



**Dynamique d'utilisation des nutriments durant l'embryogenèse  
chez le doré jaune (*Sander vitreus*) et le flétan du Groenland  
(*Reinhardtius hippoglossoides*)**

Thèse présentée

dans le cadre du programme du doctorat en océanographie

en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor es océanographie

PAR

© **Sahar Mejri**



**Composition du jury :**

**Gesche Winkler, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski**

**Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Céline Audet, codirectrice de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Grant Vandenberg, codirecteur de recherche, Université Laval**

**Tillmann Benfey, examinateur externe, University of New Brunswick**

Dépôt initial le 23 octobre 2015

Dépôt final le 27 Janvier 2016



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 papa**





## REMERCIEMENTS

Avant tout, mes remerciements vont à mon directeur de thèse, Réjean Tremblay, qui s'est toujours montré à l'écoute, disponible et qui a su m'encadrer remarquablement. Il a été pour moi une source d'inspiration et de motivation.

Je souhaite remercier ma co-directrice de thèse, Céline Audet, avec qui j'ai beaucoup appris. Céline m'a toujours soutenue et encouragée. Je remercie également mon co-directeur Grant Vandenberg, qui a très vite manifesté de l'intérêt pour le projet. Merci Grant pour ton professionnalisme, ta bonne humeur et ta disponibilité.

Je tiens à remercier spécialement Gesche Winkler et Tillmann Benfey pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail, en tant que présidente du jury pour Mme Winkler et en tant que membre externe pour M. Benfey. Merci pour vos précieux commentaires et suggestions.

Ma reconnaissance va également aux chercheurs Chris C Parrish, Mari Moren, Ines Ben Khemis et Yvan Lambert qui ont été d'une aide précieuse dans l'élaboration des expériences et lors de la rédaction de mes articles.

J'exprime ma gratitude à Karo Grenier et Marco Blanchet, les propriétaires de la station piscicole « Trois-Lacs », qui m'ont aidé dans la réalisation de mes expériences, et sans qui le travail d'écloserie n'aurait pu être réalisé. Un chaleureux merci également à toutes les personnes du laboratoire côtoyées durant ces quatre, voire même ces six dernières années.

Je remercie vivement tous les membres de l'équipe d'administration à l'ISMER, qui sont toujours présents, et avec le sourire, pour nous aider.

Ce travail a été rendu possible grâce au support financier du gouvernement tunisien, du fond de recherche nature et technologie (FQRNT), du conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), du ministère de l'agriculture, pêcheries et alimentation Québec (MAPAQ), du regroupement « ressources aquatiques Québec (RAQ) », de la fondation de l'UQAR, de l'ISMER et de l'association internationale des études québécoises (AIEQ).

J'adresse mes remerciements aux amis d'ici ou d'ailleurs qui se reconnaîtront : Yasmine, Hela, Elyès, Stéphanie, Géraldine, Clémence, Marjolaine, Jessica, Cécile, Isabelle Boulangeat, Isabelle Boily, Marie-France, Marine, Laurence, Bertrand, François, Louis, Philippe...

Je tiens à remercier les deux personnes qui ont eu la lourde tâche de m'avoir pour fille (je sais que cela n'a pas été facile tous les jours), de m'armer pour la vie et de m'avoir donné la meilleure éducation qui soit : bien plus que des remerciements pour Papa et Maman. Je remercie mes deux sœurs et mon frère pour leur soutien. Je remercie également ma belle famille. J'ai une pensée toute particulière à ma petite filleule Léa, qui est un vrai petit miracle.

Enfin, je ne remercierai jamais assez ma moitié, Julien, pour sa patience, son amour au quotidien, ses encouragements et son altruisme. Merci de m'avoir rejoint, à presque la moitié, de cette aventure québécoise, toi qui aimes la chaleur et les océans.

Je remercie tous ceux que j'ai pu oublier par mégarde et qui m'ont sûrement épaulée d'une façon ou d'une autre.

## RÉSUMÉ

Au sein des populations sauvages de poissons, la variabilité des taux de survie des premiers stades de vie est considérée comme une des principales causes de fluctuations des effectifs des différentes classes de taille. Dans un contexte aquacole, cela peut rapidement devenir une contrainte majeure à l'obtention de bons rendements de production pour les espèces piscicoles à haute valeur commerciale. Une partie importante de cette variabilité est attribuée à la qualité biochimique des œufs qui est directement liée à la condition des géniteurs, mais également aux conditions environnementales et nutritionnelles. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet était de mieux comprendre la dynamique d'incorporation et d'utilisation des nutriments dans les œufs de poissons. Ainsi, cette thèse est divisée en trois chapitres, axés sur l'étude de deux modèles biologiques, le doré jaune (*Sander vitreus*) et le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), deux espèces à fort intérêt commercial au Canada. Le premier chapitre avait pour objectif d'identifier le moment idéal de ponte chez des géniteurs du doré jaune en captivité. Pour ce faire, les variations biochimiques des œufs issus de 4 périodes de pontes successives ont été étudiées au sein d'un même cycle reproductif. L'objectif du deuxième chapitre était, quant à lui, d'améliorer les connaissances en termes de besoins nutritionnels des géniteurs du doré jaune. Pour cela, l'importance des nutriments alimentaires sur la performance reproductive et la qualité biochimique des œufs et des larves a été évaluée. Ainsi, deux régimes alimentaires (moulée expérimentale ou commerciale + maquereau) ont été testés, sur deux groupes de géniteurs en captivité et un groupe de géniteurs sauvages. Enfin, le troisième chapitre s'insère dans une thématique plus environnementale avec l'étude de la capacité de remodelage des acides gras (AGs) durant l'embryogenèse, chez le flétan du Groenland, sous l'effet de différents niveaux d'oxygène dissous.

Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier certaines caractéristiques biochimiques des œufs en lien avec leur qualité, les besoins énergétiques des embryons et la capacité adaptative de l'espèce. Les résultats principaux de ce projet de recherche suggèrent que les concentrations en acides gras essentiels et en acides aminés (AA) des œufs pourraient expliquer les différences dans la qualité de ces derniers (capacité à donner des embryons viables et en santé). Les œufs, possédant un globule huileux (doré jaune), qui ont un meilleur succès d'éclosion, contiennent au moins 5% d'acide linoléique (18 : 2 n-6) et d'acide linolénique (18 : 3 n-3) et  $\approx 25\%$  d'acide docosahexaénoïque (DHA),  $\geq 6\%$  de sérine, 0,1% de méthionine, au moins 0,2 mg.g<sup>-1</sup> de vitamine A<sub>1</sub> et  $> 2$  mg.g<sup>-1</sup> de vitamine A<sub>2</sub>. En outre, la source d'énergie principale des œufs avec globule huileux provient des lipides neutres, des protéines et des acides aminés libres. Cependant les œufs dépourvus de globule huileux (flétan du Groenland), présentant un bon succès d'éclosion, sont associés à des concentrations élevées en DHA, en acide eicosapentaénoïque (EPA), en acide oléique

(18 : 1 n-9) et en acide gondoïque (20 : 1 n-9). Enfin, chez les œufs du flétan du Groenland, soumis à des conditions hypoxiques, aucun remodelage des AGs n'a été observé. En effet, on serait attendu à un remodelage pour permettre une plus grande perméabilité membranaire. Durant le développement embryonnaire, l'énergie provient principalement des lipides neutres monoinsaturés et des lipides polaires polyinsaturés.

Ainsi, cette recherche apporte de nouvelles pistes de réflexion quant à l'importance des réserves biochimiques (AG, AA et vitamine A) des œufs et larves de poissons, pour l'étude des impacts des différents facteurs biologiques et environnementaux auxquels les jeunes stades sont exposés. Nous avons mis en évidence le lien entre la dynamique d'utilisation des nutriments par les œufs et le succès du développement, ainsi que la corrélation positive entre certains AAs, acides gras essentiels et la vitamine A, et la survie embryonnaire et larvaire. Enfin, à la lumière des résultats obtenus il est apparu qu'une emphase particulière devrait être portée sur le rôle des AGs dans l'adaptation aux conditions environnementales.

Mots clés : œufs, larves, énergie, acides gras, acides aminés, vitamine A, succès d'éclosion, embryogenèse, hypoxie, moment d'ovulation, besoins nutritionnels, doré jaune, flétan du Groenland.

## ABSTRACT

In wild fish populations, variability in survival, mainly at the early stages of development, is considered a major cause of fluctuations in different size classes of wild populations. In an aquaculture context, this can be a major constraint to achieving adequate production for fish species with high commercial value. Some of this variability is attributed to the biochemical egg quality, due to the broodstock condition as well as environmental and nutritional conditions. Therefore, in this project, the main objective was to better understand the dynamics of availability and incorporation of nutrients in fish eggs. For that purpose, two biological models were considered: Walleye (*Sander vitreus*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). The thesis has focused on three chapters. The purpose of the first chapter was to identify the ideal spawning timing, during the reproductive cycle of broodstock walleye in captivity. Thus, we studied the variations in biochemical composition of eggs at four consecutive periods during a one-month spawning season. In the second chapter, the goal was to increase our knowledge about the nutritional needs of broodstock walleye. We evaluated the importance of dietary nutrients on reproductive performance and biochemical composition of eggs and larvae. Thus, two diets (experimental or commercial pellets + mackerel) were tested on two captive broodstock groups and compared to a wild broodstock. In the third chapter, an environmental component was included; The aim was to determine whether there was potential remodelling of fatty acids (FA) during embryogenesis in eggs of Greenland halibut exposed to several levels of dissolved oxygen.

The results obtained have allowed us to identify certain egg biochemical characteristics in relation to their quality, the energy requirement of the embryos and adaptive capacity of the species. The main results of this research suggests that the concentrations of essential fatty acids and amino acids (AA) in eggs may explain differences in egg quality and success of larval development within a broodstock population. Eggs that contain an oil globule (walleye), which have better hatching success, contain at least 5% linoleic acid (18:2 n-6) and linolenic acid and  $\approx 25\%$  docosahexaenoic acid (DHA) in the total neutral FA. Furthermore, serine and methionine levels are optimal at  $\geq 6$  and 0.1%, respectively. Minimal levels could be 0.2 mg.g<sup>-1</sup> for vitamin A<sub>1</sub> and  $> 2$  mg.g<sup>-1</sup> for vitamin A<sub>2</sub>. In addition, during embryogenesis, the main energy sources are neutral lipids, proteins and free amino acids. However, eggs without an oil globule (Greenland halibut), with high hatching success, are associated with high concentrations of DHA, eicosapentaenoic acid (EPA), oleic acid (18:1 n-9), and gondoic acid (20:1 n-9). Finally, no FA remodelling was observed in eggs submitted to hypoxic conditions. Indeed, we would have expected a remodelling to allow greater membrane permeability. During

embryonic development, the energy is mainly provided from monounsaturated neutral lipids and polyunsaturated polar lipids.

The present study shows the importance of fish eggs and larvae biochemical composition (FA, AA and vitamin A), to investigate the effects of different biological and environmental factors, to which young stages are exposed. We have highlighted the link between the availability and the dynamic of nutrient use and the success of embryonic development, and the positive correlation between some AA, essential fatty acids and vitamin A, and egg and larval survival. Finally, in the light of these results, special emphasis should be given to the role of FA in adapting to environmental conditions.

Keywords: eggs, larvae, energy, fatty acids, amino acids, vitamin A, survival success, embryogenesis, hypoxia, ovulation timing, nutritional requirements, walleye, Greenland halibut.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
TABLE DES MATIÈRES .....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES.....	xx
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
AQUACULTURE ET PÊCHE.....	1
LA QUALITÉ DES ŒUFS .....	4
LES ŒUFS DES TÉLÉOSTÉENS.....	5
BIOCHIMIE DES LIPIDES ET DES PROTÉINES.....	7
CYCLE REPRODUCTIF ET MOMENT D'OVULATION.....	17
ALIMENTATION ET ÂGE DES GÉNITEURS.....	19
L'ENVIRONNEMENT .....	24
OBJECTIFS DE LA THÈSE .....	27
CHAPITRE 1 Qualité biochimique des œufs du doré jaune ( <i>Sander vitreus</i> ) en captivité en lien avec le moment d'ovulation suite au traitement hormonal.....	30
1.1 RÉSUMÉ.....	30
1.2 BIOCHEMICAL EGG QUALITY IN A CAPTIVE WALLEYE ( <i>SANDER VITREUS</i> ) BROODSTOCK POPULATION RELATIVE TO OVULATION TIMING FOLLOWING HORMONAL TREATMENT .....	32

1.3	ABSTRACT .....	33
1.4	INTRODUCTION .....	34
1.5	MATERIALS AND METHODS .....	35
1.5.1	Spawning and egg production.....	35
1.5.2	Sample collection.....	37
1.5.3	Biometric analysis.....	37
1.5.4	Biochemical analysis.....	37
1.5.5	Statistical analysis.....	39
1.6	RESULTS.....	40
1.6.1	Reproductive characteristics .....	40
1.6.2	Egg biochemical composition in relation to walleye ontogeny .....	40
1.6.3	Use of biochemical reserves during embryonic development .....	48
1.7	DISCUSSION.....	50
1.8	CONCLUSION .....	54
	REFERENCES.....	56
	CHAPITRE 2 Différences dans la composition en nutriments des œufs et des larves comme indicateurs de l'optimisation de l'alimentation des géniteurs dans la production du doré jaune ( <i>Sander vitreus</i> ) .....	65
2.1	RÉSUMÉ.....	65
2.2	DIFFERENCES IN NUTRIENT CONTENT OF EGGS AND LARVAE AS INDICATORS FOR IMPROVEMENT OF BROODSTOCK NUTRITION IN WALLEYE ( <i>SANDER VITREUS</i> ) PRODUCTION .....	67
2.3	ABSTRACT.....	68
2.4	INTRODUCTION.....	69
2.5	MATERIALS AND METHODS.....	70
2.5.1	Experimental fish and culture facility.....	70
2.5.2	Pellet composition.....	71
2.5.3	Spawning and sample collection.....	72



2.5.4	Biometric analysis .....	73
2.5.5	Biochemical analysis .....	73
2.5.6	Statistical analysis.....	75
2.6	RESULTS .....	76
2.6.1	Reproductive characteristics.....	76
2.6.2	Nutrient composition of the diet.....	78
2.6.3	Nutrient composition of eggs and larvae.....	80
2.7	DISCUSSION .....	88
2.7.1	Reproductive characteristics.....	89
2.7.2	Lipids and fatty acids.....	89
2.7.3	Proteins and amino acids .....	92
2.7.4	Vitamin A .....	93
2.8	CONCLUSION.....	95
	REFERENCES .....	97
	CHAPITRE 3 Le remodelage des acides gras durant l'embryogenèse chez le flétan du Groenland ( <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> ) en lien avec l'hypoxie .....	105
3.1	RÉSUMÉ .....	105
3.2	FATTY ACID REMODELLING DURING EMBRYOGENESIS IN GREENLAND HALIBUT ( <i>REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES</i> ) IN RELATION TO HYPOXIA TOLERANCE .....	107
3.3	ABSTRACT .....	108
3.4	INTRODUCTION .....	109
3.5	MATERIALS AND METHODS.....	111
3.5.1	Experimental design and egg sampling.....	111
3.5.2	Fatty acid analysis .....	112
3.5.3	Statistical analysis.....	112
3.6	RESULTS .....	113
3.6.1	Fatty acid composition in relation to DO levels .....	113
3.6.2	Polar fraction of fatty acids.....	115

3.6.3	Neutral fraction of fatty acids .....	119
3.6.4	Relation between hatching success and relative content of fatty acids.....	121
3.7	DISCUSSION.....	123
3.7.1	Remodelling fatty acids in low DO.....	123
3.7.2	Fuel for egg development .....	124
3.7.3	FA composition in relation to hatching success.....	125
3.8	CONCLUSION .....	127
	REFERENCES.....	128
	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	137
	UTILISATION ET INCORPORATION DES NUTRIMENTS .....	139
	PERSPECTIVES ET LIMITES .....	147
	CONCLUSION GÉNÉRALE .....	152
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	153

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les acides aminés essentiels, partiellement essentiels et non essentiels chez les poissons .....	14
Table 2. Reproductive characteristics of female walleye and their eggs and larvae collected throughout the 2012 spawning season from a broodstock in captivity.....	42
Table 3. Fatty acid composition of neutral and polar lipids of walleye eggs at 30 degree-days post fertilization at different spawning periods (P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , P <sub>3</sub> , and P <sub>4</sub> ).....	45
Table 4. Free and total amino acid contents of walleye eggs at 30 degree-days post fertilization at different spawning periods (P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , P <sub>3</sub> , and P <sub>4</sub> ).....	47
Table 5. Weight gain, characteristics of eggs and larvae, and reproductive performance of 5- and 9-year-old fish from domesticated broodstocks fed two diet treatments compared to a wild broodstock.....	77
Table 6. Fatty acid, amino acid, and vitamin A composition in mackerel, commercial pellets (CP), and experimental pellets (EP) .....	79
Table 7. Fatty acid composition of neutral lipids of walleye eggs and larvae .....	81
Table 8. Amino acid composition of walleye eggs at 30 and 60 degree-days post-fertilization for five different treatments.....	85
Table 9. Amino acid composition of walleye larvae for five different treatments .....	86
Table 10. Fatty acid composition (mean ± SD, expressed as percentage of total polar and neutral lipids detected) in Greenland halibut eggs exposed to different dissolved oxygen (DO) levels .....	114
Table 11. Fatty acid composition of the polar lipid fraction in Greenland halibut eggs with different hatching successes.....	116

Table 12. SIMPER analysis results for fatty acids from polar and neutral lipid fractions ..... 118

Table 13. Fatty acid composition of the neutral lipid fraction in Greenland halibut eggs with different hatching successes ..... 120

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Œufs du doré jaune ( <i>Sander vitreus</i> ) à globule huileux (gauche) et du flétan du Groenland ( <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> ) sans globule huileux (droite).....	7
Figure 2. Voies de biosynthèse des acides gras essentiels à partir des deux précurseurs : 18 : 2 n-6 et 18 : 3 n-3 chez les poissons .....	10
Figure 3. Voies de métabolisme des acides aminés (AAs) chez les œufs et larves de poissons .....	15
Figure 4. Changes in total lipid content and lipid class composition in walleye ( <i>Sander vitreus</i> ) eggs at 30 degree-days post fertilization .....	43
Figure 5. Variations in the proportions of selected fatty acid classes among eggs from different spawning periods at 30 degree-days post fertilization .....	46
Figure 6. Changes in the major lipid class composition in walleye ( <i>Sander vitreus</i> ) eggs and larvae at 30, 60, 155, and 200 degree-days post fertilization .....	49
Figure 7. Non-metric multi-dimensional scaling of the Bray-Curtis similarity matrix based on the relative abundance of neutral and polar fatty acid profiles associated with eggs and larvae.....	82
Figure 8. Composition of the most abundant fatty acids in polar lipids in eggs and larvae .....	84
Figure 9. Composition of vitamin A (Vitamin A <sub>1</sub> : all-trans-ROH and vitamin A <sub>2</sub> : dehydro-ROH) in eggs at 30 degree-days post fertilization.....	87
Figure 10. Content of vitamin A <sub>1</sub> and vitamin A <sub>2</sub> in eggs in relation to hatching success.....	88
Figure 11. Content of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in egg polar lipids in relation to hatching success.....	122

Figure 12. Content of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic in egg neutral lipids in relation to hatching success .....	123
Figure 13. Schéma récapitulatif des stratégies d'utilisation des nutriments durant le développement embryonnaire pour deux modèles d'œufs : modèle 1 (œuf avec globule huileux, doré jaune) et modèle 2 (œuf sans globule huileux, flétan du Groenland) .....	138
Figure 14. Les changements ontogéniques des acides aminés libres (FAA) dans les œufs de trois espèces dont deux ont des œufs sans globule huileux (modèle 2) et une avec globule huileux (modèle 1).....	145

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### AQUACULTURE ET PÊCHE

La demande alimentaire de la population mondiale est constamment en croissance. En 2011, les pêches de capture et l'aquaculture ont produit 154 millions de tonnes de poissons, dont 131 millions de tonnes destinées à l'alimentation humaine (FAO, 2012). La production aquacole mondiale est dominée par les poissons d'eau douce (FAO, 2013). Les pêches commerciales (pêches maritimes et pêches en eau douce), l'aquaculture et la transformation représentent des extrants d'une valeur de 6,4 milliards de dollars au Canada. Entre 2001 et 2011, la valeur de la production aquacole canadienne a augmenté de 40% dont 70% est généré par l'élevage du saumon atlantique (*Salmo salar*). À l'échelle mondiale, le Canada a produit environ 7% du saumon d'élevage en 2009. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) vient au second rang, soit 5,3% de la production (FAO, 2012). Cette espèce a enregistré une croissance de 6% par année depuis 2007 et elle est principalement élevée en Ontario. Parmi les autres espèces de poissons élevées dans les installations aquacoles canadiennes figurent l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) (DFO, 2012). Quant à la pêche commerciale, elle a connu une progression mondiale surtout pour la pêche en mer, atteignant 80 millions de tonnes aujourd'hui. La pêche en eaux intérieures ne représente que le quart des valeurs. Selon le ministère des Pêches et Océans Canada, 84,5% de la valeur des pêches maritimes (poissons à nageoires, fruits de mer) au Canada proviennent de l'Est du Canada, et le reste de la Colombie-Britannique. Les pêches de la côte Est sont beaucoup plus diversifiées que celles de la côte Ouest et reposent sur environ 13 espèces incluant des poissons de fond tels que la morue franche (*Gadus morhua*), l'aiglefin (*Melanogrammus aeglefinus*), le flétan atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*) et le sébaste atlantique (*Sebastes mentella*). Le

poisson à nageoires qui a la plus forte valeur commerciale dans l'Est du Canada est le flétan incluant le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), suivi du hareng (*Clupea harengus*) (DFO, 2012).

### *Le doré jaune (Sander vitreus)*

Le doré jaune (*Sander vitreus*) est un percidé d'eau douce qu'on trouve dans plus de 1500 lacs de la baie James jusqu'à l'extrême sud de la province de Québec (MPO, 2010a), ce qui représente une superficie totale d'un peu plus de 30 000 Km<sup>2</sup> (MPO, 2010a). L'aire de distribution indigène au Canada s'étend du Québec, à l'est, jusqu'à la ligne continentale de partage des eaux. On le trouve dans le bassin de Mackenzie jusqu'à l'océan Arctique, au nord, et, dans le sud, on le trouve aussi loin qu'en Alabama et en Arkansas (MPO, 2010b). Le frai a lieu au printemps, d'avril à juin, sur des fonds graveleux, dans des eaux peu profondes et bien oxygénées (Bernatchez et Giroux, 1991; MPO, 2010a). L'âge à maturité sexuelle varie de 2 à 8 ans selon le milieu et la latitude. Les proies consistent en des copépodes, des cladocères et de petits poissons durant les premières semaines de vie, pour ensuite évoluer vers un régime alimentaire à dominance de poissons. Il s'agit d'une espèce qui a une très grande importance économique au Canada (Bernatchez et Giroux, 1991) et est la deuxième espèce de poisson d'eau douce la plus pêchée au Canada et au Québec (MPO, 2010b). La durée d'incubation des œufs varie de 14 à 21 jours selon la température de l'eau (Johnston et al., 2007).

Au Québec, l'aquaculture du doré jaune (*Sander vitreus*) est une industrie en développement avec un fort potentiel de croissance. Elle produit prioritairement des larves pour ensemercer les lacs publics et privés pour les besoins de la pêche sportive (MPO, 2010a). Tant au Québec qu'en Amérique du Nord, les écloséries publiques et privées dépendent presque exclusivement des œufs prélevés en milieu naturel (Malison et al., 1998). Au Québec, en 1994, soit au début du développement de la production commerciale de cette espèce, les aspects concernant l'alimentation et la gestion des géniteurs ont été



omis en raison de la facilité relative de se procurer des œufs en milieu naturel et des connaissances limitées de l'élevage de cette espèce. Aujourd'hui, l'obtention de permis de récolte d'œufs en milieu naturel est conditionnelle au développement d'une souche génétique afin que les aquaculteurs deviennent complètement autonomes. Ceci a poussé les producteurs à travailler sur l'optimisation de la qualité des œufs provenant des géniteurs en captivité. Des essais au niveau de l'alimentation des géniteurs avec des poissons vivants et morts ont eu lieu. Cependant, malgré l'efficacité relative de cette nourriture, les coûts et les risques de maladies engendrés restent importants (MPO, 2010a). Le développement d'un aliment inerte et l'optimisation de ces composantes sont devenus une priorité pour le développement de l'industrie aquicole du doré jaune en particulier, mais aussi pour les percidés d'une façon plus générale.

#### *Le flétan du Groenland (Reinhardtius hippoglossoides)*

Le flétan du Groenland (*Reinhardtius hypoglossoides*) est un poisson marin plat que l'on retrouve dans l'Atlantique nord-est et dans l'océan Arctique. Il est présent dans l'Atlantique nord-ouest; du golfe du Saint-Laurent vers les eaux profondes au large des Grands bancs de Terre-Neuve et au nord du détroit de Davis et dans la baie de Baffin (Dyck et al., 2007). Il s'agit d'une espèce d'un grand intérêt commercial. En effet cette espèce représente 53% de la biomasse des captures totales de poissons dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent (EGSL) (MPO, 2008). Le frai a lieu principalement en hiver entre les mois de janvier et de mars (DFO, 2006). La durée d'incubation des œufs varie de 25 à 28 jours (Mejri et al., 2012; Stene et al., 1999). Les juvéniles, entre 15 et 30 cm, se concentrent principalement dans l'estuaire et au nord de l'île d'Anticosti alors que les poissons de plus grande taille (> 33 cm) sont répartis dans les différentes régions de l'EGSL (Treble et al., 2008). Ces observations suggèrent d'une part, que la tête du chenal Laurentien est la principale pouponnière pour cette population (DFO, 2006) et d'autre part, que le flétan du Groenland tolère la baisse du niveau d'oxygène dissous (OD) avec un seuil léthal pouvant se situer sous les 20-25 %sat communément mesuré dans l'estuaire. Malgré le grand intérêt

pour la pêche du flétan du Groenland, la biologie de la reproduction de ce dernier est encore peu connue (Gundersen et al., 2001), particulièrement la connaissance des facteurs influençant la reproduction et la viabilité des œufs.

## LA QUALITÉ DES ŒUFS

La variabilité de la survie des poissons au tout début de leur vie est considérée comme une des principales causes de fluctuation de l'effectif des différentes classes de taille au sein des populations sauvages (Anderson, 1988; Houde, 1987). Cette variabilité constitue par ailleurs une contrainte majeure à la production commerciale (Bromage et al., 1994; Kjørsvik et al., 1990). Une partie de cette variabilité est attribuée à la qualité des gamètes et aux conditions environnementales et nutritionnelles (Bromage et al., 1994; Brooks et al., 1997; Kamler, 2005; Kjørsvik et al., 1990). Par conséquent, comprendre les facteurs qui contribuent à la variabilité de la qualité des gamètes est un objectif clé pour le développement de l'industrie de la pêche et de l'aquaculture. Une des conditions prérequis pour la domestication et le développement de l'industrie aquicole est la capacité de contrôler les processus reproductifs du poisson en captivité, et l'obtention d'œufs de qualité optimale (Duarte et al., 2007; Mylonas et al., 2010). Bien qu'aujourd'hui de nombreux poissons d'élevage répondent à cette condition, il existe encore plusieurs espèces pour lesquelles l'industrie aquicole dépend exclusivement de la récolte d'œufs ou de juvéniles du milieu naturel. Parmi ces espèces on cite l'anguille d'eau douce (*Anguilla spp.*), la sériole du Japon (*Seriola spp.*), le mérrou (*Epinephelus spp.*) et le doré jaune. Pour les poissons marins, la qualité des œufs est un problème encore plus significatif et les facteurs expliquant ce faible succès sont encore très peu connus (Duarte et al., 2007).

Chez les poissons, la qualité des œufs peut être définie comme la capacité de l'œuf à être fécondé et à l'embryon d'y poursuivre son développement jusqu'à l'éclosion (Bobe et Labbé, 2010; Bromage et al., 1992; Hansen et Puvanendran, 2010; Kjørsvik et al., 1990). Un œuf de bonne qualité présente donc des taux de mortalités faibles à la fécondation avec

subséquentement de bons taux de survie des larves ou alevins à l'éclosion, à l'ouverture de la bouche et jusqu'au début de l'alimentation exogène. On s'attend également à ce que ces œufs produisent des alevins en santé, qui croissent rapidement (Bromage et al., 1994), bien que les effets de la qualité de l'œuf sur ces caractéristiques puissent être masqués par une variété de facteurs environnementaux et de pratiques aquicoles. Le nombre et la qualité des œufs produits peuvent être profondément affectés par les conditions sous lesquelles les géniteurs sont maintenus. Plusieurs facteurs sont impliqués et aucune normalisation n'est connue pour définir la combinaison optimale de facteurs caractérisant une qualité d'œuf standard. À ce jour, le statut nutritionnel et l'âge des géniteurs, la composition biochimique des œufs, le moment d'ovulation durant le cycle reproducteur (suite aux injections hormonales) et les conditions environnementales ont été identifiées comme des variables importantes influençant la qualité des œufs (Bromage et al., 1992; Brooks et al., 1997; Kjørsvik et al., 1990). Les comparaisons entre les poissons en captivité et les poissons sauvages, démontrent constamment que la qualité des œufs est meilleure chez les géniteurs sauvages tel que revu par Brooks et al. (1997). Cette qualité supérieure est largement reliée, aux conditions environnementales et au régime alimentaire des géniteurs.

## **LES ŒUFS DES TÉLÉOSTÉENS**

Un œuf de poisson mature contient une grande quantité de vitellus, avec ou sans globules huileux, de taille et de nombre variables, occupant la portion centrale du cytoplasme (Kunz-Ramsay, 2004; Menn et al., 2007). Un œuf est protégé par une enveloppe qui joue un rôle dans l'échange gazeux et qui permet le transport sélectif des matériaux. Le poids spécifique de l'œuf est déterminé par la dimension de l'espace vitellin et par le poids spécifique du contenu cellulaire (Kunz-Ramsay, 2004; Menn et al., 2007). Celui-ci peut être lourd s'il n'y a pas de globules huileux, ou léger en présence d'un ou plusieurs globules huileux. Le type d'œuf d'un poisson téléostéen peut être démersal, endogé, flottant ou semi flottant selon l'espèce et le biotope de celle-ci (Kunz-Ramsay,

2004). On distingue en général deux grands types : les œufs pélagiques (flottants) et les œufs démersaux (benthiques). Les œufs pélagiques flottent à la surface de l'eau ou dans la colonne d'eau et sont produits principalement par des poissons marins mais aussi par quelques poissons d'eau douce (Kunz-Ramsay, 2004). Les œufs pélagiques de la plupart des poissons marins sont généralement de petite taille et se développent à la surface de l'eau alors que les œufs plus gros vont se développer à des profondeurs plus importantes (bathypélagiques). Les différents types d'œufs qui flottent sont : 1- ceux dont la gravité spécifique du vitellus est faible, 2- ceux avec des globules huileux, et 3- ceux avec un très large globule huileux qui permet à l'œuf de flotter même en eau douce (Mellinger, 1994). Cependant, des types intermédiaires existent ainsi que d'autres caractéristiques qui permettent la flottabilité de l'œuf comme une membrane mince, les capacités adhésives et une densité spécifique supérieure à 1,01 une fois immergé.

Les œufs démersaux coulent et se déposent sur le fond. Ils sont principalement caractéristiques des poissons d'eau douce (Mellinger, 1994). Cette catégorie d'œufs existe chez les poissons marins qui pondent dans les zones littorales, ils sont connus aussi sous le nom d'œufs benthiques. Les œufs démersaux ou benthiques ont une gravité spécifique importante puisqu'ils contiennent de faibles proportions d'eau (60-70%) et un espace périvitellin très restreint (Kunz-Ramsay, 2004; Mellinger, 1994). Ils peuvent également contenir des globules huileux. Les œufs du doré jaune sont adhésifs et mesurent entre 1,5 et 2 mm. À la ponte, ils sont déposés sur des substrats rocheux et éclosent 230 jours plus tard. Ils appartiennent à la catégorie des œufs d'eau douce démersaux avec globule huileux (Figure 1). Les œufs du flétan du Groenland sont transparents avec un diamètre moyen de 4,4 mm (Mejri et al., 2012). Les œufs ont été trouvés à des profondeurs variant entre 50 et 800 m (Stene et al., 1999). Ils ont peu d'espace périvitellin comme chez les œufs du flétan du Pacifique (*Hippoglossus stenolepis*) ou du flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*) (Stene et al., 1999). Les œufs du flétan du Groenland appartiennent à la catégorie des œufs bathypélagiques sans globule huileux (Figure 1).

Les lipides vitellins, leur nature et leur localisation ont souvent été associés à la flottabilité de l'œuf (Mellinger, 1994). Les globules huileux contiennent des lipides dits « neutres » comme les triacylglycérides (TAG) et les cérides, par opposition aux lipides polaires constitués principalement de phospholipides (PLs). Ces derniers se retrouvent au niveau des vésicules vitellines, avec une faible proportion de certains lipides neutres. La composition lipidique du vitellus est très variable d'une espèce à l'autre et la correspondance entre ces variations et la structure de l'œuf, sa flottabilité et son biotope est très difficile à établir. On peut se demander si les variations dans les pourcentages des deux grandes catégories de lipides (neutres et polaires) sont le résultat d'une variation des volumes respectifs des deux compartiments que sont les globules huileux (lipides neutres) et les vésicules vitellines (lipides polaires). Le vitellus contient également une quantité importante de protéines, d'acides aminés libres, de glucides, de vitamines et de minéraux qui jouent un rôle important dans la formation des tissus (Jalabert, 2005).



Figure 1. Œufs du doré jaune (*Sander vitreus*) à globule huileux (gauche) et du flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*) sans globule huileux (droite)

## **BIOCHIMIE DES LIPIDES ET DES PROTÉINES**

Un thème commun tout au long de cette thèse est l'importance des lipides et des protéines pour les premiers stades de vie du doré jaune et du flétan du Groenland. Ils jouent

des rôles importants dans l'alimentation des géniteurs, la qualité de l'œuf et de la larve et enfin comme outils biochimiques pour mieux comprendre la capacité adaptative de l'espèce à certaines conditions environnementales.

### *Lipides et acides gras*

Les lipides sont de véritables molécules biologiques multifonctionnelles, utilisables aussi bien comme éléments structuraux des membranes, connecteurs permettant l'insertion membranaire de certaines protéines, précurseurs de réponses aux eicosanoïdes que comme métabolites particulièrement riches en énergie lorsqu'il s'agit d'acides gras (AGs) (Budge et al., 2006). La présence ou l'absence de globules huileux correspond respectivement à des œufs riches ou pauvres en lipides (Mourente et Vázquez, 1996). La première catégorie est caractérisée par une composition riche en lipides neutres (LN), principalement composés de triacylglycérides, et de faibles taux en lipides polaires (LP), alors que la deuxième catégorie est caractérisée par une forte composante en LP, principalement des phospholipides, et des quantités moindres en lipides neutres (Finn et al., 1995a; Rainuzzo et al., 1997). Dans les œufs de poisson, un des rôles majeurs des lipides est le stockage et la fourniture de l'énergie métabolique sous forme d'ATP suite à la  $\beta$  oxydation des AGs (Cetta et Capuzzo, 1982; Finn et al., 1995a; Rainuzzo et al., 1992; Rønnestad et al., 1994; Wiegand, 1996; Zhu et al., 2003). Les stratégies d'utilisation de cette énergie par l'embryon varient à la fois qualitativement et quantitativement selon les catégories d'œufs (œufs sans ou avec un globule huileux), la physiologie et la demande en énergie (Mourente et Vázquez, 1996; Rainuzzo et al., 1992). En effet, les œufs riches en LN utiliseront prioritairement des LN et ceux riches en LP utiliseront les LP comme source d'énergie (Tocher, 2003). Les profils en AGs des œufs de poissons sont souvent caractérisés par des teneurs élevées en acides gras polyinsaturés (PUFA), en particulier en acides docosahexaénoïque, DHA : 22 : 6 n-3 et eicosapenténoïque, EPA : 20 : 5 n-3, en acides gras monoinsaturés (MUFA) 18 : 1 n-9 et saturés (SFA) 16 : 0 (Kaitaranta et Ackman, 1981; Wiegand, 1996). Au niveau des œufs riches en LP, généralement des œufs sans globule d'huile, comme chez la morue franche

(Finn et al., 1995a; Fraser et al., 1988), le hareng de l'Atlantique (Tocher et al., 1985), le flétan de l'Atlantique (Falk-Petersen et al., 1989; Rainuzzo et al., 1992), le loup tacheté (*Anarhichas minor*) (Tveiten et al., 2004) et le flétan du Pacifique (Whyte et al., 1993), l'embryon a une exigence pour des taux élevés en PUFA (Tocher et Sargent, 1984). En effet, environ 50% des AGs présents dans les lipides polaires, sont polyinsaturés, et 94% de ces derniers sont des isomères de n-3. Il a été démontré par certains des auteurs précédemment cités, qu'il y a un catabolisme des PUFA, en particulier des DHA et des EPA, pour des besoins énergétiques par ces espèces lors du développement embryonnaire. Dépendamment de l'espèce, ces PUFA sont catabolisés de façon sélective ou non. Bien que pouvant être utilisés pour fournir de l'énergie, certains PUFA sont sélectivement conservés durant le développement embryonnaire (Finn et al., 1995a; Mourente et Vázquez, 1996; Tocher, 2003; Wiegand, 1996). La rétention de certains PUFA s'explique par leur importance pour l'organisme. Ils sont définis comme des acides gras essentiels (EFA) (Tocher et Sargent, 1984). Il s'agit des AGs que l'organisme animal ne peut pas ou faiblement synthétiser. Ils sont identifiés chez les poissons d'eau douce comme étant au nombre de deux : l'acide linoléique (18 : 2 n-6) et l'acide linoléique (18 : 3 n-3) (Mellinger, 1994; 1995). L'importance de ces deux PUFA est essentiellement liée à leur rôle de précurseurs d'autres PUFA des séries n-6 et n-3 (Figure 2), dont certains sont des constituants majeurs des membranes cellulaires ou des précurseurs de substances régulatrices des fonctions cellulaires comme l'acide arachidonique (AA) 20 : 6 n-3, l'EPA et le DHA (Tocher, 2003). Pour les poissons marins, l'EPA, le DHA et l'AA sont considérés des EFA en raison de l'absence ou de la faible activité de l'enzyme  $\Delta 5$  désaturase permettant l'élongation et la désaturation des acides linoléique et linoléique (Glencross, 2009) (Figure 2).

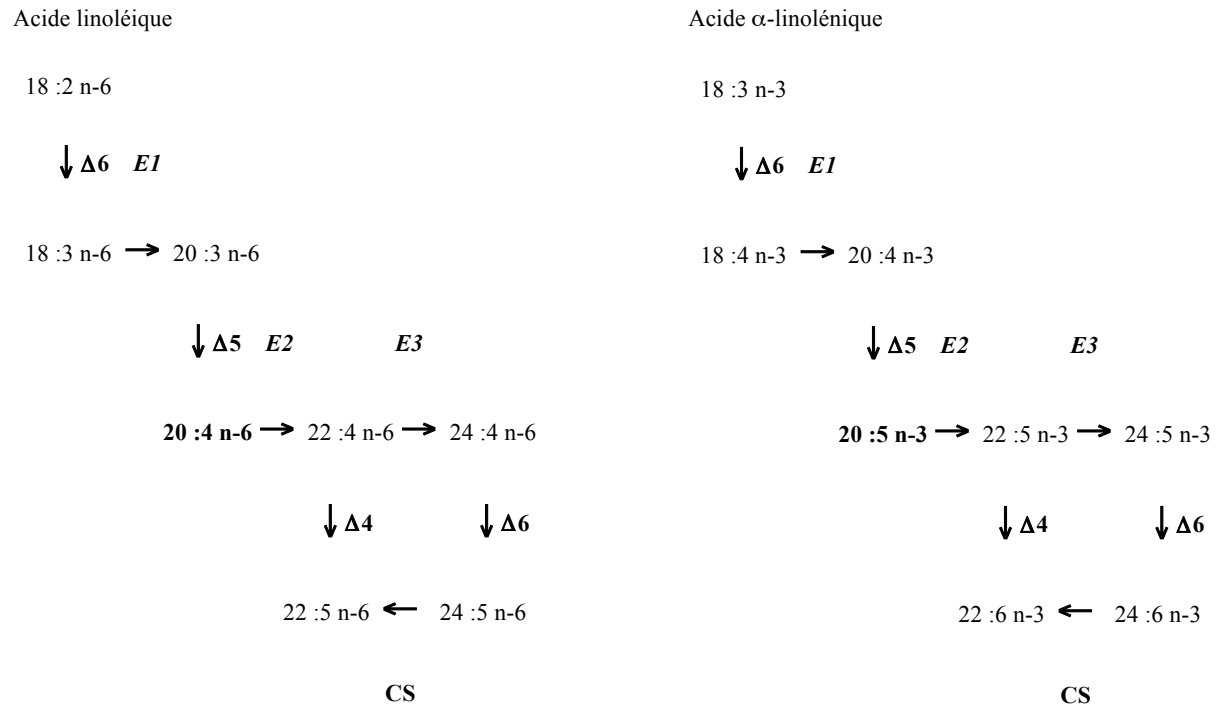


Figure 2. Voies de biosynthèse des acides gras essentiels à partir des deux précurseurs : 18 : 2 n-6 et 18 : 3 n-3 chez les poissons.  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  et  $\Delta 4$  sont des enzymes désaturases. *E1*, *E2* et *E3* sont des enzymes élongases. CS sont des peroxyosomes de raccourcissement de chaînes d'acides gras. Source Glencross (2009)

D'une façon générale, ces AGs se trouvent incorporés aux phospholipides membranaires, et redistribués sous cette forme dans tous les systèmes membranaires de la cellule (Mellinger, 1994; Sargent et al., 2002). L'activité biochimique des EFA peut avoir une multitude d'effets dont les mécanismes biochimiques précis ne sont pas tous connus et ceci même chez les mammifères. Certaines études ont démontré que l'EPA joue un rôle



important dans la biosynthèse tissulaire (Glencross, 2009) et que le DHA est nécessaire pour le développement des cellules neurales et visuelles chez plusieurs espèces, particulièrement chez les poissons (Mourente et Vázquez, 1996). De nombreuses études se sont tournées vers l'influence des EFA sur divers aspects de la reproduction chez les poissons, incluant la composition, la viabilité, le développement, la survie jusqu'à l'éclosion et au-delà (Izquierdo et al., 2001). Il a été démontré que les différents types et teneurs d'EFA sont corrélés avec la survie au cours du développement embryonnaire et la viabilité des larves (Kamler, 2005; Sewall et Rodgveller, 2008). La survie des embryons chez les œufs de trois populations distinctes de dorés (*Sander vitreus*), a été positivement corrélée avec les concentrations en EPA et DHA (Czesny et Dabrowski, 1998). Cependant, pour des échantillons pris en 1995 et 1996 à partir de ces populations, ces observations n'ont pu être confirmées (Czesny et Dabrowski, 1998). Chez le loup tacheté, la survie jusqu'au stade œillé et à l'éclosion, est négativement corrélée avec les pourcentages d'AA et d'EPA (Tveiten et al., 2004). Ces observations démontrent que l'effet seul des AGs ne peut expliquer toutes les variations observées sur le succès du développement embryonnaire. Chez les espèces de poissons dont les œufs contiennent des globules huileux, les patrons d'utilisation et de rétention des AGs lors du développement embryonnaire diffèrent d'une espèce à une autre malgré la forte tendance qu'ont ces espèces de préférentiellement consommer les AGs qui se retrouvent dans la fraction neutre, représentant la plus importante quantité de lipides dans les œufs (Czesny et Dabrowski, 1998; Rønnestad et al., 1994). Certaines études ont démontré que les larves ou alevins issus d'œufs contenant un globule huileux utilisent de 80 à 90% d'AGs en provenance des lipides neutres comme énergie métabolique juste après l'éclosion (Rønnestad et al., 1994). Deux fonctions principales sont attribuées à la présence d'huile au niveau de l'œuf (le globule huileux) : 1) contribuer à la flottabilité de l'œuf ou de la larve et 2) faciliter la transition de la larve vers l'exotrophie (Glencross, 2009; Mellinger, 1995). Il importe donc que les LN ne soient pas catabolisés avant que le système embryonnaire puisse s'alléger, en se débarrassant du chorion. L'autre fonction possible de l'huile est celle d'une réserve énergétique utilisable par la jeune larve. Les grandes variations de la composition des œufs

en termes de classes de lipides et d'AGs suggèrent d'importantes adaptations spécifiques chez les poissons. Plutôt que de limiter les comparaisons interspécifiques à des considérations sur la taille des œufs, il conviendrait donc de tenir compte des différences de compositions en classes de lipides et en AGs, pour comprendre les stratégies d'adaptation et de reproduction chez les différentes espèces. De façon sommaire, la diversité en termes de catabolisme des AGs et de la rétention des EFA lors du développement embryonnaire s'explique par la salinité du biotope, la température ambiante et la systématique (Watanabe, 1982) mais aussi par le type d'œuf (œuf avec ou sans globule huileux). En étudiant les taux de renouvellement des AGs et les stratégies d'incorporation des EFA lors du développement embryonnaire en fonction du type d'œuf, nous définirons les stratégies propres à chaque modèle. Notre choix s'est porté sur deux espèces, le flétan du Groenland et le doré jaune, deux espèces dont les œufs sont respectivement sans et avec globule huileux. Les œufs du flétan du Groenland sont pauvres en lipides et contiennent jusqu'à 70% de PLs (Mejri et al., 2012), alors que les œufs du doré jaune ont un globule huileux et sont riches en lipides neutres (Czesny et Dabrowski, 1998).

### *Protéines et acides aminés*

Les acides aminés (AAs) sont des molécules ayant des fonctions importantes chez les poissons. Ils existent sous forme d'acides aminés libres (FAA) ou d'acides aminés totaux (TAA) qui forment les protéines (Rønnestad et Morais, 2008). Les acides aminés alimentaires sont absorbés sous forme de FAA. Dans les œufs ou les larves, les FAA sont rapidement polymérisés en protéines ou utilisés comme énergie métabolique (Finn et al., 1995a; Rønnestad et al., 1999). En effet, les concentrations des FAA au niveau des tissus sont relativement faibles (Houlihan et al., 1995), le sac vitellin en contient la plus grande proportion chez les larves des poissons pélagiques marins, qui peut représenter jusqu'à 60% des AAs totaux (Finn et al., 1995b; Rønnestad et Fyhn, 1993; Rønnestad et al., 1999). La vitellogénine contient les précurseurs principaux du vitellus chez les téléostéens ; ses acides aminés sont caractérisés par des quantités élevées en alanine, acide glutamique et leucine et de faibles proportions de sérine. Les FAA agissent à la fois comme osmolytes et comme source d'énergie en plus de fournir des AAs pour la synthèse des protéines, avant l'alimentation exogène de la larve (Wright et Fyhn, 2001). Les protéines constituent le nutriment le plus abondant présent dans les œufs de poissons (Watanabe et Kiron, 1994) et sont la source d'énergie principale pour plusieurs espèces de poissons (Rønnestad et Fyhn, 1993; Sivaloganathan et al., 1998). La croissance de l'embryon implique principalement une synthèse et incorporation des protéines. Ces derniers ont un rôle important dans la fécondation et le développement embryonnaire (Srivastava et Brown, 1992; Srivastava et al., 1995). La première détermination des profils en AAs chez les poissons a été publiée en 1957 et portait sur des alevins de salmonidés, permettant, dès lors, aux nutritionnistes d'identifier l'importance des AAs pour le poisson (Halver et al., 1957). Dix des vingt AAs qui constituent les protéines ont alors été considérés comme essentiels pour les salmonidés : arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine (Halver et Shanks, 1960; Halver et al., 1957) (Tableau 1).

Tableau 1. Les acides aminés essentiels, partiellement essentiels et non essentiels chez les poissons selon Halver et al. (1957)

Acides aminés essentiels (EAA)	Acides aminés partiellement essentiels	Acides aminés non essentiels (NEAA)
Histidine (HIS)	Tyrosine (TYR)	Asparagine (ASPA)
Isoleucine (ISO)	Cystéine (CYS)	Acide aspartique (ASP)
Leucine (LEU)		Acide glutamique (GLU)
Lysine (LYS)		Glutamine (GLN)
Méthionine (MET)		Glycine (GLY)
Phénylalanine (PHE)		Proline (PRO)
Thréonine (THR)		Serine (SER)
Tryptophane (TRY)		
Valine (VAL)		
Arginine (ARG)		

Des études ultérieures, réalisées sur la plie (*Pleuronectes platessa*) et la sole (*Solea solea*), ont démontré que ces deux espèces étaient incapables de synthétiser les mêmes AAs (Cowey et al., 1970). Les acides aminés essentiels (EAA) doivent être fournis par l'alimentation (Figure 3). Les autres AAs peuvent être synthétisés *de novo* à partir des acides  $\alpha$ -keto ou par transamination en utilisant des AAs (Figure 3) et sont donc considérés comme des acides aminés non essentiels (NEAA) (Tableau 1). La cystéine et la tyrosine sont considérées comme partiellement essentielles pour les poissons car leurs seuls précurseurs sont respectivement la méthionine et la phénylalanine, deux EAA (Rønnestad et Conceição, 2005). Contrairement à ce qui a été suggéré dans le passé, les larves et les œufs des poissons retiennent préférentiellement les EAA pour les besoins liés à la

croissance et utilisent les NEAA pour des besoins énergétiques (Rønnestad et Conceição, 2005), ce qui explique pourquoi les œufs et les larves ont une régulation stricte de leur métabolisme en AAs (Green et al., 2002; Peres et Oliva-Teles, 2006). La détermination des profils en AAs, au niveau des œufs et des larves, est d'une importance majeure pour définir les exigences nutritionnelles en AAs chez l'espèce. Les profils en AAs des œufs de poissons sont également utilisés pour déterminer les exigences en AAs chez les larves (Dendrinis et Thorpe, 1987; Shcherbina et al., 1988).

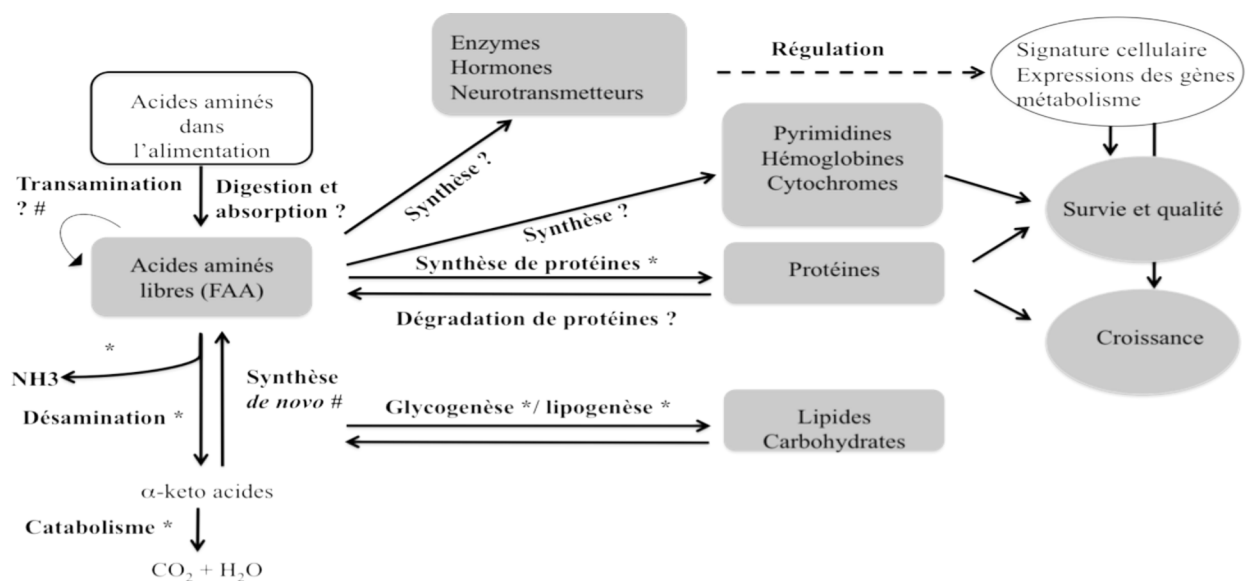


Figure 3. Voies de métabolisme des acides aminés (AAs) chez les œufs et larves de poissons. Les connaissances actuelles des effets des AAs alimentaires sont indiquées comme suit \* = affecté par la composition de l'alimentation en AAs, ? = les connaissances sont insuffisantes pour déterminer si affecté par la composition de l'alimentation en AAs, # = les connaissances sont insuffisantes pour déterminer si pertinent pour répondre aux besoins en AAs essentiels. Source Conceição et al. (2011).

Plusieurs auteurs ont suggéré que la détermination des profils en AAs de l'œuf reflète mieux les exigences en AAs d'une espèce, que la détermination des profils à différents stades de développement (Alam et al., 2005; Mambrini et Kaushik, 1995). La quantité des FAA au niveau des œufs de poissons marins est très élevée comparée à celle chez les poissons d'eau douce, et ces FAA sont partiellement utilisés pour la synthèse des protéines et principalement comme source d'énergie (Finn et al., 1995b; Kamler, 2008; Rønnestad et al., 1994). Durant les premiers stades de vie du poisson, l'absorption intestinale des AAs dépend de plusieurs processus de transport (Jürss et Bastrop, 1995; Rønnestad et Morais, 2008) et l'efficacité d'absorption des différents AAs est variable et peut changer selon l'espèce et le stade de développement (Conceição et al., 2002; Saavedra et al., 2008a; Saavedra et al., 2008b). L'arginine et la méthionine sont plus efficacement absorbées que le tryptophane, la tyrosine et plus spécifiquement la lysine au niveau des larves de la dorade (*Diplodus sargus*) (Saavedra et al., 2008a; Saavedra et al., 2008b). Des taux d'absorption différents peuvent entraîner des déséquilibres transitoires des AAs au niveau de la cellule où la synthèse des protéines a lieu, entraînant une augmentation du catabolisme des AAs. Le *turnover* des protéines inclut le renouvellement et le recyclage des protéines tissulaires ainsi que l'équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines. Il peut être divisé en une composante principale obligatoire associée au maintien des fonctions cellulaires, et une composante variable associée à la croissance (Reeds, 1989). Le *turnover* des protéines peut affecter la viabilité et la survie des larves. Il a été démontré qu'un *turnover* élevé peut augmenter la plasticité métabolique et la réponse au stress environnemental (Hawkins et al., 1987). Les fonctions principales du *turnover* des protéines sont : 1) la capacité de changer les concentrations et l'activité d'enzymes spécifiques ; 2) la mobilisation de protéines pendant le jeûne, soit par un apport en AAs comme précurseurs pour la synthèse des protéines, soit comme substrats pour des besoins énergétiques ; 3) l'élimination de protéines anormales et 4) la restructuration des cellules au cours du développement cellulaire. La synthèse des protéines au niveau des œufs et des larves de poissons est semblable à celle chez le poisson adulte et les mammifères (Mente et al., 2002). Elle augmente avec le taux de croissance (Fauconneau et al., 1986), la quantité

de protéines dans l'alimentation (Fauconneau et al., 1986), la température (Houlihan et al., 1995) et la ration alimentaire (Fauconneau et al., 1986; Houlihan et al., 1992; Houlihan et al., 1995). L'optimisation de l'utilisation des AAs fournis dans l'alimentation va dépendre de la définition du profil idéal des AAs. La détermination des exigences des œufs et des larves en AAs est loin d'être une tâche facile. On a peu de connaissances sur la biodisponibilité des AAs qui peut varier en fonction des espèces, l'ontogénie et la composition de l'alimentation. Les exigences en AAs autres que celles requises pour la croissance et l'énergie sont encore très peu étudiées au niveau des œufs et des larves de poissons mais il ne faut surtout pas les sous-estimer. Des effets bénéfiques de suppléments en AAs sur le développement embryonnaire et larvaire et la résistance au stress ont été documentés (Aragão et al., 2007; Carvalho et al., 2004; Chen et al., 2005; Fletcher, 1997). Le rôle des AAs en tant que précurseurs hormonaux, agents de signalisation cellulaire ou régulateurs de l'expression génique peut être crucial pour résoudre des problèmes en lien avec la qualité des œufs et des larves.

#### **CYCLE REPRODUCTIF ET MOMENT D'OVULATION**

Pour les poissons en captivité, chez qui le frai est souvent déclenché artificiellement, il a été clairement démontré que la détermination du moment propice pour l'ovulation est un facteur clé affectant la qualité des œufs et leur composition biochimique tant chez des espèces de poissons marins que d'eau douce (Escaffre et Billard, 1979; Nomura et al., 1974; Sakai et al., 1975; Springate et al., 1984). Ainsi, l'utilisation d'injections hormonales pour induire l'ovulation (Malison et al., 1998), peuvent résulter en plusieurs périodes de ponte induisant des compositions biochimiques variables dans les œufs provenant d'un même groupe de géniteurs. Il a été démontré que durant le cycle reproducteur, les poissons qui ovulent tardivement donnent des œufs plus petits avec des taux de survie plus faibles (Johnston et al., 2005; Johnston et al., 2007). La qualité des œufs se détériore après l'ovulation quand ces derniers passent trop de temps dans la cavité

abdominale avant d'être libérés (Bromage et al., 1994; Kjørsvik et al., 1990). Le moment idéal de la ponte, généralement estimé par des pourcentages de fécondation et de survie élevés, varie selon les espèces (Bromage et al., 1992). En conditions d'élevage, l'ovulation peut se produire sans qu'il y ait expulsion des œufs de la cavité abdominale, telle que démontré chez la truite arc-en-ciel, où les œufs doivent être artificiellement retirés des femelles (*stripping*) (Bromage et al., 1992). Le temps passé dans la cavité abdominale varie selon les individus d'un même lot de géniteurs et entraîne alors des variations dans la qualité des œufs (Nomura et al., 1974; Springate et Bromage, 1985). Une mauvaise connaissance du cycle d'ovulation et les manipulations répétées des femelles pour retirer les œufs, engendrent non seulement différentes périodes de ponte durant le cycle reproducteur, mais aussi du stress chez les femelles, causant ainsi des pertes importantes en termes de succès reproducteur et de productivité (Bruce, 1999). Pour certains salmonidés comme le saumon du Pacifique (*Oncorhynchus keta*), le cycle reproducteur peut durer quelques semaines et comprend plusieurs périodes de ponte (Fitzpatrick et al., 1987). Par opposition, des cycles plus courts sont présents chez le tilapia bleu (*Oreochromis aureus*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Formacion et al., 1993).

Les poissons marins comme le turbot (*Scophthalmus maximus*), le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), la morue franche et le flétan de l'Atlantique connaissent actuellement un développement majeur en aquaculture en Europe et en Amérique du nord. Ces espèces sont caractérisées par des productions de lots d'œufs multiples pendant la saison de reproduction (Haug, 1990; Kjesbu, 1989). Les œufs sont produits durant une courte période, à des intervalles d'une semaine avec un rythme ovulatoire régulier, court et souvent à un moment particulier de la journée (Burt et al., 1988; Kjorsvik et al., 1987). La période de rétention des œufs est donc très courte et se compte parfois en heures (Bruce, 1999; Kjesbu, 1989; McEvov, 1984; Norberg et al., 1991). Ainsi, chez le turbot, le rythme ovulatoire est régulier avec en moyenne un intervalle de 3,5 jours entre une ponte et la suivante (Bruce, 1999). Bruce (1999) a montré que les pourcentages de fécondation et d'éclosion sont bons chez le flétan de l'Atlantique tant et aussi longtemps que la fécondation a lieu dans les 6 heures après le moment d'ovulation. Ces observations



suggèrent qu'il est important de définir ce qu'on appelle «*la fenêtre d'opportunité*» (Norberg et al., 1991), soit la période durant laquelle on peut anticiper obtenir les meilleurs pourcentages de fécondation, de survie et d'éclosion à partir des œufs récoltés. Définir cette «*fenêtre*» permet d'améliorer la productivité et s'avère un outil de gestion précieux pour le succès d'élevage d'une espèce donnée.

## ALIMENTATION

L'alimentation des géniteurs en aquaculture commerciale s'est d'abord développée par l'utilisation de poissons pêchés industriellement connus sous le nom de « poissons de rebut ». Bien que le développement de moulée est en croissance, les moulées pour géniteurs sont loin d'être optimales pour l'ensemble des espèces aquacoles et l'utilisation de poissons rebuts demeure encore une pratique courante pour l'aquaculture du doré jaune. L'état nutritionnel des géniteurs influence la qualité des œufs chez les poissons (Bromage et al., 1992; Izquierdo et al., 2001; Wiegand, 1996) et joue un rôle déterminant durant la vitellogenèse (Wiegand, 1996). Les lipides, constituant la nourriture des géniteurs et assimilés par ces derniers, seront incorporés au niveau des œufs et serviront de source d'énergie et d'éléments structuraux au cours du développement embryonnaire (Brooks et al., 1997). La composition du régime alimentaire en lipides, acides gras, protéines, acides aminés et micronutriments (Harel et al., 1994; Peres et Oliva-Teles, 2006) affecte la survie de l'embryon et représente une préoccupation majeure. La qualité de l'œuf a été améliorée chez le loup européen (*Anarhichas lupus*) en altérant la composition lipidique du régime alimentaire des géniteurs (Carrillo et al., 1994). En effet, les géniteurs qui ont été nourris sur un régime alimentaire déficient en (n-3) PUFA pour une période de 10 jours juste avant la période du frai ont produit des œufs avec une viabilité réduite (Carrillo et al., 1994). Dans d'autres études, il a été démontré que de forts contenus en (n-3) PUFA dans le régime alimentaire des géniteurs sont directement corrélés avec les concentrations de PUFA au niveau des œufs de la daurade royale (*Sparus aurata*) (Hardy, 1985; Harel et al., 1994). Par

opposition à ces études, des géniteurs du flétan de l'Atlantique nourris sur des régimes alimentaires différents produisent des œufs à viabilité variable, mais avec des compositions en lipides et acides gras similaires (Bruce, 1999; Bruce et al., 1993). L'administration de rations alimentaires contenant différentes teneurs en lipides chez les géniteurs de la truite arc-en-ciel, affecte la fécondité et la taille des œufs mais n'a aucun effet apparent sur la qualité de ces derniers (Bromage et al., 1992; Roley, 1983; Springate et Bromage, 1985). En effet, Bromage et al. (1992) ont démontré que la fécondité est optimisée en utilisant un aliment contenant entre 7 et 12% de graisses brutes, mais ils ont été incapables de montrer des différences significatives entre des teneurs de 7, 12, 18 et 25% de gras sur la qualité des œufs. Toutefois, ces contradictions pourraient s'expliquer par les teneurs en acides gras spécifiques dans les fractions neutres et polaires. Un œuf riche en lipides neutres, mais déficient en acides gras essentiels pourrait limiter le développement embryonnaire, non par manque de sources énergétiques mais par manque d'acides gras essentiels nécessaires au développement adéquat des membranes cellulaires. Une quantité suffisante de protéines alimentaires, généralement entre 30 et 45 %, avec une composition équilibrée en AAs est vitale pour le développement embryonnaire et larvaire. Un régime alimentaire bien équilibré en EAA pour les géniteurs de la daurade royale améliore la synthèse de la vitellogénine (Tandler et al., 1995). Des études sur l'alimentation des géniteurs de la dorade japonaise (*Pagrus major*) ont montré que la fécondité augmente avec l'augmentation de l'apport en protéines alimentaires (Afzal Khan et al., 2005; Watanabe et al., 1984) et qu'au dessous du taux optimal de protéines alimentaires (45%), les géniteurs produisent 30% moins d'œufs. Il a été démontré que le tryptophane et la taurine sont particulièrement importants pour la reproduction. Le tryptophane est un précurseur de la sérotonine qui affecte la maturation des gonades chez les mâles et les femelles (Akiyama et al., 1996). La taurine est un des FAA les plus abondants au niveau des tissus des poissons et joue un rôle dans les processus antioxydants, l'osmorégulation, la régulation du calcium intra-cellulaire, la libération des hormones et la formation de sels biliaires (Huxtable, 1992). L'enrichissement de taurine dans les régimes alimentaires des géniteurs de la sériole (*Seriola quinqueradiata*) améliore la fécondité, les pourcentages de survie et de

fécondation des œufs (Matsunari et al., 2006). D'une façon générale, la plupart des études sur la relation entre le régime alimentaire des géniteurs et la qualité des œufs portent sur la teneur et la composition de l'aliment en termes de lipides et de protéines. Peu d'études portent sur les constituants « mineurs » de la nourriture et de leurs impacts sur la qualité des œufs bien que certaines vitamines aient été associées à leur viabilité (Hardy, 1985; Sandnes et al., 1984; Takeuchi et al., 1981).

#### *Les micronutriments : importance de la vitamine A*

En général, dans la moulée des géniteurs et des larves, les vitamines et les minéraux sont ajoutés sous forme d'un pré mélange, ce qui signifie que les minéraux et les éléments traces sont ajoutés sous forme inorganique au niveau de la moulée, alors qu'au niveau des proies dans le milieu naturel, ils sont présents souvent sous forme organique. Ceci aurait des conséquences sur la biodisponibilité de ces éléments et peut être aussi sur leur métabolisme des œufs et des larves. Des vitamines sont aussi ajoutées aux moulées sous des formes autres que celle que l'on retrouve en nature et sans connaître l'effet sur leur biodisponibilité. Comme la période d'alimentation endogène peut être considérée comme un système fermé, on peut ainsi décrire le transfert des vitamines et estimer les besoins depuis le développement embryonnaire jusqu'à la résorption du sac vitellin. Il est connu que les œufs et les larves ont des besoins en micronutriments plus élevés que les juvéniles et les poissons adultes en raison de leurs taux de croissance élevés et que la larve doit passer par une métamorphose pour atteindre le stade juvénile, une phase exigeante du développement (Finn et al., 2002; Otterlei et al., 1999; Power et al., 2001). Les vitamines liposolubles sont au nombre de quatre (vitamine A, vitamine D, vitamine E et vitamine K) et deux sont hydrosolubles, la vitamine C et la vitamine B. Cette dernière se trouve sous huit formes : thiamine, riboflavine, niacine, acide pantothénique, vitamine B<sub>6</sub>, biotine, vitamine B<sub>9</sub> et vitamine B<sub>12</sub>. Les vitamines hydrosolubles ne sont pas stockées par l'organisme et sont ainsi éliminées en cas de surdosage. Par contre, les vitamines liposolubles sont stockées dans l'organisme et absorbées avec les graisses. En lien avec

l'alimentation des géniteurs de poissons, les vitamines C, E et la thiamine ont souvent été étudiées. Les vitamines C et E sont principalement des antioxydants et sont dégradées dès qu'elles ont rempli leur rôle. Les géniteurs nourris sur du poisson fourrage ont de faibles concentrations pour ces vitamines suite à la dégradation de ces dernières durant le stockage de la nourriture. La thiamine est souvent déficiente, due à l'activité de l'enzyme thiaminase, qui est présente chez la plupart des espèces de poissons et qui dégrade la thiamine (Honeyfield et al., 2005). Dans les moulées artificielles, les vitamines C et E sont souvent ajoutées comme des composantes stables et la thiaminase est désactivée par le traitement thermique des ingrédients qui entrent dans la composition de la moulée. La vitamine A (VA), connue sous le nom de rétinoïdes, joue un rôle important dans la reproduction et le développement embryonnaire et larvaire chez les poissons. En effet, la vitamine A a plusieurs rôles notamment au niveau de la vision, de la croissance et de la régulation génique (Fontagné-Dicharry et al., 2010; La Frano et Burri, 2014). Les poissons d'eau douce utilisent deux formes de VA ; le rétinol (ROH), connu sous le nom de vitamine A<sub>1</sub> (VA<sub>1</sub>) et le didéhydrorétinol (dd-ROH), connu sous le nom de vitamine A<sub>2</sub> (VA<sub>2</sub>) (Gross et Budowski, 1966; Morton et Creed, 1939). L'excès ou la déficience en VA entraînent un développement embryonnaire anormal et altèrent la prolifération et la différenciation cellulaire (Ross et al., 2000). Les poissons obtiennent la VA à partir de l'alimentation, soit sous forme de rétinol, rétinol, esters de rétinyle ou sous forme de caroténoïdes, qui sont des précurseurs de la VA. Certaines études ont montré que la régulation de la vitamine A au niveau des œufs de poissons est possible, et ceci contrairement à la vitamine E et les caroténoïdes, qui sont transportés par des lipoprotéines à des doses bien précises (Lubzens et al., 2010; Palace et Werner, 2006). Les besoins exacts en VA, durant la maturation des gonades et l'ovulation, ne sont pas bien connus. Cependant, certains auteurs ont montré que l'alimentation des géniteurs du cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*) et de la carpe marbrée (*Aristichthys nobilis*) avec des suppléments de VA, augmente la fécondité et les pourcentages de survie des œufs et des larves (Furuita et al., 2003; Santiago et Gonzal, 2000). Malgré les efforts considérables pour démêler l'importance des composantes alimentaires dans la détermination de la qualité des œufs, la preuve que le régime

alimentaire influe directement sur la qualité des œufs est très limitée. En effet, en raison des différentes méthodes utilisées pour évaluer la qualité des œufs, des différentes rations alimentaires et des différents moments de l'administration de la nourriture dans la vie du poisson, il est difficile d'isoler les améliorations réelles dues au régime alimentaire seul. En ce qui concerne les exigences nutritionnelles en termes de lipides, d'acides gras, de protéines, d'acides aminés et de vitamines des géniteurs du doré jaune en captivité et de leurs impacts sur l'œuf, il existe encore peu d'informations sur les teneurs et les proportions nécessaires de ces derniers pour l'optimisation de la qualité de l'œuf.

### **ÂGE DES GÉNITEURS**

Généralement, des femelles plus grosses et plus âgées produisent des œufs avec une plus grande viabilité (Johnston, 1997; Johnston et al., 2007), possiblement en raison d'une meilleure composition chimique des œufs (Wiegand et al., 2011). La composition des œufs varie avec l'âge et la taille des femelles, en raison des changements ontogéniques, du régime alimentaire des femelles et de la proportion plus élevée de réserves énergétiques que ces dernières peuvent allouer à la reproduction (Wiegand et al., 2011). L'âge des géniteurs femelles est un des traits maternels les plus importants influençant aussi bien le développement embryonnaire que la survie et la croissance larvaire chez les poissons (Johnston, 1997; Johnston et al., 2007; Trippel, 1998). Johnston (1997) a démontré que l'âge et la taille des géniteurs du doré jaune, provenant du lac Manitoba, avaient une influence sur le développement embryonnaire des œufs. Cette variation est restée importante même en incluant d'autres sources de variation comme la date d'ovulation et le contenu lipidique des ovaires (Johnston, 1997; Johnston et al., 2007). L'effet le plus prononcé de l'âge des géniteurs sur le succès du développement embryonnaire et larvaire, a surtout été observé chez les plus âgés (18 ans) et les plus jeunes (5 ans), avec un taux de survie des œufs inférieur à 10% (Johnston, 1997; Trippel, 1998). Pour certaines espèces, le diamètre des œufs augmente en fonction de l'âge des géniteurs (Kamler, 2005; Kennedy et al., 2007; Marteinsdottir et Begg, 2002). En effet, les œufs de plus grand diamètre sont des

œufs qui donnent des larves plus grandes avec plus de réserves en nutriments, une meilleure activité, croissance et taux de survie (Chambers et Waiwood, 1996; Rideout et al., 2004). Diverses autres études ont montré des corrélations positives entre l'âge des femelles et la taille des œufs et la qualité des larves (Buckley et al., 1991; Evans et al., 1996; Faulk et Holt, 2008; Laine et Rajasilta, 1999; Quintero et al., 2011). Par ailleurs, Johnston et al. (2007) n'ont pu voir d'effet de l'âge des géniteurs de doré sur la qualité des œufs, bien que les femelles plus âgées aient été nettement plus grandes. En effet, la variation au niveau de la taille des œufs n'a pas entraîné de différences significatives au niveau du développement embryonnaire mais elle a permis d'expliquer la taille des larves à l'éclosion (Johnston et al., 2007). Il est donc probable que la taille des œufs ait une influence beaucoup plus importante sur la survie post éclosion que sur la survie embryonnaire, surtout pour les géniteurs en captivité (Johnston et al., 2007). Il est également possible que l'âge des femelles soit la meilleure variable, car elle incorpore une multitude de traits de la qualité de l'œuf. Rares sont les études ayant démontré une meilleure qualité des œufs produits par des femelles plus jeunes. À titre d'exemple, des femelles de daurade royale, âgées de 3 ans, étaient plus fertiles, donnant des œufs avec un meilleur succès d'éclosion et une meilleure qualité que des femelles plus âgées (Jerez et al., 2012). Des succès d'éclosion élevés (96%) et des larves plus longues à l'éclosion ont été obtenus à partir d'œufs produits par des femelles plus jeunes chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (Aliniya et al., 2013).

## **L'ENVIRONNEMENT**

Une vaste documentation existe sur le problème de l'influence de plusieurs facteurs environnementaux sur les premiers stades de développement du poisson. Plusieurs auteurs ont traité le sujet pour approfondir les connaissances sur la biologie de l'espèce ou pour résoudre certains problèmes pratiques subis par l'espèce exposée parfois à des conditions extrêmes. La majorité des publications réfèrent à des espèces qui ont un intérêt commercial.

Les poissons utilisent plusieurs mécanismes physiologiques et biochimiques pour s'adapter aux différentes conditions environnementales (Borlongan et Benitez, 1992; Cooper et al., 2002; Henrotte et al., 2011; Martínez et al., 2006; Moore et al., 2012; Morán et al., 2013; Ota et Yamada, 1971; Poletto et al., 2013; Urquhart et Koetsier, 2014; Zhou et al., 2000). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'oxygène dissous (OD). L'oxygène dissous atteint des niveaux critiques au niveau de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (EGSL), pouvant ainsi compromettre la vie du flétan du Groenland, une espèce ayant un intérêt commercial important au Québec. On a voulu chercher à comprendre l'adaptation biochimique, durant l'embryogenèse, à des faibles niveaux d'OD. La température, la salinité et la lumière sont des facteurs importants durant le développement et la croissance du poisson. Il est connu que des températures élevées vont accélérer l'utilisation des réserves énergétiques et le développement embryonnaire (Kamler, 2008). Le phénomène d'adaptation homeovisqueuse est une adaptation biochimique qui intervient à différents stades de vie suite aux changements de certaines conditions environnementales. Ce phénomène consiste en un remodelage des têtes de groupe de phospholipides, des acides gras et de la teneur en cholestérols des membranes cellulaires pour ajuster la fluidité membranaire (Barnes et al., 2014; Crocke, 1998). L'adaptation homeovisqueuse a surtout été documentée suite à des variations thermiques (Barnes et al., 2014; Crocke, 1998; Hazel, 1995; Laurel et al., 2012).

### *Oxygène dissous et phénomène d'hypoxie*

L'oxygène dissous est un des paramètres physico-chimiques important pour la croissance, la reproduction et la survie des organismes aquatiques (Diaz et Breitburg, 2009). Dans le milieu aquatique, diverses sources contribuent à l'apport d'oxygène : la diffusion atmosphérique, la photosynthèse phytoplanctonique et le mouvement des masses d'eau, ce dernier permettant surtout un mélange d'OD vers les couches profondes de la colonne d'eau (Diaz, 2001). Dans les environnements marins et côtiers, aucun autre paramètre d'importance écologique n'a changé aussi drastiquement au cours des dernières

décennies, ce changement conduisant parfois à l'apparition généralisée d'hypoxie (Diaz, 2001). Le système du Saint-Laurent (estuaire et golfe) compte parmi les écosystèmes où le niveau d'OD est inférieur à 100 % sat dans les eaux profondes. Au niveau de l'EGSL, les eaux profondes (> 200 m) ont un taux de saturation en OD inférieur à 65 % sat (Gilbert et al., 2005). Les niveaux d'oxygène diminuent dans le détroit de Cabot, avec des teneurs de 50 à 60 % sat, à environ 20 à 30 % sat dans l'estuaire (Thibodeau et al., 2006). L'hypoxie devient une menace majeure pour les écosystèmes côtiers dans le monde entier et de faibles niveaux d'OD ont déclenché des mortalités d'organismes marins en de nombreux endroits (Chesney et al., 2000). Ces «zones mortes» sont dépourvues de ressources halieutiques incluant poissons, crevettes et crabes (Chesney et al., 2000; Rabalais et al., 2002). L'hypoxie peut entraîner une perte importante de la biodiversité tout en limitant la distribution, la croissance et la reproduction des organismes aquatiques (Vaquer-Sunyer et Duarte, 2008). Le seuil de tolérance à l'hypoxie varie selon les espèces et les écosystèmes (Kramer, 1987; Wannamaker et Rice, 2000). Dans l'EGSL, des espèces de foraminifères tolérantes à l'hypoxie ont été retrouvées dans le fond de l'estuaire (Diaz et Rosenberg, 1995; Thibodeau et al., 2006) confirmant la baisse des niveaux d'OD. Les impacts de l'hypoxie dans l'EGSL ont été étudiés pour quelques espèces tels que la morue franche dont le seuil léthal a été établi à 28 % sat (Plante et al., 1998), le flétan du Groenland (Ait Youcef et al., 2013; Ait Youcef et al., 2015; Dupont-Prinet et al., 2013a; Mejri et al., 2012) et la crevette nordique (*Pandalus borealis*) (Dupont-Prinet et al., 2013b). Des espèces comme la crevette nordique ou le flétan du Groenland, encore abondantes dans les chenaux profonds de l'EGSL, semblent plus tolérantes à l'hypoxie (Ait Youcef et al., 2013; Dupont-Prinet et al., 2013b; Gilbert et al., 2005).



## OBJECTIFS DE LA THÈSE

### *Objectif général*

L'objectif principal de ce projet est de comprendre la dynamique et les stratégies d'utilisation et d'incorporation des réserves biochimiques dans deux types d'œufs de poissons téléostéens : œuf démersal avec un globule huileux et œuf pélagique sans globule huileux. Plus précisément, il s'agit de comprendre comment ces éléments influencent les développements embryonnaire et larvaire (avant le début de l'alimentation exogène) et de quelle façon ils permettent de répondre aux besoins énergétiques et structuraux des embryons. De plus, ces informations pourront nous éclairer sur l'importance des réserves biochimiques pour l'adaptation à un environnement changeant. Afin de répondre à cet objectif, la thèse a été axée autour de trois expériences principales, dont deux impliquant le doré jaune, une espèce d'eau douce présentant le modèle d'œuf démersal à globule huileux, et une impliquant le flétan du Groenland, une espèce d'eau marine avec un œuf bathypélagique sans globule huileux. Les deux premières expériences se sont déroulées en pisciculture (Station Piscicole Trois Lacs, Wotton, Québec) avec des géniteurs en captivité, et la troisième expérience s'est déroulée à l'Institut Maurice Lamontagne, Mont-Joli, Québec, avec des géniteurs de flétan du Groenland sauvages, pêchés au niveau de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent.

### *Expérience 1*

#### *Objectif*

Déterminer les variations biochimiques au niveau des œufs du doré jaune en captivité durant le cycle reproductif suite à des injections hormonales et leurs effets sur le succès du développement.

#### *Hypothèse*

Le moment d'ovulation affecte la survie, le succès d'éclosion et la composition biochimique de l'œuf et, durant l'embryogenèse, l'énergie est principalement fournie par les lipides.

### ***Expérience 2***

#### *Objectif*

Améliorer les connaissances sur les besoins nutritionnels des géniteurs du doré jaune en élevage.

#### *Hypothèse*

La moulée expérimentale enrichie en huile de krill, maquereau et astaxanthine (caroténoïdes) répond mieux aux besoins nutritionnels du doré jaune que la moulée commerciale pour la truite. Les œufs et les larves des géniteurs sauvages sont de meilleure qualité avec une composition biochimique plus adéquate que les œufs et larves issus de géniteurs en captivité.

### ***Expérience 3***

#### *Objectif*

Tester si les différences au niveau de l'utilisation et du remodelage des acides gras neutres et polaires peuvent expliquer l'incapacité de poursuivre le développement embryonnaire à de faibles niveaux d'oxygène dissous.

#### *Hypothèse*

En conditions hypoxiques, il y aura présence d'un mécanisme de remodelage membranaire avec rétention sélective des PUFA. Le développement embryonnaire est assuré par l'utilisation des SFA et MUFA à partir de la fraction polaire.

# QUALITÉ BIOCHIMIQUE DES ŒUFS DU DORÉ JAUNE (*SANDER VITREUS*) EN CAPTIVITÉ EN LIEN AVEC LE MOMENT D'OVULATION SUITE AU TRAITEMENT HORMONAL

## 1.1 RÉSUMÉ

Le but de cette étude était d'évaluer les effets des variations des lipides totaux, des acides gras et des acides aminés libres et totaux sur le développement embryonnaire du doré jaune (*Sander vitreus*) en captivité, tout au long de la période de ponte. Les œufs étaient prélevés de femelles âgées de 4 ans en quatre périodes de ponte consécutives dans le mois suivant la première ponte des géniteurs. Le succès d'éclosion était significativement plus élevé dans la période intermédiaire de ponte ( $87,3 \pm 2,4\%$ ), et aucun œuf n'a éclos dans le groupe des œufs de la dernière période ( $p < 0,05$ ). Le diamètre des œufs des deux périodes intermédiaires de ponte était significativement plus grand, ce qui a été relié à la taille plus importante des larves à l'éclosion pour ces deux périodes. Le succès du développement a été associé à la qualité des réserves de lipides durant l'ontogenèse. Concernant les acides gras polaires, il y a eu une rétention sélective des acides gras essentiels (EFA), particulièrement du plus abondant, i.e., l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui constitue plus de 40% des lipides polaires. Concernant les acides aminés totaux, les concentrations de lysine et de sérine étaient considérablement plus élevées dans les œufs des périodes intermédiaires et ont baissé significativement durant le développement. Durant l'embryogénèse, la source d'énergie principale était les triacylglycérols (TAG), les protéines et les acides aminés non essentiels. Nos résultats suggèrent que les niveaux d'EFA et d'acides aminés présents dans les œufs pourraient expliquer les différences dans la qualité des œufs et le succès du développement larvaire.

Nos résultats montrent clairement que le temps d'ovulation pendant la période de ponte affecte le succès de la production aquicole du doré jaune.

Ce premier article, intitulé « Biochemical egg quality in a captive walleye (*Sander vitreus*) broodstock population relative to ovulation timing following hormonal treatment » a été corédigé par moi-même, mon directeur Réjean Tremblay, mes codirecteurs Céline Audet et Grant W. Vandenberg, ainsi que par le chercheur Chris C. Parrish. Il a été accepté pour publication dans la revue *Aquaculture* le 17 Mars 2014. Il est paru dans le volume 431 aux pages, 99-106 (2014). Ma contribution à ce travail a été de fournir l'idée originale et concevoir le plan expérimental ainsi que l'essentiel des échantillonnages, des analyses, l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay et Céline Audet ont aidé à la coordination de la recherche et à l'écriture du manuscrit. Grant W. Vandenberg et Chris C. Parrish ont aidé pour la révision de l'article. Chris C. Parrish a aidé pour les analyses des acides aminés. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final. Des versions abrégées de l'article ont été présentées au congrès international organisé par le journal *Aquaculture* à Gran Canaria (Espagne) en 2013 et à la réunion annuelle des Ressources Aquatiques Québec (RAQ) à la même année.

**1.2 BIOCHEMICAL EGG QUALITY IN CAPTIVE WALLEYE (*SANDER VITREUS*)  
BROODSTOCK POPULATION RELATIVE TO OVULATION TIMING FOLLOWING  
HORMONAL TREATMENT**

Sahar Mejri<sup>1\*</sup>, Céline Audet<sup>1</sup>, Grant W. Vandenberg<sup>2</sup>, Christopher C. Parrish<sup>3</sup> and Réjean Tremblay<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski (ISMER, UQAR), 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, Canada, G5L 3A1*

<sup>2</sup> *Département des sciences animales, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, QC, Canada, G1V 0A6*

<sup>3</sup> *Department of Ocean Sciences, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada, A1C 5S7*

### 1.3 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate how variations in total lipids, fatty acids, and total and free amino acids in eggs affect embryonic development throughout the spawning season in cultured walleye (*Sander vitreus*). Eggs were obtained from 4-year-old females and pooled based on spawning time: they were assigned to four consecutive periods during a one-month spawning season according to the first spawning occurrence in the female broodstock. Hatching success was significantly higher at the intermediate spawning period ( $87.3 \pm 2.4\%$ ), and no eggs hatched in the late spawning group ( $p < 0.05$ ). Egg diameter was significantly larger for the two intermediate spawning periods, which is related to the greater larval length at hatch during these two periods. Successful development was associated with the quality of lipid reserves throughout ontogeny. For polar fatty acids, there was a specific retention of essential fatty acids (EFA), particularly of the most abundant, i.e., docosahexaenoic acid (DHA), which made up more than 40% of the polar fatty acid fraction. For total amino acids, lysine (LYS) and serine (SER) levels were significantly higher in eggs from the intermediate spawning periods and were preferentially depleted during embryogenesis. During embryogenesis, energy was derived primarily from triacylglycerols (TAG), proteins, and non-essential free amino acids. Our results suggest that the content of EFA and amino acids in eggs may explain differences in egg quality and success of larval development within a broodstock population. Our results clearly show that the timing of ovulation during the spawning period affects the success of walleye aquaculture production.

Keywords: walleye, spawning period, eggs, embryogenesis, hatching success, ontogeny, total lipids, fatty acids, total amino acids, free amino acids

## 1.4 INTRODUCTION

Walleye (*Sander vitreus*) is a valuable sport and commercial fish species in the northern United States and Canada. In the US, over one billion walleye fry and fingerlings are produced annually by public hatcheries for stocking enhancement programs; the broodstock is largely captured wild fish (Fenton et al., 1996; Malison et al., 1998; Rinchard et al., 2005). Nevertheless, efforts to raise walleye fry to marketable size remain in the early stages: more research and development is needed to ensure profitable production, including a better understanding of biochemical requirements during early life stages. The few previous studies that were done on biochemical composition during ontogeny were almost all performed on wild fish (Czesny et al., 2005; Johnston et al., 2007), but constraints are different when dealing with captive broodstock and egg rearing. For one thing, hormone treatment is generally used to induce spawning in captive female walleye (Malison et al., 1998). Such hormonal manipulations might result in different spawning periods and variable biochemical composition of eggs within the same broodstock population.

Egg size as well as egg composition (especially fatty acids and amino acids) can have a significant impact on the early life history of fish (Czesny et al., 2005). The influence of egg biochemical composition on offspring quality has been demonstrated in several teleost species (Bruce et al., 1993; Navas et al., 1997). Lipids allocated to egg production in walleye are divided between a lipoprotein yolk (LPY), which contains polar lipids and some neutral lipids, and an oil globule entirely filled with neutral lipids, principally triacylglycerols (Moodie et al., 1989). The LPY is used to satisfy the structural as well as caloric and micronutrient requirements of embryos and young larvae, and it is largely exhausted before exogenous feeding begins (McElman and Balon, 1979).

Under culture conditions, hatching success and embryonic survival have been related to essential polyunsaturated fatty acid content (Fernández-Palacios et al., 2011; Keckeis et al., 2000; Mazorra et al., 2003; Moodie et al., 1989; Pickova et al., 1997). Amino acids (free amino acids [FAA] and protein constituents) are vital for all living organisms. During early



fish ontogeny, they are used as fuel molecules, signaling factors, and substrates for the synthesis of a wide range of bioactive molecules (Finn and Fyhn, 2010). It has been suggested that amino acids are the main substrate for energy metabolism and protein synthesis in the embryos of some marine fish species, such as Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Clarke et al., 2010; Finn et al., 1995a) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Finn et al., 1995b). Moreover, FAA were associated with egg viability in these species (Zhu et al., 2003). Little is currently known of the variability in the quantity and quality of egg fatty acid and amino acid profiles during the walleye's reproductive season.

This study explores intraspecific variations in total lipids, lipid class composition, and fatty acid and amino acid profiles in eggs from captive walleye broodstock. The objective was to assess variations occurring through the spawning season and to determine how they may affect walleye ontogeny from fertilization to 200 degree-days (DD) post fertilization.

## **1.5 MATERIALS AND METHODS**

### **1.5.1 Spawning and egg production**

Eggs were collected from broodstock maintained at the Station Piscicole Trois-Lacs fish farm (Wotton, Quebec, Canada). Fish were kept in a 5 m<sup>3</sup> circular indoor tank with a flow-through system (1 L h<sup>-1</sup>) and natural photoperiod. The stimulation of sexual maturation began in April 2012 by an increase of temperature from 4.8 ± 0.4°C to 9.6 ± 1.9°C over one month. The broodstock group comprised 98 first-spawning females and 54 males (4 years old; mean weight 433 ± 78 g; mean length 36 ± 3 cm). Fish were fed with a mix of dry pellets (commercial trout food, 45% protein, 17% lipid; 44/16 from Martin Mills Inc., Ontario, Canada) and frozen pieces of trout (*Salvelinus fontinalis*) and mackerel (*Scomber scombrus*) five times a week from June 2011 to mid-November 2011.

Since there are no external indications of ovulation, oocyte maturation was monitored weekly by sampling ovaries from 15 to 25 females. Gametes were stripped when the first signs of ovulation occurred. Eggs were classified into four groups according to the timing of ovulation (number of days after the first occurrence): early spawning period ( $P_1$ , 3 d after first occurrence), intermediate spawning periods ( $P_2$ : 5 d;  $P_3$ : 8 d), and late spawning period ( $P_4$ : 11 d). Each period included several fish, and eggs were pooled. All females were injected once with 150 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) on 10 May. Females that spawned on  $P_2$ ,  $P_3$ , or  $P_4$  were injected with a second dose of 500 IU of hCG on 13 May.

At each spawning period, fish were anaesthetized with  $MS_{222}$  ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) in well-oxygenated fresh water and gametes were collected by hand stripping. Eggs were fertilized using the standard dry fertilization method (Malison and Held, 1996): eggs were collected from each female in a dry 500 mL plastic bowl and immediately fertilized with the milt of two to three males; the mixture was left undisturbed for 1–2 min. A mixture of Fuller's earth and water (3 cups Fuller's earth per 4 L of water) was added to the eggs and stirred to remove the sticky matrix and avoid egg clumping during incubation. Fertilized eggs from a single spawning period were pooled, left for 2–3 h during hardening, and then subdivided into two equal volumes and incubated in 6 L jars (15.8 cm diameter and 45.7 cm high) with a flow rate of  $20 \text{ L min}^{-1}$ . Incubators were supplied with pumped water from an external pond that had been previously drum filtered ( $90 \text{ }\mu\text{m}$ ), sand filtered ( $20 \text{ }\mu\text{m}$ ), and vacuum degassed. Temperature was monitored daily. The upwelling water flow in each incubator jar was regulated to ensure continuous gentle movement of the eggs. From two days after fertilization until just prior to hatching, formaldehyde treatments were applied daily at a concentration of 50–100 mg of formaldehyde  $\text{L}^{-1}$  of water for 15 min to prevent fungal development.

### **1.5.2 Sample collection**

For each batch produced, about 150 eggs were sampled after fertilization to determine fertilization and survival success: 30 to 40 embryos were sampled (five replicates per incubator) at 30, 60, 155, and 200 degree-days (DD) post fertilization. Three replicates were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical analysis, and the two others were preserved in 1% glutaraldehyde for biometric analysis. The same sampling procedure was used at hatch and before mouth opening. Hatching success (%) was estimated using triplicate subsample counts of larvae from a well-mixed incubator, taking into account the initial number of fertilized eggs and the number of dead and viable eggs removed during incubation.

### **1.5.3 Biometric analysis**

Egg diameter, oil droplet diameter, and larval length at hatch were measured with a high resolution VHX-2000 digital microscope (Keyence, Osaka, Japan) adjusted to magnifications of 30–200x and set in high dynamic range mode with light shift.

### **1.5.4 Biochemical analysis**

Lipids were extracted according to the Folch et al. (1957) procedure modified by Parrish (1999). The relative proportions of the different lipid classes (ketones [KET], triacylglycerols [TAG], free fatty acids [FFA], sterols [ST], acetone-mobile polar lipids [AMPL], and phospholipids [PL]) were determined using an Iatroscan Mark-VI analyzer (Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan) and were developed in a four-solvent system (Parrish, 1987; 1999). In addition, lipid extracts were separated into neutral and polar fractions by silica gel (30 × 5 mm i.d., packed with Kieselgel 60, 70–230 mesh; Merck,

Darmstadt, Germany) hydrated with 6% water and eluted with 10 mL of chloroform:methanol (98:2 v/v) for neutral lipids followed by 20 mL of methanol for polar lipids (Marty et al., 1992). The neutral fraction was further eluted on an activated silica gel with 3 mL of hexane and diethyl ether to eliminate free sterols. All fatty acid methyl esters (FAME) were prepared as described by Lepage and Roy (1984) and analyzed in MSMS scan mode (ionic range: 60–650 m/z) on a Polaris Q ion trap coupled to a Trace GC (Thermo Finnigan, Mississauga, ON, CA) equipped with a Valcobond VB-5 capillary column (VICI Valco Instruments Co. Inc., Broakville, ON, CA). FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37 component FAME Mix, PUFA-3, BAME, and menhaden oil; Supelco Bellefonte, PA, USA) and quantified with tricosanoic acid (23:0) as an internal standard. Chromatograms were analyzed using integration Xcalibur 1.3 software (Thermo Scientific, Mississauga, ON, CA).

For total amino acid (TAA) analysis, samples were diluted with 2 mL distilled water and hydrolyzed with equal parts of 12 N HCl containing 10% phenol at 110 °C for 24 h. Free amino acids (FAA) and TAA were extracted and derivatized using EZ:faast™ GC-FID FAA and TAA analysis kits (Clarke et al., 2010). A volume of 100 µL from each sample was mixed with 100 µL of an internal standard, norvaline (0.2 mM), and n-propanol, and passed through a sorbent tip. It was then washed with 200 µL of n-propanol for FAA analysis and 200 µL Milli-Q water for the TAA analysis. The sorbent material was ejected in an eluting medium consisting of 3:2 sodium hydroxide/n-propanol. Next, 50 µL chloroform and 100 µL iso-octane were added to the solution to form an organic layer containing the amino acids, and derivatization was completed with 1 N HCl before being run on a Varian 3800 GC-FID (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) to obtain amino acid composition with the exception of taurine and arginine. Each amino acid was quantified with a known quantity of internal standard.

### 1.5.5 Statistical analysis

Reproductive characteristics of females, egg and larva measurements, fertilization, survival, intact oil droplet and hatching successes were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posteriori Tukey multiple comparison tests when assumptions of homoscedasticity and normality were verified with Levene and Shapiro-Wilk tests ( $n = 2$ ), respectively. Data were transformed (log or arcsine square root) when necessary. One-way ANOVAs were used to estimate variations of total lipid classes, total fatty acids from neutral and polar fractions, total proteins, and total free amino acids according either to spawning periods ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , and  $P_4$ ) or to DD post fertilization (30, 60, 155, and 200). Multiple linear regression analyses were used to test whether egg and oil droplet diameters could predict larval length at hatch. These analyses were performed with the SPSS 16.0 package. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA with 9999 permutations), including posteriori pair-wise comparisons, were performed on profiles of lipid classes, fatty acids, and amino acids. Assumptions of homoscedasticity were verified with a PERMDISP test, and data were transformed (arcsine square root) when necessary (Sokal and Rohlf, 1995). To analyze the similarity between spawning periods or DD post fertilization, non-metric multi-dimensional scaling (n-MDS) and SIMPER analysis were run using a Bray-Curtis similarity matrix with PRIMER 6 (v. 6.1.12) and PERMANOVA+ (v. 1.0.2). We compared variabilities between the neutral and polar lipid fractions among the different spawning periods using coefficients of variation (CV). Standard errors of the CVs across populations were estimated with a jackknife method (Efron and Gong, 1983).

## 1.6 RESULTS

### 1.6.1 Reproductive characteristics

Total length and weight of females were similar among spawning periods ( $p = 0.8$  and  $p = 0.4$  for length and weight, respectively) (Table 2). However, egg diameter was greater at the intermediate ( $P_2, P_3$ ) spawning periods (Table 2,  $F_{\text{egg diameter (3, 120)}} = 42.2$ ,  $p < 0.01$ ) while the oil droplet diameter was greater in  $P_1$  and  $P_3$  eggs ( $F_{\text{oil droplet diameter (3, 120)}} = 4.8$ ,  $p = 0.03$ ). Fertilization and survival success at 4 h post fertilization were both significantly higher in  $P_1$  and  $P_2$  eggs (Table 2,  $F_{\text{Fertilization (3, 6)}} = 6.9$ ,  $p = 0.02$ ;  $F_{\text{survival (3, 6)}} = 11.6$ ,  $p < 0.01$ ). Egg batches from the late spawning period ( $P_4$ ) had the lowest fertilization and survival successes ( $49.9 \pm 5.5$  and  $56.8 \pm 6.7\%$ , respectively). The hatching success was significantly different among spawning periods ( $F_{(3, 4)} = 129$ ,  $p < 0.01$ ), with the highest observed in  $P_2$  eggs ( $87.3 \pm 2.4\%$ ) and no hatching in  $P_4$  eggs. Larval length at hatch was significantly higher at  $P_3$  than at  $P_2$  and  $P_1$  (Table 2,  $F_{\text{larval length (2, 84)}} = 10.9$ ,  $p < 0.01$ ), and larval length at hatch was positively correlated with egg and oil droplet diameters ( $F_{(2, 5)} = 24.5$ ,  $p = 0.01$ ,  $r^2 = 0.94$ ).

### 1.6.2 Egg biochemical composition in relation to walleye ontogeny

#### Lipids

Total lipid concentration of eggs at 30 DD post fertilization differed significantly according to the spawning period ( $F_{(3, 8)} = 34.6$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 4). Total lipids accounted for  $22 \pm 7\%$  of the egg dry mass (DM), with the highest ( $30 \pm 3\%$  of DM) and lowest ( $12 \pm 3\%$  of DM) levels in eggs from the  $P_1$  and  $P_4$  groups, respectively (Fig. 4). Similar trends were observed for total fatty acids in both neutral and polar fractions ( $F_{\text{neutral fatty acid (3, 4)}} = 642.6$ ;  $F_{\text{polar fatty acid (3, 4)}} = 11.9$ ,  $p < 0.001$ ). The major lipid classes were KET, TAG, and PL, accounting for

33, 30, and 28% of total lipids, respectively (Fig. 4). The lipid composition did not differ among eggs obtained from different spawning periods ( $p = 0.22$ ).

The polar fraction fatty acid composition of 30 DD post-fertilization eggs did not vary with spawning period ( $p = 0.17$ ) (Table 3). However, the neutral lipid fatty acid composition was significantly different in  $P_4$  eggs compared to the other three spawning periods (*Pseudo* -  $F_{(3, 4)} = 15.2$ ,  $p = 0.01$ , Table 3). SIMPER analysis showed that the 18:1 n-9 and 16:1 n-7 contents explained most of this difference. In addition, proportions of MUFA and PUFA were significantly lower in  $P_4$  eggs (one-way ANOVA;  $F_{\text{MUFA}(3, 4)} = 12.2$ ;  $F_{\text{PUFA}(3, 4)} = 12.0$ ,  $p = 0.01$ ). We predicted that variations in the relative abundance of fatty acids among the reproductive periods would be higher in the neutral than in the polar lipid fraction, and we tested this for fatty acids of particular interest. Our comparison of CVs among the four spawning periods at 30 DD post fertilization indicates that the variability was consistently higher in the neutral than in the polar fraction as predicted, except for arachidonic acid (20:4 n-6), 18:2 n-6, 18:3 n-3, MUFA, and PUFA (Fig. 5).

Table 2. Reproductive characteristics (mean  $\pm$  SD) of female walleye and their eggs and larvae collected throughout the 2012 spawning season from a broodstock in captivity. Means in a row with different letters are significantly different (ANOVA:  $p < 0.05$ ). Spawning periods within the reproductive cycle were defined according to the number of days following the first occurrence of ovulation: early spawning: P<sub>1</sub>, 3 d; intermediate spawning: P<sub>2</sub>, 5 d and P<sub>3</sub>, 8 d; and late spawning: P<sub>4</sub>, 11 d

	Reproductive cycle			
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
	7	8	48	35
<b>Females</b>				
Length (mm)	360.00 $\pm$ 21.40	364.37 $\pm$ 38.02	370.62 $\pm$ 31.61	368.37 $\pm$ 25.90
Weight (g)	438.85 $\pm$ 49.04	419.75 $\pm$ 81.43	483.20 $\pm$ 111.88	458.40 $\pm$ 76.48
<b>Eggs and Larvae</b>				
Egg diameter (mm)	1.95 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	2.01 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
Oil droplet diameter (mm)	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
Larval length on hatch (mm)	6.80 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	6.85 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	7.10 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-
Fertilization success (%)	75.92 $\pm$ 11.26 <sup>a</sup>	78.76 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	68.16 $\pm$ 5.31 <sup>ab</sup>	49.92 $\pm$ 5.54 <sup>b</sup>
Intact oil droplet (%)	77.16 $\pm$ 4.27 <sup>a</sup>	75.29 $\pm$ 6.81 <sup>a</sup>	61.26 $\pm$ 5.15 <sup>ab</sup>	47.00 $\pm$ 4.24 <sup>b</sup>
Survival success (%)	85.18 $\pm$ 4.89 <sup>a</sup>	87.79 $\pm$ 5.80 <sup>a</sup>	71.64 $\pm$ 7.84 <sup>ab</sup>	56.76 $\pm$ 6.74 <sup>b</sup>
Hatch success (%)	56.90 $\pm$ 9.76 <sup>b</sup>	87.28 $\pm$ 2.43 <sup>a</sup>	41.01 $\pm$ 8.50 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>



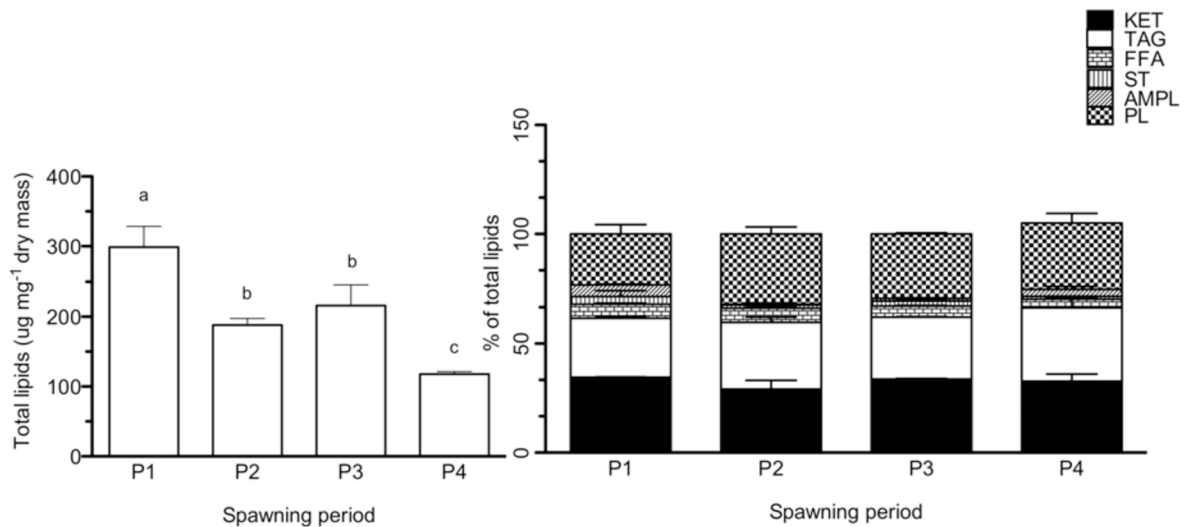


Figure 4. Changes in total lipid content and lipid class composition (KET: ketones; TAG: triacylglycerols; FFA: free fatty acids; ST: sterols; AMPL: acetone-mobile polar lipids; PL: phospholipids) in walleye (*Sander vitreus*) eggs at 30 degree-days post fertilization (mean  $\pm$  SD). Different letters indicate statistically significant differences among spawning periods. Spawning periods were defined as the number of days following the first occurrence of ovulation: early (P<sub>1</sub>, 3 d), intermediate (P<sub>2</sub>, 5 d; P<sub>3</sub>, 8 d), and late (P<sub>4</sub>, 11 d)

#### Amino acids

Aspartic acid (ASP), cystathionine (CTH), and glutamic acid (GLU) quantitatively dominated the FAA pool in *Sander vitreus* eggs at 30 DD post fertilization, accounting for  $32 \pm 7$ ,  $17 \pm 3$ , and  $9 \pm 2\%$  of total FAA, respectively (Table 4). Essential amino acids (EAA) (valine [VAL], leucine [LEU], isoleucine [ILE], threonine [THR], histidine [HIS], methionine [MET], phenylalanine [PHE], lysine [LYS], and tryptophan [TRP]) accounted for  $21 \pm 5\%$  of the FAA. Concerning TAA, alanine (ALA), GLU, and ASP were the dominant non-essential amino acids (NEAA), contributing an average of 37% of the TAA

at 30 DD post fertilization for the four spawning periods (Table 4). VAL, LEU, and ILE were the most abundant EAA. Total FAA concentration in eggs at 30 DD post fertilization averaged  $0.7 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ , with no change among spawning periods ( $p = 0.07$ ). Total protein concentration averaged  $6.3 \pm 2.6 \text{ mg g}^{-1}$ , and TAA differed according to the spawning period (*Pseudo* -  $F_{\text{TAA}(3,3)} = 7.8$ ,  $p = 0.04$ ). SIMPER analysis showed that LYS (EAA fraction) and SER (NEAA fraction) explained more than 20 and 12%, respectively, of the differences among the four spawning periods. LYS and SER were three times higher in P<sub>2</sub> eggs.

Table 3. Fatty acid composition of neutral and polar lipids of walleye eggs (% weight of total neutral and polar lipids  $\pm$  SD) at 30 degree-days post fertilization at different spawning periods (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, and P<sub>4</sub>). Spawning periods within the reproductive cycle were defined according to the number of days following the first natural occurrence of ovulation: early spawning: P<sub>1</sub>, 3 d; intermediate spawning: P<sub>2</sub>, 5 d, and P<sub>3</sub>, 8 d; and late spawning: P<sub>4</sub>, 11 d. Different letters indicate significant differences among spawning periods for the neutral fraction

Fatty acids	Neutral fraction				Polar fraction			
	Spawning periods							
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
C14:0	1.9 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.4
C16:0	8.6 $\pm$ 0.1	9.3 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.0	18.8 $\pm$ 0.1	18.9 $\pm$ 0.2	17.6 $\pm$ 0.5	19.4 $\pm$ 1.7
C18:0	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	4.9 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.9	5.1 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.6
C19:0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
<b><math>\Sigma</math>SFA<sup>†</sup></b>	12.0 $\pm$ 3.1	13.2 $\pm$ 3.3	11.4 $\pm$ 2.9	13.9 $\pm$ 3.4	26.6 $\pm$ 6.8	26.8 $\pm$ 6.8	25.6 $\pm$ 6.3	28.0 $\pm$ 7.0
C16:1 n-7	15.1 $\pm$ 0.1	11.3 $\pm$ 3.1	14.6 $\pm$ 0.5	17.4 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.0	3.4 $\pm$ 0.7
C18:1 n-9	31.5 $\pm$ 1.0	32.5 $\pm$ 0.5	30.5 $\pm$ 0.8	18.8 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.0	8.9 $\pm$ 7.6
C20:1 n-9	1.3 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.0
<b><math>\Sigma</math>MUFA<sup>‡</sup></b>	<b>49.5 <math>\pm</math> 12.1<sup>a</sup></b>	<b>47.0 <math>\pm</math> 12.0<sup>ab</sup></b>	<b>48.0 <math>\pm</math> 11.7<sup>a</sup></b>	<b>39.4 <math>\pm</math> 8.5<sup>b</sup></b>	8.1 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 1.4	9.0 $\pm$ 1.3	16.0 $\pm$ 3.2
C18:2 n-6	15.9 $\pm$ 0.8	17.2 $\pm$ 0.6	16.6 $\pm$ 0.0	10.6 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.4
C18:3 n-6	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
C20:3 n-6	0.7 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	3.7 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.4
C20:4 n-6	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
C18:3 n-3	2.8 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.00
C20:3 n-3	1.1 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0	5.5 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 1.5
C20:5 n-3	3.2 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.0	4.3 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 1.0
C22:6 n-3	11.4 $\pm$ 0.0	11.6 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 0.0	10.7 $\pm$ 0.5	45.3 $\pm$ 0.9	44.6 $\pm$ 0.8	44.8 $\pm$ 0.1	40.0 $\pm$ 6.9
<b><math>\Sigma</math>PUFA<sup>§</sup></b>	<b>37.1 <math>\pm</math> 5.4<sup>a</sup></b>	<b>38.7 <math>\pm</math> 5.8<sup>a</sup></b>	<b>38.7 <math>\pm</math> 5.7<sup>a</sup></b>	<b>32.5 <math>\pm</math> 6.4<sup>b</sup></b>	67.8 $\pm$ 13.7	66.5 $\pm$ 13.5	68.2 $\pm$ 13.6	58.8 $\pm$ 12.2
<b><math>\Sigma</math>n-3</b>	19.2 $\pm$ 4.6	19.5 $\pm$ 4.7	20.3 $\pm$ 4.8	23.7 $\pm$ 5.4	58.3 $\pm$ 1.6	56.7 $\pm$ 1.4	58.2 $\pm$ 1.5	49.3 $\pm$ 1.3
<b><math>\Sigma</math>n-6</b>	17.8 $\pm$ 6.9	19.1 $\pm$ 7.5	18.4 $\pm$ 7.2	21.0 $\pm$ 8.1	9.5 $\pm$ 2.5	9.79 $\pm$ 1.9	9.9 $\pm$ 2.4	9.5 $\pm$ 3.0
<b>Total lipids (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>94.0 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>53.0 <math>\pm</math> 19.7</b>	<b>61.2 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>48.1 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>22.2 <math>\pm</math> 2.9</b>	<b>14.8 <math>\pm</math> 4.6</b>	<b>15.0 <math>\pm</math> 1.6</b>	<b>6.9 <math>\pm</math> 3.8</b>

<sup>†</sup> Includes 15:0, 17:0, and 20:0; <sup>‡</sup> includes 15:1, 17:1, 14:1 n-5, 22:1 n-9, and 24:1; <sup>§</sup> includes 18:4 n-3

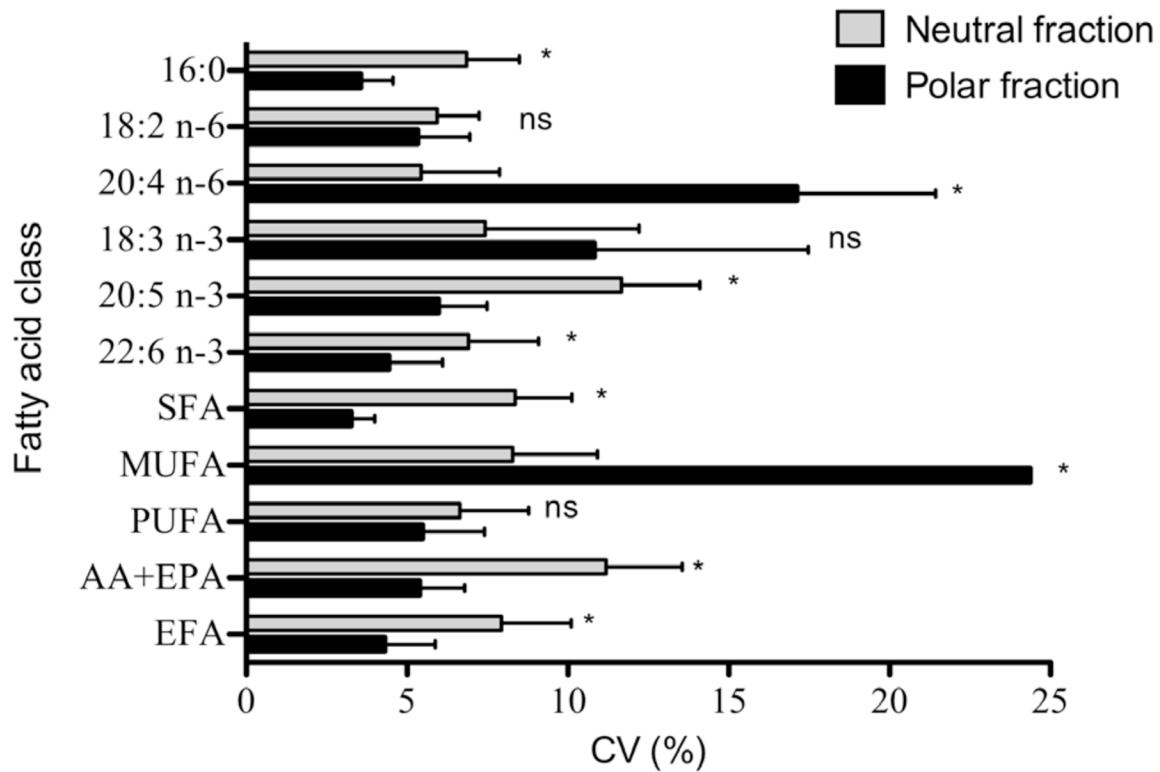


Figure 5. Variations in the proportions of selected fatty acid classes among eggs from different spawning periods at 30 degree-days post fertilization (shaded bars: neutral lipid fraction; solid bars polar lipid fraction). Values represent jackknifed means + one standard error. Results of two-tailed t-tests are indicated (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ )

Table 4. Free and total amino acid contents (% of total amino acids  $\pm$  SD) of walleye eggs at 30 degree-days post fertilization at different spawning periods (P1, P2, P3, and P4)

Amino acids	Free amino acids (FAA)				Total amino acids (TAA)			
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
<b>Essential amino acids</b>								
Valine. VAL	3.5	3.9 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.4	9.3	10.8 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.7
Leucine. LEU	3.6	4.6 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.9	11.1	10.6 $\pm$ 0.8	11.0 $\pm$ 0.4	11.5 $\pm$ 0.0
Isoleucine. ILE	2.4	2.7 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.7	6.8	7.5 $\pm$ 0.9	6.8 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 0.4
Threonine. THR	0.0	0.0	0.4 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.8	3.6	5.9 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.1
Histidine. HIS	2.1	2.6 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2	0.7	0.0	1.7 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2
Methionine. MET	2.2	3.0 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.5	2.6	2.0 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.5
Phenylalanine. PHE	1.9	2.2 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.7	5.9	4.2 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.4
Lysine. LYS	3.9	5.9 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 2.1	5.0	15.6 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.8
Tryptophan. TRP (TRY)	0.5	1.1 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.6	ND	ND	ND	ND
<b>Non- essential amino acids</b>								
Alanine. ALA	6.4	6.8 $\pm$ 1.0	4.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 1.5	15.6	17.6 $\pm$ 1.5	15.0 $\pm$ 0.2	13.5 $\pm$ 0.2
Sarcosine. SAR	1.6	1.0 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.2	0.0	0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
Glycine. GLY	2.0	2.2 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.4	6.8	6.8 $\pm$ 1.0	6.2 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.2
Serine. SER	0.0	0.0	0.0	0.4 $\pm$ 0.6	0.0	6.2 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.6
Proline. PRO	1.4	1.4 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.9	5.3	5.9 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.0	5.3 $\pm$ 0.3
Thioprolin. TPR	0.9	1.5 $\pm$ 1.3	1.3 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2	ND	ND	ND	ND
Aspartic acid. ASP	33.6	24.2 $\pm$ 7.1	30.9 $\pm$ 0.3	39.3 $\pm$ 4.8	8.1	10.4 $\pm$ 0.4	7.9 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.1
Hydroxyproline. HYP	0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.2	0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
Glutamic acid. GLU	7.8	11.4 $\pm$ 1.6	8.6 $\pm$ 2.7	8.1 $\pm$ 1.1	13.8	10.2 $\pm$ 3.2	13.1 $\pm$ 0.6	11.8 $\pm$ 0.6
Glutamine. GLN	4.4	1.8 $\pm$ 2.3	3.2 $\pm$ 0.0	4.9 $\pm$ 0.2	ND	ND	ND	ND
Tyrosine. TYR	2.6	2.5 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.9	2.75	0.8 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.0
Cystathionine. CTH	15.3	16.6 $\pm$ 0.8	13.9 $\pm$ 0.2	19.6 $\pm$ 6.0	ND	ND	ND	ND
Cystine. C-C	0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	ND	ND	ND	ND
$\Sigma$ Essential	20.5	26.3 $\pm$ 3.2	21.4 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 7.3	45.3	45.9 $\pm$ 4.4	46.8 $\pm$ 1.4	46.4 $\pm$ 0.8
$\Sigma$ Non-essential	79.4	73.6 $\pm$ 5.3	76.5 $\pm$ 1.7	84.6 $\pm$ 3.2	54.6	54.0 $\pm$ 1.1	53.1 $\pm$ 1.1	52.8 $\pm$ 0.8
$\Sigma$ Acidic	49.7	42.2 $\pm$ 1.0	48.5 $\pm$ 0.3	53.5 $\pm$ 2.3	23.7	18.9 $\pm$ 0.2	21.4 $\pm$ 0.0	19.7 $\pm$ 0.6
$\Sigma$ Basic	6.1	8.6 $\pm$ 3.0	6.6 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.8	5.8	15.6 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.8
$\Sigma$ Aromatic	8.2	10.2 $\pm$ 3.2	7.3 $\pm$ 0.0	7.1 $\pm$ 7.3	9.4	4.3 $\pm$ 4.4	10.3 $\pm$ 1.4	12.1 $\pm$ 0.8
Essential/Non-essential	0.2	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.8	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0
<b>Total (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	0.7	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	8.0	3.4 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 1.3

ND: not detected amino acids

### 1.6.3 Use of biochemical reserves during embryonic development

Because P<sub>2</sub> eggs had the highest hatching and survival successes, we only considered this group when investigating the use of biochemical reserves during embryonic development.

Total lipids decreased by almost half during embryonic development (ED) ( $F_{(3, 6)} = 6.5$ ,  $p = 0.02$ ), i.e., from  $173.3 \pm 21.6 \text{ mg g}^{-1}$  at 30 DD to  $99.7 \pm 11.0 \text{ mg g}^{-1}$  at 200 DD. Lipid class composition varied significantly during embryogenesis (*Pseudo* –  $F_{(3, 4)} = 19.3$ ,  $p = 0.03$ ): TAG decreased from  $30.7 \pm 2.4\%$  at 30 DD to  $4.7 \pm 1.7\%$  at 200 DD while PL increased from  $31.8 \pm 3.2\%$  to  $83.0 \pm 5.7\%$  for the same period (Fig. 6). Fatty acid proportions in the polar fraction changed during ED (*Pseudo* –  $F_{(3, 4)} = 28.1$ ,  $p = 0.03$ ). SIMPER analysis showed that DHA contributed the most to this difference, decreasing significantly during development. In contrast, no changes were observed in the neutral fraction ( $p = 0.06$ ). FAA and TAA profiles varied during ED (*Pseudo* –  $F_{\text{FAA } (3, 4)} = 7.0$ ,  $p = 0.02$ ; *Pseudo* –  $F_{\text{TAA } (3, 4)} = 8.4$ ,  $p = 0.01$ ), with significant decreases in ASP and CTH from 30 to 200 DD post fertilization in the FAA fraction and significant decreases in LYS and SER from 30, 60, 155, and 200 DD post fertilization in the TAA fraction.

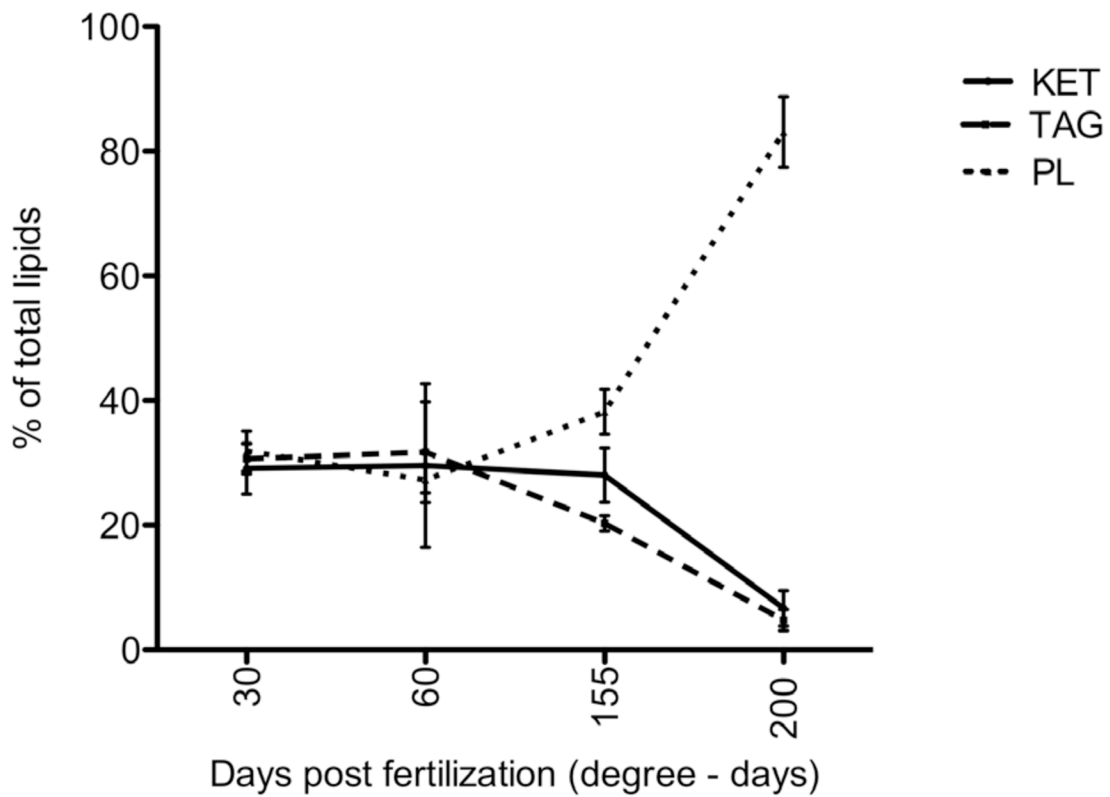


Figure 6. Changes in the major lipid class composition (KET: ketones, TAG: triacylglycerols, PL: phospholipids) in walleye (*Sander vitreus*) eggs and larvae at 30, 60, 155, and 200 degree-days post fertilization (mean  $\pm$  SD)

## 1.7 DISCUSSION

Walleye (*Sander vitreus*) hatcheries still rely largely using broodstock composed of captured wild fish. To improve offspring growth and survival, a better understanding of the biochemical events occurring in early life stages and the impact of egg biochemical composition on subsequent ontogeny are needed. To the best of our knowledge, our study is one of a few that reports 1) evidence of an effect of egg biochemical composition on survival and 2) changes in biochemical composition during embryogenesis. Our results highlight the importance of DHA (EFA), LYS (EAA), and SER, ASP, and CTH (NEAA) for egg viability and during larval development as well as reveal how late spawning may dramatically affect egg quality.

Variability in offspring survival within one broodstock may be related to many factors, such as spawning timing and hormonal induction (Malison et al., 1998; Migaud et al., 2013). Our data demonstrate a trend in decreasing mean egg size towards the end of the reproductive season, with the lowest egg survival and hatching success at the latest spawning period. This is in agreement with previous results obtained for walleye from Lake Ontario (Johnston et al., 2005; 2007). However, no effect of spawning timing was found on embryonic survival to the eyed stage in a walleye population from Ohio (Czesny et al., 2005). The decrease in egg size in the late-spawning batch could be due to the depletion of female energy reserves, as has been shown in Atlantic cod (Chambers and Waiwood, 1996; Kjesbu, 1989) and Atlantic halibut (Evans et al., 1996). Within a given species, it is commonly accepted that larger eggs have better survival and produce larger offspring (Bromage et al., 1994; Heath et al., 2003). However, some studies on trout and sea bass showed that eggs of varying size may exhibit similar developmental competence (Bromage et al., 1992; Cerdá et al., 1994). In our study, no relationship was found between egg size and survival or hatching success, but we found a positive correlation between egg size and larval size at hatch. Our results suggest that egg size may exert a stronger influence over post-hatch survival than embryonic survival, at least under culture conditions. Czesny et al.



(2005) showed that even though egg size varied among females from an inland reservoir, it was unrelated to the egg lipid content.

Relatively little is known about the role of egg biochemical composition in early survival of walleye. Based on the reproductive results, we hypothesized that eggs with the best hatching success would have the highest amounts of total lipids, with higher proportions of essential fatty acids and amino acids. Our results clearly showed that eggs from the latest spawning period (0% hatching success) had the lowest total lipid content, while eggs from the intermediate spawning periods (highest hatching success) had intermediate levels of total lipids. A positive effect of egg lipid content on embryonic survival and hatching was not expected because much of the lipid reserves in walleye eggs is contained in the large neutral oil droplet, which is not consumed before hatching (Johnston et al., 2007; Moodie et al., 1989).

The advantage of greater total lipid stores to hatching success is not clear. A relationship between egg total lipid content and egg viability has been observed in freshwater fishes, although contradictory reports exist concerning this relationship. High egg lipid content increased viability in roach and bream (Zhukinskiy et al., 1981) while no definite or negative effects were observed in walleye (Czesny and Dabrowski, 1998; Czesny et al., 2005), sole, sea bass, turbot (Devauchelle et al., 1982), Macquarie perch (Sheikh-Eldin et al., 1996) and common dentex (Samaee et al., 2009).

The proportions of lipid classes identified in walleye eggs are typical of fish eggs with a lipid globule (Kaitaranta and Ackman, 1981; Wiegand, 1996). Our results indicate that hatching success was probably related to the relative proportions of some fatty acids and/or amino acids. Hatching success has been associated with egg fatty acid composition in wild fish populations such as cod and walleye (Czesny and Dabrowski, 1998; Moodie et al., 1989; Salze et al., 2005), although such a relationship is not always present.

Polar fatty acid profiles did not vary with the spawning period and did not appear to influence hatching success. Fatty acid profiles at 30 DD post fertilization revealed very

high levels of DHA in the polar fraction. Similar high DHA levels in the polar fraction of walleye eggs were also found by Czesny and Dabrowski (1998) and Moodie et al. (1989), suggesting its selective retention during embryogenesis, as well as by Abi-Ayad et al. (2000) and Henrotte et al. (2010) in Eurasian perch eggs. A high proportion of DHA in the polar fraction demonstrates the importance of this fatty acid. It is likely related to special function since this compound is relatively rare at lower trophic levels in freshwater environments (Henderson and Tocher, 1987; Wiegand, 1996). Czesny and Dabrowski (1998) showed that the polar fraction of walleye egg lipids—in particular the essential fatty acids DHA, EPA, and AA—is noticeably less affected by the broodstock's nutritional status. We found stable proportions of AA + EPA compared with proportions of either fatty acid individually, which is of interest because AA and EPA are biochemical precursors in the eicosanoid synthesis pathways (Fernández-Palacios et al., 2011) and both compete for enzymes in the cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways, with AA being the preferred substrate (Fernández-Palacios et al., 2011). This could explain the high variability of the AA concentration in the lipid polar fraction.

We suggest that the higher levels of MUFA and PUFA in the neutral fraction for the first three spawning periods could be good indicators of offspring quality. Johnston et al. (2007) showed that the PUFA composition of neutral lipids in walleye eggs had only a minor influence on hatching success, suggesting that the relative abundance of PUFA in this fraction could be more important to offspring viability in the post-hatch period. In a marine species, the common dentex, Samaee et al. (2009) showed that high quality egg batches also had higher concentrations of total PUFA and some MUFA. Other studies showed that MUFA in the neutral fraction are preferentially utilized during embryonic development in various fish species (Fraser et al., 1988; Mourente and Vázquez, 1996; Rønnestad et al., 1994; Tocher et al., 1985; Wiegand, 1996). Indeed, in starved Eurasian perch larvae, MUFA contributed 37% of the energy from total fatty acid catabolism (Abi-Ayad et al., 2000).

Total lipids, especially TAG, decreased from 30 to 200 DD post fertilization. Such an observation suggests that TAG were used as a primary endogenous energy reserve prior to exogenous larval feeding (Falk-Petersen et al., 1989; Mejri et al., 2012; Samaee et al., 2009; Sewall and Rodgveller, 2008). Variations in the polar fraction during embryogenesis—more precisely, the decrease of DHA—suggest that polar lipids have both structural and energetic roles. DHA assures membrane fluidity, which is required for rapid cell division and growth during embryogenesis (Wiegand et al., 2004).

Environmental factors such as temperature affect the lipid composition of fish tissues (Olsen et al., 1999). Indeed, a decrease in water temperature has been associated with an increase in PUFA content in carp tissues (Kayama et al., 1986) or with an increase in DHA content in Atlantic salmon (Olsen and Skjervold, 1995); these effects are likely related to the positive correlation between the degree of unsaturation of fatty acids and membrane fluidity. In our study, the decrease in DHA could be an adaptive mechanism to reduce membrane fluidity with the increase in temperature occurring during ED. In contrast, Abi-Ayad et al. (2004) working on pikeperch larvae, in a stable temperature environment, did not notice specific retention of DHA. In contrast to lipids, relatively little research has been conducted on the role of egg protein composition during ontogeny on subsequent offspring performance. Amino acids are important constituents of fish eggs since they are required by the embryo for protein synthesis and are a major energy source prior to hatching (Rønnestad et al., 2003). Moreover, amino acids are required to synthesize the apolipoproteins required for absorption of the oil droplet (Mani-Ponset et al., 1996; Poupard et al., 2000).

Free amino acids are more important in pelagic marine eggs than in freshwater and benthic marine eggs, where they may represent less than 5% of egg constituents. For example, in common dentex, a marine pelagophil teleost, FAA account for more than 20% of DM in eggs and play an important role during embryogenesis (Samaee et al., 2010). In freshwater eggs, an organic osmolyte pool would be disadvantageous for embryonic osmoregulation in a hypoosmotic environment (Finn and Fyhn, 2010). The significant

decrease of FAA (ASP and CTH) during ED may suggest that these components could be used as energy sources. While EAA are preferentially used for growth in fish larvae, NEAA are used as energy substrates (Abboudi et al., 2006).

Concerning total amino acids, two interesting features were noticed: 1) lysine and serine were three times higher in P<sub>2</sub> eggs (intermediate spawning period) than in those from the other spawning periods; 2) these two amino acids explained most of the variations occurring during ED, and they decreased significantly from 30 to 200 DD post fertilization. There is little information about the exact roles of these amino acids at this life stage, but it is known that lysine, an EAA in fish, plays an important role in the formation of collagen, which is important in early life stages for development of the skeletal system and skin (Finn and Fyhn, 2010; Ohkubo et al., 2008). Moreover, L-carnitine, which is synthesized from LYS and MET, is required for the transport of fatty acids from the cytosol into mitochondria for  $\beta$ -oxidation (Brown et al., 2005; Harpaz, 2005). In their review, Rønnestad et al. (1999) noted that in fish eggs characterized by oil globules (e.g., *Sander vitreus*), 50% of the energy is derived from amino acids (predominately FAA, but with some contribution from proteins) and 50% from neutral lipids such as TAG and wax and/or steryl esters. Furthermore, there may be an interrelationship between these potential energy sources (Rønnestad et al., 1999; Rosa et al., 2003). Our findings suggest that there may be a concomitant use of free NEAA, proteins, and lipids as energy sources during walleye embryogenesis. Other limiting constituents may include the relative or absolute amounts of vitamins, macrominerals, and maternally transferred hormones, such as thyroid hormones (Brooks et al., 1997), all of which have been linked to both embryonic and post-hatch survival in fish (Hey et al., 1996).

## 1.8 CONCLUSION

This study shows that the timing of ovulation during the spawning period could be a strong determinant in walleye hatching success and early survival. During embryogenesis,

energy is derived primarily from TAG, proteins, and non-essential free amino acids, with a possible concomitant use of DHA to reduce membrane fluidity. Even though proteins represent less than 1% of the dry mass, the depletion of LYS and SER in TAA during embryogenesis in the intermediate spawning groups suggests a critical role during walleye ontogeny. Since walleye culture is still not well developed, the data presented in this study bring useful information concerning larval protein and lipid requirements that could be used to formulate well-balanced broodstock diets.

### **Acknowledgements**

This study was financially supported by the Société de Recherche et de Développement en Aquaculture Continentale Inc. (SORDAC), the Station Piscicole Trois-Lacs industry partner (Wotton, Quebec, Canada), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQNT). We appreciate the support of Dr. I. Ben Khemis of the National Institute of Marine Sciences and Technologies (Tunisia). We are grateful to M. Blanchet and K. Grenier for their extensive help during fieldwork and thank J. Wells for her assistance in the amino acid analysis. Finally, we would like to thank the two anonymous reviewers for their constructive comments on the manuscript.

**REFERENCES**

- Abboudi, T., Mambrini, M., Ooghe, W., Larondelle, Y., Rollin, X., 2006. Protein and lysine requirements for maintenance and for tissue accretion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 261, 369-383.
- Abi-Ayad, S.M.E.A., Kestemont, P., Mélard, C., 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 233-243.
- Abi-Ayad, S.M.E.A., Boutiba, Z., Mélard, C., Kestemont, P., 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 30, 129-136.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141-166.
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J., 1994. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 13-21.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: What makes a good egg? *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 7, 387-416.
- Brown, M.R., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Brock, M., 2005. Ontogenetic changes in amino acid and vitamins during early larval stages of striped trumpeter (*Latris lineata*). *Aquaculture* 248, 263-274.

- Bruce, M.P., Shields, R.J., Bell, M.V., Bromage, N.R., 1993. Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquac. Res.* 24, 417-422.
- Cerdá, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Higuera, M., 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. *Aquaculture* 128, 345-361.
- Chambers, R.C., Waiwood, K.G., 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1986-2003.
- Clarke, M., Parrish, C.C., Penney, R.W., 2010. Free amino acids as an indicator of egg viability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Bull. Aquacul. Assoc. Canada.* 108, 6-9.
- Czesny, S., Dabrowski, K., 1998. The effect of egg fatty acid concentrations on embryo viability in wild and domesticated walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquat. Living Resour.* 11, 371-378.
- Czesny, S., Rinchar, J., Dabrowski, K., 2005. Intrapopulation variation in egg lipid and fatty acid composition and embryo viability in a naturally spawning walleye population from an Inland reservoir. *N. Am. J. Fish. Manage.* 25, 122-129.
- Devauchelle, N., Brichon, G., Lamour, F., Stephan, G., 1982. Biochemical composition of ovules and fecond eggs of sea bass (*Dicentrarchus Labrax*), sole (*Solea vulgaris*), and turbot (*Scophthalmus maximus*). In: Richter C.J.J., Goos H.J (Eds.), *Reproduction physiology of fishes, Proc. Int. Symp. Reproductive physiology of fish*, Center for agricultural publishing and documentation, Wageningen, Netherlands, pp. 155-157.
- Efron, B., Gong, G., 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Am. Stat.* 37, 36-48.

- Evans, R.P., Parrish, C.C., Brown, J.A., Davis, P.J., 1996. Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 139, 139-149.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T., Kjørsvik, E., 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.* 101, 553-556.
- Fenton, R., Mathias, J.A., Moodie, G.E.E., 1996. Recent and future demand for walleye in North America. *Fish. Res.* 21, 6-12.
- Fernández-Palacios, H., Norberg, B., Izquierdo, M., Hamre, K., 2011. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In: Holt, G.J. (Eds.), *Larval fish nutrition*, Oxford, UK, pp. 151-181.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquac. Res.* 41, 684-716.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., 1995a. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. *Mar. Biol.* 124, 355-369.
- Finn, R.N., Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1995b. Respiration, nitrogen and energy metabolism of developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 111, 647-671.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C., 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*). *Mar. Biol.* 99, 307-313.



- Harpaz, S., 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition-a review. *Aquaculture* 249, 3-21.
- Heath, D., Heath, J., Bryden, C., Johnson, R., Fox, C., 2003. Rapid evolution of egg size in captive salmon. *Science*. 299, 1738-1740.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347.
- Henrotte, E., Mandiki, R.S.N.M., Prudencio, A.T., Vandecan, M., Mélard, C., Kestemont, P., 2010. Egg and larval quality, and egg fatty acid composition of Eurasian perch breeders (*Perca fluviatilis*) fed different dietary DHA/EPA/AA ratios. *Aquac. Res.* 41, 53-61.
- Hey, J., Farrar, E., Bristow, B.T., Stettner, C., Summerfelt, R.C., 1996. Thyroid hormones and their influences on larval performance and incidence of cannibalism in walleye *Stizostedion vitreum*. *J. World Aquacult. Soc.* 27, 40-51.
- Johnston, T.A., Miller, L.M., Whittle, D.M., Brown, S.B., Wiegand, M.D., Kapuscinski, A.R., Leggetta, W.C., 2005. Effects of maternally transferred organochlorine contaminants on early life survival in a freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2594-2602.
- Johnston, T.A., Wiegand, M.D., Leggett, W.C., Pronyk, R.J., Dyal, S.D., Watchorn, K.E., Kollar, S., Casselman, J.M., 2007. Hatching success of walleye embryos in relation to maternal and ova characteristics. *Ecol. Freshw. Fish.* 16, 295-306.
- Kaitaranta, J.K., Ackman, R.G., 1981. Total lipids and lipid classes of fish roe. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 69, 725-729.

- Kayama, M., Hirata, M., Hisai, T., 1986. Effect of water temperature on the desaturation of fatty acids in carp. *B. Japan. Soc. Sci. Fish.* 52, 853-857.
- Keckeis, H., Bauer-Nemeschkal, E., Menshutkin, V.V., Nemeschkal, H.L., Kamler, E., 2000. Effects of female attributes and egg properties on offspring viability in a rheophilic cyprinid, *Chondrostoma nasus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 789-796.
- Kjesbu, O.S., 1989. The spawning activity of cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish. Biol.* 34, 195-206.
- Lepage, G., Roy, C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391-1396.
- Malison, J.A., Held, J.A., 1996. Reproductive biology and spawning. In: Summerfelt, R.C. (Ed.), *Walleye culture manual*. NCRAC culture series 101, Iowa, Ames, pp. 11-18.
- Malison, J.A., Procarione, L.S., Kayes, T.B., Hansen, J.F., Held, J.A., 1998. Induction of out-of-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 163, 151-161.
- Mani-Ponset, L., Guyot, E., Diaz, J.P., Connes, R., 1996. Utilization of yolk reserves during post-embryonic development in three teleostean species: The sea bream *Sparus aurata*, the sea bass *Dicentrarchus labrax*, and the pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Mar. Biol.* 126, 539-547.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alornd, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock

- reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 227, 21-33.
- McElman, J., Balon, E., 1979. Early ontogeny of walleye, *Stizostedion vitreum* with steps of saltatory development. *Environ. Biol. Fish.* 4, 309-348.
- Mejri, S., Tremblay, R., Lambert, Y., Audet, C., 2012. Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. *Mar. Biol.* 159, 1693-1701.
- Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., McAndrew, B., Davie, A., Bobe, J., Herráez, M.P., Carrillo, M., 2013. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Rev. Aquac.* 5, 194-223.
- Moodie, G.E.E., Loadman, N.L., Wiegand, M.D., Mathias, J.A., 1989. Influence of egg characteristics on survival, growth and feeding in larval walleye (*Stizostedion vitreum*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 516-521.
- Mourente, G., Vázquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 221-235.
- Navas, J.M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B.M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J.G., Ramos, J., 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish. Biol.* 51, 760-773.
- Ohkubo, N., Sawaguchi, S., Nomura, K., Tanaka, H., Matsubara, T., 2008. Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 282, 130-137.

- Olsen, R.E., Løvaas, E., Lie, Ø., 1999. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 13-29.
- Olsen, Y., Skjervold, H., 1995. Variation in content of  $\Omega$ 3 fatty acids in farmed Atlantic salmon, with special emphasis on effects of non-dietary factors. *Aquacult. Int* 3, 22-35.
- Parrish, C.C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by iatrosan flame ionization detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 722-731.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer Verlag, New York, pp. 4-20.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: Comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2410-2416.
- Poupard, G., André, M., Durliat, M., Ballagny, C., Boeuf, G., Babin, P.J., 2000. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. *Cell. Tissue. Res.* 300, 251-261.
- Rinchar, J., Dabrowski, K., Van Tassell, J.J., Stein, R.A., 2005. Optimization of fertilization success in *Sander vitreus* is influenced by the sperm : Egg ratio and ova storage. *J. Fish. Biol.* 67, 1157-1161.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.

- Rønnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.* 120, 187-196.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: A review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.
- Rosa, R., Morais, S., Calado, R., Narciso, L., Nunes, M.L., 2003. Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture* 221, 507-522.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquac. Res.* 36, 1488-1499.
- Samaee, S.M., Estévez, A., Giménez, G., Lahnsteiner, F., 2009. Evaluation of quantitative importance of egg lipids and fatty acids during embryos and larvae development in marine pelagophil teleosts: With an emphasis on *Dentex dentex*. *J. Exp. Zool. Part A* 311, 735-751.
- Samaee, S.M., Mente, E., Estévez, A., Giménez, G., Lahnsteiner, F., 2010. Embryo and larva development in common dentex (*Dentex dentex*), a pelagophil teleost: The quantitative composition of egg-free amino acids and their interrelations. *Theriogenology* 73, 909-919.
- Sewall, F.F., Rodgveller, C.J., 2008. Changes in body composition and fatty acid profile during embryogenesis of quillback rockfish (*Sebastes maliger*). *Fish. Bull.* 107, 207-220.

- Sheikh-Eldin, M., De Silva, S.S., Anderson, T.A., Gooley, G., 1996. Comparison of fatty acid composition of muscle, liver, mature oocytes, and diets of wild and captive Macquarie perch, *Macquaria australasica*, broodfish. *Aquaculture* 144, 201-216.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*, 3<sup>rd</sup> ed. Freeman, W.H., New York, NY, pp. 915.
- Tocher, D., Fraser, A., Sargent, J., Gamble, J., 1985. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 20, 69-74.
- Wiegand, M.D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 6, 259-286.
- Wiegand, M.D., Johnston, T.A., Martin, J., Leggett, W.C., 2004. Variation in neutral and polar lipid compositions of ova in ten reproductively isolated populations of walleye (*Sander vitreus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 110-121.
- Zhu, P., Parrish, C.C., Brown, J.A., 2003. Lipid and amino acid metabolism during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquacult. Int* 11, 43-52.
- Zhukinskiy, V.N., Gosh, R.I., Konovalov, Y.D., Kim, Y.D., Kovtun, E.I., 1981. Overmaturation and resorption of mature oocytes and their physiological and biochemical features in roach and bream, ontogenetic diversity in fish. *Naukova Dumka*, Kiev, pp. 85-125.

# **DIFFÉRENCES DANS LA COMPOSITION EN NUTRIMENTS DES ŒUFS ET DES LARVES COMME INDICATEURS DE L'OPTIMISATION DE L'ALIMENTATION DES GÉNITEURS DANS LA PRODUCTION DU DORÉ JAUNE (*SANDER VITREUS*)**

## **2.1 RÉSUMÉ**

L'objectif de cette étude était d'améliorer nos connaissances sur les besoins nutritionnels des géniteurs du doré jaune (*Sander vitreus*). Deux régimes alimentaires ont été testés. Le premier consistait en des morceaux de maquereaux (*Scomber scombrus*), riche en acide docosahexaénoïque (DHA, 30% des acides gras totaux) et un supplément de moulée expérimentale. Le deuxième consistait en des morceaux de maquereaux et un supplément de moulée commerciale. Chaque régime alimentaire a été testé sur deux groupes de géniteurs en captivité en comparaison avec des géniteurs sauvages. Nous avons évalué l'importance des acides gras alimentaires (AGs), des acides aminés (AA) et de la vitamine A sur la performance reproductive et la composition biochimique des œufs et des larves. Le succès d'éclosion a été plus élevé chez les œufs des géniteurs sauvages (52%), caractérisés par des pourcentages élevés d'acide linoléique (LOA, 18: 2 n-6) et d'acide linoléique (LNA, 18: 3 n-3) dans la fraction neutre des lipides. D'autre part, le pourcentage de DHA des lipides neutres était plus élevé au niveau des œufs des géniteurs en captivité. Les résultats suggèrent l'importance des AA leucine, lysine, méthionine et sérine pour la survie des œufs et des larves. La concentration en rétinol (ROH, la vitamine A<sub>1</sub>) était similaire dans œufs des géniteurs sauvages et les plus jeunes des deux régimes alimentaires, mais dix fois plus faible dans œufs des géniteurs les plus âgés. Cependant, la concentration en didéhydrorétinol (dd-ROH, la vitamine A<sub>2</sub>) était significativement plus élevée au niveau

des œufs des poissons sauvages. Chaque traitement a abouti à différents niveaux de performance, nous avons alors identifié certaines caractéristiques biochimiques des œufs. Par exemple, nos résultats suggèrent que les œufs de meilleure qualité contiennent au moins 5% LOA et LNA et  $\approx 25\%$  DHA des lipides neutres. En outre, les niveaux de la sérine et de la méthionine étaient respectivement optimaux à  $\geq 6$  et 0,1%. Enfin, les œufs des géniteurs en captivité semblent déficients en vitamine A ; des niveaux minimaux pourraient être  $0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  pour la vitamine A<sub>1</sub> et  $> 2 \text{ mg.g}^{-1}$  pour la vitamine A<sub>2</sub>.

Ce deuxième article, intitulé « Differences in nutrient content of eggs and larvae as indicators for improvement of broodstock nutrition in walleye (*Sander vitreus*) production » a été corédigé par moi-même, mon directeur Réjean Tremblay, mes codirecteurs Céline Audet et Grant W. Vandenberg, ainsi que par les chercheurs Mari Moren et Ines Ben Khemis. Il est en lecture finale par les co-auteurs avant d'être soumis le 1<sup>er</sup> Décembre 2015 dans le numéro spécial de la revue *Aquaculture*. Ma contribution à ce travail a été l'essentiel des échantillonnages, des analyses, l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay, Céline Audet et Grant W Vandenberg ont fourni l'idée originale et conçu le plan de l'étude, et ont aussi aidé à la coordination de la recherche et à l'écriture du manuscrit. Mari Moren a aidé pour les analyses de la vitamine A et ainsi qu'à la révision de l'article. Ines Ben Khemis a aidé à la mise au point des protocoles d'alimentation des géniteurs et d'échantillonnage et également à l'écriture du manuscrit. Des versions abrégées de l'article ont été présentées à la réunion annuelle des Ressources Aquatiques Québec (RAQ) en 2014 et au congrès international organisé par le journal *Aquaculture* à Montpellier (France) en 2015.



## **2.2 DIFFERENCES IN NUTRIENT CONTENT OF EGGS AND LARVAE AS INDICATORS FOR IMPROVEMENT OF BROODSTOCK NUTRITION IN WALLEYE (*SANDER VITREUS*) PRODUCTION**

Sahar Mejri<sup>1\*</sup>, Réjean Tremblay<sup>1</sup>, Grant Vandenberg<sup>2</sup>, Mari Moren<sup>3</sup>, Ines Ben Khemis<sup>4</sup> and Céline Audet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER), Université du Québec à Rimouski (UQAR), Rimouski, Canada*

<sup>2</sup> *Département des sciences animales, Université Laval, Quebec, Canada*

<sup>3</sup> *National Institute of Nutrition And Seafood (NIFES), Bergen, Norway*

<sup>4</sup> *National Institute of Marine Sciences and Technologies, Tunis, Tunisia*

### 2.3 ABSTRACT

The aim of this study was to increase our knowledge about the nutritional needs of walleye (*Sander vitreus*) broodstock. Two dietary treatments were tested: the first consisted of frozen mackerel (*Scomber scombrus*) pieces and a supplement of experimental dry pellets and the second consisted of frozen mackerel pieces and a supplement of commercial trout pellets. Each diet was tested on two domesticated broodstocks and compared to a wild broodstock. We evaluated the importance of dietary fatty acids (FA), amino acids (AA), and vitamin A on reproductive performance and survival of eggs and larvae. Hatching success was highest in eggs from the wild broodstock (52%). Eggs and larvae from wild fish were characterized by the highest levels of linoleic (LOA 18:2 n-6) and linolenic (LNA 18:3 n-3) fatty acids in the neutral lipid fraction and the lowest level of DHA in both neutral and polar lipids. The results suggest the importance of the amino acids leucine, lysine, methionine, and serine for better egg survival. Retinol (ROH; vitamin A<sub>1</sub>) content was similar in eggs from wild fish and the younger broodstock from both treatment groups, but ten times lower in eggs from older fish. Dehydroretinol (dd-ROH; vitamin A<sub>2</sub>) was highest in eggs from wild fish. Because each treatment resulted in different performance levels, we can identify some important biochemical characteristics of the eggs. For example, our results suggest that better quality eggs contain at least 5% LOA and LNA and  $\approx 25\%$  DHA in the total neutral FA. Furthermore, serine and methionine levels are optimal at  $\geq 6$  and 0.1%, respectively. Finally, eggs from domesticated broodstock seemed to be deficient in vitamin A; minimal levels could be  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  for vitamin A<sub>1</sub> and  $> 2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  for vitamin A<sub>2</sub>.

#### **Keywords:**

Walleye, nutritional needs, fatty acids, amino acids, vitamin A, eggs, larvae

## 2.4 INTRODUCTION

Fatty acid (FA), amino acid (AA), and vitamin A tissue profiles are clearly influenced by diet (Cejas et al., 2003; Torstensen et al., 2000), and comparisons between wild and cultured fishes have proven to be a reliable assessment of dietary nutrient requirements. In fish eggs, the correct biochemical composition is necessary to meet the developmental needs of embryonic and larval stages (Afzal Khan et al., 2005; Araújo et al., 2012). The nutrients in eggs depend on broodstock nutrition (Araújo et al., 2012; Callan et al., 2012; Furuita et al., 2003; Izquierdo et al., 2001). Proteins and lipids are the main components of the yolk and act as nutrient sources during biosynthesis.

The role of proteins and the requirement of specific amino acids for the production of good-quality eggs have been better established in marine teleosts (Moran et al., 2007; Rønnestad et al., 1999; Rønnestad et al., 2003) than in most freshwater species. Lipids also have an important structural role in addition to their energetic role during egg and larval development. Some fatty acids are considered essential; these include eicosapentaenoic acid (EPA 20:5 n-3), docosahexaenoic acid (DHA 22:6 n-3), and arachidonic acid (AA 20:4 n-6), all of which are polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Coldebella et al., 2013; Faulk and Holt, 2008; Quintero et al., 2011; Sargent et al., 1999), as well as linoleic acid (LOA 18:2 n-6) and linolenic acid (LNA 18:3 n-3) for some freshwater and salmonid fishes (Glencross, 2009). However, we know little about how these FA are catabolized by larvae. For instance, it has been shown that starved perch larvae (*Perca fluviatilis*) use LNA and LOA instead of DHA and AA (Abi-Ayad et al., 2000).

Among the nutritional components known to affect reproduction and egg and larval development, vitamin A (VA), an essential micronutrient in fish, is of special interest. Indeed, vitamin A, also referred to as retinoids, is vital for reproduction, vision, growth, and immunity (Fontagné-Dicharry et al., 2010; La Frano and Burri, 2014). Fish store VA as retinyl-esters and use VA in the form of retinol (ROH), known as VA<sub>1</sub>, as well as

uncommon forms such as didehydroretinol (dd-ROH) known as vitamin A<sub>2</sub> (Gross and Budowski, 1966; Morton and Creed, 1939). Vitamin A, whether in deficiency or in excess, has been shown to alter embryonic development as well as cell proliferation and differentiation throughout larval and juvenile growth, reviewed by Ross et al. (2000).

Walleye (*Sander vitreus*) is an important freshwater sport and commercial fish in North America (Hartman, 2009). In most hatcheries, walleye broodstock is fed fresh or frozen fish (Mejri et al., 2014; Summerfelt and Summerfelt, 1996). In the wild, walleye feed exclusively on living organisms, such as zooplankton, insects, and other fishes. When fish farmers attempt to feed walleye with artificial feed, mortality rates of 50 to 90% are commonly observed (Summerfelt and Summerfelt, 1996).

The aim of this study was to increase our knowledge on the nutritional needs of walleye broodstocks. Two dietary treatments were tested: 1) frozen mackerel (*Scomber scombrus*), which is rich in DHA (30% of total fatty acids), supplemented with experimental dry pellets enriched with carotenoids and with mackerel and krill oils to enhance palatability for broodfish, and 2) frozen mackerel supplemented with commercial dry trout pellets. Our hypothesis was that the addition of krill and mackerel oils combined with the high astaxanthin level from the frozen mackerel-based diet of captive broodstock would increase reproductive performance and egg quality to a level similar or superior to those observed from wild broodstock.

## **2.5 MATERIALS AND METHODS**

### **2.5.1 Experimental fish and culture facility**

Walleye broodstock were maintained at the Station Piscicole Trois-Lacs fish farm (Wotton, Quebec, Canada) in 5 m<sup>3</sup> circular indoor tanks with a flow-through system (flow rate 1 L h<sup>-1</sup>) and natural photoperiod. Two groups of fish were reared in separate tanks for a

period of 12 months until spawning. One group consisted of 28 five-year-old (mean weight [w]  $724 \pm 152$  g; mean length [l]  $41.3 \pm 3.0$  cm) and three nine-year-old ( $w = 1603 \pm 640$  g;  $l = 53.3 \pm 6.0$  cm) females, and 22 five-year-old ( $w = 519 \pm 88$  g;  $l = 38.0 \pm 2.2$  cm) and eight nine-year-old ( $w = 863 \pm 262$  g;  $l = 44.9 \pm 4.6$  cm) males. The other group consisted in 28 five-year-old ( $w = 712 \pm 178$  g;  $l = 41.2 \pm 3.3$  cm) and three nine-year-old ( $w = 2063 \pm 134$  g;  $l = 58.4 \pm 2.1$  cm) females, and 13 five-year-old ( $w = 555 \pm 149$  g;  $l = 39.4 \pm 2.9$  cm) and four nine-year-old ( $w = 1282 \pm 154$  g;  $l = 50.7 \pm 3.9$  cm) males. All fish were fed to satiation, and feeding took place once a day, four times a week from June to November 2012. Both groups were fed two successive days with experimental dry pellet (EP, 5 mm diameter) or commercial dry trout pellet (CP, 6 mm; 44/16 from Martin Mills Inc., ON, Canada) followed by one day of fasting and then two days of feeding with frozen mackerel (*Scomber scombrus*) pieces. We thus had an experimental group (EXP) fed with EP + mackerel and a commercial group (COM) fed with CP + mackerel. For the EXP and COM groups, we had four treatments: experimental – 9 years old (EXP-9Y), experimental – 5 years old (EXP-5Y), commercial – 9 years old (COM-9Y), and commercial – 5 years old (COM-5Y). During the feeding period, temperature was maintained between 18 and 20°C; it was then progressively lowered and was maintained at 5°C from December 2012 to March 2013. Control eggs and larvae were obtained from wild breeders (W), caught in Flood Creek (Lac-du-Cerf, Quebec, Canada) between 18 April and 4 May 2012; there were nine females ( $w = 2556 \pm 686$  g;  $l = 56.7 \pm 5.3$  cm) and 14 males ( $w = 2097 \pm 608$  g;  $l = 58.1 \pm 6.9$  cm).

### **2.5.2 Pellet composition**

The ingredients of the experimental pellet were fish (herring) meal (35%; Swimco Canada, Toronto, ON, Canada), mackerel oil (9%; Swimco Canada), krill oil (2%; Krill Canada Corporation, Langley, BC, Canada), squid meal (5%; Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA), peas (15%; Parrheim Foods, Saskatoon, SK, Canada), soy protein HP300 (8%;

Jefo, St-Hyacinthe, QC, Canada), wheat (10%; la Seigneurie des Aulnaies Inc., Saint-Roch-des-Aulnaies, QC, Canada), corn gluten (5%; Meunerie Gérard Soucy Inc., Ste-Croix, QC, Canada), krill meal (3%, Krill Canada Corporation), vitamins and minerals (0.8%; Corey Feed Mills Ltd., Fredericton, NB, Canada), lecithin (0.5%; Vitamin World, Bohemia, NY, USA), astaxanthin (0.04%; Corey Feed Mills Ltd.), and ethoxiquin (0.015%; Corey Feed Mills Ltd.). The dry ingredients and 9% of the mackerel oil were mixed and steam pelleted using a California Pellet Mill. The pellets were then dried in a forced-air oven (30°C, 24 h), sieved, coated with the remaining mackerel and krill oil (6 and 2%, respectively), and stored at -20°C until used. The commercial pellet (CP, 44/16 Martin Mills Inc.) was composed of wheat middlings, herring meal, corn gluten meal, soybean meal, poultry meal, feather meal, herring oil, vitamins and minerals, salt, mineral mix, lysine, and choline.

### **2.5.3 Spawning and sample collection**

Water temperature was increased from 5 to 9°C in April 2013 to stimulate final egg maturation. Oocyte maturation was monitored weekly from 22 April after females received the first injection of 300 IU of human chorionic gonadotropin by sampling eggs from 10 to 15 females from each group. Females from the EXP and COM groups (62 and 44%, respectively) spawned on 1 May 2013. To minimize the effect of different spawning periods on egg quality (Mejri et al., 2014), all eggs used in the experiment were collected on the same day. Fish were anaesthetized with MS<sub>222</sub> (5 mg L<sup>-1</sup>) in well-oxygenated fresh water and gametes were collected by hand stripping. The standard dry fertilization method (Malison and Held, 1996) was used: eggs were collected from each female in a dry 500 mL plastic bowl and immediately fertilized with the milt of two to three males of the same age. Fertilized eggs were left for 2–3 h during hardening and then were placed into three 6 L jars (15.8 cm diameter and 45.7 cm high) for incubation. Eggs from six to seven females were pooled for the 5-year-old broodstock cohorts and eggs from two to three females were pooled for the 9-year-old and wild groups. Incubators were supplied with water (flow rate

of 20 L min<sup>-1</sup>) pumped from an external pond; water was drum filtered (90 µm), sand filtered (20 µm), and vacuum degassed before use, and temperature was monitored daily. The upwelling water flow in each incubator jar was regulated to ensure continuous gentle movement of the eggs. From two days after fertilization until just prior to hatching, formaldehyde treatments (50–100 mg formaldehyde per liter of water) lasting 15 min were applied daily to prevent fungal development. For each batch produced, 30–40 individuals (five replicates per incubator) were sampled after 24 h to determine fertilization success. Three replicate samples of approximately 0.2 g specimens (eggs or larvae) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical analysis, and two other replicates were preserved in 1% glutaraldehyde for biometric analysis. Sampling occurred at 30 degree-days post fertilization (ddpf) (beginning of embryogenesis), 60 ddpf (eggs at an intermediate stage of embryogenesis), 200 ddpf (larvae at hatch), and 230 ddpf (larvae before first feeding). Hatching success (%) was estimated using triplicate subsample counts of larvae from a well-mixed incubator, taking into account the initial number of fertilized eggs and the number of dead and viable eggs removed during incubation.

#### **2.5.4 Biometric analysis**

Egg diameter, larval length at hatch, and larval length before first feeding were measured with a high resolution VHX-2000 digital microscope (Keyence, Osaka, Japan) adjusted to 30–200x magnification and set in high dynamic range mode with light shift.

#### **2.5.5 Biochemical analysis**

Lipids were extracted according to the Folch et al. (1957) procedure modified by Parrish (1999) and separated into neutral and polar fractions by silica gel (30 × 5 mm i.d., packed with kieselgel 60, 70–230 mesh; Merck, Darmstadt, Germany) hydrated with 6%

water and eluted with 10 mL of chloroform:methanol (98:2 v/v) for neutral lipids followed by 20 mL of methanol for polar lipids (Marty et al., 1992). The neutral fraction was further eluted on an activated silica gel with 3 mL of hexane and diethyl ether to eliminate free sterols. All fatty acid methyl esters (FAME) were prepared as described by Lepage and Roy (1984) and analyzed in MS scan mode (ionic range: 60–650 m/z) on a Polaris Q ion trap coupled with a Trace GC (Thermo Finnigan, Mississauga, ON, Canada) (Gendron et al., 2013). All FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37 component FAME Mix, PUFA-3, BAME, and menhaden oil; Supelco Bellefonte, PA, USA) and quantified with tricosanoic acid (23:0) and nonadecylic acid (19:0) as internal standards. Chromatograms were analyzed using integration Xcalibur 1.3 software (Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canada).

For total amino acid analysis, samples were diluted with 2 mL distilled water and hydrolyzed with equal parts of 12 N HCl containing 10% phenol at 110°C for 24 h. Amino acids were extracted and derivatized using an EZ: faast™ GC-FID analysis kit (Clarke et al., 2010). A volume of 100 µL from each sample was mixed with 100 µL norvaline (0.2 mM), an internal standard, and n-propanol, and passed through a sorbent tip. The tip was then washed with 200 µL Milli-Q water. The sorbent material was injected into an eluting medium consisting of 3:2 sodium hydroxide/n-propanol. Next, 50 µL of chloroform and 100 µL of iso-octane were added to the solution to form an organic layer containing the amino acids, and derivatization was completed with 1 N HCl before being run on a Varian 3800 GC-FID (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) to obtain amino acid composition with the exception of taurine and arginine. Each amino acid was quantified with a known quantity of internal standard.

Vitamin A composition was analyzed only on egg samples. The samples were prepared using a saponification method modified from CEN (1999), where samples were boiled for 20 min with 20% (w/w) KOH. High performance liquid chromatography was then used for quantification of total retinol and di-dehydro-retinol (Moren et al., 2002; Nöll, 1996). The system consisted of an isocratic pump (Thermo Separation Products, P1000), an auto



sampler (Thermo Separation Products, AS3000 auto sampler), a silica column (4  $\mu\text{m}$  spheri, 24 cm  $\times$  4.6 cm I.D., Superspher; Merck), and a diode array detector (Thermo Separation Products, UV6000). The mobile phase consisted of 8% tert-butylmethyl ether in n-heptane; diode array scanning and retention times were used to identify the peaks. Quantification was done using a standard curve for vitamin A<sub>1</sub> and a correction factor of 1.64 for vitamin A<sub>2</sub>. Detection limits for vitamin A<sub>1</sub> and vitamin A<sub>2</sub> were 18 and 29 ng.g<sup>-1</sup> sample materials, respectively.

### 2.5.6 Statistical analysis

Reproductive characteristics of females; fertilization and hatching successes; total lipid; total protein; and vitamin A content were tested with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posteriori Hsu's multiple comparisons tests after assumptions of homoscedasticity and normality had been verified by Levene and Shapiro-Wilk tests ( $n = 3$ ), respectively. These analyses were performed with the JMP 9 package (SAS Institute Inc., Cary, NC). Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA with 9999 permutations), including a posteriori pair-wise comparisons, was performed on fatty acid and amino acid profiles in mackerel, experimental pellets, and commercial pellets. Fatty acids from neutral and polar fractions and AA profiles in eggs and larvae were tested with PERMANOVA according to two factors: treatment (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, and W) and degree-days post fertilizations (ddpf) (30 and 60 ddpf for eggs; 200 and 230 ddpf for larvae). Assumptions of homoscedasticity were verified with a PERMDISP test and data were transformed (arcsine square root) when necessary. To analyze the similarity between the profiles, non-metric multi-dimensional scaling (n-MDS) and SIMPER analyses were performed using a Bray-Curtis similarity matrix with PRIMER 6 (v. 6.1.12) and PERMANOVA+ (v. 1.0.2). Linear regression analyses were performed between the hatching and fertilization successes and vitamin A content.

## 2.6 RESULTS

### 2.6.1 Reproductive characteristics

Results of weight gain of walleye broodstock, egg diameter, larval length at hatch and before first feeding, fertilization success, and hatching success are given in Table 5. Weight gain was significantly higher in younger breeders ( $F_{(3, 102)} = 6.6, p < 0.0001$ ), but egg diameter was larger in eggs from the 9-year-old females with similar results between eggs from the wild and the 5-year-old broodstock ( $F_{(4, 223)} = 73.5, p < 0.0001$ ). While hatch success was significantly higher in eggs from the wild fish ( $F_{\text{hatching } (4, 7)} = 6.8, p = 0.01$ ), no significant difference was revealed for fertilization success. Lengths at hatch and before first feeding were significantly higher in larvae produced from wild broodstock ( $F_{\text{at hatch } (4, 85)} = 40.3; F_{\text{before first feeding } (4, 85)} = 30.6, p < 0.0001$ ).

Table 5. Weight gain, characteristics of eggs and larvae, and reproductive performance (mean  $\pm$  SD) of 5- and 9-year-old fish from domesticated broodstocks fed two diet treatments compared to a wild broodstock. Means in a row with different letters are significantly different (ANOVA:  $p < 0.05$ ). Treatments were defined as follows: Experimental – 9 years old (EXP-9Y), experimental –5 years old (EXP-5Y), commercial – 9 years old (COM-9Y), commercial – 5 years old (COM-5Y), and wild (W)

Diet	EXP diet (Mackerel + experimental pellet)		COM diet (Mackerel + commercial pellet)		Wild
	5 years	9 years	5 years	9 years	
Age	EXP-5Y		EXP-9Y		W
Treatments	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	
Weight gain (g) for both sexes	213.6 $\pm$ 79.0 <sup>a</sup>	92.7 $\pm$ 70.3 <sup>b</sup>	235.0 $\pm$ 110.7 <sup>a</sup>	118.3 $\pm$ 158.2 <sup>b</sup>	—
Egg diameter (mm)	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
Larvae at hatch (mm)	6.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	6.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	6.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	7.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Larvae before first feeding (mm)	7.1 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	7.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	7.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	7.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	8.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Fertilization (%)	90.6 $\pm$ 9.7	97.7 $\pm$ 3.9	82.2 $\pm$ 17.9	89.2 $\pm$ 4.7	87.9 $\pm$ 10.3
Hatching (%)	18.8 $\pm$ 14.5 <sup>b</sup>	6.9 $\pm$ 2.8 <sup>bc</sup>	14.9 $\pm$ 11.5 <sup>bc</sup>	2.4 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	52.1 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>

### 2.6.2 Nutrient composition of the diet

Total lipids were significantly higher in mackerel than in experimental and commercial pellets ( $F_{(2, 9)} = 18.8$ ,  $p \leq 0.001$ ; Table 6). Mackerel, CP, and EP contained similar percentages of saturated fatty acids (SFA), while CP and EP contained the highest percentages of monounsaturated fatty acids (MUFA) (53 and 49% of total FA, respectively). Compared to EP and CP, mackerel contained higher percentages of n-3 PUFA (42% of total FA), which consisted mainly of DHA and EPA. However, EP and CP contained the highest amounts of n-6 PUFA (18 and 6% of total FA, respectively), which was predominantly linoleic acid (18:2 n-6). Finally, DHA and EPA percentages were significantly higher in the EP than in the CP diet (Table 6).

Proportions of essential amino acids (EAA) were similar between mackerel, CP, and EP, except for threonine (THR), which was completely absent in both pellets while it made up  $7.5 \pm 0.2\%$  of total AA in mackerel. Mackerel showed the lowest EAA and total protein contents compared to CP and EP (EAA:  $F_{(2, 9)} = 43.8$ , protein:  $F_{(2, 9)} = 22.2$ ,  $p \leq 0.001$ ; Table 6). While we did not measure levels of vitamin A<sub>1</sub> (sum of retinols; ROH) and vitamin A<sub>2</sub> (didehydro-all-trans-retinol; dd-ROH) in mackerel, their levels have been reported to be 0.12 and 0.05 mg.g<sup>-1</sup>, respectively (NIFES, 2006).

Table 6. Fatty acid (% of total fatty acids), amino acid (% of total amino acids), and vitamin A composition in mackerel, commercial pellets (CP), and experimental pellets (EP). Different letters indicate significant differences among feed types (ANOVA:  $p < 0.05$ ). We have no data for VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub> in CP and EP

Fatty acids	Diets			Amino acids	Diets		
	Mackerel	CP	EP		Mackerel	CP	EP
C14:0	3.4 ± 1.3	3.2 ± 0.1	5.8 ± 0.0	Valine, VAL	4.8 ± 0.5	4.8 ± 0.2	5.3 ± 0.5
C16:0	15.1 ± 0.7	12.2 ± 0.4	14.4 ± 0.2	Leucine, LEU	6.7 ± 0.2	8.0 ± 0.4	8.2 ± 0.9
C18:0	4.1 ± 0.8	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.0	Isoleucine, ILE	4.0 ± 0.8	3.4 ± 0.2	4.5 ± 0.9
∑SFA <sup>†</sup>	24.2 ± 4.2	18.8 ± 3.4	25.4 ± 4.2	Threonine, THR	7.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>
C16:1	4.5 ± 0.8	4.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	Histidine, HIS	2.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
C18:1 n-9	3.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	19.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	20.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	Methionine, MET	2.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.7 ± 0.2
C20:1 n-9	8.0 ± 2.6 <sup>b</sup>	9.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	12.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	Phenylalanine, PHE	2.0 ± 0.2	2.8 ± 0.0	2.7 ± 0.1
C22:1 n-9	14.3 ± 5.1 <sup>ab</sup>	18.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	Lysine, LYS	6.2 ± 0.3	7.3 ± 1.5	5.9 ± 0.2
∑MUFA <sup>‡</sup>	31.6 ± 5.0	53.3 ± 8.4	48.9 ± 7.6	<i>Non-essential amino acids</i> <sup>+</sup>			
C18:2 n-6	1.6 ± 0.3 <sup>c</sup>	17.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	Alanine, ALA	8.4 ± 0.1	8.6 ± 0.2	8.8 ± 0.7
C18:3 n-3	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	Glycine, GLY	7.3 ± 1.0	8.8 ± 0.6	9.1 ± 0.9
C20:5 n-3	9.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	Serine, SER	24.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	18.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	23.8 ± 1.2 <sup>a</sup>
C22:6 n-3	29.5 ± 8.0 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.0 <sup>c</sup>	11.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	Proline, PRO	3.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	6.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.3 <sup>b</sup>
∑PUFA <sup>‡</sup>	44.2 ± 12.4	27.8 ± 5.5	25.6 ± 4.0	Aspartic acid, ASP	8.0 ± 1.6	8.1 ± 0.5	7.2 ± 3.8
∑n-3	41.6 ± 12.3	10.2 ± 1.5	20.0 ± 5.0	Glutamic acid, GLU	7.1 ± 1.3	12.2 ± 2.3	9.0 ± 2.6
∑n-6	2.5 ± 0.7	17.6 ± 8.6	5.6 ± 2.2	Glutamine, GLN	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.4
<b>Total lipids (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>205.9 ± 76.8<sup>a</sup></b>	<b>58.2 ± 5.2<sup>b</sup></b>	<b>83.8 ± 8.6<sup>b</sup></b>	Tyrosine, TYR	0.8 ± 0.9	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.4
VA <sub>1</sub> (sum of retinol)	0.12	—	—	Allo-isoleucine, AILE	3.8 ± 0.1	5.0 ± 0.0	4.6 ± 0.5
VA <sub>2</sub> (didehydro-all-	0.05	—	—	<b>∑ Protein (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>102.7 ± 10.2<sup>b</sup></b>	<b>274.0 ± 62.0<sup>a</sup></b>	<b>307.0 ± 78.8<sup>a</sup></b>
				<b>∑ Essential (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>43.2 ± 1.6<sup>b</sup></b>	<b>92.6 ± 13.1<sup>a</sup></b>	<b>107.7 ± 17.3<sup>a</sup></b>
				∑ Acidic (mg/g)	19.7 ± 4.9	71.5 ± 25.0	67.8 ± 38.0
				∑ Basic (mg/g)	11.9 ± 1.5	29.0 ± 2.5	26.8 ± 6.5
				∑ Aromatic (mg/g)	8.2 ± 1.8	20.6 ± 2.3	20.2 ± 2.9

<sup>†</sup>: Includes C15:0, C17:0, C20:0, C21:0 and C24:0 with percentages < 0.5%

<sup>‡</sup>: Includes C14:1, C17:1, C24:1 n-9 with percentages ≤ 1.5%

<sup>‡</sup>: Includes C18: 4 n-3, C20:3 n-3, C18:3 n-6, C20:3 n-6, C20:4 n-6 < 1%

Amino acids whose percentages were < 1% were not listed but included when calculating total protein, essential acidic, basic, and aromatic

\*: Includes tryptophan (TRP)

<sup>+</sup>: Includes asparagine, ornithine, hydroxylysine, aminoisobutyric acid, glycine-proline, α-amino adipic acid, α-aminopimelic acid, proline-hydroxyproline, amino-n-butyric acid, thioproline, hydroxyproline, cystathionine, cystine.

### 2.6.3 Nutrient composition of eggs and larvae

Total lipids in eggs did not vary ( $p = 0.9$ ) according to the different factors studied. However, total lipids in larvae varied according to days post fertilization and treatment ( $F_{\text{ddpf}(1, 10)} = 7.2$ ,  $F_{\text{treatments}(4, 10)} = 4.5$ ,  $p = 0.02$ ). In eggs, total protein and total EAA varied as a function of the interaction between treatments and days post fertilization (protein:  $F_{(4, 14)} = 4.8$ ; EAA:  $F_{(4, 14)} = 5.0$ ,  $p = 0.01$ ), but no variation was observed in larvae ( $p \geq 0.06$ ).

In both eggs and larvae, the fatty acid composition of the neutral fraction varied according to the different treatments ( $Pseudo-F_{\text{eggs}(4, 14)} = 34.4$ ,  $Pseudo-F_{\text{larvae}(4, 14)} = 39.2$ ,  $p = 0.001$ ) (Table 7). DHA, 20:3 n-3, 18:3 n-3, and 18:2 n-6 explained most of the variation among treatments. The fatty acid profiles of eggs and larvae obtained from the COM and EXP broodstocks (fed on [EP or CP] + mackerel) did not resemble those of the eggs and larvae obtained from the wild broodstock, as shown by n-MDS analysis (Fig. 7). Indeed, DHA was the most abundant component in the neutral lipid fraction ( $> 20\%$ ) and was highest in eggs and larvae from the COM and EXP broodstock groups. However, 20:3 n-3, 18:3 n-3, and 18:2 n-6 were almost three times higher in eggs and larvae from the wild fish (Table 7).

Table 7. Fatty acid composition of neutral lipids of walleye eggs and larvae (% weight of total neutral lipids  $\pm$  SD). Different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA:  $p < 0.05$ ), with eggs and larvae being tested separately (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, W; see Table 1 caption for treatment abbreviations)

Neutral FAs	Eggs					Larvae				
	Treatments									
	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	W	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	W
C14:0	2.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2
C16:0	10.0 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.9	9.8 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 1.3	9.3 $\pm$ 0.4
C18:0	1.10 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.2
SFAs <sup>†</sup>	14.5 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.1	13.6 $\pm$ 0.1	13.1 $\pm$ 0.1	12.4 $\pm$ 0.1	13.8 $\pm$ 0.2	14.6 $\pm$ 0.3	14.4 $\pm$ 0.1	14.8 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.1
C16: 1	12.5 $\pm$ 1.2	12.2 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 1.5	12.2 $\pm$ 0.6	12.1 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.4	11.6 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 1.9
C17:1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
C18:1 n-9	24.1 $\pm$ 1.8	25.6 $\pm$ 1.5	24.2 $\pm$ 0.8	25.6 $\pm$ 0.8	25.3 $\pm$ 0.6	23.6 $\pm$ 0.6	27.2 $\pm$ 0.6	23.3 $\pm$ 0.8	24.1 $\pm$ 1.2	26.7 $\pm$ 1.6
C20:1 n-9	2.8 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.1
C22:1 n-9	0.5 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0
MUFAs <sup>‡</sup>	41.0 $\pm$ 0.7	43.0 $\pm$ 0.5	41.5 $\pm$ 0.3	43.0 $\pm$ 0.3	43.2 $\pm$ 0.5	40.3 $\pm$ 0.2	45.2 $\pm$ 0.3	40.1 $\pm$ 0.1	40.9 $\pm$ 0.4	44.0 $\pm$ 0.1
C18:2 n-6	2.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	5.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	2.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
C18:3 n-6	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1
C20:3 n-6	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
C20:4 n-6	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
C18:3 n-3	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	4.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
C18:4 n-3	0.8 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
C20:3 n-3	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
C20:5 n-3	7.6 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5
C22:6 n-3	31.3 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	30.6 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	30.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	30.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	22.2 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	32.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	26.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	30.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	29.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	19.1 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>
PUFAs <sup>♣</sup>	44.0 $\pm$ 0.5	43.1 $\pm$ 1.0	44.3 $\pm$ 0.3	43.2 $\pm$ 0.5	43.4 $\pm$ 0.8	45.3 $\pm$ 0.3	39.0 $\pm$ 0.6	44.2 $\pm$ 0.5	42.4 $\pm$ 0.4	39.7 $\pm$ 0.7
Total lipids	191 $\pm$ 45.6	117 $\pm$ 19.6	120 $\pm$ 25.7	114 $\pm$ 63.7	144 $\pm$ 71.2	162 $\pm$ 24.5 <sup>a</sup>	161 $\pm$ 41.5 <sup>a</sup>	115 $\pm$ 31.4 <sup>ab</sup>	97 $\pm$ 65.1 <sup>ab</sup>	71 $\pm$ 39.4 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>: Includes C12:0, C15: 0, C17:0, C20:0, C22:0, and C24:0 with percentages  $< 0.5\%$ , <sup>‡</sup>: Includes C14:1 and C24:1 n-9 with percentages  $\leq 0.3\%$ , <sup>♣</sup>: Includes C20:2 with percentages  $< 0.2\%$

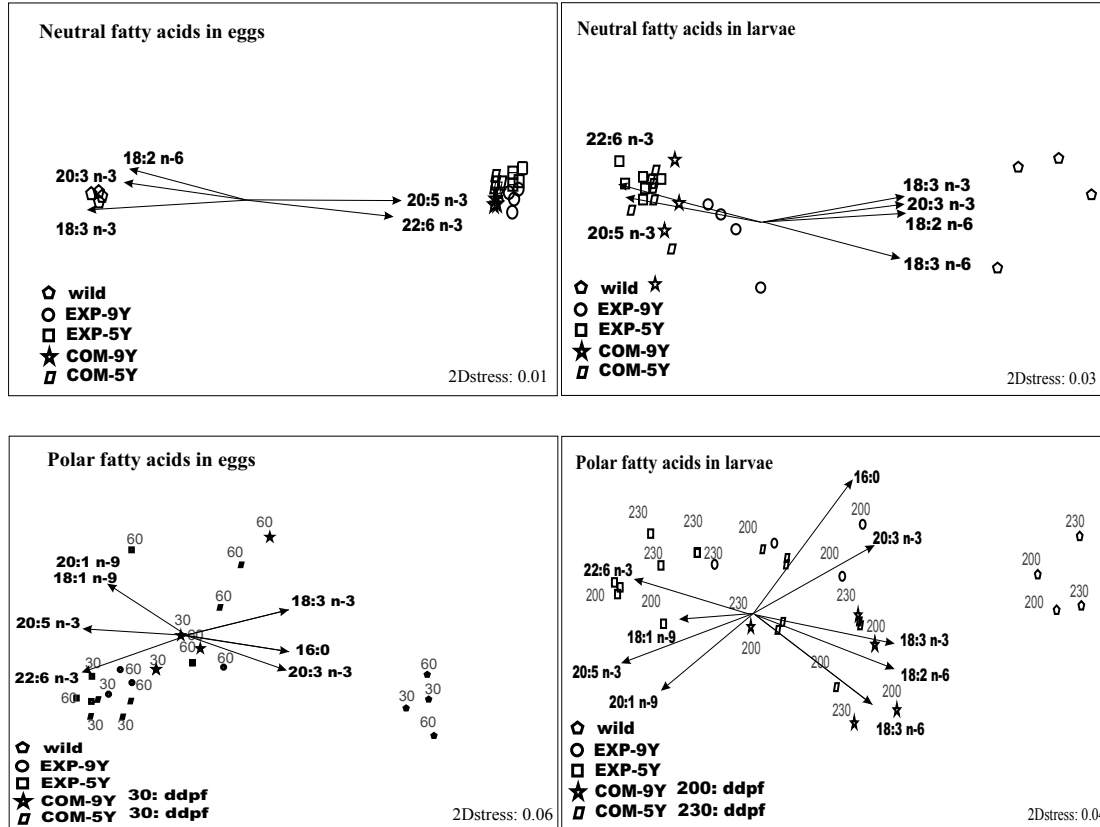


Figure 7. Non-metric multi-dimensional scaling of the Bray-Curtis similarity matrix based on the relative abundance of neutral (upper) and polar (lower) fatty acid profiles associated with eggs (left) and larvae (right). Neutral fatty acid profiles varied as a function of treatment (experimental – 9 years old [EXP-9Y], experimental – 5 years old [EXP-5Y], commercial – 9 years old [COM-9Y], commercial – 5 years old [COM-5Y], and wild [W]). Polar fatty acid profiles varied as a function of treatment and degree-days post fertilization (ddpf) (30 and 60 ddpf for eggs; 200 and 230 ddpf for larvae). The arrows represent the FA responsible for most of the variation

In the polar fraction, fatty acids varied according to the different treatments and days post fertilization (eggs:  $Pseudo-F_{\text{treatments}}(4, 13) = 12.1$ ,  $Pseudo-F_{\text{ddpf}}(1, 13) = 6.1$ ,  $p \leq$



0.006; larvae:  $Pseudo-F_{\text{treatments (4, 14)}} = 33.9$ ,  $Pseudo-F_{\text{ddpf (1, 14)}} = 3.8$ ,  $p \leq 0.04$ ). The most predominant fatty acids in this fraction were 16:0, 18:1 n-9, EPA, and DHA. In eggs and larvae, 16:0, 18:1 n-9, 20:1 n-9, 18:3 n-3, 20:3 n-3, EPA, and DHA explained most of the variation between the different treatments (Fig. 8) while DHA explained most of the variation in relation to days post fertilization (eggs:  $42.5 \pm 6.7$  and  $40.2 \pm 4.2$  at 30 and 60 ddpf, respectively; larvae:  $37.7 \pm 6.5$  and  $39.7 \pm 6.5$  at 200 and 230 ddpf, respectively). The n-MDS analysis showed a tendency similar to that observed in the neutral fraction, with eggs and larvae produced by the wild broodstock showing distinct FA profiles (Fig. 7). Leucine (LEU), lysine (LYS), valine (VAL), isoleucine (ILE), and threonine (THR) quantitatively dominated the EAA pool in eggs and larvae (Tables 8 and 9) of different treatments. Non-essential amino acids (NEAA), alanine (ALA), serine (SER), aspartic acid (ASP), and glutamic acid (GLU) were the most abundant. The statistical analysis revealed that the interaction between treatments and days post fertilization significantly affected amino acid composition in eggs ( $Pseudo-F_{(2, 14)} = 2.4$ ,  $p = 0.02$ ; Table 8) while only treatments showed a significant effect in larvae ( $Pseudo-F_{(2, 14)} = 9.4$ ,  $p = 0.001$ ; Table 9). Methionine (MET) and SER percentages were significantly lower in eggs and larvae from wild fish, and SER decreased markedly during embryogenesis in wild eggs, from 6 to 0.1% of total AA.

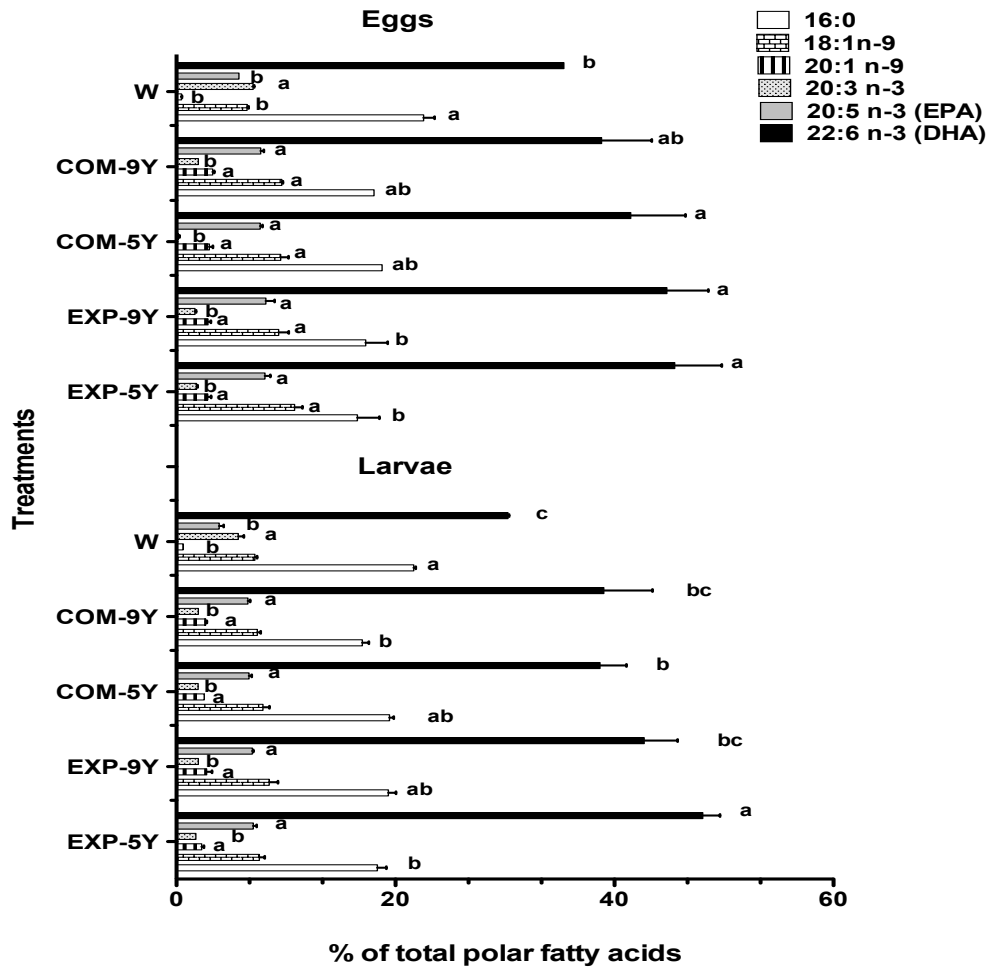


Figure 8. Composition of the most abundant fatty acids in polar lipids (% weight of total polar lipids  $\pm$  SD) in eggs and larvae. Different letters indicate statistically significant differences between treatments (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, W; see Figure 1 caption for treatment abbreviations)

Table 8. Amino acid composition (% of total amino acids) of walleye eggs at 30 and 60 degree-days post-fertilization (ddpf) for five different treatments (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, W; see Table 1 caption for treatment abbreviations). Means in a row with different letters are significantly different (treatments x ddpf:  $p < 0.05$ )

Amino acids in eggs											
	Degree days post	30 DD					60 DD				
	Treatments	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	W	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	W
		<i>Essential amino acids*</i>									
Valine, VAL	8.0 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.8 ± 0.0	8.5 ± 0.0	6.6 ± 0.7	8.0 ± 0.1	9.6 ± 0.2	9.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.6 ± 0.2	
Leucine, LEU	11.0 ± 0.1	10.9 ± 0.1	11.4 ± 0.0	10.2 ± 0.0	8.5 ± 0.7	11.4 ± 0.2	11.4 ± 0.3	9.7 ± 0.2	12.3 ± 0.2	10.6 ± 0.3	
Isoleucine, ILE	6.5 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.9 ± 0.0	7.1 ± 0.0	5.3 ± 0.3	6.6 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.6 ± 0.1	7.6 ± 0.2	
Threonine, THR	5.5 ± 0.0	7.3 ± 0.0	7.4 ± 0.0	6.2 ± 0.0	4.3 ± 0.6	5.3 ± 0.0	6.4 ± 0.1	7.6 ± 0.1	5.5 ± 0.0	5.4 ± 0.2	
Histidine, HIS	2.5 ± 0.0	1.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.0	1.7 ± 0.0	
Methionine, MET	3.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>cd</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>e</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>f</sup>	3.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>e</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>cd</sup>	2.5 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>f</sup>	
Phenylalanine, PHE	3.6 ± 0.0	3.8 ± 0.0	4.1 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.4	4.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	4.5 ± 0.0	4.7 ± 0.1	
Lysine, LYS	10.9 ± 0.0	6.5 ± 0.1	4.9 ± 0.0	5.9 ± 0.0	7.2 ± 0.7	12.5 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	9.0 ± 0.0	5.7 ± 0.1	
		<i>Non-essential amino acids<sup>†</sup></i>									
Alanine, ALA	11.9 ± 0.1	12.4 ± 0.1	14.9 ± 0.0	12.2 ± 0.1	11.9 ± 1.5	11.7 ± 0.2	18.9 ± 0.7	14.3 ± 0.4	12.7 ± 0.2	14.9 ± 0.5	
Glycine, GLY	4.9 ± 0.0	6.1 ± 0.0	6.5 ± 0.0	5.1 ± 0.0	5.7 ± 0.0	4.5 ± 0.0	8.3 ± 0.3	6.7 ± 0.2	4.5 ± 0.0	6.1 ± 0.2	
Serine, SER	6.6 ± 0.0 <sup>de</sup>	7.8 ± 0.0 <sup>bc</sup>	8.7 ± 0.0 <sup>ab</sup>	9.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.9 <sup>e</sup>	6.6 ± 0.1 <sup>de</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>f</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>bc</sup>	7.2 ± 0.0 <sup>cd</sup>	0.1 ± 0.2 <sup>g</sup>	
Proline, PRO	4.8 ± 0.0	6.9 ± 0.1	8.4 ± 0.0	5.5 ± 0.0	4.4 ± 0.3	5.7 ± 0.0	10.0 ± 0.3	7.5 ± 0.0	5.6 ± 0.0	5.5 ± 0.0	
Aspartic acid, ASP	7.6 ± 0.0	7.2 ± 0.0	5.9 ± 0.0	8.5 ± 0.0	10.2 ± 2.6	6.3 ± 0.0	5.2 ± 0.0	8.7 ± 0.0	6.9 ± 0.0	9.7 ± 0.0	
Glutamic acid, GLU	9.9 ± 0.0	8.2 ± 0.0	7.6 ± 0.0	9.4 ± 0.0	12.5 ± 0.7	7.5 ± 0.0	2.6 ± 0.0	7.9 ± 0.0	7.6 ± 0.0	13.4 ± 0.1	
Tyrosine, TYR	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.6 ± 0.0	3.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.0	3.4 ± 0.0	2.9 ± 0.7	
Σessential (mg.g <sup>-1</sup> )	19.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	9.5 ± 1.4 <sup>ab</sup>	13.9 ± 1.8 <sup>ab</sup>	7.9 ± 2.0 <sup>b</sup>	9.9 ± 3.2 <sup>ab</sup>	12.7 ± 4.0 <sup>ab</sup>	19.2 ± 1.0 <sup>ab</sup>	12.9 ± 5.6 <sup>ab</sup>	7.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	17.4 ± 5.0 <sup>ab</sup>	
Total protein (mg.g <sup>-1</sup> )	35.0 ± 2.4 <sup>ab</sup>	18.9 ± 3.4 <sup>ab</sup>	27.0 ± 3.7 <sup>ab</sup>	16.6 ± 4.1 <sup>ab</sup>	22.4 ± 6.1 <sup>ab</sup>	23.4 ± 5.2 <sup>ab</sup>	38.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	27.5 ± 12.0 <sup>ab</sup>	14.8 ± 2.9 <sup>b</sup>	37.2 ± 10.0 <sup>ab</sup>	

Amino acids whose percentages were < 1% were not listed but included when calculating total protein and essential

\*: Includes tryptophan (TRP)

†: Includes glutamine (GLN), allo-isoleucine (AILE), asparagine (ASN), ornithine (ORN), hydroxylysine, (HLY), aminoisobutyric acid (BAIB), glycine-proline (GPR), α-amino adipic acid (AAA), α-aminopimelic acid (APA), proline-hydroxyproline (PHP), amino-n-butyric acid (ABA), thioproline (TPR), hydroxyproline (HYP), cystathionine (CTH), cystine (C-C)

Table 9. Amino acid composition (% of total amino acids) of walleye larvae for five different treatments (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, W; see Table 1 caption for treatment abbreviations). Means in a row with different letters are significantly different (ANOVA:  $p < 0.05$ )

<b>Amino acids in larvae</b>					
<b>Treatments</b>	EXP-5Y	EXP-9Y	COM-5Y	COM-9Y	W
<i>Essential amino acids*</i>					
Valine, VAL	7.6 ± 0.2	7.7 ± 0.4	7.5 ± 0.2	7.4 ± 0.4	7.5 ± 0.6
Leucine, LEU	11.3 ± 1.4	10.1 ± 0.6	10.5 ± 1.0	8.8 ± 0.2	9.7 ± 0.6
Isoleucine, ILE	5.8 ± 0.0	5.7 ± 0.3	5.7 ± 0.0	6.2 ± 0.4	5.7 ± 0.5
Threonine, THR	5.5 ± 0.3	7.1 ± 0.7	5.9 ± 0.4	7.9 ± 0.3	5.2 ± 0.4
Histidine, HIS	1.4 ± 1.1	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.6 ± 0.4	2.3 ± 0.2
Methionine, MET	2.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.4 <sup>c</sup>
Phenylalanine, PHE	3.8 ± 0.6	3.3 ± 0.1	3.9 ± 0.3	3.0 ± 0.0	4.8 ± 0.2
Lysine, LYS	7.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2	8.0 ± 1.8	4.7 ± 0.2	6.2 ± 0.2
<i>Non essential amino acids<sup>+</sup></i>					
Alanine, ALA	16.3 ± 3.1	10.6 ± 1.3	11.9 ± 1.2	10.8 ± 1.0	11.4 ± 1.0
Glycine, GLY	5.9 ± 1.1	8.0 ± 0.6	5.5 ± 1.1	5.7 ± 0.8	8.4 ± 0.8
Serine, SER	5.4 ± 1.8 <sup>c</sup>	7.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	8.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>d</sup>
Proline, PRO	5.2 ± 0.6	5.5 ± 0.5	5.5 ± 0.3	5.2 ± 0.1	5.4 ± 0.8
Aspartic acid, ASP	8.5 ± 1.7	8.8 ± 1.5	8.3 ± 0.8	8.9 ± 0.8	10.4 ± 0.9
Glutamic acid, GLU	8.1 ± 4.1 <sup>b</sup>	9.7 ± 2.1 <sup>b</sup>	9.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	8.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	13.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
Tyrosine, TYR	1.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>
Cystathionine, CTH	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.5	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.5	1.4 ± 1.8
Cystine, C-C	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.0	1.4 ± 0.6	0.8 ± 0.1
∑essential (mg.g <sup>-1</sup> )	14.2 ± 0.0	12.2 ± 12.1	12.4 ± 0.3	3.8 ± 0.6	15.7 ± 7.4
Total protein (mg.g <sup>-1</sup> )	24.5 ± 2.4	40.3 ± 3.2	23.8 ± 1.1	20.8 ± 9.4	34.1 ± 15.5

Amino acids whose percentages were < 1% were not listed but are included when calculating total protein and essential, acidic, basic, and aromatic amino acids.

\*: Includes Tryptophan (TRP)

<sup>+</sup>: Includes asparagine (ASN), ornithine (ORN), hydroxylysine, (HLY), aminoisobutyric acid (BAIB), glycine-proline (GPR),  $\alpha$ -amino adipic acid (AAA),  $\alpha$ -aminopimelic acid (APA), proline-hydroxyproline (PHP), amino-n-butyric acid (ABA), thioproline (TPR), hydroxyproline (HYP), allo-isoleucine (AILE), glutamine (GLN)

All-trans-ROH (vitamin A<sub>1</sub>) was similar in eggs from wild and 5-year-old broodstock at 30 ddpf. However, it was ten times lower in eggs from the 9-year-old broodstock ( $F_{(4, 7)} = 10.3$ ,  $p = 0.005$ ; Fig. 9). De-hydro-ROH (vitamin A<sub>2</sub>) was highest in eggs from wild fish ( $F_{(4, 7)} = 17.2$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 9). Positive correlations were found between hatching success and vitamins A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> (VA<sub>1</sub>:  $F_{(1, 10)} = 6.8$ ,  $r^2 = 0.41$ ,  $p = 0.02$ ; VA<sub>2</sub>:  $F_{(1, 10)} = 13.1$ ,  $r^2 = 0.57$ ,  $p = 0.004$ ; Fig. 10), but no correlation was found between fertilization success and vitamins A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> (VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub>:  $r^2 \leq 0.0005$ ,  $p \geq 0.94$ ).

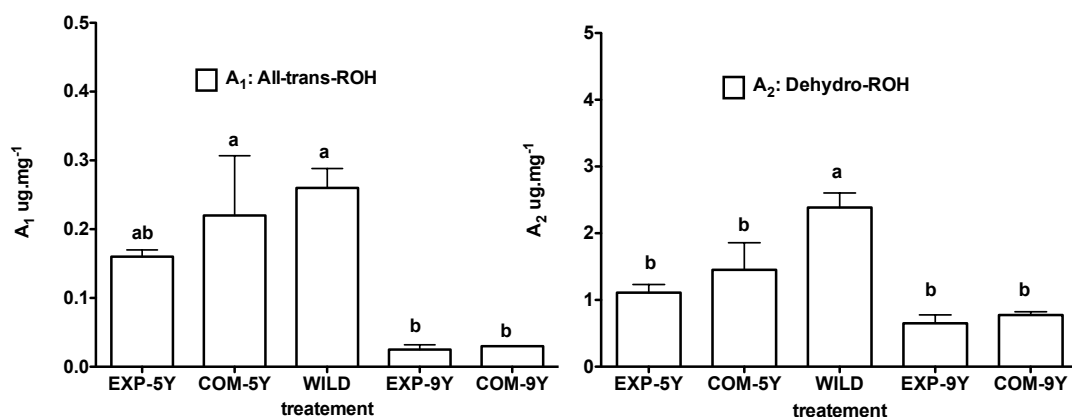


Figure 9. Composition of vitamin A (Vitamin A<sub>1</sub>: all-trans-ROH [left] and vitamin A<sub>2</sub>: dehydro-ROH [right]) in eggs at 30 degree-days post fertilization (mean  $\pm$  SD). Different letters indicate statistically significant differences among treatments (EXP-9Y, EXP-5Y, COM-9Y, COM-5Y, W; see Figure 1 caption for treatment abbreviations)

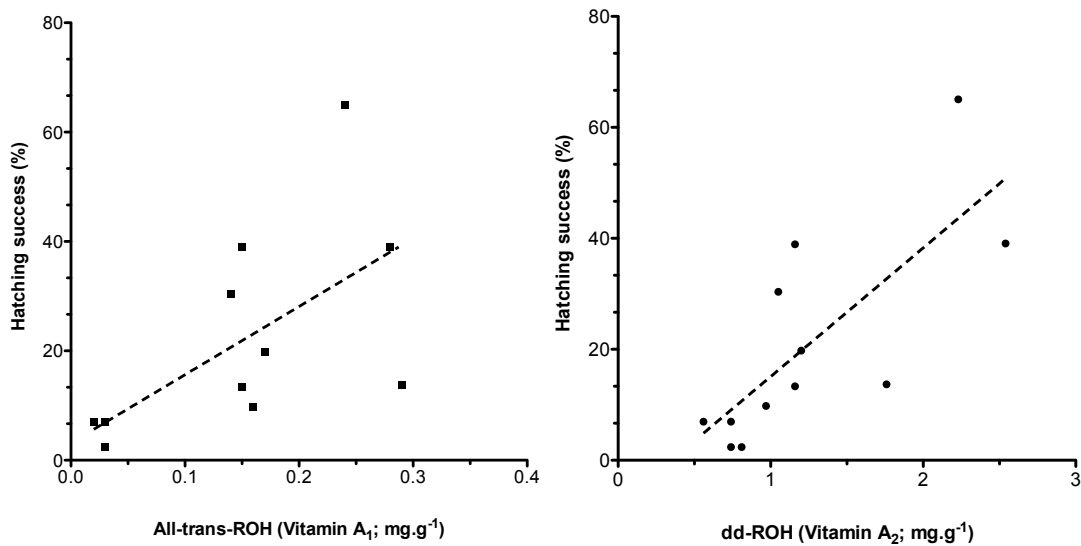


Figure 10. Content of vitamin A<sub>1</sub> (all-trans-ROH; left) and vitamin A<sub>2</sub> (dehydro-ROH; right) in eggs in relation to hatching success

## 2.7 DISCUSSION

Eggs from wild broodstock showed the best hatching success. The use of experimental pellets enriched with krill and mackerel oils and astaxanthin did not show any increase in egg performance. Eggs and larvae from the EXP and COM treatments retained the highest percentage of DHA (up to 31%). However, wild eggs and larvae had highest levels of linoleic (18:2 n-6) and linolenic (18:3 n-3) fatty acids. The results suggest the importance of the amino acids LYS, LEU, MET, and SER for egg and larva performance. Vitamin A (VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub>) contents were positively correlated with hatching success and were highest in wild eggs.

### 2.7.1 Reproductive characteristics

Weight gain was significantly higher in 5-year-old fish compared to 9-year-old fish. This might be the result of genetic predisposition (maximum size achieved for older fish). For instance, it has been observed in whitefish (*Coregonus lavaretus*) that younger broodstock (1 and 2 years old) consume food throughout the day while older individuals (3 and 4 years old) have decidedly shorter feeding periods (Szczepkowski et al., 2010). Eggs from wild fish had the best hatching success and the highest larval length at hatch and before first feeding. Hatching success from the 5-year-old broodstock was either better than or similar to older broodstock in both the COM and EXP groups. Previous work showed that female gilthead seabream (*Sparus aurata*) at maturity (3 years) were more fertile and their eggs had better hatching success than older females (Jerez et al., 2012). Similarly, the highest hatching success (96%) and larval length at hatch and at initiation of active feeding were found in offspring from younger and wild female common carp (*Cyprinus carpio*) (Aliniya et al., 2013). We did not find any significant difference in fertilization percentages among treatments, suggesting that fertilization was not affected by the tested dietary treatments or the age of broodstock. Similar results were reported in the African moony fish (*Monodactylus sebae*), in which increasing DHA level in diets did not show any significant differences in fertilization or survival percentages between floating and sinking eggs, demonstrating that the tested diets had no obvious effect on these descriptors (Ohs et al., 2013).

### 2.7.2 Lipids and fatty acids

Our study showed that total lipids in eggs were independent of the dietary treatment. Similar results were also observed in sweetlips fish (*Plectorhynchus cinctus*) (Li et al., 2005), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Navas et al., 1997), and in several other

species in which egg total lipids were not affected by broodstock diet (Cejas et al., 2003; Navas et al., 1997; Salze et al., 2005). Nevertheless, many other species with contrasting diets resulted in egg total lipids that were affected by diet (reviewed in Rainuzzo et al. (1997). For the larvae, total lipid decreased significantly from 200 to 230 ddpf, suggesting that lipids were likely used as a source of metabolic energy. After hatching and prior to first feeding, lipid catabolism has been demonstrated in different species (Rainuzzo et al., 1992; Rainuzzo et al., 1997).

Our results showed that high levels of dietary DHA were mainly reflected in the neutral fatty acid profiles of eggs and larvae. For instance, eggs and larvae from the EXP and COM treatments, which were fed mackerel containing 30% DHA, retained the highest percentages of DHA (up to 31% of total neutral FA) when compared to wild individuals (22 and 19% of total neutral FA in eggs and larvae, respectively). The lower hatching success in eggs from broodstock fed both dietary treatments (mackerel + CP or EP) could be linked to the high levels of highly unsaturated fatty acids (HUFA) in eggs and larvae. Earlier studies have shown that excessive levels of dietary HUFA, i.e., DHA, EPA, and AA, can negatively affect the quality of eggs and larvae, survival rate, and lower fecundity in brill (*Scophthalmus rhombus*) (Hachero-Cruzado et al., 2012), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Santiago and Reyes, 1993), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Furuita et al., 2000), sweetlips (Li et al., 2005), Japanese eel (*Anguilla japonica*) (Furuita et al., 2007), and gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Seifi Berenjestanaki et al., 2014). For example, fecundity and hatching success decreased when gourami were fed high levels of n-3 HUFA, and an increase in dietary n-3 HUFA increased total n-3 PUFA concentrations in eggs (Seifi Berenjestanaki et al., 2014). A decrease in hatchability was observed in Nile tilapia and striped trumpeters (*Latris lineata*) fed diets with high levels of DHA and EPA (Morehead et al., 2001; Ng and Wang, 2011). However, the eggs and larvae of wild fish in our study had significantly higher levels of 18:2 n-6, 18:3 n-3, and 20:3 n-3. This suggests that the fatty acid profiles in eggs and larvae may be due to the fatty acid content in the diet or be related to a specific requirement in fish related to physiological adaptations to their environment.



The concentration of n-6 PUFA in fish tissue is generally low, although higher levels are reported in freshwater fish species. This is perhaps not surprising if one considers that the diet of freshwater fish contains a component derived from terrestrial sources and is consequently rich in n-6 series fatty acids. Freshwater fish generally have higher tissue concentrations of the shorter-chain PUFA n-3 and n-6 series (Gonçalves et al., 2014). The fatty acid requirements of freshwater fish have been classified into three types: the rainbow trout type, the tilapia type, and the carp type (Teshima, 1985). Rainbow trout require n-3 PUFA like 18:3 n-3, tilapia require n-6 PUFA like 18:2 n-6, and carp require both n-3 and n-6 PUFA. In our study, the high levels of 18:3 n-3 and 18:2 n-6 in wild walleye eggs and larvae suggest that walleye are likely a “carp type.” The results showed that the levels of 18:2 n-6 and 18:3 n-3 in both types of pellets were higher than in mackerel. However, this was not reflected in the FA profiles of eggs and larvae of domesticated broodstock. It most likely suggests either that broodstock did not eat enough pellets or that the amount digested was not large enough to be detected in egg and larva FA profiles.

Our results showed that polar FA profiles differed according to treatment and degree-days post fertilization. These results are in contrast with previous studies that showed rather a conservative characteristic of the polar fraction (Araújo et al., 2012; Czesny and Dabrowski, 1998; Furuita et al., 2002; Mejri et al., 2014). For instance, the polar fraction of walleye and Japanese flounder egg lipids, in particular DHA, EPA, and AA, was noticeably less affected by the broodstock's nutritional status (Czesny and Dabrowski, 1998). In the polar lipid fraction, we observed high percentages of n-9 MUFA in groups fed the tested dietary treatments. However, the source of these FA (mackerel or pellets or both) is unclear. These monoenoic FA are a characteristic feature of farmed fish that are fed diets rich in oils derived from North Atlantic fish (mackerel in this study) (Sargent et al., 1999) or pellets enriched with these FA (the EXP and COM pellets both contained high levels of MUFA). The DHA variations in the polar lipid fraction during embryogenesis (from 30 to 60 ddpf) and larval development (from 200 to 230 ddpf) suggest that polar lipids seem to have an energetic role and not to be only involved in the structural function of cell membranes (Wiegand et al., 2004). Moreover, the results most

likely suggest that levels of  $\approx 25\%$  DHA and  $> 5\%$  of 18:2 n-6 and 18:3 n-3 of total neutral FA could be possible minimal levels for egg and larva performance.

### 2.7.3 Proteins and amino acids

Our results suggest the importance of LEU, LYS, VAL, ILE, ALA, ASP, SER, and GLU, since they were the most prevalent amino acids measured in walleye eggs and larvae, with the highest values of LYS and LEU in EAA fraction. Our results also suggest possible minimal levels of certain amino acids such as methionine and serine ( $> 0.1\%$  and  $> 6\%$  of total AAs, respectively). Methionine levels in eggs and larvae of wild fish (0.1 and 0.3% of total AAs, respectively) were 20 times lower than the levels detected in eggs and larvae from the EXP and COM treatments, and yet hatching success was the highest in eggs from wild broodstock. This indicates that higher levels of this essential amino acid may not be necessary for the production of walleye eggs, and that its high percentages in domesticated eggs and larvae are probably due to its high presence in the diet. Some studies have shown that an increased dietary MET was not harmful for rainbow trout (Cowey et al., 1992). However, it was expected that the activity of some enzymes would be altered. In rats, a continuous high intake of MET leads to marked increases in the activities of MAT and CS, two key regulatory sites in the transmethylation–transulfuration pathway (Finkelstein, 1990). According to Cowey et al. (1992), it may be inferred that any regulatory control of methionine catabolism in rainbow trout is much more limited than is the case in rats. On the other hand, MET has been shown to have growth-promoting effects in some species (Finn and Fyhn, 2010). Methionine is one of the most widely used AAs due to its general availability and importance as one of most limiting EAA in plant protein ingredients, such as soy- and corn-based meals (NRC, 2011).

Serine was significantly higher in eggs and larvae from fish fed tested diets and decreased drastically during embryogenesis in the wild group, suggesting that it was used as an energy source. An important role for SER has been suggested during walleye

ontogeny (Mejri et al., 2014). Indeed, higher SER content was associated with better egg quality (Akiyama et al., 1997).

We found that LEU and LYS levels were important in eggs and larvae. Other studies showed that a high level of LEU in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs was an indicator of good egg quality (Lochmann et al., 2007; Sink et al., 2010). High LEU levels have been identified as an indicator that broodstock diets provide sufficient amounts of amino acids needed to synthesize vitellogenin, the primary precursor of yolk proteins in teleosts (Choo et al., 1991; Lochmann et al., 2007; Sink et al., 2010). In our study, LYS percentages in eggs and larvae were around 6% of total AAs but were not significantly different between treatments. A dietary LYS requirement has been identified for domesticated fish, and it ranges from 1.2 to 6.2% of the diet (Ahmed and Khan, 2004; Akiyama et al., 1997; Borlongan and Benitez, 1990). Appropriate dietary LYS levels facilitate the use of other EAA because LYS reduces the oxidation rate of other amino acids (Nunes et al., 2014).

#### **2.7.4 Vitamin A**

Our results showed that VA<sub>2</sub> levels were 10 times higher than VA<sub>1</sub> levels in walleye eggs and larvae; this difference has already been observed in other freshwater species (Gesto et al., 2012; La Frano and Burri, 2014; Palace and Werner, 2006). Moreover, VA<sub>2</sub> was significantly higher in eggs from wild broodstock and these eggs had better quality indicators than those from farmed fish. This suggests that VA<sub>2</sub> could have a specific role in walleye egg development, though it is still unclear whether freshwater fish are able to use VA<sub>2</sub> more efficiently during egg development. Similar results were found in Japanese flounder eggs, where VA<sub>2</sub> content was significantly higher in wild eggs (Wang et al., 2010). In a study conducted by La Frano and Burri (2014), the diet of North American farm-raised freshwater fish was supplemented with a combined high and low concentrations of VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub>, respectively. The results showed that VA<sub>2</sub> concentrations

were higher than VA<sub>1</sub> in fish liver, suggesting that VA<sub>2</sub> is preferentially accumulated. Previous studies showed similar results, demonstrating that VA<sub>2</sub> accumulates preferentially in the liver of most freshwater fish (Doyon et al., 1998; Gesto et al., 2012; La Frano and Burri, 2014; Roos et al., 2002).

We found no clear relationship between fertilization percentages and VA (VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub>), indicating that fertilization percentages seem independent of the VA concentration in the eggs. However, a positive correlation was found between hatching success and VA (VA<sub>1</sub> and VA<sub>2</sub>). A positive correlation was revealed between egg hatching and survival percentages and vitamins A and E in Japanese eel eggs (Furuita et al., 2009). Indeed, in Furuita et al. (2009) study, VA in eggs with high hatching success (80%) was higher than levels in eggs with low hatching success. A similar relationship has also been shown in some crustaceans. For instance, fecundity and hatching percentages in Chinese white shrimp (*Penaeus chinensis*) were positively correlated with egg VA content (Mengqing et al., 2004). Levels of carotenoids, which serve as vitamin A precursors, and hatching success were measured in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*); the results indicated that eggs with lower carotenoids content had lower hatching percentages and that this level was critical to egg performance, e.g., Palace and Werner (2006). Wang et al. (2010) showed that the lower VA content in eggs from farmed fish compared to wild ones may lower larval quality in Japanese flounder; the authors suggested that this could be diminished by supplementation of adequate proportions of VA in broodstock diet. Vitamin A plays an important role as a physiological regulator of cell growth and differentiation. The hatching success and survival of 3-day-old larvae of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) improved with VA supplementation while a deficiency in the broodstock diet slightly decreased relative fecundity (Santiago and Gonzal, 2000). Incorrect dietary levels of VA could be teratogenic in some fish species at early life stages (Herrmann, 1995; Hilton, 1983). For example, deficiencies or excess levels of VA in Japanese eel eggs tended to reduce hatching and survival success (Furuita et al., 2009). Decreased hatching percentages have been obtained in zebrafish (*Danio rerio*) embryos incubated with high concentration of retinoic acid (Herrmann, 1995). Considering all the above evidence, minimal amounts of

$\geq 0.2$  and  $2.0 \text{ mg.g}^{-1}$  for  $\text{VA}_1$  and  $\text{VA}_2$ , respectively, could be suggested for fish eggs of walleye.

## 2.8 CONCLUSION

Our results have added to the knowledge on the nutritional needs of walleye broodstock. To improve walleye production, more work has to be done to develop a good broodstock diet since the use of mackerel as food is far from optimal. Dry pellets seem to be a better alternative for broodstock nutrition, but further work has to be done to determine the specific requirements for each nutrient. We determined some of the minimal nutrient requirements for eggs, which probably need at least 5% 18:2 n-6 and 18:3 n-3 and  $\approx 25\%$  DHA in the total neutral FA fraction to promote better reproductive performance. Moreover, the results demonstrated the importance of methionine and serine during embryogenesis, suggesting minimal levels of 0.1 and 6%, respectively, of total amino acids. Vitamin A ( $\text{VA}_1$  and  $\text{VA}_2$ ) was positively correlated with hatching success, revealing its important role in the early life stages of walleye and the necessity of its adequate incorporation into the diet of broodstock. Amounts  $\geq 0.2$  and  $2.0 \text{ mg.g}^{-1}$  for  $\text{VA}_1$  and  $\text{VA}_2$ , respectively, could be suggested.

## Acknowledgments

This study was financially supported by the Société de Recherche et de Développement en Aquaculture Continentale Inc. (SORDAC), the Station Piscicole Trois-Lacs industry partner (Wotton, Quebec, Canada), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQNT). We are grateful to M. Blanchet and K. Grenier for their extensive

help during fieldwork and thank Anne-Karin Syversen for her assistance in the vitamin analysis.

**REFERENCES**

- Abi-Ayad, S.M.E.A., Kestemont, P., Mélard, C., 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 233-243.
- Afzal Khan, M., Jafri, A.K., Chadha, N.K., 2005. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita*. *Aquacut. Nutr.* 11, 11-17.
- Ahmed, I., Khan, M.A., 2004. Dietary lysine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Aquaculture* 235, 499-511.
- Akiyama, T., Oohara, I., Yamamoto, T., 1997. Comparison of essential amino acid requirements with A/E Ratio among fish species (review paper). *Fish. Sci.* 63, 963-970.
- Aliniya, M., Khara, H., Noveiri, S.B., Dadras, H., 2013. Influence of age of common carp (*Cyprinus carpio*) broodstock on reproductive traits and fertilization. *Turkish. J. Fish. Aquat. Sci* 13, 19-25.
- Araújo, B., Honji, R., De Mello, P., Moreira, R., 2012. The influence of captive breeding on the fatty acid profiles of *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) eggs and larvae. *Aquacult. Int* 20, 1161-1181.
- Borlongan, I.G., Benitez, L.V., 1990. Quantitative lysine requirement of milkfish (*Chanos chanos*) juveniles. *Aquaculture* 87, 341-347.
- Callan, C.K., Laidley, C.W., Forster, I.P., Liu, K.M., Kling, L.J., Place, A.R., 2012. Examination of broodstock diet effects on egg production and egg quality in flame angelfish (*Centropyge loriculus*). *Aquacult. Res.* 43, 696-705.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Villamandos, J.E., Badía, P., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2003. Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 216, 299-313.

- CEN, 1999. Foodstuffs-determination of vitamin A by high performance liquid chromatography: Part 1. Measurement of *all-trans* retinol and *13-cis* retinol. Comité Européen de Normalisation prEN 12823-1 pp. 1-13.
- Choo, P.S., Smith, T.K., Cho, C.Y., Ferguson, H.W., 1991. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. *J. Nutr.* 121, 1932-1939.
- Clarke, M., Parrish, C.C., Penney, R.W., 2010. Free amino acids as an indicator of egg viability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Bull. Aquacul. Assoc. Canada.* 108, 6-9.
- Coldebella, I.J., Emanuelli, T., Veiverberg, C.A., Pretto, A., Rossato, S., Ferreira, D., Barcellos, L.J.G., Neto, J.R., 2013. Effect of different dietary lipid levels on the reproduction of *Rhamdia quelen*. *Aquacult. Nutr.* 19, 751-764.
- Cowey, C.B., Cho, C.Y., Sivak, J.G., Weerheim, J.A., Stuart, D.D., 1992. Methionine intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), relationship to cataract formation and the metabolism of methionine. *J. Nutr.* 122, 1154-1163.
- Czesny, S., Dabrowski, K., 1998. The effect of egg fatty acid concentrations on embryo viability in wild and domesticated walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquat. Living Resour.* 11, 371-378.
- Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R., Spear, P.A., 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: comparison of two lake sturgeon populations. *J. Fish. Biol.* 53, 973-986.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture* 279, 70-76.
- Finkelstein, J.D., 1990. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem* 1, 228-237.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquacult. Res.* 41, 684-716.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biol. Chem.* 226, 497-509.



- Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Brèque, J., Zambonino-Infante, J.L., Kaushik, S.J., 2010. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 303, 40-49.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M., Takeuchi, T., 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 187, 387-398.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 210, 323-333.
- Furuita, H., Hori, K., Suzuki, S., Sugita, T., Yamamoto, T., 2007. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 267, 55-61.
- Furuita, H., Unuma, T., Nomura, K., Tanaka, H., Sugita, T., Yamamoto, T., 2009. Vitamin contents of eggs that produce larvae showing a high survival rate in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquacult. Res.* 40, 1270-1278.
- Furuita, H., Ohta, H., Unuma, T., Tanaka, H., Kagawa, H., Suzuki, N., Yamamoto, T., 2003. Biochemical composition of eggs in relation to egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem* 29, 37-46.
- Gendron, L., Tremblay, R., Belvin, S., Génard, B., Motnikar, S., Côté, J., 2013. Condition, survival and growth in situ of hatchery-reared stage IV lobster (*Homarus americanus*) fed *Artemia* and lipid-rich wild zooplankton. *Aquaculture* 416, 380-389.
- Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 161, 69-78.
- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquaculture* 1, 71-124.

- Gonçalves, L.U., Parisi, G., Bonelli, A., Sussel, F.R., Viegas, E.M.M., 2014. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) broodstock. *Aquacult. Res.* 45, 195-203.
- Gross, J., Budowski, P., 1966. Conversion of carotenoids into vitamins A(1) and A(2) in two species of freshwater fish. *Biochem. J.* 101, 747-754.
- Hachero-Cruzado, I., Olmo, P., Sánchez, B., Herrera, M., Domingues, P., 2012. Effects of two diets on lipid composition and reproductive performance of brill (*Scophthalmus rhombus*) eggs. *Aquacult. Res.* 43, 1439-1450.
- Hartman, G.F., 2009. A biological synopsis of walleye (*Sander vitreus*). *Can. Manusc. Rep. Fish. Aquat. Sci* 2888, 48.
- Herrmann, K., 1995. Teratogenic effects of retinoic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*) as assessed by a novel scoring system. *Toxicol. In Vitro* 9, 267- 271.
- Hilton, J.W., 1983. Hypervitaminosis A in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Toxicity signs and maximum tolerable level. *J. Nutr.* 113, 1737-1745.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Jerez, S., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2012. Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season. *Aquaculture* 350, 54-62.
- La Frano, M.R., Burri, B.J., 2014. Analysis of retinol, 3-hydroxyretinol and 3,4-didehydroretinol in North American farm-raised freshwater fish liver, muscle and feed. *Aquacult. Nutr.* 20, 722-730.
- Lepage, G., Roy, C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391-1396.

- Li, Y.Y., Chen, W.Z., Sun, Z.W., Chen, J.H., Wu, K.G., 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture* 245, 263-272.
- Lochmann, S.E., Goodwin, K.J., Lochmann, R.T., Stone, N.M., Clemment, T., 2007. Volume and lipid, fatty acid, and amino acid composition of golden shiner eggs during a spawning season. *North Am. J. Aquacult.* 69, 116-126.
- Malison, J.A., Held, J.A., 1996. Reproductive biology and spawning. In: Summerfelt, R.C. (Ed.), *Walleye culture manual*. NCRAC culture series 101, Iowa, Ames, pp. 11-18.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.
- Mejri, S., Audet, C., Vandenberg, G.W., Parrish, C.C., Tremblay, R., 2014. Biochemical egg quality in a captive walleye (*Sander vitreus*) broodstock population relative to ovulation timing following hormonal treatment. *Aquaculture* 431, 99-106.
- Mengqing, L., Wenjuan, J., Qing, C., Jialin, W., 2004. The effect of vitamin A supplementation in broodstock feed on reproductive performance and larval quality in *Penaeus chinensis*. *Aquacult. Nutr.* 10, 295-300.
- Moran, D., Gara, B., Wells, R.M.G., 2007. Energetics and metabolism of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi Valenciennes*) during embryogenesis. *Aquaculture* 265, 359-369.
- Morehead, D.T., Hart, P.R., Dunstan, G.A., Brown, M., Pankhurst, N.W., 2001. Differences in egg quality between wild striped trumpeter (*Latris lineata*) and captive striped trumpeter that were fed different diets. *Aquaculture* 192, 39-53.
- Moren, M., Næss, T., Hamre, K., 2002. Conversion of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 71-80.
- Morton, R.A., Creed, R.H., 1939. The conversion of carotene to vitamin A(2) by some fresh-water fishes. *Biochem. J.* 33, 318-324.

- Navas, J.M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B.M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J.G., Ramos, J., 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.* 51, 760-773.
- Ng, W.K., Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* 314, 122-131.
- NIFES, 2006. Nutrients, seafood data, Bergen, Norway
- Nöll, G.N., 1996. High-performance liquid chromatographic analysis of retinal and retinol isomers. *J. Chromatogr. A* 721, 247-259.
- NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC.
- Nunes, A.J.P., Sá, M.V.C., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., 2014. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture* 431, 20-27.
- Ohs, C.L., Dimaggio, M.A., Grabe, S.W., Broach, J.S., Watson, C.A., Breen, N.E., Barrows, F.T., 2013. Effects of increasing docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) in brood diets of *Monodactylus sebae* on fecundity, egg and larval quality, and egg fatty acid composition. *North Am. J. Aquacult.* 75, 285-294.
- Palace, V.P., Werner, J., 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: A review. *Sci. Mar.* 70, 41-57.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer Verlag, New York, pp. 4-20.
- Quintero, H.E., Durland, E., Allen Davis, D., Dunham, R., 2011. Effect of lipid supplementation on reproductive performance of female channel catfish, *Ictalurus*

- punctatus*, induced and strip-spawned for hybridization. *Aquacult. Nutr.* 17, 117-129.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Røgenes, L., 1992. Comparative study on the fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 103, 21-26.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas, G., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: A review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.
- Roos, N., Leth, T., Jakobsen, J., Thilsted, S.H., 2002. High vitamin A content in some small indigenous fish species in Bangladesh: Perspectives for food-based strategies to reduce vitamin A deficiency. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53, 425-437.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021-1054.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquacult. Res.* 36, 1488-1499.
- Santiago, C.B., Reyes, O.S., 1993. Effects of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* broodstock. *J. Appl. Ichthyol.* 9, 33-40.
- Santiago, C.B., Gonzal, A.C., 2000. Effect of prepared diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *J. Appl. Ichthyol.* 16, 8-13.

- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Seifi Berenjestanaki, S., Esmaeili Fereidouni, A., Ouraji, H., Jani Khalili, K., 2014. Influence of dietary lipid sources on growth, reproductive performance and fatty acid compositions of muscle and egg in three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*). *Aquacult. Nutr.* 20, 494-504.
- Sink, T.D., Lochmann, R.T., Pohlenz, C., Buentello, A., Gatlin, D., 2010. Effects of dietary protein source and protein-lipid source interaction on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg production and quality, and fry hatching percentage and performance. *Aquaculture* 298, 251-259.
- Summerfelt, S.T., Summerfelt, R.C., 1996. Aquaculture of walleye as a food fish. In: Summerfelt, R.C. (Ed.), *Walleye culture manual*. North Central Regional Aquaculture Center Publications Office, Iowa State University, Ames, pp. 215-230.
- Szczepkowski, M., Szczepkowska, B., Krzywosz, T., Wunderlich, K., Stabiński, R., 2010. Growth rate and reproduction of a broodstock of European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) from Lake Gaładuś under controlled rearing conditions. *Arch. Pol. Fish.* 18, 3-11.
- Teshima, S., 1985. Lipids. In: Yone, Y.E. (Ed.), *Fish nutrition and diets*. Koseisha Koseikaku, Tokyo, pp. 20-30.
- Torstensen, B., Lie, Ø., Frøyland, L., 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)-Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35, 653-664.
- Wang, J.Y., Li, B.S., Ma, J.J., Liu, X.D., Song, Z.D., Miao, S.Y., Li, P.Y., Wang, S.X., Huang, B.S., Zhang, L.M., 2010. A comparison study of vitamin A, C and E in wild and farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish. Sci. China.* 17, 1250-1256.
- Wiegand, M.D., Johnston, T.A., Martin, J., Leggett, W.C., 2004. Variation in neutral and polar lipid compositions of ova in ten reproductively isolated populations of walleye (*Sander vitreus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 110-121

# LE REMODELAGE DES ACIDES GRAS DURANT L'EMBRYOGENÈSE CHEZ LE FLÉTAN DU GROENLAND (*REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES*) EN LIEN AVEC L'HYPOXIE

## 3.1 RÉSUMÉ

Les œufs du flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*) se trouvent dans un environnement hypoxique durant leur développement, au niveau des eaux profondes de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent. Le but de cette étude était de déterminer s'il existe un remodelage potentiel des acides gras (AGs) durant l'embryogenèse chez les œufs exposés à différents niveaux d'oxygène dissous (OD). Les œufs fécondés ont été exposés à quatre niveaux d'OD : hypoxie sévère (10 et 20% sat [pourcentage de saturation]), hypoxie modérée (35% sat) et normoxie (100%sat). Aucun remodelage des AGs n'a été observé chez les œufs soumis à ces différents niveaux d'OD. Cependant, la composition des AGs était variable selon le succès d'éclosion (haut :  $38,9 \pm 3,9\%$ , moyen :  $12,6 \pm 2,5\%$  et faible :  $4,2 \pm 4,1\%$ ). Les AGs les plus abondants dans la fraction polaire étaient l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 : 6 n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 : 5 n-3) (respectivement, 26 et 22%), ces derniers étaient positivement corrélés avec le succès d'éclosion. Les lots ayant un faible succès d'éclosion étaient caractérisés par des œufs dont la concentration en EPA et DHA polaires était faible à la fin de l'embryogénèse. Quelque soit le succès d'éclosion, la proportion d'AGs dans la fraction neutre était toujours considérablement inférieure à celle de la fraction polaire. L'acide oléique (18 : 1 n-9) (17%) était le plus abondant dans cette fraction, et, avec l'acide gondoïque (20 : 1 n-9), ils ont expliqué la plupart de la variation du succès d'éclosion.

Ce troisième article intitulé « Fatty acid remodelling during embryogenesis in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in relation to hypoxia tolerance », a été corédigé par moi même, mon directeur Réjean Tremblay, ma codirectrice Céline Audet et le chercheur Yvan Lambert. Il va être resoumis à la revue *Marine Biology* suite aux commentaires reçus en Août 2015, pour amélioration du manuscrit. Ma contribution à ce travail a été la réalisation de l'essentiel des échantillonnages, des analyses, l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Les professeurs Réjean Tremblay, Céline Audet et Yvan Lambert ont fourni l'idée originale et ont aidé à l'écriture du manuscrit. Des versions abrégées de l'article ont été présentées au congrès international organisé par le *American Fisheries Society* à Québec (Canada) en 2014 et à *Aquatic Biodiversity and Ecosystems* à Liverpool (Royaume-Unis) en 2015.



### **3.2 FATTY ACID REMODELLING DURING EMBRYOGENESIS IN GREENLAND HALIBUT (*REINHARDTIUS HIPPOGLOSSOIDES*) IN RELATION TO HYPOXIA TOLERANCE**

Sahar Mejri<sup>1\*</sup>, Réjean Tremblay<sup>1</sup>, Yvan Lambert<sup>2</sup>, and Céline Audet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski (ISMER, UQAR), 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada*

<sup>2</sup> *Pêches et Océans Canada, Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, QC, G5H 3Z4, Canada*

### 3.3 ABSTRACT

Eggs of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) are subjected to hypoxic conditions in the deep waters of the Estuary and Gulf of St. Lawrence during their development. The aim of this study was to determine whether there was potential remodelling of fatty acids (FA) during embryogenesis in eggs exposed to several levels of dissolved oxygen (DO). Fertilized eggs were exposed to four DO levels: severely hypoxic (10 and 20% sat [percent saturation]), moderately hypoxic (35% sat), and normoxic (100% sat). No FA remodelling was observed in eggs submitted to the different DO levels. However, FA composition differed according to hatching successes (high:  $38.9 \pm 3.9\%$ , medium:  $12.6 \pm 2.5\%$ , and low:  $4.2 \pm 4.1\%$ ). Eggs with high hatching success were characterized by stable FA composition in both the polar and neutral fractions during embryogenesis. The most abundant FA in the polar lipid fraction were docosahexaenoic (DHA, 22: 6 n-3) and eicosapentaenoic (EPA, 20: 5 n-3) acids (26 and 22%, respectively), the latter being positively correlated with hatching success. Batches with low hatching success were characterized by eggs with decreased levels of polar EPA and DHA at the end of embryogenesis. Whatever the hatching success, the proportion of FA in the neutral fraction was always significantly lower compared to the polar fraction. Oleic acid (18: 1 n-9) (17%) was the main FA found in this fraction, and together with gondoic acid (20: 1 n-9), they explained most of the variation in hatching success.

**Keywords:** hypoxia; Greenland halibut; eggs; fatty acids; embryogenesis; hatching success

### 3.4 INTRODUCTION

Fish use various physiological and biochemical mechanisms to adapt to most of the variability in many environmental factors, such as dissolved oxygen (Cooper et al., 2002; Martínez et al., 2006; Zhou et al., 2000), temperature (Moore et al., 2012; Morán et al., 2013; Urquhart and Koetsier, 2014), salinity (Borlongan and Benitez, 1992; Poletto et al., 2013), light (Ota and Yamada, 1971), and food availability (Smirnov and Bogdan, 2006). One general biochemical mechanism is homeoviscous adaptation, consisting of a remodelling of the phospholipid head groups, fatty acid (FA) composition, and/or cholesterol content of cell membranes in order to adjust structure fluidity following environmental changes including temperature (Barnes et al., 2014; Crocke, 1998; Hazel, 1995; Laurel et al., 2012) and pressure (Sebert, 2002). Furthermore, membrane lipid composition, particularly the unsaturation of membrane phospholipids (the number of double bonds per 100 fatty acid chains), has been demonstrated to be generally correlated with the basal metabolic rate in mammals and birds with higher polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels in species with high metabolic rates (Hulbert and Else, 2005). These authors suggest that membranes can thus act as a pacemaker for metabolism.

In oviparous fish species, FA are transferred from the female to the eggs prior to their release into the environment. Female nutrition and condition are then important factors that will determine the FA composition in fish eggs (Grote et al., 2011; Pickova et al., 2007). Fatty acids are important for the successful development of fish embryos and serve multiple purposes, including oxidative fuels, structural components for organogenesis, and precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones (De Meester et al., 2013). Many studies have also related hatching success and embryonic survival to the content of essential PUFA (Fernández-Palacios et al., 2011; Keckeis et al., 2000; Mazonra et al., 2003; Mejri et al., 2014). Marine fish eggs and larvae have an absolute requirement for three physiologically essential fatty acids (EFA), namely arachidonic acid (AA, 20: 4 n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, 20: 5 n-3), and docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6 n-3) (Bransden et al., 2005; Hurst, 2007; Sargent et al.,

1999). Recently, Parrish et al. (2007) suggested that docosapentaenoic acid (DPA, 22: 5 n-6) could also be considered as essential, at least in early life stages of cod (*Gadus morhua*) and scallops (*Argopecten irradians*). The DHA and EPA in membrane phospholipids are directly involved in the functional integrity of biological membranes, while AA and EPA can be precursors of eicosanoids, such as prostaglandins, leukotrienes, and hydroxyeicosatetraenoic acids involved in stress responses (reviewed in Glencross, 2009). The role of DPA was not clearly determined, but it could play an important structural role in membranes and/or as a precursor of bioactive docosanoids (Parrish et al. 2007). It has been suggested that DPA can act as a substitute for DHA in scallop larvae and post-larvae (Milke et al., 2004; Pernet et al., 2005). Those EFA can also increase resistance in young stages to potentially detrimental environmental conditions such as hypoxia.

Greenland halibut (*Reinhardtius hypoglossoides*) is a commercially important flatfish species that lives at depths greater than 150 m in the Estuary and Gulf of St. Lawrence (Ait Youcef et al., 2013) where dissolved oxygen levels can be as low as 18% sat (percent saturation) (Ait Youcef et al., 2013; Bourgault et al., 2012; Gilbert et al., 2005). Greenland halibut eggs are bathypelagic, and embryonic development occurs almost entirely in deep waters (Ådlandsvik et al., 2004; Domínguez-Petit et al., 2013) that may be impacted by hypoxia. Indeed, it has already been shown that the lethal DO threshold level for the early life stages of this species is between 10 and 20% sat, with hatching occurring at DO levels as low as 20% sat, suggesting adaptation to hypoxia (Mejri et al., 2012). However, the same authors also showed large differences in egg quality among females (Mejri et al., 2012).

The aim of the present study was to test whether differences in the use and remodelling of neutral and polar fatty acids may explain the inability to pursue normal embryonic development at low dissolved oxygen concentrations and if this use/remodelling is influenced by egg quality. We tested the hypothesis that fatty acid remodelling in the polar fraction is used to increase embryogenesis success in hypoxic conditions. We also tested the hypothesis that Greenland halibut egg development is mainly supported through

the use of saturated and monounsaturated fatty acids (SFA and MUFA) from the polar fraction. Finally, we verified how FA composition from the neutral and polar fractions might explain differences in hatching success between egg batches produced by different females.

### 3.5 MATERIALS AND METHODS

#### 3.5.1 Experimental design and egg sampling

The egg sampling procedures and the experimental design for Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) were previously detailed in Mejri et al. (2012). Briefly, mature fish were captured by longline fishing in the Gaspé area (48° 59' N; 64° 23' W; Quebec, Canada) and kept in circular tanks (5°C, salinity 32) with flow-through seawater until the collection of hydrated eggs from six different females, which were fertilized by the sperm of a single male. Fertilized eggs from each female were incubated at five DO levels (severe hypoxia: 10 and 20% sat, ~0.7 and 1.4 mg L<sup>-1</sup>; moderate hypoxia: 35 and 50% sat, ~2.4 and 3.5 mg L<sup>-1</sup>; normoxia: 100% sat, ~6.9 mg L<sup>-1</sup>) with two replicates for each DO level. In each incubator, temperature was maintained at 5°C and salinity at 32. DO levels were kept stable using the experimental set-up developed by Plante et al. (1998) and detailed in Mejri et al. (2012). Eggs hatched 28 days after fertilization, and three replicates (20 embryos each) per egg batch were sampled at 14, 17, and 21 days post fertilization (dpf) and stored at -80 °C for fatty acid analysis. For this study, only four DO levels (100, 35, 20, and 10% sat) and egg batches from three females characterized by high (38.9 ± 3.9%), medium (12.6 ± 2.5%), and low (4.2 ± 4.1%) hatching successes were considered. The high, medium, and low hatching success categories were attributed according to the hatching success percentages we obtained during the experiment.

### 3.5.2 Fatty acid analysis

Lipids were extracted using the Folch method (Folch et al., 1957), separated into neutral and polar fractions using silica gel (30 × 5 mm i.d., packed with Kieselgel 60, 70–230 mesh; Merck, Darmstadt, Germany) hydrated with 6% water, and eluted with 10 mL of chloroform:methanol (98:2 v/v) for neutral lipids followed by 20 mL of methanol for polar lipids (Marty et al., 1992). The neutral fraction was further eluted on an activated silica gel with 3 mL of hexane and diethyl ether to eliminate free sterols. All fatty acid methyl esters (FAME) were prepared as described by Lepage and Roy (1984) and analyzed in MSMS scan mode (ionic range: 60–650 m/z) on a Polaris Q ion trap coupled to a Trace GC (Thermo Finnigan, Mississauga, ON, CA) equipped with a Valcobond VB-5 capillary column (VICI Valco Instruments Co. Inc., Broakville, ON, CA) (Lepage and Roy, 1984). FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37 components FAME Mix, PUFA-3, BAME, and menhaden oil; Supelco Bellefonte, PA, USA) and quantified with tricosanoic acid (23:0) and nonadecanoic acid (19:0) as internal standards. Chromatograms were analyzed using integration Xcalibur 1.3 software (Thermo Scientific, Mississauga, ON, CA).

### 3.5.3 Statistical analysis

Linear regressions were performed between the hatching success of Greenland halibut embryos and PUFA concentrations in the neutral and polar fractions. Normality was tested using both the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. These analyses were performed with the JMP 9 package. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA with 9999 permutations), including a posteriori pair-wise comparisons, was performed on FA profiles and sums of SFA, MUFA, and PUFA from polar and neutral fractions. Each PERMANOVA was tested with three factors: hatching success (high, medium, and low), days post fertilization (14, 17, and 21), and DO levels (100, 35, 20, and

10% sat). Assumptions of homoscedasticity were verified with a PERMDISP test, and data were transformed (arcsine square root) when necessary. To analyze the similarity between different hatching successes during embryonic development, SIMPER analyses were run using a Bray-Curtis similarity matrix with PRIMER 6 (v. 6.1.12) and PERMANOVA+ (v. 1.0.2).

## 3.6 RESULTS

### 3.6.1 Fatty acid composition in relation to DO levels

We observed no effect of DO levels on complete FA composition in both the neutral and polar fractions (Pseudo -  $F_{\text{polar}}(3, 33) = 1.5$ ,  $p = 0.19$ ; Pseudo -  $F_{\text{neutral}}(3, 33) = 0.8$ ,  $p = 0.56$ ). Results of percentages of different FA on day 14 are presented in Table 1. Although, we did not observe a significant difference between DO levels, PUFA percentages in the polar fraction were higher in hypoxic conditions (>50% of total polar FA at 10 and 20% sat) than in moderate and normoxic conditions (42 and 35% of total polar FA at 100 and 35% sat, respectively). In neutral lipids, SFA and MUFA made up the larger fractions (>31 and >35% of total neutral FA) compared to PUFA (around 20% of total neutral FA) (Table 10).

Table 10. Fatty acid composition (mean  $\pm$  SD, expressed as percentage of total polar and neutral lipids detected) in Greenland halibut eggs exposed to different dissolved oxygen (DO) levels (100, 35, 20, and 10% sat) at 14 days post fertilization

Fatty acid	Polar fatty acids				Neutral fatty acids			
	Dissolved oxygen levels (%sat)							
	100	35	20	10	100	35	20	10
C14:0	1.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.7
C16:0	24.3 $\pm$ 6.8	23.9 $\pm$ 11.0	18.9 $\pm$ 1.5	19.2 $\pm$ 1.2	11.9 $\pm$ 0.8	10.1 $\pm$ 1.5	12.8 $\pm$ 2.0	12.7 $\pm$ 2.5
C18:0	7.4 $\pm$ 2.0	8.6 $\pm$ 3.3	6.1 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.8
C22:0	0.16 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.33	0.27 $\pm$ 0.16	0.14 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2
C24:0	0.28 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.57	0.47 $\pm$ 0.28	0.41 $\pm$ 0.27	1.8 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.3
$\Sigma$ SFA <sup>†</sup>	37.5 $\pm$ 10.6	45.4 $\pm$ 21.3	31.7 $\pm$ 5.9	31.1 $\pm$ 3.5	33.2 $\pm$ 9.0	40.4 $\pm$ 13.7	33.8 $\pm$ 13.3	31.5 $\pm$ 8.5
C 16:1 n-7	3.43 $\pm$ 0.83	2.8 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.7	7.7 $\pm$ 2.5	5.8 $\pm$ 2.1	7.7 $\pm$ 0.9	8.4 $\pm$ 1.4
C18:1 n-9	9.26 $\pm$ 1.83	8.7 $\pm$ 1.6	7.9 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 1.1	20.3 $\pm$ 5.6	16.6 $\pm$ 4.1	20.4 $\pm$ 2.5	22.1 $\pm$ 2.2
C20:1 n-9	6.31 $\pm$ 1.66	5.5 $\pm$ 1.6	5.5 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 2.1	6.8 $\pm$ 1.7	9.4 $\pm$ 3.5	9.4 $\pm$ 2.0
C22:1 n-9	0.53 $\pm$ 0.48	0.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 2.4	4.5 $\pm$ 2.0	6.1 $\pm$ 3.2	6.2 $\pm$ 3.1
C24:1 n-9	0.20 $\pm$ 0.26	0.51 $\pm$ 0.47	0.22 $\pm$ 0.20	0.29 $\pm$ 0.21	2.3 $\pm$ 2.3	1.6 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 1.0
$\Sigma$ MUFA <sup>‡</sup>	19.7 $\pm$ 5.1	18.3 $\pm$ 4.6	17.0 $\pm$ 3.2	17.6 $\pm$ 3.4	44.2 $\pm$ 15.1	35.6 $\pm$ 11.5	45.1 $\pm$ 11.5	47.5 $\pm$ 9.9
C18:2 n-6	0.49 $\pm$ 0.10	1.0 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 1.2	2.4 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3
C20:4 n-6	1.25 $\pm$ 0.36	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 1.2	0.8 $\pm$ 1.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.5
C20:5 n-3	15.6 $\pm$ 5.9	12.9 $\pm$ 7.7	18.7 $\pm$ 3.8	18.8 $\pm$ 3.5	6.6 $\pm$ 1.0	5.6 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 1.6	6.5 $\pm$ 1.0
C22:6 n-3	24.2 $\pm$ 7.9	18.1 $\pm$ 9.2	28.8 $\pm$ 2.3	28.6 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 1.3	7.5 $\pm$ 1.6	8.5 $\pm$ 3.5	8.7 $\pm$ 2.2
$\Sigma$ PUFA <sup>§</sup>	42.4 $\pm$ 14.8	35.5 $\pm$ 19.9	50.7 $\pm$ 8.0	50.6 $\pm$ 6.8	20.9 $\pm$ 7.9	22.1 $\pm$ 8.8	20.0 $\pm$ 9.0	19.8 $\pm$ 5.9
$\Sigma$ n-3	40.2 $\pm$ 14.1	32.0 $\pm$ 18.2	48.2 $\pm$ 6.6	48.0 $\pm$ 6.1	16.7 $\pm$ 3.9	16.4 $\pm$ 4.6	16.7 $\pm$ 6.6	16.7 $\pm$ 4.1
$\Sigma$ n-6	2.1 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 1.7	2.4 $\pm$ 1.3	2.6 $\pm$ 0.7	4.1 $\pm$ 3.9	5.6 $\pm$ 4.2	3.2 $\pm$ 2.3	3.0 $\pm$ 1.7

<sup>†</sup> Includes 15:0, 17:0, 20:0; <sup>‡</sup> includes 17:1; <sup>§</sup> includes 20:2, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 18:3 n-6,

20:3 n-3, 20:3 n-6



### **3.6.2 Polar fraction of fatty acids**

SFA represented 30 to 61% of the total FA. The predominant SFA was palmitic acid (16: 0) followed by stearic acid (18: 0) (Table 11). MUFA made up the smallest fraction (< 20% of total FA) while the PUFA fraction was as high as 54% of the total FA (Table 11). The highest concentrations of FA were DHA (22: 6 n-3) followed by EPA (20: 5 n-3) (Table 11).

Table 11. Fatty acid composition of the polar lipid fraction (% weight of total polar lipids  $\pm$  SD) in Greenland halibut eggs with different hatching successes: high ( $38.9 \pm 3.9\%$ ), medium ( $12.6 \pm 2.5\%$ ), and low ( $4.2 \pm 4.1\%$ )

Polar fatty acids	Hatching success								
	High			Medium			Low		
	Days post fertilization								
	14	17	21	14	17	21	14	17	21
14:0	1.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 1.1
16:0	19.9 $\pm$ 5.4	19.9 $\pm$ 2.4	18.3 $\pm$ 1.0	26.4 $\pm$ 8.4	19.1 $\pm$ 1.2	19.8 $\pm$ 0.9	18.5 $\pm$ 2.5	18.3 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 13.4
18:0	6.5 $\pm$ 1.6	6.2 $\pm$ 0.6	6.2 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 2.9	6.3 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.7	5.7 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 2.3
$\Sigma$ SFA <sup>†</sup>	33.6 $\pm$ 10.5	30.1 $\pm$ 3.7	30.9 $\pm$ 4.3	42.0 $\pm$ 15.0	30.9 $\pm$ 2.8	30.5 $\pm$ 2.4	33.8 $\pm$ 9.6	29.2 $\pm$ 1.6	61.4 $\pm$ 34.7
16:1 n-7	2.5 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 4.4
18:1 n-9	7.4 $\pm$ 1.3	6.9 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 1.3	8.8 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 9.9
20:1 n-9	6.8 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 0.0	5.6 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 3.5
MUFA <sup>‡</sup>	17.9 $\pm$ 3.2	17.1 $\pm$ 1.6	16.6 $\pm$ 1.2	19.9 $\pm$ 3.3	17.9 $\pm$ 0.9	18.1 $\pm$ 1.3	16.8 $\pm$ 2.3	16.5 $\pm$ 1.2	17.9 $\pm$ 18.9
18:2 n-6	0.6 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 3.1
20:4 n-6	1.3 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0
20:5 n-3	20.1 $\pm$ 4.7 <sup>ab</sup>	22.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	21.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	15.9 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	16.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	18.3 $\pm$ 2.8 <sup>ab</sup>	19.9 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	2.8 $\pm$ 2.2 <sup>d</sup>
22:6 n-3	25.1 $\pm$ 5.6 <sup>ab</sup>	27.5 $\pm$ 2.6 <sup>ab</sup>	27.1 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	22.9 $\pm$ 10.9 <sup>b</sup>	30.9 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	31.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	26.8 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>	30.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>
$\Sigma$ PUFA <sup>‡</sup>	48.2 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	52.5 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	52.2 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	37.4 $\pm$ 15.6 <sup>b</sup>	50.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	50.9 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	48.9 $\pm$ 9.9 <sup>a</sup>	53.8 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	20.0 $\pm$ 14.9 <sup>c</sup>

Different letters indicate significant differences among subgroups (hatching success  $\times$  days post fertilization). <sup>†</sup> Includes 15:0, 17:0, 20:0, 22:0, and 24:0. <sup>‡</sup> Includes 17:1 and 22:1 n-9. <sup>‡</sup> Includes 20:3 n-6, 18:4 n-3, 18:3 n-3, and 20:3 n-3

While we observed no effect of DO on complete FA composition, there was a significant interaction between hatching success and days post fertilization (*Pseudo - F*<sub>(4, 33)</sub> = 14.9,  $p < 0.01$ ). Similar results were found for the sums of SFA, MUFA, and PUFA, with a significant interaction of hatching success and days post fertilization effect (*Pseudo - F*<sub>(4, 33)</sub> = 16.2,  $p < 0.01$ ). SIMPER analysis showed that DHA and EPA contents explained >41% of the differences among subgroups and PUFA explained >42% (Table 12). Both DHA and EPA percentages were significantly lower in eggs from the low hatching success batch at 21 dpf ( $\leq 6\%$ ; Table 11).

Table 12. SIMPER analysis results for fatty acids from polar and neutral lipid fractions explaining most of the differences between 14, 17, and 21 days post fertilization (dpf) and egg batches presenting different hatching successes: high ( $38.9 \pm 3.9\%$ ), medium ( $12.6 \pm 2.5\%$ ), and low ( $4.2 \pm 4.1\%$ ). Monounsaturated fatty acids (MUFA) include 16:1 n-7, 18:1 n-9, 20:1 n-9, 22:1 n-9, 17:1, and 24:1 n-9; polyunsaturated fatty acids (PUFA) include 18:2 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 20:3 n-3, 20:5 n-3, and 22:6 n-3

<b>Polar fraction</b>	<b>Average</b>	<b>Contribution</b>	<b>Neutral fraction</b>	<b>Average</b>	<b>Contribution</b>
<b>Days post fertilization (dpf)</b>					
14 and 17 dpf					
DHA	3.1	29.4	20: 1 n - 9	2.0	8.5
EPA	2.2	21.2	18: 1 n - 9	1.6	6.8
PUFA	2.1	46.7	MUFA	4.7	46.4
14 and 21 dpf					
DHA	6.1	24.6	18: 1 n - 9	2.1	10.5
EPA	4.2	17.1	20: 1 n - 9	1.6	8.1
PUFA	4.3	44.6	MUFA	5.1	50.2
17 and 21 dpf					
DHA	5.3	25.4	18: 1 n - 9	2.0	7.3
EPA	3.6	17.1	20: 1 n - 9	1.9	7.2
PUFA	3.42	42.9	MUFA	5.0	43.7
<b>Hatching success</b>					
Medium and high					
DHA	3.8	28.1	20: 1 n - 9	1.9	7.0
EPA	3.0	22.5	18: 1 n - 9	1.7	6.2
PUFA	1.9	45.8	MUFA	4.9	47.1
Medium and low					
DHA	5.8	24.1	20: 1 n - 9	2.6	10.2
EPA	4.1	17.1	18: 1 n - 9	2.2	8.7
PUFA	3.8	44.1	MUFA	5.9	49.3
High and low					
DHA	4.8	21.8	18: 1 n - 9	2.9	9.2
EPA	4.2	19.3	20: 1 n - 9	2.3	7.5
PUFA	3.2	42.9	MUFA	5.4	45.8

### 3.6.3 Neutral fraction of fatty acids

The neutral lipids contained high percentages of SFA (>25%) and MUFA (>11%), with highest percentages in oleic (18: 1 n-9) and gondoic (20: 1 n-9) FA, and approximately 21% PUFA (Table 13). The same tendency was observed in the neutral fraction as in the polar fraction: There was no effect of DO and a significant interaction between hatching success and days post fertilization (*Pseudo* -  $F_{(4, 33)} = 11.1, p < 0.01$ ), but not with the same FA. In this case, oleic (18: 1 n-9) and gondoic (20: 1 n-9) FA explained > 13% of the differences (Table 12). These FA were significantly lower in eggs from the batch with low hatching success at 21 dpf ( $\leq 3.5\%$ ; Table 13). Sums of SFA, MUFA, and PUFA varied significantly according to the interaction between hatching success and days post fertilization as well (*Pseudo* -  $F_{(4, 33)} = 15.2, p < 0.01$ ), with MUFA explaining >43% of the variation (Table 12).

Table 13. Fatty acid composition of the neutral lipid fraction (% weight of total neutral lipids  $\pm$  SD) in Greenland halibut eggs with different hatching successes: high ( $38.9 \pm 3.9\%$ ), medium ( $12.6 \pm 2.5\%$ ), and low ( $4.2 \pm 4.1\%$ )

Neutral fatty acids	Hatching success								
	High			Medium			Low		
	Days post fertilization								
	14	17	21	14	17	21	14	17	21
14:0	3.2 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 1.3	3.5 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 1.7
16:0	11.8 $\pm$ 1.6	3.2 $\pm$ 5.9	10.7 $\pm$ 4.9	10.9 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 2.8	16.7 $\pm$ 2.7	31.7 $\pm$ 14.6
18:0	2.5 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 4.1	3.0 $\pm$ 1.4	3.5 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 1.1	7.4 $\pm$ 2.3
$\Sigma$ SFA <sup>†</sup>	34.5 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	50.3 $\pm$ 30.8 <sup>a</sup>	38.9 $\pm$ 33.3 <sup>b</sup>	30.1 $\pm$ 10.1 <sup>b</sup>	27.8 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	25.2 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	39.7 $\pm$ 14.8 <sup>b</sup>	46.8 $\pm$ 11.6 <sup>b</sup>	69.2 $\pm$ 37.8 <sup>a</sup>
16:1 n-7	7.8 $\pm$ 1.4	1.0 $\pm$ 2.9	6.5 $\pm$ 3.1	6.0 $\pm$ 1.7	6.5 $\pm$ 0.7	49.1 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 2.1	12.6 $\pm$ 2.9	6.2 $\pm$ 4.4
18:1 n-9	19.7 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>	11.6 $\pm$ 7.7 <sup>bc</sup>	16.7 $\pm$ 7.8 <sup>bc</sup>	17.6 $\pm$ 3.6 <sup>ab</sup>	19.5 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	21.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 5.0 <sup>ab</sup>	14.1 $\pm$ 10.1 <sup>ab</sup>	3.5 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>
20:1 n-9	9.0 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	1.7 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	7.6 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	9.9 $\pm$ 2.9 <sup>ab</sup>	10.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	11.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>	0.2 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>
22:1 n-9	7.5 $\pm$ 1.3	3.9 $\pm$ 1.9	5.2 $\pm$ 2.2	6.8 $\pm$ 1.9	7.7 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.6
$\Sigma$ MUFA <sup>‡</sup>	45.2 $\pm$ 6.7 <sup>ab</sup>	18.2 $\pm$ 16.7 <sup>c</sup>	36.4 $\pm$ 17.5 <sup>ab</sup>	43.8 $\pm$ 11.5 <sup>ab</sup>	47.7 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	49.1 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	40.3 $\pm$ 10.5 <sup>ab</sup>	24.9 $\pm$ 16.1 <sup>bc</sup>	11.1 $\pm$ 8.6 <sup>c</sup>
18:2 n-6	1.3 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 3.3	1.0 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.2	2.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 1.7
20:3 n-6	0.7 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 3.6	0.5 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 1.4
20:4 n-6	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0
18:4 n-3	0.8 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 1.0
20:5 n-3	6.7 $\pm$ 0.9	3.7 $\pm$ 5.2	7.8 $\pm$ 2.0	7.0 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 0.7	8.0 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 2.7	2.1 $\pm$ 1.7
22:6 n-3	7.4 $\pm$ 0.9	15.3 $\pm$ 3.6	9.9 $\pm$ 4.4	10.8 $\pm$ 1.9	10.2 $\pm$ 1.6	12.9 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 0.8	8.7 $\pm$ 1.8	5.1 $\pm$ 2.3
$\Sigma$ PUFA <sup>‡</sup>	19.3 $\pm$ 4.2 <sup>bc</sup>	31.3 $\pm$ 22.0 <sup>a</sup>	23.8 $\pm$ 12.3 <sup>bc</sup>	24.3 $\pm$ 7.1 <sup>ab</sup>	22.8 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	24.8 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>	18.7 $\pm$ 5.1 <sup>bc</sup>	22.6 $\pm$ 7.7 <sup>bc</sup>	17.4 $\pm$ 11.1 <sup>c</sup>

Different letters indicate significant differences among subgroups (hatching success  $\times$  days post fertilization). <sup>†</sup> Includes 12:0, 15:0, and 17:0. <sup>‡</sup> Includes 17:1 and 24:1 n-9. <sup>‡</sup> Includes 18:3 n-6, 18:3 n-3, and 20:3 n-3

### 3.6.4 Relation between hatching success and relative content of fatty acids

Positive correlations between hatching success and polar lipid DHA (22: 6 n-3) and EPA (20: 5 n-3) concentrations were found at 21 dpf (DHA:  $F_{(1, 19)} = 4.62$ ,  $r^2 = 0.19$ ,  $p = 0.04$ ; EPA:  $F_{(1, 19)} = 17.68$ ,  $r^2 = 0.48$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 11), but no correlation was found at 14 dpf (DHA and EPA:  $r^2 \leq 0.03$ ,  $p \geq 0.42$ ) or 17 dpf (DHA and EPA:  $r^2 \leq 0.28$ ,  $p \geq 0.06$ ). No other significant correlations were found for other fatty acids. In neutral lipids, significant correlations between hatching success and relative contents of DHA and EPA were observed on days 17 and 21, respectively (DHA:  $F_{(1, 22)} = 17.15$ ,  $r^2 = 0.44$ ,  $p < 0.01$ ; EPA:  $F_{(1, 19)} = 9.06$ ,  $r^2 = 0.34$ ,  $p < 0.01$ ; Fig. 12). Again, no significant correlation was found at 14 dpf (DHA and EPA:  $r^2 \leq 0.03$ ,  $p \geq 0.42$ ) or when other fatty acids were considered.

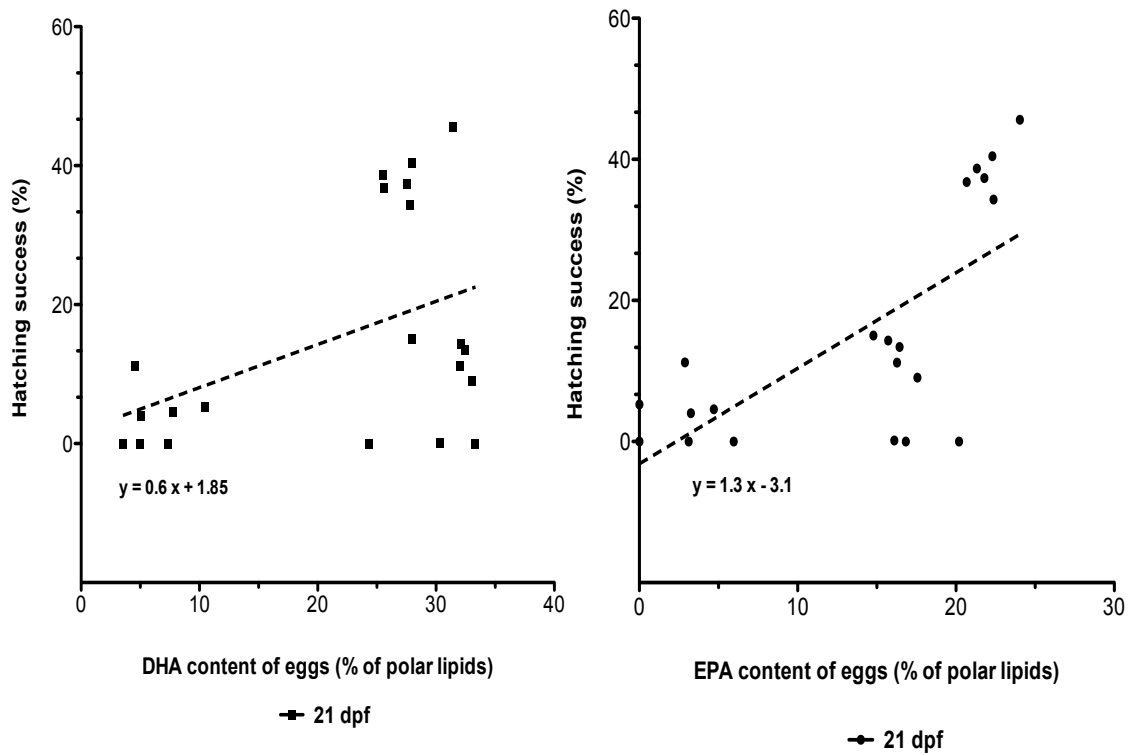


Figure 11. Content of docosahexaenoic acid (left) and eicosapentaenoic acid (right) in egg polar lipids in relation to hatching success. The dashed lines represent data at 21 days post fertilization (dpf)



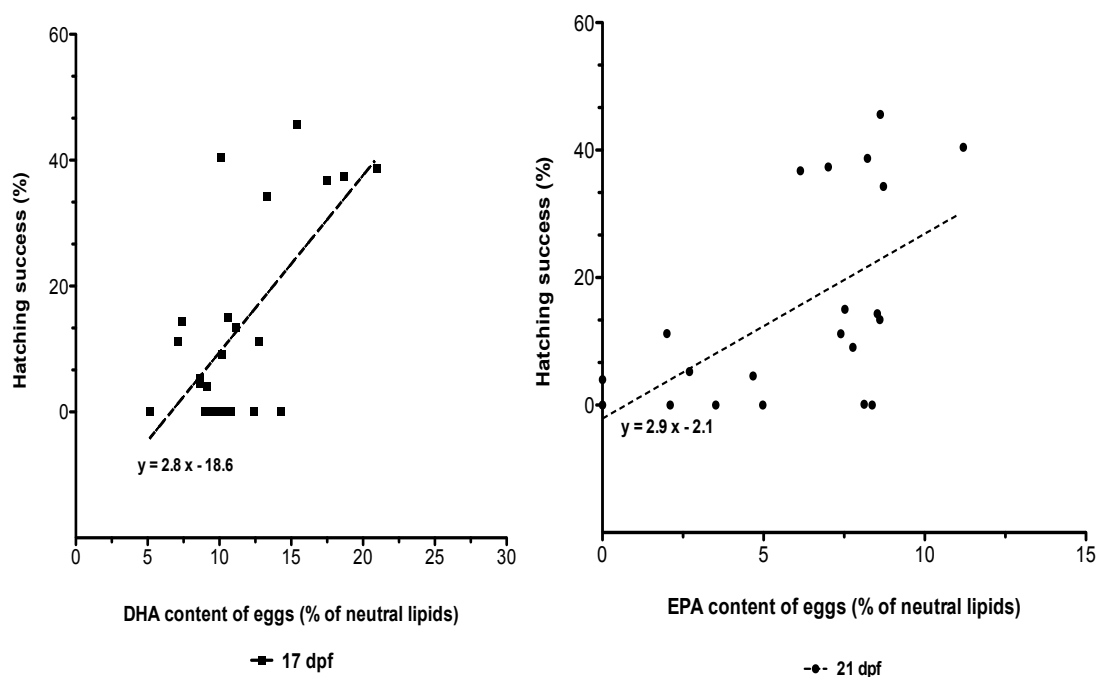


Figure 12. Content of docosahexaenoic acid (left) and eicosapentaenoic (right) in egg neutral lipids in relation to hatching success. The dashed lines represent data at 17 days post fertilization (dpf) (left) and at 21 dpf (right)

### 3.7 DISCUSSION

#### 3.7.1 Remodelling fatty acids in low DO

We hypothesized that the presence of a homeoviscous mechanism, including the selective retention of PUFA to increase membrane cell fluidity, would be present in Greenland halibut eggs exposed to hypoxic conditions. The results do not support this hypothesis: we found no specific effect on any essential fatty acids related to hypoxia

exposure in Greenland halibut eggs during embryogenesis. Some studies have been conducted on the role of EFA in hypoxia tolerance, but these were mainly on fish larvae and juveniles. For instance, McKenzie et al. (2008) showed that enriching live feed with AA, DHA, and EPA led to a significant accumulation of these EFA in the tissues of early life stages, with a significant effect on respiratory metabolism and tolerance to hypoxia in Dover sole (*Solea solea*) larvae and juveniles. Deprivation of EFA in Dover sole larvae increased their mortality during acute hypoxic stress (Logue et al., 2000). However, none of these studies determined the mechanisms underlying these effects. Even though we did not detect any effect of hypoxia on egg EFA composition during embryogenesis, that does not rule out its presence in later developmental stages. Variations in the degree of homeoviscous adaptation exhibited by specific tissues are not uncommon, and the relative lack of a homeoviscous response may indicate that physical properties of membranes other than fluidity may be important during embryogenesis in some instances (Crockett and Londrville, 2006).

### **3.7.2 Fuel for egg development**

We also tested the hypothesis that egg development in Greenland halibut is mainly supported through the use of saturated and monounsaturated fatty acids from the polar fraction. The results obtained on the use of SFA and MUFA from the polar fraction during embryogenesis do not support this hypothesis. Indeed, MUFA from the neutral fraction seemed to have been used during development. The fatty acid profile of Greenland halibut eggs, which were rich in PUFA, was comparable to those from other fish species that produce eggs with no oil globule (Faleiro and Narciso, 2010). In Greenland halibut, there were proportionally more MUFA and less PUFA in neutral lipids than in polar lipids. Similar results have been reported in other marine fish eggs (e.g., gilthead bream [*Sparus aurata*]; Fountoulaki et al., 2003; Henderson and Tocher, 1987). The higher levels of PUFA in polar lipids most likely reflect the important role of these FA in maintaining

appropriate cell membrane structure (Hazel and Eugene Williams, 1990). The use of MUFA, mainly oleic and gondoic FA, to support energetic demands for embryonic development, has also been demonstrated in other fish species, including common snook (*Centropomus undecimalis*) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) (Almansa et al., 2001). In accordance with our results, oleic acid (18:1 n-9) in spotted wolffish eggs was preferentially catabolized during embryogenesis (Almansa et al., 2001). Although DHA and EPA are known to be incorporated into cell membranes during embryonic development, we observed that they also appear to serve as an energy source during embryogenesis in Greenland halibut. In contrast to some other studies, PUFA, such as DHA and EPA, were retained by devil stinger (*Inimicus japonicus*) and Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) eggs during development (Laurel et al., 2012; Wen et al., 2013).

### **3.7.3 FA composition in relation to hatching success**

We were interested in how FA composition from the neutral and polar fractions might explain differences in hatching success between egg batches produced by different females. Hatching was positively correlated with the relative profiles of DHA and EPA in eggs at 21 dpf in both the neutral and polar fractions. Other studies have shown relationships between egg viability and concentrations of DHA, EPA, and AA in different marine fish eggs and larvae (Bruce, 1999; Jerez et al., 2012; Lanes et al., 2012; Mansour et al., 2011; Pickova et al., 1997; Salze et al., 2005). Eggs that had high and medium hatching success contained higher proportions of DHA and EPA, and had more stable FA composition during embryonic development.

The maternal effect (i.e., female origin) was important in the present study. The use of fatty acids was greater in eggs from the female that had the lowest hatching success, resulting in varying FA allocation patterns between the three categories (high, medium, and low hatching success) during embryonic development. Fatty acid composition in embryos and larvae during development may vary both in quality and quantity within the same

species (Fraser et al., 1988; Mourente and Vázquez, 1996) depending on environmental conditions (Dantagnan et al., 2007), physiological events, or energy demands (Sargent et al., 1997). Fish egg quality, determined by its biochemical composition, reflects the maternal contribution and is considered as a key maternal factor for successful embryonic development and hatching (Bachan et al., 2012; Murua and Saborido-Rey, 2003; Wiegand, 1996). In our study, despite attempts made to minimize confounding effects (using fish captured from the same location and feeding them identical diets while in captivity), we still observed noticeable differences in egg composition among females that resulted in large differences in hatching success. Although our fish were maintained in captivity for one year it is possible that the food they received in captivity did not have a significant effect on egg composition and that the variations we observed are representative of their previous wild diet. It remains unclear how the duration of the dietary regime can affect egg composition (Yanes-Roca et al., 2009), even though it is known that diet can have a direct impact on egg lipid composition during oogenesis (Rainuzzo et al., 1997). Greater variation is expected in general in wild stocks because environmental factors and maternal phenotypes are likely to be more diverse in nature than in captivity (Chambers and Waiwood, 1996). Females used in this study could have different ages as well as dietary, spawning, and distribution histories. Factors such as maternal age of spawners (Evans et al., 1996; Izquierdo et al., 2001), condition (Ouellet et al., 2001), broodstock origin (Czesny et al., 2005; Pickova et al., 1997), diet (Mazorra et al., 2003), and environmental factors (Ayers, 2006) can all contribute to differences in FA composition between individual females that could result in variable egg quality and thus hatching success.

Intraspecific variation is also possible between eggs from the same batch. For example, some clutches of zebrafish (*Danio rerio*) eggs were found to be more affected by hypoxia than others, thus contributing to the high variation in developmental rate and also suggesting that genetics plays a significant role in the hypoxic response (Bagatto, 2005). The change in egg phospholipids concentrations between batches of cod varied tremendously, with increases as high as 20% to declines as great as 70% between the initial and final egg batches (Bachan et al., 2012). Thus, many factors could explain the strong

variation in FA profiles of Greenland halibut eggs that could be related to both the different hatching percentages and days post fertilization. Unfortunately, we do not have adequate evidence to determine if it is either of these factors.

### **3.8 CONCLUSION**

In conclusion, during exposure to hypoxia, Greenland halibut eggs do not show a specific adaptive mechanism in relation to fatty acids, such as homeoviscous adaptation, or selective retention of certain essential fatty acids. Moreover, Greenland halibut egg development is mainly supported by PUFA and MUFA from the polar and neutral fractions, respectively, and DHA and EPA were positively correlated with hatching success, suggesting the importance of these FA in the early life stages of this species. The present study shows the importance of fatty acids as a biochemical tool to investigate the effects of different biological and environmental factors on egg quality and hatching success.

### **Acknowledgements**

This study was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Strategic grant No. STPGP 365115-08 to C. Audet, D. Gilbert, Y. Lambert, D. Chabot, and R. Tremblay), and Fisheries and Oceans Canada (DFO).

**REFERENCES**

- Ådlandsvik, B., Oempty, R., Gundersen, A.C., Nedreaas, K.H., Stene, A., Albert, O.T., 2004. Modelling the advection and diffusion of eggs and larvae of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the north-east Arctic. *Fish. Oceanogr.* 13, 403-415.
- Ait-Youcef, W., Lambert, Y., Audet, C., 2013. Spatial distribution of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* in relation to abundance and hypoxia in the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Fish. Oceanogr.* 22, 41-60.
- Almansa, E., Martin, M.V., Cejas, J.R., Badia, P., Jerez, S., Lorenzo, A., 2001. Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: Effects of a diet lacking n-3 HUFA. *J. Fish. Biol.* 59, 267-286.
- Ayers, M.D., 2006. Effects of hypoxic rearing environment on the development, physiology, and ecology of zebrafish. Dissertation, The Graduate Faculty of the University of Akron, Akron, OH, 125 pp.
- Bachan, M.M., Fleming, I.A., Trippel, E.A., 2012. Maternal allocation of lipid classes and fatty acids with seasonal egg production in Atlantic cod (*Gadus morhua*) of wild origin. *Mar. Biol.* 159, 2281-2297.
- Bagatto, B., 2005. Ontogeny of cardiovascular control in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of developmental environment. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 141, 391-400.
- Barnes, K.R., Cozzi, R.R.F., Robertson, G., Marshall, W.S., 2014. Cold acclimation of NaCl secretion in a eurythermic teleost: Mitochondrial function and gill remodelling. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 168, 50-62.

- Borlongan, I.G., Benitez, L.V., 1992. Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) grown in freshwater and seawater. *Aquaculture* 104, 79-89.
- Bourgault, D., Cyr, F., Galbraith, P.S., Pelletier, E., 2012. Relative importance of pelagic and sediment respiration in causing hypoxia in a deep estuary. *J. Geophys. Res. C Oceans*. 117, 1-13.
- Brandsen, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Kolkovski, S., 2005. Dietary 22:6 n-3 alters gut and liver structure and behaviour in larval striped trumpeter (*Latris lineata*). *Aquaculture* 248, 275-285.
- Bruce, M.P., 1999. Broodstock management and nutrition and egg and larval quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Dissertation, University of Stirling, Stirling, UK, 230 pp.
- Chambers, R.C., Waiwood, K.G., 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1986-2003.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279, 1-20.
- Crocke, E.L., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* 38, 291-304.
- Crockett, E., Londrville, R., 2006. Temperature. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B., Currie, S. (Eds.), *The physiology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 231-269.

- Czesny, S., Rinchar, J., Dabrowski, K., 2005. Intrapopulation variation in egg lipid and fatty acid composition and embryo viability in a naturally spawning walleye population from an inland reservoir. *N. Am. J. Fish. Manage.* 25, 122-129.
- Dantagnan, H., Bórquez, A.S., Valdebenito, I.N., Salgado, I.A., Serrano, E.A., Izquierdo, M.S., 2007. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye *Galaxias maculatus*, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations. *J. Fish. Biol.* 70, 770-781.
- De Meester, F., Watson, R., Zibadi, S., 2013. Omega-6/3 fatty acids: Functions, sustainability strategies and perspectives. In: De Meester, F., Watson, R., Zibadi, S. (Eds.), Humana Press, New York, NY.
- Domínguez-Petit, R., Ouellet, P., Lambert, Y., 2013. Reproductive strategy, egg characteristics and embryonic development of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *J. Mar. Sci.* 70, 342-351.
- Evans, R.P., Parrish, C.C., Brown, J.A., Davis, P.J., 1996. Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 139, 139-149.
- Faleiro, F., Narciso, L., 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: Searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture* 307, 56-64.
- Fernández-Palacios, H., Norberg, B., Izquierdo, M., Hamre, K., 2011. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In: Holt, G.J. (Eds.), *Larval fish nutrition*, Oxford, UK, pp. 151-181.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Biol. Chem.* 226, 497-509.



- Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4 n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 225, 309-323.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C., 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*). *Mar. Biol.* 99, 307-313.
- Gilbert, D., Sundby, B., Gobeil, C., Mucci, A., Tremblay, G.H., 2005. A seventy-two-year record of diminishing deep-water oxygen in the St. Lawrence estuary: The northwest Atlantic connection. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1654-1666.
- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquaculture* 1, 71-124.
- Grote, B., Hagen, W., Lipinski, M., Verheye, H., Stenevik, E., Ekau, W., 2011. Lipids and fatty acids as indicators of egg condition, larval feeding and maternal effects in cape hakes (*Merluccius paradoxus* and *M. capensis*). *Mar. Biol.* 158, 1005-1017.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Eugene Williams, E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167-227.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347.
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 2005. Membranes and the setting of energy demand. *J. Exp. Biol.* 208, 1593-1599.

- Hurst, T.P., 2007. Causes and consequences of winter mortality in fishes. *J. Fish. Biol.* 71, 315-345.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Jerez, S., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2012. Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season. *Aquaculture* 350, 54-62.
- Keckeis, H., Bauer-Nemeschkal, E., Menshutkin, V.V., Nemeschkal, H.L., Kamler, E., 2000. Effects of female attributes and egg properties on offspring viability in a rheophilic cyprinid, *Chondrostoma nasus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 789-796.
- Lanes, C.F.C., Bizuayehu, T.T., Bolla, S., Martins, C., de Oliveira Fernandes, J.M., Bianchini, A., Kiron, V., Babiak, I., 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. *Aquaculture* 324, 267-275.
- Laurel, B., Copeman, L., Parrish, C., 2012. Role of temperature on lipid/fatty acid composition in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) eggs and unfed larvae. *Mar. Biol.* 159, 2025-2034.
- Lepage, G., Roy, C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391-1396.
- Logue, J.A., Howell, B.R., Bell, J.G., Cossins, A.R., 2000. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid deprivation, tissue lipid composition, ex vivo prostaglandin production, and stress tolerance in juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). *Lipids* 35, 745-755.

- Mansour, N., Lahnsteiner, F., McNiven, M.A., Richardson, G.F., Pelletier, C.S., 2011. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture* 318, 371-378.
- Martínez, M.L., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A.O., Rees, B.B., 2006. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *J. Exp. Biol.* 209, 3851-3861.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 227, 21-33.
- McKenzie, D.J., Lund, I., Pedersen, P.B., 2008. Essential fatty acids influence metabolic rate and tolerance of hypoxia in Dover sole (*Solea solea*) larvae and juveniles. *Mar. Biol.* 154, 1041-1051.
- Mejri, S., Tremblay, R., Lambert, Y., Audet, C., 2012. Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. *Mar. Biol.* 159, 1693-1701.
- Mejri, S., Audet, C., Vandenberg, G.W., Parrish, C.C., Tremblay, R., 2014. Biochemical egg quality in a captive walleye (*Sander vitreus*) broodstock population relative to ovulation timing following hormonal treatment. *Aquaculture* 431: 99-106.

- Milke, L.M., Bricelj, V.M., Parrish, C.C., 2004. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture* 234, 293-317.
- Moore, A., Bendall, B., Barry, J., Waring, C., Crooks, N., Crooks, L., 2012. River temperature and adult anadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*. *Fish. Manage. Ecol.* 19, 518-526.
- Morán, P., Marco-Rius, F., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., 2013. Environmental induced methylation changes associated with seawater adaptation in brown trout. *Aquaculture* 395, 77-83.
- Mourente, G., Vázquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish. Physiol. Biochem.* 15, 221-235.
- Murua, H., Saborido-Rey, F., 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 31, 23-31.
- Ota, T., Yamada, M., 1971. Lipids of masu salmon *Oncorhynchus masou*. I. Variations of the lipid content and fatty acid composition of juvenile masu salmon during the period of smolt-transformation, and the influence of light upon those variations. *Hokkaido Univ. Fac. Fish. Bull.* 22: 151-158.
- Ouellet, P., Lambert, Y., Bérubé, I., 2001. Cod egg characteristics and viability in relation to low temperature and maternal nutritional condition. *J. Mar. Sci.* 58, 672-686.
- Parrish, C.C., Whitticar, M., Puvanendran, V., 2007. Is omega 6 docosapentaenoic acid an essential fatty acid during early ontogeny in marine fauna? *Limnol. Oceanogr.* 52, 476-479.

- Pernet, F., Bricelj, V.M., Parrish, C.C., 2005. Effect of varying dietary levels of  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 327, 115-133.
- Pickova, J., Brännäs, E., Andersson, T., 2007. Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. Aquacult. Int 15, 305-311.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: Comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54, 2410-2416.
- Plante, S., Chabot, D., Dutil, J.D., 1998. Hypoxia tolerance in Atlantic cod. J. Fish. Biol. 53, 1342-1356.
- Poletto, J.B., Cocherell, D.E., Klimley, A.P., Cech, J.J., Fangue, N.A., 2013. Behavioural salinity preferences of juvenile green sturgeon *Acipenser medirostris* acclimated to fresh water and full-strength salt water. J. Fish. Biol. 82, 671-685.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. Aquaculture 155, 103-115.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. Aquacult. Res. 36, 1488-1499.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture 177, 191-199.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture 155, 117-127.

- Sebert, P., 2002. Fish at high pressure: A hundred year history. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 575-585.
- Smirnov, L.P., Bogdan, V.V., 2006. Temperature pre-adaptation of ectothermal organisms of different organization: Role of the lipid fatty acid composition. *J. Evol. Biochem Physiol.* 32, 134-142.
- Urquhart, A.N., Koetsier, P., 2014. Low-temperature tolerance and critical thermal minimum of the invasive oriental weatherfish *Misgurnus anguillicaudatus* in Idaho, USA. *Trans. Am. Fish. Soc.* 143, 68-76.
- Wen, W., Huang, X., Chen, Q., Feng, L., Wei, L., 2013. Temperature effects on early development and biochemical dynamics of a marine fish, *Inimicus japonicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 442, 22-29.
- Wiegand, M.D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 6, 259-286.
- Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M., Main, K.L., 2009. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture* 287, 335-340.
- Zhou, B.S., Wu, R.S.S., Randall, D.J., Lam, P.K.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *J. Fish. Biol.* 57, 1160-1171.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif général de cette thèse était de comprendre la dynamique d'utilisation et d'incorporation des nutriments dans deux types d'œufs de poissons téléostéens : œuf démersal avec un globule huileux (modèle 1, le doré jaune) et œuf pélagique sans globule huileux (modèle 2, le flétan du Groenland). Plus spécifiquement, nous cherchions à comprendre comment deux catégories d'œufs se comportent pour mobiliser les réserves énergétiques et structurales durant le développement embryonnaire dans le but d'identifier un succès d'éclosion optimal et qui pourrait permettre d'identifier les œufs de meilleure qualité. Dans les trois chapitres de la thèse, nous avons testé la disponibilité et la dynamique d'utilisation et de mobilisation des nutriments en fonction de différents facteurs biotiques et abiotiques : 1) le moment d'ovulation suite à des traitements hormonaux, 2) le régime alimentaire des géniteurs et 3) les faibles niveaux d'oxygène dissous (OD) dans le milieu. Dans cette partie, je discuterai de manière plus globale des aspects liés à la dynamique d'utilisation des réserves lors de l'embryogenèse. Les résultats présentés dans les chapitres précédents nous ont permis de proposer un schéma global (Figure 13) illustrant l'utilisation et l'incorporation des nutriments par l'embryon, selon ses différents besoins, chez deux catégories d'œufs de poisson (modèle 1 et modèle 2). Ce schéma récapitulatif a été obtenu en tenant compte des résultats sur le succès de développement optimal.

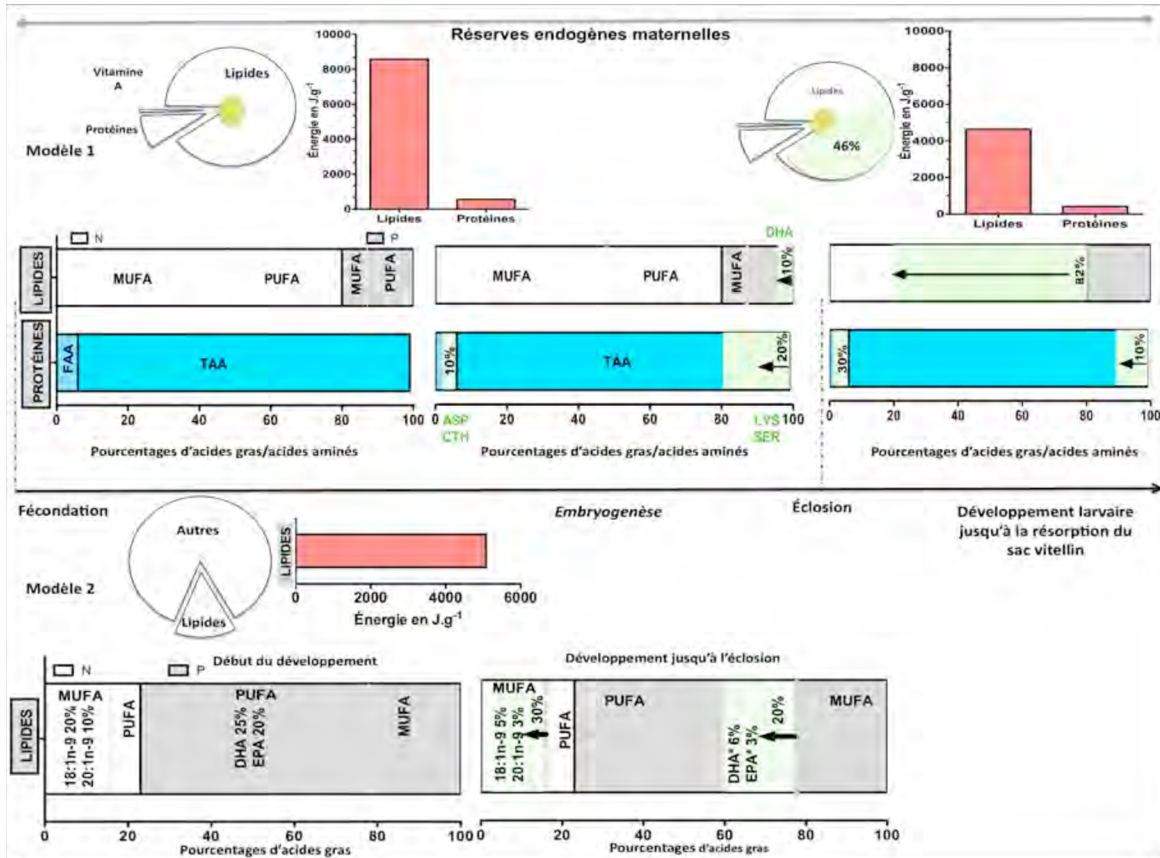


Figure 13. Schéma récapitulatif des stratégies d'utilisation des nutriments durant le développement embryonnaire pour deux modèles d'œufs : modèle 1 (œuf avec globule huileux, doré jaune) et modèle 2 (œuf sans globule huileux, flétan du Groenland). La couleur verte indique la baisse des réserves durant le développement. Les variations en acides aminés LYS, SER, ASP et CTH et l'acide gras DHA expliquent la majeure partie des diminutions de nutriments. \* : indique que ces acides gras étaient positivement corrélés avec le succès d'éclosion. N : lipides neutres, P : lipides polaires, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, DHA : acide docosahexaénoïque, EPA : acide eicosapentaénoïque, FAA : acides aminés libres, TAA : acides aminés totaux, LYS : lysine, SER : serine, ASP : acide aspartique, CTH : cystathionine



## UTILISATION ET INCORPORATION DES NUTRIMENTS

### Les lipides et les acides gras

#### *L'œuf avec globule huileux*

Basé sur les résultats de ce travail, les œufs du modèle 1 sont riches en lipides (220 mg.g<sup>-1</sup> en moyenne), dont 80% sont sous forme neutre et uniquement 20% sous forme polaire. L'équivalent énergétique des lipides correspond à 8580 J.g<sup>-1</sup> (Gnaiger, 1983). L'acide docosahexaénoïque (DHA) de la fraction polaire des lipides y représentait 45% des acides gras (AGs) polaires totaux et était associé à une meilleure qualité des œufs. On a observé au niveau du modèle 1, un niveau élevé d'acides gras polyinsaturés (PUFA) n-3. Au niveau de la fraction neutre, les pourcentages des acides gras monoinsaturés (MUFA) : 18 : 1 n-9 et 20 : 1 n-9 étaient plus élevés dans les œufs de meilleure qualité. Durant le développement, l'utilisation des lipides totaux représentait une baisse de 46%, ce qui correspond à une utilisation d'énergie de 3940 J.g<sup>-1</sup>, de l'éclosion à la résorption du sac vitellin. Cette baisse était caractérisée par des diminutions en DHA de la fraction polaire et de plusieurs AGs présents dans la fraction neutre (baisse de 82%) (Figure 13).

Les œufs riches en lipides sont ceux qui ont un ou plusieurs globules huileux (GH), et ceci indépendamment de leur origine (poissons d'eau douce ou marins). Ces derniers ont également des concentrations élevées en lipides neutres (> 50% des lipides totaux), conservés invariablement sous la forme de globule d'huile (Henderson et Tocher, 1987; Wiegand, 1996b). Chez les espèces d'eau douce comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le grand corégone (*Corgonus clupeiformis*) et le doré jaune (*Sander vitreus*) et les espèces marines comme la daurade royale (*Sparus aurata*), la daurade japonaise (*Pagrus major*), la sole du Sénégal (*Solea senegalensis*), le denté commun (*Dentex dentex*), le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*) dont les œufs possèdent un ou plusieurs GH (modèle 1), les lipides totaux sont caractérisés par des concentrations élevées en PUFA, généralement riches en n-3 PUFA (Anderson et al., 1990; Gunasekera et al., 1999; Mourente et Odriozola, 1990; Mourente et al., 1999; Rønnestad et

al., 1994; Rønnestad et al., 1998; Silversand, 1996; Vazquez et al., 1994). Comme le montre la Figure 13, les pourcentages des PUFA sont importants autant dans la fraction neutre que dans la fraction polaire.

Durant le développement embryonnaire, la dynamique d'utilisation des lipides la plus commune chez les espèces ayant des œufs du modèle 1 est telle qu'observée dans notre étude sur le doré jaune. En effet, on a noté qu'il y a utilisation des PUFA des lipides polaires (10%), pour des besoins énergétiques, et ceci principalement avant l'éclosion. Les lipides totaux et les AGs neutres ont diminué seulement après l'éclosion (respectivement de 46 et 82%). Chez les espèces, avec des œufs du modèle 1, l'utilisation des lipides neutres ne commence qu'après l'éclosion (Mourente et al., 1999; Rønnestad et al., 1994; Rønnestad et al., 1998). Similairement à notre étude, il a été reporté chez la truite arc-en-ciel, la dorade japonaise et le turbot que les AGs polaires étaient utilisés pour des besoins énergétiques durant l'embryogenèse et que les AGs neutres étaient catabolisés, principalement après l'éclosion (Mourente et Vázquez, 1996; Mourente et al., 1999; Rønnestad et al., 1994; Rønnestad et al., 1998). Contrairement à ce qui est communément observé dans les œufs du modèle 1, la dynamique de mobilisation et d'incorporation des lipides peut être différente chez certaines espèces, au sein du même modèle. En effet, chez le bar rayé (*Morone saxatilis*), l'osciète (*Acipenser guldenstaedtii*), les morues de murray (*Maccullochella peeli*) et (*Maccullochella macquariensis*) et la sole sénégalaise, les acides gras neutres sont principalement utilisés pour des besoins énergétiques avant l'éclosion des œufs, et non de l'éclosion à la résorption du sac vitellin. Cependant, les AGs polaires sont sélectivement retenus tout au long du développement (Chu et Ozkizilcik, 1995; Gershanovich et al., 1991; Gunasekera et al., 1999; Mourente et Vázquez, 1996). Ces exceptions montrent qu'une variabilité peut exister au sein d'un même modèle d'œufs.

### *L'œuf sans globule huileux*

Les œufs du modèle 2, qui sont considérés comme pauvres en lipides (130 mg.g<sup>-1</sup> en moyenne), sont constitués de 78% de lipides polaires et de 22% de lipides neutres. L'équivalent des lipides totaux en terme d'énergie correspond à 5070 J.g<sup>-1</sup>. La fraction polaire des lipides est constituée principalement de DHA et d'acide eicosapentaénoïque [EPA] à des teneurs respectives de 25 et 20% des acides polaires totaux, qui sont positivement corrélés avec le succès d'éclosion (Figure 13). Tout au long du développement embryonnaire, 20% des PUFA de la fraction polaire, principalement le DHA et l'EPA sont utilisés pour des besoins énergétiques. Cependant, au niveau de la fraction neutre, 30% des MUFA, principalement le 18 : 1 n-9 et le 20 : 1 n-9, sont sélectivement catabolisés par rapport au PUFA (Figure 13). En effet, chez les œufs sans globules huileux (modèle 2), les lipides vitellins contiennent principalement des phospholipides (PLs), riche en n-3 PUFA, représentant entre 60 et 90% des lipides totaux (Sargent et al., 2002). Durant le développement embryonnaire, les œufs des poissons du modèle 2, qu'ils soient marins ou d'eau douce, montrent un patron d'utilisation des lipides relativement similaire. Ce patron consiste principalement en un catabolisme des PUFA polaires, des MUFA neutres et en une rétention sélective des PUFA neutres. Parmi ces espèces on peut citer la morue franche (*Gadus morhua*), la morue du Pacifique (*Gadus macrocephalus*), le flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*), le hareng (*Clupea harengus*), l'aiglefin (*Melanogrammus aeglefinus*), le merlan (*Merlagus merlangus*), le lieu noir (*Pollachius virens*), le gardon (*Leuciscus rutilus*), la perche (*Percia fluviatilis*), le grand brochet (*Esox Lucius*), le tilapia (*Oreochromis mossambicus*), le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Fraser et al., 1988; Laurel et al., 2010; Tocher et al., 1985; Verreth et al., 1994; Wiegand, 1996b). Similairement à notre étude, une utilisation du DHA de la fraction polaire et une rétention sélective des PUFA de la fraction neutre a été observé au niveau des œufs chez le flétan de l'Atlantique, la morue franche, la plie commune (*Pleuronectes platessa*), le poisson rouge et le hareng, durant l'embryogenèse (Desvillettes et al., 1997; Falk-Petersen et al., 1989; Finn et al., 1995a; Finn et al., 1995b; Wiegand, 1996b). En effet, chez ces derniers, le DHA

représente une source d'énergie importante, dont 40% est catabolisé à partir de la fraction polaire et 20% retenu sélectivement dans la fraction neutre, dans le cas du flétan de l'Atlantique (Rønnestad et al., 1995; Wiegand, 1996a). Enfin, bien que les PUFA aient un rôle bien établi dans la structure et le fonctionnement membranaire, ils peuvent être une source d'énergie importante durant le développement embryonnaire et les premiers stades de développement larvaire. Il s'agit d'une caractéristique commune des œufs de poissons qui sont riches en PLs et dépourvus de globule huileux. Ces derniers vont mobiliser une partie de leurs lipides polaires pour des besoins énergétiques.

Dans les deux modèles, le DHA de la fraction polaire a significativement baissé durant le développement embryonnaire, fort probablement pour répondre à des besoins énergétiques. Dans la fraction neutre, les MUFA : 18 : 1 n-9 et 20 : 1 n-9 représentent un intérêt particulier pour les deux modèles. Ils sont plus importants chez les œufs de meilleure qualité et ont été sélectivement catabolisés chez les œufs du modèle 2. Il a été démontré que les n-9 MUFA ont une origine alimentaire, surtout lorsque les géniteurs sont nourris avec des diètes riches en huiles dérivées de poissons nord Atlantique comme le capelan, le hareng et le maquereau (Sargent, 1995). Dans le cas des géniteurs du doré jaune, ces n-9 MUFA pourraient avoir été obtenus des moules données en supplément alimentaire. Pour les géniteurs du flétan du Groenland, il est probable qu'ils proviennent du capelan, sachant que les géniteurs ont été nourris sur un mélange de diète de capelan (*Mallotus villosus*) et de crevette nordique (*Pandalus borealis*), deux fois par semaine pendant un an, avant le début des expériences. Enfin, les deux modèles représentent différentes stratégies d'utilisation des lipides et des AGs durant le développement embryonnaire. Les œufs du modèle 1 (avec GH) semblent conserver la majeure partie de leurs lipides neutres jusqu'à l'éclosion, et utiliser certains AGs polaires (comme le DHA). Pour les œufs du modèle 2 (sans GH), les PUFA polaires (DHA et EPA) et les MUFA neutres sont catabolisés tout au long du développement, alors que les PUFA des lipides neutres semblent être sélectivement conservés.

## Les protéines et les acides aminés

Au niveau des œufs du modèle 1, les protéines sont constituées de 95% d'acides aminés totaux (TAA) et de 5% d'acides aminés libres (FAA). Bien que la quantité de protéines soit faible (23 mg.g<sup>-1</sup> en moyenne; 560 J.g<sup>-1</sup>), elles sont une source d'énergie non négligeable durant le développement embryonnaire. Il y a une utilisation, de la fécondation à l'éclosion, de 20% des TAA, surtout sous forme de lysine et de sérine, et de 10% de FAA, sous forme d'acide aspartique et de cystathionine (Figure 13). Suite à l'éclosion, ces proportions sont passées à 10 et 30%, respectivement pour les TAA et les FAA. Vu l'absence des résultats concernant le modèle 2, je me baserai, dans cette discussion, sur la littérature pour expliquer les différences entre les deux modèles.

Bien que les FAA et les TAA soient beaucoup plus importants, et leurs rôles beaucoup mieux définis, chez les espèces de poissons marins que celles d'eau douce, il reste que la présence ou l'absence de globule huileux détermine la dynamique d'utilisation de ces nutriments. En général, les œufs des poissons marins (pélagiques et démersaux), au début de l'embryogenèse, contiennent entre 40 et 60% d'acides aminés (AAs) que l'on retrouve dans la matière sèche. Les œufs du modèle 2 (sans GH), contiennent plus que 50% de FAA. Ceci est en opposition avec les œufs démersaux marins et les œufs de poissons d'eau douce (modèle 1) où les FAA représentent entre 2 et 5% des AAs totaux (Thorsen et al., 1993). En effet, durant l'embryogenèse et la phase endogène de développement larvaire, les FAA sont utilisés pour des besoins énergétiques. Cependant, il existe différentes stratégies d'utilisation des FAA. Ceci est relié bien évidemment au biotope (poissons marins ou d'eau douce), mais surtout à la présence ou l'absence du globule huileux. Au niveau des œufs pélagiques avec un ou plusieurs globules huileux comme par exemple le turbot (Finn et al., 1996; Rønnestad et al., 1992a), le bar commun (Gatesoupe, 1986; Rønnestad et al., 1998), le barramundi (*Lates calcarifer*) (Sivaloganathan et al., 1998), la daurade royale (Rønnestad et al., 1994) et la daurade japonaise (Seoka et al., 1997), les FAA sont

principalement utilisés à l'éclosion. En outre, il a été rapporté que pour les œufs du turbot et du bar commun, 70% des FAA sont utilisés pour des besoins énergétiques, alors que le reste est polymérisé en protéines (Rønnestad et al., 1999). Les lipides (principalement les acides gras neutres), provenant du globule huileux, sont principalement utilisés après l'éclosion et comptent pour 80% de l'énergie (voir section lipides et AGs). Cependant, pour les espèces qui ne contiennent pas de globules huileux (modèle 2), comme la morue de l'Atlantique (Finn et al., 1995a), le flétan de l'Atlantique (Finn et al., 1995b; Rønnestad et Fyhn, 1993) et la limande-sole (*Microstomus kitt*) (Rønnestad et al., 1992b), l'utilisation des FAA continue après l'éclosion et avant la résorption du sac vitellin. Lorsque les FAA ne peuvent plus satisfaire les besoins nutritionnels, les TAA sont utilisés (Figure 14). Durant le développement embryonnaire des œufs de la morue franche (œufs modèle 2), les FAA (75%), les AGs polaires (13%) et les AGs neutres (9%) constituent les sources d'énergie. Après éclosion, les proportions des sources d'énergie changent pour 31% FAA, 20% AGs polaires, 17% AGs neutres et 31% protéines. Sommairement, le métabolisme énergétique des larves de morue semble être supporté par 67% d'AAs et 32% de lipides, ce qui suggère que cette séquence de catabolisme énergétique pourrait être applicable à d'autres espèces avec des œufs sans globule huileux.

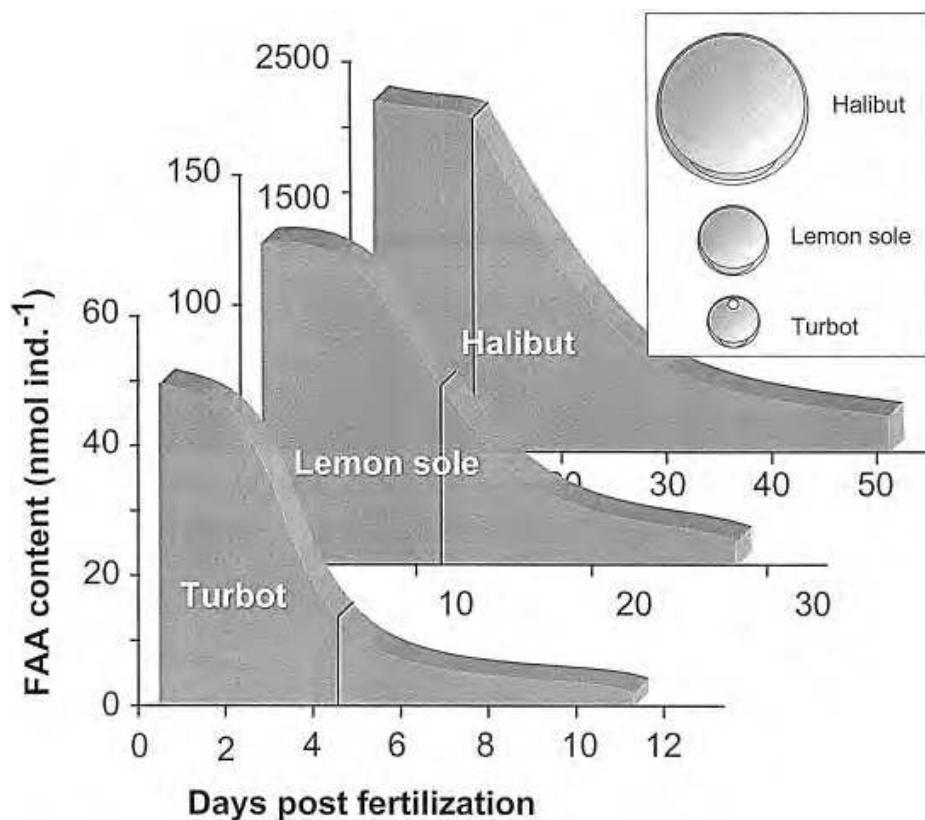


Figure 14. Les changements ontogéniques des acides aminés libres (FAA) dans les œufs de trois espèces dont deux ont des œufs sans globule huileux (modèle 2) et une avec globule huileux (modèle 1). Le moment d'éclosion est représenté par la ligne verticale. Source : Rønnestad et al. (1999)

En conclusion, les besoins énergétiques et structuraux des poissons qui ont des œufs avec globules huileux (modèle 1) sont différents de ceux sans globule huileux, qui dépendent exclusivement des nutriments dans le vitellus (Rønnestad et al., 2003). Les œufs

avec GH (modèle 1) ont un équivalent énergétique de  $9140 \text{ J.g}^{-1}$  (en considérant les lipides [ $8580 \text{ J.g}^{-1}$ ] et les protéines [ $560 \text{ J.g}^{-1}$ ]). De la fécondation à la résorption du sac vitellin, au moins 50% de leur énergie provient d'acides aminés et 50% des lipides neutres. Pour les œufs du modèle 2 (sans GH), l'équivalent énergétique en considérant seulement les lipides est de  $5070 \text{ J.g}^{-1}$ . Pour ces derniers, 70% de l'énergie est fournie par le catabolisme des AAs, et le 30% restant par le catabolisme des lipides neutres et polaires (Rønnestad et al., 1999). Construire un modèle d'œuf pour comprendre la dynamique d'utilisation et d'incorporation des nutriments durant le développement embryonnaire est un travail rendu possible par la synthèse des résultats de nombreux travaux. À titre d'exemple, sur 23 espèces de poissons étudiées (œufs de modèle 2) dans deux régions différentes (Norvège et Panama), les profils des FAA sont relativement similaires, à quelques exceptions près. La petite variabilité peut être attribuée soit à la phylogénie, soit à la latitude (Rønnestad et Fyhn, 1993; Rønnestad et al., 1996; Thorsen et al., 1993).

En se basant sur les résultats de cette étude et la littérature on peut donc définir deux stratégies de mobilisation des nutriments, en fonction du modèle de l'œuf.

Modèle 1 : les AGs neutres seraient conservés durant le développement embryonnaire pour être principalement catabolisés, entre l'éclosion et la résorption du sac vitellin. Avant l'éclosion, les FAA, les protéines et les AGs polaires du vitellus seraient principalement catabolisés.

Modèle 2 : les FAA représenteraient une source importante d'énergie et ceci tout au long du développement embryonnaire, mais surtout après l'éclosion. Les PUFA des lipides neutres seraient retenus sélectivement. Les sources principales d'énergie seraient les FAA, les PUFA polaires et les MUFA neutres.

Certes, il est important de considérer l'appartenance systémique et le biotope lors de l'étude de la mobilisation et l'utilisation des nutriments pendant le développement embryonnaire. Comme démontré dans les trois chapitres de ce travail, une multitude de facteurs influencent l'utilisation des réserves, cependant, un patron général de mobilisation



des nutriments qui prend en compte le type de l'œuf (avec ou sans GH) est utile pour faciliter l'introduction d'une nouvelle espèce en aquaculture, en rendant possible la prévision des stratégies d'incorporation des nutriments au cours du développement embryonnaire. Il manque encore beaucoup d'informations avant de réaliser de véritables modèles bioénergétiques pour les œufs et larves de poisson tel que celui proposé par Jaworski et Kamler (2002). Inclure des variables relatives à l'embryogenèse pourrait constituer un ajout important.

## **PERSPECTIVES ET LIMITES**

### **Limites**

#### *La taurine*

Dans cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois l'importance de certains AAs (sérine, lysine et méthionine) durant l'ontogénie du doré jaune. Toutefois, ceci avait déjà été observé pour d'autres espèces ayant des œufs de la même catégorie (avec GH) (Miles et Chapman, 2008; Simmons et al., 1999). Dans la littérature, au niveau des œufs démersaux et avec GH (modèle 1), la taurine est un AA dominant (Hølleland et Fyhn, 1986; Huxtable, 1992; Rønnestad et al., 1996; Suzuki et Suyama, 1983; Thorsen et al., 1993). Les pourcentages de la taurine étaient de 67 et 74% des FAA, respectivement dans les œufs de lompe (*Cyclopterus lumpus*) et de tétraodon (*Takifugu niphobles*) (Suzuki et Suyama, 1983; Thorsen et al., 1993). Il s'agit d'un acide aminé analogue, qui est un produit de dégradation de la méthionine et de la cystéine chez les poissons (Yokoyama et Nakazoe, 1996; 1998) et qui n'est pas incorporé au niveau des protéines. Il est connu principalement pour son rôle dans l'osmorégulation cellulaire et il est impliqué dans diverses autres fonctions biologiques (Huxtable, 1992; Thoroed et Fugelli, 1994). Nous n'avons pas pu doser la taurine dans notre étude compte tenu des limites de notre méthode de détection des AAs. En effet, la trousse de dosage d'AAs (EZ : faast<sup>TM</sup> GC-FID) ne permet pas la

détection de la taurine et de l'arginine (Clarke et al., 2010). Ceci serait un point à explorer, car il est fort probable que cet AA soit important pour le développement embryonnaire du doré jaune.

### *La vitamine A*

Dans le chapitre 2, nous avons démontré l'importance de la vitamine A pour un meilleur succès d'éclosion chez les œufs du doré jaune et nous avons suggéré que les œufs provenant des géniteurs en élevage, sont probablement déficients en ce micronutriment. Souvent les micronutriments sont sous-estimés dans les études portant sur les performances reproductives et les besoins nutritionnels des géniteurs. Des quantités suffisantes en nutriments comme par exemple l'iode (essentiel pour la production de l'hormone thyroïdienne) et le zinc (un cofacteur dans les récepteurs nucléaires) sont essentiels pour éviter des malformations larvaires et un arrêt du développement embryonnaire. Jusqu'à maintenant, le lien entre 1) le contenu en caroténoïdes et en vitamine A et 2) l'amélioration de la performance reproductrice des géniteurs et la survie embryonnaire est encore méconnu. Des facteurs reliés à l'environnement où les œufs sont incubés peuvent aussi modifier les besoins en vitamines. Il est possible par exemple que l'oxydation soit beaucoup plus importante au niveau des œufs qui contiennent plus de PUFA (Palace et Werner, 2006). Il faut rappeler que les deux modèles étudiés ici sont riches en PUFA. En conséquence, pour des études futures, il serait pertinent d'explorer les besoins en micronutriments afin de clarifier leurs rôles dans le développement embryonnaire.

### *Les acides gras*

Dans ce même chapitre 2, les résultats obtenus ont montré que les pourcentages relatifs en 18 : 2 n-6 et 18 : 3 n-3 sont plus élevés chez les œufs sauvages, avec un meilleur succès d'éclosion, que ceux d'élevage. On a attribué cette différence à la composition en

AGs du régime alimentaire. Cependant, une autre hypothèse possible, n'a pu être vérifiée, soit la possibilité que les processus de désaturation et d'élongation soient actifs chez le doré jaune. En effet, chez certaines espèces de salmonidés et de poissons d'eau douce, comme le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), la truite arc-en-ciel et la carpe commune (*Cyprinus carpio*), la synthèse d'AGs polyinsaturés comme le DHA et l'EPA à partir des précurseurs 18 : 2 n-6 et 18 : 3 n-3 est possible (Henderson, 1996; Owen et al., 1975; Tocher, 2010; Tocher et al., 2003; Tocher et al., 2001; Zheng et al., 2004). Il serait alors intéressant de vérifier cette hypothèse pour le doré jaune de même que de considérer l'incorporation des 18 : 2 n-6 et 18 : 3 n-3, qui pourraient être d'origine végétale (huile de lin, huile de caméline etc), dans le régime alimentaire des géniteurs. Aujourd'hui, le remplacement des farines et huiles de poissons par des produits d'origine végétale (riches en précurseurs), dans la formulation des diètes des géniteurs de poissons, est devenu un besoin urgent pour le développement durable de l'industrie aquacole.

## Perspectives

Dans un contexte plus global, où les écosystèmes marins et d'eau douce sont sévèrement exposés à l'augmentation de la température, de la pollution et de l'hypoxie, l'étude des capacités adaptatives des poissons, surtout les premiers stades de développement, est devenue une priorité. Dans le chapitre 1, nous avons suggéré que la baisse du DHA au niveau des œufs peut être une adaptation cellulaire pour augmenter la perméabilité membranaire suite à l'augmentation de la température durant l'incubation. Nous n'avons pu vérifier cette hypothèse, mais cela pourrait être une piste intéressante. Arriver à démontrer que l'espèce possède une telle capacité adaptative est sans doute utile, dans le contexte actuel où l'augmentation de la température de l'eau de surface dans les rivières et les lacs pourrait varier de +1.5 à +5.8°C en 2100 (Houghton et al., 2001).

Malgré l'absence de démonstration d'une adaptation biochimique en lien avec les AGs dans des conditions hypoxiques, on se doute bien qu'il puisse en exister une, car dans

des conditions d'hypoxie sévères (20%sat en oxygène dissous), le développement embryonnaire a pu se poursuivre jusqu'à éclosion. Il reste donc différentes voies à explorer pour comprendre l'adaptation de l'espèce à de faibles concentrations en oxygène dissous. En effet, quand un organisme est dans un environnement hypoxique, les processus de catabolisme anaérobie peuvent prendre place. Il serait pertinent d'étudier l'intensité et l'efficacité de ces processus relativement aux processus aérobies et les relations mutuelles sous différents niveaux d'OD. En général chez les poissons, l'adaptation à l'hypoxie se fait par une suite de réponses physiologiques, comportementales, biochimiques et moléculaires qui servent soit à optimiser l'apport d'oxygène dans un environnement hypoxique ou à limiter les conséquences potentielles dévastatrices d'une limitation d'oxygène sur les tissus (Martínez et al., 2006; Richards et al., 2008; Scott et al., 2008; Sloman et al., 2008; Sloman et al., 2006; Sollid et al., 2005; Sollid et al., 2003). Étant donné que la survie en hypoxie requiert une réorganisation rapide des systèmes physiologiques et biochimiques pour maximiser la captation de l'oxygène et supporter les réajustements cellulaires nécessaires pour survivre, il serait intéressant d'explorer ces deux pistes.

Enfin, on tient à souligner que l'étude des premiers stades de vie du poisson (les œufs et les larves) est très importante puisqu'ils sont le meilleur témoin de la qualité du milieu aquatique dans lequel ils vivent. Ils constituent la base du recrutement et, chez plusieurs espèces, la dispersion des larves et des œufs dans le milieu peut non seulement affecter la taille de la population, mais également leur structure génétique. Les œufs et les larves sont également soumis aux mêmes défis environnementaux que les poissons adultes, ces défis étant même plus sévères vu leur taille, leur développement incomplet et le fait que leur taille, structure et capacités comportementales et physiologiques changent rapidement au cours du développement. Baumann et al. (2012) ont montré que l'exposition à des taux élevés de CO<sub>2</sub>, chez un poisson estuarien commun (*Menidia beryllina*), entraîne une baisse de survie et de croissance de 18% chez les larves à l'éclosion et de 74% chez les œufs, ces derniers étant encore plus vulnérables. Une telle tendance a été observée chez les larves de la raie des profondeurs (*Leucoraja erinacea*) (Di Santo, 2015). La croissance et la survie des œufs et des larves de l'ombre commun (*Thymallus thymallus*) ont baissé dans les lacs

de la région de la pampa en Argentine suite à l'augmentation de la température notée depuis les 39 dernières années : la période de ponte des géniteurs, qui d'habitude a lieu à la fin du printemps, a été devancée de trois semaines, ce qui a pour effet d'exposer les œufs et les larves à des températures de fond encore froides, les rendant alors plus vulnérables aux pathogènes et à la prédation (Wedekind et Küng, 2010).

## CONCLUSION GENERALE

Suite à ce travail, nous avons mis en évidence certaines caractéristiques propres aux deux espèces étudiées. Nous avons pu :

- 1) déterminer le moment idéal d'ovulation, pendant le cycle reproductif du doré jaune, ce qui permet de donner une meilleure qualité des œufs,
- 2) définir les exigences en nutriments chez les œufs de la même espèce,
- 3) comprendre la dynamique de remodelage des acides gras par les embryons du flétan du Groenland, exposés à des conditions hypoxiques.

Enfin, les résultats des trois chapitres, nous ont permis de proposer un schéma général d'utilisation des nutriments durant l'embryogenèse, pour deux modèles d'œufs (sans et avec globule huileux).

Deux expériences ont été réalisées en pisciculture durant ce projet. Il est connu que l'environnement aquacole expose les poissons de façon répétée à des facteurs de stress aigu (manipulations, transport, etc) ou chronique (confinement, mauvaise qualité environnementale, etc). L'ensemble de ces stress peut avoir des répercussions diverses sur l'état de santé des poissons et sur leurs performances de croissance et de reproduction mais également sur leur comportement alimentaire (diminution de la quantité d'aliment ingérée). Certes, ceci représente une contrainte pour certains aspects de la recherche, mais cela nous permet de confronter nos hypothèses dans des situations réelles de production et ainsi d'obtenir des résultats plus représentatifs de ce qui peut être obtenu en entreprise.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afzal Khan, M., Jafri, A.K., Chadha, N.K., 2005. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita*. *Aquacut. Nutr.* 11, 11-17.
- Ait Youcef, W., Lambert, Y., Audet, C., 2013. Spatial distribution of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* in relation to abundance and hypoxia in the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Fish. Oceanogr.* 22, 41-60.
- Ait Youcef, W., Lambert, Y., Audet, C., 2015. Variations in length and growth of Greenland halibut juveniles in relation to environmental conditions. *Fish. Res.* 167, 38-47.
- Akiyama, T., Shiraishi, M., Yamamoto, T., Unuma, T., 1996. Effect of dietary tryptophan on maturation of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 62, 776-782.
- Alam, M.S., Teshima, S.I., Yaniharto, D., Sumule, O., Ishikawa, M., Koshio, S., 2005. Assessment of reference dietary amino acid pattern for juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquacult. Int* 13, 369-379.
- Aliniya, M., Khara, H., Noveiri, S.B., Dadras, H., 2013. Influence of age of common carp (*Cyprinus carpio*) broodstock on reproductive traits and fertilization. *Turkish. J. Fish. Aquat. Sci* 13, 19-25.
- Anderson, A.J., Arthington, A.H., Anderson, S., 1990. Lipid classes and fatty acid composition of the eggs of some Australian fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.* 96, 267-270.
- Anderson, J.T., 1988. A review of size dependent survival during pre-recruit stages of fishes in relation to recruitment. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 8, 55-66.

- Aragão, C., Conceição, L., Lacuisse, M., Yúfera, M., Dinis, M.T., 2007. Do dietary amino acid profiles affect performance of larval gilthead seabream? *Aquat. Living Resour.* 20, 155-161.
- Barnes, K.R., Cozzi, R.R.F., Robertson, G., Marshall, W.S., 2014. Cold acclimation of NaCl secretion in a eurythermic teleost: Mitochondrial function and gill remodeling. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 168, 50-62.
- Baumann, H., Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2012. Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nat. Clim. Chang.* 2, 38-41.
- Bernatchez, L., Giroux, M., 1991. Guide des poissons d'eau douce du Québec et leur distribution dans l'Est du Canada. La Prairie: Éditions Broquet, Qc, Canada. pp. 69.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 535-548.
- Borlongan, I.G., Benitez, L.V., 1992. Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos*) grown in freshwater and seawater. *Aquaculture* 104, 79-89.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141-166.
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J., 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 13-21.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish. Biol. Fisher* 7, 387-416.
- Bruce, M.P., 1999. Broodstock management and nutrition and egg and larval quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Ph.D. Dissertation. University of Stirling, Stirling UK.



- Bruce, M.P., Shields, R.J., Bell, M.V., Bromage, N.R., 1993. Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquacult. Res.* 24, 417-422.
- Buckley, L.J., Smigielski, A.S., Halavik, T.A., Caldarone, E.M., Burns, B.R., Laurence, G.C., 1991. Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. II. Effects of spawning time and female size on size, composition and viability of eggs and larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74, 125-135.
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Koopman, H.N., 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: A primer on analysis and interpretation. *Mar. Mamm. Sci.* 22, 759-801.
- Burt, A., Kramer, D., Nakatsuru, K., Spry, C., 1988. The tempo of reproduction in *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Characidae), with a discussion on the biology of 'multiple spawning' in fishes. *Environ. Biol. Fishes* 22, 15-27.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerd, J., Mañanós, E., Bromage, N., Ramos, J., Kah, O., 1994. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.). *Neth. J. Zool.* 45, 204-209.
- Carvalho, A.P., Sá, R., Oliva-Teles, A., Bergot, P., 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234, 319-333.
- Cetta, C.M., Capuzzo, J.M., 1982. Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Biol.* 71, 327-337.
- Chambers, R.C., Waiwood, K.G., 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1986-2003.
- Chen, J.N., Takeuchi, T., Takahashi, T., Tomoda, T., Koiso, M., Kuwada, H., 2005. Effect of rotifers enriched with taurine on growth in larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 71, 342-347.

- Chesney, E.J., Baltz, D.M., Thomas, R.G., 2000. Louisiana estuarine and coastal fisheries and habitats: perspectives from a fish's eye view. *Ecol. Appl.* 10, 350-366.
- Chu, F.L.E., Ozkizilcik, S., 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.* 111, 665-674.
- Clarke, M., Parrish, C.C., Penney, R.W., 2010. Free amino acids as an indicator of egg viability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* 108, 6-9.
- Conceição, L., Aragão, C., Rønnestad, I., 2011. Proteins. In: Holt, G.J. (Ed.), *Larval fish nutrition*, Oxford, UK, pp. 105-117.
- Conceição, L., Rønnestad, I., Tonheim, S.K., 2002. Metabolic budgets for lysine and glutamate in unfed herring (*Clupea harengus*) larvae. *Aquaculture* 206, 305-312.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279, 1-20.
- Cowey, C.B., Adron, J., Blair, A., 1970. Studies on the nutrition of marine flatfish: The essential amino acid requirements of plaice and sole. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 50, 87-95.
- Crocke, E.L., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* 38, 291-304.
- Czesny, S., Dabrowski, K., 1998. The effect of egg fatty acid concentrations on embryo viability in wild and domesticated walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquat. Living Resour.* 11, 371-378.
- Dendrinou, P., Thorpe, J.P., 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 61, 121-154.

- Desvillettes, C., Bourdier, G., Breton, J.C., 1997. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in pike (*Esox lucius* L) eggs and larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 381-393.
- DFO, 2006. Assessment of the Greenland halibut stock in the Gulf of St-Lawrence (4RST) in 2005. In: Canadian Science Advisory Secretariat (Ed.). Science Advisory Report, Quebec, Canada, pp. 13.
- DFO, 2012. Aquaculture in Canada 2012: A Report on Aquaculture Sustainability. Fisheries and Oceans Canada, Ottawa, Ontario.
- Di Santo, V., 2015. Ocean acidification exacerbates the impacts of global warming on embryonic little skate, *Leucoraja erinacea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 463, 72-78.
- Diaz, R.J., 2001. Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Qual* 30, 275-281.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia : A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanograph. Lit. Rev.* 33, 245-303.
- Diaz, R.J., Breitburg, D.L., 2009. Chapter 1 The hypoxic environment. In: Richards, J.G., Farrell, A.P., Colin, J.B. (Eds.), *Fish physiology*. Academic Press, pp. 1-23.
- Duarte, C.M., Marba, N., Holmer, M., 2007. Rapid domestication of marine species. *Science* 316, 382-383.
- Dupont-Prinet, A., Vagner, M., Chabot, D., Audet, C., 2013a. Impact of hypoxia on the metabolism of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70, 461-469.
- Dupont-Prinet, A., Pillet, M., Chabot, D., Hansen, T., Tremblay, R., Audet, C., 2013b. Northern shrimp (*Pandalus borealis*) oxygen consumption and metabolic enzyme activities are severely constrained by hypoxia in the estuary and Gulf of St. Lawrence. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 448, 298-307.

- Dyck, M., Warkentin, P.H., Treble, M.A., 2007. A bibliography on Greenland halibut, *Reinhardtius hippoglossoides* (a.k.a. Greenland turbot) 1936-2005. Can. Tech. Rep. Fish Aquat. Sci 2683, pp. 309.
- Escaffre, A.M., Billard, R., 1979. Évolution de la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) laissés dans la cavité abdominale au cours de la période post-ovulatoire. Bull. Fr. Peche. Piscic. 272, 56-70.
- Evans, R.P., Parrish, C.C., Brown, J.A., Davis, P.J., 1996. Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 139, 139-149.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T., Kjørsvik, E., 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. Mar. Biol. 101, 553-556.
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, Rome, pp. 241.
- FAO, 2013. La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture, Rome, pp. 52.
- Fauconneau, B., Aguirre, P., Dabrowski, K., Kaushik, S.J., 1986. Rearing of sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*) larvae: 2. Protein metabolism: Influence of fasting and diet quality. Aquaculture 51, 117-131.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. Aquaculture 279, 70-76.
- Finn, R.N., Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1995a. Respiration, nitrogen and energy metabolism of developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 111, 647-671.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., 1995b. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. Mar. Biol. 124, 355-369.

- Finn, R.N., Fyhn, H.J., Henderson, R.J., Evjen, M.S., 1996. The sequence of catabolic substrate oxidation and enthalpy balance of developing embryos and yolk sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 115, 133-151.
- Finn, R.N., Rønnestad, I., Van der Meeren, T., Fyhn, H.J., 2002. Fuel and metabolic scaling during the early life stages of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 217-234.
- Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., Ratti, F., Chitwood, R., 1987. Viabilities of eggs stripped from coho salmon at various times after ovulation. *Prog. Fish-Cult.* 49, 177-180.
- Fletcher, T.C., 1997. Dietary effects on stress and health. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 223-246.
- Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Brèque, J., Zambonino-Infante, J.L., Kaushik, S.J., 2010. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 303, 40-49.
- Formacion, M.J., Hori, R., Lam, T.J., 1993. Overipening of ovulated eggs in goldfish. I. Morphological changes. *Aquaculture* 114, 155-168.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C., 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*). *Mar. Biol.* 99, 307-313.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Res.* 34, 461-468.
- Gatesoupe, F.J., 1986. The effect of starvation and feeding on the free amino acid composition of sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*). *Océanis* 12, 207-222.
- Gershanovich, A.D., Vaitman, G.A., Vladimirovsky, S.S., Rubtsova, T.E., 1991. Changes in chemical composition of muscle in young hybrids between russian sturgeon

- Acipenser guldenstadti brandt* × beluga *Huso huso* (Pisces; acipenseriformes) under different levels of salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 100, 667-673.
- Gilbert, D., Sundby, B., Gobeil, C., Mucci, A., Tremblay, G.H., 2005. A seventy-two-year record of diminishing deep-water oxygen in the St. Lawrence estuary: The northwest Atlantic connection. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1654-1666.
- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquaculture* 1, 71-124.
- Gnaiger, E., 1983. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Forstner, G.A. (Ed.), *Polarographic oxygen sensors*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 337-345.
- Green, J.A., Hardy, R.W., Brannon, E.L., 2002. The optimum dietary essential: Nonessential amino acid ratio for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which maximizes nitrogen retention and minimizes nitrogen excretion. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 109-115.
- Gross, J., Budowski, P., 1966. Conversion of carotenoids into vitamins A(1) and A(2) in two species of freshwater fish. *Biochem. J.* 101, 747-754.
- Gunasekera, R.M., De Silva, S.S., Ingram, B.A., 1999. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and murray cod, *M. peelii peelii*. *Aquat. Living Resour.* 12, 219-227.
- Gundersen, A.C., Rønneberg, J.E., Boje, J., 2001. Fecundity of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides Walbaum*) in East Greenland waters. *Fish. Res.* 51, 229-236.
- Halver, J.E., Shanks, W.E., 1960. Nutrition of salmonoid fishes: VIII. Indispensable amino acids for sockeye salmon. *J. Nutr.* 72, 340-346.
- Halver, J.E., DeLong, D.C., Mertz, E.T., 1957. Nutrition of salmonoid fishes: V. Classification of essential amino acids for chinook salmon. *J. Nutr.* 63, 95-105.

- Hansen, Ø.J., Puvanendran, V., 2010. Fertilization success and blastomere morphology as predictors of egg and juvenile quality for domesticated Atlantic cod, *Gadus morhua*, broodstock. *Aquacult. Res.* 41, 1791-1798.
- Hardy, R.W., 1985. Importance of study of broodstock nutrition for further development of Aquaculture. In: Lovell, T. (Ed.), *Nutrition and feeding in fish*, London, UK, pp. 395-414.
- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.W., Applebaum, S.W., 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *Br. J. Nutr.* 72, 45-58.
- Haug, T., 1990. Biology of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L., 1758). *Adv. Mar. Biol.* 26, 1-70.
- Hawkins, A.J.S., Wilson, I.A., Bayne, B.L., 1987. Thermal responses reflect protein turnover in *Mytilus edulis* L. *Funct. Ecol.* 1, 339-351.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
- Henderson, R.J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nutr.* 49, 5-22.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347.
- Henrotte, E., Kpogue, D., Mandiki, S.N.M., Wang, N., Douxfils, J., Dick, J., Tocher, D., Kestemont, P., 2011. n-3 and n-6 fatty acid bioconversion abilities in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) at two developmental stages. *Aquacult. Nutr.* 17, 216-225.
- Hølleland, T., Fyhn, H.J., 1986. Osmotic properties of eggs of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* 91, 377-383.
- Honeyfield, D.C., Hinterkopf, J.P., Fitzsimons, J.D., Tillitt, D.E., Zajicek, J.L., Brown, S.B., 2005. Development of thiamine deficiencies and early mortality syndrome in

- lake trout by feeding experimental and feral fish diets containing thiaminase. *J. Aquat. Anim. Health* 17, 4-12.
- Houde, E.D., 1987. Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.* 2, 17-29.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Nogueira, M., Van der Linden, P.J., Xiaosu, V., 2001. Climate change 2001. In: Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Nogueira, M., Van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.), *The scientific basis. Intergovernmental panel on climate change*, Cambridge, UK, pp. 881.
- Houlihan, D.F., Wieser, W., Foster, A., Brechin, J., 1992. In vivo protein synthesis rates in larval nase (*Chondrostoma nasus L.*). *Can. J. Zool.* 70, 2436-2440.
- Houlihan, D.F., Pedersen, B.H., Steffensen, J.F., Brechin, J., 1995. Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at different feeding regimes. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 195-208.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-164.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 261-279.
- Jaworski, A., Kamler, E., 2002. Development of a bioenergetics model for fish embryos and larvae during the yolk feeding period. *J. Fish. Biol.* 60, 785-809.
- Jerez, S., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2012. Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season. *Aquaculture* 350, 54-62.
- Johnston, T.A., 1997. Within-population variability in egg characteristics of walleye (*Stizostedion vitreum*) and white sucker (*Catostomus commersoni*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 1006-1014.



- Johnston, T.A., Miller, L.M., Whittle, D.M., Brown, S.B., Wiegand, M.D., Kapuscinski, A.R., Leggetta, W.C., 2005. Effects of maternally transferred organochlorine contaminants on early life survival in a freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem* 24, 2594-2602.
- Johnston, T.A., Wiegand, M.D., Leggett, W.C., Pronyk, R.J., Dyal, S.D., Watchorn, K.E., Kollar, S., Casselman, J.M., 2007. Hatching success of walleye embryos in relation to maternal and ova characteristics. *Ecol Freshw. Fish* 16, 295-306.
- Jürss, K., Bastrop, R., 1995. Amino acid metabolism in fish. In: Hochachka, P., Mommsen, T. (Eds.), *Fish molecular biology and biochemistry*. Elsevier Press, Amsterdam, Netherlands, pp. 159-189.
- Kabir, M.A., Ghaedi, A., Talpur, A.D., Hashim, R., 2013. Effect of dietary protein levels on reproductive development and distribution of amino acids in the body tissues of female *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) broodstock in captivity. *Aquacult. Res.* 46, 1736-1747.
- Kaitaranta, J.K., Ackman, R.G., 1981. Total lipids and lipid classes of fish roe. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 69, 725-729.
- Kamler, E., 2005. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: An energetics perspective. *Rev. Fish. Biol. Fisher* 15, 399-421.
- Kamler, E., 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 18, 143-200.
- Kennedy, J., Geffen, A.J., Nash, R.D.M., 2007. Maternal influences on egg and larval characteristics of plaice (*Pleuronectes platessa L.*). *J. Sea Res.* 58, 65-77.
- Kjesbu, O.S., 1989. The spawning activity of cod, *Gadus morhua L.* *J. Fish Biol* 34, 195-206.
- Kjørsvik, E., Haug, T., Tjemsland, J., 1987. Spawning season of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in northern Norway. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 43, 285-293.

- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.), *Advances in marine biology*. Academic Press, pp. 71-113.
- Kramer, D., 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environ. Biol. Fishes* 18, 81-92.
- Kunz-Ramsay, Y., 2004. *Developmental biology of teleost fishes*. Springer Netherlands. pp. 636.
- La Frano, M.R., Burri, B.J., 2014. Analysis of retinol, 3-hydroxyretinol and 3,4-didehydroretinol in North American farm-raised freshwater fish liver, muscle and feed. *Aquacult. Nutr.* 20, 722-730.
- Laine, P., Rajasilta, M., 1999. The hatching success of Baltic herring eggs and its relation to female condition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237, 61-73.
- Laurel, B.J., Copeman, L.A., Parrish, C.C., 2012. Role of temperature on lipid/fatty acid composition in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) eggs and unfed larvae. *Mar. Biol.* 159, 2025-2034.
- Laurel, B.J., Copeman, L.A., Hurst, T.P., Parrish, C.C., 2010. The ecological significance of lipid/fatty acid synthesis in developing eggs and newly hatched larvae of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Mar. Biol.* 157, 1713-1724.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367-389.
- Malison, J.A., Procarione, L.S., Kayes, T.B., Hansen, J.F., Held, J.A., 1998. Induction of out-of-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 163, 151-161.
- Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1995. Indispensable amino acid requirements of fish: Correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 240-247.

- Marteinsdottir, G., Begg, G.A., 2002. Essential relationships incorporating the influence of age, size and condition on variables required for estimation of reproductive potential in Atlantic cod *Gadus morhua*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 235, 235-256.
- Martínez, M.L., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A.O., Rees, B.B., 2006. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. J. Exp. Biol. 209, 3851-3861.
- Matsunari, H., Hamada, K., Mushiake, K., Takeuchi, T., 2006. Effects of taurine levels in broodstock diet on reproductive performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Fish. Sci. 72, 955-960.
- McEvoy, L.A., 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. J. Fish Biol. 24, 437-448.
- Mejri, S., Tremblay, R., Lambert, Y., Audet, C., 2012. Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. Mar. Biol. 159, 1693-1701.
- Mellinger, J., 1994. La flotabilité des œufs de téléostéens. L'Année Biologique 33, 117-138.
- Mellinger, J., 1995. Les réserves lipidiques de l'œuf des poissons. L'Année Biologique 34, 63-90.
- Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.), The fish oocyte. Springer Netherlands, pp. 1-37.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: Effects of dietary protein source. J. Exp. Biol. 205, 3107-3122.
- Miles, R.D., Chapman, F.A., 2008. The concept of ideal protein in formulation of aquaculture feeds. Department of fisheries and aquatic sciences, University of Florida, USA. pp. 4.

- Moore, A., Bendall, B., Barry, J., Waring, C., Crooks, N., Crooks, L., 2012. River temperature and adult anadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*. *Fish. Manage. Ecol.* 19, 518-526.
- Morán, P., Marco-Rius, F., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., 2013. Environmental induced methylation changes associated with seawater adaptation in brown trout. *Aquaculture* 392, 77-83.
- Morton, R.A., Creed, R.H., 1939. The conversion of carotene to vitamin A(2) by some fresh-water fishes. *Biochem. J.* 33, 318-324.
- Mourente, G., Odriozola, J.M., 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 8, 93-101.
- Mourente, G., Vázquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 221-235.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Grau, A., Pastor, E., 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecitotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 45-58.
- MPO, 2008. Assessment of the Greenland halibut stock in the Gulf of St-lawrence (4RST) in 2007. In: Canadian Science Advisory Secretariat (Ed.). Science Advisory Report, Quebec, Canada, pp. 15.
- MPO, 2010a. Avis scientifique suivant l'évaluation des risques posés par le doré jaune (*Sander vitreus*) en Colombie-Britannique. Avis scientifique 2010/086, Nanaimo, Colombie-Britannique, Canada.
- MPO, 2010b. Évaluation du doré jaune (*Sander vitreus*) du lac Thathlina, dans les territoires du Nord-Ouest. Avis scientifique 2010/035, Winnipeg, Manitoba, Canada.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516-534.

- Nomura, M., Sakai, K., Takashima, F., 1974. The overrpening of rainbow trout. I. Temporal morphological changes of eggs retained in the body cavity after ovulation. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 40, 977-984.
- Norberg, B., Valkner, V., Huse, J., Karlsen, I., Grung, G.L., 1991. Ovulatory rhythms and egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 97, 365-371.
- Ota, T., Yamada, M., 1971. Lipids of masu salmon *Oncorhynchus masou*. I. Variations of the lipid content and fatty acid composition of juvenile masu salmon during the period of smolt-transformation, and the influence of light upon those variations. Hokkaido Univ. Fac. Fish. Bull 22, 151-158.
- Otterlei, E., Nyhammer, G., Folkvord, A., Stefansson, S.O., 1999. Temperature- and size-dependent growth of larval and early juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): A comparative study of Norwegian coastal cod and northeast Arctic cod. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 2099-2111.
- Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C., Cowey, C.B., 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus L.*, and rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. Lipids 10, 528-531.
- Palace, V.P., Werner, J., 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: A review. Sci. Mar. 70, 41-57.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 256, 395-402.
- Plante, S., Chabot, D., Dutil, J.D., 1998. Hypoxia tolerance in Atlantic cod. J. Fish Biol 53, 1342-1356.
- Poletto, J.B., Cocherell, D.E., Klimley, A.P., Cech, J.J., Fangue, N.A., 2013. Behavioural salinity preferences of juvenile green sturgeon *Acipenser medirostris* acclimated to fresh water and full-strength salt water. J. Fish. Biol. 82, 671-685.

- Power, D.M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M.A., Björnsson, B.T., Einarsdottir, I.E., Canario, A.V.M., Sweeney, G.E., 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 130, 447-459.
- Quintero, H.E., Durland, E., Allen Davis, D., Dunham, R., 2011. Effect of lipid supplementation on reproductive performance of female channel catfish, *Ictalurus punctatus*, induced and strip-spawned for hybridization. *Aquacult. Nutr.* 17, 117-129.
- Rabalais, N.N., Turner, R.E., Wiseman, W.J., 2002. Gulf of Mexico hypoxia, a.k.a. "the dead zone". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 235-263.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Rgensen, L., 1992. Comparative study on the fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 103, 21-26.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Reeds, P.J., 1989. Regulation of protein turnover. In: *Campion, D.R., Hausman, G.J., Martin, R.J. (Eds.), Animal growth and regulation. Plenum Press, New York, NY*, pp. 183-210.
- Richards, J.G., Sardella, B.A., Schulte, P.M., 2008. Regulation of pyruvate dehydrogenase in the common killifish, *Fundulus heteroclitus*, during hypoxia exposure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 295, 979-990.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A., Litvak, M.K., 2004. Paternal effects on haddock early life history traits. *J. Fish. Biol.* 64, 695-701.
- Roley, D., 1983. The effect of diet protein level, feeding level, and rearing water temperature on growth and reproductive performance of rainbow trout broodstock. Dissertation. University of Washington, Washington, USA.
- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.* 1, 239-259.

- Rønnestad, I., Conceição, L., 2005. Aspects of protein and amino acids digestion and utilization by marine fish larvae. In: Starck, J.M., Wang, T. (Eds.), *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 389-416.
- Rønnestad, I., Morais, S., 2008. Digestion. In: Finn, R.N., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish larval physiology*. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 201-262.
- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., Gravningen, K., 1992a. The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.* 114, 517-525.
- Rønnestad, I., Finn, E.P., Groot, H.J., Fyhn, H.J., 1992b. Utilization of free amino acids related to energy metabolism of developing eggs and larvae of lemon sole *Microstomus kitt* reared in the laboratory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88, 1995-1205.
- Rønnestad, I., Robertson, R., Fyhn, H.J., 1996. Free amino acids and protein content in pelagic and demersal eggs of tropical marine fishes. In: MacKinlay, D.D., Eldridge, M. (Eds.), *The fish egg*. American Fisheries Society, Vancouver, Canada, pp. 81-84.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.
- Rønnestad, I., Finn, R.N., Lie, Ø., Lein, I., 1995. Compartmental changes in the contents of total lipid, lipid classes and their associated fatty acids in developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquacult. Nutr.* 1, 119-130.
- Rønnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.* 120, 187-196.
- Rønnestad, I., Koven, W., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1998. Utilization of yolk fuels in developing eggs and larvae of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 162, 157-170.

- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas, G., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: A review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021-1054.
- Saavedra, M., Conceição, L., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., 2008a. Metabolism of tryptophan, methionine and arginine in *Diplodus sargus* larvae fed rotifers: Effect of amino acid supplementation. *Amino Acids* 35, 59-64.
- Saavedra, M., Conceição, L., Helland, S., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., 2008b. Effect of lysine and tyrosine supplementation in the amino acid metabolism of *Diplodus sargus* larvae fed rotifers. *Aquaculture* 284, 180-184.
- Sakai, K., Nomura, M., Takashima, F., Oto, H., 1975. The over-ripening phenomenon of rainbow trout, II. Changes in the percentages of eyed eggs, hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over ripening. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41, 855-860.
- Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O.R., Utne, F., 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 43, 167-177.
- Santiago, C.B., Gonzal, A.C., 2000. Effect of prepared diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *J. Appl. Ichthyol.* 16, 8-13.
- Sargent, J., Tocher, D., Bell, J., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish nutrition* 3rd ed. Elsevier (Academic Press), San Diego, California, pp. 181-257.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of lipids in fish eggs: Nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.R. (Eds.), *Broodstock management and egg larval quality*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 432.



- Scott, G.R., Wood, C.M., Sloman, K.A., Iftikar, F.I., De Boeck, G., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2008. Respiratory responses to progressive hypoxia in the Amazonian oscar, *Astronotus ocellatus*. *Respir. Physiol. Neurobiol* 162, 109-116.
- Seoka, M., Takii, K., Takaoka, O., Nakamura, M., Kumai, H., 1997. Biochemical phases in embryonic red sea bream development. *Fish. Sci.* 63, 122-127.
- Sewall, F.F., Rodgveller, C.J., 2008. Changes in body composition and fatty acid profile during embryogenesis of quillback rockfish (*Sebastes maliger*). *Fish. Bull.* 107, 207-220.
- Shcherbina, M.A., Burlachenko, I.V., Sergeeva, N.T., 1988. Chemical composition of eggs and amino acid requirements of two species of Black Sea mullets, *Mugil cephalus* and *Liza aurata*. *J Ichthyol* 28, 63-69.
- Silversand, C., 1996. Fatty-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Mar. Biol.* 125, 269-278.
- Simmons, L., Moccia, R.D., Bureau, D.P., Sivak, J.G., Herbert, K., 1999. Dietary methionine requirement of juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquacult. Nutr.* 5, 93-100.
- Sivaloganathan, B., Walford, J., Ip, Y.K., Lam, T.J., 1998. Free amino acids and energy metabolism in eggs and larvae of seabass, *Lates calcarifer*. *Mar. Biol.* 131, 695-702.
- Sloman, K.A., Mandic, M., Todgham, A.E., Fangué, N.A., Subrt, P., Richards, J.G., 2008. The response of the tidepool sculpin, *Oligocottus maculosus*, to hypoxia in laboratory, mesocosm and field environments. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 149, 284-292.
- Sloman, K.A., Wood, C.M., Scott, G.R., Wood, S., Kajimura, M., Johannsson, O.E., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2006. Tribute to R. G. Boutilier: The effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 209, 1197-1205.

- Sollid, J., Weber, R.E., Nilsson, G.E., 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. J. Exp. Biol. 208, 1109-1116.
- Sollid, J., De Angelis, P., Gundersen, K., Nilsson, G.E., 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. J. Exp. Biol. 206, 3667-3673.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., 1985. Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 47, 163-172.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliott, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 43, 313-322.
- Srivastava, R.K., Brown, J.A., 1992. Assessment of egg quality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, treated with testosterone-II. Amino acids. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 103, 397-402.
- Srivastava, R.K., Brown, J.A., Shahidi, F., 1995. Changes in the amino acid pool during embryonic development of cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 131, 115-124.
- Stene, A., Gundersen, A.C., Albert, O.T., Nedreaas, K.H., Solemdal, P., 1999. Early development of Northeast Arctic Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). J. Northwest Atl. Fish. Sci. 25, 171-177.
- Suzuki, T., Suyama, M., 1983. Free amino acids and phosphopeptides in the extracts of fish eggs. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 49, 1747-1753.
- Takeuchi, T., Watanabe, T., Ogino, C., 1981. Effects of low protein - high calorie diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 47, 645-654.

- Tandler, A., Harel, M., Koven, W.M., Kolkovski, S., 1995. Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata* new findings on its mode involvement in improving growth, survival and swimbladder inflation. *Isr. J. Aquacult.* 47, 95-111.
- Thibodeau, B., De Vernal, A., Mucci, A., 2006. Recent eutrophication and consequent hypoxia in the bottom waters of the lower St. Lawrence estuary: Micropaleontological and geochemical evidence. *Mar. Geol.* 231, 37-50.
- Thoroed, S.M., Fugelli, K., 1994. Free amino compounds and cell volume regulation in erythrocytes from different marine fish species under hypoosmotic conditions: The role of a taurine channel. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 164, 1-10.
- Thorsen, A., Fyhn, H.J., Wallace, R.A., 1993. Free amino acids as osmo effectors for oocyte hydration in marine fishes. In: Walther, B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and biochemical aspects of fish development*. University of Bergen, Norway, pp. 94-98.
- Tocher, D., Sargent, J., 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids* 19, 492-499.
- Tocher, D., Fraser, A., Sargent, J., Gamble, J., 1985. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 20, 69-74.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquacult. Res.* 41, 717-732.
- Tocher, D.R., Bell, J.R., Dick, J.R., Crampton, V.O., 2003. Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. *Lipids* 38, 723-732.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Mac Glaughlin, P., McGhee, F., Dick, J.R., 2001. Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids:

- Effects of dietary vegetable oil. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.* 130, 257-270.
- Treble, M.A., Campana, S.E., Wastle, R.J., Jones, C.M., 2008. Growth analysis and age validation of a deepwater Arctic fish, the Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1047-1059.
- Trippel, E.A., 1998. Egg size and viability and seasonal offspring production of young Atlantic cod. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127, 339-359.
- Tveiten, H., Jobling, M., Andreassen, I., 2004. Influence of egg lipids and fatty acids on egg viability, and their utilization during embryonic development of spotted wolf-fish, *Anarhichas minor Olafsen*. *Aquacult. Res.* 35, 152-161.
- Urquhart, A.N., Koetsier, P., 2014. Low-temperature tolerance and critical thermal minimum of the invasive oriental weatherfish *Misgurnus anguillicaudatus* in Idaho, USA. *Trans. Am. Fish. Soc.* 143, 68-76.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15452-15457.
- Vazquez, R., Gonzalez, S., Rodriguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis Kaup*). *Aquaculture* 119, 273-286.
- Verreth, J., Custers, G., Melger, W., 1994. The metabolism of neutral and polar lipids in eleuthero-embryos and starving larvae of the African catfish *Clarias gariepinw*. *J. Fish. Biol.* 45, 961-971.
- Wannamaker, C.M., Rice, J.A., 2000. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249, 145-163.
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 73, 3-15.

- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1984. Effect of nutritional quality of broodstock diet on reproduction of *red seabream*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 50, 495-501.
- Watanabe, T., Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124, 223-251.
- Wedekind, C., K ng, C., 2010. Shift of spawning season and effects of climate warming on developmental stages of a grayling (Salmonidae). Conserv. Biol. 24, 1418-1423.
- Whyte, J.N.C., Clarke, W.C., Ginther, N.G., Jensen, J.O.T., 1993. Biochemical changes during embryogenesis of the Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. Aquacult. Res. 24, 193-201.
- Wiegand, M.D., 1996a. Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae. Fish Physiol. Biochem. 15, 21-27.
- Wiegand, M.D., 1996b. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. Rev. Fish. Biol. Fisher. 6, 259-286.
- Wiegand, M.D., Johnston, T.A., Brown, L.R., Brown, S.B., Casselman, J.M., Leggett, W.C., 2011. Maternal influences on thiamine status of walleye *Sander vitreus* ova. J. Fish. Biol. 78, 810-824.
- Wright, P.A., Fyhn, H.J., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion. In: Wright, P.A., Anderson, P.M. (Eds.), Nitrogen excretion. Academic Press, San Diego, CA, pp. 149-200.
- Yokoyama, M., Nakazoe, J., 1996. Intraperitoneal injection of sulfur amino acids enhance the hepatic cysteine dioxygenase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. 15, 143-148.
- Yokoyama, M., Nakazoe, J., 1998. Effect of oral administration of L-cystine on hypotaurine level in rainbow trout. Fish. Sci. 64, 144-147.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase

cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.* 139, 269-279.

Zhou, B.S., Wu, R.S.S., Randall, D.J., Lam, P.K.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *J. Fish. Biol.* 57, 1160-1171.

Zhu, P., Parrish, C.C., Brown, J.A., 2003. Lipid and amino acid metabolism during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquacult. Int* 11, 43-52.