

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

ÉVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES AU
COURS D'UN ÉLEVAGE LARVAIRE DE PLIE ROUGE (*PSEUDOPLEURONECTES*
AMERICANUS)

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

comme exigence partielle

du programme de maîtrise en océanographie

PAR

KIM DOIRON

Septembre 2007

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.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu ma directrice le Dre Karine Lemarchand et mon co-directeur le Dr Réjean Tremblay pour leur soutien et leurs judicieux conseils tout au long de ses deux dernières années. Merci de m'avoir aidée à compléter cette maîtrise et de m'avoir aidée à acquérir un champ d'expertise que je n'avais pas au départ. Je remercie également le Dr Jean-Claude Brêthes et le Dr Jean-Marie Sévigny d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Je tiens également à remercier la Société de Développement de l'Industrie Maricole Inc. (SODIM) pour leur soutien financier.

Je voudrais également remercier mes amis (Antoine, Marilyn, Marianne, Kevin, Nico, Marie-Hélène, Bertrand, Cyril, Étienne, Caro, Sophie, Roland, David, Hacene, Hervé, Pat et Caro) pour leurs conseils ainsi que pour les longues discussions que nous avons pu avoir au cours de cette maîtrise. Je dédie ce mémoire à ma famille, principalement à mes parents qui m'ont toujours encouragée et appuyée pendant ce processus. Merci, car sans vous je n'aurais pas pu concrétiser ce projet.

RÉSUMÉ

A l'heure actuelle, le domaine de l'aquaculture est en pleine expansion et la production de juvéniles de poissons marins de qualité devient un enjeu majeur pour les producteurs aquicoles. Cette production intensive comporte certains risques dont l'apparition de maladies bactériennes provoquée principalement par le pathogène *Vibrio* induisant la hausse du taux de mortalité des stades larvaires. Cette étude a pour but de démontrer l'existence de relations entre la structure des communautés bactériennes et le régime alimentaire fourni à des larves de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*), plus particulièrement lors de l'emploi d'un régime alimentaire riche en acides gras (AG) essentiels reconnus pour leur effet bénéfique sur la croissance larvaire. Les analyses microbiologiques comprenaient des mesures d'abondance totale (analyses d'abondance bactérienne totale par cytométrie en flux) et spécifique (dénombrement des bactéries cultivables et de *Vibrio* sp.) ainsi que des analyses de diversité. Nos résultats ont démontré une augmentation de l'abondance bactérienne totale pour les régimes alimentaires soumis à un ajout d'AG. Les cytogrammes obtenus par cytométrie en flux ont révélé une dynamique de l'évolution des communautés bactériennes dans les bassins différente de celle enregistrée dans le contrôle d'eau de mer. L'abondance des bactéries cultivables a diminué au cours du temps dans tous les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé. L'abondance du pathogène *Vibrio* sp. a subi une augmentation dans tous les bassins d'élevage. De plus, les analyses génétiques ont révélé une diminution du coefficient de Jaccard permettant ainsi d'émettre l'hypothèse que la diversité de communauté a changé au cours du temps d'échantillonnage dans tous les bassins d'élevage quel que soit le traitement employé. Malgré le fait qu'on ait constaté des différences entre les régimes alimentaires, nos résultats n'ont pas démontré si un traitement était avantageux pour améliorer la qualité de l'eau d'élevage et la croissance larvaire.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	ii
RESUME	iii
TABLE DES MATIERES	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
1. INTRODUCTION	1
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	7
2.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	7
2.2 STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE	8
2.3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	9
2.3.1 Dénombrement des bactéries cultivables	10
2.3.2 Dénombrement du pathogène <i>Vibrio</i> sp.	10
2.3.3 Dénombrement des bactéries totales par cytométrie en flux	11
2.3.4 Analyse de la diversité bactérienne	12
2.3.4.1 Diversité des bactéries cultivables	12
2.3.4.2 Diversité des bactéries totales	14
2.4 ANALYSES STATISTIQUES	18
3. RÉSULTATS	19
3.1 ABONDANCE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES	19
3.2 ABONDANCE DES BACTÉRIES CULTIVABLES	31
3.3 ABONDANCE DU PATHOGÈNE <i>VIBRIO</i> SP.	34

3.4	STRUCTURE GÉNÉRALE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES	39
3.4.1	Diversité des bactéries cultivables.....	39
3.4.2	Diversité des bactéries totales.....	40
4	DISCUSSION	44
5	CONCLUSION	53
6	REFERENCES.....	55
7	ANNEXE 1	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Abondance moyenne des bactéries totales (bactéries/mL) et de <i>Vibrio</i> sp. [unité formatrice de colonies/mL (UFC/mL)] en 2005 et en 2006. Pour les différents traitements, l'écart-type est mentionné entre parenthèse	21
Tableau 2 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005 et en 2006.....	21
Tableau 3 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005	22
Tableau 4 : Pourcentage de fluorescence des bactéries totales par rapport au standard interne pour les cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA), les cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA), les cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA) et les cellules à très haute fluorescence (VHFNA). Pour les différentes sous-populations, l'écart-type est mentionné entre parenthèse	23
Tableau 5 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les cultures de rotifères en 2006	27
Tableau 6 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans cultures de rotifères en 2006	27
Tableau 7 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005	33
Tableau 8 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005..	33
Tableau 9 : Résultats de l'analyse de variance du pathogène <i>Vibrio</i> sp. contenu dans les bassins d'élevage en 2005 et des résultats du test de Scheirer-Ray-Hare en 2006.	37

Tableau 10 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance du pathogène <i>Vibrio</i> sp. contenu dans les bassins d'élevage en 2005	37
Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance du pathogène <i>Vibrio</i> sp. contenu dans les cultures de rotifères en 2006.....	38
Tableau 12 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance du pathogène <i>Vibrio</i> sp. contenu dans les cultures de rotifères en 2006..	38
Tableau 13 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-RFLP dans le cas des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005	42
Tableau 14 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005	42
Tableau 15 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2006	43
Tableau 16 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les cultures de rotifères en 2006	43

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux en 2005 (1ère série d'échantillonnage) : (a) eau de mer ; (b) régime alimentaire « Commercial » ; (c) régime alimentaire « Expérimental 1 » ; (1) billes de 1 μm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA). FL1 équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules.....24
- Figure 2 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux en 2006 (2nde série d'échantillonnage) : (a) eau de mer ; (b) régime alimentaire « Expérimental 2 » ; (c) régime alimentaire « Expérimental 3 » ; (1) billes de 1 μm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA). FL1 équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules25
- Figure 3 : Abondance moyenne des bactéries totales par mL pour chaque culture de rotifères en fonction des journées d'échantillonnage en 2006. Les barres verticales représentent les écart-types de mesure28
- Figure 4 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux dans les cultures de rotifères en 2006 : (a) régime alimentaire « Expérimental 2 » ; (b) régime alimentaire « Expérimental 3 » ; (1) billes de 1 μm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA) ;

(5) cellules à très haute fluorescence (VHFNA). FL1 équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules.....30

Figure 5 : Nombre moyen des bactéries cultivables en unités formatrices de colonies (UFC/mL) pour chaque bassin d'élevage en fonction des journées d'échantillonnage en 2005. Les barres verticales représentent les écart-types de mesures32

Figure 6 : Nombre moyen de colonies du pathogène *Vibrio* sp. (UFC/mL) pour chaque culture de rotifères en fonction des journées d'échantillonnage en 2006. Les barres verticales correspondent aux écart-types de mesure36

1. INTRODUCTION

A l'heure actuelle, le domaine de l'aquaculture est en pleine expansion (FAO, 2006). En raison de la surexploitation des stocks naturels et de l'augmentation de la consommation humaine de produits marins, l'industrie aquicole augmente sa production de poissons marins de 10% par année (Tocher *et al.*, 2004). La production de juvéniles de poissons marins de qualité est donc un enjeu majeur (Lee, 2003). Cependant cette production intensive comporte certains risques, comme l'apparition de maladies, particulièrement d'origine bactérienne (Eddy et Jones, 2002). Le confinement en bassin entraîne une hausse du taux de mortalité des stades larvaires qui peut atteindre 80% (Skjermo et Vadstein, 1999).

Les mortalités provoquées par l'émergence des maladies bactériennes ne peuvent pas être attribuées seulement aux bactéries pathogènes obligatoires qui induisent systématiquement la maladie, mais plutôt à une prolifération de bactéries opportunistes pouvant potentiellement développer un pouvoir pathogène envers les larves de poisson comme les genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Cytophaga* et *Flexibacter* (Gomez-Gil *et al.*, 2000). Bien que communément retrouvés dans le milieu marin, ces microorganismes peuvent développer un potentiel pathogène dans les conditions de confinement rencontrées dans les bassins d'élevage (Hansen et Olafsen, 1999 ; Skjermo et Vadstein 1999). Toutefois, les connaissances reliées aux maladies bactériennes sont limitées principalement par le manque d'informations sur l'interaction entre les différentes populations bactériennes et les larves de poisson lors d'un élevage. Le taux

de survie des stades larvaires serait probablement augmenté si les niches écologiques qu'occupent les bactéries pathogènes étaient mieux connues permettant ainsi de diminuer l'apparition des maladies bactériennes (Bergh, 1999).

Les nouvelles technologies utilisées en aquaculture créent un environnement artificiel dans lequel la croissance bactérienne est favorisée, provoquant une augmentation des maladies bactériennes (Skjermo et Vadstein, 1999). Plusieurs facteurs combinés favorisent la prolifération des bactéries opportunistes potentiellement pathogènes comme la haute densité de larves par bassin, les particules organiques issues de la décomposition larvaire, la matière organique en suspension ainsi que l'introduction de bactéries *via* la nourriture vivante fournie aux larves (ex. rotifères) (Skjermo et Vadstein, 1999). La diminution de la qualité de l'eau (disponibilité réduite de la concentration de l'oxygène et l'augmentation de la matière organique) et les régimes alimentaires inadéquats peuvent également contribuer à augmenter le taux d'infection des stades larvaires par des bactéries opportunistes potentiellement pathogènes *via* la diminution de la résistance des larves dans ces conditions de stress (Diggles *et al.*, 2000). L'évolution des variables environnementales joue un rôle très important pour le succès des élevages larvaires, particulièrement dans un milieu artificiel. Lors de stress environnementaux comme le changement de température, de salinité, de concentration d'oxygène ou l'introduction de différents polluants, les premières lignes de défense des stades larvaires sont brisées principalement au niveau des mucus permettant ainsi aux bactéries de coloniser et de pénétrer les tissus larvaires hôtes (Hansen et Olafsen, 1999).

Les bactéries opportunistes potentiellement pathogènes peuvent être introduites dans les bassins d'élevage à partir de deux sources principales, soit l'eau d'alimentation apportant la microflore bactérienne de l'environnement marin naturel dans le système aquicole, et la nourriture fournie aux larves. L'alimentation première des larves est à base de rotifères (*Brachionus plicatilis*) et de microalgues. Une étude effectuée par Rombaut *et al.*, (2001) démontre la nécessité d'une communauté bactérienne dans le milieu environnant pour le succès des cultures de rotifères. Plus la communauté bactérienne est importante, plus les rotifères se développeront efficacement. Il apparaît également que leur microflore dominante est composée de genres bactériens dont *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Moraxella* sp. et *Flavobacterium* sp. La prolifération bactérienne peut être favorisée par l'accumulation de fèces au fond des bassins d'élevage. Les fèces ne pouvant pas être entièrement éliminées durant le nettoyage des bassins d'élevage, celles-ci fournissent une source de matière organique supplémentaire permettant la croissance des bactéries environnantes (Vaseeharan et Ramasamy, 2003).

En conditions naturelles, la microflore des larves reflète celle présente naturellement dans leur environnement aquatique (Skjermo et Vadstein, 1999). Les bactéries présentes dans l'environnement et dans la nourriture vivante sont les premières colonisatrices du système digestif des larves (Grisez *et al.*, 1997). Dans les bassins d'élevage larvaire intensif, la diversité microbienne peut être altérée par l'utilisation d'eau stérilisée, l'ajout de microalgues, de rotifères ou d'antibiotiques. La communauté bactérienne protégeant les larves face à l'apparition des maladies pourrait ne pas se développer dans l'environnement et dans le système digestif des larves. Survient alors une susceptibilité

plus grande des larves face aux maladies bactériennes lorsqu'elles sont exposées à un stress environnemental ou à des bactéries pathogènes, particulièrement lors de l'ouverture de la bouche des larves (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Gatesoupe, 1999). Pour contrer la prolifération des bactéries pathogènes, plusieurs méthodes peuvent être utilisées comme l'irradiation par UV et l'ozonisation de l'eau d'alimentation, la présence des filtres à l'entrée des bassins ainsi que l'utilisation d'antibiotiques (Lee, 2003). Cependant, ces méthodes modifient la diversité des communautés bactériennes naturellement présentes et peuvent dans certains cas favoriser la croissance des bactéries pathogènes. Après une désinfection, la concentration des nutriments est faible permettant ainsi aux bactéries les plus compétitives pour la ressource naturelle et possédant un haut taux de croissance de proliférer (Olafsen, 2001). De plus, la surutilisation d'antibiotiques peut entraîner la sélection de bactéries résistantes au traitement. Cette résistance peut être transférée aux générations suivantes et rendre l'emploi des antibiotiques inutilisable (Gomez-Gil *et al.*, 2000).

A la suite de l'apparition de la résistance des bactéries aux antibiotiques classiquement utilisés en aquaculture, d'autres techniques ont été utilisées pour contrer la prolifération des bactéries pathogènes sans nuire à l'équilibre naturel des communautés bactériennes. La première approche est l'utilisation de probiotiques dans les bassins d'élevage. La seconde approche est l'augmentation de la teneur en acides gras essentiels dans l'alimentation des rotifères par l'enrichissement en microalgues (Lee, 2003).

Harel *et al.* (2002) ont démontré que la présence d'acides gras (AG) essentiels dans le régime alimentaire augmentait la résistance des stades larvaires aux maladies bactériennes. Toutefois, le mode d'action de ces AG essentiels reste méconnu. Les AG essentiels sont de type oméga-3 (n-3), comme l'acide docosahéxaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) ou de type oméga-6 (n-6), comme l'acide arachidonique (AA). Il a été prouvé que ces AG essentiels augmentaient la croissance et le taux de survie larvaire (Harel *et al.*, 2002). Par conséquent, on peut supposer que la présence d'AG essentiels dans un régime alimentaire favoriserait la dominance des bactéries bénéfiques au détriment des bactéries pathogènes.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, l'influence de différents régimes alimentaires riche en AG a été testée sur la dynamique des communautés bactériennes des bassins d'élevage larvaires de plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*). Le choix des régimes alimentaires a été effectué en fonction de leur composition en AG. Lors de cette étude, les larves de plie rouge ont été utilisées en raison de leur potentiel économique au Québec ainsi que des multiples travaux actuellement en cours à la station aquicole de l'ISMER à Pointe-au-Père (Québec). Les analyses microbiologiques ont été effectuées à partir de l'eau se trouvant dans les bassins d'élevage et non à partir du système digestif des larves, en raison de la similarité reconnue entre la microflore intestinale des larves et celle retrouvée dans l'eau des bassins d'élevage (Skjermo et Vadstein, 1999). Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier de la Société de Développement de l'Industrie Maricole Inc. (SODIM). De plus, ce projet est le début d'une caractérisation

de la microflore bactérienne dans les élevages larvaires qui servira au développement et à la production de nouveaux probiotiques.

L'objectif principal de cette étude est de démontrer que le régime alimentaire procuré à des larves de plie rouge influence l'abondance et la diversité des bactéries présentes dans les bassins d'élevage. Un parallèle sera établi entre ces observations et la croissance larvaire. Ce projet s'intègre dans une étude globale financée par la SODIM portant sur la teneur en AG essentiels contenue dans les larves de plie rouge. L'analyse de l'abondance et de la diversité bactérienne a été réalisée à l'ISMER dans le cadre de ce projet de maîtrise tandis que les analyses portant sur le contenu en AG des larves de plie rouge, réalisées à l'Institut de Recherches sur les Zones Côtière (IRZC) de Shippagan (Nouveau-Brunswick), font l'objet du travail de doctorat de Laurent Seychelles (PhD Océanographie UQAR-ISMER).

Deux objectifs spécifiques découlent de l'objectif principal de l'étude. Le premier objectif spécifique est de suivre l'évolution de la diversité et de l'abondance bactériennes dans des bassins d'élevage contenant des larves, selon différents régimes alimentaires fournis aux rotifères. Le deuxième objectif spécifique est de déterminer l'abondance de *Vibrio* sp. selon les différents régimes alimentaires. De ces objectifs spécifiques, deux hypothèses nulles ont pu être émises soit : (1) H_0 : le régime alimentaire n'influence ni la diversité ni l'abondance bactérienne dans les bassins d'élevage et (2) H_0 : le régime alimentaire n'influence pas l'abondance de la bactérie opportuniste potentiellement pathogène du genre *Vibrio* sp.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

L'expérimentation s'est déroulée à la station aquicole de Pointe-au-Père (Québec) durant l'élevage larvaire de plie rouge. L'échantillonnage consistait au suivi microbiologique d'eau récoltée dans quatre bassins d'élevage de 55 litres (38 cm * 66 cm) lors de deux séries d'élevage larvaire de 26 jours. La première série a été effectuée durant les mois de mai et juin 2005 tandis que la seconde série a été réalisée à la même période en 2006. L'eau se trouvant dans les bassins provenait de l'estuaire du Saint-Laurent, et était filtrée à travers un lit de gravier avant l'introduction dans les bassins.

Durant l'expérimentation, différents régimes alimentaires ont été fournis aux rotifères alimentant les larves, afin de tester l'effet du régime alimentaire sur la dynamique des communautés bactériennes et la croissance larvaire. En 2005, le premier régime alimentaire était une formulation sèche commerciale appelée Selco 3000 (INVE, Inc.) (« Commercial ») tandis que le second régime alimentaire consistait en un mélange expérimental à biomasse égale de trois microalgues reconnues pour leur haute teneur en AG essentiel (c.à.d. *Nannochloropsis* sp., *Chaetoceros muelleri* et *Isochrysis galbana*) (« Expérimental 1 »). En 2006, deux nouveaux régimes alimentaires ont été testés. Le premier consistait en une combinaison de la formulation sèche Easy Selco (INVE, Inc.) et des trois espèces de microalgues utilisées en 2005 à biomasse égale (« Expérimental 2 »). Le deuxième consistait en cette même composition à laquelle un

supplément artificiel d'acide arachidonique (AA) était ajouté ($1 \mu\text{g}$ de AA pour 10^6 cellules de phytoplancton) (« Expérimental 3 »). Chaque régime alimentaire était testé sur deux bassins contenant environ 14 000 larves.

2.2 STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons d'eau ont été prélevés à des journées spécifiques, soit aux jours 4, 15 et 26 de la croissance larvaire. En 2006, un prélèvement d'eau additionnel a été fait au jour 0, correspondant à la signature de l'eau se trouvant dans les bassins avant l'introduction des larves. Ce prélèvement correspondait à notre témoin initial. Le jour 4, correspond à l'ouverture de la bouche des larves et au début de l'alimentation en rotifères, le jour 15, au milieu de la croissance larvaire et le jour 26, à l'arrêt de l'alimentation en rotifères et au passage à un régime alimentaire à base d'artémies. Deux échantillons de contrôle ont été prélevés à chaque temps d'échantillonnage, l'eau de mer entrante dans les bassins ainsi que l'eau verte alimentant les bassins. L'eau verte, constituée par un ajout de microalgues, permet d'accroître la turbidité dans les bassins et elle est essentielle à une bonne croissance larvaire en plus de faciliter la propension des larves à trouver les proies (Lee, 2003). En 2006, à la suite des résultats de 2005, le témoin d'eau verte a été supprimé, et remplacé par des prélèvements d'eau des milieux de croissance des rotifères. Le volume d'eau verte introduit dans les bassins d'élevage est négligeable (quelques mL) étant donné la forte concentration de cellules phytoplanctoniques de cette eau ($6,82 \times 10^8$ cellule/L) comparativement à celui introduit *via* l'alimentation en rotifères qui équivaut à plusieurs litres (Cf. environ 5

individus/mL) (Laurence, 1977). De plus, les cultures de rotifères nécessitent la présence d'une communauté bactérienne dans leur milieu d'élevage pour obtenir une croissance optimale (Rombaut *et al.*, 2001) et, sont susceptibles de véhiculer des communautés bactériennes différentes de celles introduites par l'eau de mer entrante et, ainsi être une contribution non négligeable pour le développement des bactéries dans les bassins. A chaque temps d'échantillonnage, deux échantillons de 500 mL ont été récoltés. Ces échantillons ont été par la suite analysés au laboratoire d'écologie microbienne (ISMER) dans un délai de 4 heures.

2.3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

L'abondance et la diversité bactérienne dans l'eau des bassins d'élevage ont été étudiées en fonction du régime alimentaire fourni aux larves. Les analyses comprenaient des méthodes traditionnelles de culture bactérienne qui ont permis de mettre en évidence (1) la fraction de bactéries cultivables et (2) la présence d'un pathogène spécifique, *Vibrio* sp. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas d'accéder à la diversité totale des communautés, car seule une fraction minime des bactéries marines est cultivable (González *et al.*, 2004; Phung *et al.*, 2004). De ce fait, ces analyses ont été complétées par l'emploi de méthodes moléculaires exemptes d'étape de culture. Une amplification par polymérisation en chaîne (PCR) du gène 16S de l'ADNr a permis (1) de caractériser les isolats cultivables par l'analyse d'un polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) et (2) de caractériser la diversité des bactéries totales

par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (Phung *et al.*, 2004; Ercolini *et al.*, 2001).

2.3.1 Dénombrement des bactéries cultivables

Chaque échantillon d'eau a été dilué successivement au dixième et au centième dans de l'eau de mer stérile. Pour chaque dilution, 100 μL d'eau ont été inoculés sur un milieu nutritif adapté à la culture des bactéries marines [gélose marine agar (MA2216; Difco, Détroit, Mich.)]. Les géloses ont été réalisées en triplicata et incubées à température ambiante, à l'obscurité durant 2 semaines. Le dénombrement des bactéries cultivables a été effectué après 72 heures, 1 semaine et 2 semaines d'incubation afin de ne pas sous-estimer l'abondance des communautés bactériennes à faible vitesse de croissance. Les dénombrements ont été réalisés sur les géloses présentant de 10 à 150 colonies tel que recommandé dans la littérature (Nicolas *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Chaque morphotype bactérien caractéristique (couleur, texture, forme) a été purifié afin d'obtenir une culture pure en milieu marine broth (MB2216; Difco, Mich.). Les souches ainsi isolées ont été ensuite conservées dans du glycérol 40% (vol/vol) à -80°C jusqu'à analyse ultérieure.

2.3.2 Dénombrement du pathogène *Vibrio* sp.

Les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes de nitrocellulose quadrillées de 47 mm de diamètre et de porosité 0,45 μm (Fisher Scientific, Pittsburgh).

Différents volumes ont été analysés (1, 10, 50 et 100 mL) en triplicata sur un milieu TCBS, spécifique à la culture de *Vibrio* (Merck KgaA, Germany). Après 24 et 48 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, les colonies caractéristiques de *Vibrio* sp. (colonies jaunes, rondes et brillantes possédant un halo) ont été dénombrées sur les milieux présentant entre 30 et 150 colonies (Lacoste *et al.*, 2001 ; Diggles *et al.*, 2000).

2.3.3 Dénombrement des bactéries totales par cytométrie en flux

Pour chaque échantillon, 4 mL d'eau ont été fixés au formaldéhyde tamponné (2% concentration finale, pH 7) dans des cryotubes de 5 mL, en duplicata, et congelés à -80°C avant leur analyse par cytométrie en flux. De ces échantillons, 1 mL d'eau a été marqué par $0,25\ \mu\text{L}$ (Cf. 2 500X) de SYBR Green I (Molecular Probes, Oregon), un marqueur fluorescent des acides nucléiques. Les échantillons ont été marqués pendant 30 minutes à l'obscurité et $10\ \mu\text{L}$ de billes fluorescentes de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre (Fluoresbrite Plain, YG) ont été ajoutés comme standard interne (Lebaron *et al.*, 2002). Les échantillons marqués ont été analysés par un cytomètre en flux (EPICS Altra, Beckman-Coulter) équipé d'un laser argon de longueur d'onde d'excitation de 488 nm pendant 3 minutes. L'abondance des cellules bactériennes a été déterminée à partir d'un cytogramme représentant les paramètres SSC (taille) par rapport à FL1 (fluorescence à 525 nm). A l'aide du logiciel WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute), la sous-population des cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) a été séparée de la

sous-population à faible teneur en acides nucléiques (LNA) afin de déterminer la structure des populations bactériennes (Lebaron *et al.*, 2002).

2.3.4 Analyse de la diversité bactérienne

2.3.4.1 Diversité des bactéries cultivables

Après une culture de 24 heures en bouillon marine broth, 1 mL de la culture clonale a été prélevé et transféré dans un tube stérile de 1,5 mL. Chacun des tubes a été centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 rpm. Les culots obtenus ont été lavés avec 1 mL d'eau saline EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) à pH 8 (0,5 M de chlorure de sodium [NaCl] et 0,01 M EDTA), et centrifugés pendant 5 minutes à 12 000 rpm. 300 μ L d'une solution contenant 1 mg de lysozyme dans 1 mL d'eau saline EDTA ont été ajoutés aux culots, et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. 200 μ L de SDS 10% (sulfate de sodium dodecyl) ont été ajoutés, et mis en agitation pendant 5 minutes avant l'ajout de 25 μ L de protéinase K (20 mg/mL). Afin d'obtenir une lyse optimale, les tubes ont été incubés pendant 2 heures à 37°C dans un bain-marie.

L'ADN de chaque souche a été extrait par l'ajout d'un volume de phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25:24:1) suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 12 000 rpm. Cette opération a été réalisée deux fois au cours desquelles la phase aqueuse a été conservée. Un volume d'isopropanol 100% a été ajouté à la phase aqueuse, et agité

jusqu'à l'obtention d'une pelote d'ADN, et les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 1 mL d'éthanol 70% suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 12 000 rpm. Les tubes ont été séchés à l'air pendant 10 minutes et le culot repris dans 100 μ L d'eau stérile. Les tubes ont été congelés à -20°C jusqu'à l'amplification de l'ADN par PCR (Agogué *et al.*, 2005 ; Dumestre *et al.*, 2001).

Le gène 16S de l'ADNr est un gène très conservé dans les espèces bactériennes et couramment utilisé pour analyser la diversité bactérienne d'échantillons environnementaux (Sugita *et al.*, 2005 ; González *et al.*, 2004 ; Sandaa *et al.*, 2003 ; Nicolas *et al.*, 1996). Un ensemble d'amorces universelles a été utilisé : (1) Sadir (5'-AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AGA-3'), (2) S17 Rev (5'-GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT-3') selon le protocole de Agogué *et al.* (2005). Le mélange réactionnel consistait en 5 μ L de tampon PCR 10X (QIAGEN), 200 μ M d'un mélange de déoxynucléotide triphosphate (Biolabs Inc., New England), 50 pmol de chaque amorce, 1 U de Hotstar Taq polymérase (QIAGEN), 1 μ L d'ADN dans 50 μ L d'eau stérile. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type MyiQTM thermal cycler (Bio-Rad) selon le schéma suivant : une dénaturation initiale à 94°C pendant 15 minutes, suivi par 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C , 1 minute d'hybridation des amorces à 48°C et une minute d'élongation à 72°C . L'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 10 minutes. Les amplicons résultants ont été révélés sur un gel d'agarose 1% à 90 volts pendant 75 minutes. Après un marquage au bromure d'éthidium les gels ont été analysés sous rayonnement UV à l'aide de l'appareil

AlphaImager[®] HP (AlphaInnotech). Par la suite, les amplicons ont été purifiés à l'aide de colonne de purification MinElute[®] (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant.

Le dosage de chaque amplicon a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre DU[®]800 (Beckman-Coulter) à la longueur d'onde de 260 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorption de l'ADN. Ainsi, la concentration d'amplicon dans chacun des échantillons a pu être calculée (Lemarchand *et al.*, 2005).

Les RFLP ont été réalisés par la digestion des amplicons par l'enzyme de restriction HinP1I selon le protocole de Agogué *et al.* (2005), dans le tampon Nebuffer2 (Biolabs, New England) à 37°C pendant 16 heures. Les empreintes génétiques des souches bactériennes ont été révélées par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1,5% dans les mêmes conditions que pour l'amplification d'ADN (e.g. paragraphe 2.3.4.1). Les produits de la digestion représentaient une empreinte génétique pour chaque souche bactérienne isolée. Les gels ont été comparés entre eux grâce au logiciel AlphaImager[®] HP (AlphaInnotech).

2.3.4.2 Diversité des bactéries totales

Entre 20 et 100 mL d'eau ont été filtrés en duplicata sur des filtres de polycarbonate (PC) blanc de 25 mm de diamètre et de porosité 0,2 μm (ISOPORE[™]), dépendamment

de la turbidité des échantillons et du colmatage subséquent des filtres, ceux-ci ont été congelés à -20°C avant d'effectuer les extractions d'ADN nécessaires.

Les filtres ont été coupés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel stérile et transférés dans un tube stérile de 1,5 mL. Dans chacun des tubes, 840 μL de tampon de lyse à pH 8 (40 mM EDTA, 50 mM TRIZMA base et 0,75 M de sucrose) et 50 μL de lysozyme (20 mg/mL) ont été ajoutés, et les tubes ont été incubés à 37°C dans un bain-marie pendant 45 minutes selon le protocole développé à l'observatoire océanologique de Banyuls sur mer par Jean-François Ghiglione (communication personnelle). Ensuite, 100 μL de SDS 10% et 10 μL de protéinase K (20 mg/mL) ont été ajoutés avant incubation pendant 1 heure à 55°C .

L'ADN a été extrait par l'ajout de 900 μL de phénol-chloroforme-isoamyl-alcool (25:24:1) suivi par une centrifugation de 10 minutes à 12 000 rpm. Cette opération a été réalisée deux fois en conservant la phase aqueuse. Ensuite, un volume de 800 μL de chloroforme-isoamyl alcool (24:1) a été ajouté suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 12 000 rpm en conservant la phase aqueuse. Après l'ajout d'un volume d'isopropanol 100%, les tubes ont été congelés à -20°C pendant 2 heures pour permettre la précipitation de l'ADN. Les tubes ont été centrifugés pendant 30 minutes à 13 200 rpm. Après l'élimination du surnageant, 500 μL d'éthanol 70% ont été ajoutés, et centrifugés pendant 20 minutes à 13 200 rpm. Le surnageant a été éliminé, et les tubes ont été placés dans un évaporateur VacufugeTM (Eppendorf) pendant 20 minutes pour éliminer

l'éthanol. Finalement, 5 μL de RNase A (10 mg/mL) ont été ajoutés pour digérer l'ARN présent dans les tubes.

Chaque échantillon a été dilué au centième et placé dans une microcellule Hellma de 5 μL en quartz Suprasil[®] (Hellma[®]). Le dosage a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre DU[®]800 (Beckman-Coulter) à des longueurs d'onde de 260 nm, de 270 nm et de 280 nm. La longueur d'onde de 260 nm correspond à la longueur d'onde d'absorption de l'ADN, et a permis de calculer la concentration de l'ADN de chacun des échantillons. Le ratio 260/280 a permis de vérifier la pureté de la solution (Lemarchand *et al.*, 2005) et le ratio 260/270 a permis de vérifier une éventuelle contamination au phénol (Planken *et al.*, 2005).

Le gène 16S de l'ADNr a été amplifié par PCR en utilisant un ensemble d'amorces universelles : (1) 341F-GC (5'-CGC-CCG-CCG-CGC-CCC-GCG-CCC-GTC-CCG-CCG-CCC-CCG-CCC-GCC-TAC-GGG-AGG-CGA-CAG-3'), (2) 907R (5'-CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT-3') selon le protocole de Schäfer et Muyzer (2001). Le mélange réactionnel était composé de 5 μL de tampon PCR 10X (QIAGEN), 200 μM d'un mélange de déoxynucléotide triphosphate (Biolabs Inc., New England), 50 pmol de chaque amorce, 1 U de Hotstar Taq polymérase (QIAGEN), 200 ng d'ADN et de l'eau stérile (qsp. 50 μL). L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type Mastercycler[®] epS (Eppendorf). Les cycles d'amplification ont été les suivants : une dénaturation initiale à 94°C pendant 15 minutes, suivi par 20 cycles de 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation des amorces à 65°C avec une diminution de

la température de 0,5°C «touchdown» à chaque cycle et 3 minutes d'élongation à 72°C. Par la suite, 15 cycles de 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation des amorces à 55°C et de 3 minutes d'élongation à 72°C ont été appliqués. L'élongation finale a été faite à 72°C pendant 7 minutes. Chaque échantillon a été amplifié en triplicata (Perreault *et al.*, 2007). Les amplicons résultants ont été révélés sur un gel d'agarose 1% dans les mêmes conditions que précédemment discutées (e.g. paragraphe 2.3.4.1) (Agogué *et al.*, 2005). Les amplicons ont été purifiés à l'aide de colonne de purification MinElute® (QIAGEN) selon les recommandations du manufacturier, et congelés à -20°C avant l'analyse par DGGE.

La migration a été réalisée à l'aide du système DGGE-4001-Rev-B (C.B.S. Scientific CO.). La migration des amplicons s'est effectuée sur un gel de polyacrylamide (37,5:1) 6% comprenant un gradient de dénaturation de 20 à 80% d'urée et de formamide selon les recommandations du manufacturier à un voltage et un ampérage constant de 100 volts et 35 milliampères pendant 13 heures (Schäfer et Muyzer, 2001). Après migration, le gel a été marqué dans un bain de SYBR Green I (Molecular Probes, Oregon) pendant 40 minutes. Les bandes ont été révélées sous rayonnement UV grâce à l'appareil AlphaImager®HP (AlphaInnotech). Les gels ont été comparés entre eux grâce au logiciel AlphaImager®HP (AlphaInnotech).

2.4 ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus pour la partie de la biodiversité bactérienne ont été traités par une analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) avec réplication grâce au logiciel SYSTAT 11. Les conditions de l'analyse de variance ont été vérifiées par les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene. Le test de comparaison multiple de Tukey a été effectué lorsque des différences étaient détectées. Lorsque les conditions de l'ANOVA n'ont pas été respectées, le test non-paramétrique Scheirer-Ray-Hare a été appliqué. Pour la section de la diversité bactérienne, les empreintes génétiques obtenues par les RFLP et la DGGE ont été analysées à l'aide d'un indice de similarité soit le coefficient de Jaccard grâce à la formule suivante : $S_{\text{Jaccard}} = N_{AB}/(N_A+N_B-N_{AB})$ où N_{AB} = nombre de bandes en commun entre l'échantillon A et l'échantillon B ; N_A = nombre totale de bandes de l'échantillon A et N_B = nombre totale de bandes de l'échantillon B.

3 RÉSULTATS

3.1 ABONDANCE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES

Lors de la première série d'échantillonnage, les abondances bactériennes entre les différents bassins d'élevage diffèrent significativement (tableau 1). En effet, l'analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) démontre des différences significatives entre les abondances bactériennes (bactéries totales) des différentes journées d'échantillonnage et les régimes alimentaires des rotifères alimentant les larves de plie rouge (tableau 2). L'abondance moyenne des bactéries totales diminue au cours du temps dans le contrôle d'eau de mer avec une baisse significative entre le jour 4 et le jour 15 de l'échantillonnage. Les abondances bactériennes sont significativement différentes entre les jours 4 et 15 pour les régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 ». De plus, les abondances bactériennes sont significativement différentes par rapport au contrôle d'eau de mer : 1) quelle que soit la journée d'échantillonnage pour le régime alimentaire « Commercial » et 2) au jour 4 dans le cas du régime alimentaire « Expérimental 1 ». On ne retrouve pas de différence significative au niveau des abondances bactériennes entre les deux régimes alimentaires testés (tableau 3).

Lors de la deuxième série d'échantillonnage en 2006, les analyses statistiques des abondances bactériennes par le test de Scheirer-Ray-Hare démontrent une différence

significative selon les journées d'échantillonnage (tableau 2). L'abondance moyenne des bactéries totales augmente au cours du temps dans tous les bassins d'élevage ainsi que dans le contrôle d'eau de mer. Toutefois, aucun effet du régime alimentaire seul ni de l'interaction entre le régime alimentaire et de la journée d'échantillonnage sur l'abondance des bactéries totales n'a pu être démontré.

Tableau 1 : Abondance moyenne des bactéries totales (bactéries/mL) et de *Vibrio* sp. [unité formatrice de colonies/mL (UFC/mL)] en 2005 et en 2006.
Pour les différents traitements, l'écart-type est mentionné entre parenthèse

		Série n°1 (2005)			Série n°2 (2006)		
		Jour 4	Jour 15	Jour 26	Jour 4	Jour 15	Jour 26
Bactéries totales (x10 ⁵ bactéries/mL)	Eau de mer	3,26 (0,43)	2,26 (0,18)	2,11 (0,09)	2,70 (0,26)	2,84 (0,26)	3,63 (0,58)
	Commercial	2,36 (0,38)	2,54 (0,16)	2,36 (0,14)			
	Expérimental 1	2,13 (0,16)	2,37 (0,19)	2,27 (0,14)			
	Expérimental 2				2,90 (0,17)	2,95 (0,39)	3,67 (0,14)
	Expérimental 3				2,58 (0,15)	2,94 (0,29)	3,42 (0,07)
<i>Vibrio</i> sp. (UFC/mL)	Eau de mer	0,71 (0,20)	0,23 (0,14)	1,58 (0,64)	0,39 (0,27)	0,95 (1,01)	2,24 (0,31)
	Commercial	0,70 (0,18)	4,15 (1,46)	9,13 (7,15)			
	Expérimental 1	0,82 (0,24)	0,47 (0,10)	2,81 (2,44)			
	Expérimental 2				1,62 (1,39)	6,04 (3,66)	10,77 (0,45)
	Expérimental 3				0,11 (0,04)	1,92 (0,90)	78,00 (1,87)

Tableau 2 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005 et en 2006

Série n°1 (2005)					
Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	0,084	2	0,042	9,700	0,000
Journée	0,085	2	0,043	9,808	0,000
Régime * Journée	0,262	4	0,065	15,01	0,000
Erreur	0,514	118	0,004		
Série n°2 (2006)					
Régime alimentaire	4081,102	2	2040,551	3,050	0,133
Journée	38650,639	3	12883,546	19,260	0,000
Régime * Journée	2101,148	6	350,191	0,524	0,912
Erreur	66224,803	99	668,937		

Tableau 3 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005

	EDM (J4)	EDM (J15)	EDM (J26)	Commercial (J4)	Commercial (J15)	Commercial (J26)	Expérimental 1 (J4)	Expérimental 1 (J15)	Expérimental 1 (J26)
EDM (J4)	1,000								
EDM (J15)	0,000	1,000							
EDM (J26)	0,000	0,248	1,000						
Commercial (J4)	0,001	0,982	0,022	1,000					
Commercial (J15)	0,777	0,000	0,000	0,003	1,000				
Commercial (J26)	0,013	0,383	0,000	0,965	0,084	1,000			
Expérimental 1 (J4)	0,000	0,510	1,000	0,073	0,000	0,001	1,000		
Expérimental 1 (J15)	0,014	0,315	0,000	0,945	0,090	1,000	0,001	1,000	
Expérimental 1 (J26)	0,000	0,999	0,054	1,000	0,000	0,797	0,160	0,736	1,000

Lors des deux séries d'échantillonnage, la communauté bactérienne présente dans les différents bassins d'élevage se compose généralement de deux sous-populations principales (figures 1 et 2). La première sous-population correspond aux cellules bactériennes à haute teneur en acides nucléiques identifiables par leur haut niveau de fluorescence (HNA, population 2, figures 1 et 2). La deuxième sous-population, quant à elle, se compose de cellules bactériennes à faible teneur en acides nucléiques, identifiables par leur bas niveau de fluorescence (LNA, population 3, figures 1 et 2). Au jour 26, une troisième sous-population apparaît dans les 4 bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire fournit aux larves (VFNA, population 4, figures 1 et 2). Cette sous-population a pu être discriminée grâce au pourcentage de fluorescence de cette sous-population bactérienne par rapport à la fluorescence du standard interne (tableau 4).

Tableau 4 : Pourcentage de fluorescence des bactéries totales par rapport au standard interne pour les cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA), les cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA), les cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA) et les cellules à très haute fluorescence (VHFNA). Pour les différentes sous-populations, l'écart-type est mentionné entre parenthèse

	Série n°1 (2005)			Série n°2 (2006)		
	Jour 4	Jour 15	Jour 26	Jour 4	Jour 15	Jour 26
% HNA	25,90 (0,91)	24,85 (0,13)	24,60 (0,73)	30,78 (3,29)	35,15 (8,76)	29,83 (0,54)
% LNA	6,51 (0,25)	6,78 (0,10)	6,40 (0,06)	12,49 (3,52)	10,85 (5,54)	7,95 (0,61)
% VFNA			79,13 (14,47)		80,70 (0,00)	
% VHFNA						154,7 (2,30)

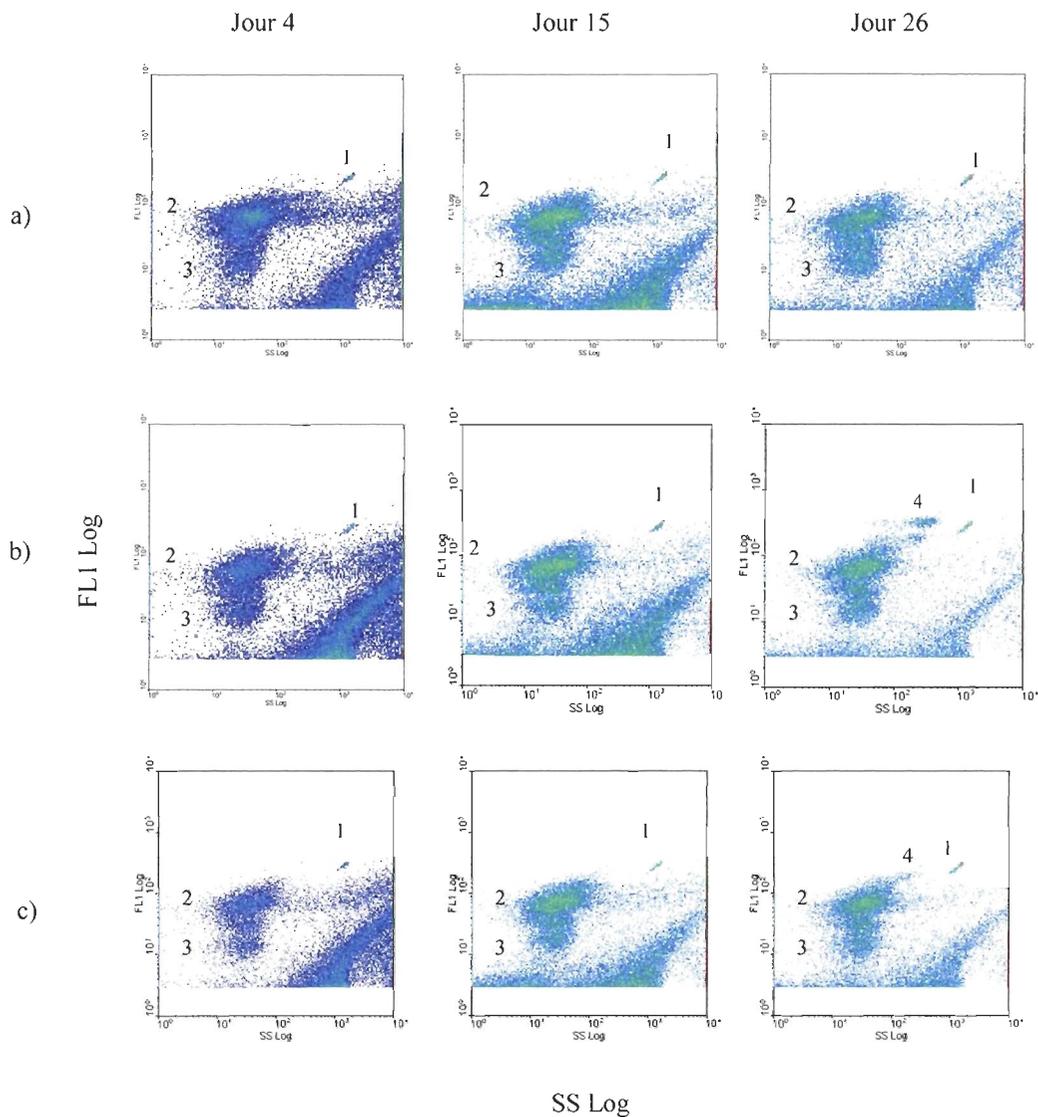


Figure 1 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux en 2005 (1ère série d'échantillonnage) : (a) eau de mer ; (b) régime alimentaire « Commercial » ; (c) régime alimentaire « Expérimental I » ; (1) billes de 1 μm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA). FL1 équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules

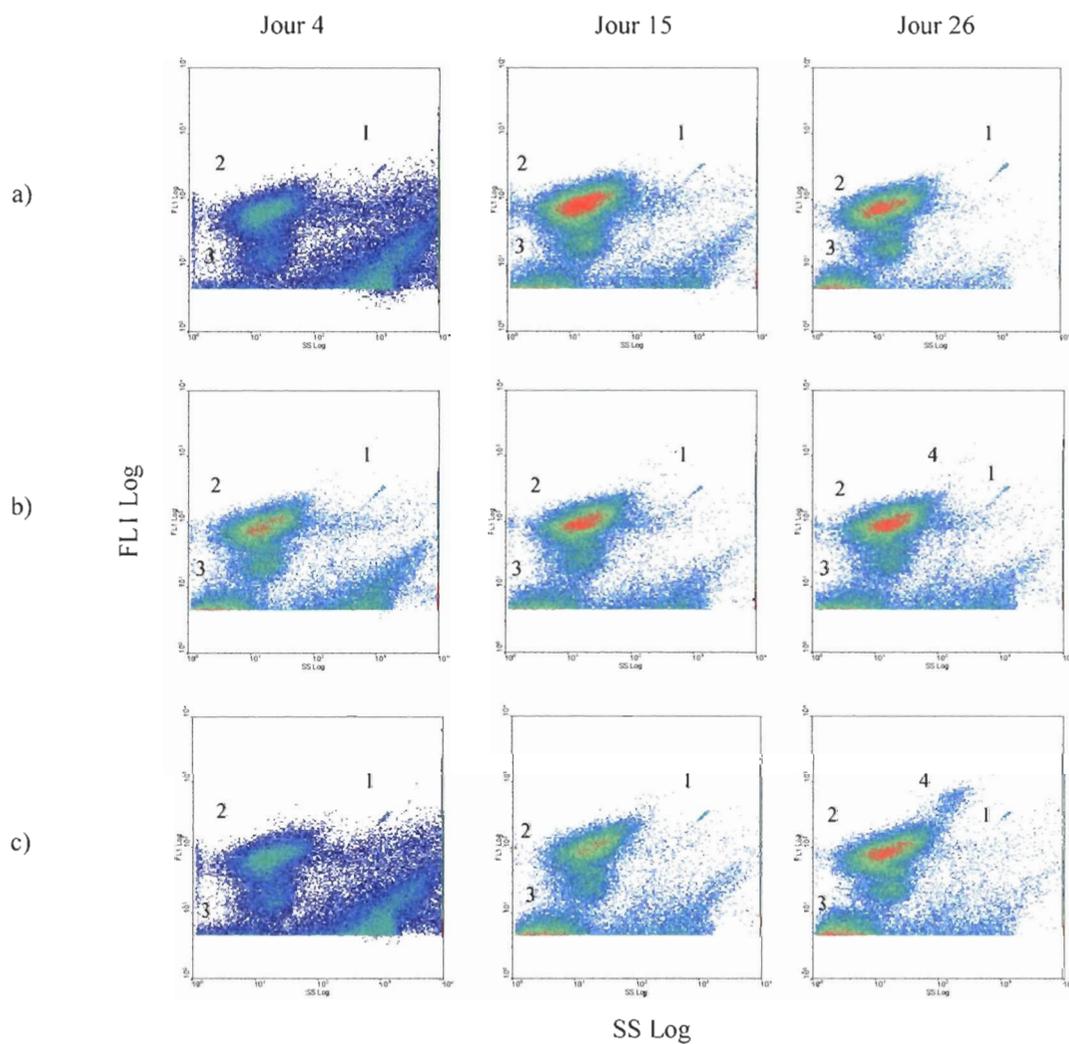


Figure 2 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux en 2006 (2nde série d'échantillonnage) : (a) eau de mer ; (b) régime alimentaire « Expérimental 2 » ; (c) régime alimentaire « Expérimental 3 » ; (1) billes de 1 µm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA). FLI équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules

À la suite des résultats obtenus lors de la première série d'échantillonnage, les abondances des bactéries totales dans les cultures de rotifères fournies aux larves ont été analysées (figure 3). Une diminution du nombre moyen de bactéries totales s'observe dans les cultures de rotifères pour les deux régimes alimentaires testés entre les jours 4 et 26. En ce qui concerne le régime alimentaire « Expérimental 2 », le nombre de bactéries totales passe de $1,65 \times 10^{10}$ bactéries/mL au jour 4 à $4,68 \times 10^9$ bactéries/mL au jour 26 tandis que pour le régime alimentaire « Expérimental 3 », ce nombre diminue de $1,35 \times 10^{10}$ bactéries/mL au jour 4 à $3,77 \times 10^9$ bactéries/mL au jour 26. L'analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) démontre une différence significative des abondances bactériennes selon les journées d'échantillonnage (tableau 5). Toutefois, les différents régimes alimentaires testés pour nourrir les rotifères n'affectent pas l'abondance bactérienne contenue dans les cultures de rotifères. Une différence significative des abondances bactériennes est mise en évidence entre les jours 4 et 26 pour le régime alimentaire « Expérimental 3 » ainsi qu'entre les jours 15 et 26 pour ce même régime alimentaire. De plus, les abondances bactériennes ne sont pas significativement différentes entre les deux régimes alimentaires testés quelle que soit la journée d'échantillonnage (tableau 6).

Tableau 5 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans les cultures de rotifères en 2006

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	0,223	1	0,223	1,298	0,271
Journée	6,132	2	3,066	17,864	0,000
Régime * Journée	0,015	2	0,008	0,044	0,957
Erreur	2,746	16	0,172		

Tableau 6 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries totales contenues dans cultures de rotifères en 2006

	Expérimental 2 (J4)	Expérimental 2 (J15)	Expérimental 2 (J26)	Expérimental 3 (J4)	Expérimental 3 (J15)	Expérimental 3 (J26)
Expérimental 2 (J4)	1,000					
Expérimental 2 (J15)	0,999	1,000				
Expérimental 2 (J26)	0,066	0,067	1,000			
Expérimental 3 (J4)	0,967	0,956	0,010	1,000		
Expérimental 3 (J15)	0,989	0,973	0,021	1,000	1,000	
Expérimental 3 (J26)	0,011	0,056	0,995	0,019	0,029	1,000

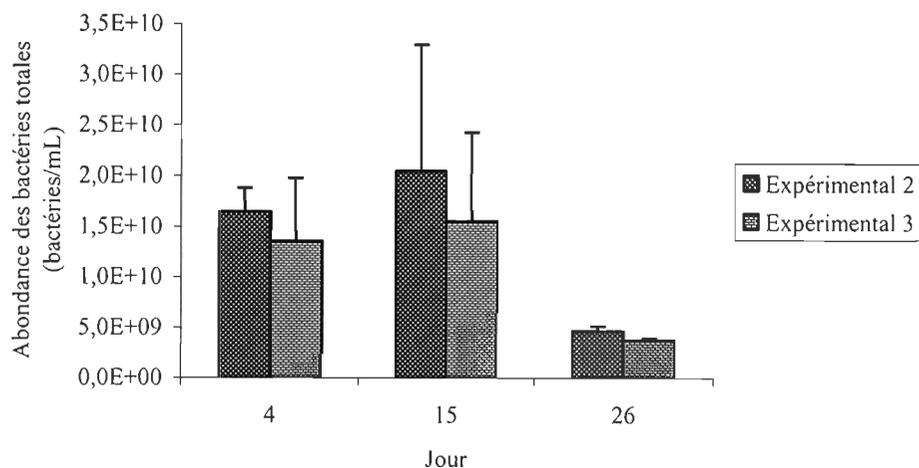


Figure 3 : Abondance moyenne des bactéries totales par mL pour chaque culture de rotifères en fonction des journées d'échantillonnage en 2006. Les barres verticales représentent les écart-types de mesure

La structure de la communauté bactérienne observée dans les cultures de rotifères (figure 4), diffère de celle observée dans les différents bassins d'élevage (figures 1 et 2). Les deux sous-populations principales (HNA et LNA, populations 2 et 3, figure 4) sont toujours observées excepté dans le cas du régime alimentaire « Expérimental 3 » au jour 26 où la sous-population LNA n'est pas distinguable sur le cytogramme (figure 4). À la fin de l'expérimentation (jour 26), la sous-population VFNA (population 4, figure 4) est plus abondante dans les cultures de rotifères comparativement aux bassins d'élevage des deux séries. De plus, les deux régimes alimentaires testés conduisent à l'apparition d'une quatrième sous-population (VHFNA, population 5, figure 4) aux jours 4 et 26 dans les cultures de rotifères. Cette dernière sous-population a pu être discriminée grâce au pourcentage de fluorescence de cette sous-population bactérienne par rapport à la

fluorescence du standard interne qui représente 188% comparativement à 81%, 27% et 12% pour les sous-populations VFNA, HNA et LNA, respectivement.

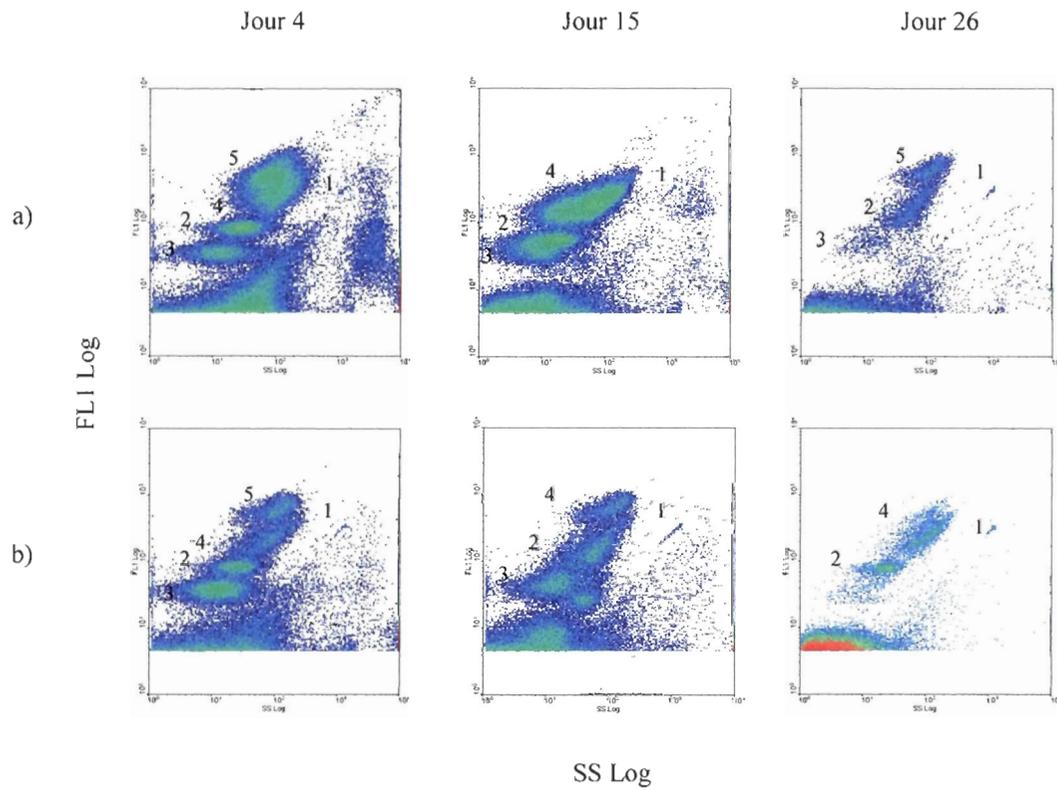


Figure 4 : Cytogrammes de fluorescence des bactéries totales par cytométrie en flux dans les cultures de rotifères en 2006 : (a) régime alimentaire « Expérimental 2 » ; (b) régime alimentaire « Expérimental 3 » ; (1) billes de 1 μm ; (2) cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) ; (3) cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) ; (4) cellules à très haute teneur en acides nucléiques (VFNA) ; (5) cellules à très haute fluorescence (VHFNA). FLI équivaut à la fluorescence des cellules à 525 nm tandis que SS équivaut à la taille des cellules

3.2 ABONDANCE DES BACTÉRIES CULTIVABLES

Le nombre moyen des bactéries cultivables a uniquement été mesuré lors de la première série d'expérience. Au cours du temps d'échantillonnage une diminution du nombre moyen des bactéries cultivables dans tous les bassins d'élevage ainsi que dans le contrôle d'eau de mer s'observe (figure 5). Dans le contrôle d'eau de mer, le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) diminue de $7,28 \times 10^4$ UFC/mL au jour 4 à $6,94 \times 10^3$ UFC/mL au jour 26 de l'échantillonnage. Dans les bassins d'élevage, une diminution $1,15 \times 10^4$ UFC/mL à $5,90 \times 10^3$ UFC/mL et de $1,22 \times 10^4$ UFC/mL à $6,11 \times 10^3$ UFC/mL s'observe entre les jours 4 et 26 de l'échantillonnage pour les régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 », respectivement. L'analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) permet de mettre en évidence que l'abondance des bactéries cultivables varie selon le régime alimentaire employé et les journées d'échantillonnage (tableau 7). Les abondances des bactéries cultivables sont significativement différentes entre les jours 4 et 15 pour les régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 » et significativement différentes du contrôle d'eau de mer pour le jour 4 et le jour 15 de l'échantillonnage dans les 4 bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire employé. Entre les deux régimes alimentaires testés, les abondances des bactéries cultivables ne sont pas significativement différentes pour les trois journées d'échantillonnage (tableau 8).

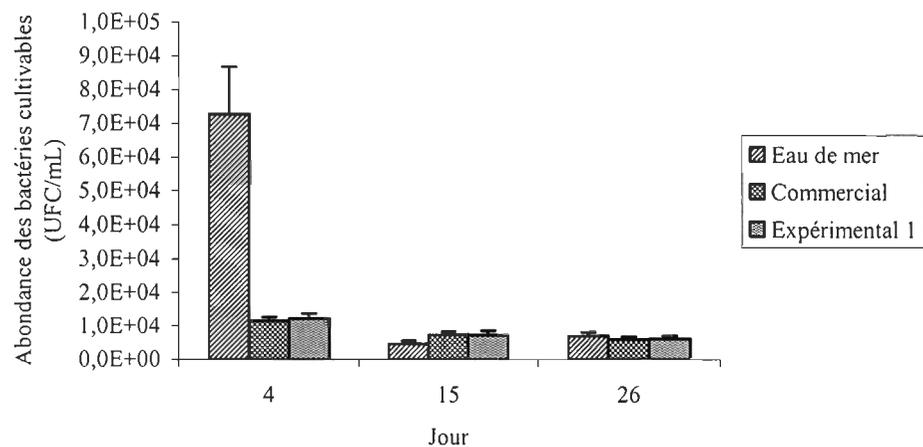


Figure 5 : Nombre moyen des bactéries cultivables en unités formatrices de colonies (UFC/mL) pour chaque bassin d'élevage en fonction des journées d'échantillonnage en 2005. Les barres verticales représentent les écart-types de mesures

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de variance des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	7,456	2	3,728	133,414	0,000
Journée	39,985	2	19,948	713,872	0,000
Régime * Journée	26,325	4	6,581	235,529	0,000
Erreur	3,409	122	0,028		

Tableau 8 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005

	EDM (J4)	EDM (J15)	EDM (J26)	Commercial (J4)	Commercial (J15)	Commercial (J26)	Expérimental 1 (J4)	Expérimental 1 (J15)	Expérimental 1 (J26)
EDM (J4)	1,000								
EDM (J15)	0,000	1,000							
EDM (J26)	0,000	0,000	1,000						
Commercial (J4)	0,000	0,000	0,000	1,000					
Commercial (J15)	0,000	0,000	0,985	0,000	1,000				
Commercial (J26)	0,000	0,012	0,372	0,000	0,090	1,000			
Expérimental 1 (J4)	0,000	0,000	0,000	0,998	0,000	0,000	1,000		
Expérimental 1 (J15)	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,184	0,000	1,000	
Expérimental 1 (J26)	0,000	0,000	0,540	0,000	0,144	1,000	0,000	0,284	1,000

3.3 ABONDANCE DU PATHOGENE *VIBRIO* SP.

Lors de la première série d'échantillonnage, le nombre de *Vibrio* sp. présente une augmentation au jour 26 dans chacun des bassins d'élevage y compris dans le contrôle d'eau de mer (tableau 1). L'analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) démontre que l'abondance de *Vibrio* sp. varie selon les régimes alimentaires testés et les différentes journées d'échantillonnage (tableau 9). Les abondances de *Vibrio* sp. sont significativement différentes entre les jours 4 et 15 pour le régime alimentaire « Commercial » ainsi que pour le régime alimentaire « Expérimental 1 » et également entre les jours 15 et 26 pour le régime alimentaire « Expérimental 1 ». Pour les deux régimes alimentaires testés, les abondances de *Vibrio* sp. sont également significativement différentes du contrôle d'eau de mer pour le jour 15 et le jour 26. De plus, les abondances de *Vibrio* sp. sont significativement différentes entre les régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 » lors de l'échantillonnage du jour 15 (tableau 10).

Lors de la deuxième série d'échantillonnage, le nombre moyen d'UFC/mL du pathogène *Vibrio* sp. subit une augmentation dans tous les bassins d'élevage ainsi que dans le contrôle d'eau de mer (tableau 1). Cependant, ces augmentations ne sont pas constantes dans le temps suggérant ainsi la non-conformité dans les conditions de l'analyse de variance. Par conséquent, le test de Scheirer-Ray-Hare a été effectué donnant comme résultat que les abondances de *Vibrio* sp. sont significativement différentes entre les régimes alimentaires testés et les journées d'échantillonnage. De

plus, la combinaison des deux facteurs influence significativement les abondances de *Vibrio* sp. (tableau 9).

Comme dans le cas des abondances des bactéries totales lors de la deuxième série d'échantillonnage, le dénombrement du pathogène *Vibrio* sp. a été réalisé dans les cultures de rotifères. Le nombre moyen de colonies de *Vibrio* sp. montre une augmentation entre les jours 4 et 26 de l'échantillonnage (figure 6). Cette augmentation du nombre de colonies est plus importante dans la culture de rotifères nourrit avec le régime alimentaire « Expérimental 3 » (de 219,75 UFC/mL à 620 UFC/mL) comparativement au régime alimentaire « Expérimental 2 » (de 255 UFC/mL à 300 UFC/mL). L'analyse de variance à deux facteurs croisés (régime alimentaire*jour) permet de démontrer que les abondances de *Vibrio* sp. dans les cultures de rotifères varient selon le régime alimentaire et les différentes journées d'échantillonnage (tableau 11). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les abondances de *Vibrio* sp. mesurées aux différentes journées d'échantillonnage pour le régime alimentaire « Expérimental 3 ». L'emploi du régime alimentaire « Expérimental 2 », quant à lui entraîne des variations significatives dans les abondances de *Vibrio* sp. entre les jours 4 et 15 les jours 15 et 26 et les jours 4 et 26 De plus, on remarque que les abondances de *Vibrio* sp. sont significativement différentes entre les deux régimes alimentaires testés aux jours 15 et 26 (tableau 12).

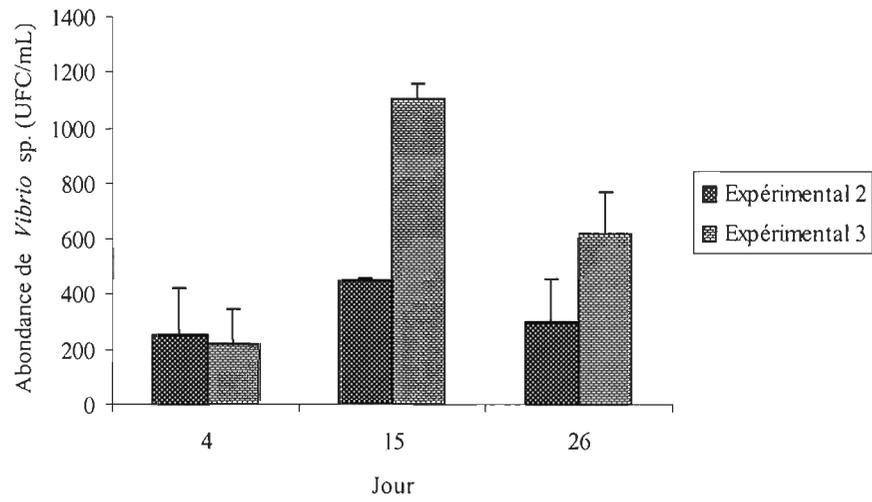


Figure 6 : Nombre moyen de colonies du pathogène *Vibrio* sp. (UFC/mL) pour chaque culture de rotifères en fonction des journées d'échantillonnage en 2006. Les barres verticales correspondent aux écart-types de mesure

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de variance du pathogène *Vibrio* sp. contenu dans les bassins d'élevage en 2005 et des résultats du test de Scheirer-Ray-Hare en 2006

Série n°1 (2005)					
Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	13,687	2	6,843	51,424	0,000
Journée	35,621	2	17,761	133,462	0,000
Régime * Journée	12,673	4	3,168	23,809	0,000
Erreur	9,182	69	0,133		
Série n°2 (2006)					
Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	8487,315	2	4243,658	9,382	0,025
Journée	57850,882	3	19283,627	42,634	0,000
Régime * Journée	21456,683	6	3576,144	7,906	0,005
Erreur	48396,847	107	452,307		

Tableau 10 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance du pathogène *Vibrio* sp. contenu dans les bassins d'élevage en 2005

	EDM (J4)	EDM (J15)	EDM (J26)	Commercial (J4)	Commercial (J15)	Commercial (J26)	Expérimental 1 (J4)	Expérimental 1 (J15)	Expérimental 1 (J26)
EDM (J4)	1,000								
EDM (J15)	0,000	1,000							
EDM (J26)	0,000	0,000	1,000						
Commercial (J4)	1,000	0,000	0,000	1,000					
Commercial (J15)	0,000	0,000	0,227	0,000	1,000				
Commercial (J26)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,416	1,000			
Expérimental 1 (J4)	1,000	0,000	0,000	0,998	0,000	0,000	1,000		
Expérimental 1 (J15)	0,305	0,002	0,000	0,443	0,000	0,000	0,019	1,000	
Expérimental 1 (J26)	0,000	0,000	0,004	0,000	0,964	0,966	0,000	0,000	1,000

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance du pathogène *Vibrio* sp. contenu dans les cultures de rotifères en 2006

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F-ratio	Probabilité
Régime alimentaire	963414,614	1	963414,614	57,139	0,000
Journée	1988698,983	2	994349,942	58,973	0,000
Régime * Journée	824179,650	2	412089,825	24,440	0,000
Erreur	606996,917	36	16861,025		

Tableau 12 : Résultats du test de comparaison multiple (test de Tukey) pour l'analyse de variance du pathogène *Vibrio* sp. contenu dans les cultures de rotifères en 2006

	Expérimental 2 (J4)	Expérimental 2 (J15)	Expérimental 2 (J26)	Expérimental 3 (J4)	Expérimental 3 (J15)	Expérimental 3 (J26)
Expérimental 2 (J4)	1,000					
Expérimental 2 (J15)	0,000	1,000				
Expérimental 2 (J26)	0,000	0,000	1,000			
Expérimental 1 (J4)	1,000	0,000	0,000	1,000		
Expérimental 1 (J15)	0,018	0,000	0,420	0,212	1,000	
Expérimental 1 (J26)	1,000	0,000	0,000	1,000	0,833	1,000

3.4 STRUCTURE GÉNÉRALE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES

3.4.1 Diversité des bactéries cultivables

Lors de la comparaison des empreintes génétiques obtenues par RFLP, on constate que pour les 11 morphotypes isolés on obtient 18 génotypes. De ces génotypes, cinq génotypes sont distinguables seulement pour le contrôle d'eau de mer, deux génotypes sont distinguables seulement dans les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé et, un génotype est distinguable dans les bassins d'élevage contenant le régime alimentaire « Commercial ». De plus, on constate une diminution du nombre de génotypes au cours du temps dans les quatre bassins d'élevage. Cette diminution coïncide avec une diminution de l'abondance bactérienne cultivable contenue dans chacun des bassins d'élevage.

L'analyse statistique par un coefficient de Jaccard démontre une perte de la similarité au cours du temps pour le contrôle d'eau de mer ainsi que pour les bassins d'élevage ayant les régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 » (tableau 13). On constate également que pour les bassins d'élevage contenant le régime alimentaire « Commercial », l'indice varie légèrement par rapport au contrôle d'eau de mer aux jours 4 et 26. En ce qui a trait aux bassins d'élevage contenant le régime alimentaire « Expérimental 1 », on remarque une importante perte de la similarité dans la communauté bactérienne cultivable entre les jours 4 et 26. Lors de la comparaison

des deux régimes alimentaires testés, on observe une haute similarité de la communauté bactérienne cultivable au jour 4 ainsi qu'une légère diminution de la similarité au jour 26.

3.4.2 Diversité des bactéries totales

Lors des deux séries d'échantillonnage, les empreintes génétiques obtenues par PCR-DGGE révèlent une différence des communautés bactériennes au cours du temps (annexe 1). En 2005, on constate la présence de 23 bandes associées au jour 4 de l'échantillonnage tandis que le jour 26 est associé à 14 bandes. De plus, le contrôle d'eau de mer contribue avec 7 bandes qui sont présentes dans tous les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé comparativement à 1 bande pour l'eau verte. En plus, 2 bandes sont exclusives au régime alimentaire « Commercial », 9 bandes pour le régime alimentaire « Expérimental 1 » et 3 bandes pour les deux régimes alimentaires testés. En 2006, 19 bandes sont exclusives au jour 4 de l'échantillonnage comparativement à 10 bandes pour le jour 26 de l'échantillonnage. De plus, le contrôle d'eau de mer contribue avec 22 bandes pour les communautés bactériennes retrouvées dans les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé contrairement à 1 bande pour l'eau verte. En plus, 10 bandes sont exclusives au régime alimentaire « Expérimental 2 », 9 bandes pour le régime alimentaire « Expérimental 3 » et 8 bandes pour les deux régimes alimentaires testés. Pour les cultures de rotifères réalisées en 2006, les empreintes génétiques révèlent que les communautés bactériennes sont très différentes entre les régimes alimentaires testés ainsi qu'entre les journées

d'échantillonnage. En effet, on constate une augmentation du nombre de bandes au cours du temps, car pour le jour 4, 6 bandes y sont associées comparativement à 11 bandes et à 17 bandes pour les jours 15 et 26 respectivement. De plus, 17 bandes sont exclusives au régime alimentaire « Expérimental 2 », 12 bandes pour le régime alimentaire « Expérimental 3 » et 10 bandes pour les deux régimes alimentaires testés.

L'analyse statistique par un coefficient de Jaccard en 2005 démontre une perte de la similarité au cours du temps (tableau 14). En effet, entre les jours 4 et 26 nous observons des changements des communautés bactériennes pour le contrôle d'eau de mer et les 4 bassins d'élevage. Toutefois, une augmentation de la similarité s'observe entre le contrôle d'eau de mer et le régime alimentaire « Commercial » contrairement aux autres interactions. En 2006, l'analyse statistique par un coefficient de Jaccard démontre que la similarité entre les jours 4 et 26 de l'échantillonnage est très basse (tableau 15) En ce qui concerne la comparaison entre les deux régimes alimentaires testés en 2006, une augmentation de la similarité s'observe. Pour les cultures de rotifères, le coefficient de Jaccard démontre que les similarités entre les régimes alimentaires et les journées d'échantillonnage sont presque nulles (tableau 16). En effet, pour le régime alimentaire « Expérimental 2 », la similarité entre le jour 4 et le jour 26 est similaire au régime alimentaire « Expérimental 3 ». Entre les deux régimes alimentaires, on ne constate pas une haute similarité ni pour le jour 4 ni pour le jour 26 de l'échantillonnage.

Tableau 13 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-RFLP dans le cas des bactéries cultivables contenues dans les bassins d'élevage en 2005

	EDM (J4)	Commercial (J4)	Expérimental 1 (J4)	EDM (J26)	Commercial (J26)	Expérimental 1 (J26)
EDM (J4)	1					
Commercial (J4)	0,36	1				
Expérimental 1 (J4)	0,40	0,67	1			
EDM (J26)	0,21	0,38	0,15	1		
Commercial (J26)	0,15	0,33	0,18	0,33	1	
Expérimental 1 (J26)	0,22	0,09	0,29	0,09	0,43	1

Tableau 14 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2005

	EDM (J4)	Commercial (J4)	Expérimental 1 (J4)	EDM (J26)	Commercial (J26)	Expérimental 1 (J26)
EDM (J4)	1					
Commercial (J4)	0,34	1				
Expérimental 1 (J4)	0,24	0,38	1			
EDM (J26)	0,05	0,14	0,10	1		
Commercial (J26)	0,09	0,14	0,18	0,54	1	
Expérimental 1 (J26)	0,11	0,17	0,19	0,20	0,21	1

Tableau 15 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les bassins d'élevage en 2006

	EDM (J4)	Expérimental 2 (J4)	Expérimental 3 (J4)	EDM (J26)	Expérimental 2 (J26)	Expérimental 3 (J26)
EDM (J4)	1					
Expérimental 2 (J4)	0,05	1				
Expérimental 3 (J4)	0,41	0,10	1			
EDM (J26)	0,13	0,06	0,16	1		
Expérimental 2 (J26)	0,06	0,09	0,09	0,48	1	
Expérimental 3 (J26)	0,19	0,05	0,12	0,22	0,19	1

Tableau 16 : Matrice de similarité du coefficient de Jaccard pour les résultats de PCR-DGGE dans le cas des bactéries totales contenues dans les cultures de rotifères en 2006

	Expérimental 2 (J4)	Expérimental 3 (J4)	Expérimental 2 (J26)	Expérimental 3 (J26)
Expérimental 2 (J4)	1			
Expérimental 3 (J4)	0,17	1		
Expérimental 2 (J26)	0,10	0,11	1	
Expérimental 1 (J26)	0,15	0,17	0,17	1

4 DISCUSSION

La structure des communautés bactériennes (c.à.d. leur abondance et leur diversité) dans les bassins d'élevage larvaire ainsi que la modification de cette structure au cours du temps d'élevage sont encore méconnues. Les bactéries apparaissent souvent comme les agents responsables des mortalités importantes observées lors des premiers stades de développement des poissons d'élevage, toutefois peu d'études traitent présentement de la dynamique des communautés microbiennes dans les systèmes aquicoles. C'est pourquoi cette étude a été entreprise afin de mieux définir les relations entre la structure des communautés bactériennes et le régime alimentaire fourni à des larves de plie rouge, plus particulièrement lors de l'emploi d'un régime alimentaire riche en AG essentiels reconnus pour leur effet bénéfique sur la croissance larvaire (Harel *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus au cours de ce travail démontrent une légère hausse de l'abondance bactérienne totale dans les bassins d'élevage comparativement au contrôle d'eau de mer. Li *et al.* (2004) ont observé que l'eau de mer contenait aux alentours de 5×10^5 cellules/mL à 6×10^5 cellules/mL ce qui se rapproche des résultats obtenus dans cette étude. Cette augmentation peut résulter d'un apport important en nutriments, de l'oxygénation constante des bassins d'élevage ainsi qu'un surplus de matière organique provenant de la nourriture vivante et du dépôt de fèces dans le fond des bassins aquicoles (Payne *et al.*, 2006). Les fortes valeurs observées en 2005 au jour 4 dans le cas de l'eau de mer ne sont pas considérées ici car elles résultent de conditions

climatiques exceptionnelles (tempête dans l'estuaire du Saint-Laurent la veille de l'échantillonnage) ayant entraîné une forte remise en suspension des sédiments côtiers et, en conséquence une augmentation de l'abondance bactérienne totale au niveau de la station de pompage en eau de mer. Une stabilité de l'abondance bactérienne totale a pu être observée lors de l'utilisation du régime alimentaire « Commercial ». Cette stabilité pourrait être reliée à un accroissement de l'alimentation des larves lors de leur croissance. Payne *et al.* (2006) ont observé une diminution de l'abondance bactérienne provoquée par une diminution de l'apport en nutriments disponibles lors du début de la phase d'alimentation des larves. Les larves ingérant de plus en plus de nutriments pour leur croissance entraînent une diminution de la disponibilité des nutriments pour les bactéries. Cependant, la tendance inverse a été observée dans les bassins d'élevage soumis aux régimes alimentaires « Expérimental 1, 2 et 3 », soit une augmentation de l'abondance bactérienne totale au cours du temps. Cette augmentation pourrait être liée à une valeur nutritive plus importante de ces régimes alimentaires riches en AG essentiels, entraînant une plus faible ingestion de nourriture par les larves pour atteindre un niveau énergétique acceptable. Par conséquent, l'augmentation de l'abondance bactérienne totale dans ces bassins d'élevage pourrait être associée à une plus grande disponibilité en nutriments dans ces bassins comparativement aux bassins soumis au régime alimentaire « Commercial » moins riche en AG (Payne *et al.*, 2006). Toutefois, peu de données sont actuellement disponibles afin de relier ces modifications d'abondance bactérienne totale à un changement de diversité au sein des communautés bactériennes présentes ou à une stabilité des espèces présentes.

Lors de l'expérimentation, les abondances bactériennes totales obtenues lors de l'analyse des cultures de rotifères sont en moyenne de $1,24 \times 10^{10}$ bactéries/mL. Ceci est nettement supérieur aux données reportées par Skjermo et Vadstein (1993). En effet, les cultures de rotifères contiennent généralement de fortes concentrations bactériennes de l'ordre de 6×10^6 cellules/mL à $2,5 \times 10^8$ cellules/mL (Skjermo et Vadstein, 1993). Cette différence a pu être provoquée par une augmentation de la disponibilité des nutriments pour les bactéries ou par l'enrichissement en AG dans les cultures de rotifères. Néanmoins, une diminution de l'abondance bactérienne totale au cours du temps a été constatée dans toutes les cultures de rotifères testées. Par conséquent, quel que soit le régime alimentaire, aucune conclusion n'a pu être révélée avec certitude sur l'effet de l'enrichissement en AG dans les cultures de rotifères.

Les cytogrammes obtenus à partir des abondances bactériennes totales révèlent la présence de deux sous-populations bactériennes principales. Ces deux sous-populations ont été identifiées comme étant les cellules à haute teneur en acides nucléiques (HNA) et les cellules à faible teneur en acides nucléiques (LNA) (Sherr *et al.*, 2006 ; Longnecker *et al.*, 2006 ; Lebaron *et al.*, 2002). Initialement, les HNA étaient décrites comme étant les cellules actives des communautés bactériennes tandis que les LNA étaient considérées comme les cellules moins actives ou mortes (Li *et al.*, 1995). Présentement, cette théorie est sujette à controverse, ces deux sous-populations sont maintenant considérées comme étant des cellules actives à différents degrés dans les communautés bactériennes. Néanmoins, l'évolution des HNA au cours du temps peut être un indicateur relatif de la structure des communautés bactériennes contenue dans la

colonne d'eau (Sherr *et al.*, 2006). Sherr *et al.* (2006) ont observé que les rapports HNA/LNA et HNA/Abondance bactérienne totale étaient constants au cours du temps dans l'eau de mer. Nos résultats ne révèlent aucun changement notable de ces ratios au cours du temps. Une légère diminution du nombre de cellules HNA a pu être observée au cours du temps quel que soit le régime alimentaire testé (données non publiées). On peut donc supposer que la composition des communautés bactériennes est constante dans les bassins d'élevage malgré l'enrichissement en AG essentiels.

Les cytogrammes obtenus à partir des cultures de rotifères révèlent une dynamique bactérienne différente de celle retrouvée dans les bassins d'élevage. En effet, une troisième sous-population a été mise en évidence lors de la dernière journée d'échantillonnage dans chaque traitement et plus particulièrement dans les cultures de rotifères. Cette sous-population riche en acides nucléiques comparativement aux deux autres sous-populations majeures engendre une augmentation de la dégradation bactérienne dans la colonne d'eau. Toutefois, il n'est actuellement pas possible de déterminer ni le rôle, ni la nature exacte de cette troisième sous-population (Longnecker *et al.*, 2001). On peut seulement supposer que l'activité bactérienne globale a augmenté entre le jour 15 et le jour 26 de la croissance larvaire et que cette sous-population a été introduite dans les bassins d'élevage *via* les cultures de rotifères, car elle n'est pas distinguable ni dans le contrôle d'eau de mer, ni dans l'eau verte. Aucun lien n'a pu être clairement démontré entre cette troisième sous-population et la performance des larves en terme de croissance et de survie (Seychelles, communication personnelle).

La simple mesure de l'abondance bactérienne totale ne renseigne pas sur l'évolution des communautés bactériennes présentes dans les bassins d'élevage au cours du temps d'élevage. Bien que seules les espèces bactériennes représentant environ 1% de la communauté bactérienne totale soient visibles par PCR-DGGE (Muyzer et Smalla, 1998) cet outil demeure adéquat pour estimer les changements de diversité s'opérant au sein de la communauté bactérienne au cours du processus d'élevage larvaire. Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation ont permis de mettre en évidence que le nombre de bandes observées dans les profils DGGE diminuait dans tous les traitements en bassin au cours du temps traduisant une diminution des espèces majoritaires. La tendance inverse a pu être observée dans les cultures de rotifères se traduisant par une augmentation des espèces majoritaires. Pour tous les bassins d'élevage et les cultures de rotifères, le coefficient de Jaccard est faible. Par conséquent, la similarité des bandes observées entre les bassins d'élevage et les cultures de rotifères au cours de l'échantillonnage est faible renseignant ainsi sur la possibilité d'un changement des communautés bactériennes entre le début et la fin de l'expérimentation. Ces résultats sont semblables aux données obtenues par Payne *et al* (2006) qui ont observés l'existence d'un changement dans la composition bactérienne de la colonne d'eau. Cependant, ils n'ont pu mettre en évidence aucun changement dans les profils DGGE de diversité bactérienne en condition de forte mortalité larvaire. Les profils DGGE observés dans les bassins d'élevage au jour 4 sont semblables pour chacun des traitements, mais différents au jour 26. On peut donc émettre l'hypothèse que la composition bactérienne de chacun des bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire employé a évolué différemment au cours de l'expérience. Cependant, aucune affirmation ne peut être confirmée sur la nature exacte de ces changements et sur

le fait d'une influence directe des AG susceptibles de modifier favorablement les communautés bactériennes. Cette hypothèse devrait être validée par un séquençage des bandes majeures afin de déterminer la nature des espèces bactériennes présentes dans chacun des échantillons traités.

L'augmentation des abondances bactériennes totales pourrait être reliée avec l'augmentation de la diversité des communautés bactériennes. En effet, les changements dans les communautés bactériennes observées à partir des empreintes génétiques par la DGGE pourraient indiquer que les espèces minoritaires prendraient une expansion dans les communautés bactériennes au détriment des espèces majoritaires. L'hypothèse émise serait que les espèces minoritaires augmenteraient en nombre contrairement à une diminution des espèces majoritaires. Toutefois, les profils DGGE ne permettent pas efficacement l'identification des espèces minoritaires. Dans les cultures de rotifères, l'inverse est constaté. Cette augmentation des espèces majoritaires peut être provoquée par l'enrichissement en AG dans les cultures de rotifères. En effet, un apport plus important des nutriments pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'abondance totale des espèces majoritaires dans les cultures de rotifères.

Plusieurs études ont démontré que l'abondance des bactéries cultivables représentait de 1% à 3% des bactéries totales présentes dans les milieux aquatiques (Pinhassi *et al.*, 1997 ; Amann *et al.*, 1995 ; Kjelleberg *et al.*, 1993 ; Colwell *et al.*, 1985). Ce pourcentage peut augmenter si l'environnement marin est riche en nutriment (Agogué *et al.*, 2005). Au cours de notre étude, le pourcentage moyen de la fraction cultivable était

de 3,38%, et ce pourcentage restait sensiblement le même au cours de l'échantillonnage malgré les diminutions des abondances bactériennes cultivables rencontrées dans les bassins d'élevage soumis aux régimes alimentaires « Commercial » et « Expérimental 1 ». Ces résultats corroborent les données obtenues par Bourne *et al.* (2004). Ces baisses d'abondance se sont accompagnées de diminutions de la diversité des génotypes bactériens à travers le temps pour tous les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé. L'analyse génétique révèle que le coefficient de Jaccard entre le régime alimentaire « Commercial » et le régime alimentaire « Expérimental 1 » était sensiblement identique au cours du temps, et que cette haute similarité des génotypes entre les deux régimes alimentaires pouvait signifier que le régime alimentaire « Expérimental 1 », malgré le fait qu'il soit riche en AG essentiels, n'influçait vraisemblablement pas la communauté bactérienne cultivable au cours de l'échantillonnage. Cependant, la faible valeur de l'indice de Jaccard entre le contrôle d'eau de mer et les bassins d'élevage qu'importe le traitement, laisse supposer que la communauté bactérienne cultivable proviendrait majoritairement des cultures de rotifères. Toutefois, cette hypothèse n'a pas pu être clairement démontrée étant donné que l'analyse des bactéries cultivables n'a pas été réalisée directement sur les cultures de rotifères.

Un des enjeu principal en aquaculture est la réduction du taux de mortalité larvaire provoqué principalement par l'apparition de types bactériens (Eddy et Jones, 2002). Une diminution des bactéries opportunistes potentiellement pathogènes particulièrement *Vibrio* sp. pourrait augmenter le taux de survie des stades larvaires. En effet, *Vibrio* sp.

est le pathogène le plus fréquemment rencontré dans le milieu aquicole. Ce pathogène peut induire des maladies lors d'un stress environnemental ou lorsqu'il se retrouve en milieu confiné où tous les éléments pour une croissance rapide sont réunis. Dans le cas des bassins aquicoles, ce pathogène peut entraîner rapidement des maladies provoquant ainsi la chute de la densité larvaire dans les bassins d'élevage (Payne *et al.*, 2006). De plus, les larves lorsqu'elles commencent à se nourrir investissent de l'énergie dans les processus d'alimentation amenant ainsi une diminution de l'énergie disponible à la défense immunitaire (Payne *et al.*, 2006).

Nos résultats révèlent une augmentation de l'abondance de *Vibrio* sp. au cours du temps dans tous les bassins d'élevage quel que soit le régime alimentaire testé. L'augmentation la plus importante se retrouvait dans le régime alimentaire « Expérimental 3 » comparativement aux trois autres régimes alimentaires testés où les augmentations étaient semblables. Cette augmentation pourrait être le résultat de l'enrichissement par un supplément artificiel en acide arachidonique favorisant la croissance rapide de *Vibrio* sp. Dans ce sens, Vaseeharan et Ramasamy (2003) ont émis l'hypothèse sur l'augmentation des vibrios dans la colonne d'eau dans le fait que les systèmes d'élevage larvaire en bassin de poissons de marins constituaient un environnement favorable pour la prolifération des vibrios du fait de l'absence de renouvellement journalier complet de l'eau des bassins d'élevage. Cette absence entraîne une accumulation de substances organiques provenant de l'excès de nourriture ainsi que de matières fécales au fond des bassins provoquant l'augmentation de la population algale. En effet, l'enrichissement en acide arachidonique pourrait entraîner

cette augmentation de la nourriture non assimilée par les larves de plie rouge provenant du fait que les larves assimileraient moins de nourriture étant donné qu'elles ont un supplément alimentaire pouvant permettre de moins consommer de nourriture.

La forte présence de *Vibrio* sp. dans les bassins d'élevage pourrait provenir des cultures de rotifères. En effet, *Vibrio* sp. est l'espèce dominante dans ce type d'environnement artificiel (Rombaut *et al.*, 2001). L'augmentation de *Vibrio* sp. dans les bassins d'élevage soumis au régime alimentaire « Expérimental 3 » coïnciderait avec une augmentation importante des vibrios dans les cultures de rotifères nourries au régime alimentaire correspondant. Ces résultats laissent supposer qu'un enrichissement en AG essentiel trop important pourrait faire augmenter la population des vibrios dans les bassins d'élevage. Rombaut *et al.* (2001) ont confirmé que l'enrichissement des régimes alimentaires peut entraîner un changement dans la composition bactérienne pathogène complètement différente de la composition bactérienne initiale. A la suite des observations des comptes des vibrios, le régime alimentaire « Expérimental 1 » serait le régime le mieux adapté pour limiter la prolifération des bactéries du genre *Vibrio* sp.

5 CONCLUSION

Pour conclure, l'existence de relations entre la structure des communautés bactériennes et un régime alimentaire riche en AG essentiels lors d'un élevage larvaire de plie rouge n'a pas pu être clairement démontrée. En effet, la structure des communautés bactériennes change au cours du temps quel que soit le traitement employé. Toutefois, nos résultats ne confirment pas avec certitude que les régimes alimentaires riches en AG essentiels jouent un rôle sur les changements bactériens observés ou sur la diminution du pathogène *Vibrio* sp. Néanmoins, il a été démontré que la structure des communautés bactériennes évoluait différemment entre les traitements. En effet, quel que soit le régime alimentaire employé, la communauté bactérienne changeait au cours du temps, plus particulièrement dans les cultures des rotifères où la composition bactérienne est complètement différente de celle trouvée dans les bassins d'élevage. Dans les cultures de rotifères, il a été démontré que ces cultures apportaient une troisième sous-population bactérienne dans les bassins d'élevage. Ce fait prouve que les cultures de rotifères contribuent à l'établissement de la microflore bactérienne des larves de plie rouge dans les bassins aquicoles contrairement au milieu naturel. De plus, l'abondance de *Vibrio* sp. a augmenté dans les bassins d'élevage soumis aux différents régimes alimentaires testés. Plusieurs hypothèses ont été émises sur les changements dont l'augmentation de l'apport en nutriments provoquée par l'enrichissement artificiel en AG essentiels dans les cultures de rotifères et de l'augmentation de la matière organique dans les bassins d'élevage provoquée par la nourriture vivante non ingérée.

De futures recherches sur la génétique des populations bactériennes pourraient procurer de meilleurs renseignements sur les espèces bactériennes présentes dans chacune des communautés bactériennes dans les bassins d'élevage larvaire de poissons marins. L'emploi d'outils moléculaires tel que le séquençage des bandes majeures de la PCR-DGGE et l'identification précise des bactéries cultivables pourrait compléter les informations manquantes de cette étude.

6 REFERENCES

Agogué, H., Casamayor, E.O., Bourrain, M., Obernosterer, I., Joux, F., Herndl, G.J., Lebaron, P., 2005. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 54:269-280.

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59:143-169.

Bergh, O., 1999. Bacterial pathogens associated with early life stages of marine fish. *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Bell CR, Brylinsky M, Jonhson-Green P (ed), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Bourne, D.G., Young, N., Webster, N., Payne, M., Salmon, M., Demel, S., Hall, M., 2004. Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 242:31-51.

Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A., Palmer, L.M., 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology* 3:817-820.

Diggles, B.K., Carson, J., Hine, P.M., Hickman, R.W., Tait, M.J., 2000. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* 183:1-12.

Dumestre, J.-F., Casamayor, E.O., Massana, R., Pedros-Alio, C., 2001. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquatic Microbial Ecology* 26:209-221.

Eddy, S.D. et Jones, S.H., 2002. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture* 211:9-28.

Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production : bias of culture-dependant and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24:610-617.

FAO, 2006. FAO fisheries technical paper. Vol. 500. State of the world aquaculture 2006.

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-165.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191:259-270.

González, S.F., Krug, M.J., Nielsen, M.E., Santos, Y., Call, D.R., 2004. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4):1414-1419.

Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F., 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155:387-399.

Hansen, G.H. et Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38:1-26.

Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar, Y., Place, A.R., 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213:347-362.

Kjelleberg, S., Flärdh, B.G., Nyström, T., Moriarty, D.J.W., 1993. Growth limitation and starvation of bacteria. Ford TE (ed) *Aquatic Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Boston, pp. 289-320.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(5):2304-2309.

Laurence, G.C., 1977. A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. Fisheries Bulletin 75(3):529-546.

Lebaron, P., Servais, P., Baudoux, A.-C., Bourrain, M., Courties, C., Parthuisot, N., 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. Aquatic Microbial Ecology 28(2):131-140.

Lee, C.-S., 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production : a review. Aquaculture 227:439-458.

Lemarchand, K., Berthiaume, F., Maynard, C., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., Brousseau, R., 2005. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. Journal of Microbiological Methods 63:115-126.

Li, W.K.W., Jellett, J.F., Dickie, P.M., 1995. DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. Limnology Oceanography 40:1485-1495.

Li, W.K.W., Head, E.J.H., Harrison, G.W., 2004. Macroecological limits of heterotrophic bacterial abundances in the ocean. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research 51:1529-1540.

Longnecker, K., Sherr, B., Sherr, E., 2001. Phylogenetic analysis of metabolically active heterotrophs in the Oregon upwelling system. EOS, Transactions, American Geophysical Union 82, suppl., [np].

Longnecker, K., Sherr, B.F., Sherr, E.B., 2006. Variation in cell-specific rates of leucine and thymidine incorporation by marine bacteria with high and with low nucleic acid content off the Oregon coast. Aquatic Microbial Ecology 43:113-125.

Muyzer, G. et Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73 (1), 127–141.

Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. Diseases of Aquatic Organisms 27:67-76.

Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture 200:223-247.

Payne, M.S., Hall, M.R., Bannister, R., Sly, L., Bourne, D.G., 2006. Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster (*Panulirus ornatus*). Aquaculture 258:80-90.

Perreault, N.N., Andersen, D.T., Pollard, W.H., Greer, C.W., Whyte, L.G., 2007. Characterization of the Prokaryotic Diversity in Cold Saline Perennial Springs of the Canadian High Arctic. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (5): 1532-1543.

Phung, N.T., Lee, J., Kang, K.H., Chang, I.S., Gadd, G.M., Kim, B.H., 2004. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 233:77-82.

Pinhassi, J., Zweifel, U., Hagström, A., 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63:3359-3366.

Planken, K.L., Koenderink, G.H., Roozendaal, R., Philipse, A.P., 2005. Monodisperse DNA restriction fragments I. Synthesis and characterization. *Journal of Colloid and Interface Science* 291(1):120-5.

Prescott, Harley, Klein, 1995. *Microbiology*, second edition. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, 1014 p.

Rombaut, G., Suantika, G., Boon, N., Maertens, S., Dhert, P., Top, E., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture* 198:237-252.

Sandaa, R.-A., Magnesen, T., Torkildsen, L., Bergh, O., 2003. Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*) using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Systematic and Applied Microbiology* 26:302-311.

Schäfer, H. et Muyzer, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, 30:425-468.

Sherr, E.B., Sherr, B.F., Longnecker, K., 2006. Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep-Sea Research I* 53:713-725.

Skjermo J. et Vadstein O., 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255-256(1): 185-191.

Skjermo, J. et Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177:333-343.

Sugita, H., Nakamura, H., Shimada, T., 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* 243:403-409.

Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., Ng, W.-K., Bell, J.G., Campbell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137:49-63.

Vaseeharan, B. et Ramasamy, P., 2003. Abundance of potentially pathogenic microorganisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiological Research* 158:299-308.

7 ANNEXE 1

Exemple d'un gel de PCR-DGGE pour les bassins d'élevage en 2005 au jour 4 de l'échantillonnage où L1 : témoin; L2 : eau de mer (échantillon 1), L3 : eau verte (échantillon 1), L4 : eau verte (échantillon 2), L5 : « Commercial » (échantillon 1), L6 : eau de mer (échantillon 2); L7 : « Commercial » (échantillon 2), L8 : « Expérimental 1 » (échantillon 1), L9 : « Expérimental 1 » (échantillon 2).

L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9

