

RAPPORT FINAL : PROJET ELICOPTR

Evaluation des caractéristiques biologiques et nutritionnelles et de l'aptitude à l'élevage d'espèces locales de copépodes dans le but de favoriser la transition endo-exotrophie de larves de poissons marins d'élevage et d'aquarium



Thomas Camus, Mars 2015

Mots clés : Elevage de copépodes, larviculture marine, alimentation larvaire, écloséries marines, transition endo-exotrophie.



ABSTRACT

Depuis 2012, le CCDTAM de Koné (Centre Calédonien de Développement et de Transfert en Aquaculture Marine) travaille à la mise au point de techniques d'élevages pour *Lutjanus sebae* ('pouatte') et *Cromileptes altivelis* ('loche truite'), deux espèces de poissons tropicaux à fort potentiel commercial. Les premiers essais d'élevages larvaires avec *L. sebae* ont été menés fin 2012 et reposaient sur l'utilisation exclusive de rotifères comme proies vivantes. D'importantes mortalités larvaires (90-95%) ont été observées dès le sixième jour post éclosion (j6), accompagnées par de faibles taux de croissances. Ces mauvaises performances ont incitées CCDTAM à examiner le potentiel des copépodes en tant qu'alternative aux rotifères dans les étapes de nourrissage précoce de *L. sebae*.

Les copépodes, et plus particulièrement leurs stades nauplii, sont des proies vivantes naturelles et essentielles pour de multiples espèces de poissons marins tropicaux et subtropicaux. Ils sont utilisés en aquaculture depuis une trentaine d'années, notamment dans le cas d'espèces difficile à cultiver. Leur usage est en effet essentiel pour certaines espèces particulièrement délicates, et est associé à une multitude de bénéfices dans la culture d'espèces déjà maîtrisées.

Le projet EliCopTr, fruit d'une collaboration entre l'Adecap et l'Ifremer, a débuté au CCDTAM en Octobre 2013 et s'est déroulé sur 18 mois, couvrant deux périodes de production larvaire au CCDTAM. Son objectif premier était de déterminer l'aptitude à l'élevage d'espèces de copépodes indigènes ainsi que leur potentiel comme proies vivantes en éclosion, particulièrement lors de la phase de transition endo-exotrophique (premier nourrissage larvaire). Dans le cadre de cette opération, 3 espèces candidates ont été sélectionnées: les copépodes planctoniques *Parvocalanus crassirostris* et *Bestiolina similis*, et le copépode benthique *Tisbe* sp.. Après avoir isolé ces espèces des eaux calédoniennes, ils ont été mis en culture au CCDTAM dans une salle consacrée exclusivement à la culture de copépodes.

Les premiers essais d'utilisation de copépodes dans le cadre d'élevages larvaires intensifs de *L. sebae* ont été menés par le CCDTAM lors de la saison de production 2013-2014. L'introduction de *P. crassirostris* et *B. similis* dans les cycles larvaires a permis d'obtenir des premiers résultats très encourageants, avec des taux de survie larvaire 50 fois supérieurs 5 jours après l'éclosion (DPH), et 30 fois supérieurs 10 jours (DPH), comparés à

un régime n'utilisant que les rotifères. Des taux de conformité supérieurs post-métamorphose et une diminution de l'incidence des malformations ont également été observés.

Une série de tests menée en parallèle avec des petits volumes expérimentaux (40 ou 250l) ont permis de dégager quelques tendances en matière de mise en place du nourrissage extotrophique et de mesures morphométriques chez *L. sebae*. Ces données incluent le diamètre moyen des œufs fertilisés, la chronologie de l'éclosion des œufs, la taille moyenne des larves à l'éclosion, la chronologie et la mesure de l'ouverture buccale, l'observation des premières prises alimentaires, etc... Une expérience de nourrissage comparatif copépodes seuls vs. rotifères seuls a démontré que les larves n'ayant reçu que des copépodes possédaient une longueur totale moyenne à j14 significativement plus importante (3.94 ± 0.37 mm) que les larves nourries uniquement sur rotifères (3.45 ± 0.26 mm).

Au cours de l'intersaison 2014, une nette baisse de productivité a été constatée dans les cultures de copépodes, suivie d'un effondrement total des populations au bout de quelques jours. Après avoir considéré plusieurs hypothèses pour tenter d'expliquer ce phénomène, une toxicité aux métaux lourds dans l'eau de mer a été déterminée comme responsable des symptômes observés. L'utilisation de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) a été incluse dans le protocole de culture des copépodes afin de s'affranchir de cette toxicité. Une fois ce problème résolu, la montée en puissance des populations de copépodes en prévision de la saison de production 2014-2015 a pu se faire sans encombre.

Durant la saison de production 2014-2015, plusieurs nouveaux essais d'élevages larvaires intensifs ont été menés par le CCDTAM afin de confirmer les résultats obtenus l'année précédente. Des premiers essais d'élevages larvaires en grands volumes ont également pu être conduits avec *C. altivelis*.

Parallèlement, plusieurs expériences de nourrissage comparatif ont été menées en petits volumes afin de tester à une échelle expérimentale l'effet des copépodes sur la survie, la croissance et la qualité des larves de *Lutjanus Sebae*. Deux installations expérimentales ont été mises en place pour cette occasion: 20 cages flottantes cylindro-coniques en voile blutex de 40 μ m (V= 100l), et 9 bacs cylindro-coniques (V= 200l) en PEHD. Trois régimes alimentaires ont été testés en triplicats : un régime constitué exclusivement de rotifères (« ROT ») ; un régime constitué exclusivement de copépodes (« COP ») ; et un mélange contenant rotifères et copépodes (« MIX »). La mise en place de ces structures et des

protocoles expérimentaux a été le fruit d'un important travail de collaboration entre le CCDTAM, Ifremer Palavas et les acteurs du projet EliCopTr.

Les cinq tests conduits en cages flottantes ont produit des survies larvaires relativement faibles malgré des niveaux de proies vivantes satisfaisants, indiquant que ce type de structure expérimentale n'était pas adapté aux larves de *L. sebae*. Plusieurs données ont néanmoins été récoltées, et un perfectionnement des techniques d'approvisionnement en nauplii de copépodes a été mis au point au cours de ces expériences.

Les 4 expériences en bacs de 200l ont produit de meilleurs résultats que les cages flottantes en termes de survie et de croissance, et des observations morphométriques plus fines ont également été réalisées (inflation de la vessie natatoire, réplétion stomacale, torsion de la notochorde, résorption du globule lipidique, présence de calculs urinaires, malformation). Les résultats de ces expériences ont permis de dégager quelques tendances concernant l'influence des copépodes sur le développement larvaire précoce de *L. sebae*.

Des essais larvaires ont également été conduits avec l'espèce de poisson ornementale *Dascyllus* sp., en collaboration avec l'Aquarium Des Lagons de Nouméa. Un total de 3 expériences en petits volumes ont été réalisées entre 2014 et 2015.

Les essais réalisés en grands volumes par le CCDTAM ainsi que les expériences en petits volumes menés dans le cadre de l'opération EliCopTr ont permis d'établir que les copépodes *P. crassirostris* et *B. similis* sont des proies vivantes adaptées à l'élevage larvaire de *L. sebae*. Leur utilisation dans le cycle larvaire précoce est nécessaire et suffisant pour obtenir des taux de survie et de conformité satisfaisants.

Les résultats des expériences menées en petits volumes indiquent que la composition biochimique des nauplii de copépodes, et moins leur petite taille comme initialement proposée, serait le facteur principal responsable de leur supériorité vis à vis des rotifères. En effet, la présence de nauplii lors des premières étapes de nourrissage exotrophique s'accompagne d'une accélération de la maturation du système digestif chez *L. sebae*. Les nauplii de copépodes ingérés par les larves sont donc responsables d'un effet 'kick start' qui déclenche et accélère la maturation du système digestif. A l'opposé, le système digestif des larves nourries exclusivement sur rotifères demeure immature et incapable d'absorber efficacement les nutriments contenus dans les rotifères. Ainsi, les larves qui ont bénéficié d'un apport en nauplii lors de la mise en place du nourrissage exotrophique posséderont un système digestif plus mature, et donc plus à même d'être capable d'extraire les nutriments de proies vivantes plus difficiles à digérer (type rotifères).

Partant de ce constat, plusieurs améliorations peuvent être apportées à l'utilisation des copépodes dans le cadre d'élevage larvaire. De futures pistes de recherches à considérer incluent l'optimisation de la synchronisation, de la quantité et de la durée d'utilisation des nauplii de copépode nécessaires au déclenchement de l'effet 'kick start'.

ORGANISATION DU DOCUMENT

Abstract	2
Sommaire	6
Chapitre 1 : Description du Projet	7
Chapitre 2 : Isolation et identification des espèces candidates	12
Chapitre 3 : Résumé des activités entreprises durant la saison de production 2013-2014	19
Chapitre 4 : Résumé des activités entreprises durant la saison de production 2014-2015	41
Chapitre 5 : Conclusion et Perspectives	63
Bibliographie	67
ANNEXES	

CHAPITRE 1

DESCRIPTION DU PROJET

Les collectivités de la Nouvelle Calédonie encouragent depuis plusieurs années la diversification aquacole et notamment la pisciculture marine, illustrée notamment par la création du CCDTAM (Centre Calédonien de Développement et de Transfert en Aquaculture Marine) et le soutien à une entreprise privée Aqualagon. Elles favorisent également l'émergence de micro entreprises dans le domaine de l'exportation d'espèces aquariophiles.

Un des principaux obstacles à la production d'espèces nouvelles, que ce soit pour l'aquariophilie ou la production, est la difficulté de leur élevage larvaire en raison notamment de l'inadéquation des proies vivantes traditionnelles. L'incorporation de copépodes, et plus précisément de leurs stades nauplii, dans la séquence alimentaire des larves précoces permet très souvent d'améliorer les survies, notamment en raison de leur petite taille et de leur excellent profil biochimique.

A ce jour, la Nouvelle Calédonie ne dispose pas de compétences dans l'élevage de ce type de proie.

1.1 Contexte

Le maximum du potentiel mondial de capture de poissons, mollusques et crustacés dans les écosystèmes marins et continentaux a été atteint il y a environ deux décennies : le volume mondial des prises déclarées (hors rejets et pêche INN –illégale, non déclarée, non réglementée) apparaît désormais stabilisé au voisinage de 90 Mt/an (88% en eaux marines, 12% en eaux continentales) (FAO, 2009). L'essor de l'aquaculture –dont la production a crû au taux moyen de 6,1 %/an pendant la période 2001-2009– soutient la croissance de l'offre alimentaire. En 2009, 84% de la production globale (pêche et aquaculture) était destiné à la consommation humaine directe. La contribution de l'aquaculture à l'alimentation humaine (56 Mt) se rapproche de celle de la pêche. La FAO et l'OCDE prévoient que la production aquacole atteindra 74 Mt en 2020. Pour atteindre ces objectifs, le secteur de l'aquaculture doit investir massivement dans les différents axes de recherche afin de promouvoir le développement de nouvelles espèces émergentes et de nouveaux protocoles de culture des organismes marins.

Ce même enjeu est posé au territoire de la Nouvelle-Calédonie. Avec le classement de vaste zone du lagon au Patrimoine Mondial de l'Unesco, une pression des activités humaines croissante, mais surtout la présence d'une diversité marine exceptionnelle, les pouvoirs publics souhaitent promouvoir le développement d'une aquaculture durable d'espèces locales, qui favoriseraient par ailleurs le développement d'activité économique dans les zones côtières rurales. A ce titre, une réelle politique de diversification aquacole est soutenue par la Nouvelle-Calédonie et ses provinces, notamment au travers du lancement d'un Technopole dont les premiers chantiers et outils (CCDTAM et CTA) sont dédiés à l'aquaculture marine.

Malgré les récents progrès de la formulation d'aliments inertes destinés aux larves de poissons (Cahu & Infante, 2001) l'alimentation de la plupart des espèces à fort potentiel aquacole dépend encore de la disponibilité de proies vivantes principalement pour les stades précoces (Conceição et al., 2010). En effet, à l'ouverture de la bouche, le système digestif des larves est encore rudimentaire et dépourvu d'estomac, de sorte que l'essentiel de la digestion protéique

intervient dans les cellules épithéliales intestinales (Govoni et al., 1986 ; Avila & Juario, 1987). Pour une large majorité de larves d'espèces marines, la transition endo exotrophie ne peut s'effectuer à partir d'une alimentation constituée exclusivement d'aliments inertes (Lazo et al., 2000; Payne & Rippingale, 2000). L'inclusion de proies vivantes dans les protocoles de culture de poissons marins est donc fondamentale, au minimum durant la délicate période de transition endo-exotrophie.

De nos jours, les proies vivantes les plus utilisées en aquaculture sont les rotifères et les artémias, en raison de l'existence de protocoles de production en masses standardisés (Lubzens et al., 2001; Conceição et al., 2010). Toutefois, leur qualité nutritionnelle est souvent inappropriée pour l'élevage d'une majorité de juvéniles. Ils présentent notamment d'importantes carences en certains acides gras dits essentiels, notamment en EPA (acide eicosapentaénoïque), et DHA (acide docosahexaénoïque) ainsi qu'en phospholipides (Sargent et al., 1997; O'Bryen & Lee, 2005). De très nombreuses études ont montré que le nourrissage des larves à l'aide d'assemblages de zooplancton sauvage, constitué principalement de copépodes, pouvait minimiser les carences nutritionnelles précitées (Ronnestad et al., 1998; Støttrup, 2000; Cassiano & Ohs, 2011). De meilleures survies et croissances ont été observées chez les alevins d'espèces tropicales ou semi-tropicales (Kraul et al., 1992; Lemus et al., 2010; Côrtes & Tsuzuki, 2012) nourris avec ce type de proies.

En plus de leurs limitations nutritionnelles, les rotifères et artémias possèdent un faible contenu enzymatique et sont souvent très mal digérés par les jeunes larves de poisson dont le système digestif n'est pas encore entièrement développé (Schipper et al., 1999).

A ces limitations biochimiques s'ajoutent également des problèmes biologiques : la taille des rotifères (150 à 340 µm) et des artémias (422 à 517) est souvent trop grande pour permettre leur ingestion par des larves à petite bouche lors de la mise en place de l'alimentation exotrophique, qui nécessitent des proies parfois inférieures à 100 µm tels *Dascyllus* spp. (demoiselles) et *Siganus* spp. (picots).

Il est désormais bien établi que les copépodes provenant d'élevages ou du milieu naturel présentent des caractéristiques biochimiques et biologiques particulières qui leur confèrent un potentiel de substitution totale ou partielle aux aliments vivants ou inertes évoqués précédemment (Evdjemo et al., 2003; Drillet et al., 2006; van der Meeren et al., 2008). Depuis de nombreuses années, les aquaculteurs ont appris à maîtriser les blooms de copépodes pour assurer et accompagner l'alimentation des juvéniles dans les bassins de terre extensifs, les mésocosmes et/ou bacs larvaires semi intensifs (Engell-Sorensen et al., 2004). L'emploi de ces organismes en élevage larvaire a été élevé au rang de « recette miracle » pour débloquent le passage délicat endo-exotrophie de plusieurs espèces tropicales ou subtropicales (Doi & Singhagraiwan, 1993; Schipper et al., 1999; Payne et al., 2001; Ogle et al., 2002; McKinnon et al., 2003; Schipper, 2006; Wilcox et al., 2006), ainsi que de nombreuses espèces de poissons d'aquarium (Payne & Rippingale, 2000; Baensch, 2003; Laidley et al., 2008; Olivotto et al., 2008a; Ho et al., 2009).

Plusieurs publications ont ainsi mis en évidence la supériorité des copépodes en tant que proies vivantes. Les caractéristiques de larves marines élevées avec un régime de copépodes incluent l'amélioration des taux de survie et de croissance, une pigmentation plus soutenue, un meilleur développement du système digestif, une diminution des malformations du squelette et une meilleure capacité à tolérer le stress (van der Meeren et al., 2008; Lemus et al., 2010).

1.2 Articulation du projet

1.2.1 Faisabilité de l'opération

En février 2013, nous avons répondu avec succès à l'appel à projets du Programme ZoNéCo: ressources marines de Nouvelle-Calédonie visant au renforcement de la compétitivité des secteurs pêche et aquaculture en relation avec les projets piscicoles existants.

Le projet s'est déroulé sous la forme d'un post doctorat effectué par T.Camus PhD- Doctor of Philosophy in the School of Marine and Tropical Biology James Cook University Australia, co financé par l'Ifremer et l'ADECAL.

L'ADECAL a pris en charge des frais d'équipement, de fonctionnement, et de personnel nécessaires à la réalisation de l'opération initiale d'une durée de 12 mois pour un montant 6 948 000 FCFP. La première tranche du projet s'est déroulée d'octobre 2013 à septembre 2014. Une seconde tranche de 6 mois a été actée lors du COPIL de juillet 2014 dotée d'un financement complémentaire de 500 000 FCFP. Elle s'est achevée en mars 2015.

1.3 Objectifs

1.3.1 Culture intensive de copépodes

Malgré ces avantages significatifs et de récentes avancées technologiques l'utilisation des copépodes en éclosérie de production est aujourd'hui encore limitée (Drillet et al., 2011). Parmi les principaux freins figurent les coûts de production élevés et les faibles productivités (densités) en conditions d'élevage (Schipp, 2006). Le manque de méthodes standardisées pour la culture de copépodes, ainsi que les différences biologiques et comportementales importantes entre espèces, rendent nécessaire un travail scientifique spécifique à chaque espèce afin de déterminer leur biologie reproductive, leur cycle de vie, les conditions acceptables de culture et de nourrissage. En raison de ces particularités, les conditions optimales de culture d'une espèce donnée (incluant son régime alimentaire) ne sont que rarement transposables aux autres espèces. De sorte qu'il existe un besoin important de développer et soutenir des programmes de recherche à double vocation scientifique et plus finalisée afin de mettre au point et améliorer les protocoles de cultures intensives des espèces de copépodes les plus prometteuses pour les applications aquacoles.

1.3.2 Nourrissage larvaire

La principale caractéristique de la phase de transition endo-exotrophie est que la larve ne tire plus sa source de nutriment, ainsi que son énergie nécessaire à la poursuite de son développement larvaire, de ses réserves vitellines mais de la nourriture ingérée. Cette étape critique de transition dans le développement larvaire est souvent la cause d'importants épisodes de mortalité. Pour permettre le succès de cette transition endo-exotrophie, il est impératif que toutes les structures et organes impliqués dans la prise de nourriture, la digestion et l'assimilation soient opérationnels au bon moment et que la nourriture appropriée soit disponible (Yufera & Darias, 2007). Généralement, la réussite de la transition endo exotrophie est appréciée par la survie et la croissance précoces des larves de poissons (Busch

et al., 2010; Cassiano et al., 2011; Côrtes & Tsuzuki, 2012). D'autres critères plus précis (non exhaustifs) sont également employés :

- le jour de la première prise alimentaire (Doi et al., 1997) ;
- critères morpho-anatomiques tels la vitesse de résorption du globule lipidique qui couvre la transition endo-exotrophie (Avila & Juario, 1987) ;
- critères du développement larvaire comme le moment de l'apparition de la torsion de la corde qui précède la formation de la caudale, l'apparition des premières ébauches de la dorsale (Lemus et al., 2010) ;
- critères de qualité comme le taux d'inflation de la vessie gazeuse, la taux de cristaux présents dans la vessie urinaire, la pigmentation, les malformations mandibulaire ou de la colonne vertébrale (Naess & Lie, 1998 ; Imstrand et al., 2006; Rajkumar & Vasagam, 2006, Denis Covès, com.pers.)

1.3.3 Actions prévues de l'opération ELICOPTR

- 1 Echantillonnage de la biodiversité locale des copépodes, notamment en zone de mangrove.
- 2 Isolement de différentes espèces de calanoides et harpacticoides.
- 3 Détermination des potentialités d'élevage des espèces candidates (temps de génération, cycle de vie, productivité) en volumes croissant.
- 4 Aptitude au changement d'échelle de production (du béccher au bac de volumes croissants pouvant atteindre quelques m³).
- 5 Tests d'adéquation (attrait, capture, digestion apparente etc...) de ces copépodes au nourrissage des larves de poissons;
- 6 Détermination de la composition bio-chimique des espèces candidates (réalisés par le laboratoire de Chimie de Lille1);
- 7 Détermination du succès du passage endo-exotrophie des larves de poissons par des indicateurs « simples » morpho anatomiques et d'activité des larves et indicateurs d'efficacité de capture (installations du CCDTAM) ;

1.4 Résultats attendus et bénéfiques pour les collectivités

1.4.1 Les résultats attendus de cette opération

- 1 Adaptation et transfert technique de production d'un copépode *Acartia sp.* ou *Bestiolina sp.* au CCDTAM et formation d'un technicien du CCDTAM ;
- 2 Mise au point de la production en continu à petite échelle de deux (voire trois) espèces locales de copépodes sélectionnées sur la base de leurs caractéristiques biologiques, nutritionnelles et de leur aptitude à l'élevage ;
- 3 Réalisation de tests préliminaires comparatifs sur l'influence d'une alimentation employant des nauplii de copépodes seuls et/ou en association avec des rotifères et/ou des rotifères sur la survie et la croissance sur les larves de poissons (a minima d'espèces de

l'aquarium des lagons) qui seront disponibles en fonction de la montée en puissance des projets en cours (Aqualagon et CCDTAM) ;

- 4 Mise au point de protocoles d'élevage en conditions intensives spécifiques des copépodes locaux sélectionnés et édition d'un rapport technique.

1.4.2 Bénéfices pour les collectivités

Ce projet contribuera à la valorisation de la biodiversité des écosystèmes lagunaires de la Nouvelle Calédonie à travers deux de ses composantes: copépodes et poissons. Le service rendu par cette biodiversité s'exprimera par le développement attendu de la pisciculture qui est encore en phase de d'émergence. Le succès de cette nouvelle activité pour le Territoire piloté par le CCDTAM dépend en grande partie de la mise au point d'une zootechnie larvaire reproductible intégrant des nauplii de copépodes locaux pour faciliter le passage endo-exotrophie des larves. La valorisation des traits de vie des espèces de copépodes sélectionnées se traduira par la mise au point technologique de systèmes d'élevages innovants adaptés aux besoins exprimés par les acteurs impliqués dans cette opération (CCDTAM, Aqualagon, Siganidés DOM TOM).

L'aquarium de Nouméa est fortement impliqué dans la préservation de l'environnement marin et notamment des récifs coralliens. La biodiversité remarquable des espèces d'ornementation du lagon et le développement important de leur commerce à l'export conduit à une pression de pêche qui inquiète les collectivités. Leur production via l'aquaculture (en circuit fermé) constitue une alternative plus durable pour le maintien de l'intégrité des écosystèmes concernés. La mise au point d'une technologie d'élevage larvaire basée sur l'utilisation de nauplii de copépodes en utilisant l'espèce *Dascyllus* sp. comme modèle pour l'élevage des espèces destinées au commerce de l'aquariophilie constituera une avancée importante.

CHAPITRE 2

ISOLATION ET IDENTIFICATION DES ESPECES CANDIDATES

2.1. Isolation

Les premiers échantillonnages de copépodes en milieu naturel ont coïncidé avec le démarrage du projet EliCopTr en Octobre 2013. La totalité de ces échantillonnages a été effectuée dans la Baie de Foué ainsi que dans l'arroyo où est effectué le pompage en eau de mer du CCDTAM, soit à quelques centaines de mètres du centre.



Localisation des échantillonnages de zooplancton
Point G.P.S de la baie de Foué: -21.086521, 164.804771
Point G.P.S du channel 'CCDTAM' : -21.091546, 164.809191

Au-delà de l'aspect pratique lié à la proximité du CCDTAM, la localisation géographique des échantillonnages n'a pas été décidée au hasard. Les milieux saumâtres, baies estuaires et mangroves, subissent en effet d'importants changements de paramètres de qualité d'eau par rapport aux environnements océaniques plus stables. Cet environnement hétérogène confère aux copépodes d'eaux saumâtres une certaine plasticité dans leur capacité à tolérer d'importantes variations de qualité d'eau, à l'opposé des espèces océaniques et côtières qui vivent dans les environnements plus stables (Manchline, 1998). Les copépodes de baies et mangroves possèdent notamment une plus grande tolérance aux changements de paramètres incluant la salinité, la température, la concentration en phytoplancton, le pH, la turbidité, etc. La tolérance supérieure des espèces d'eaux saumâtres leur confère donc un avantage non négligeable en tant que proies vivantes par rapport à d'autres espèces purement océaniques.

Les prélèvements de zooplancton ont été effectués à l'aide de deux filets possédant respectivement des mailles de 65 et 200 microns. Ces filets étaient attachés et laissés à la dérive derrière un bateau avançant à faible allure pendant 3 à 5 minutes afin d'accumuler suffisamment de zooplancton sans surcharger les filets et risquer d'endommager les animaux collectés. Les filets étaient ensuite remontés sur le bateau et leur contenu remis en suspension dans des seaux de 20l préalablement remplis d'eau de mer prélevée *in-situ*. Ces prélèvements ont ensuite été ramenés en laboratoire et les copépodes séparés des autres constituants du zooplancton, avant d'être ensuite triés par espèce pour identification.



Filet à plancton avec une maille de 60 μ m. Le container a l'opposé de l'ouverture accumule le zooplancton capturé



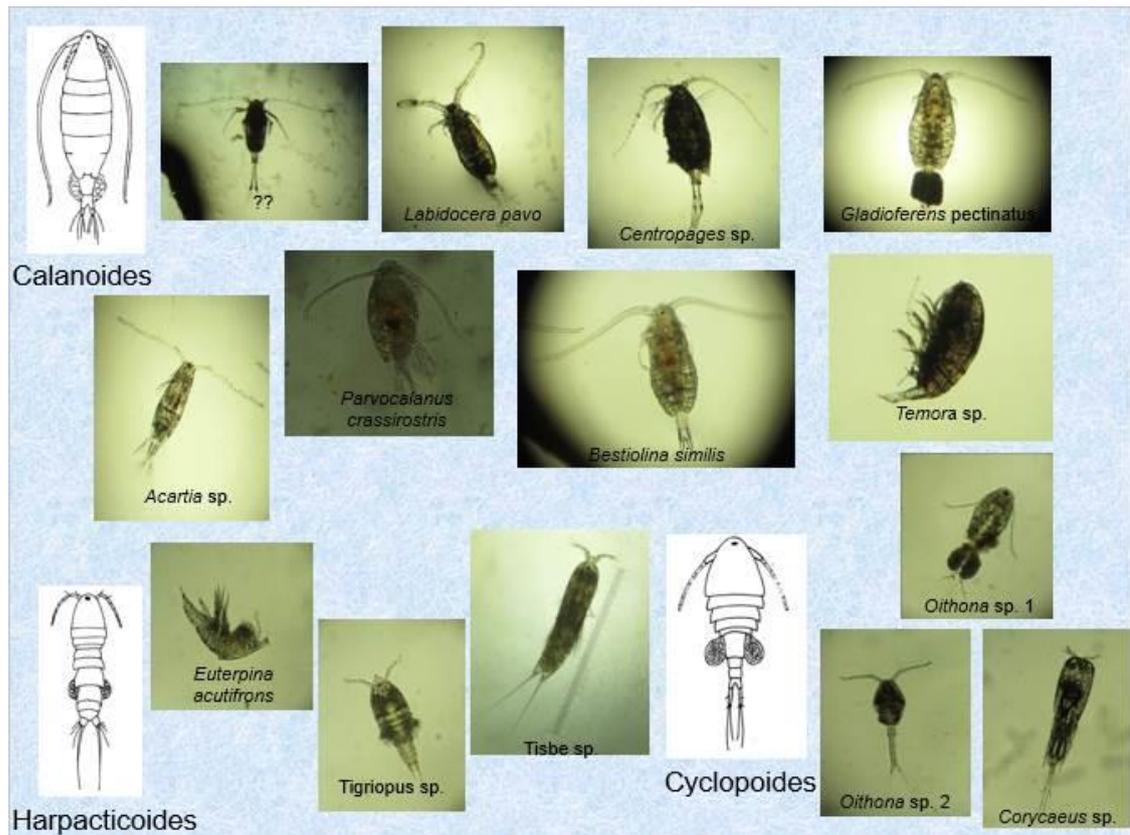
Echantillonnage de zooplancton dans la Baie de Foué à l'aide des deux filets à plancton

2.2 Identification

Il n'existe à ce jour que peu d'études scientifiques décrivant les assemblages de copépodes présents en Nouvelle-Calédonie, toutes publiées dans les années 1980. Deux publications décrivent les espèces de copépodes planctoniques rencontrées dans les lagons de la Province Sud (Binet, 1984 ; Binet, 1985), et une troisième concerne l'ensemble du Pacifique Sud-Ouest, avec plusieurs mentions des eaux calédoniennes (Dessier, 1988). Le reste des publications copépodologiques en Nouvelle-Calédonie concerne des espèces d'eau douce (Dusart, 1984 ; Defaye, 2001) et ne sont donc pas pertinentes dans le cadre de l'opération EliCopTr. Ce faible nombre de publications concernant la description des copépodes des eaux de la Nouvelle Calédonie et l'absence totale d'étude réalisée en Province Nord laissait présager un travail délicat d'identification. Cependant, les espèces de copépodes prélevées dans le cadre de l'opération EliCopTr possédaient des affinités phylétiques significatives avec les espèces tropicales et subtropicales rencontrées dans les eaux du

Queensland, où le candidat a préalablement effectué son doctorat (Camus, 2013). Du fait des connaissances taxonomiques acquises sur ces espèces, le procédé d'identification a pu être accompli relativement rapidement. [Néanmoins, l'identification exacte de ces espèces n'a été rendue définitivement possible que par l'examen de celles-ci par un taxonomiste de renommée mondiale présent au Congrès de Copépodologie qui s'est tenu en Corée en juillet 2014].

L'un des objectifs majeurs du projet EliCopTr était l'isolation de trois espèces locales de copépodes sélectionnées sur la base de leurs caractéristiques biologiques et de leur aptitude à l'élevage. Une dizaine d'espèces de copépodes ont été isolées dans un premier temps, avant d'affiner la sélection aux trois espèces candidates de l'opération :



Les espèces de copépodes isolés pour l'opération EliCopTr lors des premiers échantillonnages (Octobre 2013)

Parmi les espèces de copépodes échantillonnées, quatorze ont été initialement mis en culture : huit Calanoides, trois Harpacticoides et trois Cyclopoides. Parmi ces espèces, deux Calanoides et un Harpacticoides ont été sélectionnées comme espèces candidates pour l'opération EliCopTr. Les critères de cette sélection sont détaillés ci-après. Les Cyclopoides ont été écartés en raison de leur alimentation omnivore et de leur mode de nourrissage raptorial. Ces copépodes ont en effet été observés en train de s'attaquer à des proies de taille bien supérieure à la leur, notamment à des larves de poissons marins. Leur utilisation en écloserie marine est donc déconseillée.

Parmi les espèces Calanoides isolées, la présence de *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* fut remarquée. Ces deux copépodes appartiennent à la famille des Paracalanidae et possèdent une abondante distribution en milieux tropicaux et subtropicaux, dominant

fréquemment les assemblages de copépodes en eaux peu profondes (McKinnon and Duggan, 2001 ; Boxshall and Halsey, 2004). Ces copépodes pélagiques sont tous deux de petite taille et constituent souvent une part importante des assemblages de copépodes rencontrés en milieu saumâtre, notamment en Australie (McKinnon and Duggan, 2001; Boxshall and Halsey, 2004). Leurs avantages potentiels dans le cadre d'EliCopTr sont les suivants:

- **Abondants** à proximité du CCTAM (Baie de Foué et channel 'CCDTAM')
- Ces deux espèces sont reconnues comme étant des **proies essentielles et privilégiées** pour plusieurs familles de poissons tropicaux et (Sampey et al., 2007).
- Leur **profil nutritionnel** a été jugé **très approprié** à la larviculture (McKinnon et al., 2003 ; Schipp, comm. pers.)
- Ils possèdent 12 stades de développement distincts, offrant **un large éventail de tailles de proies aux larves cultivées**. Ces stades de développement incluent 6 stades nauplii (N1 à N6), suivis de 6 stades copépodites (C1 à C6). Le 6eme stade copépodite étant le stage adulte, sexuellement mature.
- Les stades nauplii de ces copépodes mesurent entre 60 et 180 μm et les stades copépodites entre 200 et 600 μm . Ces petites tailles, et plus spécifiquement celle de leurs stades nauplii, sont **adaptées au nourrissage larvaire d'espèce possédant de très petites ouvertures buccales** lors de la mise en place du nourrissage extrophique.
- Tous leurs **stades de développement sont pélagiques** et sont donc disponibles pour les larves de poisson pélagiques.
- Leur **productivité relativement importante en culture intensive** par rapport à d'autres espèces en font d'excellents candidats en tant que proies vivantes dans le cadre d'écloseries marines (McKinnon et al., 2003 ; Shields et al., 2005).

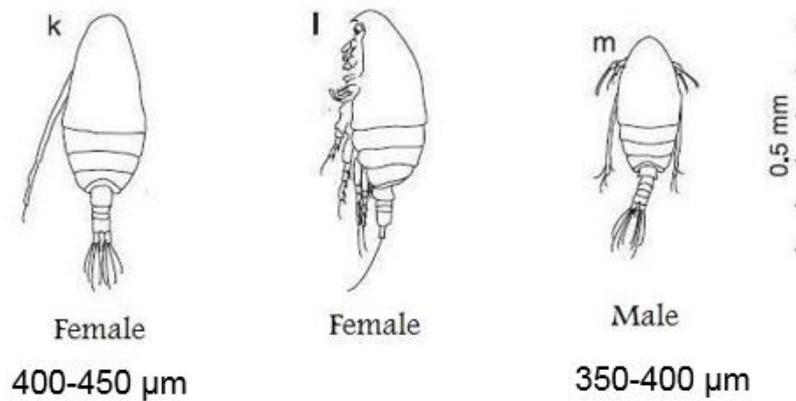


Comparaison de la taille d'un nauplius de *B. similis* (80 μm , à gauche) avec un rotifère *Brachionus rotundiformis* (175 μm sans son œuf, à droite).

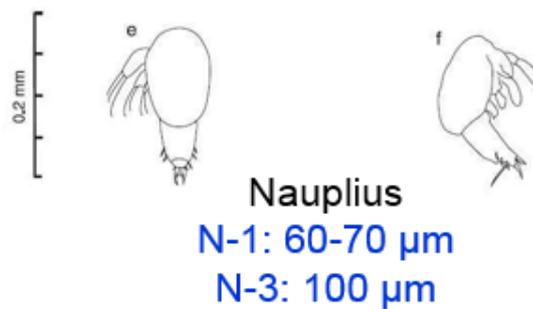
P. crassirostris et *B. similis* furent donc sélectionnées en tant qu'espèces candidates dans le cadre de l'opération Elicoptr, en concertation avec l'encadrement scientifique ainsi que la direction du CCDTAM.

2.2.1. Espèce candidate #1 : *Parvocalanus crassirostris* (Calanoida: Paracalanidae)

Longueur totale adulte C6 : < 450 μm . Jeune nauplii N1 : < 65 μm



Adultes *Parvocalanus crassirostris* et longueur totale (source : McKinnon et al., 2003)



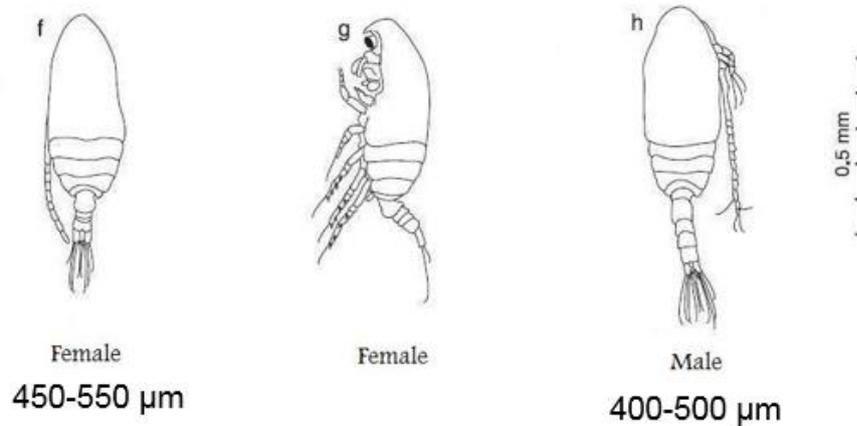
Stade nauplius et longueur totale (source : McKinnon et al., 2003)



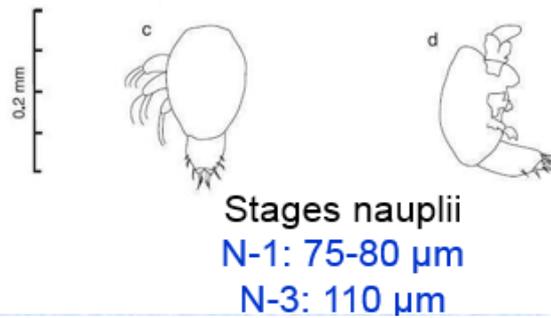
Parvocalanus crassirostris observé sous le microscope (x30): Femelle adulte (gauche) et stade nauplius 1 (droite)

2.2.2. Espèce candidate #2 : *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae)

Longueur total adulte C6 : < 550 μm . Jeune nauplii N1 : < 80 μm



Adultes *Bestiolina similis* et longueur totale (source : McKinnon et al., 2003)



Stade nauplius et longueur totale (source : McKinnon et al., 2003)



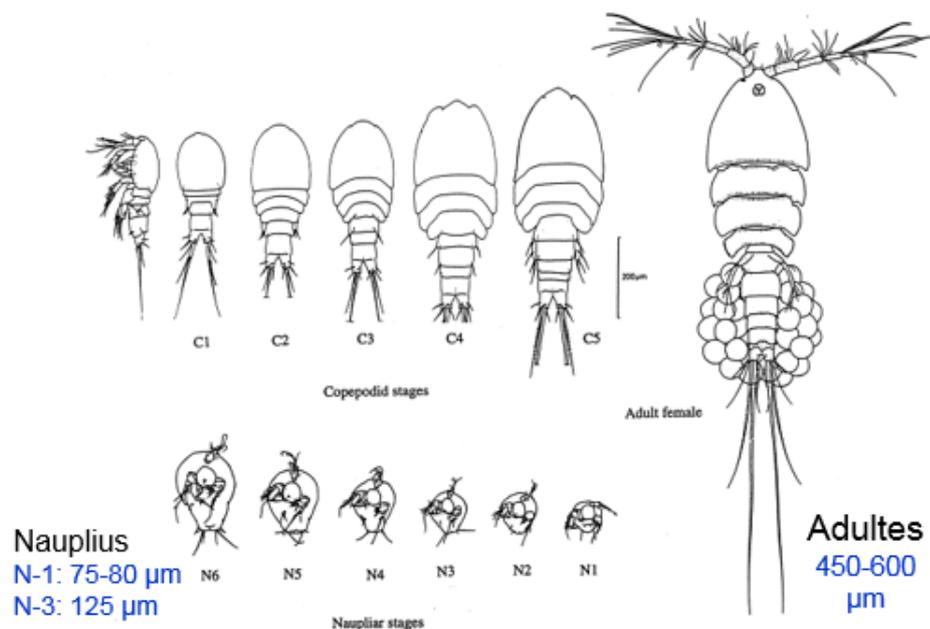
Bestiolina similis observé sous le microscope (x30): Femelle adulte (gauche) et stade nauplius 1 (droite)

L'isolation, la culture en condition intensive, ainsi que l'utilisation de ces deux copépodes dans un contexte aquacole sont inédits en Nouvelle Calédonie.

2.2.3. Espèce candidate #3 : *Tisbe* sp. (Harpacticoida: Tisbidae)

Lors du démarrage du projet en Octobre 2013, Aqualagon a exprimé le souhait de bénéficier d'une culture de copépodes benthiques, mieux adaptés aux larves type Picots qui possèdent un comportement de chasse le long des parois. Les Harpacticoides étant des copépodes presque exclusivement benthiques, *Tisbe* sp. fut rapidement déterminé comme ayant le meilleur potentiel en termes de productivité et fut donc sélectionné comme 3ème espèce candidate. Le CCDTAM et l' Aquarium Des Lagons n'ont pas manifesté d'intérêt pour cette espèce.

La sélection de cette espèce se justifie notamment par ses petits stades de développement, sa forte productivité en culture et son profil nutritionnel supérieur (Heath and Moore, 1997 ; Souza-Santos et al., 2006 ; Arndt and Sommer, 2014).



Stades de développement et longueur totale de *Tisbe* sp.



Femelle adulte *Tisbe* sp. sous microscope (x40)

En raison de problèmes opérationnels indépendants de notre volonté durant la période 2014-2015, un transfert de *Tisbe* sp. vers Aqualagon n'a pu avoir lieu. La culture de ce copépode a donc été abandonnée en Juillet 2014.

CHAPITRE 3

RESUME DES ACTIVITES ENTREPRISES DURANT LA SAISON DE PRODUCTION 2013-2014

3.1. Expériences menées dans le cadre d'EliCopTr (Novembre et Décembre 2014)

3.1.1 Introduction

Le démarrage de la période de pontes de *Lutjanus sebae* au CCDTAM était prévu pour le mois de Décembre 2013. Suite au démarrage de l'opération EliCopTr en Octobre, deux mois étaient donc a priori disponibles pour réaliser la montée en puissance des espèces de copépodes candidates isolées en tout début d'opération. Les pontes de *L. sebae* ont cependant démarré plus tôt que prévu avec les premiers œufs fertilisés récoltés dès le 2 Novembre 2013. L'organisation a dû être modifiée en conséquence, avec le démarrage des premiers élevages larvaires tout juste un mois après le début de l'opération EliCopTr et un temps disponible extrêmement court pour mettre en place le plan expérimental indispensable à la bonne conduite d'expériences scientifiques.

Néanmoins, 4 expériences à échelle pilote ont pu être réalisées sur l'utilisation de *B. similis* et *P. crassirostris* durant les premières étapes de nourrissage larvaire de *L. sebae*.

3.1.2 Description des expériences

Quatre expériences ont été réalisées sur la dalle mis à disposition dans la salle « copépodes » durant la saison de ponte 2013-2014. Trois ont été conduites dans des volumes de 40l et la quatrième dans des volumes de 250l. Les principaux paramètres de ces 4 expériences sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Les paramètres mis en œuvre et des principaux facteurs observés dans les expériences mis en place durant la saison de ponte 2013-2014 :

Exp. #	Date de Démarrage	Durée (jours)	Unités Expérimentales	Méthode d'Introduction	Densité d'inoculation	Microalgues	Proies Vivantes	Facteurs observés
1	08/11/2013	1	9 x 40 l	Larves à j1	11,75 larves /l	20K C/ml/jour	copépodes seuls	Mises au point opérationnelles
2	10/11/2013	9	9 x 40 l	Œufs fertilisés	7,5 œufs /l (volumétrique)	20K C/ml/jour	Copépodes seuls	Timing de l'ouverture buccale, mesure de l'ouverture buccale, observation des mouvements de prédation, résorption du globule lipidique
3	25/11/2013	5	6 x 40 l	Œufs fertilisés	12,5 œufs /l (volumétrique)	eau claire	absence de nourrissage	Timing de l'épuisement des réserves vitellines
4	05/12/2013	16	2 x 250 l	Œufs fertilisés	15 œufs /l (volumétrique)	20K C/ml/jour	Copépodes seuls	Résorption du globule lipidique, ouverture buccale, mesure de la bouche, réplétion stomacale, comparaison croissance à j14 avec larves élevées sur rotifères seuls

Les bacs cylindro-coniques de 40 l et les bacs ronds à fond plat de 250 l dans lesquels ont été réalisées les expériences sont présentés ci-dessous :



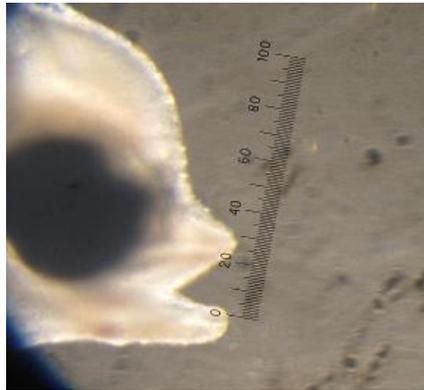
3.1.3 Principaux résultats

A) Expérience # 1

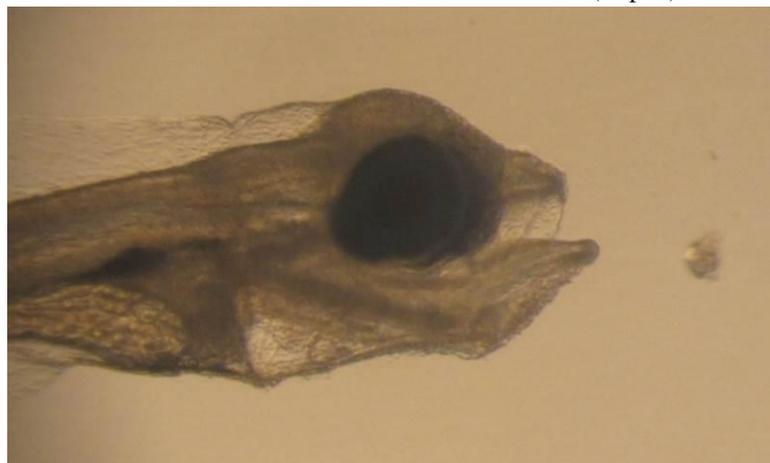
Les larves à j1 post éclosion ont été comptées une par une avant d'être introduites dans les volumes expérimentaux. Une mortalité totale a été constatée au lendemain de leur introduction. Il a donc été décidé d'introduire des œufs fertilisés plutôt que des larves lors des expériences suivantes afin d'éviter cette mortalité initiale.

B) Expérience # 2

Le diamètre moyen des œufs fertilisés de *L. sebae* est de $890 \pm 30\mu\text{m}$. L'éclosion a débuté 20 à 22 heures après la ponte avec un taux d'éclosion de 90% ($T=27 \pm 0.5^\circ\text{C}$). La longueur totale des larves est de $2.92 \pm 0.09\text{mm}$ à j1 post éclosion. L'ouverture buccale est observée chez certaines larves dès 36h après éclosion et la totalité des larves possèdent une bouche fonctionnelle à j4 post éclosion. L'ouverture buccale mesure en moyenne $200\mu\text{m}$ de hauteur sur $180\mu\text{m}$ de large, indiquant que les larves sont mécaniquement capables d'ingérer les jeunes stades nauplii de *P. crassirostris* et de *B. similis*.

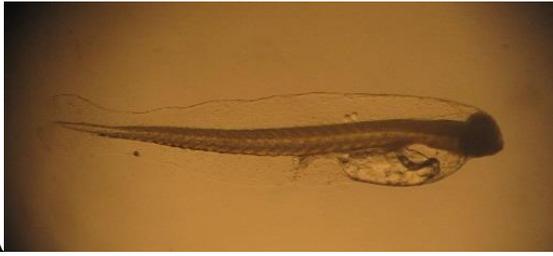


Hauteur de bouche de *L. sebae* mesurée à J4 (Exp. 2)



Ouverture buccale d'une larve à j4 post éclosion et comparaison avec un nauplii 1 de *B. similis*

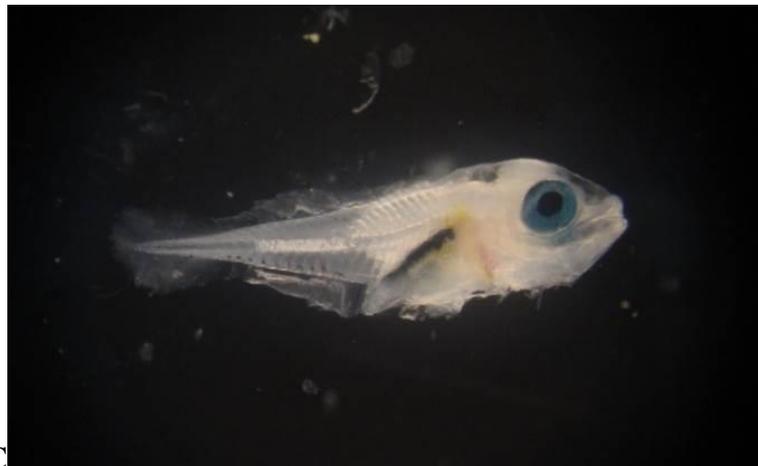
Des premières observations de prise alimentaire dans le système digestif chez quelques larves à j3 ont également été réalisées, de même qu'un suivi du développement morphologique des larves de j1 à j9 :



A



B



C

Larves de *L. sebae* issus de l'expérience #2 à : j1 (A) ; j6 (B) ; j9 (C)

C) Expérience # 3

Les larves de *L. sebae* élevées en eau claire et sans apport de nourriture aboutissent à une mortalité cumulée de 80% à j5. Une mortalité totale est observée à j6 au matin.



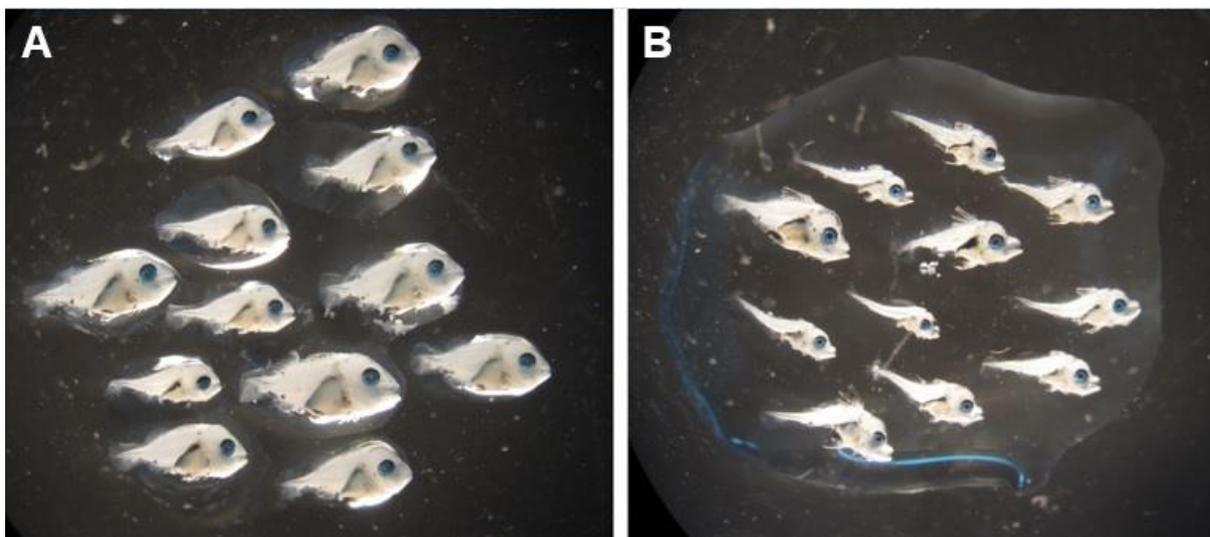
Larve de *L. sebae* à jeun, à j5 (Exp. 3). Noter l'absence de contenu stomacal.

Une absence totale de pigmentation dans le système digestif était observée de j1 à j6 chez la totalité des larves observées. Les traces de coloration observées dans le tube digestif de *L. sebae* au cours des précédentes expériences peuvent donc être attribuées à un nourrissage exotrophique.

D) Expérience # 4

Les larves ont été élevées dans 2 bacs de 250 l jusqu'à j16. Les premiers comportements de prédatons (mouvements en 'S') ont été observés chez certaines larves dès j3, indiquant le démarrage du nourrissage exotrophique. Une analyse visuelle du contenu stomacal à j4 a permis d'observer la présence d'œufs de copépodes dans le TD de certaines larves.

A j5 les tubes digestifs de 90% des larves observées n'étaient pas vides, avec une pigmentation orangée parfois fortement prononcée. A j6, les tubes digestifs étaient non vides chez toutes les larves observées. A j14, la longueur totale des larves a été comparée avec celle de larves du même âge élevées sur un régime exclusivement composé de rotifères :



Comparaison de la taille totale de *L. sebae* à j14 suivant que les larves ait été nourrie sur copépodes (A); rotifères (B).

La taille moyenne des larves élevées sur un régime « copépodes » est de 3.94 ± 0.37 mm, contre 3.45 ± 0.26 mm pour les larves élevées sur un régime « rotifères ». La réplétion stomacale des larves nourries sur copépodes était également plus importante que pour les larves nourries sur rotifères. A j16, les larves élevées uniquement avec un régime copépodes ont été sorties de la salle copépode et placées dans la nurserie du CCDTAM afin de recevoir une alimentation composée d'artémias.

Ce résultat apporte une indication forte qu'une alimentation constituée de nauplii de copépodes accélère le développement de *L. sebae* par rapport à un régime uniquement constitué de rotifères.

3.1.4 Conclusion

Ces 4 expériences ont apporté des résultats préliminaires intéressants et ont apporté la confirmation que les copépodes *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* constituent des proies vivantes facilitant la transition endo/exotrophique chez *Lutjanus sebae*. L'expérience 4 a démontré qu'une alimentation exclusivement composée de nauplii de copépodes pouvait amener les larves jusqu'au passage à la phase de nourrissage sur artémias, sans qu'il soit nécessaire de les nourrir avec des rotifères.

Il apparaît que les larves de *L. sebae* possèdent une bouche fonctionnelle dès 36-50 heures post-éclosion et commencent à se nourrir 48-72 heures après éclosion. Les larves semblent d'abord ingérer des œufs de copépodes avant de faire la transition vers un régime de nauplii. Ce comportement alimentaire est-il surtout lié à une forte présence d'œufs dans la colonne d'eau, ou bien à une spécialisation alimentaire chez les jeunes larves de *L. sebae* ? Les œufs de copépodes représentent en effet des proies nécessitant moins de dépense énergétique pour être capturées par rapport aux stades nauplii, et qui de plus, possèdent un important contenu nutritionnel si leur digestion est possible.

Au-delà de ces résultats préliminaires, ces expériences en petits volumes ont également permis de dégager des premières pistes de recherches ultérieures, mais surtout de se familiariser avec les méthodologies d'élevages larvaires spécifiques à *L. sebae*, et d'acquérir une première série de connaissances sur le développement ontogénique des larves.

3.2. Utilisation des copépodes dans les élevages larvaires CCDTAM (Novembre 2013 à Janvier 2014)

Durant la saison de production 2012-2013, le CCDTAM a appliqué pour *L. sebae* un protocole d'élevage larvaire basé sur une alimentation exclusive de rotifères. Cette méthode a permis de produire environ 500 post larves de *L. sebae* avec une survie globale de 0.18% sur les 30 premiers jours d'élevage larvaire. D'importants épisodes de mortalité (de l'ordre de 90-95%) étaient notamment observés à j5 et j6, correspondant à la résorption complète des réserves vitellines et le démarrage du nourrissage exotrophique. Suivant ce constat, le CCDTAM a formulé le souhait de tester le potentiel des copépodes dans les élevages larvaires de *L. sebae* dès la saison de ponte 2013-2014.

Cette section propose un rapide tour d'horizon de l'utilisation par le CCDTAM des espèces de copépodes candidates *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* dans le cadre des élevages larvaires de *L. sebae* durant la saison de production 2013-2014. Deux approches distinctes concernant l'approvisionnement de copépodes en élevage larvaire intensif ont été testées :

- Un apport de populations zooplanctoniques naturelles, incluant plusieurs espèces de copépodes, mais aussi d'autres membres du zooplancton (incluant des espèces parfois indésirables).
- Un apport de copépodes issus de cultures pures (maintenues dans la salle de culture « copépodes »).

3.2.1 Essais larvaires avec assemblages de zooplancton naturel

Une méthode consistant à fournir aux élevages larvaires de *L. sebae* des assemblages de zooplancton échantillonnés directement depuis le milieu naturel a été testée par le CCDTAM. Cette approche est considérée comme étant moins fiable qu'un apport de copépodes

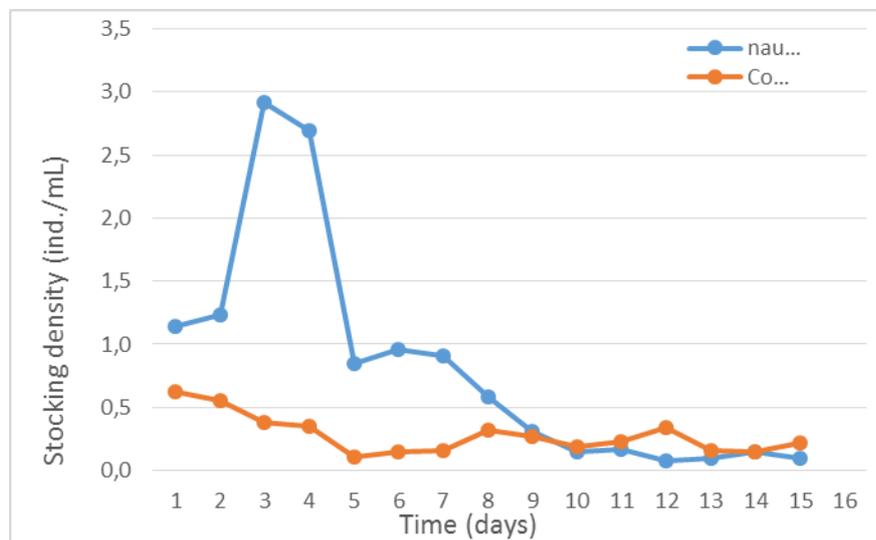
provenant d'une culture pure car elle ne permet pas de contrôler ni la composition des proies vivantes offertes aux larves (copépodes et autres), ni la présence éventuelle de parasites ou organismes pathogènes. Le zooplancton prélevé depuis le milieu naturel est filtré sur un tamis de 500µm avant d'être introduit dans les élevages larvaires, afin de s'affranchir d'une partie des organismes indésirables (type larves de méduses, larves de crabes, larves de balanes, etc...).

Durant les 14 premiers jours d'élevage larvaire, le candidat vérifiait quotidiennement la quantité et la composition des assemblages de copépodes. 4 à 6 espèces de copépodes étaient présentes, et une bonne concentration en nauplii d'espèces pélagiques (0.5 - 1.5 nauplii/ml) a été maintenue. Deux essais ont été conduits, tous les deux produisant une mortalité de 100%, l'une à j2 et l'autre à j8 :

Les essais du CCDTAM en élevage larvaire de *L. sebae* nourris à partir d'assemblages de zooplancton naturel

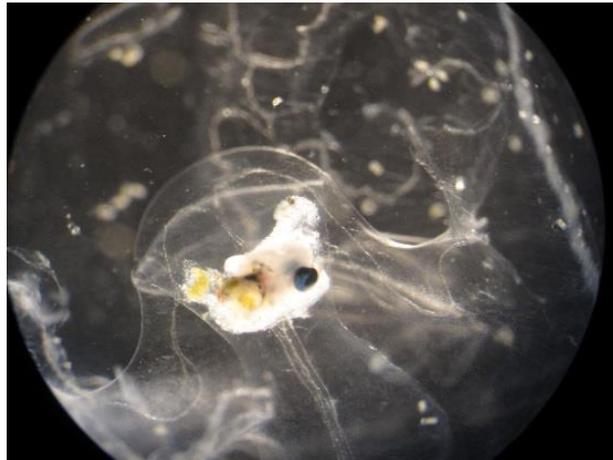
Elevage Larvaire #	Bassin (Volume)	Date de Démarrage (j0)	Espèce(s) de copépodes utilisée(s)	Larves à j0	Larves à j30	Survie globale (%)
1	L3 (9 m ³)	16/11/2013	zooplancton	79 000	0	0,00%
2	N2 (6 m ³)	15/11/2013	zooplancton	78 000	0	0,00%

A) Elevage # 1 (L3)



Evolution de la densité en nauplii et copépodites de j0 à j16 dans le bac larvaire L2. Les larves de *L. sebae* ont été introduites à j4.

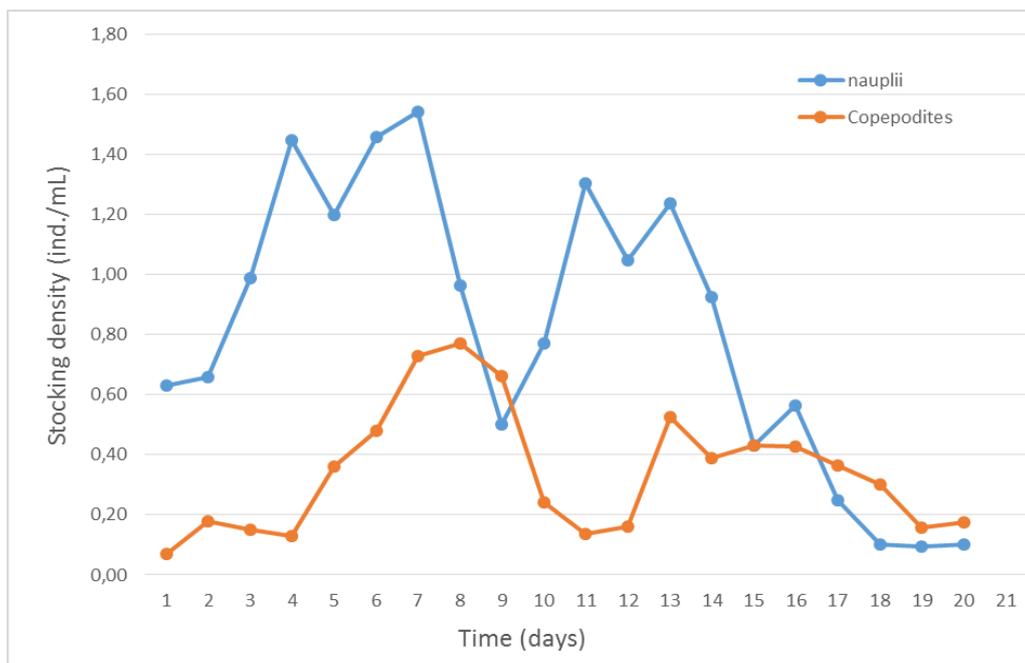
A partir de j9 post éclosion, de fortes concentrations de certains composants indésirables du zooplancton (vorticelles, chaetognathes, méduses) ont été observés :



Larves de *L. sebae* piégée par une méduse et en cours de digestion

Cet élevage larvaire est stoppé le 27/11/2013 à j11, après une mortalité larvaire totale.

B) Elevage # 2 (N2)



Evolution de la densité en nauplii et copépodites dans le bac larvaire N2. Les larves de *L. sebae* ont été introduites à j9.

Un important épisode de mortalité touchant approximativement 80% des larves a été constaté à j10, coïncidant avec le début des renouvellements d'eau. Un important bloom de vorticelles, présent sur la surface des copépodes et les rotifères a également été observé à partir de j9. Cet élevage larvaire est interrompu le 27/11/2013 (j11 post-éclosion) après 100% de mortalité larvaire constaté.

3.2.2 Les essais larvaires avec copépodes issus de cultures pures

Dans le cadre de ces essais larvaires, et contrairement à l'approche précédente, les copépodes provenaient exclusivement des cultures pures de *B. similis* et *P. crassirostris* maintenues à l'intérieur de la salle « copépodes » du CCDTAM. Cette méthode d'approvisionnement est fiable et permet de connaître précisément la composition et la quantité des espèces de copépodes introduites dans les élevages larvaires.

Quatre élevages larvaires ont été effectués avec cette méthode dans des volumes de culture de 5, 6 et 9 m³. Les trois premiers élevages larvaires ont été réalisés avec un protocole proposé par un consultant Indonésien en eau verte, le 4^{ème} essai a été réalisé en suivant les recommandations d'utilisation des copépodes préconisées par le consultant australien Glenn Schipp lors d'une consultance privée qui s'est déroulé au CCDTAM du 16 au 19 Décembre 2013.

Résumé des 4 essais larvaires effectués avec des copépodes issus de cultures pures maintenus dans la salle « copépodes » du CCDTAM

Elevage Larvaire #	Bassin (Volume)	Date de démarrage (j0)	Espèce(s) de copépode utilisé(s)	Larves à j0	Larves à j30	Survie (%)
1	L2 (6 m ³)	17/11/2013	<i>Parvocalanus crassirostris</i>	88 000	1600	1,82%
2	L1 (5 m ³)	17/11/2013	<i>Bestiolina similis</i>	64 000	210	0,33%
3	L3 (9 m ³)	29/11/2013	<i>P. crassirostris</i> + <i>B. similis</i>	180 000	746	0,41%
4	L2 (6 m ³)	18/12/2013	<i>P. crassirostris</i> + <i>B. similis</i>	27 000	2201	8,15%

Au cours de ces élevages larvaires, les tâches du post-doctorant étaient les suivantes :

- Maintenir les cultures intensives de copépodes pour permettre des réapprovisionnements fiables en copépodites et/ou nauplii dans les élevages larvaires.

- Effectuer un suivi quotidien des populations de copépodes dans les bacs larvaires de j0 à j12 (moment de la transition vers un régime artémias). Ce suivi permet de suivre l'évolution des densités de nauplii et de copépodites présents dans les cultures et de pouvoir décider si un ajout est nécessaire. La satiété et le comportement global des copépodes sont également observés au cours de ce comptage.

- Pour le 4^{ème} élevage larvaire (protocole « Schipp »), une vérification quotidienne de la concentration en microalgues dans les bacs d'élevage est également réalisée afin de maintenir des conditions de nourrissage optimales pour les copépodes.

Investigations des méthodes d'inoculation :

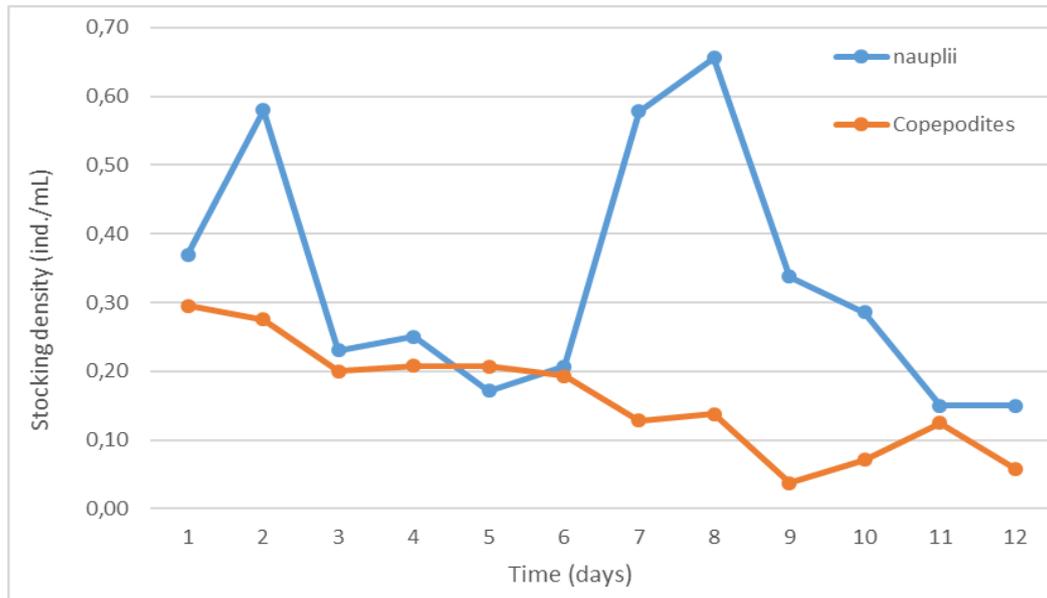
Plusieurs approches ont été envisagées concernant l'introduction des copépodes depuis leurs bacs de culture vers les bacs d'élevage larvaire : (1) Un transfert direct de volume à volume; (2) Le transfert de stades nauplii uniquement; (3) Le transfert de stades copépodites uniquement.

La méthode consistant à n'introduire que des copépodites a été retenue, car les copépodites sont moins fragiles que les nauplii et sont donc plus apte à tolérer un transfert vers un élevage larvaire. Lorsqu'elle est bien synchronisée (température, nourriture adéquate), cette méthode d'inoculation permet d'obtenir des "blooms" de nauplii significatifs coïncidant avec le premier nourrissage exotrophique des larves cultivées.

Les protocoles larvaires mis en place et les résultats obtenus ne seront pas détaillés dans le présent document. Seules les données concernant l'évolution des concentrations en copépodes (nauplii et copépodites) seront précisées dans chacun des élevages larvaires réalisés par le CCDTAM.

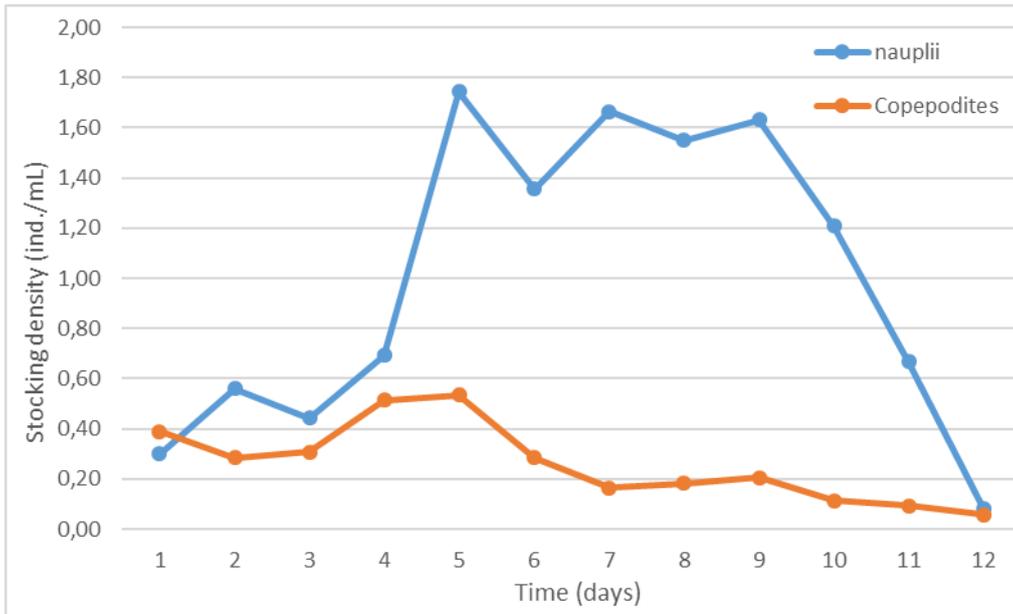
A) Larvaire #1 « Eau Verte » (L2)

La concentration en nauplii a varié entre 0.15 et 0.65 nauplii/ml de j0 à j12 et était de 0.25 nauplii/ml lors des premiers nourrissages à j3 :



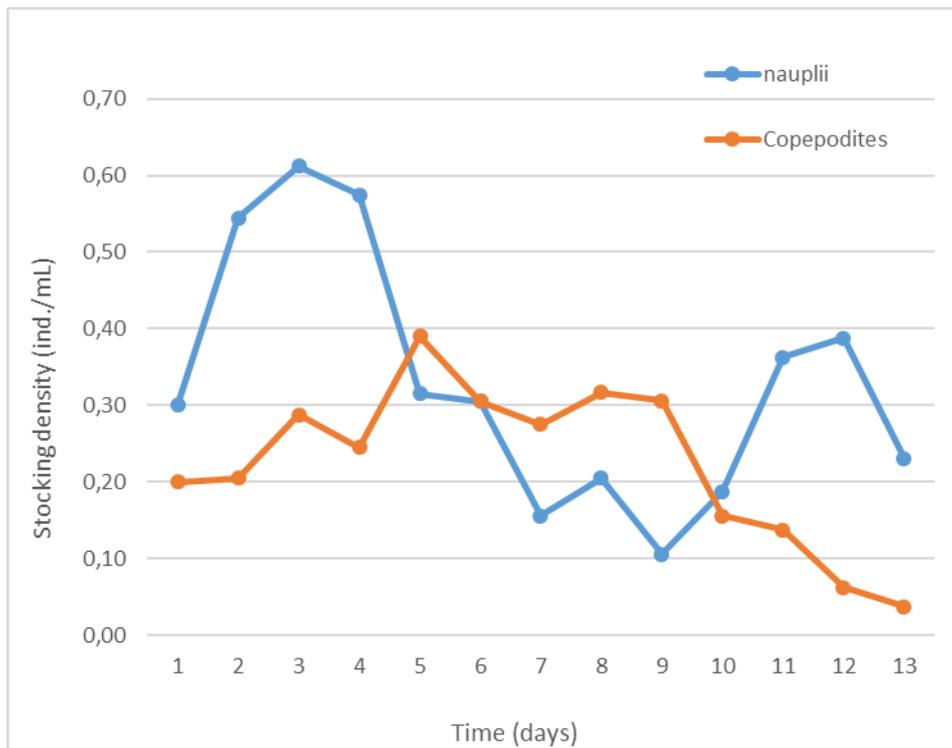
Evolution de la densité en nauplii et copépodites de *Parvocalanus crassirostris* de j2 à j13 dans le bac L2.

B) Larvaire #2 « Eau Verte » (L1)



Evolution de la densité en nauplii et copépodites de *Bestiolina similis* de j2 à j13 dans le bac L1

C) Larvaire #3 « Eau Verte » (L3)

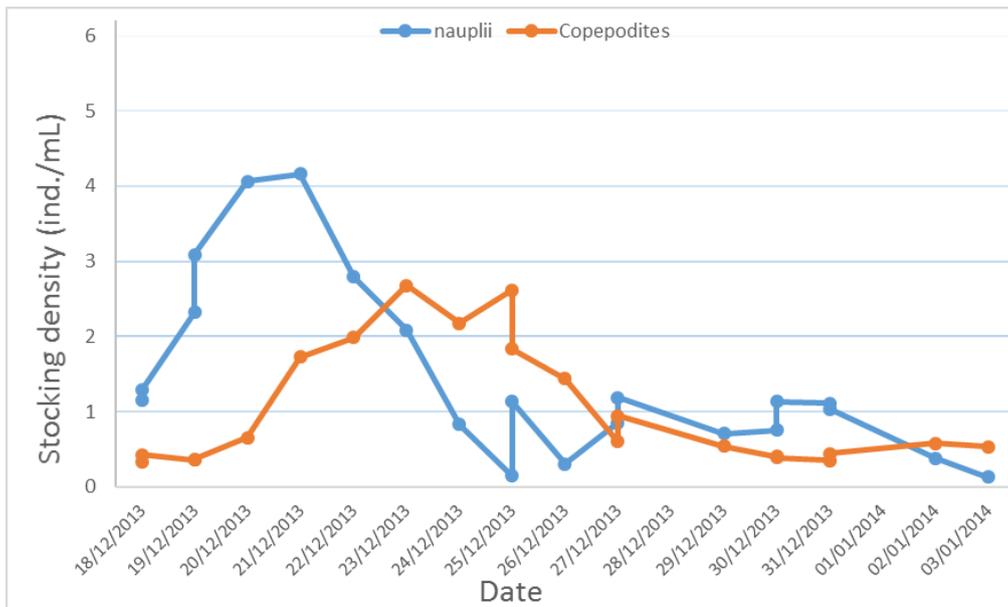


Evolution de la densité en nauplii et copépodites de *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* de j1 à j13 dans le bac L3

D) Larvaire #4 « Protocole Schipp » (L2)

Contrairement aux précédents, cet élevage larvaire a été réalisé en suivant les recommandations de Glenn Schipp afin d'optimiser l'utilisation des copépodes en tant que proies vivantes.

La survie globale des larves de *L. sebae* à j30 était de 8.15%. De fortes indications ont également été relevées concernant une accélération du développement des larves par rapport aux précédents élevages larvaires, notamment avec une métamorphose observée quelques jours plus tôt que pour les élevages n'ayant reçu que des rotifères.



Evolution de la densité en nauplii et copépodes de *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* de j0 à j16 dans le bac L2.



Larves de *L. sebae* à j24

3.2.3 Conclusion

Deux espèces de copépodes pélagiques ont été sélectionnées puis cultivées au CCDTAM dans le but d'être introduites dans les cycles larvaires de *L. sebae* lors de la saison de ponte 2013-2014. Quatre élevages larvaires intensifs ont ainsi été réalisés et des survies

significatives ont été obtenues. Ces résultats indiquent que les copépodes Paracalanides *P. crassirostris* et *B. similis* constituent des proies vivantes adaptées au nourrissage larvaire de *Lutjanus sebae* et que leur introduction à partir de j2 est nécessaire et suffisante pour obtenir des survies acceptables chez cette espèce. En revanche, l'approche consistant à fournir les élevages larvaires en copépodes par le biais d'apport de zooplancton sauvage a été abandonnée au vu de la mortalité totale observée lors des deux essais conduits.

Environ 500 post-larves ont été produites par le CCDTAM durant la saison de production 2012-2013 (sans utilisation de copépodes), contre 7500 en 2013-2014. L'introduction de copépodes dans les élevages larvaires a permis d'obtenir des survies 10 à 100 fois supérieures à j8 et 30 à 50 fois supérieures à j30 par rapport à un élevage sur rotifères seuls. Les larves nourries sur copépodes ont également un développement accéléré puisque leur sevrage peut être réalisé 4 à 5 jours plus tôt que pour des larves nourries sur rotifères. Enfin, un meilleur taux de « conformité post-métamorphose » des larves a été constaté comparativement à celui des individus nourris avec des proies vivantes traditionnelles.

Ces résultats confirment que les nauplii de ces deux espèces de copépodes sont d'excellents candidats à la substitution des rotifères au cours de la phase de nourrissage précoce et qu'ils apportent de multiples avantages aux larves de *L. sebae*. Une amélioration spectaculaire des résultats en première semaine a en effet été constatée. Les copépodes sont les proies naturelles des larves de lutjans et vivaneaux dans le milieu naturel et la petite taille des stades nauplii facilite leur ingestion par les larves à petite bouche. A l'évidence, leur composition biochimique convient mieux aux besoins nutritionnels des jeunes larves que celle des rotifères, même enrichis. Néanmoins, des points de blocage demeurent avec notamment d'importants épisodes de mortalités larvaires observés entre j8 et j10. Pour la suite, des efforts devront être fournis pour optimiser l'utilisation des nauplii de copépodes en élevage larvaire, notamment de leurs méthodes d'introduction.

3.3. Expérience avec *Dascyllus* sp. (Février 2014)

3.3.1 Introduction

L'Aquarium Des Lagons (ADL) de Nouméa a manifesté dès le début du projet EliCopTr un intérêt pour réaliser des tests d'élevages larvaires utilisant des copépodes afin de maîtriser la production d'espèces ornementales à forte valeur commerciale telles que *Dascyllus*. A la fin de la saison de production 2013-2014 du CCDTAM, des expériences sur l'élevage larvaire de *Dascyllus* sp. ont pu être organisées dans les infrastructures du CCDTAM, avec le concours de l'ADL. Ces expériences ont été réalisées sur la période du 11/02/2014 au 03/03/2014.

3.3.2 Description des expériences

Florent Keller, technicien chercheur et responsable de la gestion des stocks de géniteurs à l'ADL de Nouméa a fourni des œufs fertilisés et a participé à deux expériences durant le mois de Février 2014. Les œufs de *Dascyllus*, de type démersal et adhésifs, sont déposés sur des algues ou sur les parois des bacs d'élevage :



Œufs fertilisés de *Dascyllus* sp.

Les œufs ont été mis à incuber dans des containers de 3L situés dans la salle « copépodes ». Les larves étaient introduites 24h après éclosion (j1) dans des bacs cylindro-coniques de 40 l remplis avec 35 l d'eau de mer neuve. 3 régimes larvaires étaient testés: 1) Nauplii de copépodes (« COP »); 2) rotifère (« ROT »); 3) un mélange de nauplii et de rotifères (MIX). 4 réplicats ont été conduits par traitement.



Unité expérimentale pour manip *Dascyllus* sp.

A) Expérience # 1

Les larves ont été introduites dans les bacs expérimentaux à une densité de 7.6 larves/l. Les larves mesuraient en moyenne 2.41 ± 0.02 mm avec une bouche de 130- 140µm de large et 180 -

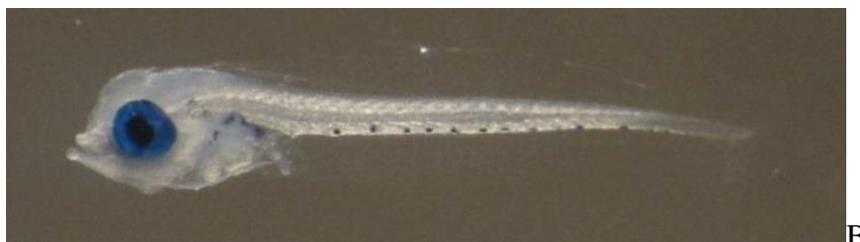
200µm de hauteur à j2. Les larves à j3 mesuraient en moyenne 2.23 ± 0.03 mm et l'ouverture buccale mesurait approximativement 140µm de large et 200µm de hauteur.

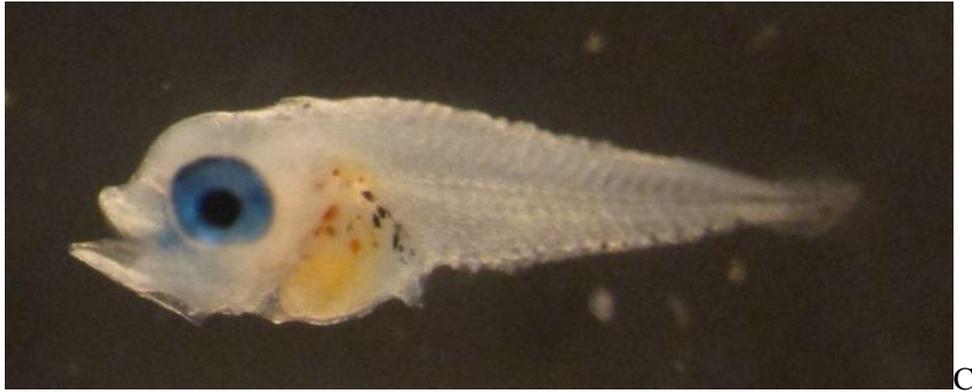
D'importantes pluies causées par la dépression tropicale Edna ont malheureusement provoqué une importante baisse de qualité d'eau et la présence de nombreuses particules a été constatée dans les volumes d'élevage. Une mortalité complète des larves à j3 a conduit à stopper l'expérience.

B) Expérience # 2

A j1, les larves ont été introduites dans les volumes d'élevage à une concentration de 10 larves/l. Les larves mesuraient 2.39 ± 0.01 mm en longueur totale, ne possédaient pas encore d'yeux pigmentés et seules quelques-unes avaient initié leur ouverture buccale. Au moment d'introduire les proies vivantes (j2), les larves mesuraient en moyenne 2.31 ± 0.01 mm et possédaient toutes une bouche formée et des yeux pigmentés. A j3 les larves mesuraient en moyenne 2.32 ± 0.01 mm. A partir de j4, il ne restait plus assez de larves dans les réplicats pour effectuer des mesures.

Cette expérience s'est mieux déroulée que la première mais a néanmoins dû être interrompue prématurément en lien avec une mortalité totale dans tous les traitements à j8. Cependant, il a été constaté que la survie des larves nourries avec des nauplii de copepodes était supérieure à celles ayant reçu un régime unique de rotifères. En effet, les larves du traitement ROT sont toutes mortes à j4 post éclosion, alors que les larves COP et MIX ont survécu jusqu'à j8. Ceci est une indication forte que : (a) les rotifères ne sont pas des proies vivantes adaptées au nourrissage précoce de cette espèce ornementale de petite taille; (b) les nauplii de copépodes Paracalanides permettent aux larves de passer le cap de la transition exotrophique et de survivre plusieurs jours après. Un développement morphologique satisfaisant des larves COP et MIX a également été observé :





Larve de *Dascyllus* à j1 (A) ; J3 (B) ; et j6 post éclosion (C).

3.4. Intersaison 2014 (Mars – Juillet 2014)

3.4.1 Expérience avec *Tisbe* sp. (Mars 2014)

Une série d'expériences à petite échelle a été menée sur le copépode Harpacticoïde *Tisbe* sp. dans le but d'estimer sa productivité en culture intensive. *Tisbe* sp. produit des œufs à l'intérieur d'un sac ovigère attaché à la partie ventrale des femelles. Le sac se détache ensuite lorsque les œufs sont prêts à éclore.



Femelle *Tisbe* sp. avec sac ovigère

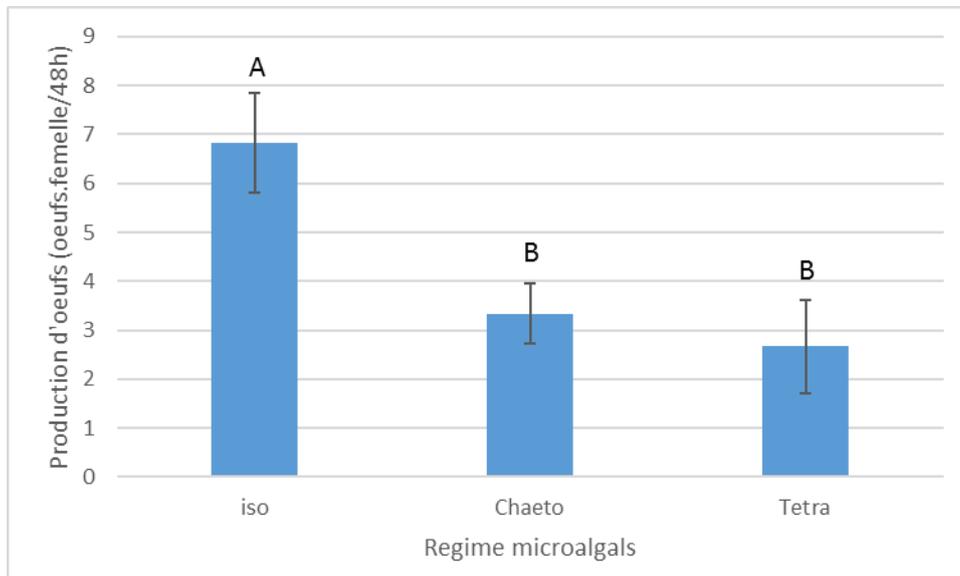
A) Choix de l'espèce d'algue

La première expérience a consisté à déterminer le régime microalgal optimal pour la culture de *Tisbe* sp.. L'influence de 3 régimes microalgaux (*T-iso*, *Chaetoceros muelleri* et *Tetraselmis chuii*) a été testée sur des adultes femelles *Tisbe* sp..

Un couple d'adultes sexuellement matures était introduit dans une boîte de Petri de 20ml contenant un des trois régimes microalgaux testés, à une densité de 1000 µg.C/ml (6 réplicats/traitement). Afin d'éviter le biais introduit par la différence de taille entre les algues utilisées, les concentrations en microalgues sont exprimées en microgramme de carbone. En effet, une cellule de *Tetraselmis* représente une biomasse beaucoup plus importante que celle

de *T-iso* et *Chaetoceros*. De sorte qu'une comparaison réalisée en termes de nombre de cellules par ml n'est pas représentative.

Après 48 heures d'incubation, le nombre d'œufs et de nauplii produits est compté :

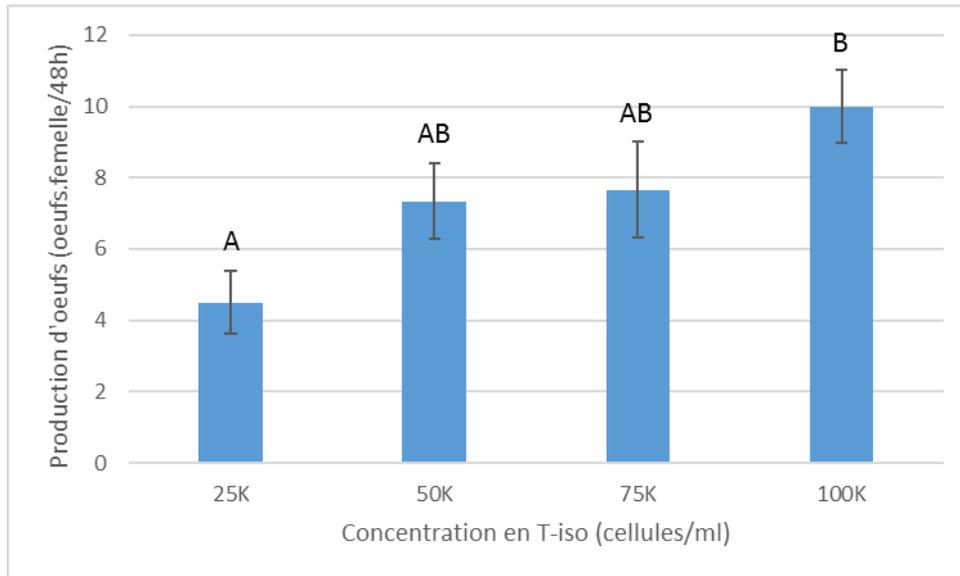


Production d'œufs de *Tisbe* sp. sur 48 heures en fonction de 3 régimes de microalgues

La quantité d'œufs produite par les copépodes nourris avec T-iso était significativement supérieure à celle produite par les autres régimes et T-iso a donc été sélectionnée pour alimenter et produire *Tisbe* sp..

B) Détermination de la ration algale optimale

Une seconde expérience a été menée pour déterminer la quantité optimale de microalgues à fournir à *Tisbe* sp. afin de maximiser sa production d'œufs. Les concentrations en T-iso testées étaient de (1) 25.000, (2) 50.000, (3) 75.000 et (4) 100.000 cellules/ml. Un couple d'adultes sexuellement matures était introduit dans une boîte de Petri de 20ml contenant une des concentrations d'algues testée (6 réplicats/traitement). Après 48 heures d'incubation, le nombre d'œufs et de nauplii produits a été compté :



Production d'œufs sur 48h en fonction de 4 rations de T-iso chez *Tisbe* sp.

Une analyse statistique n'a démontrée aucune différence significative entre les traitements 50K, 75K et 100K. En conséquence la concentration la plus faible (50K cellules/ml) a été adoptée pour produire *Tisbe* sp..

C) Essais sur le type de substrat

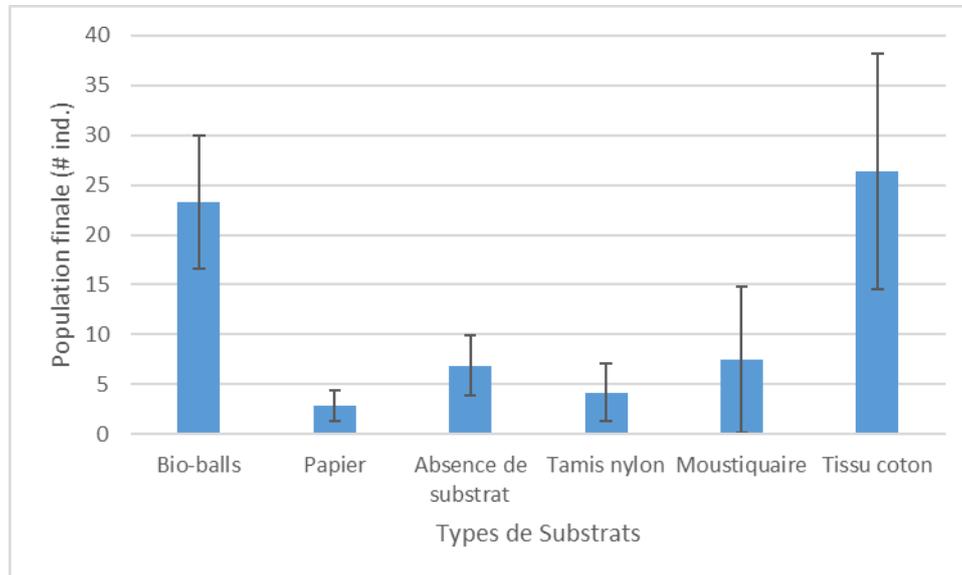
Dans une troisième expérience, la croissance de population de *Tisbe* sp. sur 45 jours a été mesurée en relation avec 6 différents types de substrat: (1) Tamis en nylon (950 μ m); (2) moustiquaire (1000 μ m); (3) papier; (4) tissu fibreux en coton; (5) des « bioballs »; (6) absence de substrat. Les boîtes de Petri étaient incubées dans le noir.



Différents traitements de l'expérience « substrat » pour *Tisbe* sp.

Un groupe de 6 femelles ovigères étaient introduites dans un puit de 20 ml rempli d'eau de mer propre et nourries avec 50.000 cellules/ml de T-iso (6 répliquats par traitement). Les répliquats étaient ensuite alimentés tous les 3 jours avec 50.000 cellules/ml de T-iso. Les

premiers nauplii ont été notés à partir du 7^{ème} jour d'incubation. Les premiers adultes issus de la génération F1 ont été observés à partir du 12^{ème} jour. L'expérience fut stoppée après 43 jours de culture et le nombre total de copépodites, nauplii et œufs présents dans chaque réplicats comptés.



Population finale de *Tisbe* sp. après 43 jours d'incubation en présence de différents types de substrats.

Il n'existe pas de différence significative entre les résultats ($p > 0.05$). Un substrat composé de bio-balls a donc été préféré car il possède une plus grande surface volumétrique dans les cultures de *Tisbe*.

D) Conclusion

Le fait que *Tisbe* sp. tolère 43 jours de culture au sein d'un même volume sans aucun changement d'eau témoigne de sa grande tolérance vis à vis des paramètres de qualité d'eau. Aqualagon n'ayant pas montré de réel intérêt pour ces expérimentations, la culture de cette espèce omnivore benthique a été stoppée en Juillet 2014 au CCDTAM.

3.4.2 Problème avec les cultures de copépodes et la solution de l'EDTA (Mars - Juillet 2014)

A) Introduction

A partir du mois de Mars 2014, la productivité des cultures intensives de copépodes a commencé à diminuer: Cette baisse se traduisait par une stagnation du nombre d'individus et notamment par une faible densité des jeunes stades copépodites dans les populations. Plusieurs changements d'eau et un important nettoyage de la salle de culture n'ont pas permis de résoudre ce problème. A partir du mois d'Avril, les populations ont commencé à décliner

invariablement sur plusieurs semaines, débouchant sur la perte d'environ la moitié des cultures, l'autre moitié possédait juste assez d'individus pour pouvoir se maintenir.

B) Premières hypothèses

Un problème de consanguinité a d'abord été envisagé comme étant à l'origine du problème. De multiples échantillonnages et de nouvelles isolations de *B. similis* et *P. crassirostris* ont eu lieu au cours du mois d'Avril et de Mai, afin d'apporter du « sang neuf » aux cultures. Aucun progrès n'a été constaté.

L'hypothèse d'un virus ou d'une contamination bactérienne a ensuite été envisagée. De nouvelles populations originaires de la baie de Foué ont été isolées en Juin 2014 et mis en cultures pures dans des bacs préalablement nettoyés au chlore et au savon bactéricide. La mise en culture de ces nouvelles populations a produit les mêmes résultats: des populations restant stables quelques jours avant de commencer à décroître pour disparaître complètement environ 10 à 15 jours après avoir lancé les cultures.

Plusieurs autres facteurs ont été étudiés comme source potentielle du problème:

Résumé des principales actions entreprises pour remédier à la perte des populations de copépodes dans les cultures intensives

Hypothèse pour expliquer la perte des cultures	Actions entreprises pour tester cette hypothèse	Conclusion
Problème génétique	Apport de nouveaux individus isolés depuis le milieu naturel pour enrichir la diversité génétique des populations	Aucune différence observée
Contamination virale ou bactérienne des cultures	Désinfection de la salle de culture et des bacs d'élevages + isolation et mise en culture de nouvelles populations à partir du milieu naturel	Aucune différence observée
Problème de qualité des microalgues ? ISO et/ou CHAETO	Nourrir les cultures durant 1 semaine avec une seule espèce de microalgue (CHAETO ou ISO)	Aucune différence observée
Problème de qualité d'eau (Ammoniac/nitrite/chlore /phosphate)	Suivi quotidien de ces paramètres de qualité d'eau pendant une semaine	Aucun problème détecté
Problème lié à l'utilisation de l' ozone pour stériliser l'eau de mer du CCDTAM	Eau de mer "brute" non traitée utilisée pour cultiver les copépodes	aucun changement

C) Résolution du problème : Utilisation de l'EDTA

Après avoir considéré puis écarté ces hypothèses, de nouvelles populations de *B. similis* et *P. crassirostris* ont été isolées depuis le milieu naturel et mises en culture dans la salle « copépodes ». Ces cultures ont été observées minutieusement et quotidiennement afin de tenter de remédier au problème. Ces nouvelles populations ont été établies à partir de copépodites C5 et d'adultes C6 isolés depuis le milieu naturel :

- **Jour 1** après inoculation, les présences d'œufs et de jeunes nauplii (N1 et N2) dans les cultures confirment que les adultes isolés sont capables de produire des nauplii (pas de problèmes de fertilisation, ni de production d'œufs viables ni d'éclosion).

- Au bout de **2 jours**, des œufs, des jeunes nauplii (N1 et N2) et des copépodites adultes (C6) sont observés dans les cultures. Tous les copépodites C5 introduits initialement se sont donc métamorphosés en adultes, mais le développement des nauplii semble en revanche être suspendu, ou au moins significativement ralenti.

- Après **3 jours**, les cultures ne contiennent que des œufs, des jeunes nauplii (N1 et N2) et des adultes (C6). Les adultes continuent donc de produire des œufs qui ont la capacité d'éclore, mais les nauplii issus de ces pontes semblent interrompre leur développement au stade N2, avant de mourir quelques jours après.

- Après **4 jours**, le constat reste inchangé par rapport au troisième jour.

- **5 jours** : Pas de changement; toujours des œufs, de nauplii N1 et N2 et des adultes présents dans les cultures.

- **6 à 14 jours** : Les adultes introduits initialement commencent à mourir, phénomène qui s'accompagne d'une baisse de la quantité d'œufs produite. La production d'œufs s'interrompt complètement avec la mort de la dernière femelle adulte. Les nauplii produits se développent jusqu'au stade N2 puis meurent au bout de quelques jours.

Ce blocage dans le développement des nauplii conduit donc à une perte totale des populations de copépode en moins de 2 semaines. L'hypothèse d'une déficience nutritionnelle est à exclure car ISO et CHAETO sont reconnues comme étant les espèces adaptées à la culture de *B. similis* et *P. crassirostris*. Une dernière hypothèse en lien avec la présence d'un composé toxique dans l'eau de mer, qui empêcherait la métamorphose des jeunes nauplii à partir du stade N2, est avancée après avoir pris connaissance des pratiques zootechniques en cours dans les écloséries de crevettes.

Afin de tester cette dernière hypothèse, de l'EDTA (acide Ethylène Diaminotétra Acétique) a été introduit dans des cultures récemment isolées. L'EDTA est un produit chimique utilisé pour détoxifier l'eau de mer en chélatant les minéraux et les métaux tels que le chrome, fer, plomb, mercure, cuivre, aluminium, nickel, zinc, calcium, cobalt, magnésium, etc... De l'EDTA a été ajouté dans les cultures à une concentration de 10ppm. 24 heures après, des nauplii au stade 3 (N3) étaient observés dans les cultures ! Un suivi des populations pendant les jours suivant a confirmé que les nauplii, dans une eau traitée avec de l'EDTA, étaient désormais capables d'effectuer toutes leurs métamorphoses jusqu'au stade C6.

L'EDTA a donc été inclus préventivement dans le protocole de culture afin de permettre aux populations de copépodes de résister à la toxicité « naturelle » de l'eau de mer liée aux fortes charges en métaux. Ces mesures ont été mises en place en Aout 2014 et ont conduit à une rapide augmentation des populations de copépodes. Néanmoins, il n'existe pas d'analyse de qualité des eaux environnant le CCDTAM, et nous n'avons donc aucun recul sur la nature des métaux et/ou minéraux dissous incriminés.

3.4.3 Atelier et Conférence en Corée (Juillet 2014)

Le 6^{ème} Atelier de pré-conférence et la 12^{ème} Conférence Internationale sur les Copépodes se sont tenus du 8 au 18 Juillet 2014, respectivement à Yeosu et Seoul. Un compte-rendu exhaustif de mission a été rendu au responsable d'opération Zoneco et est consultable sur demande.

Durant l'atelier de pré-conférence, le candidat a pu faire confirmer par les plus grands experts mondiaux l'identification des espèces de copépodes isolées au cours de l'opération EliCopTr, notamment des 3 espèces candidates, sus mentionnées.



12th International Conference on Copepoda - "Copepoda and the Global Environment"
July 14-18, 2014 at Hanyang University, Seoul, Korea

CHAPITRE 4

RESUME DES ACTIVITES ENTREPRISES DURANT LA SAISON DE PRODUCTION 2014-2015

4.1 Introduction

L'un des principaux objectifs de l'opération EliCopTr était la « réalisation de tests comparatifs sur l'influence d'une alimentation employant des nauplii de copépodes seuls et/ou en association avec des rotifères et/ou des rotifères seuls sur la survie et la croissance de larves de poissons (a minima d'espèces de l'aquarium des lagons) qui seront disponibles en fonction de la montée en puissance des projets en cours (Aqualagon et CCDTAM) ». En accord avec cet objectif, le candidat a démarré en Avril 2014 une série d'échanges avec Eric Gasset et Denis Covès (Ifremer, Palavas) afin de mettre au point un protocole expérimental de nourrissage comparatif lors des premières phases de nourrissage larvaire de *Lutjanus sebae*. L'influence de trois régimes alimentaires sur la survie et le développement de *L. sebae* ont été testés: (1) un régime copépodes (« COP ») constitué d'un mélange des deux espèces candidates *P. crassirostris* et *B. similis*; (2) un régime rotifère (« ROT ») constitué du rotifère « S » *Brachionus rotundiformis*; (3) un régime mixte (« MIX ») contenant une combinaison de copépodes et de rotifères.

En étroite concertation avec Eric Gasset, 2 types de volumes expérimentaux ont été mis au point pour réaliser ces expériences :

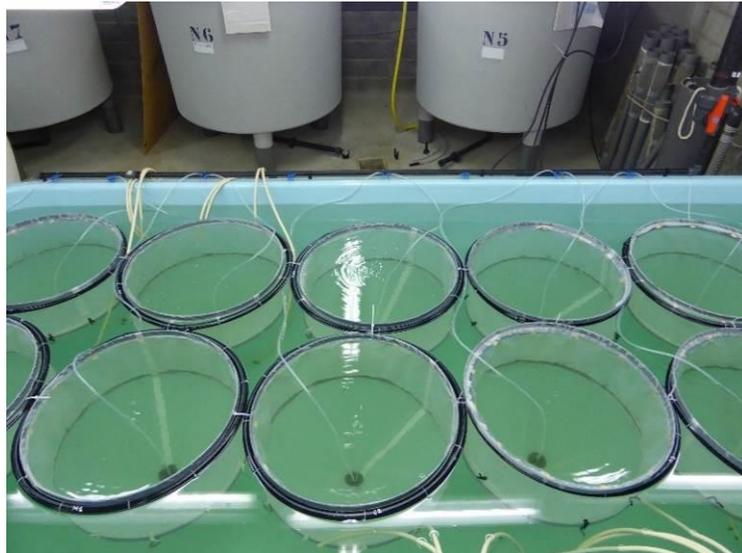
- Des volumes expérimentaux « Cages Flottantes », constitués de 20 cages flottantes cylindro-coniques d'une capacité de 120l (volume utile 100l) en tissus mono-filament polyester maille de 40µm. Ces cages ont été conçues puis commandées auprès de la société Aquarheak, le cahier des charges utilisé à cet effet est présenté en Annexe 1. Ces cages étaient ensuite mises en suspension dans un bac de 6m³ situés dans la salle de nurserie du CCDTAM.



A



B



C

Dispositif expérimental « Cages flottantes » installé dans un des deux bacs de la nurserie, mise à disposition par le CCDTAM durant le mois d'Octobre 2014.

- Des volumes expérimentaux « Bacs 200l » constitués de 9 bacs cylindro-coniques de 200l prêtés pour l'occasion par la station Ifremer du Centre Technique Aquacole de Boulouparis. Ces bacs ont ensuite été placés sur la dalle mise à disposition pour l'opération EliCopTr, située dans la salle « copéode » du CCDTAM. Les apports d'eau neuve étaient réalisés par le fond via des débit-litres. Une surverse précédée d'une crépine de 50 μ m était installée en haut des bacs.





A, B, C: Dispositif expérimental “bacs 200l”

Un total de 9 expériences furent réalisées à l’aide de ces volumes expérimentaux durant la saison de ponte 2014-2015 : 5 dans les cages flottantes et 4 dans les bacs de 200l.

4.2 Expériences “Cages flottantes”

Ces expériences ont été conduites en Octobre 2014, en fonction de la disponibilité des pontes des géniteurs des deux espèces maintenues au CCDTAM. En raison d’une non-disponibilité d’œufs de *L. sebae*, deux expériences (3 et 4) ont été conduites avec des larves de *Cromileptes altivelis* :

Résumé des 5 expériences conduites en cages flottantes. Un total de 10 enceintes d’élevages ont été mises en place dans chacune de ces expériences: 3 traitements avec 3 réplicats par traitements, plus un contrôle :

Exp. #	Larves	Date de Démarrage	Durée (jours)	Densité d'inoculation	Survie finale	Facteurs observés
1	<i>L. sebae</i>	06/10/2015	7	10 larves/l	COP: 1,8% MIX: 5,8% ROT: 5,6%	-survie et taille totale à j7
2	<i>L. sebae</i>	13/10/2015	7	3,5 larves/l	COP: 1,05% MIX: 2,29% ROT: 0,48%	-survie et taille totale à j7 -développement système digestif à j7
3	<i>C. altivelis</i>	22/10/2015	3	12 larves/l	0%	x
4	<i>C. altivelis</i>	24/10/2015	4	3 larves/l	0%	x
5	<i>L. sebae</i>	27/10/2015	5	14 larves/l	0%	x

En raison des résultats non significatifs obtenus lors des expériences 3,4 et 5, cette section se concentrera sur le détail des résultats des expériences 1 et 2.

4.2.1 Expérience 1

Les méthodes utilisées pour la réalisation des expériences 1 à 5 ne varient pas significativement les unes par rapport aux autres. Seul le Matériel et Méthode de l'expérience 1 est détaillé ci-dessous à titre d'exemple pour l'ensemble des expériences menées en cages flottantes.

A) Matériels et Méthodes

Origine des larves

Les œufs sont issus de pontes naturelles non induites à partir d'un lot de géniteurs sauvages de *Lutjanus sebae* présent sur le site du CCDTAM depuis 2013 et qui entre dans sa 2^{ème} saison de ponte. La ponte utilisée est issue du bassin de géniteur G1, datant de la nuit de Samedi 4 au Dimanche 5 Octobre 2014. Le nombre d'œufs récoltés était de 200.000 œufs fécondés. Le taux d'éclosion des œufs fertilisés était d'environ 50%.

Incubation

L'incubation des œufs fécondés a été réalisée dans un bac de 500L installé dans la salle géniteurs et équipé d'un thermoplongeur (25.5°C) et aéré à un taux de 140ml/min. La salinité était de 35.9 ppt. Deux changements d'eau partiels (50% du volume total) ont été effectués 24 et 36h après incubation. La densité en larves dans le bac d'incubation a été déterminée en effectuant 30 échantillons de 70ml dans lesquels les larves vivantes ont été comptées. Une densité de 0.14 larves /ml dans le bac d'incubation a été déterminée. A j2, les larves ont ensuite été distribuées volumétriquement entre les 10 volumes d'élevages pour obtenir une concentration de 10 larves/l (1000 larves/cage).

Dispositif expérimental

Il est constitué d'un bassin de nurserie de 6m³ (outil de production en place au CCDTAM) dans lequel viennent prendre place 10 cages cylindro-coniques fabriquées en toile à bluter d'une porosité de 41 µm d'un volume de 120 litres (V utile = 100L, D = 60cm, H = 60cm). Chaque cage est alimentée par une pompe péristaltique qui puise l'eau dans le bassin de nurserie et la libère par le fond dans les cages (70% /j, soit 3%/h). Chaque cage a également une aération centrale. Le débit d'air ajusté à 60 ml/mn doit permettre une répartition des proies et des larves la plus homogène possible dans les cages. L'éclairage est réalisé à partir de tubes de néons fluorescents situés environ à 180 cm au-dessus de la surface de l'eau (500 ±40 lux).

L'installation a été mise en eau 2 jours avant l'introduction des larves et renouvelée par le fond à raison d'un renouvellement de 10 % du volume /jour.

Paramètres	Expérimentation cages 100 l
Eclairage	24h illumination
Volume d'élevage	10 Cages flottantes cylindro-coniques de 100 litres utiles dans bassin de nurserie 6 m ³
Nombre d'œufs / litre	10
Type bullage	Tuyau Crystal (assez grosses bulles)
Débit d'aération (ml/min)	60
R. quotidien en eau (%)	10
Crépines	Mailles cage de 41 µm
Température (°C)	27.5 ± 0.5°C

Plan expérimental

Cages	Type de proies	Concentrations moyenne en proies vivantes obtenues
C1, C2, C3	Nauplii de Copépodes Calanoïdes (Paracalanidae)	0.8/ml

M1, M2, M3	Nauplii de Copépodes Calanoïdes (Paracalanidae) + Rotifères type « S »	0.1/ml + 4/ml
R1, R2, R3	Rotifères type « S »	8/ml

Paramètres environnementaux

La température : $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, maintenue par un thermoplongeur (2000W) régulé via un automate et une sonde.

Salinité : 37ppt

Arrivée et gestion du débit d'eau : L'eau de mer d'entrée est filtrée mécaniquement (10, 5 et 1 μm), traitée à l'ozone et aux U.V. Il n'y a pas de recyclage. Le bac de nurserie de 6 m³ dans lequel flottent les cages est renouvelé à raison de 10% par jour par une arrivée située à l'opposé de l'évacuation. Chaque cage est, quant à elle, renouvelée à raison de 70%/j par le fond, grâce à une pompe péristaltique qui puise l'eau directement dans le bac de 6 m³.

Aération : Elle est assurée par un tuyau Crystal lesté, placé au centre du cône de la cage. Seule la pointe du tuyau est positionnée dans l'évacuation centrale, le lest est posé sur le fond du bassin (reproductibilité de l'hydrodynamisme).

Débit d'air : Le débit est maintenu à 60 ml/mn dans chaque cage.

Ecrémeur de surface : Les cages ne sont pas équipées d'un système individuel de nettoyage de la surface.

Intensité lumineuse : L'intensité est de 480-500 lux à la surface des cages sur l'ensemble de l'élevage. Ces intensités sont mesurées et réglées avant la mise en élevage, et mises en route à la première alimentation. L'éclairage de la salle de nurserie est disposé au mieux afin d'obtenir des valeurs d'intensités les plus homogènes possible d'une cage à l'autre.

Photopériode : La photopériode est continue, 24H de jour durant toute la durée de l'expérience. Dans le but de stimuler la prise alimentaire des larves qui ne se nourrissent pas dans l'obscurité.

Contrôle des conditions environnementales

La fréquence et la méthode de contrôle sont résumées dans le tableau ci-dessous pour l'ensemble des paramètres suivis :

Paramètres	Fréquence de mesure	Appareils de mesure	Valeurs fixées
Température ($^\circ\text{C}$)	1 fois/jour	$27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$,	$27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Salinité (‰)	1 fois/jour	Refractomètre	36‰ (± 1)
Oxygène dissous (%)	1 fois/jour	Sonde Oxyguard	> 80% sat.
Potentiel redox (mv)	1 fois/jour	Sonde Oxyguard	~180 mv
pH	1 fois/semaine	Sonde Oxyguard	< 0.2mg/l

Alimentation

La concentration en proies vivantes est mesurée une fois par jour, le matin, et est ensuite réajustée aux valeurs souhaitées. Un prélèvement de 100ml est réalisé dans chaque cage contenant les traitements 'R' et 'M'. Un prélèvement de 200ml est réalisé dans chaque cage contenant le traitement 'C', en raison de la plus grande hétérogénéité de distribution des copépodes par rapport aux rotifères. Les échantillons de proies vivantes sont ensuite fixés (formaldéhyde) puis comptés sous une loupe binoculaire.

Gestion de l'apport de microalgues :

Afin de permettre la production de nauplii et l'enrichissement des rotifères dans les cages d'élevage larvaire, trois apports de *Isochrysis galbana* (ISO) sont réalisés quotidiennement, de façon à maintenir des concentrations en microalgues de l'ordre de 30.000C/ml.

Note : L'apport de *Chaetoceros muelleri* a été abandonné après avoir constaté que cette espèce de microalgue colmatait rapidement la maille de 41 μm des cages.

La gestion des Copépodes :

En fonction des besoins, ont été rajouté quotidiennement dans les élevages larvaires : (a) uniquement des copepodites ; (b) uniquement des nauplii. Les stades Copepodites et Nauplii sont issus des cultures CS et CP maintenues dans la Salle Copépodes du CCDTAM.

La gestion des Rotifères :

A J+2PH, la quantité totale introduite était de 2.400.000 rotifères. Soit 400.000 x 3 (traitements MIX) + 800.000 x 3 (traitements ROT). Chaque jour, environ 1.500.000 rotifères étaient repartis entre les réplicats MIX et ROT pour maintenir les concentrations souhaitées de 4 rot/ml dans les traitements MIX et 8 rot/ml dans les traitements ROT. La présence dans les traitements ROT et MIX d'une importante proportion de femelles ovigères indique que les conditions de cultures expérimentales convenaient aux rotifères.

Brachionus rotundiformis (souche 'S') est produit en semi-continu dans des bacs cylindro-conique de 400L dans une salle dédiée à sa culture au CCDTAM (25°C, 25ppt, 8L:16D). Les rotifères sont nourris sur Rotigrow+ ® en continu via une pompe péristaltique. Le Rotigrow + est stocké dans un frigo (4°C).

Entretien

La taille de maille des cages est de 41 µm et permet la circulation des cellules de microalgues mais retient les proies vivantes. Les cages sont restées propres au cours de la manip alors que des dépôts d'algues mortes commençaient à apparaître autour de j5.

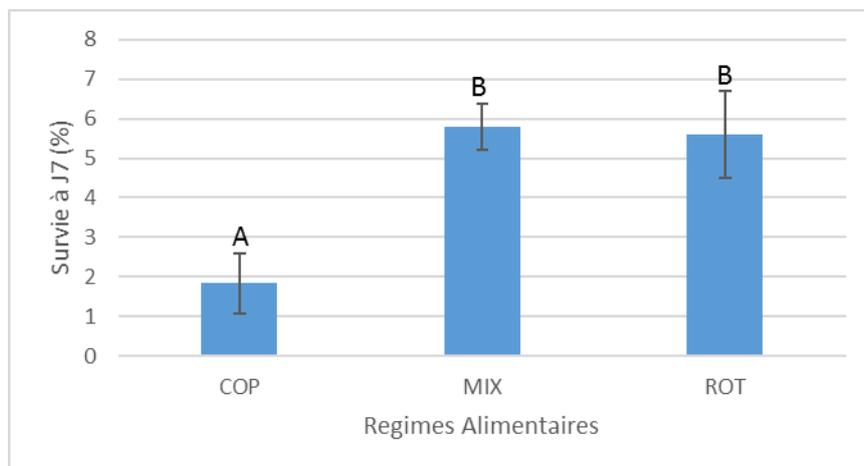
B) Résultats

Répartition spatiale et comportement des larves

Les larves ont définitivement adopté très tôt un comportement de parois : A partir de j3, 75% des larves dans les cages étaient observées le long des parois verticales des cages, la tête en général orientée vers la maille. Les autres larves étaient observées en pleine eau. Des comportements de prédation (forme en « s » avant de bondir en avant) ont clairement été observés à partir de j3. A J+5PH environ la moitié des larves restantes se trouvaient le long de la maille et l'autre moitié dans la colonne d'eau, majoritairement à mi-hauteur d'eau. Quand il restait encore un certain nombre de larves (j2 à j5), elles étaient majoritairement observées en répartition de type « essaim » avec quelques autres larves solitaires reparties dans la cage.

Survie

La survie des larves élevées sur un régime de copépodes pures était significativement réduite par rapport aux traitements MIX et ROT.

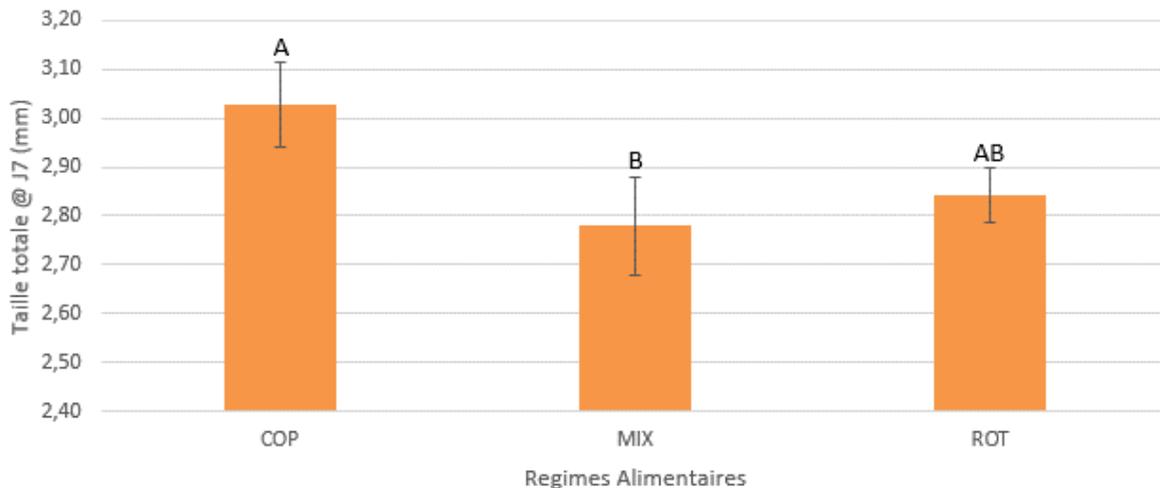


Survie larvaire de *L. sebae* de j2 à j7 post-éclosion. Les lettre indiquent les différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$)

En raison d'un démarrage précoce (plusieurs semaines avant la date initialement prévue) les stocks de copépodes n'étaient pas correctement synchronisés pour le démarrage d'une manip et le niveau en nauplii n'a jamais pu être aussi important que souhaité. Il était en moyenne de 0.8 nauplii/ml à j4 dans les réplicats COP et n'était que de 0.1n/ml dans les réplicats MIX. Ces faibles densités en copépodes expliquent probablement les faibles survies observées.

Taille totale

A j7 post-éclosion, la longueur totale des larves COP était significativement plus importante par rapport à celles du traitement MIX.



Taille totale des larves de *L. sebae* à j7 post-éclosion. Les lettres indiquent les différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$)

C) Discussion

Cette première manip a permis de se familiariser avec la structure expérimentale des cages flottantes et de mise au point zootechnique concernant l'apport et le suivi des populations de proies vivantes. Les faibles densités en copépodes observées dans les réplicats COP et MIX expliquent probablement les mortalités importantes observées dans ces traitements. Le faible taux d'éclosion peut également indiquer que la qualité des larves n'était pas optimale. Enfin, la possibilité que les volumes expérimentaux ne conviennent pas aux larves de *L. sebae* ne peut pas être exclue.

4.2.2 Expérience 2

A) Modification du Matériel et Méthodes par rapport à l'expérience #1

Après analyses des paramètres ayant conduit à un résultat moyen lors de l'Expérience #1, une série de changements a été mis en place pour l'expérience #2 dans le but d'améliorer les résultats.

- Œufs incubés dans éclosoir 500l dans la nurserie ($T = 28 \pm 0.5^\circ\text{C}$).
- Température de l'expérience à 28°C au lieu de 29°C .

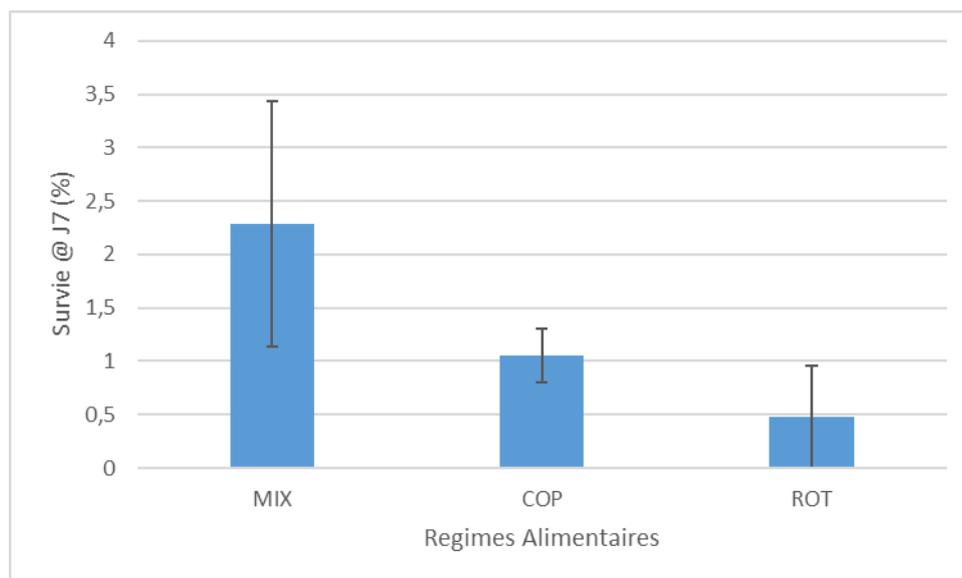
- *Pompage air en circuit fermé afin que le bullage soit similaire de jour en jour.*
- *Stopper le renouvellement d'eau afin de pouvoir mettre de l'EDTA dans les volumes d'élevage à 5ppm.*
- *Nourrir les cages 3x par jours en microalgues, uniquement T-iso*
- *Introduction des PV à j2 (avant celle des larves)*
- *Amélioration de la synchronisation des pics de nauplii de copépodes.*

La ponte utilisée pour cette seconde expérience était issue du bassin de géniteurs G1 et comprenait 60.000 œufs, dont 50.000 morts. Après éclosion, les cages expérimentales n'ont pu être inoculées qu'à une concentration de 3.5 larves/l. Cette faible densité d'inoculation était souhaitée dans le but de se prémunir d'une limitation en proies vivantes pour les larves.

B) Résultats

Survie à j7

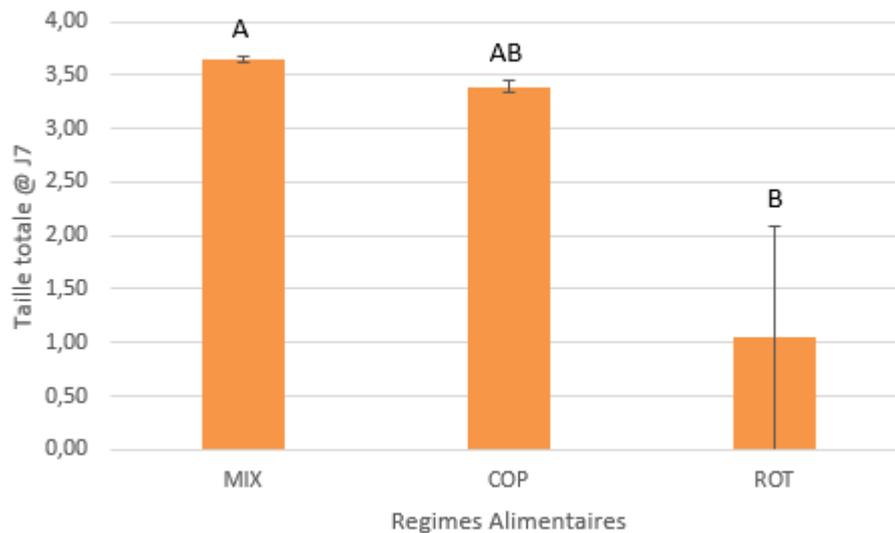
Les survies moyenne étaient relativement faibles, et moins importantes que lors de la première expérience. Pas de différence statistique entre les traitements ($p > 0.05$) :



Survie finale de *L. sebae* à j7 post-éclosion

Taille Totale à j7

Les régimes COP et MIX ont produit les meilleures croissances de *L. sebae* avec des longueurs moyennes de larves à j7 trois fois plus importantes que dans le cas de larves élevées sur un régime ROT.



Longueur totale de *L. sebae* à j7 post éclosion en fonction des différents régimes alimentaires. Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$)

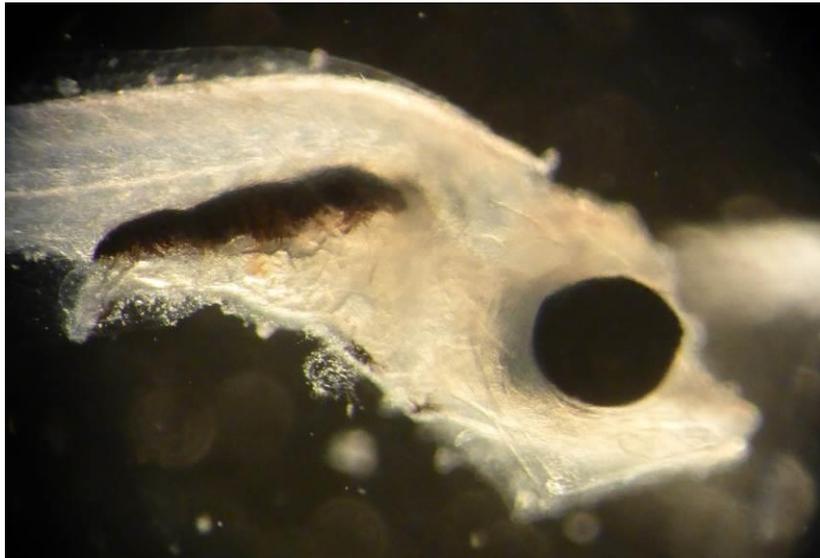
Comparaison des systèmes digestifs à j7 : Critère de développement.

L'observation à la loupe binoculaire du système digestif de *L. sebae* à j7 a démontré d'importantes différences de développement en fonction de leur régime alimentaire larvaire. Les larves dont le régime comprend des nauplii de copépodes possèdent un système digestif bien plus avancé à j7 comparé à des larves nourries uniquement sur rotifères.



Larve à j2, l'ouverture buccale vient de se finaliser et le système digestif n'a pas encore commencé de se développer sous l'action d'un nourrissage exotrophique.





Larve de *L. sebae* à j7 nourries avec un régime MIX (A), et COP (B). Le développement et la pigmentation de l'estomac et du système digestif en général est à un stade de développement bien plus avancé par rapport a des larves nourries sur rotifères.



Larve de *L. sebae* à j7 élevée sur rotifères uniquement. Comparé aux Figures précédentes, le système digestif est faiblement développé et peu pigmenté.

C) Discussion

Les taux de survies obtenus dans cette manip n'étaient pas meilleurs que ceux de la manip #1, et ce malgré de plus fortes concentrations en nauplii de copépodes.

On note toutefois une croissance plus forte dans les traitements COP et MIX par rapport au traitement ROT. Ce développement accéléré chez les larves se nourrissant avec des nauplii de copépodes se traduit également par une maturation plus précoce du système digestif.

4.2.3 Expériences 3 et 4

A) Modifications par rapport à la manip #2

- Pontes de loche truite *C. altivelis* car pas de ponte de *L. sebae* disponibles.
- Inoculé à 12 larves par litres (manip #3) et 3 larves par litre, comportant une quantité importante de détritrus type « coquilles d'œufs » (manip #4)
- Ajout EDTA @ 10ppm

B) Résultats

Manip 3 : Stoppée à j3 après une mortalité totale des larves en dépit de concentrations satisfaisantes en proies vivantes (5-6 nauplii/ml à j3 pour les COP ; 3-4 nauplii/ml à j3 pour les MIX ; 10 rotifères/ml pour les ROT).

Manip 4 : Mortalité quasi totale des larves à j3. Manip stoppée à j4 en dépit de concentrations satisfaisantes en proies vivantes (3 nauplii/ml à j3 pour les COP ; 2 nauplii/ml à j3 pour les MIX ; 10 rotifères/ml pour les ROT).

Aucune donnée de survie ou de croissance n'ont pu être tirées des expériences 3 et 4.

C) Discussion

C. altivelis semble moins bien supporter les conditions d'élevage expérimental en cages flottantes par rapport à *L. sebae*. Au cours de ces deux expériences, 100% des larves mises en incubation sont mortes avant le premier nourrissage.

4.2.4 Expérience 5

A) Changements par rapport aux manips précédentes

- Ponte de 40.000 *L. sebae* à incuber ($T=27^{\circ}C$)
- Larves introduites à une concentration de 11 larves /l
- Rotifères introduits à j1

B) Résultats

Expérience stoppée à j5 après mortalité totale des larves. Aucune donnée de survie et de croissance récoltées.

C) Discussion

Une importante mortalité a été observée dans l'ensemble des cages, à partir de j2 jusqu'à j5 et l'arrêt de l'expérience. Il est important de noter que cet important épisode de mortalité n'a pas été constaté dans l'écloqueur mitoyen qui servait de contrôle négatif, remplis avec la même source d'eau de mer que pour les cages flottantes et au sein duquel se trouvaient des centaines de larves issues de la même ponte que celles utilisées pour cette expérience. Une hypothèse pour expliquer ce décalage serait un problème de qualité d'eau qui toucherait les larves cultivées en cages flottantes mais n'affecterait pas les larves situées dans l'écloqueur. On peut en effet supposer que les cages flottantes, en raison de trop faibles taux d'échanges d'eau et en étant alimentées quotidiennement en microalgues, favorisent l'apparition de blooms bactériens. Le volume plus important de l'écloqueur (500l) et le fait qu'il ne soit pas alimenté en microalgues ou proies vivantes expliqueraient que ces blooms n'y ont pas été observés.

Beaucoup de larves mortes ont été retrouvées « collées » en surface, suggérant que l'utilisation d'huile, minimisant la pression partielle, durant les premiers jours d'élevage larvaire pourrait réduire cette mortalité.

Enfin, l'examen à la loupe binoculaire des contenus stomacaux démontre qu'une majorité des estomacs sont vides, ou quasiment vides à j5. La prise alimentaire des larves n'est donc pas optimale, malgré des concentrations de proies vivantes satisfaisantes (2.5 - 4 nauplii/ml à partir de j2 pour les traitements COP). Ces contenus stomacaux quasiment vides malgré des densités de proies vivantes relativement importantes laissent à penser que les larves ne parviennent pas à se nourrir efficacement au sein des structures expérimentales. Cette prise alimentaire suboptimale peut être liée à des conditions hydrodynamiques non favorables dans les cages (échange d'eau, turbulences). Un autre facteur pourrait être la couleur blanche des cages, qui empêcherait les larves de repérer visuellement leurs proies, par manque de contraste avec leur environnement.

4.2.5 Conclusion générale concernant les expériences en cages flottantes :

- Au vu des faibles survies observées lors de ces 5 manip, et réalisées avec des larves de deux espèces, il semblerait que ces cages flottantes de 100l ne constituent pas un outil approprié pour réaliser des expériences de nourrissage comparatif avec des larves de poissons, en tout cas pour *L. sebae* et *C. altivelis*.
- Ce dispositif expérimental, bien qu'innovant, ne permet pas des échanges d'eau assez importants pour maintenir une qualité d'eau optimale dans les volumes d'élevages. En conséquence, d'importants épisodes de mortalité ont été observés avant même la mise en place des premiers nourrissages.
- Les faibles taux de réplétion stomacale observés lors de l'arrêt des expériences semblent également indiquer que les larves ont des difficultés à ingérer les nauplii de copépodes, et ce malgré d'importantes densités de proies disponibles dans la colonne d'eau.
- Il est primordial de parfaitement gérer la quantité de copépodes introduite, et ce avec le bon timing, afin de synchroniser le bloom de nauplii avec le démarrage du nourrissage exotrophique des larves. Si

cette synchronisation n'est pas atteinte au démarrage de la manip, il est ensuite assez difficile d'obtenir les valeurs cibles via des ajouts quotidiens. De plus, ces ajouts quotidiens doivent être réduits au minimum car ils monopolisent beaucoup de temps (comptages etc..) et participent au stress des larves. Note : Les leçons de cet enseignement ont été appliquées avec succès pour les manips 2 à 5 puisque le candidat a obtenu des concentrations en nauplii supérieures à 4/ml.

- Il a été mis au point un protocole opérationnel de routine pour relever les paramètres de qualité d'eau ainsi que pour effectuer l'estimation de concentrations en proies vivantes et en microalgues. La méthode pour déterminer les concentrations en microalgues et en proies vivantes dans les réplicats a été optimisée.
- Il est impératif d'optimiser au maximum les interventions sur les réplicats. Les paramètres de qualité d'eau sont enregistrés le plus délicatement possible. Les ajouts en proies vivantes et en algues se font le plus délicatement possible.
- Les protocoles d'incubation de ponte, de détermination du taux d'éclosion et d'introduction des larves dans les volumes d'élevages ont été optimisés

4.3 Expériences "200l renouvellement"

Présentation des 4 expériences conduites en volumes de 200l avec renouvellement d'eau. 9 enceintes d'élevages étaient utilisées pour chacune de ces expériences: 3 traitements avec 3 réplicats par traitements :

Exp. #	Larves	Date de Démarrage	Durée (jours)	Densité d'inoculation	Survie finale	Facteurs observés
1	<i>L. sebae</i>	20/11/2015	10	10 larves/l	COP: 2,7% MIX: 5,0% ROT: 0,8%	Taille totale et survie à j10 Résorption globule lipidique Réplétion stomacale Largeur ouverture bouche Inflation vessie natatoire Calculs urinaires Torsion notochorde Malformations
2	<i>L. sebae</i>	05/12/2015	10	20 larves/l	COP: 0,4% MIX: 1,3% ROT: 0,1%	
3	<i>L. sebae</i>	16/12/2015	10	15 larves/l	COP: 5,7% MIX: 5,3% ROT: 0,1%	
4	<i>Dascyllus</i> sp.	14/01/2015	10	12 larves/l	COP: 1,3% MIX: 2,9% ROT: 0,01%	

4.3.1 Expérience 1 : *L. sebae*

A) Matériel et Méthodes

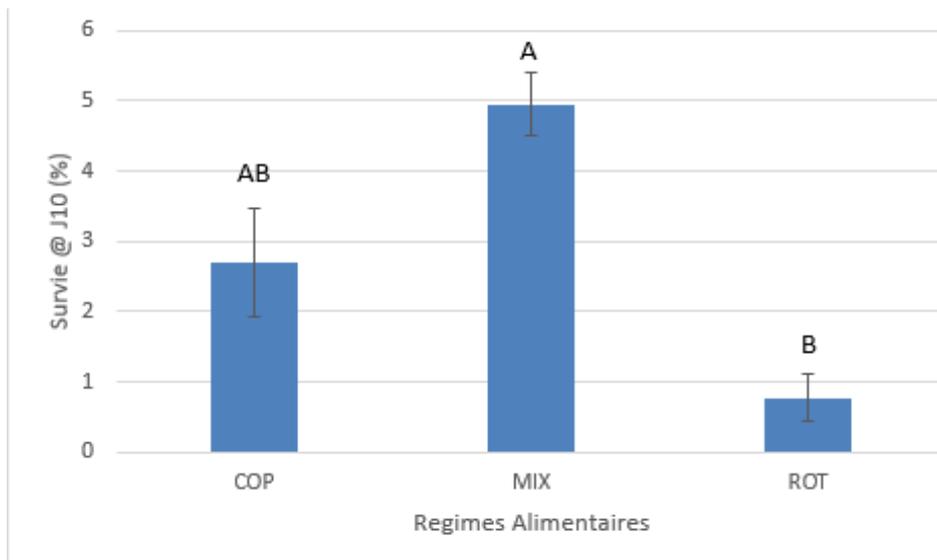
Cette expérience a été effectuée au cours de la mission d'Eric Gasset en Nouvelle Calédonie, qui a eu lieu à partir du 20 Novembre 2014 pour une durée de 12 jours. Une présentation détaillée de la méthodologie mise en place pour réaliser les expériences en bacs de 200l est détaillée en

Annexe 2. Ce protocole a été conçu avec la participation d'Éric Gasset et de Denis Covès et a nécessité de nombreux échanges préalables en cours d'année.

B) Résultats et Discussion

Survie à j10

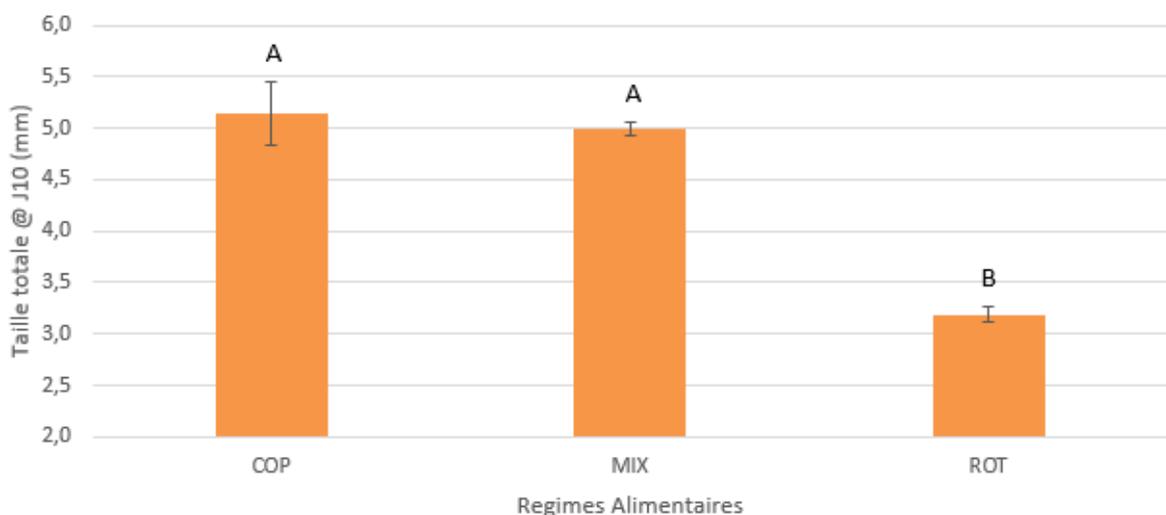
Le taux de survie des larves élevées sur un régime MIX est environ 5 fois plus important que les survies observées sur un régime ROT. Le traitement COP a produit des survies intermédiaires :



Survie de *L. sebae* à j10 post éclosion en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p = 0,005$

Taille totale à j10

La longueur totale des larves cultivées dans les traitements COP et MIX était significativement plus importante que celles issues du régime ROT à j10:



Taille totale de larves de *L. sebae* à j10 post éclosion en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p < 0,001$

Réplétion stomacale, Résorption du globule lipidique, Inflation de la vessie natatoire,
Présence de calculs urinaires

Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements alimentaires en ce qui concerne l'inflation de la vessie natatoire et la réplétion stomacale à j10.

Il est intéressant de noter que 16.4% des larves cultivées avec un régime ROT n'ont pas correctement résorbé leur globule lipidique à j10, alors qu'une résorption complète a été observée chez la totalité des larves cultivées avec un régime COP ou MIX. Cette anomalie est peut-être liée à un stress alimentaire qui agirait sur le processus de résorption de ces globules.

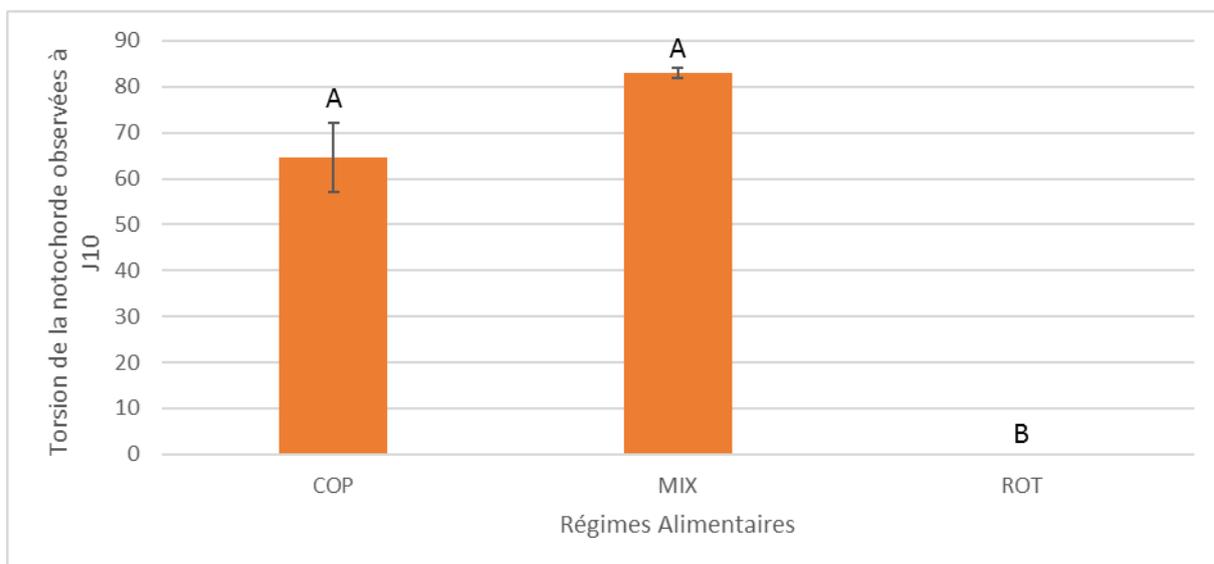
Enfin, des calculs urinaires (parfois très conséquents) ont été observés chez environ 50% des larves cultivées sur un régime ROT, alors qu'il ne touchait qu'une faible proportion des larves issues des traitements COP et MIX :

Observation de différents facteurs biologiques de *L. sebae* à j10. La présence de différents lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($p > 0.05$). La valeur p est précisée pour chaque facteur.

Régimes larvaire	Présence de vessie natatoire (%)	Réplétion stomacale (%)	Présence de globule lipidique non résorbé (%)	Présence de calculs urinaires (%)
COP	88,2 ± 0,05	98,9 ± 1,1	0,0 ± 0,0	5,7 ± 2,2 ^{AB}
MIX	91,5 ± 0,001	100 ± 0,00	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,7 ^A
ROT	80,8 ± 0,1	86,5 ± 0,9	16,4 ± 9,6	46,9 ± 7,7 ^B
Valeur-p	0,586	0,361	0,361	0,004

Torsion de la notochorde

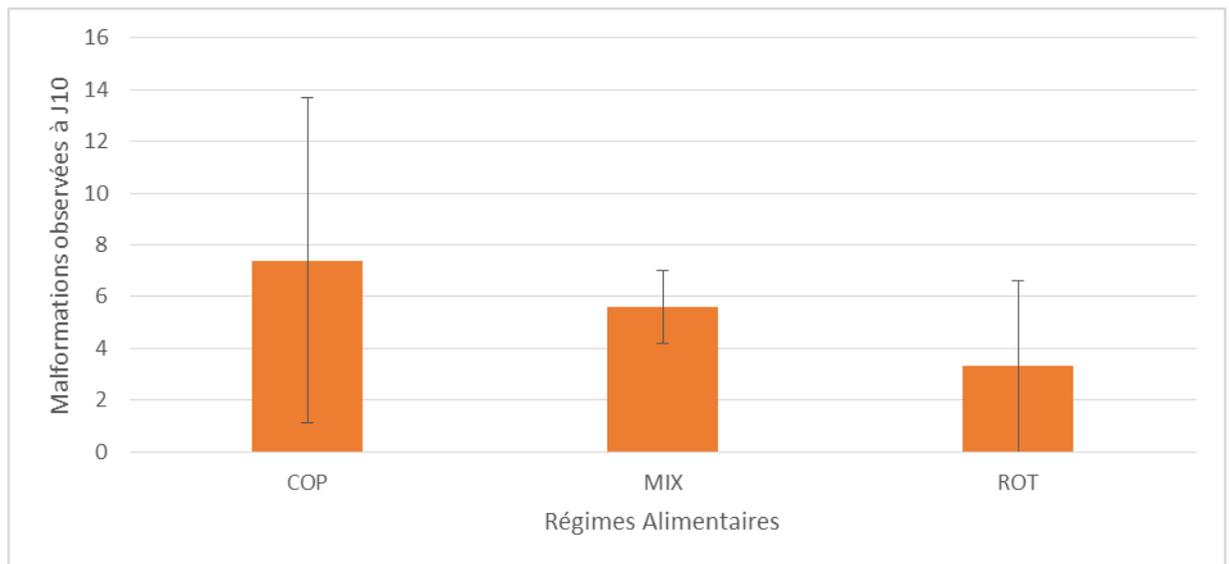
L'initiation de la torsion de la notochorde est un critère objectif du développement des larves. Aucune torsion de la notochorde n'a été observée chez les larves élevées sur un régime ROT. A l'opposé, les traitements COP et MIX possédaient une importante proportion de larves ayant initié cette métamorphose à j10 :



Torsions de la notochorde observées à j10 post éclosion chez des larves de *L. sebae*, en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p < 0,001$

Malformation

Il n'existe pas de différence significative de prévalence des malformations entre les traitements testés ($p > 0,05$). La majorité des malformations étaient observées au niveau des mandibules (phénomène de « bec de canard » ou mandibule inférieure trop longue). Seul un réplicats sur trois dans le traitement COP présentait un important taux de malformation (20%), les deux autres réplicats ne contenaient que des larves correctement formées.



Malformations observées à j10 post éclosion chez des larves de *L. sebae*, en fonction des 3 régimes alimentaires testés. $p = 0,794$

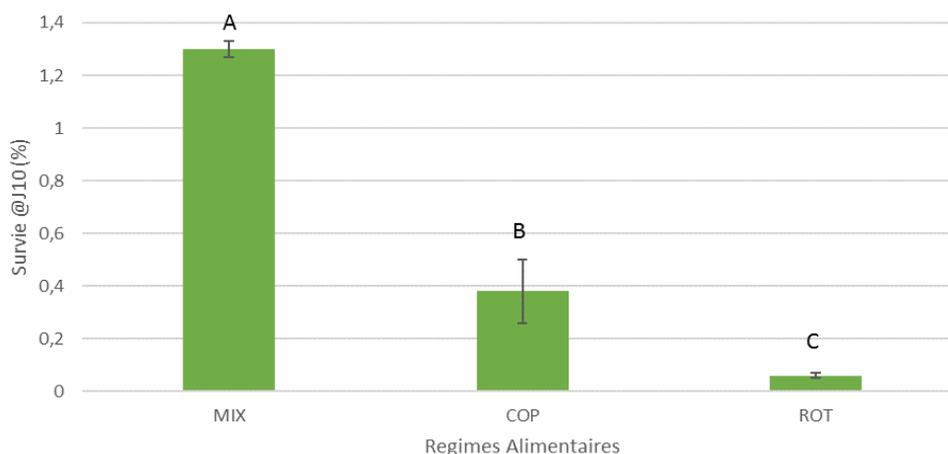
4.3.2 Expérience 2 : *L. sebae*

A) Résultats et Discussion

Cette expérience ayant conduit à de faibles taux de survies finales, le détail des résultats ne sera pas discuté dans le présent rapport. Seules les données de survie seront présentées.

Survie à j10

La survie larvaire de *L. sebae* à j10 a globalement été très faible ($< 1,5\%$ dans l'ensemble des traitements). Cependant, les larves élevées avec un régime MIX possédaient une survie significativement supérieure aux autres traitements. La survie moyenne des réplicats ROT était quasiment négligeable alors que celle des réplicats COP était intermédiaire.



Survie de *L. sebae* à j10 post éclosion en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Les données sont présentées en tant que moyennes +/- erreurs standards. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p = 0,005$

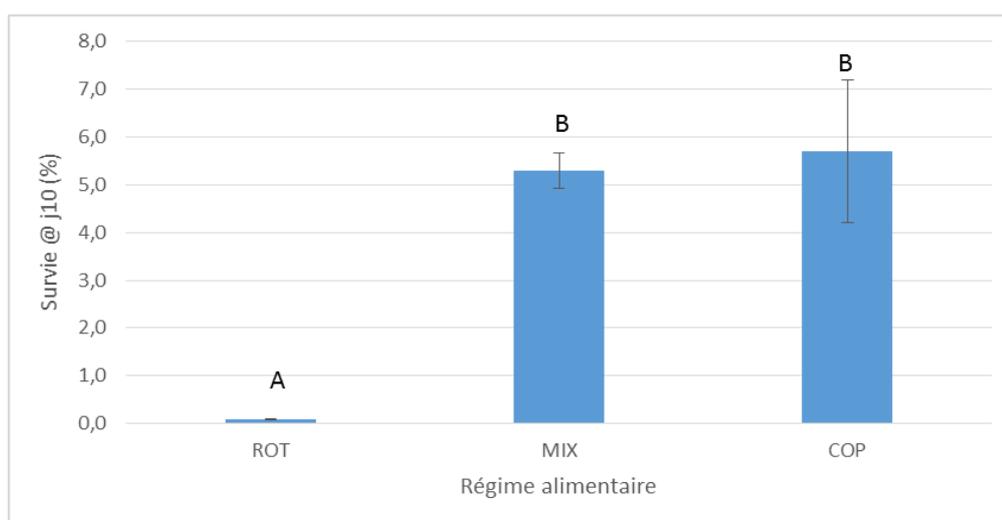
4.3.3 Expérience 3 : *L. sebae*

Contrairement aux expériences 1, 2 et 4, la durée d’approvisionnement en copépodes au cours de cet essai a été réduite de 4 jours pour être stoppée à j6 (au lieu de j10). Les traitements MIX et COP ont donc reçu un régime alimentaire correspondant de j2 à j5 inclus, avant de ne recevoir que des rotifères jusqu’à l’arrêt de l’expérience à j10 (avec une concentration cible de 10 rotifères /ml).

A) Résultats

Survie à j10

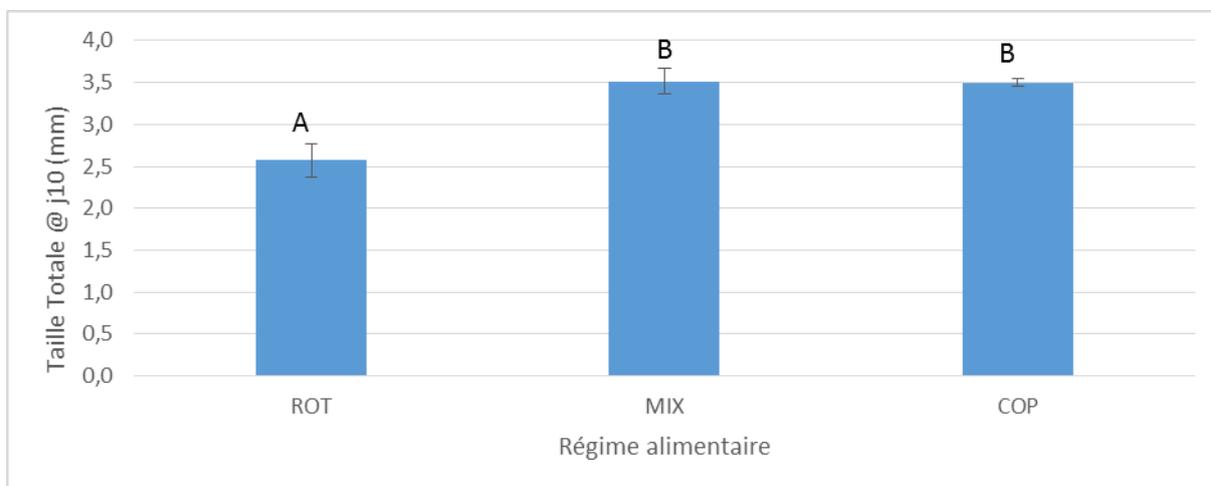
Le traitement ROT a produit des survies extrêmement faibles (0.09%). Les survies moyennes obtenues dans les traitements MIX et COP étaient comprises entre 5 et 6% et étaient significativement supérieures à celle du traitement ROT :



Survie de *L. sebae* à j10 post éclosion en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Les données sont présentées en tant que moyennes +/- erreurs standards. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p = 0,008$

Longueur totale à j10

La longueur totale à j10 des larves élevées sur les régimes MIX et COP était significativement plus importante ($p < 0.05$) que celle issue du traitement ROT et se situaient autour de 3.5 mm:



Longueur totale de *L. sebae* à j10 en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Les données sont présentées en tant que moyennes +/- erreurs standards. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p = 0.006$

Autres paramètres morphométriques relevés :

Les larves issues du traitement ROT avaient un pourcentage significativement plus faible d'inflation de la vessie natatoire et de torsion de la notochorde comparées au traitement COP ($p < 0.05$). En revanche, aucune différence statistique n'a été relevée parmi les différents régimes expérimentaux testés en ce qui concerne la réplétion stomacale, la résorption du globule lipidique, la présence de calculs urinaire et les taux de malformations observés chez les larves à j10:

Observation de différents facteurs biologiques de *L. sebae* à j10. La présence de différents lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($p > 0.05$). La valeur p est précisée pour chaque facteur.

Traitement	Présence de vessie natatoire (%)	Réplétion stomacale (%)	Présence de globule lipidique non résorbé (%)	Présence de calculs urinaires (%)	Début de Torsion de la Notochorde (%)	Incidence des Malformations (%)
ROT	27,7 ± 17,4 ^A	100 ± 0	11,1 ± 11,1	22,2 ± 11,1	0 ± 0 ^C	50 ± 9,6
MIX	63,2 ± 3,2 ^{AB}	100 ± 0	1,1 ± 1,1	1,7 ± 0,9	7,3 ± 1,9 ^{CD}	33,8 ± 4,9
COP	70 ± 1,6 ^B	98,5 ± 0,9	0,9 ± 0,4	2,8 ± 0,9	16,5 ± 3,4 ^D	28,5 ± 2,1
valeur-p	0,029	0,829	0,993	0,629	0,006	0,1

B) Discussion

Cette expérimentation a été réalisée dans des conditions similaires à la manip #1. La seule différence de méthodologie était la durée pendant laquelle des nauplii de copépodes ont été fournis aux cultures : de j2 à j10 pour la manip #1, et de j2 à j5 pour cette manip. La comparaison des résultats entre ces deux expériences permet de dégager des premières tendances sur l'influence de la durée de l'approvisionnement en nauplii sur les étapes précoces d'élevage larvaire de *L. sebae*.

Dans les deux expériences, les taux de survie dans les traitements ROT étaient inférieurs à 1% (0.09% ici, contre 0.767% durant la manip #1). Les survies moyennes du régime MIX étaient quasiment similaires entre les deux expériences autour de 5% (5.3% ici, contre 4.95% pour l'expérience #1). Enfin, les taux de survie du régime COP étaient supérieurs dans cette expérience (5.7%) comparés avec ceux de la manip #1 (2.7%). Ces résultats indiquent que des taux de survies égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec 10 jours d'apport en copépodes peuvent être obtenus si cette période est réduite aux 5 premiers jours d'élevage larvaire. Réduire la durée d'apport en copépode de 10 à 5 jours ne semble donc pas avoir un effet négatif sur la survie des larves, et même au contraire dans le cas du traitement COP.

La taille moyenne des larves récoltées dans cette expérience était inférieure à celle des larves récoltées au terme de la manip #1, et ce pour l'ensemble des traitements. Ceci tend à démontrer qu'il existe une corrélation positive entre la durée pendant laquelle les larves reçoivent des nauplii de copépodes et leurs taux de croissances.

Comme pour la manip #1, aucune larve élevée avec le traitement ROT n'avait initié de torsion de la notochorde à j10. Quant aux traitements MIX et COP, 7.3% et 16.5% des larves respectivement avaient commencé leur flexion pour cette manip, contre 83% et 64% dans la manip #1. Les larves de l'expérience #3 avaient donc une croissance et un développement ralentis par rapport aux larves issues de la manip #1 pour lesquelles les apports en copépodes ont été poursuivis jusqu'à j10.

Les taux de malformation rencontrés dans cette expérience étaient également plus élevés (28 à 50% selon les traitements) que ceux observés lors de la manip #1 (3 à 7.5% en fonction des traitements). En revanche la proportion de larves élevées sur ROT présentant des calculs urinaires était plus faible dans cette expérience (22.2%) comparée avec celle de la manip #1 (47%).

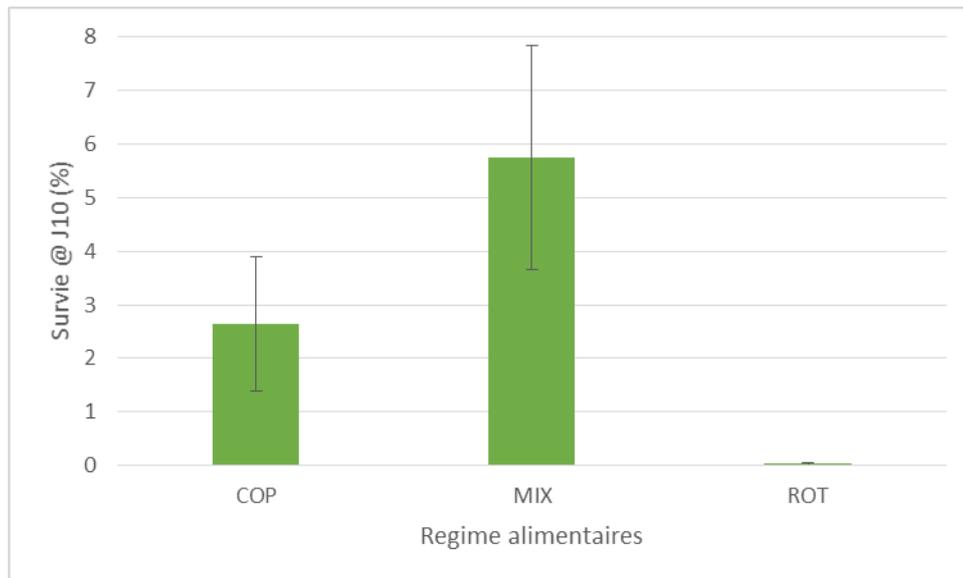
Réduire la durée d'approvisionnement en nauplii de copépode de 10j à 5j n'influence pas négativement la survie moyenne des larves, mais par contre affecterait la croissance, le développement et l'incidence de malformation.

4.3.4 Expérience 4 : *Dascyllus* sp.

A) Résultats et Discussion

Survie à j10

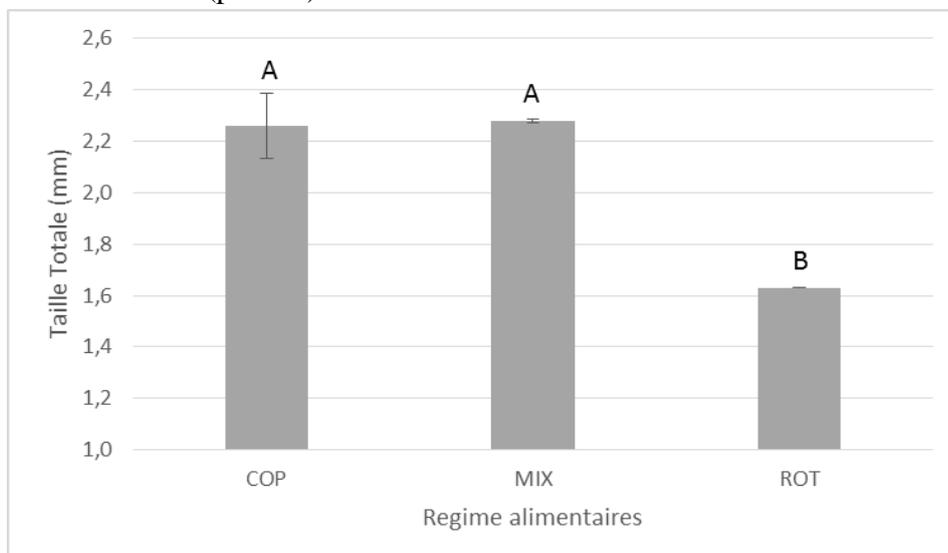
La meilleure survie a été observée chez les larves issues du traitement MIX, suivie de COP, même si il n'existe pas de différence statistique entre ces traitements ($p > 0.05$). Une unique larve survivante a été récoltée dans les réplicats ROT lors de la conclusion de l'expérience à j10.



Survie moyenne de *Dascyllus* sp. à j10 en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Les données sont présentées en tant que moyennes +/- erreurs standards. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p=0.006$

Longueur Totale à j10

La longueur totale des larves issues des traitements COP et MIX était significativement supérieure à celle des larves issues du traitement ROT ($p<0.05$). Il n'existe pas de différence significative entre les traitements COP et MIX ($p>0.05$).



Longueur totale de *Dascyllus* sp. à j10 en fonction des 3 régimes alimentaires testés. Les données sont présentées en tant que moyennes +/- erreurs standards. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements. $p=0.006$

La taille totale des larves de *Dascyllus* à j10 était significativement plus petite par rapport à celle constatée pour *L. sebae* au même âge (cf. manip #1 en 2001 : environ 5mm à j10 pour les traitements COP et MIX).

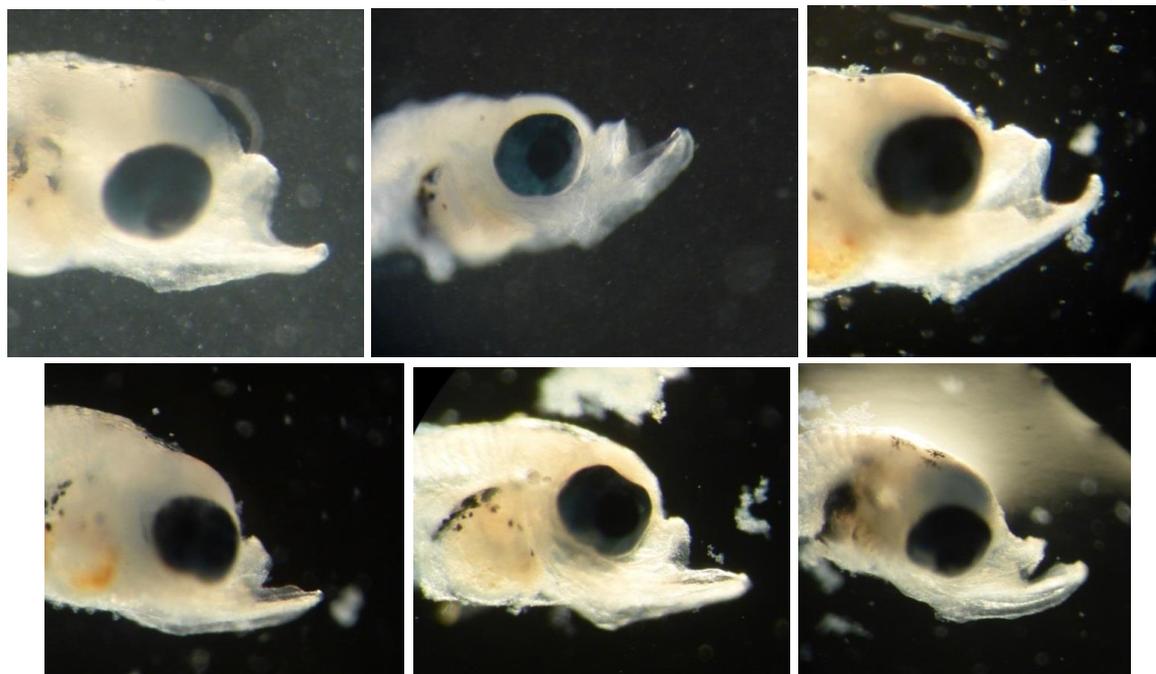
Autres paramètres morphométriques observés :

Le taux d'inflation de vessie natatoire est relativement faible pour les traitements COP et MIX et ne sont pas statistiquement différents entre eux. Aucune vessie natatoire n'a été observée chez la larve issue du traitement ROT. La totalité des larves observée à j10 possédaient un contenu stomacal non vide, à l'exception de quelques larves issues du traitement MIX pour lesquelles un tube digestif transparent a été observé. La résorption du globule lipidique était complète pour l'ensemble des larves à j10, tous traitements confondus. La présence de calculs urinaires n'a été observée que chez une minorité de larves élevées avec un régime COP. Aucune larve n'avait initiée de torsion de la notochorde à j10. L'unique larve récoltée dans les réplicats ROT avait une malformation de la mandibule inférieure. 30 à 50% des larves issues des traitements COP et MIX possédaient une malformation quelconque, majoritairement située au niveau des mandibules.

Observation de différents facteurs biologiques de larves de *Dascyllus* sp. à j10. Les données sont présentées en tant que moyenne +/- Erreurs Standards. La présence de différentes lettres indique des différences significatives entre les traitements ($p > 0.05$). La valeur p est précisée pour chaque facteur.

Régime Alimentaire	Vessie natatoire	Contenu stomacale	Globule lipidique	Calcul urinaire	Torsion Notocorde	Malformation
COP	25 ± 7% ^A	100%	0%	2 ± 2%	0%	48 ± 6%
MIX	30 ± 2% ^A	98 ± 2%	0%	0%	0%	35 ± 1%
ROT	0 % ^B	100 ± 100%	0%	0%	0%	100 ± 100%
Valeur de p	0.004	0.361	1	0.829	1	0.361

Exemple de différentes malformations des mandibules observées chez *Dascyllus* sp. à j10 :



L'importante proportion de larves possédant une malformation des mandibules pourrait être liée aux conditions environnementales au cours de l'embryogenèse.

La plus petite taille des larves de *Dascyllus* à j10 par rapport à *L. sebae* se confirme également par le fait qu'à j10 aucune larve de *Dascyllus* sp. n'avait encore initié un début de torsion de la notochorde, alors que 60-80% des larves de *L. sebae* élevées sur MIX et COP exhibaient un démarrage de flexion à j10 (manip #1).

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 CONCLUSION GENERALE

5.1.1 Réalisation des résultats attendus

- 1 Adaptation et transfert technique de production d'un copépode *Acartia sp.* ou *Bestiolina sp.* au CCDTAM et formation d'un technicien du CCDTAM ;

→ **Objectif atteint à 100% : Deux espèces de copépodes *Bestiolina similis* et *Parvocalanus crassirostris* sont cultivées conjointement à différentes échelles au CCDTAM. Le responsable d'écloserie et la technicienne proies vivantes ont été formés au maintien de ces cultures intensives. Un agent de l'ADL a également été formé au maintien des cultures intensives de ces copépodes.**

- 2 Mise au point de la production en continue à petite échelle de deux (voire trois) espèces locales de copépodes sélectionnées sur la base de leurs caractéristiques biologiques, nutritionnelles et de leur aptitude à l'élevage ;

→ **Objectif atteint à 90% : Deux espèces de copépodes calanoides et une espèce harpacticoïde ont été cultivées à petite (bécher), moyenne (40l) et grande échelle (7x400l + 5x500l). La culture de l'espèce harpacticoïde a cependant été abandonnée car son utilisation n'a pas été sollicitée par les partenaires de l'opération.**

- 3 Réalisation de tests préliminaires comparatifs sur l'influence d'une alimentation employant des nauplii de copépodes seuls et/ou en association avec des rotifères et/ou des rotifères sur la survie et la croissance sur les larves de poissons (a minima d'espèces de l'aquarium des lagons) qui seront disponibles en fonction de la montée en puissance des projets en cours (Aqualagon et CCDTAM) ;

→ **Objectif atteint à 85% : Réalisation de manips préliminaires durant la saison de ponte 2013-2014 dans des volumes expérimentaux de 40l (*L. sebae* et *Dascyllus sp.*). Réalisation de 9 expériences en nourrissage comparatif durant la saison de production 2014-2015, réalisées en cages flottantes ainsi qu'en bacs de 200l.**

Cependant, aucune analyse biochimique n'a été réalisée au cours de ces expériences, due à des survies larvaires trop faibles pour permettre de fournir la quantité de biomasse nécessaire pour conduire ce type d'analyse.

- 4 Mise au point de protocoles d'élevage en conditions intensives spécifiques des copépodes locaux sélectionnés et édition d'un rapport technique.

→ **Objectif atteint à 100% : Rédaction et soumission d'un protocole détaillé à destination de non scientifique durant une consultance privée au CCDTAM réalisée à partir du mois d'Avril 2013 pour une durée de 3 mois.**

5.1.2 L'importance des nauplii de copépodes dans les élevages larvaires de poissons tropicaux

De nombreuses larves de poissons marins tropicaux possèdent une ouverture buccale de très petite taille, qui limite de fait leur capacité à ingérer certains types de proies vivantes, particulièrement lors de la transition endo-exotrophique. Lors du démarrage du projet EliCopTr, la première hypothèse suggérée pour expliquer les avantages procurés aux larves par une alimentation à base de copépodes était que la petite taille de leurs stades nauplii permettait aux larves de les ingérer efficacement, contrairement aux rotifères dont la taille était trop importante. Ainsi, selon cette hypothèse, les larves seraient principalement limitées par la taille de leur bouche, et un apport de nauplii permettrait de contourner cette limitation purement mécanique.

Cette hypothèse semble valide dans le cas de *Dascyllus* sp. : Chez cette espèce, la largeur moyenne de la bouche lors du premier nourrissage n'est que de 120 µm et est donc trop petite pour pouvoir ingérer des rotifères « S » dont les plus petits spécimens mesurent environ 150 x 100 µm. De plus, les expériences menées avec *Dascyllus* au cours de l'opération EliCopTr ont clairement démontré qu'une alimentation utilisant exclusivement les rotifères produisait une mortalité complète des larves, accompagnée par des contenus stomacaux vides.

Cependant, dans le cas de *L. sebae*, plusieurs observations contredisent cette hypothèse : Chez cette espèce, la largeur moyenne de la bouche lors du premier nourrissage est d'environ 150 - 160µm, ce qui lui permet d'ingérer des rotifères « S ». Ensuite, les tests de nourrissage comparatifs menés sur *L. sebae* ont démontré que les larves étaient capables de survivre à un régime exclusivement constitué de rotifères (même si la survie et la qualité des larves est extrêmement faible). Ces observations amènent à reconsidérer l'influence des nauplii dans l'alimentation larvaire de certaines espèces comme *L. sebae* : S'il n'est pas purement mécanique, quel est l'avantage significatif apporté par les nauplii de copépodes aux larves de *L. sebae* par rapport à un régime rotifère?

5.1.2 L'effet « Kick Start » des nauplii de copépodes

Il a été observé chez plusieurs espèces de poissons marins qu'au moment du passage endo-exotrophie les larves étaient capables d'ingérer des rotifères mais que ceux-ci étaient déféqués entiers, voire vivants, alors que ce phénomène n'a jamais été observé pour les nauplii de copépodes.

Certains auteurs en ont déduit que l'ingestion initiale de rotifères et/ou leur passage dans le TD ne déclenche pas spontanément la libération des enzymes nécessaires à leur digestion par la larve. L'œsophage ne « reconnaît pas » initialement ce type de proie qui est extrêmement rare dans le milieu naturel et n'envoie pas le signal de libération des enzymes digestives ad hoc. Il a été démontré que ce message était programmé génétiquement et spécifique à chaque espèce de poisson. Il a été également évoqué dans la littérature que les dents vomériennes (palais) des larves n'étaient pas capables de « déchirer » la cuticule épaisse des rotifères mais

pouvaient rompre plus facilement la carapace fine des nauplii permettant un contact direct entre le contenu plus labile et les enzymes digestives. Il a également été établi que les nauplii de copépode, et particulièrement ceux des calanoides, étaient bien plus digestibles en raison d'un contenu enzymatique intrinsèque bien plus important que celui des rotifères. Ces hypothèses convergent vers l'acquisition d'un stade de maturation minimum du système digestif nécessaire pour favoriser la première alimentation exogène faute de quoi la larve meurt de faim rapidement.

Le suivi du développement du système digestif chez *L. sebae* démontre un lien important entre la rapidité de la maturation et la présence de nauplii dans le régime larvaire : Un régime larvaire comprenant des nauplii de copépode (en combinaison ou non avec des rotifères) provoque une accélération de la mise en place du système digestif par rapport à des larves nourries uniquement sur rotifères. Cet effet déclencheur des nauplii sur la maturation du système digestif des larves est baptisé « Kick Start Effect » (Schipf, 2006) et s'observe chez *L. sebae* dès les premiers jours du nourrissage exotrophique.

La maturation du TD atteinte précocement grâce au nourrissage sur nauplii de copépodes facilite en retour la digestion des rotifères, (« positive feedback loop ») : Plus les larves ingèrent de nauplii de copépodes, plus elles acquièrent le potentiel (matériel enzymatique) de digérer efficacement les rotifères. A l'opposé, le système digestif des larves qui n'ont pas consommé de nauplii n'aura pas la capacité de digérer efficacement les rotifères.

5.2 PERSPECTIVES

Il a été démontré dans ce travail que la mise au point d'un protocole d'élevage larvaire pour *L. sebae* ou *Dascyllus* sp. nécessitait l'emploi de copépodes pour faciliter le passage endo-exotrophie, comme cela a été démontré chez de nombreuses autres espèces nouvelles pour l'aquaculture. Il a été également montré que le régime mixte copépodes-rotifères offrait les meilleures perspectives « co feeding ».

Il est bien établi que les deux principales limitations d'utilisation des copépodes en élevage larvaire sont la faible productivité de leurs cultures intensives par rapport aux proies vivantes traditionnelles comme les rotifères et leur technicité de culture. A ce stade des investigations et du protocole d'élevage plus ou moins stabilisé, les élevages larvaires de *L. sebae* destinés à la production de masse seront rapidement limités par la quantité de copépodes qu'il sera possible d'apporter aux volumes d'élevages larvaires, même si il a été mis au point une technique de production en grands volumes extérieurs. Pour cette raison, il est nécessaire de faire évoluer le référentiel d'élevage larvaire dans sa phase initiale (passage endo exotrophie et 12 jours suivants) qui utilise conjointement les copépodes et les rotifères.

Les recherches doivent porter sur une meilleure compréhension du phénomène 'kick start' qui au final consiste à utiliser avec parcimonie la ressource « copépodes ». Il s'agit donc de déterminer:

- la période à laquelle il faut introduire et/ou que les larves disposent des nauplii. Cette connaissance est associée à l'optimisation de la synchronisation des blooms de nauplii dans les bacs d'élevage larvaire;
- Quantité par larve à fournir minimale pour déclencher le « kick start ». Cette recherche est destinée à limiter les volumes de copépodes à produire conjointement avec ceux non limitants des rotifères.
- la durée minimale de fourniture et/ou que les larves disposent de nauplii de copépode (en co feeding avec les rotifères). Cette thématique vise à réduire au maximum l'ajout et donc la durée de production de masse copépodes en concertation avec l'optimisation de l'emploi des rotifères;

BIBLIOGRAPHIE

- Avila, E.M., Juario, J.V., 1987. Yolk and Oil globule utilization and developmental morphology of the digestive tract Epithelium in larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture* 65, 319-331.
- Arndt, C., Sommer, U., 2014. Effect of algal species and concentration on development and fatty acid composition of two harpacticoid copepods, *Tisbe* sp. and *Tachidius discipus*, and a discussion about their suitability for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 20, 44-59.
- Avila, E.M., Juario, J.V., 1987. Yolk and Oil globule utilization and developmental morphology of the digestive tract Epithelium in larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture* 65, 319-331.
- Baensch, F., 2003. Marine copepods and the culture of two new pygmy Angelfish species. *Freshwater and Marine Aquarium Magazine* 26, 156-162.
- Binet, D., 1984. Copépodes planctoniques du lagon de Nouvelle-Calédonie facteurs écologiques et associations d'espèces. *Marine Biology* 82, 143-156.
- Binet, D., 1985. Essai d'utilisation de la diversité spécifique dans l'analyse des communautés de copépodes planctoniques du lagon de Nouvelle-Calédonie. *Marine Biology* 88, 85-99.
- Boxshall, G.A., Halsey, S.H., 2004. An introduction to copepod diversity. Ray Society Series 166. With S. H. Halsey. 2 Parts [Vols]. The Ray Society, London, U.K. 940 p. [Part I 421 p., Part II 519 p.]
- Busch, K.E.T., Falk-Peterson, I.B., Peruzzi, S., Rist, N.A., Hamre, K., 2010. Natural zooplankton as larval feed in intensive rearing systems for juvenile production of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 41, 1727-1740
- Cahu, C., Infante, J.Z., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.
- Camus, T., 2012. Improvement of copepods intensive culture protocols as live feeds for aquaculture hatcheries. James Cook University PhD thesis.
- Cassiano, E.J., Ohs, C.L., 2011. Performance of larval Florida pompano fed nauplii of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *North American Journal of Aquaculture* 73, 114-123
- Chinnery, F. E., Williams, J. A., 2003. Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. *Marine Ecology Progress Series* 263, 149-157.
- Conceição, L.E.C., Yufera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research* 41, 613-640.
- Côrtes, G de F., Tsuzuki, M.Y., 2012. Effect of different live food on survival and growth of first feeding barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997) larvae. *Aquaculture Research* 43, 831-834.

- Defaye, D., 2001. A New Mesocyclops (Copepoda, Cyclopidae) from New Caledonian Fresh Waters. *Crustaceana*, 74 (7) : 647-658.
- Dessier, A., 1988. Les peuplements de copepodes épiplanktoniques du Pacifique Sud-Ouest. Composition, Variabilité. *Oceanologica Acta* 11 (3) : 249-258.
- Doi, M., Singhagraiwan, T., 1993. Biology and culture of the red snapper *Lutjanus argentimaculatus*. Research project of the fishery resource development in the kingdom of Thailand. Eastern marine fisheries development centre (EMDEC), Thailand, 51 pp
- Drillet, G., Jorgensen, N.O.G, Sorensen, T.F., Ramlov, H., Hansen, B.W., 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquaculture Research* 37, 756-772.
- Drillet, G., Frouel, S., Sichlau, M.H., Jepsen, P.M., Hojgaard, 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.
- Dussart, D. H., 1984. Sur quelques Crustacés Copépodes de Nouvelle Calédonie. *Rev. Hydrobiol. trop.* 17 (4): 301-308.
- Engell-Sorensen, K., Støttrup, J.G., Holmstrup, M., 2004. Rearing of flounder (*Platichthys flesus*) juveniles in semi extensive systems. *Aquaculture* 230, 475-491.
- 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.
- FAO, 2009. How to feed the world in 2050. FAO, Rome
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16, 59-77.
- Heath, P. L., Moore, C. G., 1997. Rearing Dover sole larvae on *Tisbe* and *Artemia* diets. *Aquaculture International* 5, 29-39.
- Ho, Y.S., Chen, C.M., Chen, W.Y., Kuo, J., Chang W.B., 2009. Embryonic and larval development of saddleback anemonefish, *Amphiprion polymnus*, Linnaeus (1758). *Platax* 6, 35-46.
- Kraul, S., Nelson, A., Brittain, K., Ako, H., Ogasawara, A., 1992. Evaluation of live feeds for larval and post larval Mahimahi *Coryphaena hippurus*. *Journal of world mariculture society* 23, 299-307.
- Laidley, C.W., Callan, C.K., Burnell, A., Liu, K.K.M., Bradley, C.J., Mira, M.B., Shields, R.J., 2008. Development of aquaculture technology for the flame angelfish, *Centropyge loriculus*. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture* 19, 1-7.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, J.G., Faulk, C., Arnold, C.R., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188, 339-351.

- Lemus, J.T., Blaylock, R.B., Apeitos, A., Lotz, J.M., 2010. Short-term effect of first-prey type and number on survival and growth of intensively cultured Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae), larvae. *Journal of The World Aquaculture Society* 41, 455-463
- Lubzens, E., Zmora, O., Barr, Y., 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia* 446, 337-353
- Mauchline J., 1998. *Advances in Marine Biology: The Biology of Calanoid Copepods*. Academic Press, London, UK.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., 2001. Summer egg production rates of paracalanid copepods in subtropical waters adjacent to Australia's North West Cape. *Hydrobiologia* 453/454, 121-132.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichol, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G., Robin, B., 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223, 89-106.
- Murray, M. M., Marcus, N. H., 2002. Survival and diapause egg production of the copepod *Centropages hamatus* raised on dinoflagellate diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 270, 39-56.
- O'Bryen, P.J., Lee, C.S., 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing workshop discussion summary. In: Lee, C.S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in Aquaculture*, Blackwell Publishing, Melbourne, pp. 245-255
- Ogle, J.T., Nicholson, L.C., Lotz, J.M., 2002. Culture of the copepod *Acartia tonsa* utilizing various artificial feeds. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 53, 234-240.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O., 2008a. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture* 274, 347-352.
- Payne, M.F., Ripplingale, R.J., 2000. Rearing west Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture* 188, 353-361.
- Payne, M.F., Ripplingale, R.J., Cleary, J.J., 2001. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture* 194, 137-150.
- Rønnestad, I., Helland, S., Lie, O., 1998. Feeding artemia to larvae of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. *Aquaculture* 165, 159-164
- Sampey, A., McKinnon, A.D., Meekan, M.G., McCormick, M.I., 2007. Glimpse into guts: overview of the feeding of larvae of tropical shore fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339, 243-257.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Schipp, G., Bosmans, J.M.P., Marshall, A.J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture* 174, 81-88.

Schipp, G., 2006. The use of Calanoid copepods in semi intensive marine fish larviculture. En: Editores: L., Cruz Suarez, D., Ricque Marie, M.T., Salazar, M.G., Nieto Lopez, D.A., Villareal Cavazos, A.C., Puello Cruz, A. Garcia Ortega. Avances en Nutricion acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola 15-17 noviembre. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico. pp. 84-94.

Shields, R. J., Kotani, T., Molnar, A., Marion, K., Kobashigawa, J., Tang, L., 2005. Intensive cultivation of a subtropical Paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae. In: Lee, C.-S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), Copepods in aquaculture. Blackwell Scientific Publication Ltd, Melbourne, pp. 3-9.

Souza-Santos, L. P., Pastor, J. M. O., Ferreira, N. G., Costa, W. M., Araujo-Castro, C. M. V., Santos, P. J. P., 2006. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analysis. Aquaculture Research 37, 1516-1523.

Støttrup, J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture research, 31, 703-711.

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, 375-394.

Wilcox, J.A., Tracy, P.L., Marcus, N.M., 2006. Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. Journal of The World Aquaculture Society 37, 113-120.

Yúfera, M., Darias, M.J., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture 268, 53-63

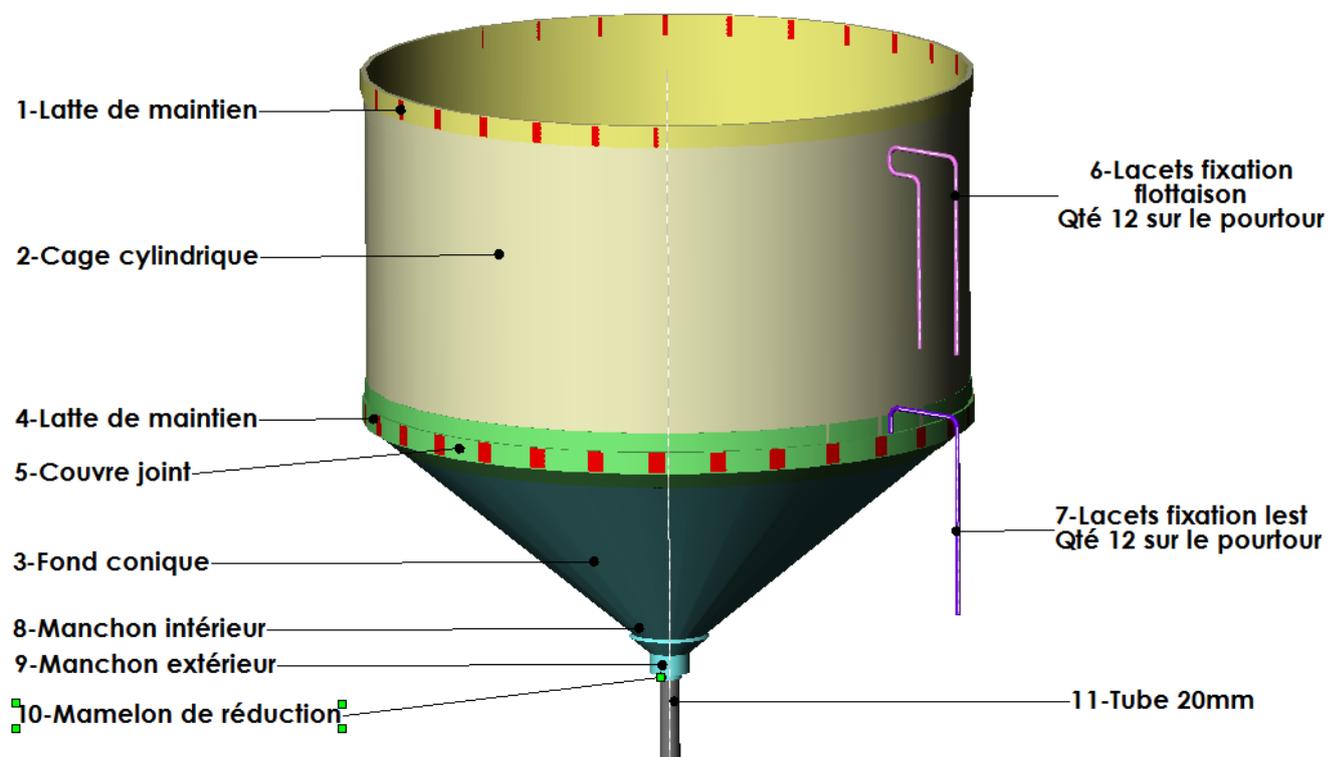
Cahier des charges pour la réalisation de 20 cages cylindro-coniques

1-Définition :

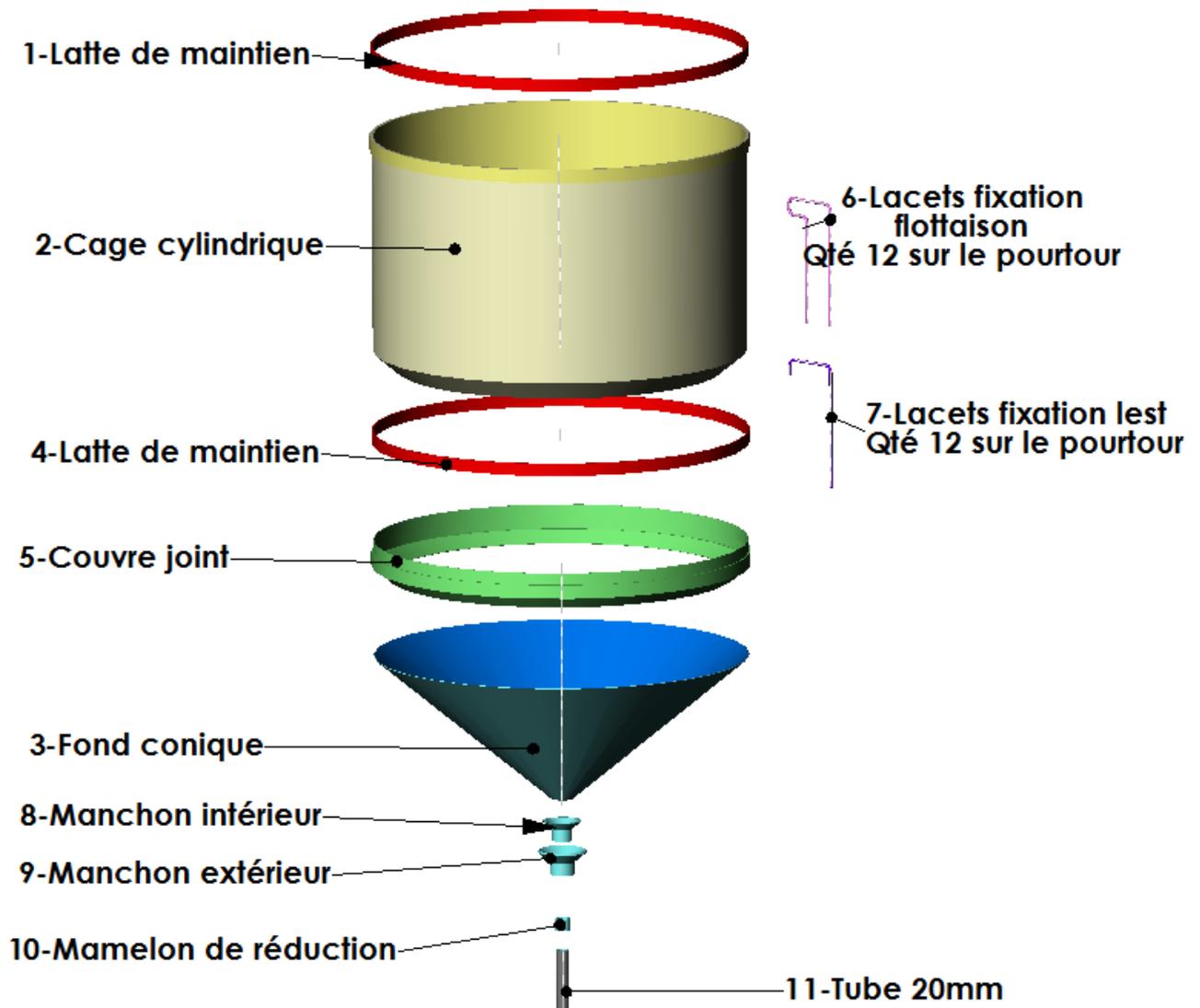
La demande porte sur la réalisation de cages cylindro-coniques constituées de :

- 1- Une latte de maintien en partie haute,
- 2- Une structure cage en tissu mono filament polyester maille de 40 μ et de fils de 40 μ ,
- 3- Un fond conique en tissu mono filament polyester maille de 40 μ et de fils de 40 μ ,
- 4- Une latte de maintien en partie basse de la structure,
- 5- Un couvre joint en tissu mono filament polyester maille de 40 μ et de fils de 40 μ ,
- 6- De 12 lacets en partie haute pour l'attache des cages sur système de flottaison,
- 7- De 12 lacets en partie basse de la partie cylindrique pour l'attache de lest,
- 8- Un manchon de raccordement intérieur en PVC (hors prestation),
- 9- Un manchon de raccordement extérieur en PVC (hors prestation),
- 10- D'un mamelon de réduction en PVC (hors prestation),
- 11- D'un tube \varnothing 20mm en PVC (hors prestation, hors périmètre de fourniture),

Vue d'ensemble



Vue éclatée des composants :



2-Exigences :

Chaque cage sera immergée en eau salée.

Les cages serviront à la collecte de juvéniles et devront être parfaitement étanche, pas de déchirure, pas de trous, pas de mailles sautées

Le fil utilisé pour toutes les coutures devra résister à l'immersion permanente dans l'eau de mer.

L'utilisation de colle PVC spécial sanitaire est autorisée.

Les parois intérieures ne doivent comporter aucunes aspérités susceptibles de retenir ou blesser les juvéniles.

Les coutures doivent être parfaitement étanches.

Les ourlets et coutures devront être dirigés vers l'extérieure du collecteur.

Les dimensions extérieures seront :

Dia int 600mm,	H 350mm pour la partie cylindrique
	H250mm pour la partie conique

Sur tout le pourtour supérieur, un lacet à 2 brins de 500mm, quantité 12 sur le périmètre, seront fixés à la structure cylindrique, prévoir des renforts, pour permettre l'accrochage de la cage au système de flottaison.

Sur le pourtour au dessus de la latte, Rep-5, un lacet à 1 brin de 500mm, quantité 12 sur le périmètre seront fixés à la structure cylindrique pour permettre le lestage de la cage.

Dans le fond du cône un système de vidange sera constitué d'un ensemble de raccord PVC qui seront collés ensemble pour assurer l'étanchéité et la tenue mécanique.

La vidange sera assurée par un tube de $\varnothing 20$ mm.

Les fournitures seront à intégrer dans le devis. Il est toutefois possible que la Société AquaRhéak prenne en charge la fourniture des tissus, des lattes et des composants PVC la mise en œuvre reste à la charge du prestataire.

3-Descriptif Rep-1 et Rep-4 Lattes de maintien :

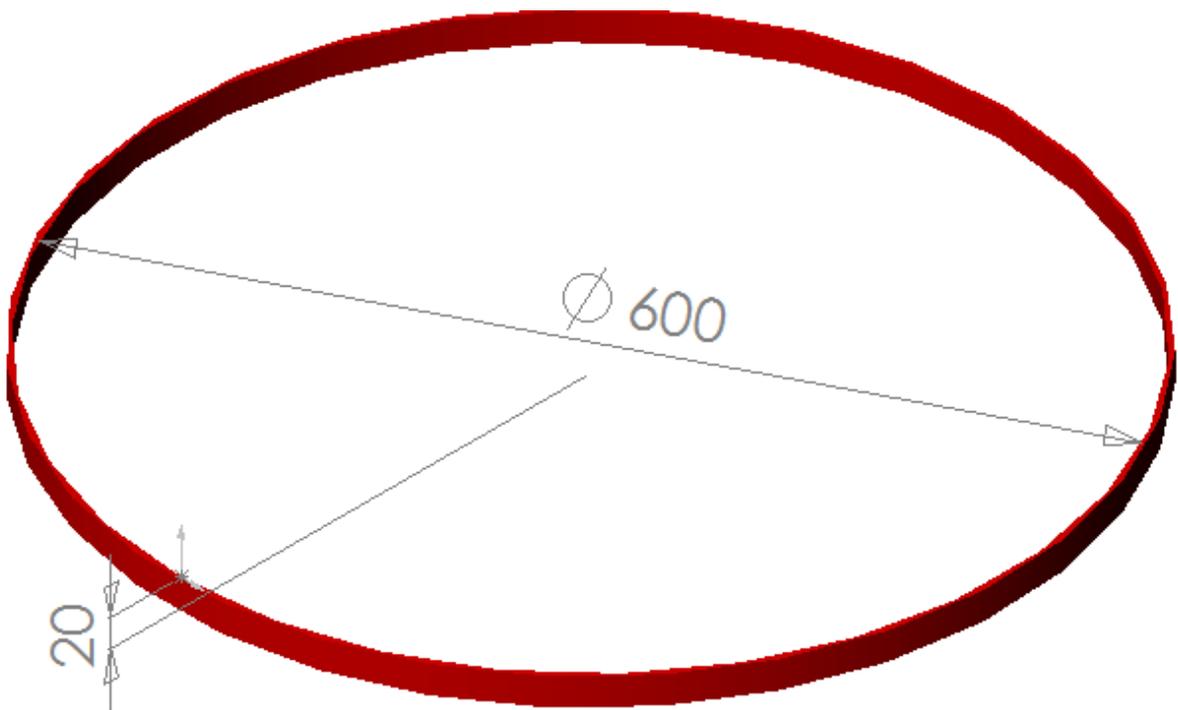
La structure sera constituée d'une latte en fibre de verre

Ep: 3mm

Hauteur: 20mm

Cintrée sur un diamètre de 600mm

Jonction par recouvrement et collage ou rivetage aluminium fraisé/fraisé



4-Descriptif Rep-2 Cage cylindrique :

La cage est réalisée à partir de tissus Mono filament en polyester mailles de 40 μ (Fournisseur Sefar Suisse Ref : Petex, lé 1020mm de large),

L'ourlet en partie haute devra intégrer une latte rigide de maintien décrite au paragraphe 3 rep-1, En partie inférieure, un début de partie conique permettra la fixation du fond conique (zone non développable qui devra être coupée pour permettre un recouvrement sans plis),

Ce cylindre devra être parfaitement étanche, sans déchirure, sans trous, sans accroc dans les mailles

Les dimensions de la partie cylindrique sont :

Dia : 600mm, H : 350mm

Pour assurer une bonne tenue des coutures, des renforts extérieurs sont autorisés.

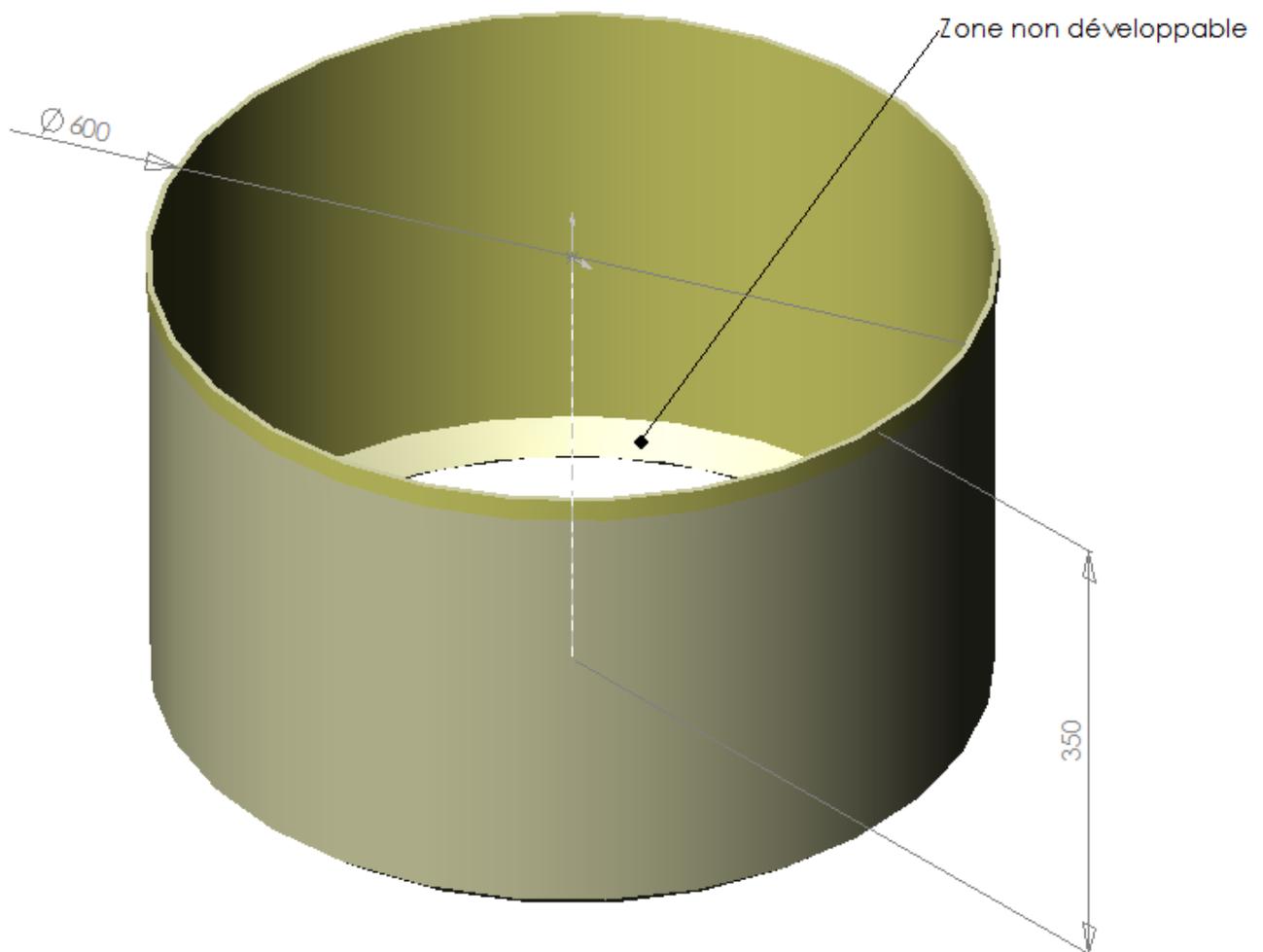
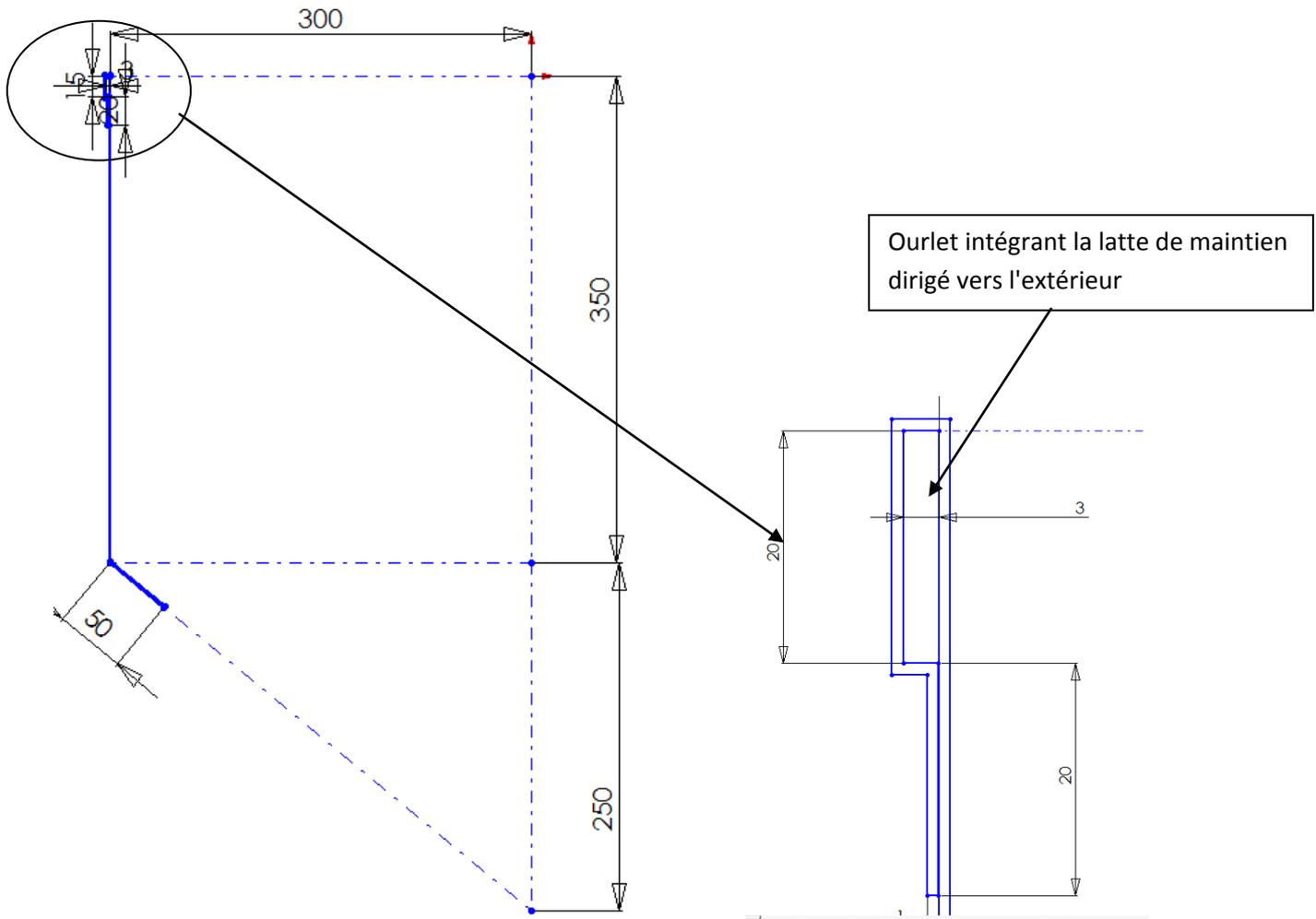


Schéma d'une section partie cylindrique :



5-Descriptif Rep-3 Fond conique :

Le fond conique est réalisé à partir de tissus Mono filament en polyester mailles de 40 μ (Fournisseur Sefar Suisse Ref : Petex, lé 1020mm de large),

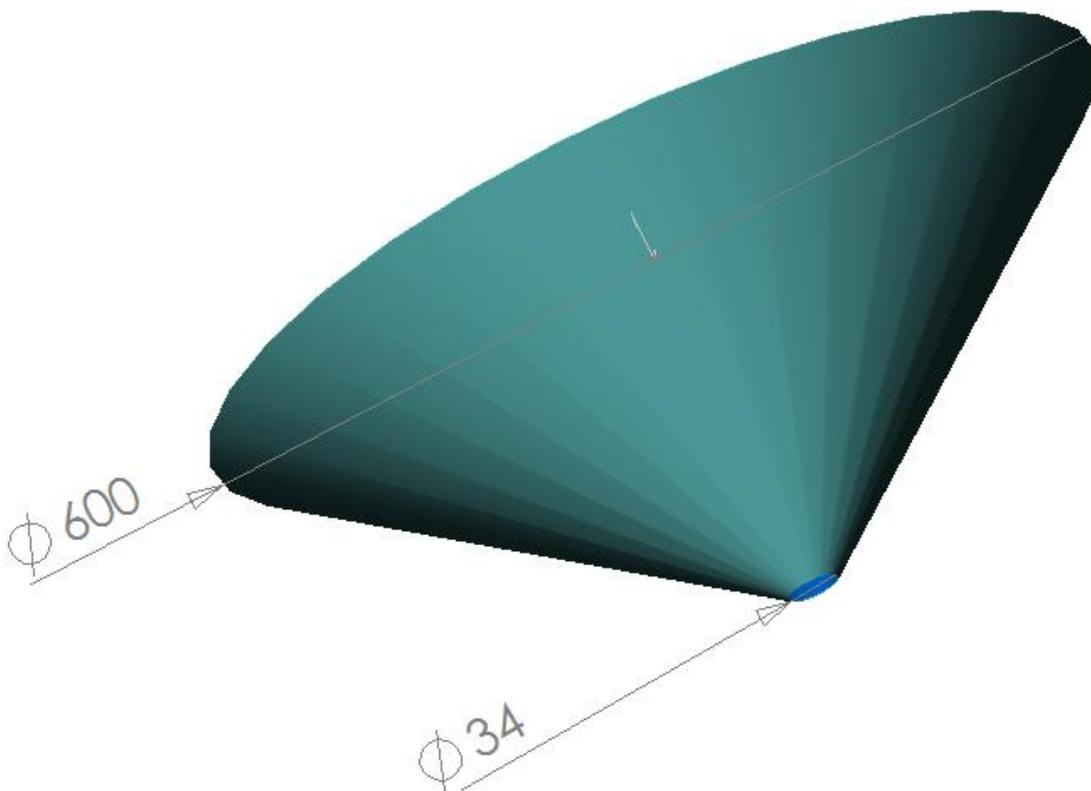
La partie inférieure du cône devra intégrer un trou \varnothing 34mm pour l'installation du système de vidange, descriptif paragraphe 10,

Ce cône devra être parfaitement étanche, sans déchirure, sans trous, sans accroc dans les mailles

Les dimensions du cône sont :

Dia : 600mm, H : 250mm

Pour assurer une bonne tenue des coutures, des renforts extérieurs sont autorisés.



6-Descriptif Rep-5 Couvre joint :

Le couvre joint est réalisé à partir de tissu Mono filament en polyester mailles de 40 μ (Fournisseur Sefar Suisse Ref : Petex, lé 1020mm de large),

Le couvre joint assure le maintien de la latte inferieure, rep-4, sur la partie cylindrique et le fond conique (zone non développable qui devra être coupée pour permettre un recouvrement),

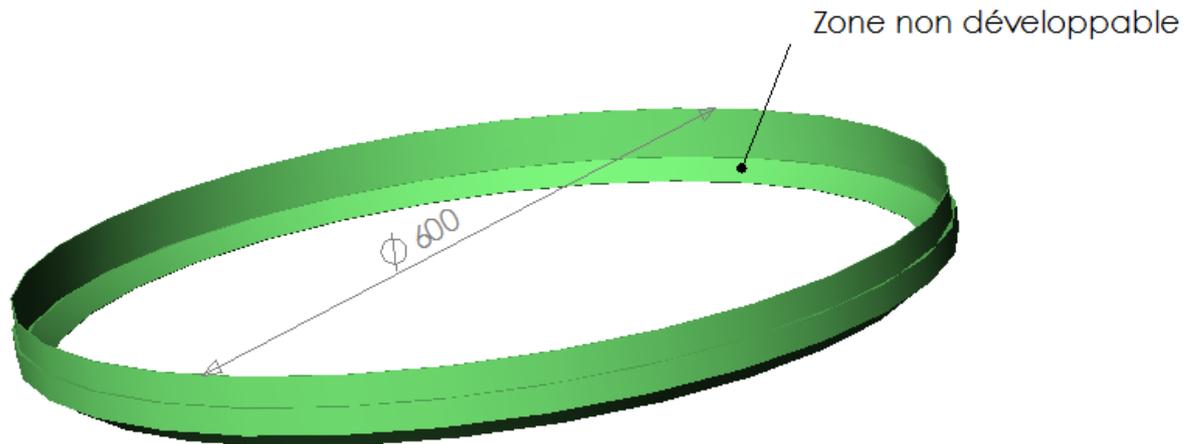
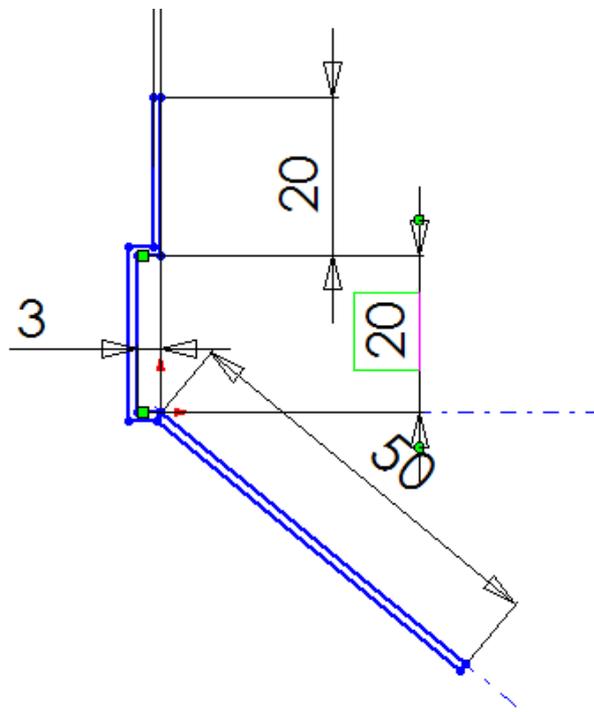


Schéma section Couvre joint :



7-Descriptif Rep-6 Lacets supérieurs:

Les lacets seront fabriqués avec de la garcette, tresse polyester, de diamètre 6mm.
Chaque lacet comprendra 2 brins de 500mm chacun.
Ils seront cousus avec renfort sur la partie cylindrique à 40mm en dessous du haut de la cage.
12 lacets seront repartis sur le pourtour de la cage.

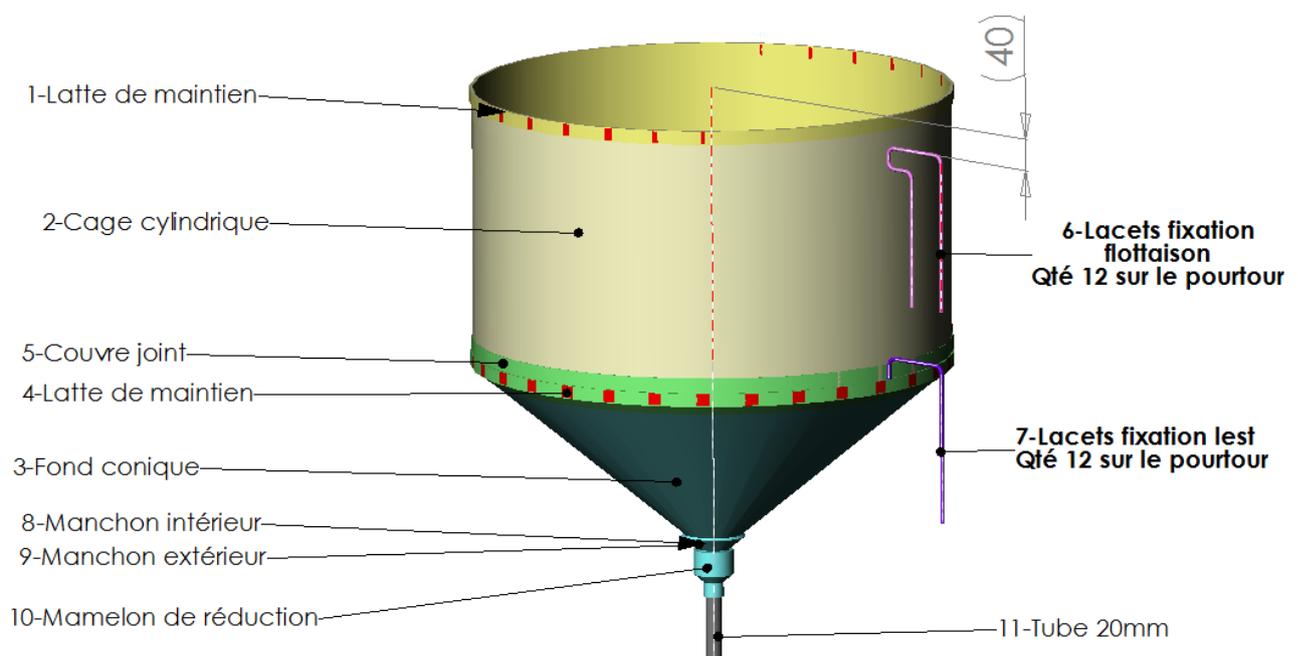
8-Descriptif Rep-7 Lacets inférieurs:

Les lacets seront fabriqués avec de la garcette, tresse polyester, de diamètre 6mm.
Chaque lacet comprendra 1 brin de 500mm.
Ils seront cousus avec renfort sur la partie cylindrique au dessus la latte inférieur rep-5.
12 lacets seront repartis sur le pourtour de la cage.

9-Descriptif pose Lacets :

Sur le pourtour, 12 lacets à 2 brins de 500mm Rep-6 seront fixés à la cage pour fixation sur système de flottaison à 40mm du haut de la cage,

Après assemblage du fond conique, pose de la latte rep-4 et du couvre joint rep-5, sur le pourtour 12 lacets à 1 brins de 500mm rep-7 seront fixés au dessus de la latte rep-4 pour permettre de lester la cage.



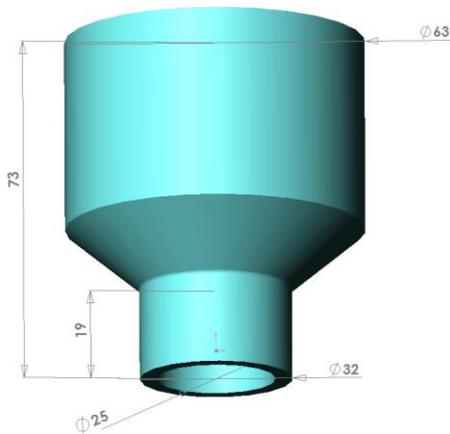
10-Descriptif Système de vidange fond conique:

Le système de vidange est constitué de 3 pièces:

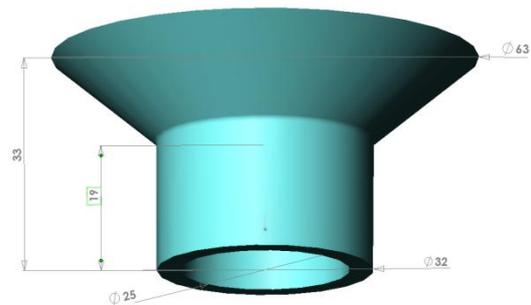
- Rep 8 : Manchon intérieur Ref 721-190-921 $\varnothing 32/63$ coupé à la fin du cône,
- Rep 9 : Manchon extérieur Ref 721-910-924 $\varnothing 40/75$ coupé à la fin du cône,
- Rep 10 : Mamelon de réduction Ref 721-900-337 $\varnothing 25/20$ pour reprise tube $\varnothing 20$,

Rep 8 : Manchon intérieur

Manchon standard

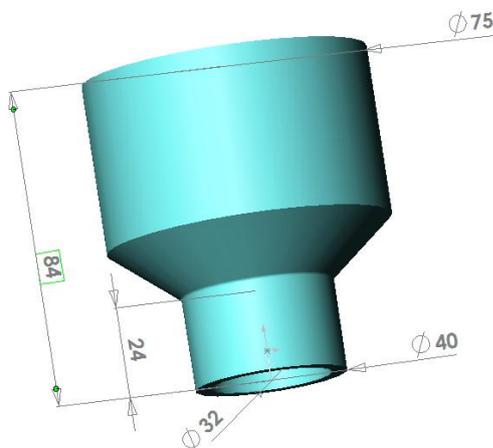


Manchon modifié

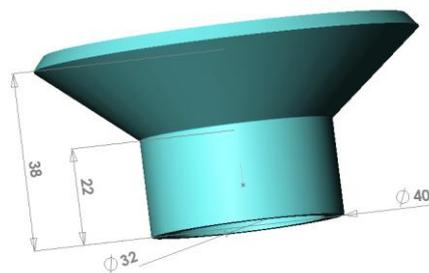


Rep 9 : Manchon extérieur

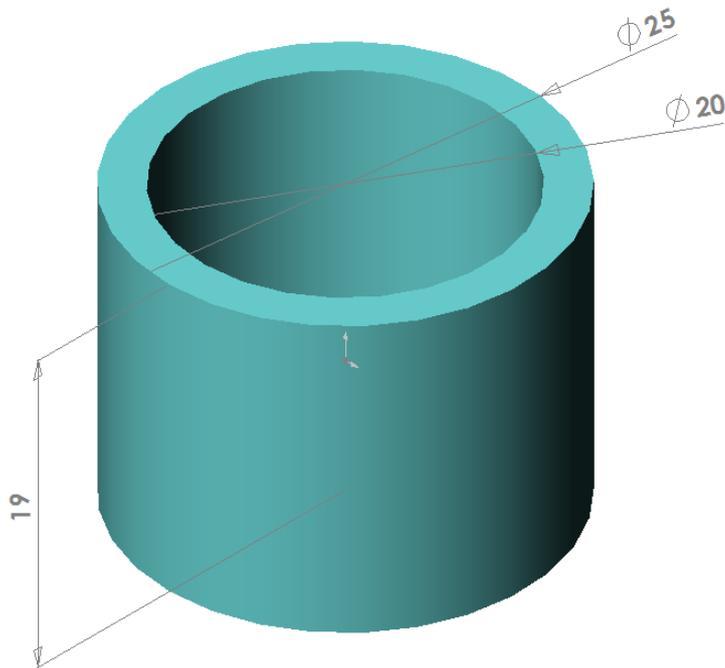
Manchon standard



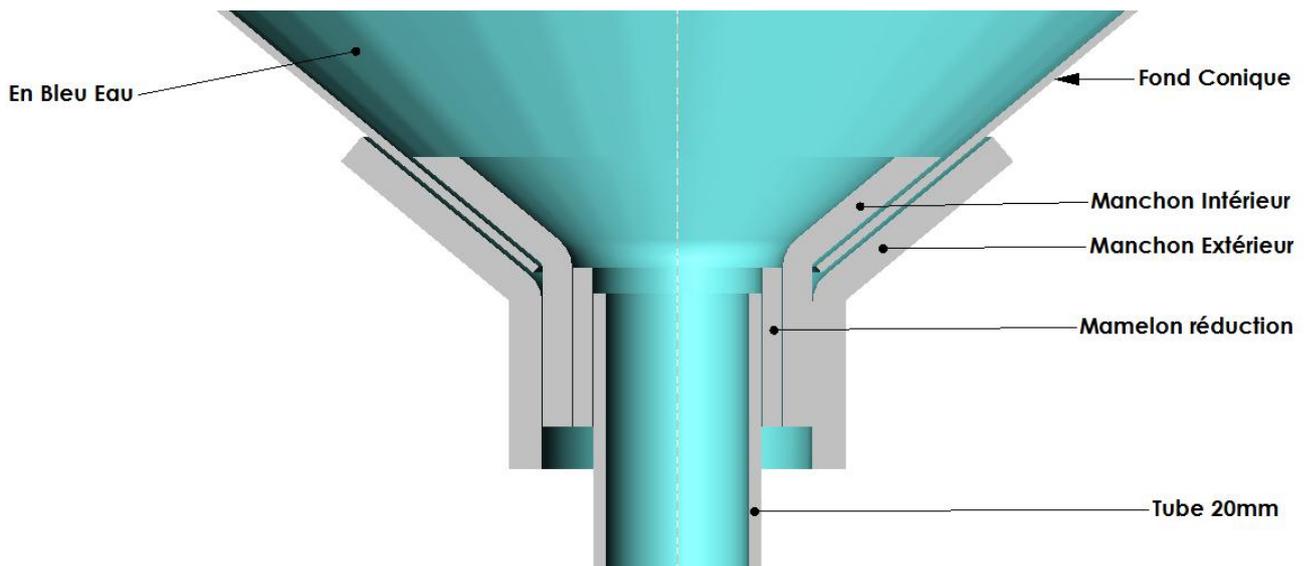
Manchon modifié



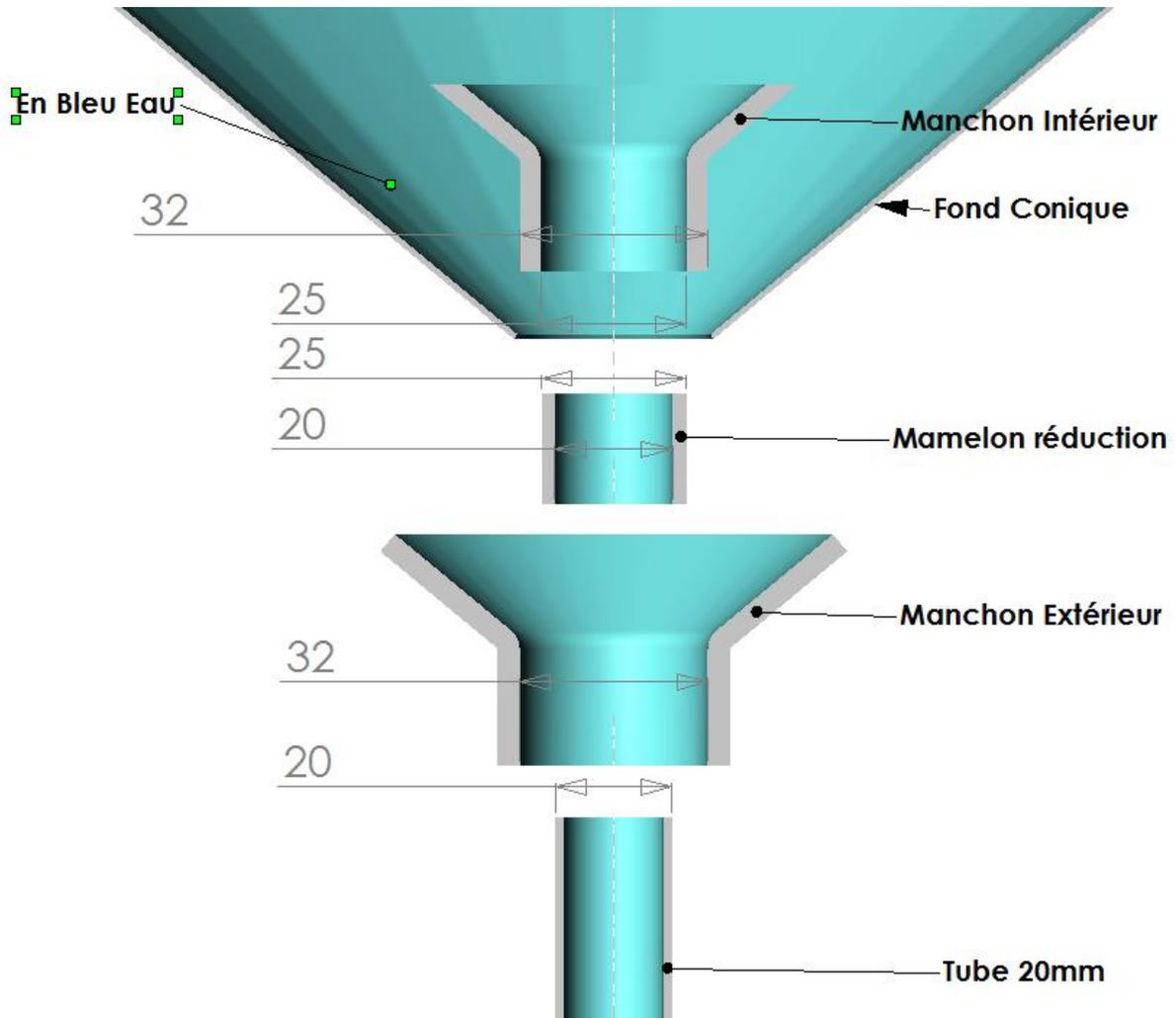
Rep 10 : Mamelon de réduction



Ensemble Assemblé



Ensemble éclaté



11-Particularités :

Le tissu sera de fourniture AquaRhéak, l'expression de besoin en mètre devra être communiqué à la remise du devis.

Les autres fournitures seront de la responsabilité du fabricant.

Note :

Toutes les modifications de conception devront être soumises à AquaRhéak avant remise de l'offre de prix et ne pourront être appliquées qu'après accord écrit et validation des concepts par la société AquaRhéak.

Les méthodes de fabrication, la sous-traitance de certaine tâche, sont sous la responsabilité du fabricant.

Un essai en eau devra être effectué avant livraison.

Le devis détaillera :

Les couts NRC

Outillage,

Patrons,

Les couts RC

Le cout d'achat des matières premières,

La main d'œuvre,

Les frais de transport,

La réponse devra détailler :

Le cycle d'appro,

Le cycle de réalisation,

Tous renseignements complémentaires peuvent être demandés à la société AquaRhéak

Projet Elicoptr : Utilisation de copépodes dans l'alimentation larvaire de *Lutjanus sebae* à l'échelle expérimentale

Eric Gasset et Denis Covès, Ifremer unité BOME, Projet DDPOM, Palavas

Luc Della Patrona, Thomas Camus, Thierry Laugier, Ifremer unité LEAD, Nouvelle Calédonie

Le 02 Novembre 2014

Objectif

Le principal objectif de ces expériences est de mesurer et comparer l'influence de différents régimes en proies vivantes administrées lors des premières phases de nourrissage exotrophique du Vivaneau *Lutjanus sebae*. Les 3 traitements testés sont: (1) copépodes calanoides ; (2) rotifères ; (3) un régime « mixte » (copépodes + rotifères).

Le protocole présenté ci-dessous testera les effets de l'utilisation de copépodes dans les premiers jours d'alimentation des larves et la comparera à une alimentation à base de rotifères et à une alimentation mixte copépodes/Rotifères.

Cette expérimentation sera réalisée et financée dans le cadre du projet ELICOPTR (Zoneco, Adecal, Ifremer). Elle est planifiée sur le dernier trimestre 2014 dans les installations du CCDTAM en Nouvelle Calédonie.

Le protocole détaillé ci-dessous est basé sur les premiers résultats acquis par le CCDTAM en phase larvaire du Pouate, sur le travail réalisé dans le cadre du post-doc de Thomas Camus depuis 1 an en matière de maîtrise de l'élevage de copépode, et sur l'expertise de l'Ifremer en termes d'élevage larvaire d'espèces tempérées et tropicales.

Matériel et méthodes

Origine des larves

Les œufs seront issus de pontes naturelles non induites à partir d'un lot de géniteurs sauvages présent sur le site du CCDTAM depuis 2013 et qui entre dans sa 2^{ème} saison de ponte.

Ponte

La ponte sera décrite par les caractéristiques ci-dessous :

- Origine (bassin et géniteurs) ;
- Date de ponte ;

- Nombre d'œufs récoltés ;
- Taux de fécondation ;
- Diamètre des œufs et du globule lipidique, nb de globule.

Le lot d'œufs permettant de mettre en œuvre une expérimentation larvaire devra présenter un taux de fécondation > à 80 %. Les œufs viables (fécondés) et non-viables seront séparés avant leur mise en incubation par décantation.

Incubation

L'incubation des œufs fécondés est réalisée directement dans les installations d'élevage larvaire. Alternativement, les œufs fécondés pourront être incubés dans la salle d'expérimentation puis les larves transférées à J2 post éclosion, i.e. lorsqu'elles sont le moins fragile mais n'ont pas encore commencées leur nourrissage exotrophique.

Les installations

L'installation comprend 9 bassins en PEHD d'un volume de 200 litres (V utile = 180 l, D =62 cm, H= 100 cm), cylindro-coniques, à paroi noire munie d'une évacuation latérale équipée d'une crépine (50 à 300 µm) Les bacs sont également équipés d'une arrivée d'eau par le fond permettant un renouvellement d'eau en continue via des débilitres. Une chasse est également installée au fond de la partie conique des bassins.

L'incubation

Les installations sont mises en eau quelques jours avant le début de l'incubation et renouvelés par le fond à raison d'un renouvellement horaire de 20 % du volume. Le débit d'air ajusté entre 80 et 100 ml/mn doit permettre une répartition la plus homogène dans tout le volume d'élevage (cages et bassins) et éviter que les œufs restent à la surface.

La densité en œufs est calculée pour obtenir la densité de larves juste écloses par litre souhaitée (10 l/l) en tenant compte d'un taux d'éclosion moyen (moyenne des résultats antérieurs) estimé à 80 %. Les conditions de l'incubation sont données dans le tableau ci-dessous.

Paramètres	Expérimentation Bassins 200 l
Eclairage	Au noir
Volume d'élevage	9 Bac cylindro-coniques 200 litres
Nombre d'œufs / litre	12
Type bullage	Aiguilles ou pipettes pasteur (assez grosses bulles)
Débit d'aération (ml/mn)	100
R. horaire en eau (%)	20
Crépines	200 µm + aération circulaire autour
Température (°C)	Proche de celle de la ponte : 28 °± 1°C

Après l'éclosion, les cages et bassins seront débarrassés au maximum (siphonage après décantation par arrêt momentané des débits d'eau et d'air) des coquilles et œufs non éclos. Le nb d'œufs non éclos sera évalué pour chaque cage ou bassin.

Le taux d'éclosion sera estimé à partir de mise en incubation individuelle d'œufs dans trois plaques de micro-titration de 24 puits de 2 ml. Elles seront maintenues à la température des bassins d'élevage (bain marie, étuve ou pièce climatisée).

Compte-tenu de la densité de larves par unité expérimentale au démarrage (10 l/L), le nombre total d'œufs fécondés nécessaires pour l'ensemble des 9 bassins est de 25000.

Elevage larvaire

Design des expérimentations

Les mêmes conditions d'élevage seront mises en œuvre sur les 9 volumes expérimentaux du début à la fin des expérimentations à l'exception de la séquence alimentaire entre DPH 2 et DPH 12 qui est résumée ci-dessous :

Bassins	Type de proies	Concentrations moyenne en proies
1, 2, 3	Copépodes Calanoïdes (Paracalanidae)	3/ml
4, 5, 6	Copépodes Calanoïdes (Paracalanidae) + Rotifères type « S »	1/ml + 5/ml
7, 8, 9	Rotifères type « S »	10/ml

L'expérimentation en bassins se poursuivra après cette phase d'alimentation comparée et intégrera le passage sur Artémia, le sevrage et l'alevinage pendant une trentaine de jours.

* : le jour de l'éclosion est appelé DPH0 (Day Post Hatching)

Conditions environnementales

La température : L'élevage se déroule à une température non-régulée comprise entre 27 et 29 °C. L'installation expérimentale des 9 bassins est à réaliser sur le site du CCDTAM dans une zone équipée d'une climatisation réversible permettant de réguler la température de l'air à 28± 1°C.

Salinité : L'élevage se fait à salinité de l'eau de mer proche de 36 ‰

Gestion du débit d'eau dans les installations : le renouvellement est de 5 % du volume par heure, après l'éclosion et pendant les 12 premiers jours, sous réserve du maintien des conditions environnementales fixées ci-dessous. Il évoluera ensuite à la hausse, dans les bassins 200 l, dès le nourrissage sur Artémia et pourra atteindre 25 à 30 % par heure en fin d'élevage.

Arrivée d'eau : L'arrivée d'eau de mer est filtrée mécaniquement, écumée et traitée à l'ozone. Il n'y a pas de recyclage. L'eau provient du château de la zone des générateurs qui alimente les 9 bassins par gravité. Elle entre dans les bassins par la base du cône via des débillites.

Aération : Elle est assurée par une aiguille ou une pipette Pasteur lestée, placée au centre du bac ou de la cage. Seule la pointe de l'aiguille ou de la pipette est positionnée dans l'évacuation centrale, le lest est posé sur le fond du bassin (reproductibilité de l'hydrodynamisme).

Débit d'air : Entre DPH1 et DPH2 le débit doit permettre une bonne répartition des larves dans le milieu. Il est de l'ordre de 80 à 100 ml/mn. A partir de DPH3 et jusqu'à DPH 6, ce débit est diminué (30 à 50 ml/mn) pour permettre aux larves d'accéder à la surface du bassin (période d'inflation des vessies natatoires) et faciliter la prise alimentaire. Il est ensuite augmenté progressivement afin d'homogénéiser notamment les Artémia dans le milieu.

Les installations sont équipées de débit-litres adaptés aux gammes de débits :

- Eau : de 0.2 à 2 l/mn ;

Ecrémeur de surface : Les bassins sont équipés d'un système individuel de nettoyage de la surface (écrémeur) participant à l'entretien efficace de la surface de l'eau du bassin nécessaire à l'apparition de vessies natatoires fonctionnelles chez les larves. Il est mis en place à DPH3 et il est conservé tant qu'il est efficace dans le nettoyage de la surface. Il est maintenu en parfait état particulièrement de DPH3 à DPH6, période supposée d'inflation des vessies natatoires. Il est placé et réglé de façon à ne pas piéger de larves.

Intensité lumineuse L'intensité souhaitée est de 600 lux à la surface des bassins sur l'ensemble de l'élevage. Ces intensités sont mesurées et réglées avant la mise en élevage, et mise en route à la première alimentation. Elles sont obtenues grâce à un jeu de mailles positionnées autour des néons (qualité blanc industrie) qui seront retirées en fonction de l'augmentation souhaitée de l'intensité.

Photopériode : La photopériode est continue, 24H de jour entre DPH2 et DPH 12. Sur les bassins, elle sera ensuite diminuée à 14h de jour et 10 heures de nuit lors du passage des 9 bassins sur Artémia dès DPH13.

■ Contrôle des conditions environnementales

La fréquence et la méthode de contrôle sont résumées dans le tableau ci-dessous pour l'ensemble des paramètres suivis :

Paramètres	Fréquence de mesure	Appareils de mesure	Valeurs fixées
Température (°C)	2 fois/jour	Multi-sonde ODEON	28°C (±1)
Salinité (‰)	1 fois/jour	Conductimètre WTW	36‰ (±1)
pH	1 fois/jour	Multi-sonde ODEON	> 7,5
Oxygène dissous (%)	1 fois/jour	Sonde Oxyguard	> 80% sat
Potentiel redox (mv)	1 fois/jour	Multi-sonde ODEON	> 200 mv
Azote ammoniacal, (mg/l)	1 fois/semaine	Sea test/Photomètre	< 0.2mg/l

■ Alimentation

La séquence alimentaire durant la période d'alimentation comparée est proposée dans le tableau ci-dessous. Elle est basée d'une part sur l'expérience acquise sur les espèces tropicales ayant fait l'objet d'un travail de

maitrise zootechnique (Ombrine, Platax) et d'autre part sur l'analyse bibliographique des croissances obtenues sur différentes espèces de *Lutjanus* (*guttatus*, *analys*, *synagris*...). Elle pourra de ce fait être adaptée en temps réel aux résultats obtenus sur *L. sebae*.

Type de proies	À compter de DPH13
Nauplii <i>Artémia</i>	DPH 13 –DPH 16
<i>Artémia</i> pré-grossis	DPH 15 –DPH 22
Cofeeding Micro-Gemma 75 /150	DPH 17 –DP19
Sevrage Micro-Gemma 150/300	DPH 20 –DPH 26
Le Gouessant Marin Start AL1	DPH 25 –DPH 30

La méthode de gestion des différentes proies est décrite ci-dessous. Le principe général repose sur une estimation quotidienne de la concentration des différentes proies dans les bassins et sur le réajustement qui en découle.

La gestion de l'apport de microalgues :

Afin de permettre la reproduction des copépodes et la production de nauplii dans les bassins d'élevage larvaire, un apport des microalgues *Isochrysis galbana* (T-Iso) et *Chaetoceros muelleri* sera réalisé quotidiennement (en 2 ou 3 fois) de façon à maintenir des concentrations de l'ordre de 50.000 cellules par ml.

En se basant sur une concentration moyenne de 3 millions cellules/mL pour T-iso, et de 2 millions cellules/mL pour *Chaetoceros* en culture, on peut estimer les quantités requises en microalgues comme il suit :

Pour des bacs de 200L (Volume utile 180L, soit $9 \times 180L = 1620L$), cela représente un apport initial de 13.5L de T-iso et 21L de *Chaetoceros*. Environ 13L d'algues neuves seront ajoutés quotidiennement pour maintenir les concentrations visées.

La gestion des Copépodes :

La concentration en copépodes est mesurée une fois par jour et réajustée aux valeurs souhaitées. La quantité totale de copépodes requise initialement pour démarrer l'expérience avec les concentrations souhaitées est de :

3 bacs de 180L [3 cop/mL] + 3 bacs de 180L [1 cop/mL], soit approx. 2.000.000 copépodes pour démarrer la manip en bacs de 200L

Le volume de production copépode permettant le maintien de ces concentrations est estimé à environ $1m^3$ et sera cultivé dans la salle copépode.

La gestion des Rotifères :

La quantité totale de rotifères produite est d'environ 15 millions par bassin/ jour pour les 3 bassins et cages larvaires recevant des rotifères uniquement et de 7.5 millions par bassin/ jour pour les 3 bassins du régime mixte rotifères + copépodes. Sa production est divisée en 2 parts inégales (1/3 + 2/3) :

- La première part (1/3 du total) correspond au total des rations qui vont être fournies aux larves au cours des 8 heures d'alimentation manuelle. Cette quantité (enrichie pendant la nuit précédente dans

le bac de production) est stockée au froid (après rinçage) grâce à des bouteilles congelées changées toutes les 2 heures dans une cuve de 40 litres. La distribution de ces rations débute par une quantité permettant d'atteindre la concentration souhaitée dans chacun des bassins ou cages. Elle est suivie par trois distributions faites toutes les 2 heures en fonction de la diminution des concentrations observées.

- Les 2/3 de rotifères restant mis le matin dans le bac d'enrichissement sont récoltés et rincés en fin de journée. Ils représentent la quantité qui sera distribuée en continu par la pompe péristaltique entre le soir et le lendemain matin. Le débit de la pompe est calculé en fonction du temps de distribution (16 heures) et du volume de stockage des proies. Ce système doit permettre de maintenir une concentration suffisante de proies dans les bassins pour permettre aux larves de se nourrir en permanence :
 - Débit pompe péristaltique = 48 ml/mn soit 2.9l/h par canal
 - Temps de distribution en continu (entre 17h et 9h) = 16h
 - Quantité totale de rotifères à stocker (2/3 de la ration journalière) = $(3 \times 15) \times 2/3 + (3 \times 7.5) \times 2/3 = 45$ millions
 - Volume à distribuer pour les 3 bassins sur Rotifères : $3 \text{ bassins} \times 2.9 \text{ litres/h} \times 16\text{h} = 140\text{l}$
 - Volume à distribuer pour les 3 bassins sur Rotifères+ copépodes : $(3 \text{ bassins} \times 2.9 \text{ litres/h} \times 16\text{h})/2 = 70 \text{ l}$
 - Volume total de la cuve de stockage > à $140 + 70 = 210$ litres
- Enrichissement : La veille de sa récolte le bac de culture de rotifères reçoit une dose d'enrichissement de Easy DHA Selco® de 0.1 g/million. Le lendemain les rotifères produits (ceux qui seront distribués en fin de journée) reçoivent une dose journalière d'enrichissement de 0.3 g/million d'Easy DHA Selco® distribuée en une fois juste après la récolte des rotifères et le passage dans ce bac d'enrichissement.
- La densité des proies dans les bassins larvaires est vérifiée 2 fois par jour sur un bassin représentatif par un prélèvement de 5 ml et un comptage sous la binoculaire.

Gestion de la distribution des Artémia (Procédure de production des Artémia en annexe 1 à 3):

Les Artémia (nauplii et métanauplii) sont distribués de façon manuelle entre 2 et 6 fois par jour. Les quantités distribuées sont ajustées quotidiennement en fonction de la consommation qui pourra être comparée aux prédictifs de consommation (annexe 4) pour évaluer les performances de l'élevage en temps réel.

La dernière distribution est réalisée en fin de journée grâce à une pompe péristaltique qui est programmée pour fonctionner sur la période d'éclairage restante.

Stockage des proies : Les Artémia sont récoltés en une seule fois en début de journée puis stockés à 10 °C (fort ralentissement du métabolisme) entre deux distributions grâce à un système de bain-marie relié à un groupe froid.

Distribution des Micro-particules:

- **Cofeeding :** A partir de DPH 17, la micro-particule Gemma micro 75 et 150 (SKRETTING®) est distribuée en cofeeding avec les Artémia par saupoudrages manuels au travers d'un tamis

(salière) et sur les périodes plus longues grâce à un distributeur automatique programmable (ou tapis).

- **Sevrage** : au cours de cette phase à partir de DPH 20, la micro-particule remplace peu à peu l'utilisation des *Artémia* en augmentant la période d'utilisation de cette dernière.

Le rationnement au cours de cette période (DPH 20 à DPH 30) évoluera entre 20 et 10 % des biomasses par jour. L'estimation de la survie et de la croissance sera utilisée pour prévoir les stocks des différents aliments nécessaires aux expérimentations.

Entretien

Crépines des bassins : La taille des mailles de la crépine est adaptée aux types de proies et à l'évolution des colmatages. Elle est de 50 μm pour la première période, et évoluera à 300 μm en fin de l'élevage. L'objectif est de ne pas trop stocker de « vieilles » proies dans les bassins tout en ayant la possibilité d'avoir une bonne information sur la disparition des proies issue de la consommation des larves (et non à cause de la perte au travers de la crépine). Il est, en outre, important de trouver le bon compromis entre le maintien de la densité des proies dans le bassin et l'élimination des déchets en évitant le colmatage. Tout au long de l'élevage les crépines de mailles 500 μm peuvent être utilisées au cours de l'alimentation en proies pour permettre l'évacuation d'une ration trop importante. Elles sont nettoyées entre 1 et 3 fois par jour.

Tuyaux de distribution et cuves de stockage de proies vivantes : les cuves de stockage des proies et les canalisations de distribution automatique sont nettoyées, désinfectées et rincées tous les jours (annexe 3).

Siphonage : le nettoyage du fond des bassins et des cages est réalisé à l'aide d'un siphon dont la taille est adaptée à la capacité des larves à ne pas être aspirées (canne en verre de 8 mm).

Le nettoyage de l'écrémeur est effectué entre DPH 3 et DPH 6 plusieurs fois par jour (période d'inflation des vessies).

Critères d'évaluation des résultats

Lors d'échantillonnages réalisés aux DPH clés du larvaire les éléments suivants seront mesurés sur 20 à 30 larves par unité expérimentale prises au hasard :

- Croissance linéaire dès DPH 1 et pondérale (dès que possible) ;
- La réplétion stomacale dès la 1^{ère} alimentation DPH2 ;
- Apparition et description de la chronologie de l'évolution de certains organes
 - Vessie natatoire dès DPH 3,
 - Vésicule vitelline et gouttelette lipidique dès DPH 1,
 - Torsion de la chorde...
- les différentes anomalies
 - Cristaux vessies urinaires,
 - Pigmentation,

- Mandibules (bec de canard),
- Absence d'opercules.

Le stockage de ces échantillons (lyophilisés) permettra des analyses biochimiques des larves. L'activité enzymatique sera également déterminée.

Estimation de la survie

L'estimation de la survie de l'élevage larvaire est prévue à la fin de chaque expérimentation. L'arrivée d'eau dans les bassins est stoppée, un micro-bullage d'oxygène est mis en service et les larves sont concentrées puis pêchées au bêcheur. L'estimation du nombre est ensuite réalisée par comptage individuel de toutes les larves.

Un suivi journalier de la mortalité (chasse + siphonage) sera tenté tout au long du larvaire malgré la difficulté que cela représente sur de si petites larves en début d'élevage.

Répartition spatiale et comportement des larves

La répartition spatiale des larves et leur situation dans le volume d'eau peut évoluer au cours du temps. Elle est définie par des comportements de parois, de surface, de fond et de pleine eau. La répartition dans le bassin peut être homogène ou plutôt de type « essaim ». Cette répartition peut également être reliée (et donc caractérisée) à des modifications environnementales (éclairage, alimentation). Tous les éléments comportementaux sont des éléments importants dans l'établissement des normes d'élevage. Outre les comportements alimentaires (posture de chasse), d'autres types de comportement (fuite, attraction, réaction) sont notés.

Gestion des données

Un cahier de laboratoire est mis en service dès le début de l'expérimentation.

Un exemple de fiche de suivi journalier est présenté en annexe 5.

Les analyses statistiques seront réalisées grâce au logiciel Statistica V10.

Bibliographie

PANINI E.B., MYLONAS C.C., ZANUY S., CARRILLO M., RAMOS J., BRUCE M. P., 2001. **Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates.** *Aquaculture International* **9**: 189–195, 2001.

Clarke M.E., Michael L. Domeier and Wayne A. Laroche, 1997. **DEVELOPMENT OF LARVAE AND JUVENILES OF THE MUTTON SNAPPER (LUTJANUS ANALIS), LANE SNAPPER (LUTJANUS SYNAGRIS) AND YELLOWTAIL SNAPPER (LUTJANUS CHRYSURUS).** *BULLETIN OF MARINE SCIENCE*, 61(3): 511–537

- Boza-Abarca J., Calvo-Vargas E., Solis-Ortiz N., Komen J., 2008. **Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica**. *Ciencias Marinas* (2008), 34(2): 239-252
- Boza-Abarca J., Valverde-Chavarria S., Calvo-Vargas E., Ramirez-Alvarado M., Rodriguez-Gómez E., 2011. **Hormone-induced spawning of wild and captive-grown spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* using carp pituitary suspension and human chorionic gonadotropin**. *Ciencias Marinas* (2011), 37(2): 125-139
- Doi M., Ohno A., Kohno H., Taki Y. and Singhagraiwan T., 1997. **Development of Feeding Ability in Red Snapper *Lutjanus argentimaculatus* Early Larvae**. *Fisheries Science* 63(6), 845-853 (1997)
- Riley C.M., Holt G.J., Arnold C.R. **Growth and morphology of larval and juvenile captive bred yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus***. Marine Science Institute The University of Texas at Austin
P.O. Box 1267, Port Aransas, Texas 78373
- Leu M-Y. and Liou C-H., 2013. **The larval development of the Russell's snapper, *Lutjanus russellii* (Teleostei: Lutjanidae) reared under laboratory Conditions**. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2013, 93(6), 1695–1701.
- 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 (2013) 153–158
- Tønnessen Busch K.E., 2010. **Optimal growth and survival of first-feeding cod larvae in culture challenges related to their small size**. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J., 2000. **Early weaning of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet**. *Aquaculture* 189, 109-117.
- Benetti, D.D., Orhun, M., Sardenberg, B., O'Hanlon, B., Welch, A., Hoenig, R., Zink, I., Rivera J.A., Denlinger, B., Bacoat, D., Palmer, K., & Fernando, C., 2008. **Advances in hatchery and grow-out of cobia *Rachycentron canadum***. *Aquaculture Research* n° 39 (pp, 701-711)
- Cahu, C., Zanbonino Infante, J., Escaffre, A.M., Bergot, P., Kaushik, S., 1998. **Preliminary result on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding**. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169, 1-7.
- Cahu, C., Zanbonino Infante, J., 2001. **Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae**. *Aquaculture* 200, 161-181
- Chatain B. et D. Covès, 1991. **Current status of french intensive larval rearing techniques for sea bass and sea bream**. Poster
- Chatain B. 1994. **Estimation et amelioration des performances zootechniques de l'élevage larvaire de *Dicentrarchus labrax* et de *Sparus Auratus***. Thèse de doctorat. Université de Marseille 2.
- Covès D. et E. Gasset, 1993. **Gilthead seabream (*Sparus Auratus*) intensive larval rearing in closed system**. Poster
- Curnow, j., King, J., Bosmans, J., Kolkosvski, S., 2006. **The effect of reduce *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae**. *Aquaculture* 257, 204-213.
- Gasset E. 1991. **Elevage larvaire du Loup *Dicentrarchus Labrax*. Standards d'élevage 1990-1991 à la station Ifremer de Palavas**. MERA, 1991
- Gasset E. et al. 2006. **Méthode d'élevage larvaire du platax**. 10p Ifremer, Aquapoly
- Gasset E. et D. Covès, 1993. **Elevage larvaire de la Dorade en circuit fermé à l'échelle pilote**. MERA, 1993.

Ounais-Guchemann, 1989. **Définition d'un modèle d'élevage larvaire intensif pour la Daurade Sparus Auratus**. Thèse de doctorat. Université de Marseille 2.

Petton B., 2002. **Les phases précoces de l'élevage de l'Ombrine Sciaenops ocellatus**. ARDA, Rapport d'activité 2002.

Petton, B., Falguiere, J.C., 2006. **Total replacement of Artemia with artificial microbound diets in larval culture of Red drum Sciaenops ocellatus in Martinique**. Poster. Rencontre Aquacole Martiniquaise, Novembre 2006.

Sekoa M., Kurata M., Hatanaka Y., Biswas AK., Ji SC., Kumai H., 2007. **Possible nutrients in Artemia affecting the larval growth of Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis**. Aquacult. Sci. 55: 55-64.

Tian, X., Qin, J.G., 2004. **Effects of previous ration restriction on compensatory growth in barramundi Lates calcarifer**. Aquaculture 235, 273-283.

Gasset E., Covès D. 2011. **Maitrise du cycle biologique en captivité, exemple de la domestication de Platax orbicularis en Polynésie française**. Poster, Journées portes ouvertes Centre Ifremer de Méditerranée, 20 au 22 mai 2011.

Gasset E., Remoissenet G., Maamaatuaiahutapua M., Covès D., 2009. **Démarche de domestication d'une nouvelle espèce de poisson lagunaire (Platax orbicularis) en Polynésie française. Prise en compte des aspects de durabilité**. Présentation au 2^{ème} séminaire « domestication aquacole » CIRAD, Montpellier, 25 et 26 novembre 2009 (présentation orale)

Gasset, E., Remoissenet, G., 2011. **Le paraha peu Platax orbicularis**. Quae, Versailles, 64 pp.

Annexe 1 : La production des Artémia

- **Nauplii** : L'eau et les cystes sont chlorés/déchlorés selon la méthode jointe en annexe 3. L'incubation des cystes est de 24 h en bassin de 200 litres fortement aéré (max 2g/l). Après une purge rapide et une décantation d'une vingtaine de minute (opercule à la surface et spot en fond de bac), ils sont récoltés sur une maille de 80 µm par la vanne de purge du bac. Les cystes utilisés sont des INVE® type AF choisis pour leur petite taille ($\pm 430 \mu\text{m}$) et leur niveau élevé en HUFA.
- **Artémia de un jour (A1)** : Ils sont produits dans deux bacs de 300 litres et sont enrichis pendant 24 h avec du Easy DHA Selco (1g/million en 2 repas). Les cystes utilisés sont des INVE® type AF. Un petit apport d'oxygène pur peut être utilisé en fonction des valeurs de concentration d'O₂ mesurées lors de l'enrichissement. L'enrichissement pourra également être apporté en continu par une pompe péristaltique.

Annexe 2 : Protocole de chloration et déchloration des cystes d'Artémia

- Remplir d'eau le bac d'éclosion des cystes ;
- Mettre la quantité de cystes à éclore ;
- Mettre dans l'eau du bac 100 ml par m³ (15 ml pour 150 litres d'eau) de javel à 12°chlore ;
- Attendre 10 minutes puis verser un volume équivalent d'une solution de thiosulfate à 220 g par litre.

Annexe 3 : Procédure d'entretien du système de distribution des proies vivantes par pompe péristaltique

1. Sortir les tubes de chaque bassin et les « brancher » au raccord plastique sur le rebord du bassin (l'écoulement doit se faire à l'extérieur du bassin).
2. Sortir les tubes et les bullages des bacs de distributions (BD), les rincer.
3. Ouvrir la vanne de fond pour vidanger les BD
4. Rincer les BD
5. Nettoyer les BD, les tubes et les bullages avec l'éponge et du savon bactéricide
6. Rincer les BD, les tubes et les bullages
7. Fermer la vanne de fond. Remettre les tubes et les bullages dans les BD et mettre ½ litre d'Oxonia à 10 % au fond
8. Mettre la pompe en route sur graduation assez rapide (40 pour LII, 90 pour LIII).
9. Après ¼ d'heure, ouvrir la vanne, rincer les BD, les tubes et les bullages
10. Fermer la vanne et remplir d'eau douce (20 litres) pour rincer les canalisations en gardant les pompes sur un débit important.
11. Après ¼ d'heure :
 - a. Ouvrir la vanne pour vidanger la cuve
 - b. Refermer la vanne
 - c. Remettre les pompes sur le débit de distributions (20 sur LIII, 17 sur LII).
 - d. Remettre tous les tubes dans les bassins d'élevage
12. La ration de proies à distribuer peut alors être mise dans les BD

Annexe 4 : Prédicatif de consommation d'Artémia et des besoins en cystes

ELEVAGE LARVAIRE Lutjanus Sebae						nb de bassin=		9				
Estimation des besoins en						nb de J0 par litre=		10				
A0 Inve AF et A1 Salt Creek EN MILLIONS						nb de J0 par bassin=		2000				
						nb de J0 total=		18000				
salle larvaire						salle de proies						
		Besoin par bassin		total production		Date total		Date total		Volume mini (L)		
DATE	AGE	A0 AF/bac	A1 SC/bac	A0 AF/bac	A1 SC/bac	Grammes de cystes A0 AF mis en élevage		Grammes de cystes A1 SC mis en élevage		Ecllosion AO 1g/l gross. Ao/A1		
		(millions)		(millions)						cystes AF	cystes SC	100 AO/ml
15-oct-14	13	1		9		14/10	45			45		
16/10	14	1,5		13,5		15/10	67,5			68		
17/10	15	2	0,5	18	4,5	16/10	90	14/10	32,4	90	32	54
18/10	16	2,5	1	22,5	9	17/10	112,5	15/10	64,8	113	65	108
19/10	17		3		27	18/10		16/10	194,4		194	324
20/10	18		4		36	19/10		17/10	259,2		259	432
21/10	19		5		45	20/10		18/10	324		324	540
22/10	20		6		54	21/10		19/10	388,8		389	648
23/10	21		7		63	22/10		20/10	453,6		454	756
24/10	22		8		72	23/10		21/10	518,4		518	864
totaux		=	7	34,5	63	310,5	315		2235,6			

Annexe 5 : Fiche type d'élevage

Fiche journalière élevage larvaire						cycle N°				
date		Bassin		circuit matin	circuit soir	DPH				
Température						Changement paramètres :		Biométries		
salinité					échant. Eco.					
pH										
Potenciel redox										
O2 dissous (%)										
				Crépines						
				écremeur						
		Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Paramètre testé										
Débit d'eau	l/mn									
Débit d'air	ml/mn									
mortalités	n									
Type de proies	Heures	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin	Bassin
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Observations:										

Annexe 6 : liste du matériel expérimental et des consommables

- 9 bacs d'élevage 200 litres (Volume utile 180L)
- Alimentation des 9 bacs en eau de mer filtrée en pvc diam 20 mm :
 - Par le fond
 - Au travers un débitmètre (fournisseur Radiospare ou Fisher)
 - Evacuation latérale en partie haute (- 10cm de la hauteur totale) en \varnothing 40mm au travers de crépine équipé de chaussettes filtrantes (41 à 500 μ m)
- Alimentation des 9 bacs en air filtré sur cartouche 1 μ m
- Chaque bac reçoit un éclairage contrôlé par une horloge et n'est pas soumis à des lumières parasites
- 9 canaux de pompe péristaltique pour l'alimentation continue (notamment pendant l'absence du personnel) et les tubes de rechange
- 1 écrémeur par bac
- Seaux 20 l, beshers 0.5 et 1l en verre, pipette 1, 3 et 10 et 25ml
- Des petits bulleurs, des robinets et du tuyau cristal 6 mm, des raccords plastiques, des colliers plastiques (type Colson), un peu d'outillage en bon état, lampe électrique frontale, de la maille pour faire des tamis, du MS 222 (anesthésique)
- Ne pas oublier de commander à l'avance le consommable : Cystes d'Artémia, produits d'enrichissement, les aliments sevrage et alevinage, produits de nettoyage désinfectants et bactéricides, de l'alcool....
- Une bino, cuve de dolffus, verre de montre, des plaques de micro-puits (on peut les fournir)....

