saint-Laurent était partiellement déterminée par des facteurs transmis par le père. Cependant, nous n'avons pas détecté d'effets paternels dans la croissance des juvéniles post-métamorphiques (fortes contraintes ontogénétiques).

Au cours de cette thèse, nous avons porté une attention particulière à l'étude des juvéniles pendant les périodes suivant la déposition grâce à la mise en place d'un

nouveau dispositif d'élevage expérimental. Nos travaux ont permis de révéler la présence d'une taille limite à la déposition et de constater l'importante diminution des ressources énergétiques lipidiques pendant les étapes de développement post-métamorphiques, processus probablement impliqué dans les pics de mortalité observés à l'automne. De plus, nous avons développé un moyen efficace de palier à la diminution de croissance hivernale en exposant les juvéniles à une photopériode estivale dès la fin de l'automne et en maintenant une température permettant une bonne activité métabolique tout au long de l'hiver. D'une manière générale, nos travaux auront grandement contribué à l'amélioration de l'élevage des jeunes juvéniles de plie rouge dans des conditions environnementales considérées comme "froides" et permettent d'envisager le développement de cette espèce en aquaculture au Canada.

* * *

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amara, R. et Galois, R.** 2004. Nutritional condition of metamorphosing sole: spatial and temporal analyses. *Journal of Fish Biology* **64**, 72-88.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G. et Laffargue, P.** 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* **351**, 201-208.
- Ballard, K. A., Pickett, R. L. et Sivak, J. G.** 1987. Comparison of the musculoskeletal structure of the orbits of the migrating and non-migrating eyes in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Experimental Biology* **47**, 23-26.
- Bang, A., Grønkjær, P., Clemmesen, C. et Høie, H.** 2006. Parental effects on early life history traits of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **334**, 51-63.
- Batt, J.** 1998. Winter flounder culture. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* **98**, 11-13.

- Begg, G. A., Friedland, K. D. et Pearce, J. B.** 1999. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fisheries Research* **43**, 1-8.
- Begg, G. A. et Waldman, J. R.** 1999. An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research* **43**, 35-44.
- Bélangier, M.,** 2008, Influence du moment du sevrage sur la croissance et la survie des juvéniles de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*). Mémoire de maîtrise en océanographie. Université du Québec à Rimouski, Rimouski (Qué.), Canada, 67 p.
- Belk, M. C., Johnson, J. B., Wilson, K. W., Smith, M. E. et Houston, D. D.** 2005. Variation in intrinsic individual growth rate among populations of leatherside chub (*Snyderichthys copei* Jordan & Gilbert): adaptation to temperature or length of growing season? *Ecology of Freshwater Fish* **14**, 177-184.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., MacDonald, F. M. et Sargent, J. R.** 1994. Effect of diet rich in linoleic (18:2n - 6) and α -linolenic (18:2 - 3) acids on the growth, lipid class and fatty acid composition and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **13**, 105-118.

- Ben Khemis, I., Audet, C., Fournier, R. et de la Noüe, J.** 2003. Early weaning of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) larvae on a commercial microencapsulated diet. *Aquaculture Research* **34**, 445-452.
- Ben Khemis, I., de la Noüe, J. et Audet, C.** 2000. Feeding larvae of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) with live prey or microencapsulated diet: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquaculture Research* **31**, 377-386.
- Benoît, H. P., Pepin, P. et Brown, J. A.** 2000. Patterns of metamorphic age and length in marine fishes, from individual to taxa. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**, 856-869.
- Bertram, D. F., Chambers, R. C. et Leggett, W. C.** 1993. Negative correlations between larval and juvenile growth rates in winter flounder: implications of compensatory growth for variation in size-at-age. *Marine Ecology Progress Series* **96**, 209-215.
- Bertram, D. F., Miller, J. M. et Leggett, W. C.** 1997. Individual variation in growth and development during the early life of winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Fisheries Bulletin* **95**, 1-10.

- Bishop, C. D., Erezyilmaz, D. F., Flatt, T., Georgiou, C. D., Hadfield, M. G., Heyland, A., Hodin, J., Jacobs, M. W., Maslakova, S. A., Pires, A., Reitzel, A. M., Santagata, S., Tanaka, K. et Youson, J. H.** 2006. What is metamorphosis? *Integrative and Comparative Biology* **46**, 655-661.
- Björnsson, B. T.** 1997. The biology of salmon growth hormone: From daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry* **17**, 9-24.
- Björnsson, B. T., Hemre, G.-I., Bjørnevik, M. et Hansen, T.** 2000. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of underyearling Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology* **119**, 17-25.
- Blanc, J. M.** 2003a. Comparison of experimental designs for estimating quantitative genetic parameters in fish. *Aquaculture Research* **34**, 1099-1105.
- Blanc, J. M.** 2003b. Paternal variation in juvenile survival and growth of the triploid hybrid between female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and the male brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture Research* **34**, 205-210.
- Boehlert, G. W.** 1981. The effects of photoperiod and temperature on laboratory growth of juvenile *Sebastes diplopora* and a comparison with growth in the field. *Fisheries Bulletin* **79**, 789-794.

- Boeuf, G. et Le Bail, P. Y.** 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**, 129-152.
- Bolker, J. A. et Hill, C. R.** 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology* **56**, 1029-1052.
- Brett, J. R.** 1979. Environmental factors and growth. In *Fish physiology. Bioenergetics and growth* (Hoar, W. S., Randall, D. J. and Brett, J. R., eds.), pp. 599-677. New York: Academic Press.
- Bromage, N., Porter, M. et Randall, C.** 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* **197**, 63-98.
- Brooks, S., Tyler, C. R. et Sumpter, J.** 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 387-416.
- Brown, R. et Gabriel, W.** 1998. Winter flounder, in: Clark, S.H., ed. Status of the fishery resource off the northeastern United States for 1998. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-115*, 81-84.

- Buckley, L. J.** 1979. Relationship between RNA-DNA ratio, prey density and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **36**, 1497-1502.
- Buckley, L. J.** 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology* **80**, 291-298.
- Buckley, L. J.** 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North Atlantic). Winter flounder. *U.S. Army Corps of Engineers Biological report 82 (11-87) - TR EL-82-4*, 12 pp.
- Buckley, L. J., Caldarone, E. M. et Ong, T. L.** 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* **401**, 265-277.
- Buckley, L. J., Smigielski, A. S., Halavik, T. A., Caldarone, E. M., Burns, B. R. et Laurence, G. C.** 1991. Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. I. Among-location variability in size and survival of larvae reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series* **74**, 117-124.
- Buckley, L. J., Smigielski, A. S., Halavik, T. A. et Laurence, G. C.** 1990. Effects of water temperature on size and biochemical composition of winter flounder

Pseudopleuronectes americanus at hatching and feeding initiation. *Fisheries Bulletin* **88**, 419-428.

Burton, M. P. et Idler, D. R. 1987. An experimental investigation of the non-reproductive, post-mature state in winter flounder. *Journal of Fish Biology* **30**, 643-650.

Butts, I. A. E. et Litvak, M. K. 2007a. Parental and stock effects on larval growth and survival to metamorphosis in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Aquaculture* **269**, 339-348.

Butts, I. A. E. et Litvak, M. K. 2007b. Stock and parental effects on embryonic and early larval development of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* **70**, 1070-1087.

Chambers, R. C. et Leggett, W. C. 1987. Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**, 1936-1947.

Chambers, R. C. et Leggett, W. C. 1992. Possible causes and consequences of variation in age and size at metamorphosis in flatfishes (pleuronectiformes): an analysis at

the individual, population, and species levels. *Netherlands Journal of Sea Research* **29**, 7-24.

Chambers, R. C. et Leggett, W. C. 1996. Maternal influence on variation in egg sizes in temperate marine fishes. *American Zoologist* **36**, 180-196.

Chambers, R. C., Leggett, W. C. et Brown, J. A. 1988. Variation in and among early life history traits of laboratory-reared winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Ecology Progress Series* **47**, 1-15.

Chambers, R. C., Rose, K. A. et Tyler, J. A. 1995. Recruitment and recruitment processes of winter flounder, *Pleuronectes americanus*, at different latitudes: implication of an individual-based simulation model. *Netherlands Journal of Sea Research* **34**, 19-43.

Chambers, R. C., Witting, D. A. et Lewis, S. J. 2001. Detecting critical periods in larval flatfish populations. *Journal of Sea Research* **45**, 231-242.

Clarke, W. C., Shelbourn, J. E. et Brett, J. R. 1978. Growth and adaptation to sea water in "underyearling" sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon subjected to regimes of constant or changing temperature and day length. *Canadian Journal of Zoology* **56**, 2413-2421.

- Clarke, W. C., Shelbourn, J. E., Ogasawara, T. et Hirano, T.** 1989. Effect of initial daylength on growth, seawater adaptability and plasma growth hormone levels in underyearling coho, chinook, and chum salmon. *Aquaculture* **82**, 51-62.
- Clemmesen, C.** 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Marine Biology* **118**, 377-382.
- Clynick, B. G., McKindsey, C. W. et Archambault, P.** 2008. Distribution and productivity of fish and macroinvertebrates in mussel aquaculture sites in the Magdalen islands (Québec, Canada). *Aquaculture* **283**, 203-210.
- Coad, B. W.** 1993. Guide des poissons marins de pêche sportive de l'Atlantique canadien et de la Nouvelle-Angleterre. La Prairie (Québec, Canada), 400 p.
- Conover, D. O.** 1990. The relation between capacity for growth and length of growing season: evidence for and implications of countergradient variation. *Transactions of the American Fisheries Society* **119**, 416-430.
- Conover, D. O.** 1992. Seasonality and the scheduling of life history at different latitudes. *Journal of Fish Biology* **41**, 161-178.

- Conover, D. O.** 1998. Local adaptation in marine fishes: evidence and implication for stock enhancement. *Bulletin of Marine Science* **62**, 477-493.
- Conover, D. O., Brown, J. J. et Ehtsham, A.** 1997. Countergradient variation in growth of young striped bass (*Morone saxatilis*) from different latitudes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 2401-2409.
- Conover, D. O. et Schultz, E. T.** 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Tree* **10**, 248-252.
- Cossins, A. R. et Bowler, K.** 1987. Temperature biology of animals. Chapman and Hall, London, 300 p.
- Crawford, C. M.** 1984. Preliminary results of experiments on the rearing of Tasmanian flounders, *Rhombosolea tapirina* and *Ammotretis rostratus*. *Aquaculture* **42**, 75-81.
- Crockett, E. L.** 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist* **38**, 291-304.
- Curran, M. C. et Able, K. W.** 2002. Annual stability in the use of coves near inlets as settlement areas for winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Estuaries* **25**, 227-234.

- de Montgolfier, B., Audet, C. et Lambert, Y.** 2005. Growth of early juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Aquaculture Research* **36**, 1595-1601.
- DeCelles, G. R. et Cadrin, S. X.** 2007. An interdisciplinary assessment of winter flounder stock structure. *ICES CM 2007/L:18*, 1-20.
- Deniel, C.** 1990. Comparative study of growth of flatfishes on the west coast of Brittany. *Journal of Fish Biology* **37**, 149-166.
- Duman, J. G. et Devries, A. L.** 1974. Freezing resistance in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Nature* **247**, 237-238.
- Dwyer, K. S., Parrish, C. C. et Brown, J. A.** 2003. Lipid composition of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*) in relation to dietary lipid intake. *Marine Biology* **143**, 659-667.
- Ehrlich, K. F.** 1974. Chemical changes during growth and starvation of larval *Pleuronectes platessa*. *Marine Biology* **24**, 39-48.
- Eriksson, L. O. et Lundqvist, H.** 1980. Photoperiod entrains ripening by its differential effect in salmon. *Naturwissenschaften* **67**, 202-203.

- Evans, J. P. et Geffen, A. J.** 1998. Male characteristics, sperm traits, and reproductive success in winter-spawning Celtic Sea Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Marine Biology* **132**, 179-186.
- Ewart, K. V. et Hew, C. L.** 2002. Molecular aspects of fish and marine biology. Vol. 1: fish antifreeze proteins. Singapore: World Scientific, 236 p.
- Exadactylos, A., Geffen, A. J. et Thorpe, J. P.** 1999. Growth and genetic variation in hatchery-reared larval and juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* **176**, 209-226.
- Fairchild, E. A. et Howell, W. H.** 2001. Optimal stoking density for juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society* **32**, 300-308.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. et Boeuf, G.** 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **18**, 81-88.
- Falconer, D. S. et Mackay, T. F. C.** 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Pearson Education Limited, Essex, England, 470 p.

- Ferron, A. et Leggett, W. C.** 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Advances in Marine Biology* **30**, 217-303.
- Fletcher, G. L.** 1977. Circannual cycles of blood plasma freezing point and Na⁺ and Cl⁻ concentrations in Newfoundland winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), correlation with water temperature and photoperiod. *Canadian Journal of Zoology* **55**, 789-795.
- Fletcher, G. L., Haya, K., King, M. J. et Reisman, H. M.** 1985. Annual antifreeze cycles in Newfoundland, New Brunswick and Long Island winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Ecology Progress Series* **21**, 205-212.
- Fletcher, G. L., Hew, C. L. et Davies, P. L.** 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual Review of Physiology* **63**, 359-390.
- Fletcher, G. L. et Smith, J. C.** 1980. Evidence for permanent population differences in the annual cycle of plasma 'antifreeze' levels of winter flounder. *Canadian Journal of Zoology* **58**, 507-512.
- Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G. H.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.

- Fonds, M.** 1979. A seasonal fluctuation in growth rate of young plaice (*Pleuronectes platessa*) and sole (*Solea solea*) in the laboratory at constant temperatures and a natural daylight cycle. In *Cyclic phenomenon in marine plants and animals. Proceeding of the 13th European Marine Biology Symposium, Isle of Man, 27 September - 4 October 1978* (Naylor, E. and Hartnoll, R. G., eds.), pp. 151-156. Oxford, New York: Pergamon Press.
- Fraboulet, E., Lambert, Y., Litvak, M. K. et Audet, C.** 2009. The effects of latitudinal origin and paternal contribution on larval growth of winter flounder in a northern environment. *Transactions of the American Fisheries Society* **138**, 407-415.
- Fraboulet, E., Lambert, Y., Tremblay, R. et Audet, C.** *in press*. Assessment of the physiological cost of metamorphosis and paternal effects on growth of young winter flounder juveniles in cold environment *Journal of Fish Biology*
- Fraser, A. J.** 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**, 1868-1873.
- Fraser, A. J., Gamble, J. C. et Sargent, J. R.** 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Marine Biology* **99**, 307-313.

- Fuchs, J.** 1978. Influence de la photopériode sur la croissance et la survie de la larve et du juvénile de sole (*Solea solea*) en élevage. *Aquaculture* **15**, 63-74.
- Fukuda, M., Sako, H., Shigeta, T. et Shibata, R.** 2001. Relationship between growth and biochemical indices in laboratory-reared juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and its application to wild fish. *Marine Biology* **138**, 47-55.
- Galois, R., Lagardere, F. et Richard, P.** 1990. Changes in biochemical composition and otolith microstructure of larval common sole, *Solea solea* (L.) under experimental starvation. *La Mer* **28**, 273-285.
- Garant, D., Dodson, J. J. et Bernatchez, L.** 2003. Differential reproductive success and heritability of alternative reproductive tactics in wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Evolution* **57**, 1133-1141.
- Gauthier, S. Y., Marshall, C. B., G.L., F. et Davies, P. L.** 2005. Hyperactive antifreeze protein in flounder species. The sole freeze protectant in American plaice. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* **272**, 4439-4449.
- Geffen, A. J., Van der veer, H. W. et Nash, R. D. M.** 2007. The cost of metamorphosis in flatfishes. *Journal of Sea Research* **58**, 35-45.

- Getchell, R.** 1998. New salmon pathogen: Sleuthing uncovers *Piscirickettsia salmonis*. *Fish Farming News* **6**, 6.
- Gilliers, C., Amara, R., Bergeron, J. P. et Le pape, O.** 2004. Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. *Environmental Biology of Fishes* **71**, 189-198.
- Gorshkov, I., Meiri, H., Rosenfeld, S., Ben-Atia, S., Lutzki, A., Peduel, B., Ron, G., Gorshkova, A., Skvortzov, A. et Tandler, A.** 2003. Parental effects on sex ratios in progeny of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* **55**, 265-273.
- Graham, L. A., Marshall, C. B., Lin, F.-H., Campbell, R. L. et Davies, P. L.** 2008. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites. *Biochemistry* **47**, 2051-2063.
- Green, B. S. et McCormick, M. I.** 2005. Maternal and paternal effects determine size, growth and performance in larvae of a tropical reef fish. *Marine Ecology Progress Series* **289**, 263-272.
- Gwak, W. S. et Tanaka, M.** 2001. Developmental change in RNA:DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its

- application to assessment of nutritional condition for wild fish. *Journal of Fish Biology* **59**, 902-915.
- Gwak, W. S., Tsusaki, T. et Tanaka, M.** 2003. Nutritional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared Japanese flounder from hatch to release. *Aquaculture* **219**, 503-514.
- Håkanson, J. L.** 1989a. Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Marine Biology* **102**, 143-151.
- Håkanson, J. L.** 1989b. Condition of larval anchovy (*Engraulis mordax*) in the Southern California Bight, as measured through lipid analysis. *Marine Biology* **102**, 153-159.
- Hallaråker, H., Folkvord, A. et Stefánsson, S. Ö.** 1995. Growth of juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) related to temperature, day length and feeding regime. *Netherlands Journal of Sea Research* **34**, 139-147.
- Harding, M. M., Ward, L. G. et Haymet, A. D. J.** 1999. Type 1 'antifreeze' proteins: structure-activity studies and mechanism of ice growth inhibition. *European Journal of Biochemistry* **264**, 653-665.
- Hartree, E. F.** 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* **48**, 422-427.

- Hayes, P. H., Davies, P. L. et Fletcher, G. L.** 1991. Population differences in antifreeze protein gene copy number and arrangement in winter flounder. *Genome* **34**, 174-177.
- Hazel, J. R.** 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology* **57**, 19-42.
- Hebert, K. P., Goddard, P. L., Smoker, W. W. et Gharrett, A. J.** 1998. Quantitative genetic variation and genotype by environment interaction of embryo development rate in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 2048-2057.
- Herbinger, C. M., Doyle, R. W., Pitman, E. R., Paquet, D., Mesa, K. A., Morris, D. B., Wright, J. M. et Cook, D.** 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* **137**, 245-256.
- Higashitani, T., Takatsu, T., Nakaya, M., Joh, M. et Takahashi, T.** 2007. Maternal effects and larval survival of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae*. *Journal of Sea Research* **58**, 78-89.

- Hogans, W. E.** 1995. Infection of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, *Caligidae*) parasitic on Atlantic salmon (*Salmo salar*) cultured in marine waters of the lower Bay of Fundy. 14 p.
- Hoie, H., Folkvord, A. et Johannessen, A.** 1999. The influence of different parental combinations and incubation temperature on the RNA and DNA content of herring larvae at hatching: a pilot study. *Journal of Fish Biology* **55**, 110-118.
- Hunt, R. L.** 1969. Overwinter survival of wild fingerling brook trout in Lawrence creek, Wisconsin. *Journal Fisheries Research Board of Canada* **26**, 1473-1483.
- Idler, D. R., Fletcher, G. L., Belkhole, S., King, M. J. et Hwang, S. J.** 1989. Regulation of antifreeze protein production in winter flounder: A unique function for growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* **74**, 327-334.
- Ihssen, P. E., Booke, H. E., Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R. et Utter, F. M.** 1981. Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**, 1838-1855.
- Imsland, A. K., Folkvord, A., Jónsdóttir, Ó. D. B. et Stefansson, S. O.** 1997. Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **159**, 125-141.

- Imsland, A. K., Folkvord, A. et Stefansson, S. O.** 1995. Growth, oxygen consumption and activity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under different temperatures and photoperiods. *Netherlands Journal of Sea Research* **34**, 149-159.
- Imsland, A. K., Foss, A., Koedijk, R., Folkvord, A., Stefansson, S. O. et Jonassen, T. M.** 2007. Persistent growth effects of temperature and photoperiod in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology* **71**, 1371-1382.
- Imsland, A. K., Foss, A., Stefansson, S. O., Mayer, I., Norberg, B., Roth, B. et Jenssen, M. D.** 2006. Growth, feed conversion efficiency and growth heterogeneity in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) reared at three different photoperiods. *Aquaculture Research* **37**, 1099-1106.
- Imsland, A. K. et Jonassen, T. M.** 2001. Regulation of growth in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): aspects of environment x genotype interactions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **11**, 71-90.
- Jearld Jr., A., Sass, S. L. et Davis, M. F.** 1993. Early growth, behavior, and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *Fishery Bulletin US* **91**, 65-75.
- Jobling, M.** 1994. Fish bioenergetics. Chapman & Hall, London, 309 p.

- Jonassen, T. M., Imsland, A. K., Kadowaki, S. et Stefansson, S. O.** 2000. Interaction of temperature and photoperiod on growth of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research* **31**, 219-227.
- Kamler, E.** 2005. Parent-egg-progeny relationship in teleost fishes: an energetics perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **15**, 399-421.
- Kennedy, V. S. et Steele, D. H.** 1971. The winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, in Long Pond, Conception Bay, Newfoundland. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **28**, 1153-1165.
- King, M. J., Kao, M. H., Brown, J. H. et Fletcher, G. L.** 1989. Lethal freezing temperatures of fish, limitations to seapen culture in Atlantic Canada. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* **3**, 47-49.
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A. et Homefjord, I.** 1990. Egg quality in fish. *Advances in Marine Biology* **26**, 71-113.
- Langton, R. W. et Bowman, R. E.** 1981. Food of eight northwest Atlantic pleuronectiform fishes. *NOAA Technical Report NMFS Circular SSRF0749*, 16 p.

- Laroche, W. A.** 1981. Development of larval smooth flounder, *Liopsetta putnami*, with a redescription of development of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Family Pleuronectidae). *Fishery Bulletin* **78**, 897-909.
- Laurence, G. C.** 1975. Laboratory growth and metabolism of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* from hatching through metamorphosis at three temperatures. *Marine Biology* **32**, 223-229.
- Lee, G. W. Y. et Litvak, M. K.** 1996. Weaning of metamorphosed winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) reared in the laboratory: comparison of two commercial artificial diets on growth, survival and conversion efficiency. *Aquaculture* **144**, 251-263.
- Levinton, J. S.** 1983. The latitudinal compensation hypothesis: growth data and a model of latitudinal growth differentiation based upon energy budgets. I. Interspecific comparison of *Ophryotropha* (Polychaeta: Dorvilleidae). *Biological Bulletin* **165**, 686-698.
- Lindsay, C. C.** 1966. Body size of poikilotherm vertebrates at different latitudes. *Evolution* **20**, 456-465.
- Lister, J. S. et Neff, B. D.** 2006. Paternal genetic effects on foraging decision-making under the risk of predation. *Ethology* **112**, 963-970.

- Litvak, M. K.** 1996. Development of winter flounder (*Pleuronectes americanus*) for aquaculture: State of the art. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* **96**, 24-26.
- Litvak, M. K.** 1999. The development of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) for aquaculture in Atlantic Canada: current status and future prospects. *Aquaculture* **176**, 55-64.
- Lochman, S. E., Maillet, G. L., Franck, K. T. et Taggart, C. T.** 1995. Lipid class composition as a measure of nutritional condition in individual larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 1294-1306.
- Love, R. M.** 1970. The chemical biology of fishes. Academic Press, New York, 550 p.
- Lux, F. E.** 1973. Age and growth of the winter flounder flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, on Georges Bank. *Fishery Bulletin* **71**, 505-512.
- Lux, F. E., Peterson, A. E. et Hutton, R. F.** 1970. Geographical variation in fin ray number in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), off Massachusetts. *Transactions of the American Fisheries Society* **99**, 483-488.

- MacLean, J. A. et Evans, D. O.** 1981. The stock concept, discreteness of fish stocks, and fisheries management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**, 1889-1898.
- Malloy, K. D. et Targett, T. E.** 1994. Effects of ration limitation and low temperature on growth, biochemical condition, and survival of juvenile summer flounder from two Atlantic coast nurseries. *Transactions of the American Fisheries Society* **123**, 182-193.
- Marshall, C. B., Fletcher, G. L. et Davies, P. L.** 2004. Hyperactive antifreeze protein in a fish. *Nature* **429**, 153.
- Marteinsdottir, G. et Steinarsson, A.** 1998. Maternal influence on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *Journal of Fish Biology* **52**, 1241-1258.
- Mayr, E.** 1963. Populations, species, and evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 797 p.
- McClelland, G., Melendy, J., Osborne, J., Reid, D. et Douglas, S.** 2005. Use of parasite and genetic markers in delineating populations of winter flounder from the central and south-west Scotian Shelf and north-east Gulf of Maine. *Journal of Fish Biology* **66**, 1082-1100.

- McCracken, F. D.** 1963. Seasonal movements of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), on the Atlantic coast. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **20**, 551-586.
- McLeese, J. M. et Moon, T. W.** 1989. Seasonal changes in the intestinal mucosa of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), from Passamaquoddy Bay, New Brunswick. *Journal of Fish Biology* **35**, 381-393.
- Mercier, L., Audet, C., De la Noüe, J., Parent, B., Parrish, C. C. et Ross, N. W.** 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. *Aquaculture* **229**, 361-376.
- Mommsen, T. P.** 2001. Paradigm of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* **129**, 207-219.
- Morin, R., Forest, I. et Benoît, H.** 2002. Status of NAFO Division 4T winter flounder, February 2002. *Canadian Science Advisory Secretariat Research Document* **2002/033**, 56 pp.
- Munro, H. N. et Fleck, A.** 1966. The determination of nucleic acids. In *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D., ed.), pp. 113-116. New York: Interscience.

- Neff, B. D.** 2004. Increased performance of offspring sired by parasitic males in bluegill sunfish. *Behavioral Ecology* **15**, 327-331.
- Neff, B. D. et Lister, J. S.** 2007. Genetic life history effects on juvenile survival in bluegill. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 517-525.
- Nitschke, P., Brown, R. et Hendrickson, L.** 2000. Winter Flounder. In *Status of Fishery Resources off the Northeastern United States* (NOAA national marine fisheries service, n. f. s. c., ed.).
- Norton, E. C., MacFarlane, R. B. et Mohr, M. S.** 2001. Lipid class dynamics during development in early life stages of shortbelly rockfish and their application to condition assessment. *Journal of Fish Biology* **58**, 1010-1024.
- Ojaveer, E.** 2006. On the external and parental effects in early development of herring (*Clupea pallasii*) at the NE Kamchatka. *Fisheries Research* **81**, 1-8.
- Oliver, J. D., Holeton, G. F. et Chua, K. F.** 1979. Overwinter mortality of fingerling smallmouth bass in relation to size, relative energy stores, and environment temperature. *Transactions of the American Fisheries Society* **108**, 130-136.

- Osse, J. W. M. et Van den Boogaart, J. G. M.** 1997. Size of flatfish larvae at transformation, functional demands and historical constraints. *Journal of Sea Research* **37**, 229-239.
- Page, F. et Robinson, S.** 1992. Salmon farming in the Bay of Fundy, a chilling reminder! *World Aquaculture* **23**, 31-34.
- Panagiotaki, P. et Geffen, A. J.** 1992. Parental effects on size variation in fish larvae. *Journal of Fish Biology* **41**, 37-42.
- Parrish, C. C.** 1987. Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by iatroscan flame ionization detection. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**, 722-731.
- Parrish, C. C.** 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In *Lipids in freshwater ecosystems* (Arts, M. T. and Wainman, B. C., eds.), pp. 4-20. New York: Springer-Verlag.
- Parrish, C. C., Wells, J. S., Yang, Z. et Dabinett, P.** 1998. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Marine Biology* **133**, 461-471.

- Pearcy, W. G.** 1961. Seasonal changes in osmotic pressure of flounder sera. *Science* **134**, 193-194.
- Pereira, J. J., Goldberg, R., Ziskowski, J. J., Berrien, P. L., Morse, W. W. et Johnson, D. L.** 1999. Essential fish habitat source document: winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, life history and habitat characteristics. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-138*, 39 pp.
- Perry, G. M. L., Audet, C., Laplatte, B. et Bernatchez, L.** 2004. Shifting pattern in genetic control at the embryo-alevin boundary in brook charr. *Evolution* **58**, 2002-2012.
- Petersson, E. et Jarvi, T.** 2007. Characteristics of brown trout males influence growth and survival of their offspring. *Journal of Fish Biology* **71**, 493-509.
- Pierce, D. E. et Howe, A. B.** 1977. A further study on winter flounder group identification off Massachusetts. *Transactions of the American Fisheries Society* **106**, 131-139.
- Pigliucci, M.** 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 481-486.

- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y. et de La Noüe, J.** 2003. Comparison of stress responses in wild and captive winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) broodstock. *Aquaculture Research* **34**, 803-812.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y. et de la Noüe, J.** 2002. The effects of two rearing salinities on survival and stress of winter flounder broodstock. *Journal of Aquatic Animal Health* **14**, 281-287.
- Policansky, D.** 1982. The asymmetry of flounders. *Scientific American* **246**, 116-122.
- Present, T. M. C. et Conover, D. O.** 1992. Physiological basis of latitudinal growth differences in *Menidia menidia*: variation in consumption or efficiency ? *Functional Ecology* **6**, 23-31.
- Probst, W. N., Kraus, G., Rideout, R. M. et Trippel, E. A.** 2006. Parental effects on early life history traits of haddock *Melanogrammus aeglefinus*. *ICES Journal of Marine Science* **63**, 224-234.
- Quinn, G. P. et Keough, M. J.** 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge, 556 p.

- Reynolds, J. D. et Gross, M. R.** 1992. Female mate preference enhances offspring growth and reproduction in a fish, *Poecilia reticulata*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **250**, 57-62.
- Richard, P., Bergeron, J. P., Boulhic, M., Galois, R. et Person-Le Ruyet, J.** 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Marine Ecology Progress Series* **72**, 69-77.
- Ricker, W. E.** 1980. Calculs et interprétations des statistiques biologiques des populations de poissons. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada* **191F**, 409p.
- Rideout, R. M., Litvak, M. K. et Trippel, E. A.** 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* **34**, 653-659.
- Rideout, R. M., Trippel, E. A. et Litvak, M. K.** 2004. Paternal effect on haddock early life history traits. *Journal of Fish Biology* **64**, 695-701.
- Rinchard, J., Lee, K. J., Czesny, S., Ciereszko, A. et Dabrowski, K.** 2003. Effect of feeding cottonseed meal-containing diets to broodstock rainbow trout and their impact on the growth of their progenies. *Aquaculture* **227**, 77-87.

- Rose, K. A., Jeffrey, A. T., Chambers, R. C., Klein-MacPhee, G. et Danila, D. J.** 1996. Simulating winter flounder population dynamics using coupled individual-based young-of-the-year and age-structured adult models. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 1071-1091.
- Sabatés, A., Rossi, S. et Reyes, E.** 2003. Lipid content in the early life stages of three mesopelagic fishes. *Journal of Fish Biology* **63**, 881-891.
- Saillant, E., Chatain, B., Fostier, A., Przybyla, C. et Fauvel, C.** 2001. Parental influence on early development in the European sea bass. *Journal of Fish Biology* **58**, 1585-1600.
- Saillant, E., Ma, L., Wang, X., Gatlin III, D. M. et Gold, J. R.** 2007. Heritability of juvenile growth traits in red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Aquaculture Research* **38**, 781-788.
- Sargent, J. R., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. et Tocher, D.** 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* **179**, 217-229.
- Schreiber, A. M.** 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*. **129**, 587-595.

- Schultz, E. T., Reynolds, K. E. et Conover, D. O.** 1996. Countergradient variation in growth among newly hatched *Fundulus heteroclitus*: geographic differences revealed by common-environment experiments. *Functional Ecology* **10**, 366-374.
- Scott, W. B. et Scott, M. G.** 1988. Atlantic fishes of Canada. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences* **219**, 731 p.
- Seikai, T., Tanangowan, J. B. et Tanaka, M.** 1986. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **52**, 977-982.
- Seychelles, L.** 2008. Effet de l'apport alimentaire en acides gras sur les communautés bactériennes associées aux larves de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) et au système d'élevage. Thèse de doctorat en océanographie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski (Qué.), Canada, 179 p.
- Simensen, L. M., Jonassen, T. M., Imsland, A. K. et Stefansson, S. O.** 2000. Photoperiod regulation of growth of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **190**, 119-128.
- Smigielski, A. S. et Arnold, C. R.** 1972. Separating and incubating winter flounder eggs. *Progressive Fish-Culturist* **34**, 113.

- Sogard, S. M.** 1997. Size-selective mortality in the juvenile stage of teleost fishes: a review. *Bulletin of Marine Science* **60**, 1129-1157.
- Sogard, S. M. et Olla, B. L.** 2000. Endurance of simulated winter conditions by age-0 walleye pollock: effects of body size, water temperature and energy stores. *Journal of Fish Biology* **56**, 1-21.
- Sokal, R. R. et Rohlf, J. F.** 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W.H. Freeman and Company, New York, 887 p.
- Solbakken, J. S. et Pittman, K.** 2004. Photoperiodic modulation of metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **232**, 613-625.
- Solbakken, V. A., Hansen, T. et Stefánsson, S. Ö.** 1994. Effects of photoperiod and temperature on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent performance in seawater. *Aquaculture* **121**, 13-27.
- Stearns, S. C.** 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* **39**, 436-445.
- Stefánsson, M. Ö., FitzGerald, R. D. et Cross, T. F.** 2002. Growth, feed utilization and growth heterogeneity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Rafinesque) under different photoperiod regimes. *Aquaculture Research* **33**, 177-187.

- Stefánsson, S. O., Björnsson, B. T., Hansen, T., Haux, C., Taranger, G. L. et Saunders, R. L.** 1991. Growth, parr–smolt transformation, and changes in growth hormone of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**, 2100-2108.
- Stobo, W. T., Fowler, G. M. et Smith, S. J.** 1997. Status of 4X winter flounder, yellowtail flounder, and American plaice. *Canadian Stock Assessment Secretariat Research Document 97/105*
- Swain, D. P. et Foote, C. J.** 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 113.128.
- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T. et Burke, J. S.** 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **28**, 19-31.
- Thorpe, J. P. et Morgan, R. I. J.** 1978. Parental influence on growth rate, smolting rate and survival in hatchery reared juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* **13**, 549-556.
- Toneys, M. L. et Coble, D. W.** 1979. Size-related, first winter mortality of freshwater fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* **108**, 415-419.

- Trippel, E. A.** 2003. Estimation of male reproductive success of marine fishes. *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Sciences* **33**, 81-113.
- Trippel, E. A., Kraus, G. et Köster, F. W.** 2005. Maternal and paternal influence on early life history traits and processes of Baltic cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology Progress Series* **303**, 259-267.
- Trippel, E. A. et Neil, S. R. E.** 2003. Effects of photoperiod and light intensity on growth and activity of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* **217**, 633-645.
- Tyler, A. V. et Dunn, R. S.** 1976. Ration, growth and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal Fisheries Research Board of Canada* **33**, 63-75.
- Unwin, M. J., Kinnison, M. T., Boustead, N. C. et Quinn, T. P.** 2003. Genetic control over survival in Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.): experimental evidence between and within populations of New Zealand chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **60**, 1-11.

- Vaillancourt, R.** 2008. Contribution à l'optimisation des conditions d'élevage du stade larvaire de la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*). Thèse de doctorat en océanographie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski (Qué.), Canada, 149 p.
- Vaillancourt, R., Brêthes, J. C. F. et Desrosiers, G.** 1985. Croissance de la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) de l'estuaire maritime du Saint-Laurent. *Canadian Journal of Zoology* **63**, 1610-1616.
- Van der veer, H. W., Berghahn, R. et Rijnsdop, A. D.** 1994. Impact of juvenile growth on recruitment in flatfish. *Netherlands Journal of Sea Research* **32**, 153-173.
- Van Guelpen, L. et Davis, C. C.** 1979. Seasonal movements of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, in two contrasting inshore locations in Newfoundland. *Transactions of the American fisheries Society* **108**, 26-37.
- Vollestad, L. A. et Lillehammer, T.** 2000. Individual variation in early life-history traits in brown trout. *Ecology of Freshwater Fish* **9**, 242-247.
- Wang, X., Ross, K. E., Saillant, E., Gatlin III, D. M. et Gold, J. R.** 2006. Quantitative genetics and heritability of growth-related traits in hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ x *Morone saxatilis* ♂). *Aquaculture* **261**, 535-545.

- Weatherley, A. H. et Gill, H. S.** 1987. The biology of fish growth. Academic Press, London, 443 p.
- Wedekind, C., Muller, R. et Spicher, H.** 2001. Potential genetic benefits of mate selection in whitefish. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 980-986.
- Wells, B., Steele, D. H. et Tyler, A. V.** 1973. Intertidal feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) in the bay of Fundy. *Journal Officiel des Recherches en Pêcheries du Canada* **30**, 1374-1378.
- Woiwode, J. G. et Adelman, I. R.** 1991. Effects of temperature, photoperiod, and ration size on growth of hybrid striped bass X white bass. *Transactions of the American Fisheries Society* **120**, 217-229.
- Wootton, R. J.** 1998. Ecology of teleost fishes. 2nd. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 385 p.
- Yamamoto, T. et Reinhardt, U. G.** 2003. Paternal effect on otolith size at emergence in masu salmon. *Journal of Fish Biology* **62**, 1226-1231.
- Yamashita, Y., Tanaka, M. et Miller, J. M.** 2001. Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *Journal of Sea Research* **45**, 205-218.

Ziskowski, J. et Murchelano, R. 1975. Fin erosion in winter flounder. *Marine Pollution Bulletin* **6**, 26.

**ANNEXE. ÉVALUATION DU NOMBRE DE COPIES DES GÈNES CODANT POUR
LES PROTÉINES ANTIGEL CHEZ LES JUVÉNILES DE PLIE ROUGE HYBRIDES**

A.1 INTRODUCTION

Des méthodes basées sur une réaction en chaîne par polymérase en temps réel sensible (qPCR en anglais, pour quantitative polymerase chain reaction) ont été développées par Gisela Martinez et ses collègues dans le laboratoire de Vanya Ewart (IMB – NRC) afin de doser les gènes codant pour les quatre principales formes sériques de protéines antigel (AFP en anglais, pour "*antifreeze proteins*"). Ces méthodes ont été utilisées pour mesurer le nombre de copies de trois de ces gènes dans le génome des juvéniles issus des croisements de type "demi-frère" réalisés dans le cadre de cette thèse. Les gènes étudiés ont été ceux codant pour la forme hyperactive (Hyp Type I) et les petites isoformes HPLC-6 et HPLC-8. Il est attendu que les plies possédant le plus grand nombre de copies du gène codant pour la forme hyperactive et celles avec de hauts niveaux des deux autres isoformes soient les plus appropriées pour l'aquaculture côtière en eau froide.

A.2 MÉTHODES

Matériel biologique

Les juvéniles de plie rouge utilisés dans cette étude provenaient des séries de croisement de type "demi-frère" réalisées au printemps 2006 dans le cadre de l'étude des effets paternels sur la croissance des jeunes stades. Les populations étudiées, le plan des croisements, l'élevage des larves et des juvéniles (jusqu'à 45 jours après la déposition) ont été décrits dans les deux premiers chapitre de cette thèse. Ainsi, pour chaque ponte des femelles de la baie des Chaleurs (BC), trois groupes d'hybrides ont été obtenus: ♀ BC × ♂ BC; ♀ BC × ♂ BP; et ♀ BC × ♂ ES (BP: baie de Passamaquoddy, ES: estuaire du Saint-Laurent). Soixante jours après la déposition, la taille de la moulée distribuée aux juvéniles a été ajustée de 0,3 mm à 0,5 mm (0,2 g jour⁻¹ bassin⁻¹; Gemma wean diamond, Skretting, Saint-Andrews, N.-B., Canada). Les juvéniles de chaque groupe ont été élevés dans des bassins séparés dans les conditions environnementales naturelles de ES (température, salinité, photopériode) jusqu'au mois de janvier suivant.

Échantillonnage

À la mi-janvier (2007-01-11, température = 3,8 °C), 25 individus par type de croisement ont été échantillonnés, photographiés à l'aide d'une caméra digitale (Evolution VF, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) installée sur une loupe binoculaire (Olympus SZ61), pesés (M_H ; masse humide en milligrammes), rincés (eau millipore) et

congelés individuellement en microtube à -80°C pour les futures analyses génétiques. Les mesures de longueur standard (L_S) et de largeur corporelle (L_C ; au niveau du premier rayon de la nageoire anale) ont été réalisés avec le logiciel Image Pro-Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Pour chaque individu, le facteur de condition de Fulton a été calculé ($K = 100 \times [M_H / L_S^3]$) et les niveaux de pigmentation et d'érosion de nageoire ont été évalués selon une échelle qualitative (de 0 à 5; le 0 correspondant à une absence de pigmentation ou d'érosion) décrite par de Montgolfier *et al.* (2005).

Analyses par PCR quantitative

Des amorces d'oligonucléotides adaptées à l'amplification des gènes codant pour les protéines HYP TYPE I, HPLC-6 et HPLC-8 ont été développées et utilisées pour amplifier l'ADN génomique des juvéniles. Les produits de PCR ont été confirmés par séquençage des deux brins d'ADN. Les amorces sélectionnées ont amplifié avec succès les trois gènes cibles. Des courbes standard ont été générées et utilisées pour évaluer l'efficacité des réactions.

En utilisant ces amorces, la quantification des gènes codant pour les principales AFP sériques de la plie rouge a été réalisée pour les trois groupes d'hybrides. Le calibrage du dosage des gènes *AFP* par l'utilisation de gènes à copie unique comme contrôle s'est avéré infructueuse. Par contre, le calibrage utilisant de l'ADN génomique comme standard a permis une détermination directe du nombre de copies de ces gènes sur une

base de génome haploïde. Ceci a nécessité la vérification de la taille du génome haploïde chez la plie rouge par cytométrie de flux, étape réalisée avec succès. Cette approche nous a permis de déterminer la quantité de gènes *AFP* présents dans le génome des juvéniles de plie rouge.

Analyses statistiques

Les analyses des données de croissance ont été réalisées à l'aide d'un logiciel de statistique (Statistica 7, Statsoft Inc.) avec un seuil de significativité $\alpha = 0,05$. La normalité et l'homoscédasticité des données morphologiques (L_S , L_C , M_H et K) ont été vérifiées par les tests de Komolgorov-Smirnov et de Brown-Forsythe respectivement (Quinn et Keough, 2002) avant d'être comparées entre les trois types de croisement par des analyses de variance (ANOVA) à un facteur (origine du mâle). Les analyses *a posteriori* ont été réalisées par des tests de comparaisons multiples (HSD de Tukey pour N inégaux). Les indices de pigmentation et d'érosion de nageoire ont été comparés entre les trois groupes à l'aide d'ANOVA non-paramétriques de Kruskal-Wallis (origine du mâle).

A.3 RÉSULTATS

Croissance

Au mois de janvier, les juvéniles fécondés par les mâles originaires des trois régions étudiées ne présentaient pas de différence de longueur, de largeur, de poids et de facteur de condition (Tableau VI). À cette époque, les juvéniles présentaient de bons niveaux de pigmentation et de faibles taux d'érosion de nageoire, sans aucune différence relative à l'origine des mâles utilisés pour les croisements (Figure 17).

Tableau VI. Caractéristiques biologiques des juvéniles de plie rouge issus de croisements de type demi-frère. Il n'y a aucune différence entre les groupes (ANOVAs à un facteur, d.l.l. = 2, $P < 0,05$). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ÉT. BC: mâle de la baie des Chaleurs, BP: mâle de la baie de Passamaquoddy, ES: mâle de l'estuaire du Saint-Laurent.

	BC	BP	ES
Longueur standard (mm)	15,32 \pm 1,90	14,74 \pm 2,55	13,49 \pm 2,48
Largeur corporelle (mm)	5,69 \pm 0,80	5,61 \pm 1,01	4,96 \pm 0,96
Masse humide (mg)	72,8 \pm 33,4	70,2 \pm 36,2	55,6 \pm 34,1
Facteur de condition K	1,89 \pm 0,24	2,01 \pm 0,22	2,06 \pm 0,34

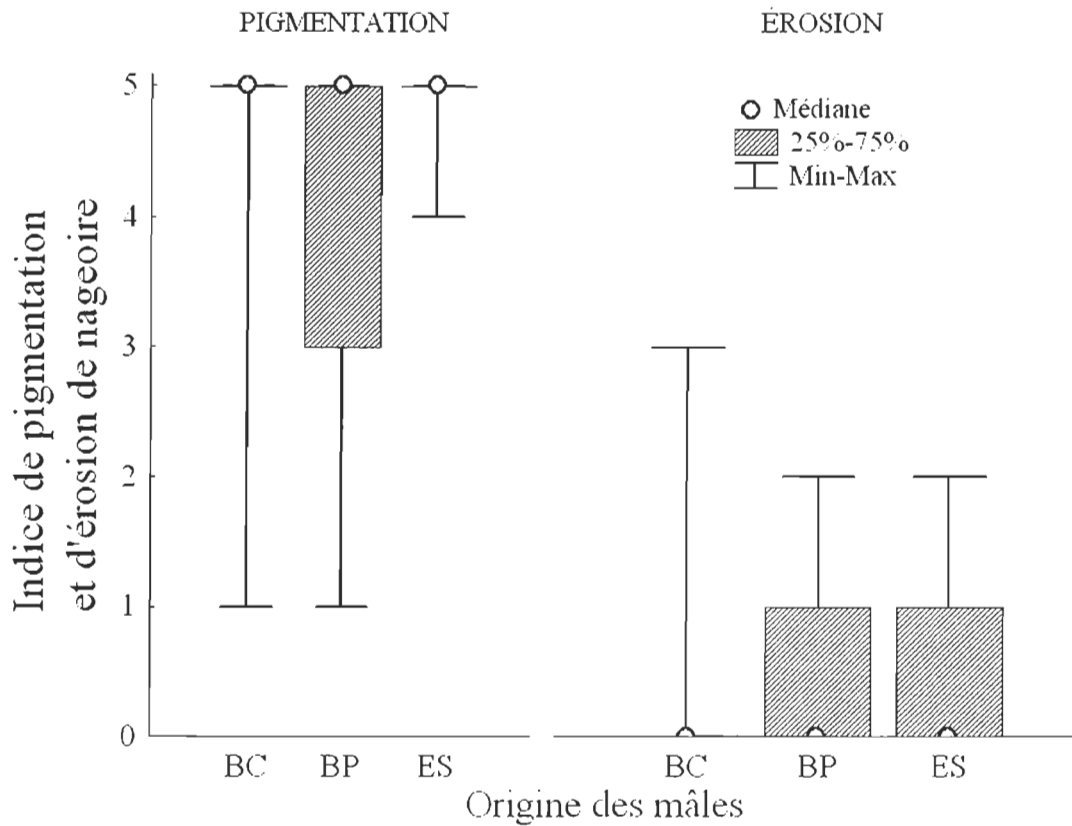


Figure 17. Indices de pigmentation et d'érosion de nageoire des juvéniles de plie rousse issus de croisements de type "demi-frère" en janvier. Il n'y a pas de différence entre les groupes (tests de Kruskal-Wallis, $N = 63$, $P < 0,05$). Les résultats sont exprimés sous forme de médiane (cercle), quartiles (boîtes) et minimum-maximum (moustaches). Échelle: 0: 0 %; 1: 1 – 20 %; 2: 21 – 40 %; 3: 41 – 60 %; 4: 61 – 80 %, et 5: 81 – 100 % d'érosion ou de pigmentation. BC: mâle de la baie des Chaleurs, BP: mâle de la baie de Passamaquoddy, ES: mâle de l'estuaire du Saint-Laurent.

Nombre de copies de gènes

Les nombres moyens de copies des gènes codant pour les protéines antigél présents chez les différents groupes de juvéniles hybrides sont présentés au Tableau VII. Il est important de noter que le nombre de copies du gène codant pour la protéine antigél hyperactive de type I est faible alors que les petites protéines HPLC-6 et HPLC-8 sont encodées par un important nombre de copies dans le génome de ces poissons. Les juvéniles fécondés par les mâles de l'estuaire du Saint-Laurent et de la baie des Chaleurs, les régions les plus nordiques, ont nettement plus de copies des gènes codant pour ces petites protéines dans leur génome que les juvéniles fécondés par les mâles de la Baie de Passamaquoddy, une région beaucoup plus méridionale. Les Tableaux VIII, IX et X présentent les nombres de copies des différents gènes mesurés chez les juvéniles fécondés par les mâles des différentes origines. Il est clair qu'une variation substantielle du nombre de copies de gène est également présente au sein d'un même type de croisement.

Tableau VII. Nombre moyen de copies des gènes codant pour les protéines antigél chez les juvéniles fécondés par les mâles des trois origines. BC: mâle de la baie des Chaleurs, BP: mâle de la baie de Passamaquoddy, ES: mâle de l'estuaire du Saint-Laurent.

	BC	BP	ES
HYP TYPE I	2	2	4
HPLC-6	22	6	47
HPLC-8	40	12	41

Tableau VIII. Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél
sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de la baie
des Chaleurs. n/d: non disponible.

Individu	HYP TYPE I	HPLC-6	HPLC-8
1	3	49	26
2	3	25	n/d
3	2	10	54
4	4	82	89
5	2	19	22
6	1	23	70
7	4	43	82
8	0	17	27
9	3	46	32
10	4	98	202
11	1	11	25
12	2	17	20
13	3	31	81
14	2	6	33
15	3	7	7
16	1	4	3
17	2	8	13
18	3	6	n/d
19	2	9	25
20	3	13	12
21	1	6	n/d
22	1	3	7
23	2	17	10
24	n/d	9	6
25	1	8	n/d

Tableau IX. Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél
sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de la baie
de Passamaquoddy. n/d: non disponible.

Individu	HYP TYPE I	HPLC-6	HPLC-8
1	1	1	1
2	1	2	3
3	1	1	1
4	2	2	3
5	0	2	5
6	1	2	3
7	n/d	3	3
8	1	3	n/d
9	1	4	13
10	2	3	4
11	4	11	n/d
12	1	2	9
13	2	6	6
14	6	6	4
15	4	16	n/d
16	1	n/d	21
17	1	8	5
18	1	4	12
19	1	n/d	40
20	3	35	83
21	1	4	9
22	1	2	5
23	1	5	33
24	1	3	8
25	0	n/d	5

Tableau X. Nombre de copies de gène encodant les principales protéines antigél
sériques chez les juvéniles de plie rouge fécondés par les mâles de
l'estuaire du Saint-Laurent. n/d: non disponible.

Individu	HYP TYPE I	HPLC-6	HPLC-8
1	2	8	n/d
2	2	15	17
3	2	28	11
4	2	39	n/d
5	n/d	51	84
6	5	57	21
7	5	63	21
8	3	n/d	40
9	4	76	114
10	4	69	19
11	n/d	72	36
12	5	40	49
13	4	51	n/d

A.4 INTERPRÉTATION

D'une manière préliminaire, les résultats suggèrent une importante différence de résistance au gel entre les populations originaires des deux régions soumises à un important risque de gel saisonnier (ES et BC) et celle originaire d'une région rarement soumise au gel (BP). Ainsi, ces populations nordiques possèderaient un nombre plus important de gènes codant pour les petites isoformes sériques, mais il semble également que les individus de l'estuaire du Saint-Laurent pourraient présenter un nombre de copies plus important du gène codant pour l'isoforme hyperactive. Ces tendances pourront être vérifiées après les résultats définitifs des travaux de Gisela Martinez et de ses collègues sur les souches pures. Cependant, ces populations nordiques sembleraient recommandées dans le cadre d'un élevage en eau froide.

Dans cette étude, l'utilisation de familles de type "demi-frère" ne nous permet pas de distinguer de différence parentale dans la transmission de ces gènes puisque nous n'avons pas les valeurs des individus utilisés pour les croisements. Cette analyse n'ayant pas été planifiée au moment des fécondations, aucun prélèvement n'a été réalisé sur les géniteurs. De plus, même au début de l'hiver, aucune différence de croissance ou de condition n'a pu être attribuée à l'origine géographique des mâles chez les juvéniles étudiés. Ces résultats corroborent l'absence d'effet paternel dans le potentiel de croissance des jeunes juvéniles de plie rouge déjà décelé au cours de la période suivant la déposition

(chapitre II). Il serait nécessaire d'étudier ces effets quand les températures hivernales approchent le point de congélation afin de déterminer si le plus faible nombre de copies de gènes AFP des populations méridionales peut affecter la croissance hivernale des juvéniles.

A.5 REMERCIEMENTS

Nous souhaitons remercier L. Seychelles, F. Jacques, M. Parenteau, K. Dumas, É. Lavisse, A. Licois, D. Lavallée et M. Péloquin pour leur précieuse aide dans L'élevage des animaux. Nous souhaitons également remercier V. Ewart, G. Martinez et R. Richards de l'IBM pour leur accueil et leur implication dans les analyses génétiques. Nous sommes reconnaissants envers E. Trippel (DFO, Saint-Andrews, N.-B.) pour nous avoir fourni des spécimens de plie rouge de la baie de Passamaquoddy. Ce projet était financé par une subvention stratégique conjointe du CRSNG (STPGP 307484-04) attribuée à M. Litvak (CCSA-UNBSJ), C. Audet (ISMER-UQAR), Y. Lambert (IML-MPO) et V. Ewart (IBM-CNRC), par le Réseau Aquaculture Québec et par le Ministère des Pêches et Océans du Canada.

