



Université du Québec
à Rimouski

**PERFORMANCE ET VALEUR NUTRITIONNELLE DES
NAUPLII DE COPÉPODES COMME NOURRITURE
VIVANTE DANS L'ÉLEVAGE DES LARVES DE PLIE
ROUGE (*Pseudopleuronectes americanus*)**

Mémoire présentée

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© **MARÍA ANGÉLICA MARTÍNEZ SILVA**

Janvier 2018

COMPOSITION DU JURY :

DOMINIQUE ROBERT, PRÉSIDENT DU JURY, UQAR - ISMER

RÉJEAN TREMBLAY, DIRECTEUR DE RECHERCHE, UQAR - ISMER

CÉLINE AUDET, CODIRECTRICE DE RECHERCHE, UQAR - ISMER

GESCHE WINKLER, CODIRECTRICE DE RECHERCHE, UQAR - ISMER

**CHRIS PARRISH, EXAMINATEUR EXTERNE, MEMORIAL UNIVERSITY OF
NEWFOUNDLAND**

DÉPÔT INITIAL LE 03 OCTOBRE 2017 DÉPÔT FINAL LE 10 JANVIER 2018

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.

Je voudrais remercier de tout cœur la personne qui a été avec moi pendant ce long chemin, mon copain de vie et d'aventures, Santi. Et je ne peux pas oublier mes parents... c'est grâce à eux si je suis ici aujourd'hui.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mes directeurs de recherche, Réjean Tremblay, Céline Audet et Gesche Winkler. Travailler avec vous a été très enrichissant et m'a permis d'avancer sur le chemin de l'aquaculture qui me passionne. Ce fut un vrai plaisir d'apprendre avec vous trois. Réjean, merci pour ta façon incroyable de répondre toujours à chacune de mes questions et pour la clarté de tes explications, j'ai beaucoup appris de toi et ainsi que de tous les membres de ton labo. Céline, merci pour la confiance que tu m'as accordée et pour la chance que tu m'as donnée de travailler dans ton équipe, merci aussi énormément pour ta patience avec moi à la station pendant les longues journées de formation, malgré la barrière de la langue. Gesche, merci d'être tout le temps là pour nous. J'ai retrouvé grâce à toi l'amour pour les sorties sur le terrain en cherchant nos copépodes. Faire partie de ton labo a aussi été incroyable!

Merci à toute l'équipe de la station aquicole de Pointe-au-Père : Nathalie Morin, Nathalie Gauthier, Renée Gagné et les filles qui nous ont beaucoup aidées toutes les longues journées d'été : Marie-Anne, Mathilde et Evelyn.

Un grand merci spécial à Greg pour les sorties sur le terrain afin de chercher les précieux copépodes et aussi à Gigi, avec qui on a fait une équipe de maîtrise incroyable, merci pour toute l'aide à la station, surtout dans les journées les plus difficiles avec les copépodes, le congrès à Winnipeg, etc.

Je tiens à remercier toute la gang de ma promo, le NÉMO et tout spécialement les Argentines Juli, Xime et Elo, ma maîtrise n'aurait pas été la même sans vous !

Je veux aussi remercier la famille Gonzalez de m'avoir accueillie comme une des leurs. Je n'ai pas de mots pour vous remercier suffisamment. Un gros merci aussi à Annie

Duchesne pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble et pour l'aide à nous intégrer à la famille UQAR.

Je voudrais en plus remercier Nathalie Landreville pour ses précieuses corrections en grammaire et le merveilleux atelier de français, et aussi Martine Belzile pour sa patience et son sourire constant.

Merci de tout mon cœur à ma famille qui a été tout le temps présente pour m'encourager et me permettre de poursuivre mes rêves malgré la distance. Je vous aime beaucoup! Je ne pouvais pas demander une meilleure famille!

Finalement, merci Santi pour ta patience et ton amour inconditionnel, cette réalisation est aussi la tienne.

AVANT-PROPOS

Mon chemin pour arriver aujourd'hui à finalement présenter mon mémoire de maîtrise, a commencé il y a longtemps en Colombie, mon pays d'origine. Biologiste marine de profession, j'ai trouvé ma passion dans l'aquaculture. En 2003, j'ai vécu mon premier contact avec la recherche grâce à Nicolas Chararro, mon professeur d'aquaculture et toute une autorité chez moi, avec qui j'ai travaillé sur la cryoconservation de sperme de poissons pendant que je finissais mon baccalauréat. À partir de ce moment, ma vie a commencé à tourner autour des poissons. Des anniversaires, des dates importantes, des Noëls, des fêtes du Nouvel An, j'en ai raté beaucoup, chaque fois parce que j'étais responsable de mes poissons et de mes expériences, soit avec des vivaneaux au début, des tilapias et des cobias après, ou soit avec les cultures de bactéries (probiotiques ou pathogènes). Mais c'est ça mon bonheur, bien que tous ne le comprennent pas, être dans un labo ou dans les bassins de poissons, ça me fait plaisir. Obtenir des résultats et aller les partager aux congrès, et apprendre chaque jour, c'est comme ça que je voudrais passer le reste de ma vie.

Enfin, quand on a décidé de quitter la Colombie, j'avais tout le temps l'objectif de faire une maîtrise et de me trouver une place dans un groupe de recherche en aquaculture... et je suis chanceuse. Le destin m'a amenée directement à l'ISMER où j'ai trouvé mes incroyables directeurs, Réjean, Céline et Gesche. Maintenant, j'ai changé de langue, j'ai changé les poissons tropicaux pour la plie rouge, une espèce très bien adaptée aux eaux froides du Nord, mais je ne changerai jamais ma passion pour l'aquaculture.

Loin de chez moi, je ne sais pas encore comme se déroulera mon destin, mais c'est sûr que la recherche est le chemin dans lequel je veux continuer...

RÉSUMÉ

Les copépodes sont la principale nourriture de nombreuses larves de poissons marins en milieu naturel. Cependant, dans l'élevage larvaire, les rotifères enrichis sont les proies vivantes les plus couramment utilisées. Des impacts sur le comportement alimentaire, la croissance, la survie et la composition en acides gras (AG) chez les larves de plie rouge nourries avec des copépodes et des rotifères ont été déterminés et liés à la composition en AG des deux proies. Les nauplii d'*Eurytemora herdmani*, une des principales espèces de copépodes de l'estuaire du Saint-Laurent, n'ont montré aucune différence significative dans leurs profils d'acides gras essentiels suggérant une qualité nutritionnelle similaire en termes des acides gras. Ainsi, seul *Eurytemora herdmani* a été utilisé dans cette étude et comparé aux rotifères. Les nauplii des copépodes sont caractérisés par des niveaux plus élevés d'acides gras essentiels, en particulier de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Le niveau d'incorporation sélective des acides gras essentiels dans les tissus larvaires (lipides polaires) a indiqué que les nauplii pourraient mieux remplir les besoins nutritionnels larvaires en DHA que ne le peuvent les rotifères. Finalement, le comportement des larves est modifié selon le régime alimentaire. Les larves nourries avec des nauplii sont plus actives (passent plus de temps à nager).

Mots clés : plie rouge, copépodes, rotifères, acides gras

ABSTRACT

Copepods are the main natural food for many marine fish larvae. However, enriched rotifers are the most commonly used live prey in larval rearing. Impacts on feeding behaviour, growth, survival, and fatty acid (FA) composition of winter flounder larvae fed with copepods and rotifers were determined and related to the FA composition of the two live prey. Nauplii obtained from *Eurytemora* spp., one of the main species of copepods present in the St. Lawrence estuary, showed no significant difference in their essential fatty acid profiles, suggesting similar nutritional quality. Thus, only *Eurytemora herdmani* was used in this study and compared to enriched rotifers. Copepod nauplii were characterized by higher levels of essential fatty acids, particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). The level of selective incorporation of essential fatty acids from diets in larval tissues (polar lipids) indicated that nauplii might better fulfill larval nutritional requirements for DHA than rotifers. Furthermore, larval behaviour was modified according to the diet: larvae fed with nauplii spent more time swimming with no changes in the occurrence of hunting events.

Keywords: winter flounder, copepods, rotifers, nutrition, fatty acids

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
AVANT-PROPOS.....	XI
RÉSUMÉ.....	XII
ABSTRACT	XIII
LISTE DE TABLEAUX	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE D'ANNEXES.....	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	XVIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
LA PLIE ROUGE COMME ESPÈCE MODÈLE.....	1
L'ÉLEVAGE DE LA PLIE ROUGE	2
BESOINS NUTRITIONNELS DES LARVES DE POISSONS MARINS	4
LA NOURRITURE VIVANTE DANS L'ÉLEVAGE DE LARVES DE POISSONS MARINS.....	5
L'IMPORTANCE ET LE RÔLE DES ACIDES GRAS DANS LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE.....	8
OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE.....	10
CHAPITRE 1	12
PERFORMANCE DES NAUPLII DE COPÉPODES COMME NOURRITURE VIVANTE CHEZ LES LARVES DE PLIE ROUGE.....	12
1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	12
1.2 PREY QUALITY IMPACTS THE FEEDING BEHAVIOUR AND LIPID COMPOSITION OF WINTER FLOUNDER (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>) LARVAE.....	14
1.2.1 <i>Abstract</i>	14
1.2.2 <i>Introduction</i>	15
1.2.3 <i>Material and methods</i>	17
1.2.4 <i>Results</i>	23
1.2.5 <i>Discussion</i>	30
1.2.6 <i>Conclusion</i>	38
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	39
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41
ANNEXES.....	52

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1: Croissance quotidienne des larves de plie rouge nourries pendant six jours avec des naupliis (<i>Eurytemora</i> spp.) ou des rotifères (<i>Brachionus plicatilis</i>).....	25
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Placement multidimensionnel (n-MDS) de la composition en acides gras de <i>Acartia</i> sp. et <i>Eurytemora</i> spp.	21
Figure 2: Abondance d' <i>Acartia</i> sp. et <i>Eurytemora</i> sp. aux trois sites d'échantillonnage de l'estuaire du Saint-Laurent en relation avec la température et la salinité.	23
Figure 3: Composition en acides gras essentiels (EFA) des proies (rotifères <i>Brachionus plicatilis</i> et nauplii d' <i>Eurytemora</i> spp.) utilisées pour chaque essai d'alimentation.	24
Figure 4: Pourcentage d'acides gras essentiels (fraction neutre) aux jour 0 et 6 (J0 et J6) chez les larves nourries avec des rotifères <i>Brachionus plicatilis</i> ou nauplii d' <i>Eurytemora</i> spp.	26
Figure 5: Concentration (mg mg ⁻¹) en acides gras neutres chez les larves nourries avec des rotifères <i>Brachionus plicatilis</i> ou nauplii d' <i>Eurytemora</i> spp.	27
Figure 6: Ratio entre les acides gras polaires des larves et les acides gras totaux des proies pour les larves nourries avec des rotifères <i>Brachionus plicatilis</i> ou des nauplii d' <i>Eurytemora</i> spp.	28
Figure 7: Pourcentage de temps passé par les larves de plie rouge en nage et au repos dans 10 minutes suivant l'alimentation.	29

LISTE D'ANNEXES

Annexe 1 : Pourcentage (mol %) d'acides gras totaux de copépodes adultes échantillonnés dans l'estuaire du Saint-Laurent pendant la saison estivale de 2015.	53
Annexe 2 : Pourcentage (mol %) et concentration (mg ml ⁻¹) en acides gras totaux chez les proies utilisées pendant les expériences d'alimentation de larves de plie rouge.....	54
Annexe 3a: Acides gras (fraction neutre) à la fin de l'expérience d'alimentation (jour 6) chez les larves nourries avec des nauplii d' <i>Eurytemora</i> sp. ou des rotifères <i>Brachionus plicatilis</i>	55
Annexe 3b: Acides gras (fraction polaires) à la fin de l'expérience d'alimentation (jour 6) chez les larves nourries avec des nauplii d' <i>Eurytemora</i> sp. ou des rotifères <i>Brachionus plicatilis</i>	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AA	Arachidonic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
EFA	Essential Fatty Acids
EPA	Eicosapentaenoic acid
FA	Fatty acids
FAA	free amino acid
HUFAs	Highly unsaturated fatty acids
LC-PUFA	Long chain polyunsaturated fatty acids
SGR	Specific growth rate
MUFA	Monounsaturated fatty acids
NL	Neutral lipids
n-MDS	non-metric multi-dimensional scaling
PL	Polar lipids
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
SFA	Saturated fatty acids
DW	Dry weight
DPH	Days post hatching

INTRODUCTION GÉNÉRALE

LA PLIE ROUGE COMME ESPÈCE MODÈLE

La plie rouge, *Pseudopleuronectes americanus*, est un poisson plat d'intérêt commercial que l'on retrouve sur la côte nord-est de l'Amérique du Nord (Scott et Scott, 1988). C'est un poisson dont la durée de vie peut atteindre 15 ans et dont la longueur moyenne des adultes est de 65 cm pour un poids maximal de 3 kg. L'habitat de la plie rouge varie selon les étapes de son cycle vital, ce qui affecte sa distribution (McCracken, 1963).

Les adultes matures vivent dans les eaux marines profondes et effectuent une migration vers les zones côtières pour se reproduire dans des baies ou des estuaires à fond sableux d'une profondeur de 6-15 m (Pereira, 1999). La plie rouge est eurytherme (températures entre - 1.9 et +29 °C) et euryhaline (salinités entre 3 et 40) et son taux de croissance est fortement corrélé aux conditions de température (Percy, 1962). Les larves sont pélagiques avec une symétrie bilatérale avant la métamorphose et se caractérisent par la migration de l'œil gauche vers le côté droit du corps, causant une modification de 90 degrés de l'orientation générale du corps. Chez les poissons plats, ce processus est un stade critique qui implique des changements morphologiques et physiologiques profonds, en fait, la migration des yeux chez les poissons plats est le développement asymétrique le plus radical chez les vertébrés (Kjorsvik et al., 2011). Au cours de cette période, une étape importante est le passage au stade benthique, un changement comportemental et écologique associé à une transition radicale du milieu de vie (Osse et van den Boogaart, 1997; Schreiber, 2001; Geffen et al., 2007). Le stade larvaire, encore pélagique, est un stade de vie vulnérable et hautement spécialisé. Le défi lors de l'élevage de ce type de poissons est donc de connaître les besoins nutritionnels et environnementaux particuliers des différents stades de développement (Kjorsvik et al., 2011).

L'ÉLEVAGE DE LA PLIE ROUGE

La plie rouge est considérée comme une espèce potentielle pour la diversification de l'aquaculture marine en eau froide, car elle a la capacité de survivre aux températures hivernales inférieures à 0°C grâce à la présence des protéines antigels présentes dans son plasma sanguin (Duman et de Vries, 1974). Cependant, la production aquacole de cette espèce n'a pas progressé comme on aurait pu s'y attendre (Audet et Tremblay, 2011). Le goulot majeur d'étranglement dans le développement commercial de cet élevage, comme pour la plupart des poissons marins, est le manque de nourriture adéquate pour couvrir les besoins nutritionnels des premiers stades (Marcus, 2005).

Chez les poissons plats, la métamorphose est complexe (Bishop et al. 2006) et les différences profondes qui existent entre larves et juvéniles font en sorte que l'élevage des deux stades nécessite des installations et procédures très différentes (Bertram et al., 1993). Tous les aspects de l'élevage doivent être adaptés incluant la conception des bassins, l'écoulement de l'eau, les soins quotidiens et le régime alimentaire. Comme le développement de moulée n'est pas encore complètement optimisé pour les premiers stades des poissons marins, mais surtout parce que les larves sont des prédateurs visuels dont le comportement alimentaire est stimulé par le mouvement, l'utilisation de différentes espèces de zooplancton est souvent nécessaire à l'étape de la première alimentation (Audet et Tremblay, 2011). Cette nourriture vivante doit toutefois être ajustée en fonction de l'ontogénie du poisson par l'utilisation de différentes espèces, densités et enrichissements (Baglolle et al., 1997). De la même façon, afin de justifier une production commerciale, il est nécessaire de développer un modèle de croissance pour déterminer les coûts de production liés à la durée de l'élevage jusqu'à la taille commerciale. C'est certainement un élément clé, mais malheureusement les connaissances sont encore trop fragmentaires chez cette espèce pour pouvoir développer un tel modèle (Audet et Tremblay, 2011).

En conditions d'élevage, les nouvelles larves sont attirées par le mouvement, justifiant le choix des proies vivantes pour leur survie et leur croissance (Audet et

Tremblay, 2011). C'est précisément à cette période que l'on observe des mortalités importantes reliées aux déficits nutritionnels des proies. De plus, l'étape post-métamorphose avec passage à la vie benthique est une période critique de la vie chez les poissons plats et à cette période le changement d'alimentation est essentiel pour la survie (Fraboulet et al., 2010; 2011). Pour cette raison, une production réussie de larves de poissons marins dépend de la production de proies vivantes de haute qualité, avec des caractéristiques nutritionnelles adéquates, microbiologiques et zootechniques. Les espèces de zooplancton les plus couramment utilisées comme nourriture vivante sont des rotifères (*Brachionus plicatilis*) et des artémies (*Artemia salina*) (Ajiboye et al., 2011). Celles-ci ne sont pas la nourriture naturelle des larves, mais elles sont faciles à produire en densités élevées et leur valeur nutritionnelle peut être manipulée (Øie et al., 2011). Une autre méthode utilisée pour améliorer les conditions de culture et augmenter la survie est l'utilisation de l'eau verte, qui est souvent utilisée pour améliorer le comportement alimentaire des larves et pour améliorer l'immunité larvaire (Audet et Tremblay, 2011). Quant aux géniteurs, ils sont généralement maintenus à température ambiante à une photopériode naturelle (Plante et al., 2002 ; 2003).

Afin de réduire le manque de connaissances sur la plie rouge, différentes études ont été faites dans notre laboratoire sur les conditions d'élevage et plus particulièrement de la période qui va de l'éclosion jusqu'à la métamorphose (Fraboulet et al., 2009). Mercier et al. (2004) ont démontré que l'acclimatation de rotifères à basse température, afin de les utiliser comme nourriture vivante, ne présente pas d'avantages pour l'optimisation de l'élevage des larves de la plie. Une comparaison entre l'élevage de larves nourries avec des rotifères enrichis et un aliment microencapsulé a été faite par Ben Khemis et al., (2000; 2003), travaux qui ont démontré que les néo-juvéniles étaient incapables d'ingérer l'aliment microencapsulé dans les premières semaines de vie et que l'utilisation de nourriture vivante en début de phase larvaire est essentielle pour la survie et la croissance. Seychelles et al., (2011 ; 2013) ont démontré pour la première fois qu'il existe une relation entre la densité bactérienne dans l'intestin et le type d'enrichissement de rotifères. Les enrichissements plus riches en acide arachidonique (AA) avec de ratios plus élevés d'acide docosahexaenoïque

(DHA) / acide eicosapentaenoïque (EPA) diminuent la colonisation bactérienne. Ils ont aussi démontré que l'AA a un rôle indirect sur la santé des larves. Les travaux de Vagner et al. (2013; 2014) ont évalué l'effet de l'utilisation des rotifères enrichis avec trois différents enrichissements à base de microalgues : un mélange de *Nannochloropsis oculata* (Nanno), *Isochrysis galbana* (T-iso), and *Pavlova lutheri*, l'utilisation unique de Nanno ou l'utilisation unique de Tiso. Leurs résultats ont montré que la teneur en acides gras polyinsaturés inférieure des régimes Tiso et Nanno n'affecte pas le développement larvaire ou l'accumulation de réserves de lipides. Par ailleurs, ils suggèrent la présence de différentes sources de synthèse énergétique variable à chaque étape du développement. Chez les néo-juvéniles de plie, différents systèmes d'élevage ont été évalués sur la survie, la pigmentation et la croissance et n'ont montré aucun effet. Fraboulet et al. (2010) ont mis en évidence le coût énergétique élevé associé à la métamorphose, les néo-juvéniles utilisant la plupart de leurs réserves de lipides pendant la période de croissance et lors du passage à la vie benthique. Chez les adultes, différentes conditions de production comme la salinité, ainsi que le stress causé par la captivité sur les réserves énergétiques ont été étudiés (Plante et al., 2002 ; 2003 ; 2005). Leurs résultats n'ont montré aucun effet de la salinité en termes de croissance, de condition ou de réserves d'énergie. Cependant l'eau saumâtre favorisait la survie et réduisait les signes de stress et l'occurrence d'infections. D'autre part, ils ont constaté que le pourcentage d'eau dans les muscles, qui peut être facilement déterminé, est un moyen efficace de prédire avec précision les réserves d'énergie chez la plie rouge.

BESOINS NUTRITIONNELS DES LARVES DE POISSONS MARINS

Lorsqu'ils sont nourris à satiété, les poissons sont capables d'ajuster leur consommation alimentaire en fonction de la densité énergétique de l'aliment afin d'atteindre une croissance maximale. Cette adaptation n'est pas toujours exacte et le remplissage de l'estomac peut être limitatif lorsque la nourriture est faible en contenu énergétique. En général, les régimes devraient fournir au moins 15-18 mégajoules (MJ) d'énergie digestible (EG) (Médale et Guillaume, 1999). En plus de cette énergie, les aliments doivent contenir des éléments essentiels, tels que les acides gras. Les poissons marins juvéniles nécessitent

généralement de 0,5 à 1,0 % de leur poids sec en acides gras n-3 (HUFA) dans leur régime alimentaire, ce qui est facilement obtenu en intégrant de 5 à 21 % d'huile de poisson riche en triacylglycérol (Sargent et al., 1997). En moyenne, les exigences pour le LCPUFA dans les larves de poissons marins sont atteintes avec un aliment ou une proie contenant environ 3 % de LCPUFA en poids sec. Toutefois, les besoins en certains LCPUFA pourraient être modifiés par les conditions abiotiques de l'environnement (Izquierdo et Koven, 2011). Ainsi, une corrélation positive entre le degré d'insaturation des acides gras et la fluidité des membranes cellulaires des poissons a été observée, ce qui pourrait être particulièrement important dans les écloseries opérant à basse température (Bowden et al., 1996). Les LCPUFA considérés comme essentiels, appelés acides gras essentiels (EFA) sont l'AA, l'EPA et le DHA (Avella et al., 2007; Støttrup et al., 1999). Le DHA et l'EPA sont impliqués dans la structure des membranes cellulaires alors que l'AA et l'EPA sont des précurseurs de la chaîne des eicosanoïdes à la base de la réponse au stress (Glencross, 2009). Chez les poissons, la synthèse des FA se produit dans le foie et est catalysée par un complexe d'enzymes synthétases des acides gras. Chez plusieurs poissons marins comme la plie, le 16:0 et le 18:0 sont les acides gras les plus abondants (Corraze, 1999). Toutefois, chez les poissons marins la capacité de biosynthèse des EFA est très réduite et doit ceux-ci doivent provenir des aliments ingérés (Glencross, 2009).

LA NOURRITURE VIVANTE DANS L'ÉLEVAGE DE LARVES DE POISSONS MARINS

La période où les larves ont besoin de proies vivantes est courte mais essentielle, car la croissance est très rapide et la mortalité est élevée (Robin et Gatesoupe, 1999). Dans le milieu marin pélagique les copépodes (Crustacea: Arthropoda) sont les animaux zooplanctoniques les plus abondants et probablement les plus importants au niveau écologique étant, après le phytoplancton à la base du réseau alimentaire marine et ils sont les proies principales de la majorité des espèces de poisson lors du stade larvaire (Perumal et al., 2009; Avella et al., 2007). Ils sont considérés comme des proies vivantes de valeur nutritionnel « supérieur » pour les espèces aquacoles, car ils sont une source précieuse de protéines, de lipides, de glucides et d'enzymes jouant tous un rôle important dans la

digestion tout en favorisant la métamorphose des larves (Perumal et al., 2009). Cependant, la technologie permettant la culture intensive de copépodes à des densités élevées n'est pas encore disponible partout et certaines écloséries récoltent encore des copépodes directement dans la mer pour alimenter leurs larves. Cependant, ils existent certains élevages de copépodes à grande échelle pour l'aquaculture commerciale au Danemark et à Taiwan (Hansel, 2017).

Pour réussir à cultiver commercialement des copépodes, il est important de: 1) maximiser la production et l'éclosion des œufs, 2) optimiser la valeur nutritionnelle des différents stades de copépodes qui seront fournis aux larves de poisson, et 3) harmoniser le taux de développement des copépodes en lien avec la taille de la bouche des larves de poissons (Kleppel et al., 2005).

Il existe différents critères pour faire la sélection des bonnes espèces à utiliser comme proie vivante, comme la facilité de capture et de culture, un fort taux de croissance, une production d'œufs en continu, la taille, la composition biochimique et le comportement de nage (Marcus, 2005). La large variété de tailles présente chez les copépodes permet de répondre aux différents besoins des larves pendant leur développement, car les premiers nauplii ont une taille de 80-200 μm et les adultes de 1-5 mm (Evjermo et al., 2003). La valeur nutritionnelle des copépodes est également meilleur pour les larves de poissons marins permettant d'éviter les processus d'enrichissement avant de les utiliser (Drillet et al., 2011). Les espèces de copépodes qui habitent près du littoral ont tendance à convertir les nutriments de leur nourriture en nouvelle biomasse relativement rapidement, limitant l'accumulation de grandes quantités de lipides (Kleppel et al., 2005). Les copépodes côtières (avec du potentiel d'être utilisés en aquaculture, e.g. *Acartia* spp., et *Eurytemora* spp.) ont généralement peu de lipides totaux en comparaison avec les autres proies traditionnellement utilisées en aquaculture (rotifères et *Artemia*) (Støttrup et Norsker, 1997). Cependant, ils sont plus riches en acides gras essentiels présents majoritairement sous forme de phospholipides, plus facilement assimilables pour les larves de poissons (van

der Meeren et al., 2008). Ainsi, les copépodes sont riches en acides gras essentiels, soient AA, EPA et DHA (Avella et al., 2007; Støttrup et al., 1999). Les phospholipides chez les copépodes adultes peuvent constituer près de 57% des lipides totaux et 63% chez les nauplii et sont donc majoritaires par rapport aux lipides de réserves énergétiques, dits neutres (van der Meeren et al., 2008). Certains auteurs considèrent que les acides gras hautement insaturés (HUFA) des copépodes viennent directement du phytoplancton qu'ils consomment. Toutefois, ils possèdent une excellente capacité d'élongation et de désaturation des FA n-3 suggérant un fort potentiel de biosynthèse des EFA, tandis que les mêmes capacités sont très limitées chez les rotifères et *Artemia* (Marcus, 2005). Furthermore, copepods also tend to be better digested than *Artemia* because of their slower transit through fish larvae guts (Arndt et al., 2015).

Drillet et al. (2006) ont démontré que les rotifères enrichis avec *Rhodomonas salina* contiennent une proportion plus élevée d'acides aminés essentiels dans leur fraction d'acides aminés libres (FAA) (43 %) que les copépodes *Acartia tonsa* (30 à 32 %). Cependant, les rotifères avaient des niveaux inférieurs d'acides gras essentiels comme le DHA (7 % contre 23-32 % chez les copépodes) et leur rapport DHA / EPA était inférieur à celui des copépodes (0,54 vs 1,35-1,63). Il y a des évidences que la valeur biologique du DHA serait plus élevée que celle de l'EPA lors de la première alimentation chez certaines espèces marines, ce qui suggère que les exigences en n-3 HUFA pourraient non seulement être fonction de la quantité totale de ces acides gras dans l'alimentation, mais aussi des proportions relatives de DHA et d'EPA (Watanabe, 1993).

Les proies vivantes qui ont été les plus étudiées pour l'élevage des poissons marins sont les copépodes calanoïdes. *Eurytemora affinis* par exemple, passe à travers une diapause pendant l'étape d'œuf, étape qui présente un intérêt pour l'aquaculture. Durant cette période, les œufs peuvent survivre jusqu'à 20 mois (Marcus, 2005). *Acartia tonsa* et *A. clausi* ont été cultivés avec succès afin de nourrir des larves de poisson. Même si ces espèces n'ont pas de diapause, les œufs peuvent être conservés au froid pendant plusieurs

semaines (Støttrup et al., 1999). Barroso et al. (2013) ont utilisé le copépode *A. tonsa* comme premier aliment pour *Centropomus parallelus* et les résultats montrent que les larves alimentées avec des copépodes ont de meilleures compositions en acides gras essentiels que celles alimentées avec des rotifères (*B. rotundiformis*) enrichis avec *Nannochloropsis oculata*. Une autre étude a démontré une performance supérieure des nauplii de copépodes, qui contiennent plus de 50% de phospholipides, par rapport à d'autres espèces de proies vivantes (McEvoy et al., 1998). Bergvik et al. (2012) ont aussi constaté que le profil en acides gras des copépodes était lié au profil d'acide gras des sources alimentaires potentielles. En ce qui concerne la composition en acides gras d'*E. affinis*, deux populations ont été caractérisées et des niveaux élevés en DHA) et en EPA ont été trouvés (Cabrol et al., 2015). Selon le travail de Hagemann et al. (2013 et 2016), la teneur totale en lipides dans les œufs de *A. tonsa* était de 18 % du poids sec avec une somme en DHA et d'EPA qui atteignait près de 25% des acides gras totaux. Dans les nauplii récemment éclos, la teneur en lipides représentait 14 % du poids sec et la teneur en DHA et EPA était respectivement de 16 et 11% des acides gras totaux. Dans une autre étude qui compare la composition biochimique des proies vivantes, Evjeremo et Olsen (1997) ont reporté des résultats différents. La teneur totale en lipides d'*Artemia franciscana* de 21-23% de leur poids sec après enrichissement avec du Super Selco ou DHA Selco était deux fois plus élevée que chez les copépodes adultes *Temora longicornis* et *Eurytemora* sp. (9-11% de leur poids sec).

L'IMPORTANCE ET LE RÔLE DES ACIDES GRAS DANS LE DÉVELOPPEMENT LARVAIRE

Les classes les plus importantes de lipides dans la nutrition animale sont les triglycérides (TAG) et les phospholipides (PL). La composition en acides gras des lipides neutres reflète généralement la composition en acides gras de l'alimentation, alors que la composition en acides gras des lipides polaires est plus fortement régulée et reflète les exigences des membranes cellulaires des individus (Sargent et al., 1999). Les principaux acides gras hautement insaturés (HUFA), soit le DHA, l'EPA et l'AA ont été identifiés comme des EFA chez les poissons marins en raison de l'activité négligeable de la delta-5 désaturase,

principale enzyme désaturante responsable de la formation des HUFA à partir de précurseurs à courte chaîne (Tocher, 1993).

La période de croissance des larves se caractérise par la prolifération rapide des membranes cellulaires et sub-cellulaires, dans lesquelles les HUFA sont incorporés comme composantes structurales primaires, fournissant la fluidité essentielle nécessaire au bon fonctionnement et à la signalisation des membranes biologiques. Ainsi, les besoins en HUFA s'amplifie au cours des stades larvaires du développement, et la nécessité d'une source exogène devient essentiel pour ces nutriments (Willey et al., 2003). Dans le milieu marin, la forte production d'acides gras polyinsaturés (PUFA) à longue chaîne (20 carbons ou plus) est assurée par le premier maillon de la chaîne alimentaire, le phytoplancton (Corraze, 1999).

Les acides gras essentiels sont requis par les organismes pour deux raisons principales : 1) leur rôle structurel, car les phospholipides sont des composantes importantes des membranes cellulaires et pour le transport des lipoprotéines et 2) comme substrat pour la synthèse de toute la famille des molécules bioactives comme les prostaglandines (PG), les leucotriènes et les thromboxanes. Ces composantes sont importantes pour la liaison entre les hormones et leurs sites de réactions. De plus, les lipides ont de multiples fonctions dans le système nerveux, circulatoire, digestif, reproductif, rénal et immunitaire, etc. (Watanabe, 1982). Finalement, un dernier rôle a été découvert pour l'AA, soit celui de médiateur dans la régulation de certains enzymes (Bell et al., 2003). Pour certains auteurs, le rôle du DHA est plus important que celui du EPA spécialement pour la survie et la résistance au stress (Robin et Gatesoupe, 1999). Ceci est dû à des interactions compétitives non seulement entre le DHA et l'EPA, mais aussi entre l'EPA et AA. La concurrence du DHA et de l'EPA provient du fait que les deux molécules utilisent les mêmes enzymes pour estérifier les acides gras dans la structure des phospholipides (Sargent et al., 1999). Étant donné que le DHA se trouve naturellement à des niveaux très élevés dans les tissus nerveux, on pense qu'il joue un rôle spécialisé dans la

structure et la fonction de la membrane neurale (Bell et al., 2003). Par conséquent, un niveau trop élevé d'EPA dans l'alimentation par rapport au DHA aurait un impact négatif sur la fonction neurale larvaire se reflétant sur la croissance et la survie (Bell et al., 2003; Copeman et al., 2002).

Les lipides sont très riches en énergie: 1 g de PL fournit en moyenne 33 kJ (8 kcal) et 1 g de TAG, 40 kJ (9.5 kcal). En supposant une digestibilité de 95 %, la valeur énergétique (en termes d'énergie digestible) de 1 g de lipides dans la nourriture est de 37-38 kJ, c'est-à-dire 2.5 fois plus que les glucides et 1.8 fois plus que les protéines (Corraze, 1999). L'addition des lipides dans la nourriture peut également favoriser la pigmentation des poissons, car ils contribuent à la bonne assimilation et à la digestion des pigments (Choubert, 1999). Cet aspect est très important, car les problèmes de pigmentation sont très fréquents dans l'aquaculture des poissons plats et ont été identifiés comme étant liés à un déficit en AA (Audet et Tremblay, 2011).

OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE

L'objectif général de cette étude était d'évaluer la valeur nutritionnelle des copépodes comme proie vivante et comment ils affectent le contenu en acides gras chez les larves de plie rouge. Afin de répondre à cette question, trois objectifs spécifiques ont été retenus.

Objectif 1. Déterminer la composition, l'abondance et le contenu en acides gras des copépodes présents dans l'estuaire du Saint-Laurent pendant la saison estivale.

Hypothèse testée. Bien que dominantes dans l'estuaire du Saint-Laurent, la composition, l'abondance et le contenu en acides gras d'*Acartia* sp. et d'*Eurytemora* sp. diffèrent au cours de la saison estivale.

Objectif 2. Comparer le contenu en acides gras de différents types de proies vivantes pour la culture de larves de plie rouge (copépodes vs rotifères).

Hypothèse testée. Le contenu en acides gras essentiels sera supérieur chez les copépodes comparativement à celui observé chez les rotifères.

Objectif 3. Comparer la composition en acides gras et le comportement alimentaire chez les larves nourries avec différentes proies vivantes (copépodes vs rotifères).

Hypothèse testée. La composition en acides gras et le comportement alimentaire chez les larves de plie rouge seront différents selon le type de proies consommées.

Ce travail a été financé par le FQRNT (Fonds Québécois pour la Recherche, Nature et Technologies) à R.T., C.A. et G.W. (2016-PR-190063) ainsi que par Ressources Aquatiques Québec (RAQ).

CHAPITRE 1

PERFORMANCE DES NAUPLII DE COPÉPODES COMME NOURRITURE VIVANTE CHEZ LES LARVES DE PLIE ROUGE

1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Les copépodes sont la principale nourriture de nombreuses larves de poissons marins en milieu naturel. Cependant, dans l'élevage larvaire, les rotifères enrichis sont les proies vivantes les plus couramment utilisées. Des impacts sur le comportement alimentaire, la croissance, la survie et la composition en acides gras (AG) chez les larves de plie rouge nourries avec des copépodes et des rotifères ont été déterminés et liés à la composition en AG des deux proies. Les nauplii d'*Eurytemora herdmani*, une des principales espèces de copépodes de l'estuaire du Saint-Laurent, n'ont montré aucune différence significative dans leurs profils d'acides gras essentiels suggérant une qualité nutritionnelle similaire en termes des acides gras. Ainsi, seul *Eurytemora herdmani* a été utilisé dans cette étude et comparé aux rotifères. Les nauplii des copépodes sont caractérisés par des niveaux plus élevés d'acides gras essentiels, en particulier d'DHA et d'EPA. Le niveau d'incorporation sélective des acides gras essentiels dans les tissus larvaires (lipides polaires) a indiqué que les nauplii pourraient mieux remplir les besoins nutritionnels larvaires en DHA que ne le peuvent les rotifères. Finalement, le comportement des larves est modifié selon le régime alimentaire. Les larves nourries avec des nauplii sont plus actives (passent plus de temps à nager). Compte tenu de ces résultats-ci, il pourrait être envisagé de développer une culture de copépodes, qui semble être l'avenir des proies vivantes pour l'élevage de larves de poissons, ou d'améliorer la manière d'enrichir les rotifères en ajoutant plus de DHA.

Cet article, intitulé en anglais « Prey quality impacts the feeding behaviour and lipid composition of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae », fut corédigé par moi-même ainsi que par les professeurs Réjean Tremblay, Céline Audet et Gesche Winkler. Il sera soumis pour publication à la revue *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de la question, l'exécution des expériences et la rédaction de l'article. Les professeurs Tremblay, Audet et Winkler ont fourni l'idée originale, et ils ont aidé au développement de la méthode ainsi qu'à l'analyse de résultats et à la révision de l'article. Une version abrégée de cet article a été présentée à la réunion annuelle de Ressources Aquatique Québec (RAQ) à l'automne 2016 où j'ai reçu le prix du public pour la meilleure affiche. À l'hiver 2017, une présentation orale avec les résultats finaux de la maîtrise a été faite à la conférence de la Société canadienne de Zoologie à Winnipeg.

1.2 PREY QUALITY IMPACTS THE FEEDING BEHAVIOUR AND LIPID COMPOSITION OF WINTER FLOUNDER (*Pseudopleuronectes americanus*) LARVAE

1.2.1 Abstract

Copepods are the main natural food for many marine fish larvae. However, enriched rotifers are the most commonly used live prey in larval rearing. Impacts on feeding behaviour, growth, survival, and fatty acid (FA) composition of winter flounder larvae fed with copepods and rotifers were determined and related to the FA composition of the two live prey. Nauplii of *Eurytemora* spp., one of the main species of copepods present in the St. Lawrence estuary, showed no significant difference in their essential fatty acid profiles, suggesting similar nutritional quality. Thus, only *Eurytemora herdmani* was used in this study and compared to enriched rotifers. Copepod nauplii were characterized by higher levels of essential fatty acids, particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). The level of selective incorporation of essential fatty acids from diets in larval tissues (polar lipids) indicated that nauplii might better fulfill larval nutritional requirements for DHA than rotifers. Furthermore, larval behaviour was modified according to the diet: larvae fed with nauplii spent more time swimming with no changes in the occurrence of hunting events.

Keywords: winter flounder, copepods, rotifers, nutrition, fatty acids

1.2.2 Introduction

In nature, it has been demonstrated that marine fish larvae mainly feed on zooplankton, especially copepod nauplii and copepodites (Llopiz, 2013; Robert et al., 2014). However, in marine larval fish rearing, which is the case with winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), the most common live prey used as a proxy for copepods are rotifers (Fraboulet et al., 2010; 2011). Rotifers are easy to produce in high abundance year-round, their size fits the mouth of many species of fish larvae, and their slow swimming speeds make them easy to capture by fish larvae (Øie et al., 2011). However, the nutritional value of rotifers is generally considered poor for marine fish larvae because of their low levels of essential fatty acids (EFA; Castell et al., 2003).

EFA include eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA), docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), and arachidonic acid (20:4n-6, AA), and these have been reported to be essential for the optimal growth of several marine fish species whose biosynthetic production is insufficient to meet their nutritional requirements (Glencross, 2009). EFA functions can be divided in two broad areas, with EPA and DHA involved in maintenance of the structural and functional integrity of biological membranes (Hazel, 1995) while AA and EPA acting as precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones (Howard and Stanley, 1999). Several studies have evaluated different ways to enrich rotifers to obtain the best proportions of essential fatty acids (Castell et al., 2003; Haché and Plante, 2011; Vagner et al., 2014; Haché et al., 2016).

The optimization of EFA composition in marine fish feed is complicated by the competitive interaction between EPA and DHA for phospholipid biosynthesis and between AA and EPA for the eicosanoid response (Sargent et al., 1999). Thus, the correct balance between AA, EPA, and DHA and total fatty acid content is important to avoid nutritional deficiency (Glencross, 2009). Seychelles et al. (2009; 2011) and Vagner et al. (2013; 2014) used different rotifer enrichments with specific proportions of EFA to rear winter flounder

larvae. They found that while low levels of highly unsaturated fatty acids (HUFA) did not affect growth performance or lipid reserves, an essential combination of EPA, AA, and DHA is required to sustain the up-regulation of growth hormone gene expression throughout larval development and metamorphosis in winter flounder. These authors found that the best combination was an enrichment containing an EPA/DHA/AA ratio of around 4/3/1.

Despite fast growth in winter flounder reared with enriched rotifers, there is still a high larval mortality rate persists at metamorphosis (Audet and Tremblay, 2011). Mercier et al. (2004) suggested that the use of another live prey more representative of the natural environment of larvae could be an interesting hypothesis to test for optimizing larval rearing of winter flounder. Therefore, a new alternative in aquaculture is the use of copepods as live feed, since they are the natural prey (Ajiboye et al., 2011; van der Meeren et al., 2008; Støttrup, 2003; Hernandez-Molejon and Alvarez-Lajonchere, 2003), and some copepods are exploited successfully in extensive systems in Taiwan and in Denmark (Hansel, 2017).

Several studies have established that copepods are naturally richer in EFA than are rotifers (Barroso et al., 2013; Støttrup and Norsker, 1997; Avella et al., 2007), with higher levels of phospholipids (> 50%) (McEvoy et al., 1998); this could improve rearing success because this lipid class seems to be more easily assimilated by various fish species (Gisbert et al., 2005; Tocher et al., 2008). Another important advantage of copepods is that their size varies according to their ontogeny, providing prey of different size ranges for marine fish larvae and juveniles (Lee et al., 2005). Shaheen et al. (2001) evaluated the preference of winter flounder larvae for two copepod species (*E. affinis* and *A. hudsonica*) and demonstrated that behaviour and morphology of the prey are key factors in selection by fish. However, the relationship between prey preferences and their nutritional value in the early stages of winter flounder remains unknown. Furthermore, knowledge of the

biochemical and nutritional value of copepods for early stages of marine fish is fragmentary.

The objectives of this current study were (1) to characterize the composition, abundance, and fatty acid content of adult copepods from a natural environment in order to know their availability and their nutritional value as live prey for winter flounder rearing; (2) to compare the nutritional value of copepod nauplii and enriched rotifers with the larval rearing success of winter flounder; and (3) to analyze and compare the feeding behaviour (swimming, resting, and hunting) of larvae fed with copepod nauplii or rotifers. We hypothesized that copepod nauplii would be more preyed upon and more appropriate to meet nutritional needs. This study highlights new knowledge of the nutritional needs and feeding behaviour of winter flounder larvae.

1.2.3 Material and methods

Copepod sampling

Three stations were sampled in the St. Lawrence estuary (Rivière-du-Loup: 47°84'N, 69°57'W; Kamouraska: 47°56'N, 69°87'W; Rivière-Ouelle: 47°48'N, 70°02'W) on five occasions (1, 16 June; 1, 29 July; 14 August 2015). Seawater salinity and temperature were measured at the surface at the beginning and end of sampling at each site with a YSI professional plus probe. Zooplankton was obtained by 10 min horizontal surface tows from the dock using a ring net (0.5 m diameter, 245 µm mesh size) equipped with a flux meter in the middle of the net. For each station, one sample was preserved in ethanol (95%), and placed in the freezer (-20°C) until laboratory identification; after 24 h, ethanol was totally replaced. Zooplankton from the second sample were preserved in seawater at -80 °C for lipid analyses. Three 10 ml subsamples from a 1 L sample were taken for zooplankton identification (minimum of 300 individuals per subsample) and abundance determination using a counting chamber under a stereomicroscope.

Winter flounder larval production

All experiments were conducted at the aquaculture station of the Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Québec, Canada (48°27'N, 68°32'W) from April to August 2016. Female winter flounder broodstock were collected in the Baie-des-Chaleurs, Québec, Canada (48°10'N, 67°30'W), and larvae were obtained using the fertilization protocol described by Ben Khemis et al. (2000). The rearing protocol was similar to the one used by Vagner et al. (2014). Briefly, newly hatched larvae were reared in 55 L cylindroconical polyethylene tanks at a rearing density of 1 larva·ml⁻¹, supplied with filtered sea water (10 µm), and maintained at 10°C with a 12L:12D photoperiod. Permanent upwelling was maintained in each tank by an aeration system. From the mouth opening stage (4 days post-hatch [dph]) until the beginning of experiments, larvae were fed daily with the rotifer *Brachionus plicatilis* enriched with Sparkle (Selco, INVE aquaculture Ltd., Thailand) at a concentration of 12 individuals ml⁻¹. In larval rearing tanks, the water supply was stopped each day for 12 h while a green water preparation (*Nannochloropsis oculata* at 1.6 × 10⁶ cells·L⁻¹) was added to each tank. At the end of the day, water circulation resumed, allowing complete renewal of the tank water during the night. Tank bottoms were cleaned weekly.

Copepod nauplii production

Adult copepods (*Eurytemora herdmani*) were collected in June 2016 at the Rivière-du-Loup site, and females with egg sacks were placed in ovitraps (100 µm mesh size) within 10 L tanks filled with 1 µm filtered seawater at 18°C and salinity 27. Hatched nauplii were collected and counted daily, then placed in a 1 L bottle at 10°C with 1 µm filtered seawater at 18°C, salinity 27 and low aeration until use for larval feeding experiments.

Larval feeding experiments

E. herdmani nauplii and enriched rotifers used for larval feeding experiments were maintained in 0.2 µm filtered and aerated seawater (salinity 27), and fed daily with a mix of

microalgae (*Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, and *Pavlova lutheri*, 1:1:1). Two similar experiments were carried out with two different batches of winter flounder larvae of the same age (16 dph). Larval growth, survival, and fatty acid composition were evaluated in six 20 ml well plates after feeding with *E. herdmani* nauplii or *Brachionus plicatilis* for six days. Two winter flounder larvae were placed in each well (total of 72 larvae, for 36 replicates) filled with 20 ml of filtered (1 µm) green seawater (as already described) at 10 °C and salinity 27. Larvae were transferred every day to a new well containing 24 prey (nauplii or rotifers). After six days, the surviving larvae were preserved at -80 °C for lipid analyses.

Specific growth rate (SGR) was calculated according to the following equation (where wt. is weight and the time interval used was six days; Cook et al., 2000):

$$\text{SGR (\% body wt. gain/day)} = \left[\frac{(\text{Log}_n \text{ Final fish wt.} - \text{Log}_n \text{ Initial fish wt.})}{\text{Time interval}} \right] 100$$

Larval behaviour analyses

Larval feeding behaviour was recorded in the six 20 ml well plates (three well plates per treatment). Each well contained two winter flounder larvae of the age 16 days post hatching. Two trials were performed on two different experimental days on larvae of a similar age. Two cameras (GoPro HERO4 Silver + LCD [CHDHY-401]) equipped with a macro polar pro filter were positioned over the three well plates per treatment to give a complete view of each well for video recordings. The behavioural responses of larvae were videotaped and analyzed during the first ten minutes after feeding using NOLDUS OBSERVER XT 9.0 software (Noldus Information Technology Inc., Leesburg, VA, USA). Behaviour was determined and quantified as the time spent (percentage of the total observation time) to swim and rest (as state events) and to hunt (point event).

Fatty acid (FA) composition

For adult copepods of *Acartia* sp. and *E. herdmani*, 60 individuals per sampling period per site were kept on ice and randomly selected under stereomicroscope, for a total of 1840 individuals. Each individual was rinsed with 1 μ m filtered seawater to remove particles on their exoskeleton. Half of the individuals were used for FA analyses and preserved in 4 ml amber glass vials with 3 ml of dichloromethane:methanol (2:1 v/v) under a nitrogen atmosphere at -80 °C. The remaining individuals were used for dry mass estimation (60 °C for 48 h).

For *E. herdmani* nauplii and rotifers used in feeding experiments, 200 individuals were randomly selected and filtered on a pre-combusted (450 °C for 2 h) and pre-weighed GF/C filter (25 mm) for FA analysis and 200 others were used for dry mass determination. For winter flounder larvae, six larvae per treatment and replicate (eight) were used for FA composition analyses and six others for dry mass determination.

Lipids were extracted in dichloromethane–methanol using the modified Folch procedure (Folch et al., 1957) described in Parrish (1987). Total fatty acid composition was analyzed on wild copepods and prey (nauplii and rotifers), but neutral and polar lipids were separated for larvae to determine the fatty acid composition of each fraction. The neutral (including triacylglycerols, free fatty acids, and sterols) and polar (including mainly phospholipids) fractions were separated by silica gel (30 \times 5 mm i.d., packed with Kieselgel 60, 70–230 mesh; Merck, Darmstadt, Germany) hydrated with 6% water, and eluted with 10 ml of chloroform:methanol (98:2 v/v) for neutral lipids followed by 20 ml of methanol for polar lipids.

The neutral fraction was further eluted on an activated silica gel with hexane and diethyl ether to eliminate the free sterols. Each fraction was prepared as described in Lepage and Roy (1984) and analyzed using a multichannel Trace GC ultra (Thermo

Scientific) gas chromatograph equipped with a model Triplus autosampler, a PTV injector, and a model ITQ900 (Thermo Scientific) mass detector, and analyzed with Xcalibur v.2.1 software (ThermoScientific, Mississauga, ON, CA). FAMES were identified with known standards (Supelco 37 Component FAME Mix and menhaden oil; Supleco Inc., Belfonte, PA, USA) after manual verification of the FA integration.

Statistical analyses

PRIMER software (version 7.0.11) was used for non-metric multi-dimensional scaling (n-MDS) and PERMANOVA analyses based on Bray-Curtis dissimilarities following validation of the assumptions of homoscedasticity using PERMDISP tests. When necessary, arcsine square-root transformation was used for percentage data (Sokal and Rohlf, 1995). To visualize the similarity between the fatty acid profiles of each species from different dates, n-MDS was performed using a Bray-Curtis similarity matrix. Furthermore, PERMANOVA was used to compare the temporal variability (five sampling dates) of fatty acid composition between the two copepod species (*Acartia* sp. and *E. herdmani*).

Since the fatty acid composition of *Acartia* sp. and *E. herdmani* were similar and showed no significant variation among sampling dates (species: $pseudo-F_{1, 45}=1.78$, $p(perm)=0.13$; date: $pseudo-F_{4, 45}=1.26$, $p(perm)=0.24$; species \times date: $pseudo-F_{3, 45}=1.70$, $p(perm)=0.08$), we decided to use only *E. herdmani* for feeding experiments (Figure 1, Annex 1).

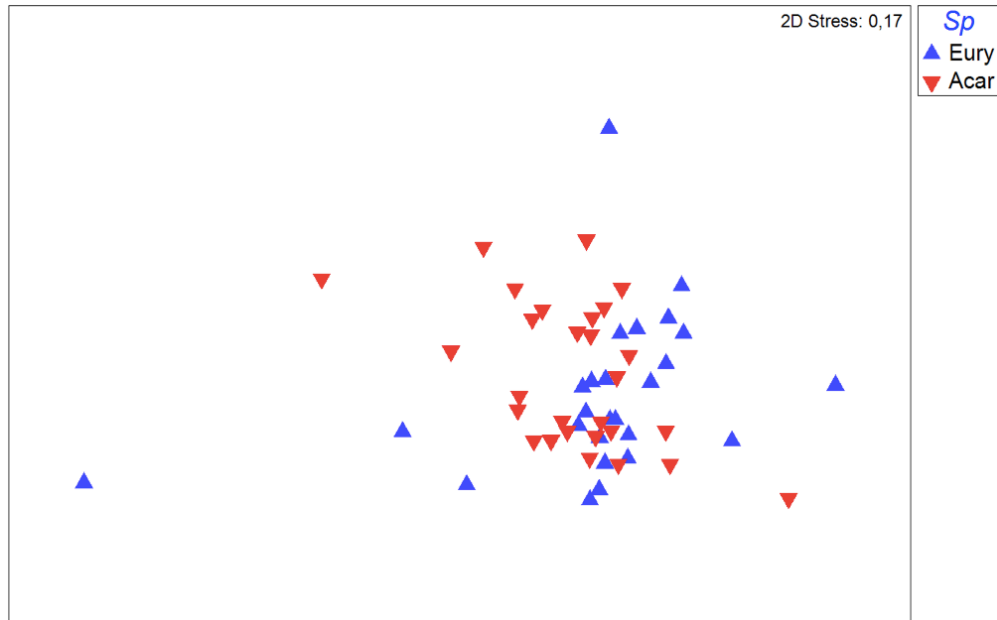


Figure 1: Non-metric multidimensional scaling (n-MDS) plot based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix calculated on square-root-transformed fatty acid composition data for *Acartia* sp. and *Eurytemora herdmani*.

We used a PERMANOVA analysis to compare fatty acid composition between nauplii and rotifers used as prey during the two larval feeding experiments. Another PERMANOVA was carried out to compare fatty acid profiles of the neutral lipid fraction of larvae on day 0 and after six days of feeding on nauplii or rotifers (three levels) in each experiment (two levels). The SIMPER procedure was performed to identify FA explaining the most important dissimilarity between treatments. These PERMANOVA tests were done after verification of the assumptions of homoscedasticity with PERMDISP. Furthermore, to find differences between treatments, ANOVAs were carried out using SYSTAT software (version 12.02).

Length and weight growth (difference between day 6 and day 0 of the experiment), survival rates at the end of feeding trials, and specific growth rates (rotifers and nauplii) were compared with Student t-tests. Two-way ANOVAs were carried out to compare prey

from each experiment (2 prey \times 2 experiments) with each essential fatty acid (AA, EPA, DHA in % of total fatty acids) and total EFA concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$) of prey used for feeding trials as the dependent variables. Two-way ANOVAs were performed on each EFA of larval neutral lipids to compare the impact of feeding trials (larvae on day 0 and after six days of feeding on nauplii or rotifers) for each experiment (three feeding levels \times two experiments). A ratio between polar FA of larvae on day 6 and prey FA was also calculated for each EFA to explore potential nutritional needs in the diet; these were compared with two-way ANOVAs with experiment (two trials) and diet (nauplii and rotifers) as factors. Similar two-way ANOVAs were also used for behaviour analyses of larval time spent (%) resting and swimming, and the number of hunting events per minute. Homogeneity of variance and normality were verified using Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. When differences were detected, a posteriori comparison using a Tukey pairwise test was used to determine which means were significantly different. If necessary, data were log+1 or square-root (% data) transformed to achieve homogeneity of variances. ANOVAs were carried out using SYSTAT software (version 12.02).

1.2.4 Results

Characterization of natural potential prey

The St. Lawrence estuary holds different zooplankton species, including bivalve larvae, polychaetes, and gastropods. In our summer 2015 samples, more than 80% of the zooplankton species composition consisted of copepods, particularly calanoid copepods such as *Acartia* sp. and *Eurytemora* spp. (mainly *E. herdmani* and some *E. affinis*). Abundances showed important spatio-temporal variations, with maximal values obtained in July for both taxa (Figure 2).

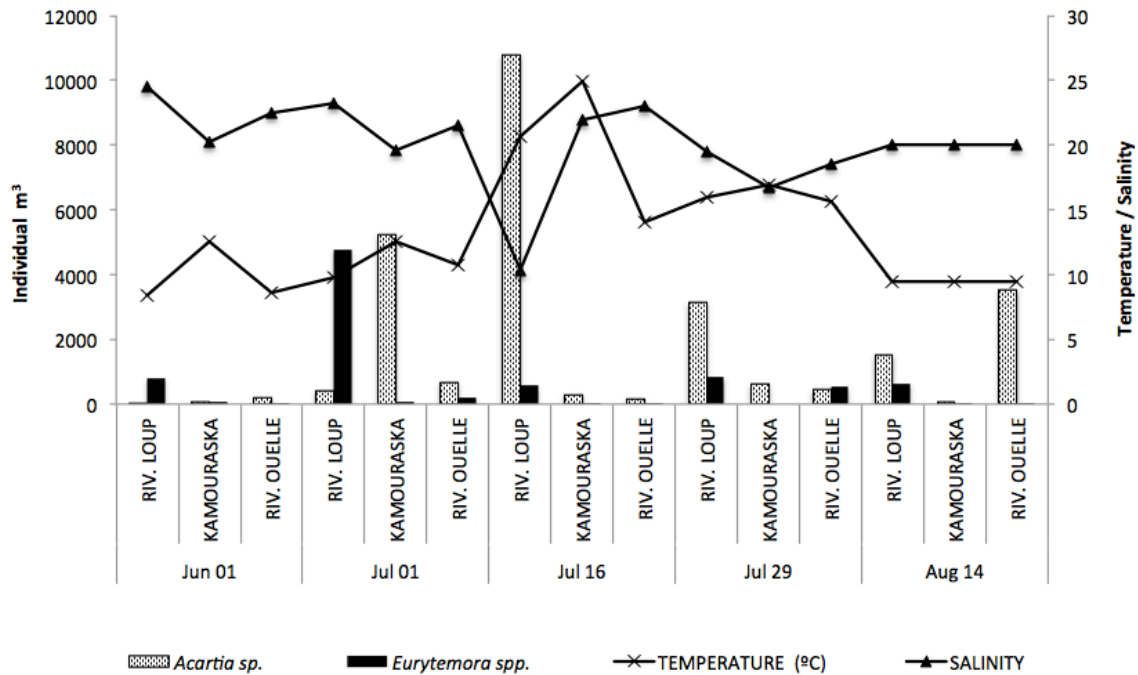


Figure 2: Abundances of *Acartia* sp. and *Eurytemora* spp. at the three sampling sites in the St. Lawrence estuary and their relationship with temperature and salinity at the surface.

On the other hand, there were significant differences in the fatty acid composition of live prey (rotifers and *E. herdmani* nauplii) used during feeding trials ($pseudo-F_{1,23}=5.03$, $p(perm)<0.001$), with *E. herdmani* nauplii being richer in EPA and DHA compared to rotifers (Figure 3). In general, both experiments showed similar results for prey fatty acid composition ($pseudo-F_{1,23}=2.18$, $p(perm)=0.061$). SIMPER analysis on each factor indicated that the three essential fatty acids (DHA, EPA, and AA) explained more than 25% of the variability of data.

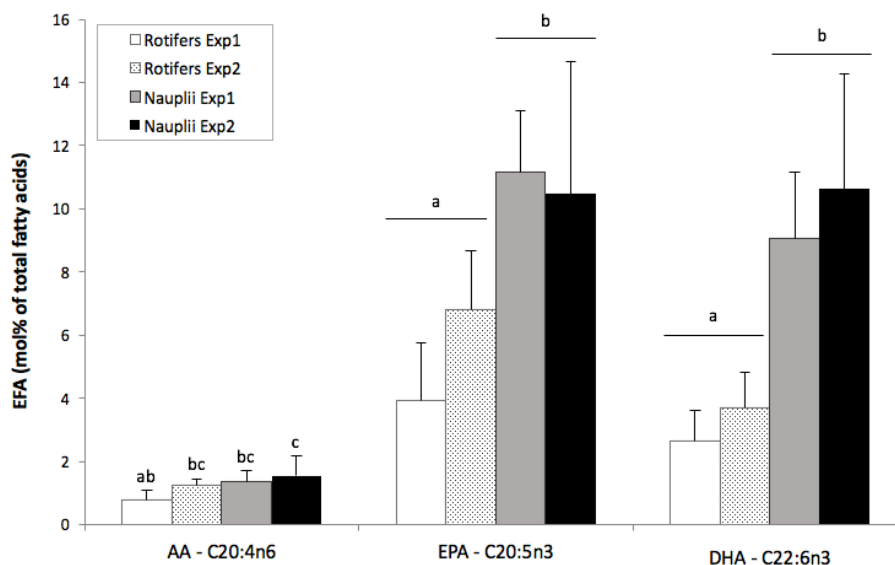


Figure 3: Mean proportions of essential fatty acids (EFA) of prey (rotifers *Brachionus plicatilis* and *Eurytemora herdmani* nauplii) used for each feeding trial. Error bars indicate standard errors. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.005$).

For AA, we observed a significant difference between prey and experiments ($F_{1, 20}=7.28$, $p=0.014$), with higher values for *E. herdmani* nauplii from experiment 2 compared to rotifers from experiment 1 (Figure 3). A significantly higher EPA value was observed in *E. herdmani* nauplii compared to rotifers ($F_{1, 20}=25.75$, $p < 0.001$), with no differences between experiments ($F_{1, 20}=1.01$, $p=0.327$) or interaction between factors, i.e., prey \times experiments ($F_{1, 20}=2.732$, $p=0.114$) (Figure 3). The DHA level in *E. herdmani* nauplii was more than twice as high as that in rotifers ($F_{1, 20}=53.8$, $p < 0.001$; Figure 3), with no differences between experiments ($F_{1, 20}=2.025$, $p=0.17$) or interactions ($F_{1, 20}=0.076$, $p=0.786$). Total fatty acid concentration (TFA, $\mu\text{g mg}^{-1}$) was similar between experiments ($F_{1, 20}=0.334$, $p=0.57$) and prey ($F_{1, 20}=0.25$, $p=0.623$), and no interaction was observed ($F_{1, 20}=3.347$, $p=0.072$). The mean value was $202.8 \pm 53.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry mass of total fatty acids in prey.

Larval feeding experiments

After six days of feeding trials, growth was similar between winter flounder larvae fed with *E. herdmani* nauplii and those fed with rotifers in both experiments (Table 1). Specific growth rate (SGR) did not show significant differences in winter flounder larvae fed with *E. herdmani* nauplii ($0.24 \pm 0.06\%$ day⁻¹) or with rotifers ($0.20 \pm 0.04\%$ day⁻¹; $t=1.317$, $p=0.209$). Larval survival was also similar between diet treatments, with values of $36.94 \pm 5.69\%$ and $35.35 \pm 16.78\%$ for the *E. herdmani* nauplii and rotifer treatments, respectively, and no differences were found between experiments ($t=1.0$, $p=0.931$).

Table 1: Daily growth of winter flounder larvae fed for 6 days with rotifers (*Brachionus plicatilis*) or *Eurytemora herdmani* nauplii. Data are mean \pm standard deviation of two different experiments.

	Rotifers	Nauplii
Weight (mg day ⁻¹)	0.011 \pm 0.008	0.017 \pm 0.012
Length (mm day ⁻¹)	0.056 \pm 0.064	0.101 \pm 0.114

To evaluate the accumulation of lipid reserves in winter flounder larvae, the fatty acid composition from the neutral fractions was compared before (day 0) and after (day 6) the feeding trials using rotifers or *E. herdmani* nauplii. The fatty acid composition of neutral lipids from larvae showed a significant difference between experiments and diet treatments ($pseudo-F_{2,34}=3.016$, $p(perm)=0.022$). SIMPER analysis indicated that the three essential fatty acids (DHA, EPA, and AA) explained 15% to 20% of the dissimilarity between treatments. ANOVAs on each EFA from the neutral fraction of larvae indicated a significant interaction between experiments and diet treatments for AA ($F_{1,30}=6.29$, $p=0.005$), being high on day 6 in larvae fed on rotifers in the second experiment. A similar interaction between experiments and diet treatments was observed for EPA ($F_{1,30}=6.67$, $p=0.004$) and DHA ($F_{1,30}=6.32$, $p=0.005$), with high values on day 6 for larvae fed on rotifers (Figure 4).

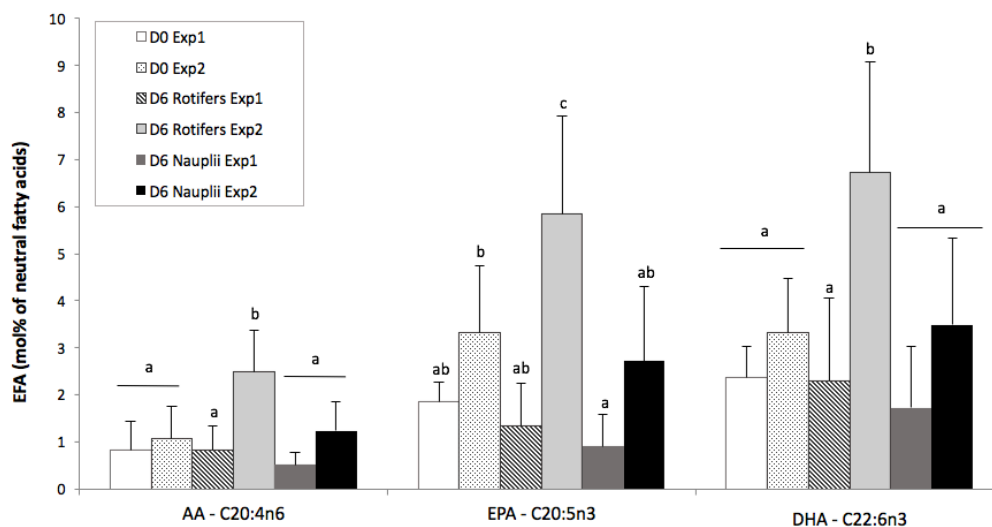


Figure 4: Percentage of essential fatty acids in the neutral lipid fraction of larvae at day 0 and day 6 fed with rotifers (*Brachionus plicatilis*) or *Eurytemora herdmani* nauplii. Error bars indicate standard errors. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.005$).

The total fatty acid concentration in the neutral lipid fraction also showed a significant difference between experiments and diet treatments ($F_{1, 29} = 6.98$, $p = 0.003$) corresponding to higher values in larvae fed with *E. herdmani* nauplii for six days; however, this was only true for the first experiment (Figure 5).

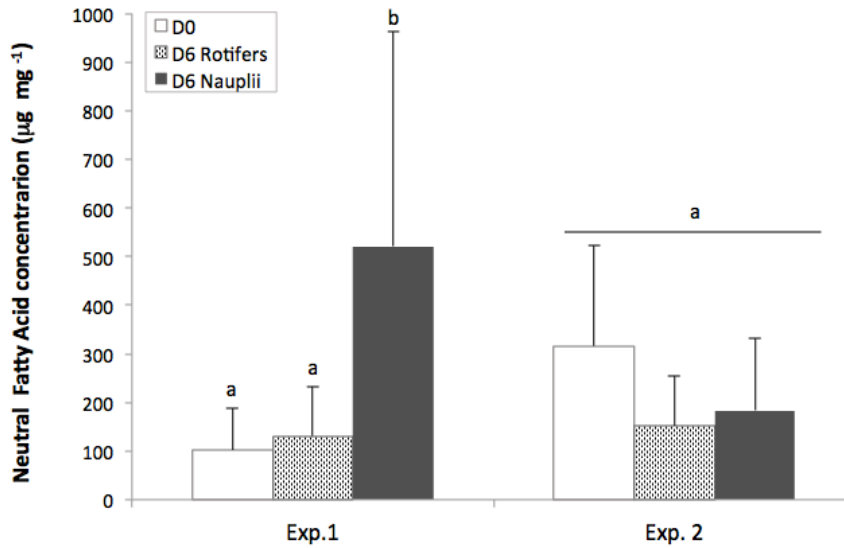


Figure 5: Concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$) of neutral fatty acids of larvae at day 0 and day 6 fed with rotifers (*Brachionus plicatilis*) or *Eurytemora herdmani* nauplii. Error bars indicate standard deviation. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.005$).

To obtain an indicator of the prey's nutritional quality, we used the ratio of the polar fraction of fatty acids present in larvae after six days of feeding and the total fatty acids present in prey. This ratio indicates the selective incorporation into the cell membrane (polar lipids) of larvae for physiological needs of a given dietary essential fatty acid (from nauplii or rotifers). The same ratios were calculated for AA, EPA, and DHA. The observed ratio for AA was slightly above 1, and only larvae in the second experiment fed with rotifers showed a significantly higher value of 3.01 ± 0.24 (interaction term experiment \times prey; $F_{1, 16}=10.08$, $p=0.006$). The ratio of EPA was significantly lower (<1) in experiment 1 compared to experiment 2 ($F_{1, 16}=22.36$, $p < 0.001$). The EPA ratio was lower in larvae fed with nauplii (<1) than in larvae fed with rotifers ($F_{1, 16}=25.99$, $p < 0.001$), and no significant interaction ($F_{1, 16}=0.41$, $p=0.531$) was found. The DHA ratio was mostly > 1 for larvae fed with rotifers, particularly during the second experiment. Significantly lower ratios (closer to 1) were observed for larvae fed with nauplii (interaction term $F_{1, 16}=7.03$, $p < 0.017$; Figure 6).

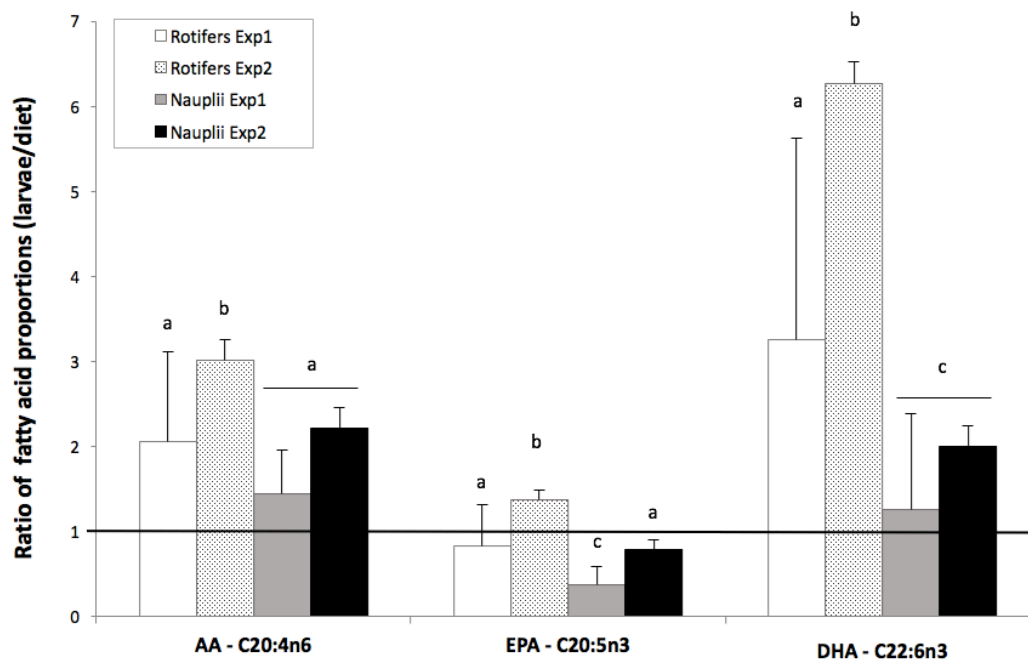


Figure 6. Ratio between proportions of polar fatty acids in larvae and those of total fatty acids in prey for larvae fed with rotifers (*Brachionus plicatilis*) or *Eurytemora herdmani* nauplii. Error bars indicate standard errors. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.005$).

Larval behaviour experiments

The use of different prey for winter flounder larval rearing modified their behaviour in a significant way. Larvae fed with nauplii were 32% more active (spent more time swimming) than larvae fed with rotifers ($F_{3, 136} = 37.013$, $p < 0.001$; Figure 7). During the swimming period, we observed a trend toward higher hunting rates in larvae fed with nauplii (1.4 ± 0.8 events \cdot min $^{-1}$) than with rotifers (1.1 ± 0.7 events \cdot min $^{-1}$), although this difference was not significant ($F_{1, 68} = 4.996$, $p = 0.29$).

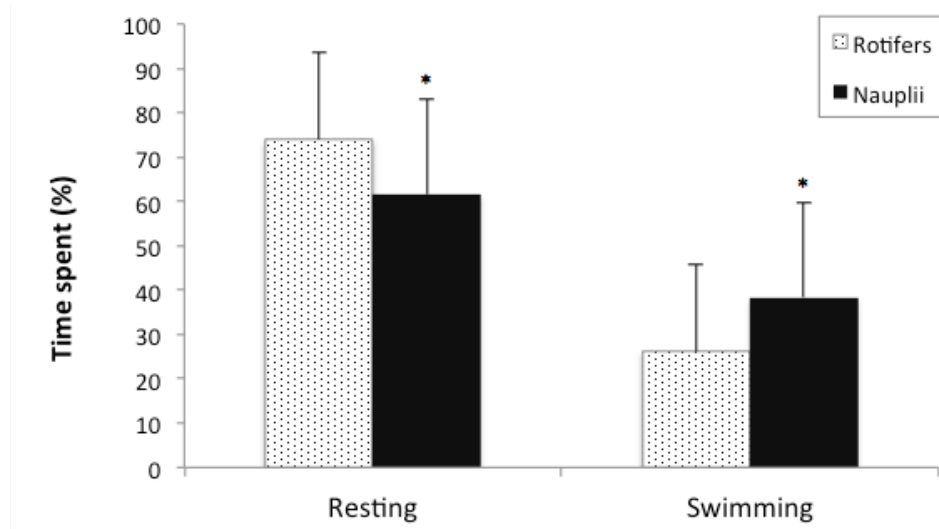


Figure 7. Percentage of time spent by winter flounder larvae in swimming and resting during the 10 minutes following feeding. Error bars indicate standard errors. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.005$).

1.2.5 Discussion

The results confirm the hypothesis that *E. herdmani* nauplii used as live prey have a more suitable fatty acid composition for winter flounder larvae compared to that of rotifers, which are generally used in hatcheries. In addition, we found that the nature of the prey affects larval feeding behaviour. These results suggest that larval feeding could be improved, particularly since copepods seemed to be a more appropriate food to meet the DHA needs of winter flounder larvae.

It is generally considered that copepods meet the nutritional requirements of fish larvae (Evjemo et al., 2003). Most fish and crustacean species depend largely on copepod species throughout their early life stages (Llopiz, 2013; Robert et al., 2014), and some species even feed exclusively on copepods during their entire life cycle (Perumal et al., 2009). Thus, it is likely that the natural prey for winter flounder larvae of the St. Lawrence estuary are calanoid copepods, which are a valuable source of proteins, lipids,

carbohydrates, and enzymes (Perumal et al., 2009). In the middle estuary, our results indicate that *Eurytemora* spp. is more abundant early in the summer while *Acartia* sp. is more important later in the summer. The two genera are not present at the same time in the same quantities, and *Eurytemora* would be more available as potential prey when winter flounder are in the larval stage.

To evaluate the nutritional value of each species, we focussed on their fatty acid composition and content because fatty acids are among the most important molecules transferred across the plant–animal interface in marine food webs (Dalsgaard et al., 2003). The link between fatty acid profiles and the seasonal variation of zooplankton species in the field is still poorly known. Although some studies in other environments have demonstrated differences in the fatty acid compositions among species of copepods (Evjermo et al., 1997; 2003; Drillet et al., 2006), no differences in the fatty acid compositions of *Acartia* sp. and *Eurytemora* spp. were observed during the summer (June to August) sampling period of our study. This result suggests that regardless of the copepod species, prey with similar fatty acid composition are always available in the St. Lawrence estuary during summer. This absence of differentiation is probably related to the small-scale sampling done only during summer, the period of winter flounder larval development. Thus, during early ontogeny, the most abundant copepod species in the St. Lawrence middle estuary showed similar nutritional quality in terms of fatty acid composition and content for fish larvae. However, at a seasonal scale, the fatty acid composition of copepods in the St. Lawrence estuary is probably more variable and linked to phytoplankton species succession (Cabrol et al. 2015).

Marine fish species have limited activities of elongases and desaturases involved in the biosynthesis of essential fatty acids, so they require DHA, EPA, and AA from food for growth and survival (Sargent et al., 1999; Glencross, 2009). Furthermore, lipid reserves in fish larvae are very limited and their survival strongly depends on the continuous

availability of high-quality food containing all the necessary nutrients to match their nutritional requirements (Izquierdo and Koven, 2011).

Most marine fish hatcheries have relied on readily available cultures of rotifers (*Brachionus plicatilis*) as first-feeding organisms. However, rotifers are naturally poor in a number of nutrients required for normal growth and development, especially EFA (Bell et al., 2003). Thus, they need to be properly enriched before their use as live food for larvae (Avella et al., 2007). According to several authors, rotifers contain a high proportion of essential amino acids in the free amino acid (FAA) fraction, but they are characterized by low levels of important fatty acids like DHA (Drillet et al., 2006). We determined the fatty acid profiles of enriched rotifers and copepod nauplii used during feeding experiments and observed that the nauplii of *E. herdmani* had higher values of EPA and DHA compared to rotifers, as already observed in the literature (Evjerno and Olsen, 1997; Bell et al., 2003; Drillet et al., 2006; Barroso et al., 2013). In general, copepods have a nutritional composition matching the nutritional requirements of marine finfish larvae and are a natural source of antioxidants, astaxanthin, vitamins C and E (van der Meeren et al., 2008; Mæhre et al., 2013), and particularly of fatty acids (Watanabe, 1978; Watanabe, 1993). Several coastal copepods have a high content of total fatty acids, normally near 60% (Evjerno and Olsen, 1997). In general, the predominant fatty acids of copepods are DHA, EPA, and the saturated fatty acid 16:0 (Evjerno et al., 2003), which fits with our lipid results. Cabrol et al. (2015) and Hagemann et al. (2013) found similar results in lipid composition of *Eurytemora* sp. and *Acartia* sp., which are characterized by high levels of EPA, DHA, and AA. According to Evjerno et al. (2003), the total lipid contents of *Eurytemora* sp. varies from 7–14% of dry weight (DW), that of DHA from 26–42%, EPA from 15–24%, and 16:0 from 8–12%, and the sum of n-3 HUFA is 55–62%, which is also consistent with our results. Lipid analysis in adult *Acartia tonsa* indicated that they represent 18% of the dry weight, and the sum of DHA and EPA was close to 25% of total FA. In early hatched nauplii, the lipid content was 14% of DW while the DHA and EPA content was 16% and 11% of total FA, respectively (Hagemann et al., 2013). Similar values were found by

Perumal et al. (2009) for *Acartia* sp. (12.42–17.81% of total FA). These results are also similar to our own.

The relative proportions of each essential fatty acid in polar lipids (fatty acids incorporated into cell membranes) in larvae vs. prey (*E. herdmani* nauplii and rotifers) were used to evaluate the nutritional quality of diets. This ratio indicates whether the DHA, EPA, and/or AA are selectively incorporated by larvae (Copeman et al., 2002). If the relative proportion of the fatty acid in larvae/diet is equal to or below one, then the fatty acid requirement of a larva is presumably satisfied. In contrast, if the relative proportion of the fatty acid in larvae/diet is higher than 1, then a fatty acid is selectively incorporated by larvae, suggesting a potential dietary deficiency. (Pernet and Tremblay, 2003; Gendron et al., 2013). The EPA and AA ratios for both diets were close to one, suggesting that the EPA and AA contents of enriched rotifers and copepod nauplii seemed to be sufficient for winter flounder larval development. Thus, we assume that a similar fatty acid level in winter flounder cell membranes and in the prey (relative proportion ≤ 1) confirms that the nutritional requirement for these fatty acid is satisfied

The results for DHA were very different, showing a strong selective incorporation when winter flounder larvae were fed with enriched rotifers. This selective retention of DHA has been also reported by Vagner et al. (2014) in winter flounder larvae fed with enriched rotifers. Their results suggest that the availabilities of EFA from the different algae used to enrich rotifers were below the physiological needs of early settled and post-settled larvae. Thus, to optimize winter flounder larval rearing, a new rotifer enrichment method needs to be used to increase DHA.

In the same way, winter flounder larvae fed with rotifers containing higher AA levels and higher DHA:EPA ratios showed better growth and the lowest bacterial colonization of the intestinal lumen compared to larvae fed with rotifers containing lower AA levels and lower DHA:EPA ratios (Seychelles et al., 2011). AA, EPA, and DHA available from the

algal cocktail diet used by Vagner et al. (2014) for winter flounder larvae seemed to be sufficient for larval and post-settled larval development, since the ratios between organism FA content and dietary FA content were always below one for that treatment. However, a strong selective retention for DHA was found. In addition, these authors did not find a significant effect of diet or interaction between developmental stage and diet on total length or maximum width.

A DHA deficiency is critical since larvae used this EFA during development to form a major part of the phospholipid structure of cell membranes (fluidity maintenance in cold environments; Izquierdo and Koven, 2011). Thus, when DHA is deficient in food, its concentration decreases in the membranes, and this affects larval development (Watanabe, 1978). It has been demonstrated that the addition of DHA in diet of marine fish larvae improved growth and feeding efficiency, thereby reducing mortality (Watanabe, 1993) more effectively than the addition of EPA or AA (Wu et al., 2002; Koven et al., 1993). In fact, DHA is preferentially conserved during food deprivation (Koven et al., 1989) and is selectively assimilated into tissues and membranes, suggesting a metabolic priority for this fatty acid (Rainuzzo et al., 1997; Izquierdo, 1996). We suggest that the DHA deficit in the rotifer diet might explain the trend of differential growth in the first experiment in winter flounder larvae fed with *Eurytemora* spp. nauplii, since DHA is one of the key biochemical components that determines the success of the development and the growth rate of larvae and young fish (Sargent et al., 1999).

High amounts of EPA in relation to DHA and AA may create an imbalance in the structural composition of phospholipids, a displacement of DHA from membrane lipids, or an increased oxidation risk (Izquierdo and Koven, 2011), which could affect the normal growth and quality of the larvae (Rainuzzo et al., 1997). This imbalance seems to occur in our study in winter flounder larvae fed with rotifers. The failure to provide correct quantities of essential fatty acids might be a primary cause for unsuccessful rearing of marine fish larvae. Indeed, EPA can be an important source of eicosanoids in marine fish,

particularly in an environment where AA is not very abundant (Izquierdo and Koven, 2011), and EPA has been found to be necessary to complete eye migration in the flatfish *Limanda ferruginea* (Copeman et al., 2002).

In our experiment, rotifers were enriched with a cocktail of three microalgal species, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, and *Pavlova lutheri*. These species were selected for their fatty acid profiles and their facility to enrich rotifers (Seychelles et al., 2009). For example, Seychelles et al. (2009) demonstrated that the high DHA content of *I. galbana* enriched DHA levels by more than 6% in rotifers. However, in our experiment, rotifers showed DHA values below 2%. We used a similar rotifer rearing method, but we fed rotifers with a mix of microalgal species while Seychelles et al. (2009) fed rotifers only one microalgal species. Thus, it seems that the *I. galbana* concentration in the rotifer tanks of that experiment was too low or that rotifers preferentially ingested *C. gracilis* over *I. galbana*. Clearly, our enrichment method was not appropriate for producing rotifers meeting the DHA needs of winter flounder larvae.

The DHA deficiency in rotifer diets was not reflected by lower survival rates of winter flounder larvae compared to those fed DHA-rich nauplii diets. The six-day periods of the feeding trials were sufficient to affect their feeding behaviour (increasing swimming time in nauplii diet) and modify the lipid composition of cell membranes in larvae (in the first experiment), but probably too short to be reflected in growth or selective mortality. After six days of feeding, DHA deficiency in food was reflected in the polar lipids of winter flounder larvae. At the same time, only weak accumulations (between 0.5% and 6%) of DHA, EPA, and AA in the neutral lipid fraction was observed in the winter flounder larvae, independent of the diet. Combined with the high metabolism of larvae, it is not surprising to observe a DHA deficiency in the polar lipids of larvae after six days.

Fish larval behaviour, mainly the costly activities of swimming and hunting (Hunt von Herbing et al., 2001), are influenced by the food's lipid composition. Bransden et al.

(2005) found that striped trumpeter fish larvae, *Latis lineata*, fed with low dietary DHA showed a modified swimming pattern. We observed similar results, with rotifer-fed larvae showing evidence of DHA deficits being 32% less active than larvae fed with *E. herdmani* nauplii. Although changes in swimming activity levels were significant, there was no significant change in hunting rates between diets. Nevertheless, a non-significant tendency was observed with rotifer-fed larvae, which had hunting rates that were 22% lower. It is possible that a longer feeding trial period leading to a higher DHA deficit could have led to a statistically significant trend for the hunting rate.

Larval feeding behaviour results from the interaction between complex processes that include several pre- and post-consumption steps—search, detection, attack, capture, ingestion, digestion, and evacuation—and each of these steps has a specific pattern that changes throughout development (Yufera, 2011). In the same way, the size and swimming behaviour of zooplankton prey appear to influence prey selection in cultured fish larvae. Zooplankton, such as *Artemia* nauplii, rotifers (*B. rotundiformis*), and copepods (*A. tonsa*), exhibit a wide range of swimming velocities and behavioural patterns that affect the ability of fish larvae to capture them (Turingan et al., 2005). According to Buskey (2005), most copepod nauplii exhibit intermittent locomotion, with periods of jerky swimming interspersed with periods of quiescence. This behaviour pattern makes it difficult for visual predators to track their prey and may also increase the probability for copepod nauplii to a detect predator's approach by mechanoreception mechanisms during periods of no motion (Kramer and McLaughlin, 2001). In fact, copepods nauplii trigger the appropriate hunting behavior in fish larvae due to their zig-zag swimming patterns which the larvae find attractive (Hansen, 2017).

Regarding attack behaviour, Shaheen et al. (2001) demonstrated that significantly more attacks were made on *E. affinis* than *Acartia hudsonica* (28 vs. 19, and mostly females). The consumption of female *E. affinis* could be advantageous because they are egg-bearing and considered more energetically valuable than the males. It has also been

suggested that egg sacs increase visibility and limit the escape of females (Sandström, 1980). These authors also suggested that *E. affinis* was preferred because its pigmentation and morphology make it more easily detected. Furthermore, prey swimming behaviour has also been considered since *E. affinis* movements are much quicker and more erratic than *A. hudsonica*, which was slower and more rhythmic (Shaheen et al., 2001). This slow and rhythmic behaviour seems similar to swimming pattern of rotifers used in our studies. Lubzens et al. (1989) described rotifers as slow swimmers that maintain their position in the water column.

The selection of food by fish larvae not only depends on prey accessibility, but also on organoleptic preferences (Yufera, 2011). Some metabolites from planktonic organisms (amino acids and nucleotides) have been identified as olfactory and taste stimuli for feeding. The ability to discriminate chemical cues by olfaction and gustation is present at first feeding and improves during larval development (Kolkovski et al., 1997).

Understanding predator–prey interactions is key to successful feeding and nutrition in larviculture, because the feeding mechanism of the developing larvae influences their performance in a number of ways (Turingan et al., 2005). Another factor affecting feeding behaviour is larval size, since attack and feeding success increase progressively in larger larvae. Thus, to determine the best prey for winter flounder larval rearing success, further similar studies using different larval developmental stages (sizes) would be important.

In general, our results demonstrate that copepods have a better fatty acid composition, particularly the high DHA content, than enriched rotifers. However, for commercial aquaculture purposes that seem to be the future of live prey in larval rearing, there are still some limitations to achieve successful copepod cultures (even at an experimental scale). Recently efforts in copepods culture were made in different species of calanoids and cyclopoids (Pan et al., 2017; Rayner et al., 2017a; Rayner et al., 2017a; Selander et al., 2017). Even a research alliance involved scientists within several different

disciplines and countries was deployed (Hansen, 2017). Considering that our results do not show differences in fatty acids content between *Acartia* spp. and *Eurytemora* spp. there are more chances to move towards the culture of *Acartia* spp, whose is a more studied specie. In this particular case, Hansen et al. (2017) discusses some of the challenges that hold back the progress of mass cultivation of *Acartia tonsa*, Vu et al. (2017) formulated a simple model to determine the maximum density in *Acartia tonsa* culture, and Abate et al. (2015) demonstrated that a recirculated aquaculture system production of *A. tonsa* fed microalgae was economically feasible.

However, if a culture of copepods is not yet available or achievable in a hatchery, another cost-effective solution is to continue the development of better rotifer enrichment. In the case of winter flounder, the rotifer enrichment protocol, which proved to be effective in AA and EPA, could be improved by the addition of DHA. However, even when rotifers are enriched, they are not a perfect replacement for copepods; for example, their swimming behavior could affect the feeding behavior of larval fish.

1.2.6 Conclusion

Based on our results, there was no difference in fatty acid composition among sampling dates or stations between the two species of copepod nauplii examined in our study (*Acartia* sp. and *Eurytemora* spp.). Thus, regardless of the copepod species, prey with similar fatty acid compositions were always available to fish larvae throughout their larval development period (summer in the St. Lawrence estuary). Larval rearing performance of winter flounder in terms of fatty acid content, in particular DHA, was higher in larvae fed with *E. herdmani* nauplii than with enriched rotifers, which are traditionally used in aquaculture. Finally, *E. herdmani* impacted the feeding behaviour of winter larvae by stimulating swimming activity. Considering these results, it could be thinking about developing a copepod culture, which seems to be the future of live prey to fish larval rearing, or improve the way to enrich the rotifers by the addition of more DHA.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude fournit de nouvelles connaissances sur l'impact du type de proies vivantes utilisées en alimentation larvaire sur le comportement alimentaire et le contenu en acides gras chez la plie rouge.

Les résultats ici présentés démontrent que contrairement à ce qui a été rapporté dans des études précédentes, les deux espèces de copépodes les plus abondants dans l'estuaire moyen du Saint-Laurent, *Eurytemora* spp. et *Acartia* sp., ont la même teneur en acides gras totaux et qu'il n'existe pas de différence temporelle ou spatiale sur la nature ou la teneur en acides gras durant la saison estivale. Ceci suggère la présence constante de proies potentielles avec des profils lipidiques similaires pour les larves présentes en milieu naturel. Cette absence de différenciation est probablement liée à la petite échelle temporelle, puisque les échantillonnages n'ont été réalisés que durant l'été, période de développement des larves de plie rouge dans cet environnement.

Par ailleurs, les résultats confirment l'hypothèse que les larves de plie rouge nourries avec des nauplii de copépodes ont un comportement alimentaire différent et un contenu supérieur en acides gras comparativement à celles nourries avec des rotifères. Pour les deux régimes alimentaires, les nauplii de copépodes et les rotifères, les rapports d'EPA et d'AA semblent adéquats pour assurer le développement larvaire. Cependant, une forte incorporation sélective de DHA chez les larves nourries avec des rotifères a été observée. De plus, les larves nourries aux rotifères et ayant un déficit en DHA étaient 32% moins actives que celles nourries avec des nauplii de copépodes, affectant aussi le taux de chasse.

Bien que la littérature fasse aussi référence aux bienfaits de l'utilisation des copépodes dans l'élevage des larves, certains éléments méritent réflexion avant de la promouvoir. Au cours de l'expérimentation, le principal problème rencontré fut l'obtention d'une quantité suffisante de nauplii de copépodes pour réaliser les expériences. Après la capture, l'entretien des copépodes pour la production de nauplii ne fut pas non plus une tâche facile. Cependant, il est recommandé de faire ce type d'expériences d'alimentation durant de périodes plus prolongées (plus de deux semaines) afin de trouver plus facilement des différences de croissances chez les larves. Également, les expériences pourraient être faites avant et après la période de métamorphose afin de savoir si la teneur initiale en acides gras affecte la croissance et la survie lors de la métamorphose. Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'évaluer le comportement des larves face aux différentes espèces de copépodes qu'ont des comportements de nage différente. Finalement, il serait intéressant d'évaluer la quantité minimale des nauplii nécessaires pour combler les besoins en acides gras essentiels chez les larves.

Enfin, si l'on pense à l'utilisation de copépodes pour utilisation en élevage larvaire, force est de constater qu'il existe encore certaines limitations à son implantation, même à l'échelle expérimentale, et la solution la plus rentable est de continuer à chercher la meilleure façon d'améliorer l'enrichissement des rotifères. Dans le cas de la plie rouge, le protocole d'enrichissement des rotifères qui fournit de bonnes teneurs en AA et EPA, pourrait être amélioré par l'ajout de DHA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abate, T. G., Nielsen, R., Nielsen, M., Drillet, G., Jepsen, P. M., Hansen, B. W., 2015). Economic feasibility of copepod production for commercial use: result from a prototype production facility. *Aquaculture* 436, 72–79.
- Ajiboye, O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D., Nwogu, N.A., 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Rev. Fish Biol. Fish.* 21, 225–246.
- Arndt, C., Sommer, U., Ueberschär, B., 2015. A comparative in-vitro-test on the digestibility of live prey for fish larvae under specific consideration of trypsin. *Aquaculture* 446, 12–16.
- Audet, C., Tremblay, R., 2011. Production of flounder (Pleuronectiformes) in eastern North America: biological issues 11. *Can. J. Zool.* 89, 612–621.
- Avella, M.A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O., 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture* 273, 87–95.
- Baglolle, C.J., Murray, H.M., Goff, C.P., and Wright, G.M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.* 51, 120–134.
- Barroso, M.V., de Carvalho, C.V.A., Antoniassi, R., Cerqueira, V.R., 2013. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388-391, 153–158.
- Bell, J.G., McEvoy, L., Estevez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211–220.

- Ben Khemis, I., de la Noue, J., Audet, C., 2000. Feeding larvae of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) with live prey or microencapsulated diet: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquacult. Res.* 31, 377–386.
- Ben Khemis, I., Audet, C., Fournier, R., de la Noüe, J., 2003. Early weaning of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) larvae on a commercial microencapsulated diet. *Aquacult. Res.* 34, 445–452.
- Bergvik, M., Leiknes, Ø., Altin, D., Dahl, K.R., Olsen, Y., 2012. Dynamics of the lipid content and biomass of *Calanus finmarchicus* (copepodite V) in a Norwegian fjord. *Lipids* 47, 881–895.
- Bertram, D.F., Chambers, R.C., and Leggett, W.C. 1993. Negative correlations between larval and juvenile growth rates in winter flounder: implications of compensatory growth for variation in size-at-age. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96, 209–215.
- Bishop, C.D., Erezyilmaz, D.F., Flatt, T., Georgiou, C.D., Hadfield, M.G., Heyland, A., Hodin, J., Jacobs, M.W., Maslakova, S.A., Pires, A., Reitzel, A.M., Santagata, S., Tanaka, K., and Youson, J. H. 2006. What is metamorphosis? *Int. Comp. Biol.* 46, 655–661.
- Bowden, L.A., Restall, C.J., Rowley, A.F., 1996. The influence of environmental temperature on membrane fluidity, fatty acid composition and lipoxygenase product generation in head kidney leucocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 115, 375–382.
- Bransden, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglione, S.C., 2005. Dietary 22:6n3 alters gut and liver structure and behavior in larval striped trumpeter (*Latis lineata*). *Aquaculture* 248, 275-285.
- Buskey, E.J., 2005. Behavioral characteristics of copepods that affect their suitability as food for larval fishes, dans: Lee, C.S., O'Bryen., Marcus NH., (Eds.), *Copepods in aquaculture*, Blackwell publishing, Ames, pp. 91-105.
- Cabrol, J., Winkler, G., Tremblay, R., 2015. Physiological condition and differential feeding behavior in the cryptic species complex *Eurytemora affinis* in the St. Lawrence estuary. *J. Plankton Res.* 37, 372–387.

- Castell, J., Blair, T., Neil, S., Howes, K., Mercer, S., Reid, J., Young-Lai, W., Gullison, B., Dhert, P., Sorgeloos, P., 2003. The effect of different HUFA enrichment emulsions on the nutritional value of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed to larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquacult. Int.* 11, 109-117.
- Cook, J.T., Mcniven, M.A., Richardson, G.F., Sutterlin, A.M., 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture* 188, 15–32.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): A live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304.
- Corraze, G., 1999. Lipid nutrition, dans: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutritional and feeding of fish and crustaceans*, Springer – Praxis, Chichester, pp. 111-130.
- Choubert, G., 1999. Carotenoides and pigmentation, dans: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutritional and feeding of fish and crustaceans*, Springer – Praxis, Chichester, pp. 183-196.
- Dalsgaard, J., St. John, M., Kattner, G., Miiller-Navarra D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46, 225-340.
- De Montgolfier, B., Audet, C., Lambert, Y., 2005. Growth of early juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Aquacult. Res.* 36, 1595-1601.
- Drillet, G., Jørgensen, N.O.G., Sørensen, T.F., Ramløv, H., Hansen, B.W., 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquacult. Res.* 37, 756–772.
- Drillet, G., Frouel, S., Sichlau, M.H., Jepsen, P.M., Højgaard, J.K., Joarder, A.K., Hansen, B.W., 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315, 155–166.
- Duman, J.G., de Vries, A.L., 1974. Freezing resistance in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Nature* 247, 237-238.

- Evjemo, J.O., Olsen, Y., 1997. Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiologia* 358, 159–162.
- Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227, 191–210.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fraboulet, E., Lambert, Y., Litvak, M., Audet, C., 2009. The effects of latitudinal origin and paternal contribution on larval growth of winter flounder in a northern environment. *Trans. Am. Fish. Soc.* 138, 407–415.
- Fraboulet, E., Lambert, Y., Tremblay, R., Audet, C., 2010. Assessment of paternal effect and physiological cost of metamorphosis on growth of young winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* juveniles in a cold environment. *J. Fish Biol.* 76, 930–948.
- Fraboulet, E., Lambert, Y., Tremblay, R., Audet, C., 2011. Growth and lipid composition of winter flounder juveniles reared under natural and fixed photoperiod and temperature conditions. *N. Am. J. Aquac.* 73, 89–96.
- Geffen, A.J., van der Veer, H.W., Nash, R.D.M., 2007. The cost of metamorphosis in flatfishes. *J. Sea Res.* 58, 35–45.
- Gendron, L., Tremblay, R., Belvin, S., Génard, B., Motnikar, S., Côté, J., 2013. Condition, survival and growth in situ of hatchery-reared stage IV lobster (*Homarus americanus*) fed *Artemia* and lipid-rich wild zooplankton. *Aquaculture* 416–417, 380–389.
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40, 609–618.
- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquacult.* 1, 71–124.

- Haché, R., Plante, S. 2011. The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and *Artemia* (*Artemia salina* strain *Franciscana*). *Aquaculture* 311, 201-208.
- Haché, R., Plante, S., Forward, B.S., Pernet, F., 2016. Cod larviculture using high-density rotifer production with different enrichments. *J. World Aquacul. Soc.* 48, 57-69.
- Hagemann, A., Oie, G., Attramadal, Y., Veiseth, R. Ovjemo, J.O., 2013. Content of essential fatty acids in cultivated *Acartia tonsa* nauplii fed a DHA-deficient *Tetraselmis* sp. concentrate, dans: Book of abstracts and short communications of 6th Fish & Shellfish larviculture symposium, Belgium, pp169-172.
- Hagemann, A., Øie, G., Evjemo, J.O., Olsen, Y., 2016. Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. *Aquacult. Internat.* 24, 57–68.
- Hansen, B.W., 2017. Advances using Copepods in Aquaculture. *J. Plankton Res.* 39, 972–974.
- Hansen, B.W., Jepsen, P.M., Drillet, G., 2017a. Applied and fundamental plankton research would benefit from more joint efforts: examples from *Acartia tonsa*. *J. Plankton Res.*, 39, 975–983.
- Hansen, B.W., Hansen, P.J., Nielsen, T.G, Jepsen, P.M., 2017b. Effects of elevated pH on marine copepods mass cultivation systems— practical implications. *J. Plankton Res.*, 39, 984–993.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
- Hernandez-Molejon, OG., Alvarez-Lajonchere, L., 2003. Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda: Cyclopoida), and its advantages as food for marine fish larvae. *Aquaculture* 219, 471–483.
- Howard, R., Stanley, D., 1999. The tie that binds: eicosanoids in invertebrate biology. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 880-890.
- Hunt von Herbing, I., Gallager, S.M., Halteman, W., 2001. Metabolic cost of pursuit and attack in early larval Atlantic cod. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216, 201-212.

- Izquierdo, M.S., 1996. Review article: essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 2, 183-191.
- Izquierdo, M.S., Koven, W., 2011. Lipids, dans: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*, Wiley-Blackwell, Chichester, pp 47–81.
- Kjorsvik, E., Galloway, T., Estevez, A., Saele, O., Moren, M., 2011. Effects of larval nutrition on development, dans: Holt, G.J., (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 219–248.
- Kleppel, G.S., Hazzard, S.E., Burkart, C., 2005. Maximizing the nutritional values of copepods in aquaculture: Managed versus balanced nutrition, dans: Lee, C.S., O'Bryen, Marcus, N.H. (Ed.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell publishing. Oxford, pp. 49-60.
- Kolkovski, S., Koven, B., Tandler, A., 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155, 193-205.
- Koven, W.M., Kissil, G.W., Tandler, A., 1989. Lipid and n-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79, 185–191.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357–364.
- Kramer, D.L., McLaughlin, R.L., 2001. The behavioral ecology of intermittent locomotion. *Amer. Zool.* 41, 137-153.
- Lee, C.-S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H., 2005. *Copepods in Aquaculture*, Blackwell Publishing, Oxford.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lip. Res.* 25, 1391–1396.
- Llopiz, J.K., 2013. Latitudinal and taxonomic patterns in the feeding ecologies of fish larvae: a literature synthesis. *J. Mar. Syst.* 109–110, 69–77.
- Lubzens, E., Tandler, A., Minkoff, G., 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia* 186–187, 387–400.

- Mæhre, H.K., Hamre, K., Elvevoll, E.O., 2013. Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: Feed for marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 19, 301–311.
- Marcus, N., 2005. Calanoid copepods, resting eggs and aquaculture, dans: Lee, C.S., O'Bryen, Marcus, N.H. (Ed.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell publishing. Ames, pp. 3-10.
- McCracken, F.D., 1963. Seasonal movements of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), on the Atlantic coast. *J. Fish. Res. Board Can.* 20, 551–585.
- McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, Ø., 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163, 237–250.
- Médale, F., Guillaume, J., 1999. Nutritional energetics, dans: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutritional and feeding of fish and crustaceans*. Springer – Praxis, Chichester, pp. 59-80.
- Mercier, L., Audet, C., De La Noüe, J., Parent, B., Parrish, C.C., Ross, N.W., 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: Use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. *Aquaculture* 229, 361–376.
- Øie, G., Reitan, K.I., Evjermo, J.O., Stottrup, J., Olsen, Y., 2011. Live feeds, dans: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*, Wiley-Blackwell, Chichester, pp 307–344.
- Osse, J.W.M., van den Boogaart, J.G.M., 1997. Size of flatfish larvae at transformation, functional demands and historical constraints. *J. Sea Res.* 37, 229–239.
- Pan, Y.-J., Souissi, A., Sadovskaya, I., Hansen, B.W., Hwang, J.-S., Souissi, S., 2017. Effects of cold selective breeding on the body length, fatty acid content, and productivity of the tropical copepod *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda). *J. Plankton Res.*, 39, 994–1003.
- Parrish, C.C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan flame ionization detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 722-731.

- Pearcy, W.G., 1962. Ecology of an estuarine population of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Bull. Bingham Oceanogr. Collect. Yale University, 8.
- Pereira, J.J., 1999. Essential fish habitat source document. Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, life history and habitat characteristics. Diane Publishing.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2003. Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalga harvested on filters. *Lipids* 38, 1191–1195.
- Perumal, P., Rajkumar, M., Santhanam, P., 2009. Biochemical composition of wild copepods, *Acartia spinicauda* and *Oithona similis*, from Parangipettai coastal waters in relation to environmental parameters. *J. Environ. Biol.* 30, 995–1005.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y., de la Noüe, J., 2002. The effects of two rearing salinities on survival and stress of winter flounder broodstock. *J. Aquat. Anim. Health*, 14, 282-287.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y., de la Noüe, J., 2003. Comparison of stress variables in wild and captive flounder breeders (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Aquacult. Res.* 34, 803-812.
- Plante, S., Audet, C., Lambert, Y., 2005. Alternative methods for measuring energy content in winter flounder. *N. Am. J. Fish. Manag.* 25, 1-6.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stage of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rayner, T.A., Hwang, J.-S., Hansen, B.W., 2017a. Minimizing the use of fish oil enrichment in live feed by use of a self-enriching calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. *J. Plankton Res.*, 39, 1004–1011.
- Rayner, T.A., Hwang, J.-S., Hansen, B.W., 2017b. Anticipating the free amino acid concentrations in newly hatched pelagic fish larvae based on recently fertilized eggs and temperature. *J. Plankton Res.*, 39, 1012–1019.

- Robert, D., Murphy, H.M., Jenkins, G.P., Fortier, L., 2014. Poor taxonomical knowledge of larval fish diet composition is impeding our ability to assess the existence of a ‘critical period’ driving year-class strength. *ICES J. Mar. Sci.* 71, 2042-2052.
- Robin, J., Gatesoupe, F.J., 1999. Feeding fish larvae with live prey, dans: Guillaume, J., Métailler, R. (Eds), *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 213-228.
- Sandström, O., 1980. Selective feeding by baltic herring. *Hydrobiologia* 69, 199-207.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation polyunsaturated fatty acids larval feeds and sources of in marine fish. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A, Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
- Scott, W.B., Scott, M.G., 1988. Atlantic fishes of Canada. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 219, 554–557.
- Schreiber, A.M., 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 129, 587–595.
- Selander, E., Heuschele, J., Larsson, A.I., 2017. Hydrodynamic properties and distribution of bait downstream a zooplankton trap. *J. Plankton Res.*, 39, 1020–1027.
- Seychelles, L.H, Audet, C., Tremblay, R., Fournier, R., Pernet, F., 2009. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*) using frozen-concentrated microalgae. *Aquac. Nutr.* 15, 431-439.
- Seychelles, L.H., Audet, C., Tremblay, R., Lemarchand, K., Pernet, F., 2011. Bacterial colonization of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* fed live feed enriched three different commercial diets. *Aquac. Nutr.* 17, 195-206.
- Seychelles, L.H, Doiron, H., Audet, C., Tremblay, R., Pernet, F., Lemarchand, K., 2013. Impact of arachidonic acid enrichment of live rotifer prey on bacterial communities in rotifer and larval fish cultures. *Can. J. Microbiol.* 59, 189-196.

- Shaheen, P.A., Stehlik, L.L., Meise, C.J., Stoner, A.W., Manderson, J.P., Adams, D.L., 2001. Feeding behavior of newly settled winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) on calanoid copepods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257, 37–51.
- Sokal, R.R. Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, third ed, Freeman, New York.
- Støttrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231–248.
- Støttrup, J.G., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in laboratory-reared calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algae diets. *Aquaculture* 176, 257-269.
- Støttrup, J.G., 2003. Production and nutritional value of copepods, dans: Støttrup, J.G., McEvoy L.A. (Eds), *Live Feed in Marine Aquaculture*, Blackwell Science, Oxford, pp. 145-205.
- Tocher, D.R., 1993. Elongation predominates over desaturation in the metabolism of 18:3n-3 and 20:5n-3 in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Lipids* 28, 267–272.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280, 21-34.
- Turingan, R.G., Beck, J.L., Krebs, J.M., Licamele, J.D., 2005. Development of feeding mechanics in marine fish larvae and the swimming behavior of zooplankton prey: Implications for rearing marine fishes, dans: Lee, C.S., O'Bryen., Marcus N.H., (Eds.), *Copepods in aquaculture*, Blackwell publishing, Ames, pp. 119-132.
- Vagner, M., de Montgolfier, B., Sévigny, J.-M., Tremblay, R., Audet, C., 2013. Expression of genes involved in key metabolic processes during winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) metamorphosis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 91, 156–163.
- Vagner, M., de Montgolfier, B., Sévigny, J.-M., Tremblay, R., Audet, C., 2014. Effects of algae-enriched rotifers on winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) gene expression during metamorphosis. *Mar. Biol.* 161, 985–999.

- van der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K., Fyhn, H.J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274, 375–397.
- Vu, M.T.T., Hansen, B.W., Kiørboe, T., 2017. The constrains of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J. Plankton Res.*, 39, 1028–1039.
- Watanabe, T., 1978. Nutritional quality of living feeds used in seed production of fish. *Proc. 7th. Japan-Soviet Joint Symp.* Tokai University Press, Tokyo, pp. 49–57.
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 73, 3-15.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 152– 161.
- Willey, S., Bengtson, D., Harel, M., 2003. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquacult. Internat.* 11, 131–149.
- Wu, F.-C., Ting, Y.Y., Chen, H.-Y., 2002. Docosahexaenoic acid is superior to eicosapentaenoic acid as the essential fatty acid for growth of grouper *Epinephelus malabaricus*. *J. Nutr.* 132, 72–79.
- Yufera, M., 2011. Feeding behavior in larval fish, dans: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*, Wiley-Blackwell, Chichester, pp 47–81.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Pourcentage (mol %) d'acides gras totaux de copépodes adultes échantillonnés dans l'estuaire du Saint-Laurent pendant la saison estivale de 2015

Fatty Acid (%)	<i>Acartia</i> sp.	<i>Eurytemora</i> spp.
14:0	2.14 ± 0.70	2.68 ± 1.10
15:0	0.61 ± 0.11	0.53 ± 0.10
16:0	28.92 ± 4.3	27.01 ± 6.08
17:0	0.74 ± 0.3	0.58 ± 0.21
18:0	21.71 ± 8.69	20.39 ± 9.15
20:0	0.69 ± 0.27	0.44 ± 0.19
21:0	0.23 ± 0.15	0.39 ± 1.00
22:0	0.87 ± 0.32	1.17 ± 0.67
24:0	0.65 ± 0.34	0.43 ± 0.14
14:1	0.17 ± 0.10	0.19 ± 0.34
15:1	0.16 ± 0.15	0.08 ± 0.07
16:1	2.67 ± 2.31	4.01 ± 1.65
17:1	0.72 ± 0.68	1.06 ± 0.69
18:1n9	6.21 ± 2.05	4.78 ± 1.45
20:1n9	1.79 ± 2.44	1.61 ± 2.53
22:1n9	1.03 ± 0.85	0.52 ± 0.38
24:1n9	0.78 ± 0.25	0.43 ± 0.16
18:2n6	1.31 ± 0.45	1.05 ± 0.41
20:2	0.46 ± 0.14	0.39 ± 0.14
22:2	0.29 ± 0.13	0.27 ± 0.14
18:3n3	1.37 ± 0.83	0.64 ± 0.27
18:3n6	0.28 ± 0.15	0.26 ± 0.08
20:3n6	0.41 ± 0.21	0.27 ± 0.19
20:3n3	0.63 ± 0.23	0.50 ± 0.16
18:4n3	1.81 ± 0.82	1.84 ± 0.80
20:4n6	0.52 ± 0.19	0.45 ± 0.15
20:5n3	10.02 ± 4.96	16.05 ± 7.06
22:6n3	12.70 ± 06.05	11.85 ± 5.10
Σ SFA	55.59 ± 12.54	53.69 ± 14.47
Σ MUFA	13.56 ± 5.46	12.70 ± 4.13
Σ PUFA	29.84 ± 10.87	33.63 ± 11.86
TFA (µg mg ⁻¹)	129.44 ± 84.23	230.60 ± 133.21

ANNEXE 2 : Pourcentage (mol %) et concentration (mg ml⁻¹) d'acides gras totaux de rotifères *Brachionus plicatilis* et nauplii d'*Eurytemora herdmani* utilisées pendant les expériences d'alimentation des larves de plie rouge. Les nombres présentés à droite du nom des proies font référence aux expériences un et deux.

Fatty Acid (%)	Rotifers -1	Nauplii -1	Rotifers -2	Nauplii -2
14:0	2.601 ± 0.667	2.049 ± 0.696	3.012 ± 0.517	2.361 ± 0.595
15:0	0.811 ± 0.153	0.795 ± 0.393	0.634 ± 0.122	0.572 ± 0.138
16:0	39.49 ± 4.387	32.8 ± 3.98	33.794 ± 1.644	34.807 ± 4.206
17:0	0.893 ± 0.138	0.747 ± 0.227	0.654 ± 0.144	0.570 ± 0.120
18:0	41.27 ± 5.233	32.060 ± 7.386	29.721 ± 3.477	34.876 ± 9.369
20:0	0.758 ± 0.245	0.780 ± 0.187	1.003 ± 0.185	0.613 ± 0.062
21:0	0.140 ± 0.119	0.167 ± 0.079	0.258 ± 0.084	0.114 ± 0.033
22:0	0.412 ± 0.164	0.619 ± 0.215	5.562 ± 0.155	0.638 ± 0.110
24:0	0.468 ± 0.327	0.903 ± 0.353	0.714 ± 0.160	0.990 ± 0.218
14:1	0.127 ± 0.106	0.143 ± 0.666	0.211 ± 0.089	0.094 ± 0.040
15:1	0.146 ± 0.125	0.157 ± 0.079	0.253 ± 0.108	0.101 ± 0.045
16:1	1.932 ± 1.18	5.719 ± 2.263	8.131 ± 2.258	4.411 ± 2.060
17:1	0.936 ± 0.801	0.616 ± 0.49	0.760 ± 0.351	0.462 ± 0.230
18:1n9	2.755 ± 1.292	7.155 ± 2.551	5.808 ± 4.209	5.456 ± 2.397
20:1n9	0.589 ± 0.315	0.565 ± 0.138	2.089 ± 1.723	0.252 ± 0.160
22:1n9	1.069 ± 0.695	1.177 ± 0.494	1.420 ± 0.537	0.774 ± 0.414
24:1n9	0.318 ± 0.247	0.398 ± 0.207	0.581 ± 0.212	0.407 ± 0.178
18:2n6	0.793 ± 0.414	0.858 ± 0.291	1.476 ± 0.256	0.804 ± 0.344
20:2	0.083 ± 0.067	0.157 ± 0.108	0.308 ± 0.094	0.192 ± 0.117
22:2	0.165 ± 0.154	0.199 ± 0.107	0.287 ± 0.116	0.122 ± 0.062
18:3n3	0.442 ± 0.291	0.386 ± 0.172	0.637 ± 0.210	0.360 ± 0.200
18:3n6	0.154 ± 0.142	0.242 ± 0.114	0.365 ± 0.206	0.241 ± 0.142
20:3n6	0.372 ± 0.374	0.316 ± 0.117	0.256 ± 0.290	0.242 ± 0.095
20:3n3	0.322 ± 0.295	0.590 ± 0.248	0.620 ± 0.227	0.615 ± 0.333
18:4n3	0.43 ± 0.308	0.676 ± 0.224	0.740 ± 0.205	0.692 ± 0.385
20:4n6	0.265 ± 0.224	0.566 ± 0.219	0.544 ± 0.179	0.662 ± 0.350
20:5n3	1.312 ± 1.061	5.031 ± 1.63	3.395 ± 1.063	4.333 ± 2.559
22:6n3	0.949 ± 0.621	4.129 ± 1.483	1.768 ± 0.605	4.240 ± 2.658
Σ SFA	88.84 ± 8.18	70.92 ± 9.10	70.35 ± 3.70	75.54 ± 9.10
Σ MUFA	7.87 ± 4.49	15.93 ± 5.52	19.25 ± 2.83	11.96 ± 5.52
Σ PUFA	5.29 ± 3.75	13.15 ± 4.27	10.40 ± 3.18	12.50 ± 4.27
TFA (µg mg ⁻¹)	260.123 ± 164.210	172.633 ± 104.705	118.308 ± 103.334	264.046 ± 111.499

ANNEXE 3a : Acides gras (fraction neutre) des larves de la plie rouge à la fin de l'expérience d'alimentation (jour 6) avec nauplii d'*Eurytemora* sp. ou des rotifères *Brachionus plicatilis*. Les nombres présentés à droite du nom des proies font référence aux expériences un et deux.

Fatty acid (%)	Rotifers -1	Nauplii -1	Rotifers -2	Nauplii -2
14:0	2.036 ± 0.798	2.227 ± 1.069	1.176 ± 0.671	0.855 ± 0.210
15:0	0.698 ± 0.203	0.580 ± 0.216	0.507 ± 0.311	0.412 ± 0.085
16:0	33.606 ± 6.774	37.887 ± 1.376	31.679 ± 4.768	24.334 ± 5.876
17:0	0.875 ± 0.060	1.409 ± 0.761	0.610 ± 0.193	0.645 ± 0.161
18:0	38.028 ± 8.948	42.541 ± 3.469	37.879 ± 11.932	29.765 ± 9.265
20:0	0.799 ± 0.275	0.432 ± 0.249	1.725 ± 1.449	0.651 ± 0.255
21:0	0.425 ± 0.292	1.814 ± 1.870	0.248 ± 0.247	0.197 ± 0.171
22:0	0.497 ± 0.197	0.366 ± 0.167	0.450 ± 0.254	0.403 ± 0.117
24:0	0.587 ± 0.281	0.239 ± 0.178	0.706 ± 0.732	0.855 ± 0.460
14:1	0.129 ± 0.083	0.051 ± 0.009	0.073 ± 0.049	0.146 ± 0.105
15:1	0.211 ± 0.122	0.101 ± 0.078	0.225 ± 0.206	0.153 ± 0.091
16:1	2.630 ± 1.259	1.388 ± 0.651	2.510 ± 1.282	3.030 ± 1.785
17:1	0.760 ± 0.451	0.715 ± 0.622	1.072 ± 0.698	1.620 ± 1.009
18:1n9	3.594 ± 1.037	2.031 ± 1.507	4.460 ± 1.910	7.955 ± 3.122
20:1n9	4.117 ± 5.529	1.020 ± 0.815	1.400 ± 1.684	2.163 ± 1.652
22:1n9	2.281 ± 1.245	1.089 ± 0.911	2.234 ± 2.666	3.379 ± 3.741
24:1n9	0.458 ± 0.236	0.238 ± 0.217	0.638 ± 0.508	1.186 ± 0.558
18:2n6	1.050 ± 0.313	0.627 ± 0.287	1.542 ± 0.859	2.244 ± 1.268
20:2	0.661 ± 1.056	0.078 ± 0.027	0.274 ± 0.242	0.611 ± 0.717
22:2	0.349 ± 0.292	1.125 ± 1.824	0.276 ± 0.351	0.186 ± 0.127
18:3n3	0.190 ± 0.125	0.085 ± 0.058	0.574 ± 0.708	0.425 ± 0.217
18:3n6	0.152 ± 0.106	0.063 ± 0.042	0.351 ± 0.361	0.315 ± 0.371
20:3n3	0.812 ± 0.507	0.500 ± 0.340	1.138 ± 0.560	2.439 ± 0.934
20:3n6	0.378 ± 0.315	0.162 ± 0.129	0.423 ± 0.387	0.429 ± 0.170
18:4n3	0.221 ± 0.179	0.084 ± 0.054	0.317 ± 0.486	0.249 ± 0.204
20:4n6	0.832 ± 0.517	0.516 ± 0.264	1.235 ± 0.628	2.487 ± 0.875
20:5n3	1.338 ± 0.909	0.908 ± 0.668	2.717 ± 1.573	5.846 ± 2.077
22:6n3	2.286 ± 1.761	1.723 ± 1.311	3.484 ± 1.840	6.726 ± 2.342
Σ SFA	77.55 ± 13.90	87.50 ± 6.63	74.98 ± 13.88	58.12 ± 14.67
Σ MUFA	14.18 ± 8.53	6.63 ± 2.95	12.69 ± 7.24	19.63 ± 7.56
Σ PUFA	8.27 ± 5.63	5.87 ± 3.91	12.33 ± 6.73	22.25 ± 7.59
TFA (µg mg ⁻¹)	131.133 ± 101.633	521.272 ± 441.954	155.612 ± 149.035	151.166 ± 102.028

ANNEXE 3b : Acides gras (fraction polaires) des larves de la plie rouge à la fin de l'expérience d'alimentation (jour 6) avec nauplii d'*Eurytemora* sp. ou des rotifères *Brachionus plicatilis*. Les nombres présentés à droite du nom des proies font référence aux expériences un et deux.

Fatty acid (%)	Rotifers -1	Nauplii -1	Rotifers -2	Nauplii -2
14:0	1.525 ± 0.728	0.795 ± 0.313	0.514 ± 0.177	0.381 ± 0.08
15:0	0.510 ± 0.059	0.448 ± 0.129	0.325 ± 0.189	0.212 ± 0.026
16:0	28.576 ± 2.703	25.262 ± 7.044	17.163 ± 4.138	19.387 ± 3.024
17:0	1.053 ± 0.309	1.034 ± 0.337	0.846 ± 0.447	0.626 ± 0.013
18:0	32.619 ± 3.997	31.312 ± 9.403	19.819 ± 5.133	24.714 ± 2.666
20:0	0.967 ± 0.316	0.830 ± 0.151	0.382 ± 0.126	0.313 ± 0.042
21:0	0.284 ± 0.154	0.285 ± 0.140	0.113 ± 0.100	0.112 ± 0.031
22:0	0.487 ± 0.195	0.647 ± 0.205	0.230 ± 0.079	0.215 ± 0.054
24:0	0.802 ± 0.383	0.806 ± 0.330	0.850 ± 0.242	0.667 ± 0.077
14:1	0.247 ± 0.096	0.222 ± 0.98	0.165 ± 0.80	0.121 ± 0.031
15:1	0.312 ± 0.163	0.261 ± 0.116	0.173 ± 0.076	0.130 ± 0.027
16:1	2.449 ± 0.547	2.019 ± 0.750	3.003 ± 0.741	2.471 ± 0.301
17:1	0.880 ± 0.318	0.692 ± 0.421	0.622 ± 0.501	0.358 ± 0.158
18:1n9	7.877 ± 3.442	6.121 ± 2.254	9.245 ± 1.058	8.342 ± 0.527
20:1n9	1.024 ± 0.255	1.221 ± 0.481	1.531 ± 0.238	1.443 ± 0.137
22:1n9	0.234 ± 0.335	0.654 ± 0.247	0.427 ± 0.198	0.205 ± 0.117
24:1n9	0.560 ± 0.245	0.628 ± 0.277	0.533 ± 0.197	0.385 ± 0.045
18:2n6	1.876 ± 0.333	1.775 ± 0.687	2.832 ± 0.365	2.550 ± 0.222
20:2	0.348 ± 0.159	0.396 ± 0.152	0.391 ± 0.091	0.339 ± 0.037
22:2	0.347 ± 0.167	0.515 ± 0.225	0.164 ± 0.080	0.118 ± 0.026
18:3n3	0.404 ± 0.213	0.476 ± 0.179	0.390 ± 0.102	0.191 ± 0.117
18:3n6	0.374 ± 0.518	0.306 ± 0.138	0.159 ± 0.064	0.191 ± 0.188
20:3n3	1.787 ± 0.649	2.216 ± 0.926	3.215 ± 0.514	2.908 ± 0.251
20:3n6	0.588 ± 0.176	0.552 ± 0.220	0.565 ± 0.132	0.477 ± 0.044
18:4n3	0.336 ± 0.191	0.327 ± 0.149	0.060 ± 0.095	---
20:4n6	1.608 ± 0.611	2.408 ± 1.038	3.745 ± 0.582	3.414 ± 0.379
20:5n3	3.269 ± 1.381	4.747 ± 2.251	9.340 ± 1.292	8.313 ± 1.219
22:6n3	8.655 ± 3.904	13.044 ± 6.473	23.196 ± 3.793	21.256 ± 2.659
Σ SFA	66.82 ± 6.42	61.42 ± 15.89	40.24 ± 7.67	46.63 ± 5.61
Σ MUFA	13.58 ± 3.20	11.82 ± 4.24	15.70 ± 1.77	13.45 ± 0.81
Σ PUFA	19.59 ± 7.20	26.76 ± 11.88	44.06 ± 6.62	39.92 ± 4.87
TFA (µg mg ⁻¹)	50.544 ± 31.314	48.624 ± 37.007	86.532 ± 33.563	110.159 ± 35.562