

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

EFFET DE L'ADDITION DE *RHODOMONAS SALINA* DANS LE RÉGIME
ALIMENTAIRE DE *PECTEN MAXIMUS*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Comme exigence partielle du programme en océanographie

PAR

RENÉE GAGNÉ

4 DÉCEMBRE, 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur Réjean Tremblay, professeur-chercheur en aquaculture à l'ISMER, sans qui cette expérience n'aurait pas eu lieu. Réjean merci pour ta confiance, ton aide continue, ta disponibilité et tes nombreux conseils. Ce fut un plaisir d'apprendre à tes côtés.

Merci à mon co-directeur, Fabrice Pernet, de l'Institut de recherche sur les zones côtières de Shippagan, pour tes nombreux conseils, ta rigueur ainsi que le partage de tes connaissances. J'en profite, pour te souhaiter bonne chance dans tes projets futurs en France.

Je voudrais remercier toute l'équipe du Laboratoire de physiologie des invertébrés marins du centre IFREMER de Brest, sans qui, cette expérience n'aurait pu être réalisée. Tout d'abord merci à Philippe Miner qui m'a assisté durant les élevages larvaires et post-larvaires. Merci pour ta patience, ta disponibilité, le partage de tes connaissances et pour ton amitié. Merci à Jean-René Le Coz pour son assistance lors des analyses biochimiques et sa patience inconditionnelle. Merci à Jean-François Samain pour m'avoir permis de participer à cette belle équipe. Merci à Olivier Gastineau et Virgil Quillien pour leur aide en laboratoire. Un gros merci à cette belle équipe pour les magnifiques moments passés à vos côtés dans votre petit coin de pays et au plaisir de vous revoir très bientôt.

Merci à toute l'équipe d'ARGENTON et du TINDUFF, pour l'utilisation des infrastructures nécessaires lors des élevages post-larvaires et votre aide durant les élevages.

Un merci particulier à ma famille sans qui, je ne serais pas rendue où je suis aujourd'hui. Merci de toujours m'avoir encouragée à poursuivre mes projets et de m'avoir soutenue dans les moments plus difficiles. Merci à mes amis (es) et mon copain qui ont su m'aider et m'encourager dans cette belle expérience de vie.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, la Société de développement de l'industrie maricole, le Ministère des relations internationales du Québec et le Réseau Aquaculture Québec.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet de l'addition de *Rhodomonas salina* dans le régime alimentaire de *Pecten maximus* sur la croissance, la survie et le succès de métamorphose en relation avec le contenu biochimique. La microalgue *Rhodomonas salina* (R) a été ajoutée à un régime alimentaire standard couramment utilisé en éclosierie-nurserie (*Pavlova lutheri* (P), *Isochrysis galbana* (T) et *Chaetoceros calcitrans* (C)). La qualité du régime alimentaire, particulièrement la teneur en acides gras polyinsaturés, est un facteur essentiel dans le succès du développement larvaire, post-larvaire et juvénile. Nos résultats démontrent que l'addition de *R. salina* semble avantageuse avec une métamorphose plus rapide, mais aucune différence n'a été observée sur la croissance et la survie entre les deux régimes alimentaires à l'étude. Une accumulation plus rapide des triglycérides chez les larves nourries par PTCR dans les 19 premiers jours de l'élevage larvaire pourrait expliquer cette métamorphose plus rapide. Les larves et post-larves nourries avec le régime PTCR ont démontré une accumulation importante de AA (20:4n-6), mais une concentration plus faible en DHA (22:6n-3) et en EPA (20:5n-3). Une incorporation préférentielle de DHA et AA dans les lipides polaires a été observée pour les deux régimes, ce qui démontre l'importance de ces acides gras sur le métabolisme de *P. maximus*. La composition en stérol observée chez les larves nourries avec PTCR démontre une forte concentration de brassicasterol. Ces résultats suggèrent que le brassicastérol semble être un stérol très important qui pourrait même remplacer certaines fonctions membranaires du cholestérol.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE PREMIER	
LIPID REQUIREMENTS OF THE SCALLOP <i>PECTEN MAXIMUS</i> (L.) DURING LARVAL AND POST-LARVAL DEVELOPMENT IN RELATION TO ADDITION OF RHODOMONAS SALINA IN DIET	9
ABSTRACT	10
1.1 INTRODUCTION	11
1.2 MATERIAL AND METHODS	13
<i>1.2.1 Animal maintenance</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2 Experimental design</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3 Growth, survival and metamorphic success</i>	<i>15</i>
<i>1.2.4 Biochemical analysis</i>	<i>16</i>
<i>1.2.5 Statistical analysis</i>	<i>18</i>
1.3 RESULTS	19
<i>1.3.1 Scallop performance</i>	<i>19</i>

1.3.2 Protein, lipid and carbohydrate (PLG) and Organic matter (OM)	21
1.3.3 Triacylglycerol	22
1.3.4 Fatty acids	23
1.3.5 Sterols	27
1.4 DISCUSSION	29
1.4.1 Effect of microalgal diets on larval performance	29
1.4.2 Effect of diet and ontogeny: gross biochemical composition of scallops	29
1.4.3 Effect of diet and ontogeny: fatty acid composition of scallops	30
1.4.4 Effect of diet and ontogeny: sterol composition of scallops	32
1.5 CONCLUSION	34
1.6 ACKNOWLEDGEMENTS	34
1.7 DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	36
1.8 BIBLIOGRAPHIE	39
1.9 ANNEXES	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 <i>Pecten maximus</i> . Organic matter (% total matter) and biochemical content (ng larvae ⁻¹) in 27 d-old scallops fed PTC and PTCR.....	21
Tableau 2 <i>Pecten maximus</i> . Fatty acid composition for neutral lipids in larvae and post-larvae fed PTCR and PTC diets expressed as % of total fatty acids (TFA).....	24
Tableau 3 <i>Pecten maximus</i> . Fatty acid composition for polar lipids in larvae and post-larvae fed PTCR and PTC diets expressed as % of total fatty acids (TFA)	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation du cycle de vie de <i>Pecten maximus</i>	3
Figure 2 <i>Pecten maximus</i> . Shell length and survival of larvae and post-larvae fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization	20
Figure 3 <i>Pecten maximus</i> . Occurrence of double-rings of larvae fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization.....	21
Figure 4 <i>Pecten maximus</i> . Triacylglycerol concentration in scallops fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization.....	22
Figure 5 <i>Pecten maximus</i> . Levels of AA (20:4n-6), EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) for neutral and polar lipids in scallops fed PTCR and PTC as a function of the day post-fertilization.....	26
Figure 6 <i>Pecten maximus</i> . Levels of cholesterol, brassicasterol, stigmaterol and β -sitosterol in scallops fed PTCR and PTC as a function of the day post-fertilization.....	28

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 <i>Pecten maximus</i> . Taux de croissance des larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation	48
Annexe 2 <i>Pecten maximus</i> . Survie des larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation	49
Annexe 3 <i>Pecten maximus</i> . Apparition de double barre chez les larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation.....	50
Annexe 4 <i>Pecten maximus</i> . Matière organique (%) et contenu biochimique (ng larve ⁻¹) des larves nourries avec les régimes PTC et PTCR pour les jours 18-23-32-38 et 45.....	51
Annexe 5 <i>Pecten maximus</i> . Concentration en triglycérides dans les larves nourries avec les régimes PTC et PTCR.....	52
Annexe 6 <i>Pecten maximus</i> . Composition en AA (20:4n-6), EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) pour les lipides neutre et polaire dans les larves nourries avec les régimes PTCR et PTC, exprimée en % de la masse d'acides gras totaux.....	53
Annexe 7 <i>Pecten maximus</i> . Concentration de cholestérol, brassicastérol, stigmastérol et β -sitostérol dans les larves nourries avec les régimes PTCR et PTC en fonction des jours post-fécondation, exprimée en % de la masse de stérol total	54

INTRODUCTION GÉNÉRALE

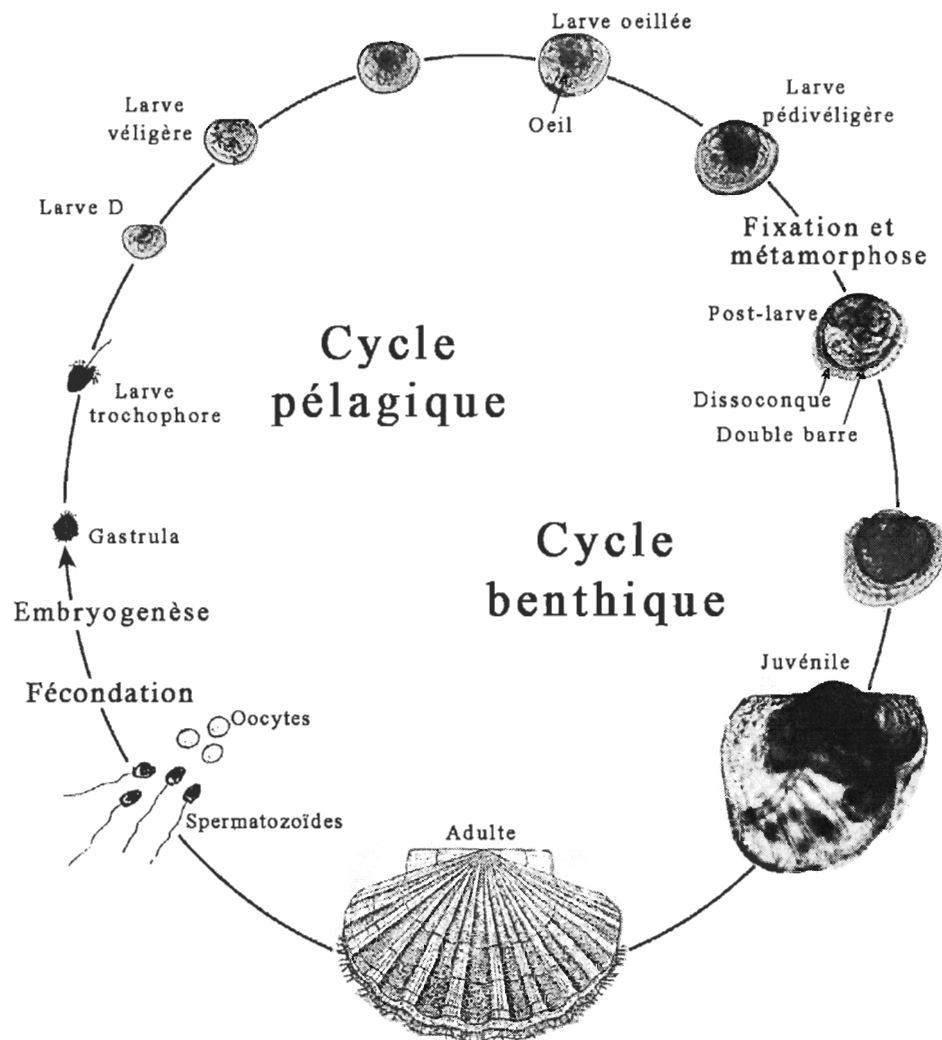
Généralité

La famille des Pectinidés regroupe plus de 300 espèces de mollusques bivalves dans le monde et est l'une des principales ressources halieutiques, mais seulement trois espèces de la famille des Pectinidés sont principalement exploitées dans les eaux de l'Atlantique Nord *Chlamys islandica* (Pétoncle d'Islande), *Pecten maximus* (Coquille Saint-Jacques) et *Placopecten magellanicus* (Pétoncle géant). Pendant plusieurs années, des études ont été entreprises pour développer l'aquaculture de bivalves à haute valeur commerciale (Le Pennec et al. 2003). En France, *Pecten maximus* est l'une des espèces les plus étudiées en raison de sa valeur commerciale mais aussi due à la grande diminution des stocks naturels engendrée par des pêches intensives (Le Pennec et al. 2003). Dans une optique de gestion durable de cette ressource et en raison de la forte variabilité naturelle de son renouvellement, plusieurs recherches ont porté sur le déterminisme du recrutement de ces espèces à cycle de vie benthopélagique en milieu naturel et en éclosierie. L'objectif central de ces travaux est d'obtenir des post-larves de bonnes qualités, résistantes aux contraintes environnementales naturelles, et de les ensemercer en grand nombre sur des futures zones de pêche afin de renouveler les stocks. Toutefois, la réalisation de cet objectif passe par trois phases incontournables : i) la reproduction (maturation des gamètes, ponte et fécondation), ii) le développement larvaire et post-larvaire et iii) la fixation des juvéniles sur des supports artificiels.

Cycle de vie

Indépendamment de l'espèce, la vie pélagique des pectinidés débute par l'émission des gamètes dans le milieu suivi de la fécondation, suivi par la formation des stades embryonnaires et larvaires puis d'une phase de métamorphose. La métamorphose est la transition entre la vie pélagique et la vie benthique puisqu'à la suite de celle-ci les individus se fixent aux substrats marins (Le Pennec et *al.* 2003). À des températures de 16-17°C en laboratoire, on obtient des larves trocophores de *Pecten maximus* 24 heures après la fécondation des œufs et des larves D après 48 heures. Initialement les réserves contenues dans l'oocyte sont les seules sources énergétiques permettant l'embryogenèse, soit le passage de l'embryon à la larve. C'est seulement au stade larvaire que les individus développent des cils permettant la locomotion et plus tard la capture de particules alimentaires (Le Pennec et *al.* 2003). C'est aussi durant ce stade que la coquille est formée, ce qui facilite le suivi de la croissance des individus. Le dernier stade de la vie pélagique est caractérisé par le développement d'un « oeil », d'un pied et aussi par l'apparition de double barre à la bordure de la coquille. La double barre est une formation sur le bord de la prodissoconque, coquille larvaire d'un bivalve, qui correspond à une gouttière périphérique sur laquelle prendra naissance la dissoconque (Gerard et *al.* 1989). La dissoconque qui se développe après la métamorphose prend naissance dans cette gouttière près du bord externe mais n'établit aucun contact avec celui-ci. Au cours de son développement, la dissoconque va s'épaissir et masquer progressivement la gouttière. Ce critère peut facilement s'observer et est utilisé en éclosérie afin d'identifier si les larves sont aptes à la métamorphose. La métamorphose des bivalves est un phénomène complexe qui regroupe une multitude de

transformations anatomiques plus ou moins simultanées et qui se déroulent à des rythmes différents (Veniot et *al.* 2003). Le taux de survie des larves et le succès de la métamorphose est dépendant de plusieurs facteurs, tel les conditions environnementales (Pernet et *al.* 2003b), le régime alimentaire (Soudant et *al.* 1998a; Pernet et *al.* 2005b) et les caractéristiques génétiques (Ermande et *al.* 2003; Hedgecock et *al.* 2007).



Le Penneç, 2003

Fig.1. Représentation du cycle de vie de *Pecten maximus*

Nutrition

Au cours des 10 dernières années, le secteur de la nutrition en larviculture de mollusques bivalves a subi un développement important, dû en grande partie à un meilleur contrôle des conditions d'élevage (Farias & Iker 2006). Beaucoup d'études se sont centrées sur des moyens plus efficaces et plus rentables pour obtenir de la nourriture pour chaque étape de la culture des bivalves. Deux aspects ont donc été développés, soit, le développement de la technologie relative à la culture d'algues et la production de substituts aux microalgues. Les pectinidés sont des bivalves filtreurs se nourrissant de seston et sont capables d'ingérer des particules vivantes ou inertes présentes dans la colonne d'eau. L'utilisation des cultures de micro-algues dans les élevages intensifs de bivalves incluant les pectinidés a permis de mieux connaître les caractéristiques nutritives de ces algues afin de mieux satisfaire les besoins nutritionnels des géniteurs, des larves et des post-larves (Farias & Iker 2006). Les micro-algues couramment utilisées lors des élevages de mollusques bivalves sont les suivantes : *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* (Delaunay et al. 1993).

La nutrition est un facteur essentiel au succès des élevages larvaires et post-larvaires des mollusques bivalves, particulièrement afin de répondre aux besoins énergétiques et fonctionnels importants de la métamorphose. Afin de subvenir aux besoins nutritionnels des pectinidés dans le conditionnement des géniteurs ainsi que pour les cultures larvaires et post-larvaires, la quantité et la qualité des protéines, des glucides et des lipides utilisés dans le régime alimentaire sont évaluées. Le contenu protéinique des microalgues améliore la

durée de maturation, la fécondité des femelles ainsi que l'équilibre énergétique des géniteurs (Farias & Iker 2006). Plusieurs études ont su démontrer que les larves utilisent plutôt les lipides que les protéines ou le glycogène (Holland 1978, Gallager et *al.* 1986). De plus, les lipides sont une très grande source d'énergie en période de stress chez les larves planctoniques d'invertébrés marins (Holland 1978). La combinaison de la réponse rapide aux changements environnementaux et l'utilisation des réserves lipidiques suggèrent qu'elles sont une méthode idéale pour l'évaluation des conditions physiologiques chez les larves de bivalves (Gallager et *al.* 1986). L'étude de Gallager et *al.* (1986), suggère que, chez les œufs, l'apport lipidique endogène provenant des parents durant la vitellogenèse est rapidement métabolisé durant l'embryogenèse pour des fonctions nutritives.

Lipides

Phospholipides et triglycérides

Les lipides représentent une forme de carbone particulièrement réduit ; leur oxydation au cours du métabolisme libère de grandes quantités d'énergie. Les lipides sont donc des molécules de choix pour la mise en réserve de l'énergie métabolique (Garrett & Grisham, 2000). Les lipides se présentent sous deux formes, les lipides neutres et les lipides polaires. Les phospholipides sont des lipides polaires et sont les principaux constituants des membranes cellulaires (Pernet, 2003). Les lipides neutres quant à eux comprennent les triacylglycérols ou triglycérides (TAG). Les triglycérides sont les principaux dérivés neutres du glycérol et la plus importante réserve d'énergie chez l'animal (Garrett & Grisham, 2000). Lorsque les larves sont aptes à se nourrir à partir de l'apport exogène,

l'énergie est emmagasinée principalement sous forme de triglycéride, principale source de réserve lipidique. Durant la métamorphose, les lipides neutres, particulièrement les TAG, sont la première réserve d'énergie de l'huître *Ostrea edulis* (Holland 1978). Une étude présentée par Pernet et *al.* (2003a) démontre que la concentration en TAG dans le régime alimentaire des larves du Pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) est positivement corrélée avec la croissance des larves et le contenu en triglycéride chez celles-ci. Holland (1978) a conclu que chez les larves de plusieurs invertébrés, les lipides neutres et spécialement les TAG, étaient principalement une réserve énergétique permettant de parer les stress environnementaux et nutritionnels.

Les acides gras

Un acide gras comporte une longue chaîne hydrocarbonée (la « queue ») terminée par un groupe carboxylique (la « tête »). La très grande majorité des acides gras naturels ont un nombre pair d'atomes de carbone mais il existe des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone, particulièrement chez les organismes marins. Un acide gras monoinsaturé n'a qu'une unique double liaison par opposition aux acides gras polyinsaturés qui en ont plusieurs (Garrett & Grisham, 2000). Plusieurs travaux ont démontré que la qualité des micro-algues dépendait de leur composition en acides gras polyinsaturés (PUFA) très faiblement synthétisés par les mollusques (Berntsson et *al.* 1997; Utting & Millican 1998) et que la performance larvaire des pectinidés (croissance et survie après la métamorphose) variait selon les quantités respectives de certains acides gras particuliers, dits essentiels (Marty et *al.* 1992; Soudant et *al.* 1998b). Un régime alimentaire riche en acides gras

polyinsaturés, tels que les acides docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3), eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n-3) et arachidonique (AA, 20 :4n-6), favorise la croissance, la survie et le succès de métamorphose des larves de bivalves (Delaunay *et al.* 1993; Pernet *et al.* 2005a). Ces acides gras ont donc fait l'objet de plusieurs études, qui ont démontré des rôles importants pour les mollusques bivalves. Le régime alimentaire des larves peut-être remplacé à 40% par des émulsions lipidiques enrichies en EPA et DHA alors que chez les post-larves de 2mm la substitution peut se faire jusqu'à 20% du régime sans affecter leur croissance et survie (Farias & Iker 2006). Certains auteurs suggèrent que le DHA joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules membranaires (Hulbert 2005). Une étude effectuée par Delaporte *et al.* en 2003 a démontré qu'un régime alimentaire riche en diatomées, tel *Chaetoceros calcitrans*, favorisait chez l'huître du Pacifique une augmentation du nombre d'hémocytes et de phagocytose. Cette auteure suggère que la composition en acides gras de *Chaetoceros calcitrans*, caractérisée par une grande proportion d'EPA (17.8%) et AA (2.0%), pourrait être responsable des changements observés sur les réponses immunitaires de l'espèce (Delaporte 2006).

Les stérols

Un autre aspect important de la nutrition lipidique chez les mollusques est l'apport en stérols. Les mollusques ne peuvent biosynthétiser eux-mêmes les stérols et c'est en partie pour cette raison qu'un régime alimentaire riche en stérols est nécessaire au bon fonctionnement des individus (Kanazawa 2001). Dans les tissus animaux, les stérols sont associés à plusieurs fonctions et plus particulièrement comme composant structural des

membranes cellulaires. Les microalgues *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* contiennent une assez grande variété de stérols avec le brassicastérol, β -sitostérol et cholestérol représentant à eux seul plus de 80% de la concentration totale en stérols (Napolitano et al. 1993). Plusieurs études mentionnent une accumulation préférentielle du cholestérol ce qui suggère l'importance primordiale de ce stérol pour les mollusques mais aussi pour plusieurs autres organismes vivants (Napolitano et al. 1993; Soudant et al. 1998a; Kanazawa 2001). Le cholestérol est un stérol majeur et est d'une grande importance dans le métabolisme cellulaire (Palacios et al. 2007). La présence de cholestérol chez les individus devrait donc en principe nous informer de la bonne condition physiologique de ceux-ci.

Objectifs et hypothèse

Ainsi, la présente étude vise à examiner (1) l'effet de l'addition de la micro-algue *Rhodomonas salina* au régime alimentaire de *P. maximus* durant l'ontogénie larvaire et post-larvaire sur la croissance et la survie (2) l'étude de la dynamique énergétique et la composition en acides gras durant l'ontogénie en fonction des régimes alimentaires testés. Nous testerons principalement une hypothèse, soit que l'addition de *R. salina* au régime alimentaire apporte un avantage énergétique et structurant aux larves de *P. maximus*.

CHAPITRE I

LIPID REQUIREMENTS OF THE SCALLOP *PECTEN MAXIMUS* (L.) DURING LARVAL AND POST-LARVAL DEVELOPMENT IN RELATION TO ADDITION OF RHODOMONAS SALINA IN DIET

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the effect of the addition of *Rhodomonas salina* in the diet of *Pecten maximus* on growth, survival, metamorphosis success in relation to biochemical content. Food quality is an essential factor in the success of the larval, post-larval and juvenile development. A diet rich in polyunsaturated fatty acids present an advantage for growth, survival and metamorphosis success. Larvae and post-larvae fed with the diet containing *R. salina* showed a higher accumulation of AA (20:4n-6), but a lower concentration of DHA (22:6n-3) and EPA (20:5n-3). Addition of *R. salina* seems to be advantageous by an earlier appearance of metamorphosis, but no difference was identified on growth and survival between diets. A preferential incorporation of DHA and AA in polar lipids observed in both diets, indicated the importance of these fatty acids on metabolism of *P. maximus*. The composition of sterol observed in larvae fed with an addition of *R. salina* show a high level of brassicasterol. Advantage of the preferential accumulation of brassicasterol with the addition of *R. salina* is not clear but other studies suggest that brassicasterol can replace cholesterol in some functions.

1.1 INTRODUCTION

Recruitment in natural population as well as the successful aquaculture of marine bivalves depends to a large extent on the acquisition of energy reserves to support larval growth and transition through metamorphosis. Most invertebrate larvae primarily rely on lipids to fulfil their energetic needs whereas protein catabolism occurs when the organism is short on lipid reserves (Holland 1978). Provision of sufficient lipid reserve is particularly important for successful completion of metamorphosis, a critical period during which bivalves are limited in their ability to feed on exogenous particulates (Baker & Mann 1994) and undergo an energetically-demanding tissue reorganization to transit from a planktonic to a benthic way-of-life.

Growth and survival of marine bivalves also rely on the acquisition of essential fatty acids (EFA) for incorporation into membrane phospholipids (Soudant *et al.* 1998b). EFA functions can be divided into two broad areas. On one hand, the n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) docosahexaenoic acid (22:6n-3) is involved in maintaining the structural and functional integrity of biological membranes due to its unique structure, which facilitates rapid conformational changes in membrane proteins (Feller *et al.* 2002; Turner *et al.* 2003). On the other hand, C₂₀ PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and arachidonic acid (20:4n-6), represent precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones that includes prostaglandins, leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids (Smith & Murphy 2003). Eicosanoid production is associated to stressful situations, with

excess eicosanoid production having been recorded under pathological conditions in fish (Bell & Sargent 2003).

Sterols are ubiquitous lipid components of all eukaryotic organisms. In animal tissues, sterols are associated with a number of functions, and one of the most important is their role as structural components of cellular membranes (Nes 1974). The ability to synthesize or bioconvert sterols *de novo* is generally low or absent, vary among the bivalve species, and imply that a dietary supply of sterols is necessary for bivalve growth (Voogt 1975). Consequently, the qualitative and quantitative variability of the sterol compositions in microalgae used in hatchery (Gladu *et al.* 1991) will have repercussions on phytosterol, and particularly on the cholesterol composition in larvae, and will modify growth performances (Wikfors *et al.* 1991).

Although EFA and sterols requirements in bivalve larvae have been the subject of many studies (Delaunay *et al.* 1993; Nevejan *et al.* 2003; Soudant *et al.* 1998b; Pernet *et al.* 2005b; Soudant *et al.* 2000) very few authors investigated their requirements during metamorphosis. Additionally, most of these previous studies focused on traditional standard hatchery diets which generally include *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp. and *Pavlova* sp. However, addition of the PUFA-rich *Rhodomonas salina* in the diet of sand dollars increases larval growth, survival and metamorphic success (Schiopu *et al.* 2005). More recently, Tremblay *et al.* (2007) showed that addition of *R. salina* in the diet of

Pecten maximus increased organic content and lipid reserves in pre-metamorphic scallops. Here we propose to evaluate the effect of the addition of *Rhodomonas salina* on growth, survival and lipid composition during the entire larval ontogeny of *P. maximus*, including the metamorphic period.

1.2 MATERIAL AND METHODS

1.2.1 Animal maintenance

Adult scallops *Pecten maximus* were collected from the bay of Brest and kept in a flow-through seawater system at 15°C for 60 days and continuously fed with a mixture of *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), *Pavlova lutheri* and *Skeletonema costatum*. Spawning was induced by thermal stimulation (Gruffydd & Beaumont 1970) and has been realized at the experimental hatchery of IFREMER, Brest. Experiments consisting of two nutritional treatments were conducted in triplicate 150-l tanks cylinder-cone shape until metamorphosis, at an initial density of 8 larvae·μl⁻¹. The seawater (20°C) was filtered at 1 μm, treated with U.V., stirred by aeration and renewed every two or three days. Bacterial growth was limited by addition of the antibiotic thiamphenicol at 8 ppm (Robert et al. 1996). At the onset of settlement, generally 27 days post-fertilization (dpf), evidenced by the appearance of eyespot and “double-rings” shell edges over 50% of the population, the post-larvae were collected on a 150 μm mesh screen and transferred at the experimental hatchery of Argenton, IFREMER. The post-larvae were maintained in two nutritional treatments, in duplicate downweller, 130 μm mesh screen. Each downweller contained 100 000 post-larvae and was in a raceway tank of 120 L (2m x 0.5m x 0.12 m). The

seawater was pre-filtered at 5 μ m at a flow-rate of 100 L/h and temperature controlled at \approx 15-16 °C. Mesh screen size was adjusted to shell size and post-larval rearing was effective until 41 pdf (around 1mm post larvae length).

Microalgae from CCAP (U.K.) were cultured in 1 μ m filtered-sterilized sea-water enriched with *f/2* medium with addition of silicates for diatoms (Guillard 1975). Briefly, algae were maintained at \approx 20°C under continuous irradiance from cool-white fluorescence lights and mixed with aeration (air/CO₂; 98.5-1.5%) as described in Tremblay et al. (2007). The algae *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* and *Rhodomonas salina* were produced in continuous culture by opposite to a batch-culture for *Chaetoceros calcitrans*. The renewal rate for continuous culture was 25% for *P. lutheri* and 40% for T-ISO and *R. salina*. Algal cells were visually examined under a dissecting microscope and counted using a haemocytometer cell.

1.2.2 Experimental design

Two different microalgae mixtures were used as nutritional treatments for *P. maximus* larvae. The first was a standard diet namely PTC (*Pavlova lutheri* (P), *Isochrysis galbana* (T), *Chaetoceros calcitrans* (C)) and the second was an experimental diet namely PTCR (*Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* and *Rhodomonas salina* (R)). PTC served as a reference diet, commonly used in bivalve hatcheries (Delaunay et al. 1993). Larvae were fed daily with 15 cells $\cdot\mu$ l⁻¹ of each component of diet at

a ratio of 45 cells· μl^{-1} (1:1:1) for PTC and 60 cells· μl^{-1} (1:1:1:1) for PTCR. Tremblay et al. (2007), showed that larvae fed with adjusted PTC diet (on the basis of algal dry weight), to obtain biomasses similar to the PTCR diet did not show superior growth or higher biochemical content than larvae fed PTC diet at 45 cells· μl^{-1} . The post-larvae were fed continuously with the same nutritional treatment (PTC and PTCR) at 10×10^9 cell day⁻¹ for *P. lutheri*, *I. galbana* and *C. calcitrans* and 2.5×10^9 cell day⁻¹ for *R. salina*. Scallops were sampled during the early veliger stage (14 and 19 dpf), the late veliger stage (23 dpf), the pre-metamorphic stage (27 dpf) and the post-metamorphic stage (41 dpf), for growth, survival and lipid analyses (triacylglycerol content [TAG], fatty acid composition of neutral and polar lipids and sterols). Due to biological limitation, analyses of proximate (total lipid, protein and carbohydrate) were conducted only on pre-metamorphic scallops at 27 dpf.

1.2.3 Growth, survival and metamorphic success

Growth of larvae was calculated following measurements of the shell length (anterior-posterior distance) with image analysis software, NIH (National Institute of Health, USA) for Macintosh. After metamorphosis (41 dpf) growth of post-larvae was analysed with Nikon (10x) profile projector. Fifty scallops were measured at each sampling time and dietary treatment.

Mortality was expressed as the cumulative amount of empty shells based on initial number of scallops on sub-samples. Settlement success was determined by the difference of

the number of post-larvae settled at 41 dpf and the number of larvae transferred at metamorphosis (100 000) at 27 dpf.

Competent larvae were estimated by the appearance of the “double-rings” at the margin of the shell, corresponding to a peripheral groove on which the dissoconch shell will attach (Doroudi *et al.* 1999). This criterion was used to assess amount of larvae that began metamorphosis (Gerard *et al.* 1989). Samples ~300 larvae were taken every two days at the first apparition of “double-rings” and percentage was evaluated by microscopy.

1.2.4 Biochemical analysis

Thirty to fifty thousands pre-metamorphic scallops were filtered onto Whatman GF/F 47 mm filters pre-combusted at 450°C. For post-metamorphic scallops, only ~10 000 animals were used. Samples for organic matter and proximate analysis were kept at -80°C in plastic tube of 3 ml. Samples used for lipid analyses were stored in glass tube with 6 ml chloroform:methanol (2:1,v/v), closed under nitrogen, further sonicated for 10 minutes and kept at -20°C until extraction.

Organic matter and proximate (total lipid, protein and carbohydrate)

Scallops were grinded and dried at 80°C during 24h to obtain the dry weight and then heated at 450°C for the determination of the ash weight. The organic matter was calculated

from the difference between the dry matter and the ash weighted on a microbalance Mettler M3. Total lipids quantification was determined by the mass obtained after lipid extraction (Bligh & Dyer 1959). Carbohydrate and protein contents were measured colorimetrically (Dubois *et al.* 1956; Lowry *et al.* 1951), by use of a spectrophotometer Kontron Uvikon 941.

Triacylglycerol content

Lipids were extracted following the procedure described by Folch *et al.* (1957). Triacylglycerol were determined by high performance thin layer chromatography (HPTLC) on silicagel plates (MERCK silicagel #60F254). Lipids were deposited on the plates with an automatic thin layer chromatography (TLC) sampler 4 CAMAG. Samples were first developed in a mixture of hexane-diethyl ether-acetic acid (20:5:0.5, v/v/v) followed by a mixture of hexane-diethyl ether (97:3, v/v). The standard utilised was oil Menhaden from fish 1,64 %. The revelation of TAG in the samples was obtained by heated 20 minutes at 160 °C with copper sulphate 3% phosphoric acid 8% and analysed with a TLC scanner 3 CAMAG at 370 nm and with the software Wincats.

Fatty acids

The lipids extracts were evaporated to dryness and recovered with three washings of 500 μ l of chloroform:methanol (98:2, v/v). Neutral and polar lipids were separated by column chromatography on silica gel micro-columns (30x5mm I.D. Kieselgel 70-230 mesh

Merck) using chloroform:methanol (98:2, v/v) to elute neutral lipids, followed by neat methanol to elute polar lipids (Marty *et al.* 1992). A known amount of 23:0 (internal standard) was added in each lipid fraction. Lipids were trans-esterified under nitrogen using $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (12%) for 10 minutes at 100°C . Fatty acid methyl esters (FAME) were analysed using a gas chromatograph equipped with an on-column injector, a DB-Wax (30 m x 0.25 mm; $0.25\ \mu\text{m}$ film thickness) capillary column and a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas at $2\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The fatty acids were identified by comparing their retention time with known standards (37 component FAME Mix, PUFA-3 and menhaden oil) and quantified with tricosanoic acid (23:0).

Sterols

An aliquot of the neutral lipids was transesterified using sodium methoxyde (0.5M in methanol) at ambient temperature for 90 min (Soudant *et al.*, 1998a). Sterols were analysed using gas chromatograph equipped with an on-column injector followed by a Restek Rtx65 capillary column (15 m x 0.25 mm; $0.25\ \mu\text{m}$ film thickness). Hydrogen was used as the gas carrier. Sterols were identified by comparing their retention time with standards and quantified with cholestane as an internal standard.

1.2.5 Statistical analysis

Differences in shell length, survival, double-rings, and biochemical composition of scallops were investigated using two-way repeated analyses of variance (ANOVAs) as a

function of day and diet. Biochemical composition include TAG content, relative proportions of selected fatty acids (namely 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3) in neutral and polar lipids and sterol composition (cholesterol, brassicasterol, β -sitosterol and stigmasterol). The unit of replication was the tank in which the diet was applied (n=3 for each diet). Here we used a mixed linear model and the repeated option was applied to the term “day” because repeated measurements were taken on the same experimental unit (tank). Organic matter and proximate of larvae at 27 dpf were compared between diets using student-T test. Residuals were screened for normality using the expected normal probability plot and further tested using Kolmogorov-Smirnov test. Homogeneity of variance-covariance matrices was graphically assessed and further tested using Levene test. If necessary, data were arcsine square-root transformed to achieve homogeneity of variances. Analyses were carried out using SAS 9.1.3 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

1.3 RESULTS

1.3.1 Scallop performance

Scallops fed PTC and PTCR showed similar growth and survival (Fig. 2). Time affected significantly shell length ($F_{5,18} = 454.0$, $p < 0.001$) and survival of scallops ($F_{6,22} = 114.3$, $p < 0.001$, Fig.1). Diet and day interacted on their effects on the occurrence of double-rings (ANOVA, $F_{3,12} = 86.4$, $p < 0.001$, Fig.3). For both diets the first double-rings appeared at around 19 days post-fertilization. At 27 dpf, scallops fed PTCR showed more than 50%

of double-rings compared to only 25% in scallops fed PTC. However, the settlement success was similar between diets: $27,7\% \pm 9,4$ for PTC and $23 \%\pm 10,3$ for PTCR.

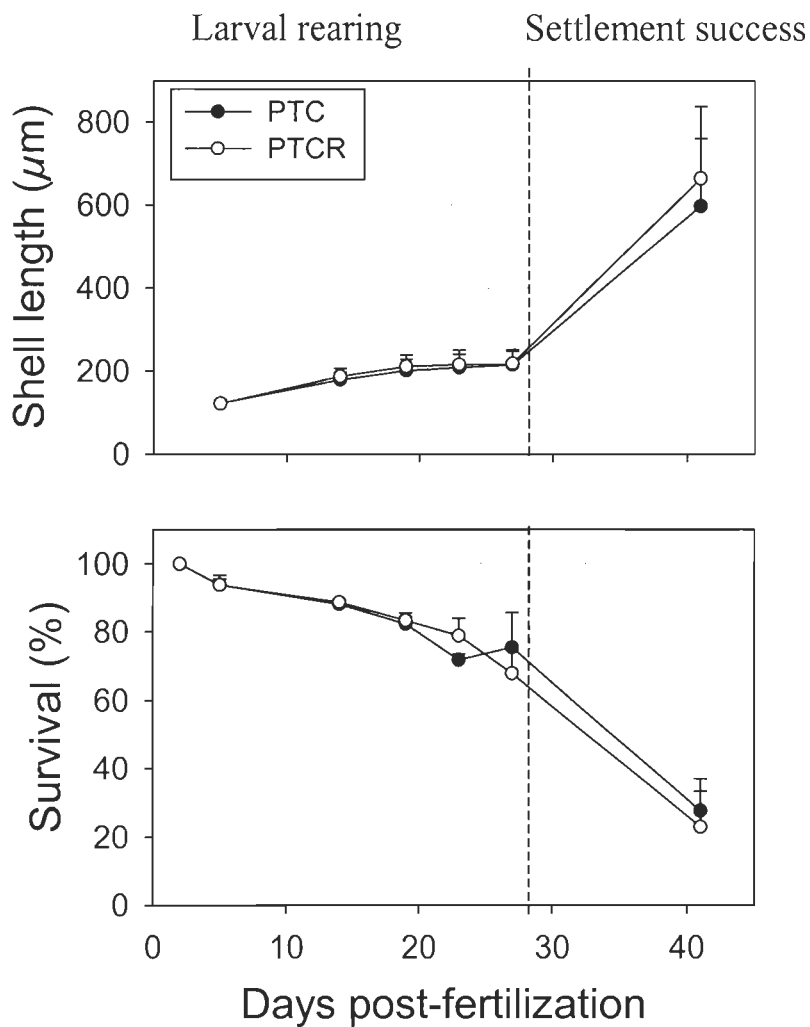


Fig. 2. *Pecten maximus*. Shell length and survival of larvae and post-larvae fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization (mean \pm SD; n=3 replicate tanks per diet).

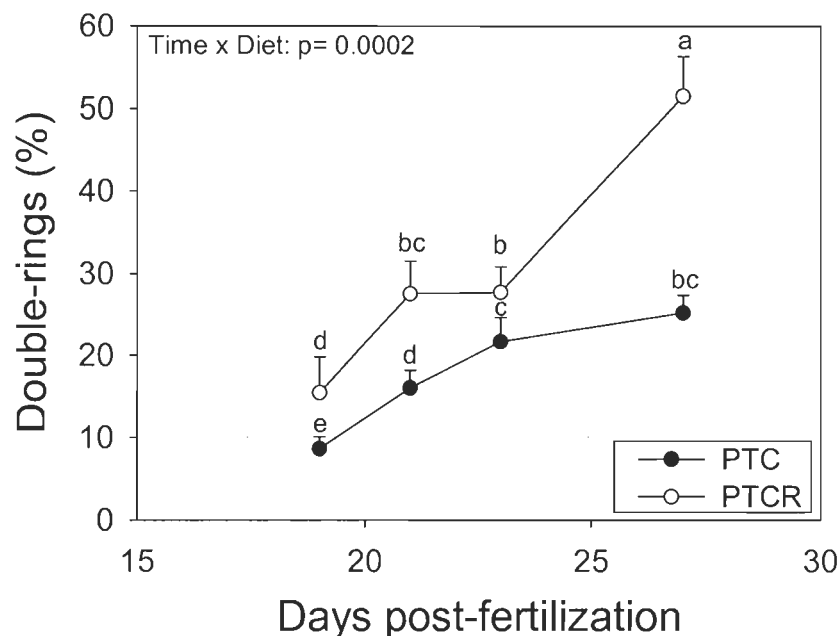


Fig. 3. *Pecten maximus*. Occurrence of double-rings of larvae fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization (mean \pm SD; n=3 replicate tanks per diet).

1.3.2 Protein, lipid and carbohydrate (PLG) and Organic matter (OM)

The organic matter of 27 dpf larvae fed PTC was similar to the one fed PTCR ($t=0.201$, $p=0.851$), like the absolute contents (amount per ng larvae^{-1}) of carbohydrates ($t=1.684$, $p=0.167$), proteins ($t=1.278$, $p=0.270$) and lipids ($t=0.466$, $p=0.665$) (Table 3).

Table 1. *Pecten maximus*. Organic matter (% total matter) and biochemical content (ng larvae^{-1}) in 27 d-old scallops fed PTC and PTCR (mean \pm SD).

Diet	Organic matter	Proteins	Lipids	Carbohydrates
PTCR	31.4 \pm 5.3	275.61 \pm 93.14	110.07 \pm 11.68	30.23 \pm 7.49
PTC	32.1 \pm 1.9	350.23 \pm 39.34	115.00 \pm 14.12	38.73 \pm 4.44

1.3.3 Triacylglycerol

Diet and day interacted on their effects on TAG concentration ($F_{4,14} = 6.1$, $p = 0.005$). For both diets, the concentrations of TAG increased as a function of time. During the first 19 dpf, the accumulation of TAG was more rapid in larvae fed PTCR (34,02 to 63,53 ng larvae⁻¹) compared to that of larvae fed PTC which varied from 21,76 to 31,29 ng larvae⁻¹. In post-larvae (41 dpf), higher level of TAG was observed in scallops fed PTC (457,57 ng scallop⁻¹) compared to that occurring in scallops fed PTCR where it was 291,06 ng scallop⁻¹.

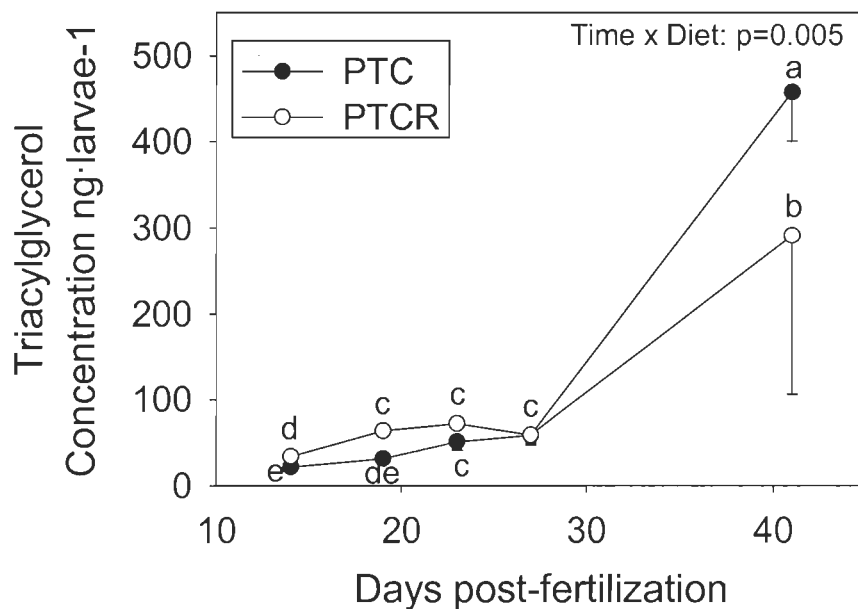


Fig.4. *Pecten maximus*. Triacylglycerol concentration in scallops fed PTC and PTCR as a function of the day post-fertilization (mean \pm SD).

1.3.4 Fatty acids

Fatty acids were divided into three broad categories; saturated (SFA), monosaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Particular emphasis is given in this study to the long chain PUFA 20:4n-6, 20:5n-3 (EPA) and 22:6n-3 (DHA). These three fatty acids contributed for 40-56% of the total PUFA levels found in scallop larvae for neutral lipids (Table 2) and for 63-70% for the polar lipids (Table 3). Diet and day showed interactions on their effects on AA, EPA and DHA. Level of AA was higher in scallops fed PTCR than in those fed PTC (neutral: $F_{4,14} = 8.5$, $p = 0.001$, polar: $F_{4,14} = 10.7$, $p < 0.001$, Fig.5). During the larval development, scallops fed PTC showed higher level of DHA compared to those fed PTCR. However, after the metamorphic period, there was no effect of diet on level of DHA in scallops (neutral: $F_{4,14} = 81.84$, $p < 0.001$, polar: $F_{4,14} = 4.39$, $p = 0.017$, Fig.5). Levels of DHA in scallops fed both diet decreased during ontogeny. During the early larval development, scallops fed PTCR show higher level of EPA than those fed PTC. However, the inverse was observed after metamorphosis: scallops fed PTC showed higher level of EPA than those fed PTCR (neutral: $F_{4,14} = 21.0$, $p < 0.001$, polar: $F_{4,14} = 13.4$, $p = 0.001$, Fig.5). Level of EPA in the polar lipids of scallops fed PTCR decreased as a function of time until attaining the lowest value (~9%) in 41 d-old scallops. It is noteworthy that levels of AA and DHA were generally higher in the polar lipids compared to that in the neutral lipids, whereas levels of EPA in the polar lipids were lower than or equal to that observed in the neutral lipids.

Table 2. *Pecten maximus*. Fatty acid composition for neutral lipids in larvae and post-larvae fed PTCR and PTC diets expressed as % of total fatty acids (TFA). Data are means \pm SD. TFA was expressed as $\mu\text{g individual}^{-1}$.

Neutral	PTC					PTCR				
	14	19	23	27	41	14	19	23	27	41
Fatty acid composition (% of total fatty acids)										
14:0	9.1 \pm 0.2	9.0 \pm 0.1	9.1 \pm 0.2	9.2 \pm 0.1	11.9 \pm 0.4	8.3 \pm 0.2	9.1 \pm 0.2	8.1 \pm 0.2	7.6 \pm 0.2	8.8 \pm 0.7
16:0	15.8 \pm 0.3	15.9 \pm 0.1	16.0 \pm 0.2	15.6 \pm 0	14.8 \pm 0.5	16.0 \pm 0.1	15.6 \pm 0.2	15.3 \pm 0.1	14.9 \pm 0.5	14.2 \pm 0.5
18:0	2.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0	2.2 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	2.2 \pm 0.1
Σ SFA	28.3 \pm 0.5	28.0 \pm 0.2	28.2 \pm 0.3	28.0 \pm 0.2	29.4 \pm 0.5	27.2 \pm 0.2	27.4 \pm 0.4	26.6 \pm 0.2	26.1 \pm 0.7	26.1 \pm 0
16:1(n-7)	8.5 \pm 0.4	8.6 \pm 0	9.5 \pm 0.1	9.6 \pm 0.3	15.3 \pm 0.2	5.7 \pm 0.1	5.4 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1
18:1(n-9)	7.8 \pm 0.3	8.2 \pm 0.1	8.3 \pm 0.2	8.2 \pm 0	4.3 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	9.5 \pm 3.7	9.2 \pm 3.7	5.1 \pm 0.1
18:1(n-7)	7.9 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1	8.1 \pm 0.2	8.3 \pm 0.1	5.5 \pm 0.4	6.9 \pm 0.2	6.0 \pm 0.1	4.4 \pm 3.8	4.5 \pm 3.9	5.0 \pm 0
20:1(n-9)	0.6 \pm 0	0.8 \pm 0	0.8 \pm 0	0.9 \pm 0	0.4 \pm 0.1	0.7 \pm 0	0.7 \pm 0	0.8 \pm 0	0.8 \pm 0	0.6 \pm 0
Σ MUFA	25.9 \pm 1.1	27.2 \pm 0.1	28.3 \pm 0.2	28.4 \pm 0.3	26.6 \pm 1.0	21.9 \pm 0.2	20.6 \pm 0	21.4 \pm 0.3	21.1 \pm 0.1	20.7 \pm 0.4
16:3(n-6)	1.3 \pm 2.3	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0
18:2(n-6)	3.3 \pm 0	3.1 \pm 0	2.9 \pm 0	2.7 \pm 0	6.1 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	9.6 \pm 0.1	9.4 \pm 0.1	9.0 \pm 0.4	11.7 \pm 0.4
18:3(n-6)	0.5 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0	0.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.6	1.3 \pm 0	1.6 \pm 0	1.6 \pm 0	1.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.4
18:3(n-3)	3.5 \pm 0	3.1 \pm 0	2.6 \pm 0	2.3 \pm 0	3.0 \pm 0	6.2 \pm 0.1	6.2 \pm 0	5.8 \pm 0.1	5.8 \pm 0.4	5.7 \pm 0.3
18:4(n-3)	7.2 \pm 0.1	7.2 \pm 0	6.9 \pm 0.1	6.8 \pm 0.2	4.8 \pm 0	7.6 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	7.7 \pm 0.3	7.7 \pm 0.6	6.0 \pm 0.4
20:4(n-6)	0.7 \pm 0	0.8 \pm 0	0.8 \pm 0	0.8 \pm 0	1.4 \pm 0	2.5 \pm 0.1	2.7 \pm 0	2.9 \pm 0	2.9 \pm 0.1	2.9 \pm 0.3
20:5(n-3) (EPA)	9.7 \pm 0.2	10.0 \pm 0	10.3 \pm 0.1	10.9 \pm 0.1	12.8 \pm 0.5	10.6 \pm 0.1	10.2 \pm 0	10.0 \pm 0.2	10.3 \pm 0.4	11.2 \pm 0.1
22:4(n-9)t	0.2 \pm 0	0.3 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.1 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.1 \pm 0	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
22:5(n-6)	2.7 \pm 0.1	2.8 \pm 0	2.6 \pm 0	2.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0	1.2 \pm 0	1.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
22:6(n-3) (DHA)	13.8 \pm 0.3	13.9 \pm 0	12.9 \pm 0.1	12.6 \pm 0.3	7.6 \pm 0.5	9.8 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1	8.8 \pm 0.2	8.9 \pm 0.3	7.1 \pm 0.3
Σ PUFA	45.4 \pm 1.4	44.3 \pm 0.3	42.8 \pm 0.2	43.0 \pm 0.2	43.2 \pm 0.8	50.4 \pm 0.3	51.3 \pm 0.5	51.3 \pm 0.5	51.7 \pm 1.1	52.4 \pm 0.1
Σ (n-6)	9.0 \pm 2.1	7.8 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	11.3 \pm 0.7	14.2 \pm 0.1	16.4 \pm 0.1	16.7 \pm 0.2	16.3 \pm 0.4	19.2 \pm 0
Σ (n-3)	35.1 \pm 0.5	35.2 \pm 0.3	33.7 \pm 0.2	33.7 \pm 0.3	29.4 \pm 0.2	35.4 \pm 0.3	33.8 \pm 0.2	33.4 \pm 0.5	34.1 \pm 0.8	31.1 \pm 0.2
Σ (n-3)/ Σ (n-6)	4.0 \pm 0.9	4.5 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1	2.5 \pm 0	2.1 \pm 0	2.0 \pm 0	2.1 \pm 0	1.6 \pm 0
DHA/EPA	1.4 \pm 0	1.4 \pm 0	1.3 \pm 0	1.2 \pm 0	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0	0.8 \pm 0	0.9 \pm 0	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0
EPA/AA	14.3 \pm 0.2	12.5 \pm 0.8	12.8 \pm 0.2	12.9 \pm 0.4	9.3 \pm 0.7	4.3 \pm 0.1	3.7 \pm 0	3.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0	3.9 \pm 0.4
TFA ($\mu\text{g individual}^{-1}$)	26.0 \pm 0.9	27.0 \pm 3.3	45.9 \pm 1.9	55.1 \pm 4.9	207.1 \pm 72.5	40.5 \pm 7.4	38.4 \pm 8.5	65.0 \pm 7.9	61.4 \pm 11.0	130.0 \pm 35.8

Table 3. *Pecten maximus*. Fatty acid composition for polar lipids in larvae and post-larvae fed PTCR and PTC diets expressed as % of total fatty acids (TFA). Data are means \pm SD. TFA was expressed as pg individual⁻¹.

Polar	PTC					PTCR				
	14	19	23	27	41	14	19	23	27	41
Fatty acid composition (% of total fatty acids)										
14:0	1.3 \pm 0	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	2.4 \pm 1.0	1.1 \pm 0	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4
16:0	11.6 \pm 0.1	11.3 \pm 0.5	11.1 \pm 1.3	11.2 \pm 0.1	12.0 \pm 0.2	10.6 \pm 0.4	10.0 \pm 0.8	11.3 \pm 1.0	10.2 \pm 1.3	10.5 \pm 0.4
18:0	6.7 \pm 0.2	7.4 \pm 0.3	6.8 \pm 0.7	6.7 \pm 0.5	7.6 \pm 0	7.4 \pm 0.3	7.9 \pm 0	7.4 \pm 0.2	7.4 \pm 0.1	7.4 \pm 0.6
Σ SFA	20.7 \pm 0.3	21.2 \pm 1.4	20.6 \pm 0.5	20.7 \pm 0.2	23.3 \pm 0.7	20.2 \pm 0.5	20.0 \pm 0.8	21.4 \pm 1.1	20.1 \pm 1.7	20.5 \pm 0.3
16:1(n-7)	2.5 \pm 0.5	2.3 \pm 0.5	2.5 \pm 0.3	2.9 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	1.6 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3	2.2 \pm 0.7	2.2 \pm 0.6
18:1(n-9)	4.0 \pm 0	4.0 \pm 0.1	3.9 \pm 0.2	3.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0	3.4 \pm 0	3.4 \pm 0.3	3.4 \pm 0.3	2.9 \pm 0
18:1(n-7)	5.5 \pm 0	5.6 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1	5.4 \pm 0	6.1 \pm 0.2	4.6 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	4.5 \pm 0.5	4.9 \pm 0
20:1(n-9)	2.3 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	2.7 \pm 0	2.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0	1.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
Σ MUFA	15.5 \pm 0.6	16.1 \pm 0.3	16.3 \pm 0.7	16.5 \pm 0.4	17.9 \pm 0.5	13.2 \pm 0.2	13.7 \pm 0.2	14.2 \pm 0.2	14.2 \pm 1.5	14.1 \pm 0.5
16:3(n-6)	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	1.5 \pm 2.6	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	2.4 \pm 3.5
18:2(n-6)	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	2.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1	3.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2	5.0 \pm 0.5
18:3(n-6)	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0	0.6 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
18:3(n-3)	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0	1.2 \pm 0.1	2.5 \pm 0	2.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3	1.9 \pm 0.1	1.8 \pm 0.3
18:4(n-3)	2.2 \pm 0	2.2 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.3 \pm 0.3	2.7 \pm 0	2.7 \pm 0.1	2.5 \pm 0.2	2.4 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3
20:4(n-6)	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0	2.3 \pm 0	2.5 \pm 0.1	3.7 \pm 0	4.4 \pm 0.1	5.5 \pm 0	5.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.3	5.4 \pm 0.6
20:5(n-3) (EPA)	10.0 \pm 0.1	9.5 \pm 0.3	9.6 \pm 0.1	9.8 \pm 0.1	10.9 \pm 0.4	10.5 \pm 0.1	10.2 \pm 0.1	9.6 \pm 0.9	8.9 \pm 0.4	8.6 \pm 0.5
22:4(n-9)t	1.8 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2	2.1 \pm 0	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	2.0 \pm 0.6
22:5(n-6)	5.9 \pm 0.1	6.3 \pm 0.4	6.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	3.8 \pm 0.4	4.2 \pm 0.3	3.3 \pm 0.4
22:6(n-3) (DHA)	25.6 \pm 0.3	26.3 \pm 1.6	25.4 \pm 0.3	24.2 \pm 0.9	21.0 \pm 0	21.6 \pm 0.2	21.3 \pm 0.5	21.4 \pm 0.7	22.7 \pm 1.3	19.6 \pm 1.7
Σ PUFA	53.8 \pm 0.5	54.7 \pm 2.9	53.3 \pm 0.6	53.6 \pm 0.9	53.9 \pm 1.0	56.8 \pm 0.2	59.1 \pm 3.0	55.2 \pm 1.7	56.4 \pm 1.6	56.9 \pm 0.6
Σ (n-6)	10.4 \pm 0.1	10.8 \pm 0.4	10.7 \pm 0.2	12.2 \pm 2.5	12.9 \pm 0.1	14.0 \pm 0.1	16.1 \pm 0.1	15.4 \pm 1.2	15.4 \pm 0.4	19.8 \pm 2.9
Σ (n-3)	40.9 \pm 0.3	41.0 \pm 2.5	39.9 \pm 0.2	38.4 \pm 1.3	37.5 \pm 0.8	40.4 \pm 0.6	39.3 \pm 0.2	37.8 \pm 1.3	39.1 \pm 1.2	34.0 \pm 1.6
Σ (n-3)/ Σ (n-6)	3.9 \pm 0	3.8 \pm 0.1	3.7 \pm 0.1	3.3 \pm 0.7	2.9 \pm 0	2.9 \pm 0	2.4 \pm 0	2.5 \pm 0.2	2.5 \pm 0	1.7 \pm 0.3
DHA/EPA	2.6 \pm 0	2.8 \pm 0.1	2.6 \pm 0	2.5 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0	2.1 \pm 0.1	2.2 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
EPA/AA	4.8 \pm 0.2	4.0 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	1.9 \pm 0	1.8 \pm 0.3	1.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
TFA (pg individual ⁻¹)	8.5 \pm 2.5	8.9 \pm 0.9	14.1 \pm 2.1	18.5 \pm 2.3	85.7 \pm 2.3	12.8 \pm 0.2	13.4 \pm 0.8	16.9 \pm 4.0	13.6 \pm 5.1	48.4 \pm 26.7

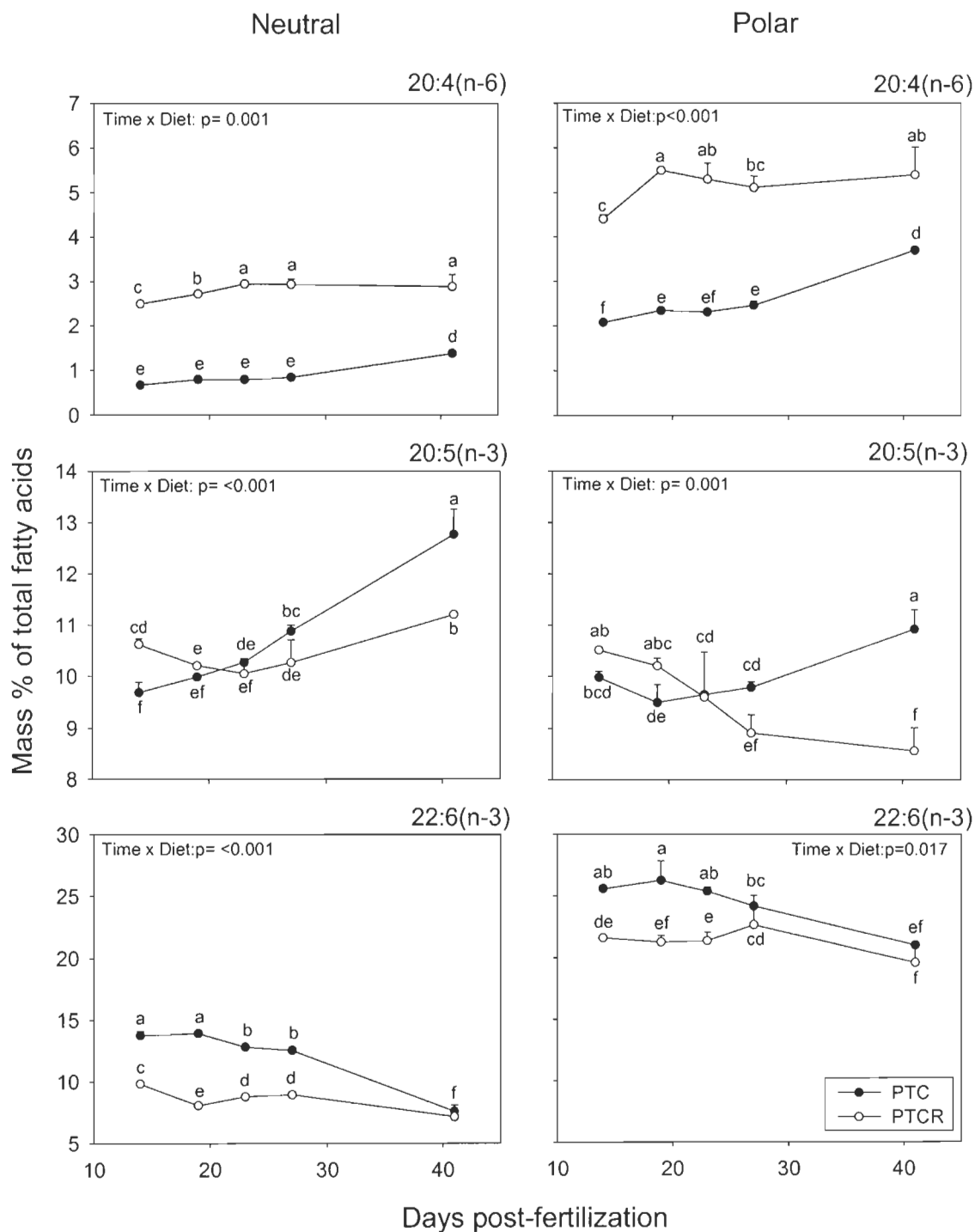


Fig.5. *Pecten maximus*. Levels of AA (20:4n-6), EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) for neutral and polar lipids in scallops fed PTCR and PTC as a function of the day post-fertilization (mean \pm SD).

1.3.5 Sterols

Particular emphasis is put on the four main sterols; cholesterol, brassicasterol, stigmasterol and β -sitosterol; which collectively contributed to 68-75% of the total sterol content in scallops. At 41 dpf, total sterol concentration was almost twice higher in animals fed PTC (18.7 ± 1.9 ng scallop⁻¹) than in those fed PTCR, where it was 9.8 ± 4.9 ng scallop⁻¹. Level of brassicasterol in larvae fed PTCR increased during larval ontogeny and was higher than in larvae fed PTC where it remained low ($F_{4,13} = 11.1$, $p < 0.001$, Fig.3.). Scallops fed PTC showed higher levels of cholesterol ($F_{4,13} = 9.4$, $p < 0.001$) and β -sitosterol ($F_{4,13} = 4.0$, $p = 0.026$) compared to those fed PTCR (Fig.6). Overall, levels of cholesterol increased after metamorphosis at the expense of β -sitosterol and stigmasterol. Level of stigmasterol remained unaffected by dietary treatment but it varied as a function of time ($F_{4,13} = 13.5$, $p < 0.001$, Fig.6).

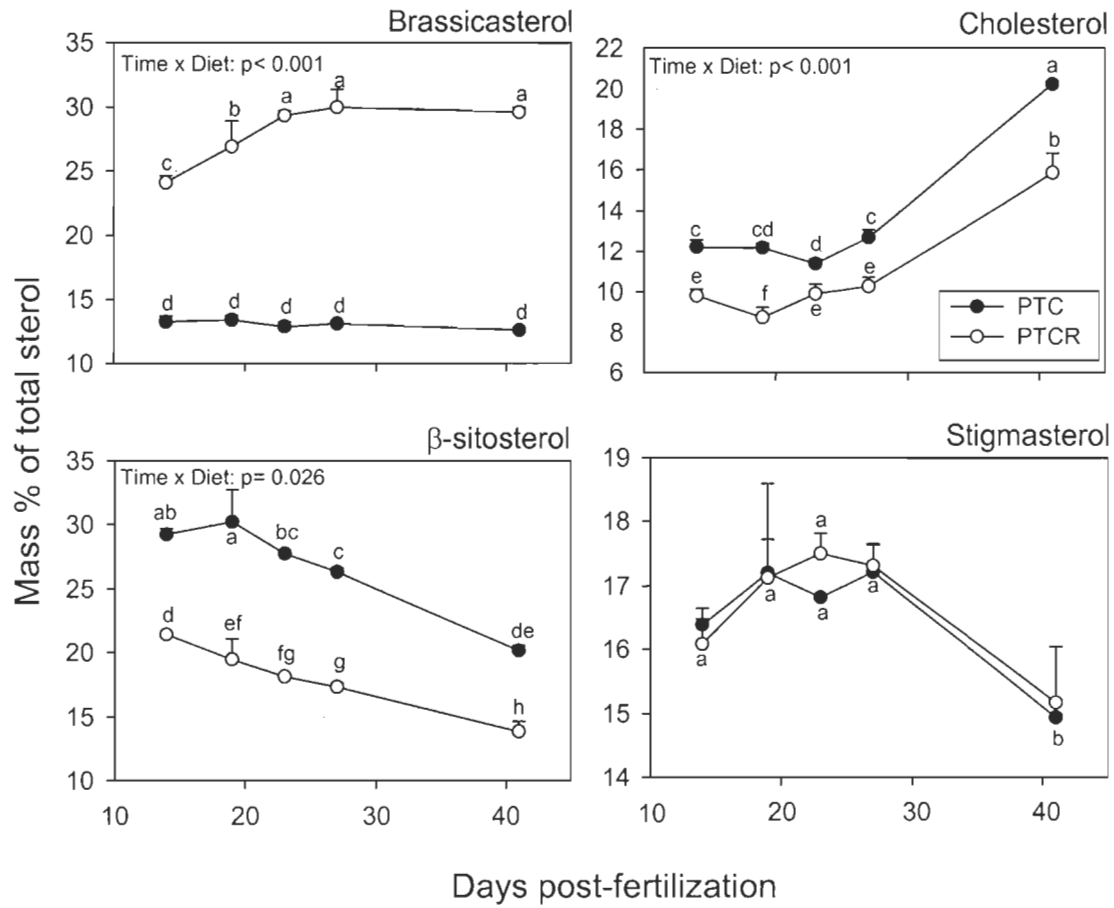


Fig. 6. *Pecten maximus*. Levels of cholesterol, brassicasterol, stigmasterol and β -sitosterol in scallops fed PTCR and PTC as a function of the day post-fertilization. Data were expressed as mass % of total sterol (mean \pm SD).

1.4 DISCUSSION

1.4.1 Effect of microalgal diets on larval performance

Although scallops fed with the two experimental diets showed similar growth and survival, our results suggest that animals fed PTCR undergo metamorphosis more rapidly than those fed the standard hatchery diet, PTC. Indeed, scallops fed PTCR showed a twice higher level of double-rings at 27 dpf compared to larvae fed PTC as previously reported (Tremblay et al. 2007). Despite the fact that the occurrence of double-rings is generally considered as a criteria for assessing larval competency to metamorphosis in *P. maximus* (Gerard et al. 1989), the settlement success measured at 41 dpf was similar between the two tested diets. This paradoxical result may be attributable to the large sampling interval adopted in our study. We thus cannot ascertain whether metamorphosis increased suddenly over a short period or gradually between 27 and 41 dpf in scallops fed the two diets.

1.4.2 Effect of diet and ontogeny: gross biochemical composition of scallops

Larvae scallops fed PTCR and PTC showed similar lipids, proteins and carbohydrates contents. It was previously reported that the addition of *R. salina* to a standard hatchery diet for *P. maximus* significantly increases the organic content of pre-metamorphic larvae due to higher levels of protein and lipid (Tremblay et al. 2007). Indeed, the starch content in the *R. salina* seemed beneficial to *P. maximus* larvae compared to other algal species. These carbohydrates could provide an energy source for metabolic demand during larval development or converted to and accumulated as lipids. In our study, even if lipids

accumulation in PTCR fed larvae seem develop metamorphosis more rapidly it was not reflected by a higher settlement success.

Holland (1978) reviewed the literature on energy metabolism in many invertebrate larvae and concluded that neutral lipids, especially triacylglycerols, was most important as a storage medium for use during nutritional or environmental stress (Gallager et al. 1986). In study of Pernet et al. (2003a), top-performing scallops were characterized by the accumulation of TAG reserves up to 10.4-24.4 ng larvae⁻¹ during the pre-metamorphic period. Therefore, this accumulation appears to provide a good indicator of future growth, survival and metamorphic success, with higher values indicative of cohort success (Pernet et al. 2003a). More rapid accumulation of TAG in larvae fed with PTCR until 19 dpf, seem to be related with apparition of more rapid metamorphosis process (double-ring). Nevertheless, the concentration of TAG at 41 dpf was higher in post-larvae fed with PTC (~458 ng larvae⁻¹ vs ~291 ng larvae⁻¹ with PTCR), which could be an indicator of lesser physiological conditions of post-larvae fed with PTCR.

1.4.3 Effect of diet and ontogeny: fatty acid composition of scallops

The addition of *R. salina* in diet enhanced the accumulation of AA in neutral and polar lipids of scallops. It is generally accepted that AA acts as a precursor of eicosanoids in several invertebrate species including bivalves (Stanley et al. 1999; Smith & Murphy 2003) and is mostly associated with phosphatidylinositol (Soudant et al. 1998b; Soudant et

al. 1997; Soudant *et al.* 1996), seems to be very important for female gonads. Several studies in bivalves suggest that deficiencies in AA may be detrimental for survival and resistance to pathogen. For example, haemocyte membrane lipids in oysters *Crassostrea gigas* also contain elevated amounts of AA presumably to regulate immune response (Delaporte *et al.* 2003). High mortalities and low growth rates of sea scallop, *Placopecten magellanicus*, larvae were associated with low level of AA in the diet (<1%, Pernet & Tremblay, 2004). Finally, an increase in AA levels during metamorphosis of sea scallops *Placopecten magellanicus* was attributed to an increasing demand for AA rich immune cells to degrade larval tissues and to fight surface-associated bacteria (Pernet *et al.* 2005b).

Scallops fed PTCR showed a higher level of EPA compared to those fed PTC until 23 dpf when this pattern was inverted. This pattern may reflect the effect of a long term ingestion of *R. salina*, a microalgal species normally characterized by low level of EPA (Tremblay *et al.* 2007). Alternatively, it was previously reported that *P. maximus* larvae gradually eliminate EPA in their polar lipids during their early ontogeny (Delaunay *et al.* 1993; Marty *et al.* 1992). Since 20:5n-3 and 20:4n-6 compete for the same enzymes for eicosanoids synthesis and that eicosanoids produced from 20:5n-3 are generally less active than those produced from 20:4n-6 (Bell & Sargent 2003), the gradual reduction of 20:5n-3 in polar lipids of scallops fed PTCR may have significant biological impacts.

Scallops fed PTCR showed a lower level of DHA compared to those fed PTC until 27 dpf when it became similar. It is also noteworthy that the quantity of DHA in polar lipids of scallop larvae (20-25%) largely exceeded the values (7-14%) found in neutral lipids, which normally reflect dietary levels (Delaunay et al. 1993). This observation supports the fact that DHA was the most strongly bioconcentrated fatty acid in polar lipids of scallop larvae (Marty et al. 1992; Delaunay et al. 1993; Soudant et al. 1998b). The proportion of DHA in the polar lipids of larvae was almost constant whereas it decreased in the neutral lipids. This finding raises the possibility that DHA was selectively incorporated into membrane PL at the expense of reserve lipids, most likely in response to the low dietary proportions (Plante et al. 2007). Maintenance of high level of DHA in membrane lipids was attributed to the fact that DHA plays a major role in maintaining the structural and functional integrity of cell membranes (Delaunay et al. 1993).

1.4.4 Effect of diet and ontogeny: sterol composition of scallops

Although bivalves are capable of selectively incorporating certain sterols, it is generally accepted that they have a negligible capacity for the biosynthesis or conversion of sterols. Preferential incorporation of cholesterol over other sterols was previously observed in scallops *P. maximus* (Soudant et al. 1998a), thus emphasizing the importance of this sterol. Here we showed that scallops fed PTCR exhibited a marked enrichment in brassicasterol compared to those fed PTC. A pioneer study showed that brassicasterol is important for bivalves (Voogt 1975) and it was suggested that brassicasterol can replace cholesterol for some functions (Pazos et al. 2003). Palacios et al. (2007) showed a similar

and constant level of free sterols found in different tissues were in accordance to their role in cellular membranes. Cholesterol was the major sterol, in free and esterified forms, underlying the specific importance of that sterol in cell metabolism (Palacios et al. 2007). Nevertheless, the presence of phytosterols in all tissues implies that these sterols could substitute for cholesterol in the cellular membrane (Palacios et al. 2007). The presence of several phytosterols in substantial concentrations, mainly brassicasterol and 24-methylenecholesterol in gonad and somatic tissues, further supports a specific physiological role of these sterols in scallops (Palacios et al. 2007). PTCR diet seems to promote accumulation of brassicasterol in larvae, but our results did not allow evaluating if this increase is beneficial to the larvae.

It is also noteworthy that level of cholesterol increased markedly during metamorphosis from 12 to 20% at the expense of β -sitosterol. This result suggests a specific nutritional requirement for cholesterol during metamorphosis of *P. maximus*. This requirement may be due to the fact that cholesterol is an essential component in animal membranes, with multiple effects on their physical properties including membrane fluidity, phase behaviour, thickness, and permeability (Crockett 1998). A widely accepted notion is that cholesterol stabilizes membranes, i.e. it increases the order of the surrounding acyl chains in membranes in the fluid phase (Crockett 1998). It is noteworthy that other phytosterols have less of an ordering effect on membranes than cholesterol (Suckling et al. 1979). Therefore, the observed increase in cholesterol during the metamorphosis in *P.*

maximus may reflect a role for cholesterol in the membrane response. However, the role of cholesterol in metamorphosing scallops requires further investigation.

1.5 CONCLUSION

In conclusion, our results suggest that scallop larvae *P. maximus* showed a more rapid metamorphosis when adding *R. salina* to a traditional hatchery diet. A more rapid accumulation of TAG until 19 dpf could indicate an advantage of using PTCR during larval development to obtain a more rapid metamorphosis process, but this trend seems to be inversed during post-larval ontogeny. We also observed a higher accumulation of AA in scallops fed PTCR, which may present an advantage for survival in pathogenic conditions. Furthermore, PTCR clearly enhanced the level of brassicasterol in scallops compared to that of animals fed PTC. However, the functional significance of this result remains unclear. Nevertheless, further experiment needs to evaluate the impact of the addition of *R. salina* during the post-larval development.

1.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Virgil Quillien and Olivier Gastineau (IFREMER, Brest) for their technical assistance with biochemical analyses and the technical staff from Argenton hatchery for their help with animal maintenance. Thanks are also addressed to Laure Devine for amending an English version of this manuscript. This study was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Société de

développement de l'industrie maricole and Ministère des relations internationales du Québec.

1.7 DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

La présente étude visait à examiner (1) l'effet de l'addition de la microalgue *Rhodomonas salina* au régime alimentaire de *P. maximus* (2) la dynamique énergétique et fonctionnelle de la composition en acides gras et en stérols durant l'ontogénie larvaire et post-larvaire de *P. maximus*. Le régime PTCR semble favoriser une métamorphose plus rapide, ce qui se reflète par un taux de double barre supérieur comparativement au régime PTC. De plus, à l'approche de la fixation, pendant le stade pédivéligère, le début de la production de byssus se traduit par des regroupements de larves nageuses en formation structurée qui rappellent des stalactites (Gerard et al. 1989). Ce critère n'est pas quantifiable mais il montre l'imminence de la fixation et ce phénomène se produit plus rapidement chez les larves nourries par le régime PTCR comparativement aux larves nourries avec PTC. Par contre, le succès de fixation est semblable pour les deux régimes à l'étude. Bien que la métamorphose arrive plus rapidement pour le régime PTCR, cela ne se traduit pas par une survie supérieure. À J41, les deux régimes présentent le même taux de fixation ce qui peut être influencé par les conditions hydrodynamiques du milieu d'élevage. En effet, une étude effectuée par Pernet et al. (2003b) a démontré un effet significatif du régime hydrodynamique sur le succès de fixation des larves de moule (*Mytilus* sp.), particulièrement la turbulence. Une alimentation plus efficace engendre de meilleures conditions physiologiques chez les larves et par le fait même une meilleure fixation. Il est possible que notre régime hydrodynamique, peut-être trop faible, puisse avoir affecté négativement la fixation des post-larves lors de notre étude. De plus, *Rhodomonas salina* est une grosse microalgue (7.5 μm) qui, selon nos observations, semble affecter le taux de

salissures sur les tamis. En effet, une plus forte concentration de salissure a été observée dans les tamis lors des élevages post-larvaires utilisant le régime PTCR. Cette présence de salissure pourrait possiblement épuiser les post-larves qui recherchent un substrat favorable et par le fait même, affecter leurs conditions physiologiques et l'énergie allouée à la fixation.

Les larves nourries avec le régime PTCR présentent une plus grande concentration de AA tandis que le régime PTC semble favoriser une accumulation de DHA dans les larves. En ce qui concerne les stérols, il est intéressant de voir l'accumulation préférentielle de brassicastérol dans les larves nourries avec PTCR. Cette accumulation préférentielle suggère une certaine importance du brassicastérol et il pourrait même remplacer le cholestérol dans la réalisation de certains rôles fonctionnels, le cholestérol étant un stérol important dans la composition membranaire (Soudant et *al.* 1998a). De façon générale, l'utilisation du régime PTCR semble favoriser les conditions d'élevage larvaire de *P. maximus*. Une métamorphose plus rapide permet de réduire le temps d'élevage larvaire et de transférer plus rapidement en nourricerie, ce qui est un avantage économique non négligeable pour les aquaculteurs. Par contre, lors de l'élevage post-larvaire la tendance semble s'inverser et PTC apparaît plus adapté pour des juvéniles avec une plus grande accumulation de TAG, EPA et cholestérol comparativement au régime PTCR.

Une étude connexe à la présente étude vise à tester le rôle des acides gras polyinsaturés sur les capacités de fixation des post-larves de Coquille Saint-Jacques afin d'accroître l'attachement du naissain sur des collecteurs artificiels placés pendant une année en milieu naturel. Cette étude sera effectuée dans un canal hycobenthos sous la supervision du Dr Frédéric Olivier du Muséum National d'Histoire Naturelle (Dinard, France). Elle permettra de déterminer l'influence d'un régime alimentaire riche en acides gras polyinsaturés sur la fixation de post-larves de *Pecten maximus* soumises à des conditions hydrodynamiques variables. Dans un même ordre d'idées, la présente étude ainsi que l'étude en canal hydrodynamique (HYCOBENTHOS) seront par la suite reproduites sur une espèce d'importance économique se retrouvant au Canada, *Placopecten magellanicus*, et dirigée par le Dr Réjean Tremblay de l'ISMER. Quelques points pourront alors être améliorés ou réévalués lors de cette seconde expérience. Tout d'abord un suivi larvaire et post-larvaire pourrait être effectué pour les protéines, lipides et glucides et non seulement à la métamorphose comme c'est le cas dans la présente étude. De plus, l'échantillonnage des triacylglycérols, acides gras et stérols pourrait s'échelonner sur une plus longue période lors de l'élevage post-larvaire. Il serait aussi intéressant d'utiliser le régime PTCR lors de l'élevage larvaire et d'utiliser le second régime, PTC, lors de l'élevage post-larvaire puisque PTCR semble plus adapté lors de l'élevage larvaire. Une seconde expérience sur *Placopecten magellanicus* nous permettra de vérifier l'effet de PTCR et de vérifier si ce régime présente les mêmes avantages que pour *Pecten maximus*. Finalement, d'autres études de fixation en canal hydrodynamique pourraient être effectuées à la station aquicole de Pointe-au-Père.

1.8 BIBLIOGRAPHIE

- Baker SM, Mann R (1994) Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) and the effects of hypoxia on postsettlement ingestion rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 181:239-253
- Bell JG, Sargent JR (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218:491-499
- Berntsson KM, Jonsson PR, Wangberg SA, Carlsson AS (1997) Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 154:139-153
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917
- Crockett EL (1998) Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist* 38:291-304
- Delaporte M (2006) Impact of 20 : 4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41:567-576
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF (2003) Effect of mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206:3053-3064

- Delaunay F, Marty Y, Moal J, Samain J-F (1993) The effect of monospecific algal diet on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 173 163-179
- Doroudi MS, Southgate PC, Mayer R (1999) Growth and survival of blacklip pearl oyster larvae fed different densities of microalgae. *Aquaculture International* 7:179-187
- Dubois M, Gillies KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for the determination of carbohydrates and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356
- Ermande B, Clobert J, McCombie H, Boudry P (2003) Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *Journal of Evolutionary Biology* 16:399-414
- Farias A, Iker U (2006) Nutrition in Pectinids. In: Shumway SE, Parsons GJ (eds) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture* Second edition, Vol *Developments in aquaculture and fisheries science*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p 521-536
- Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD (2002) Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 124:318-325
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry* 226:497

- Gallager SM, Mann R, Sasaki GC (1986) Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56:81-103
- Garrett RG, Grisham CM (2000) *Biochimie*, De Boeck Université, Paris, p. 238-239
- Gerard A, Salaun M, Tritar S (1989) Critères de compétence des larves à la métamorphose chez *Pecten maximus*. *Haliotis* 19:373-380
- Gladu PK, Patterson GW, Wikfors GH, Chitwood DJ, Lusby WR (1991) Sterols of some diatoms. *Phytochemistry* 30:2301-2303
- Gruffydd LD, Beaumont AR (1970) Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus*. *Helgol Wiss Meeresunters* 20:486-497
- Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MHE (eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum, New York, p. 29-60
- Hedgecock D, Launey S, Pudovkin AI, Naciri Y, Lapegue S, Bonhomme F (2007) Small effective number of parents (N-b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 150:1173-1182
- Holland DL (1978) Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and Biophysical perspectives in marine Biology* 4:85-123
- Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology* 234:277-288
- Kanazawa A (2001) Sterols in marine invertebrates. *Fisheries science* 67:997-1007

- Le Pennec M, Paugam A, Le Pennec G (2003) The pelagic life of the pectinid *Pecten maximus*--a review. ICES Journal of Marine Science 60:211-223
- Lowry OH, Rosebrough Nj, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry 193: 265-275
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 163:221-234
- Napolitano GE, Ackman RG, Silva-Serra MA (1993) Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. Marine Biology 117:647-654
- Nes WR (1974) Role of sterols in membranes. Lipids 9:596-611
- Nevejan N, Saez I, Gajardo G, Sorgeloos P (2003) Supplementation of EPA and DHA emulsions to a *Dunaliella tertiolecta* diet: effect on growth and lipid composition of scallop larvae, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture 217:613-632
- Palacios E, Racotta IS, Arjona O, Marty Y, Le Coz JR, Moal J, Samain JF (2007) Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis 2. Lipid classes and sterols. Aquaculture 266:266-273
- Pazos AJ, Silva A, Vazquez V, Perez-Paralle ML, Roman G, Sanchez JL, Abad M (2003) Sterol composition of gonad, muscle and digestive gland of *Pecten maximus* from Malaga (South Spain). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 134:435-446

- Pernet F, Bricelj VM, Cartier S (2005a) Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 329:265-280
- Pernet F, Bricelj VM, Parrish CC (2005b) Effect of varying dietary levels of [omega]6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 327:115-133
- Pernet F, Tremblay R (2004) Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310: 73-86
- Pernet F (2003) Nutrition et hydrodynamisme: Effets sur la reproduction et la performance larvaire des mollusques bivalves, Thèse Ph.D. Université Laval
- Pernet F, Tremblay R, Bourget E (2003a) Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: Larval growth, competency and settlement. *Journal of Shellfish Research* 22:377-388
- Pernet F, Tremblay R, Bourget E (2003b) Settlement success, spatial pattern and behavior of mussel larvae *Mytilus* spp. in experimental 'downwelling' systems of varying velocity and turbulence. *Marine Ecology-Progress Series* 260:125-140
- Plante S, Pernet F, Hache R, Ritchie R, Ji B, McIntosh D (2007) Ontogenic variations in lipid class and fatty acid composition of haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* in relation to changes in diet and microbial environment. *Aquaculture* 263:107-121

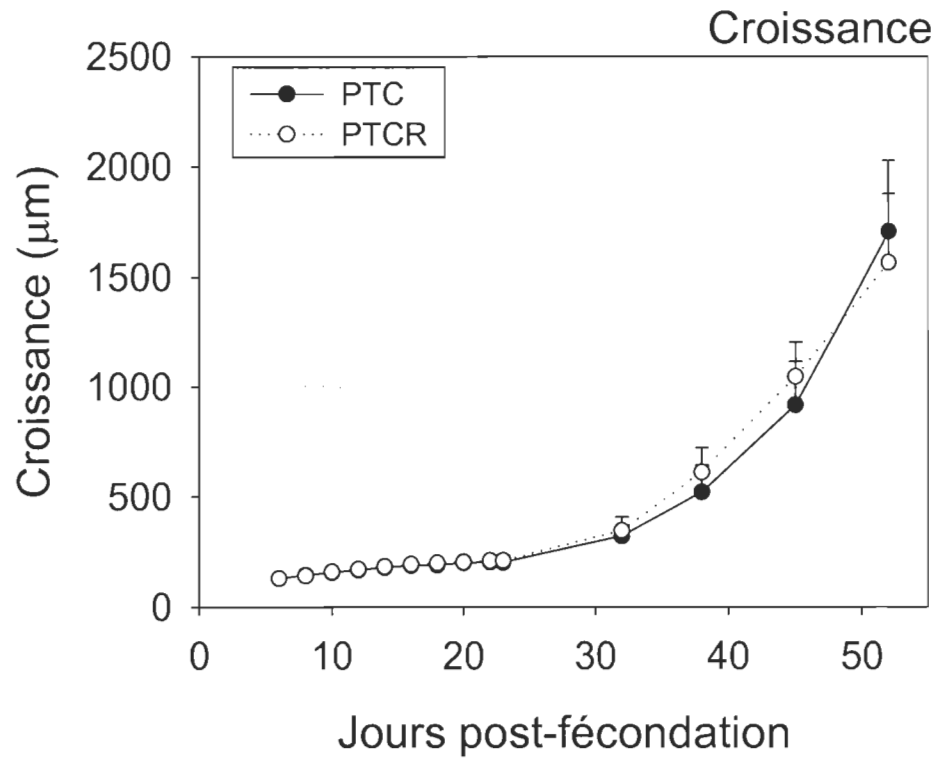
- Robert R, Miner P, Nicolas JL (1996) Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International* 4:305-313
- Schiopu D, B George S, Castell J (2005) Ingestion rates and dietary lipids affect growth and fatty acid composition of *Dendraster excentricus* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*
- Smith WL, Murphy RC (2003). The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier Science, Amsterdam, p. 341-371.
- Soudant P, Moal J, Marty Y, Samain JF (1996). Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 205, 149-163.
- Soudant P, Moal J, Marty Y, Samain JF (1997). Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 215, 103-114.
- Soudant P, Le Coz JR, Marty Y, Moal J, Robert R, Samain JF (1998a) Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119:451-457
- Soudant P, Marty Y, Moal J, Hicham M, Samain JF (1998b) Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 121:279-288

- Soudant P, Sanles MV, Quere C, Le Coz JR, Marty Y, Moal J, Samain JF, Sorgeloos P (2000) The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 184:315-326
- Stanley D, Hoback W, Bedick J, Tunaz H, Rana R, Aliza A, Millers J (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in larvae of the butterfly, *Colias eurytheme*. *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 123: 217-223
- Suckling KE, Blair HAF, Boyd GS, Craig IF, Malcolm BR (1979) The importance of the phospholipid bilayer and the length of the cholesterol molecule in membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 551:10
- Tremblay R, Cartier S, Miner P, Pernet F, Quere C, Moal J, Muzellec M-L, Mazuret M, Samain J-F (2007) Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262:410-418
- Turner N, Else PL, Hulbert AJ (2003) Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90:521-523
- Utting SD, Millican PF (1998) The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165:167-178
- Veniot A, Bricelj VM, Beninger PG (2003) Ontogenetic changes in gill morphology and potential significance for food acquisition in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Marine Biology* 142:123-131

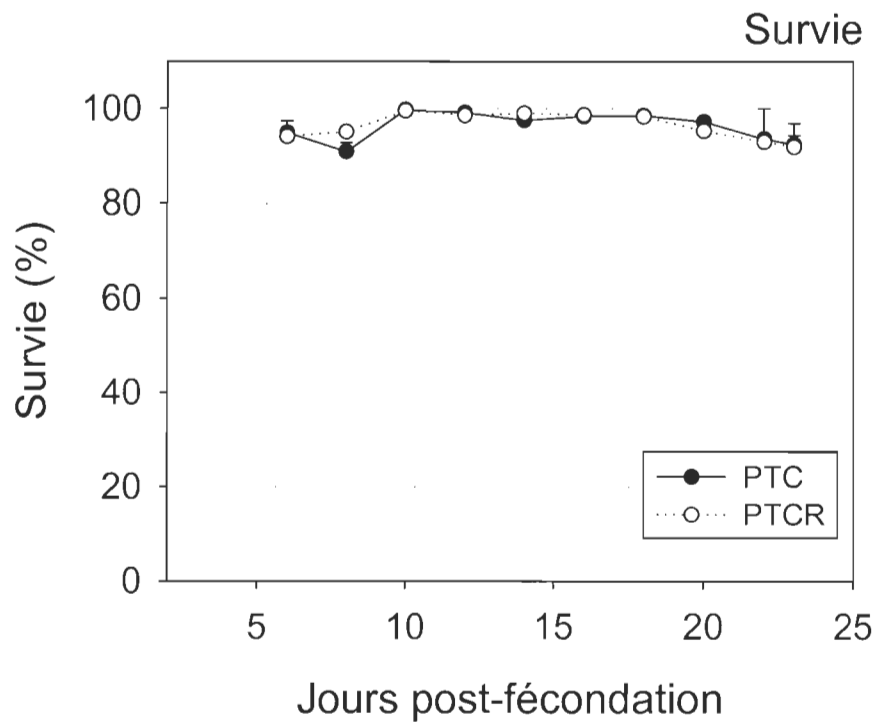
- Voogt PA (1975) Investigations of the capacity of synthesizing 3[beta]-sterols in mollusca-
-XIII. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (Anisomyaria).
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular
Biology 50:499-504
- Wikfors GH, Gladu PK, Patterson GW (1991) In search of the ideal algal diet for oysters:
recent progress, with emphasis on sterols. Journal of Shellfish Research 10:292

1.9 ANNEXES

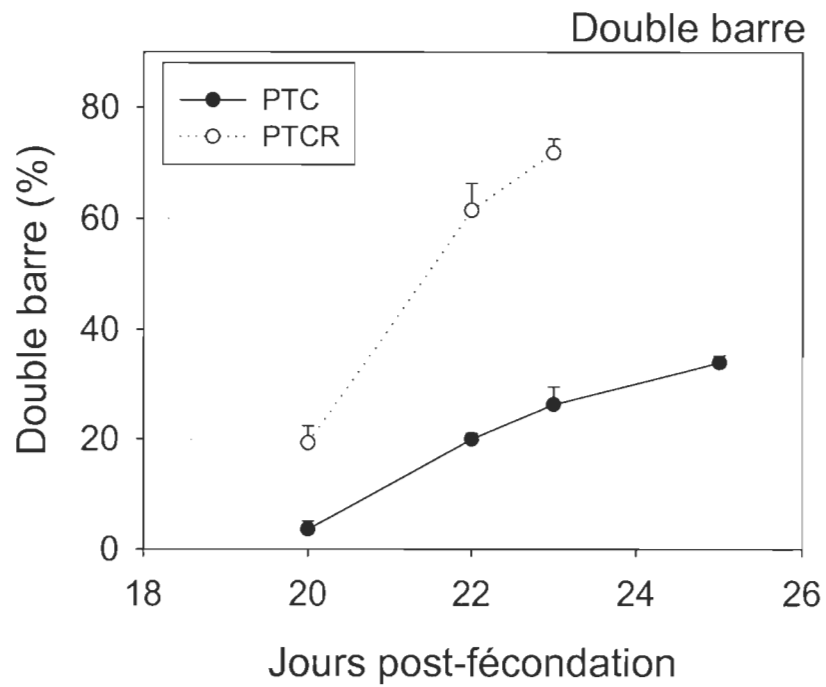
Afin de pouvoir comparer nos résultats cette expérience a été exécutée une seconde fois durant l'été 2006. Il est important de mentionner que les méthodes d'échantillonnage et d'analyse sont les mêmes pour les 2 expériences effectuées. Ces résultats ne sont pas présentés dans l'article afin de faciliter la présentation de l'article qui sera soumis à Aquaculture. Les annexes qui suivent présentent les résultats obtenus lors de l'expérience exécutée en 2006.



ANNEXE 1 : *Pecten maximus*. Taux de croissance des larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation (moyenne \pm e-t; n=3 réplicats bassin par régime).



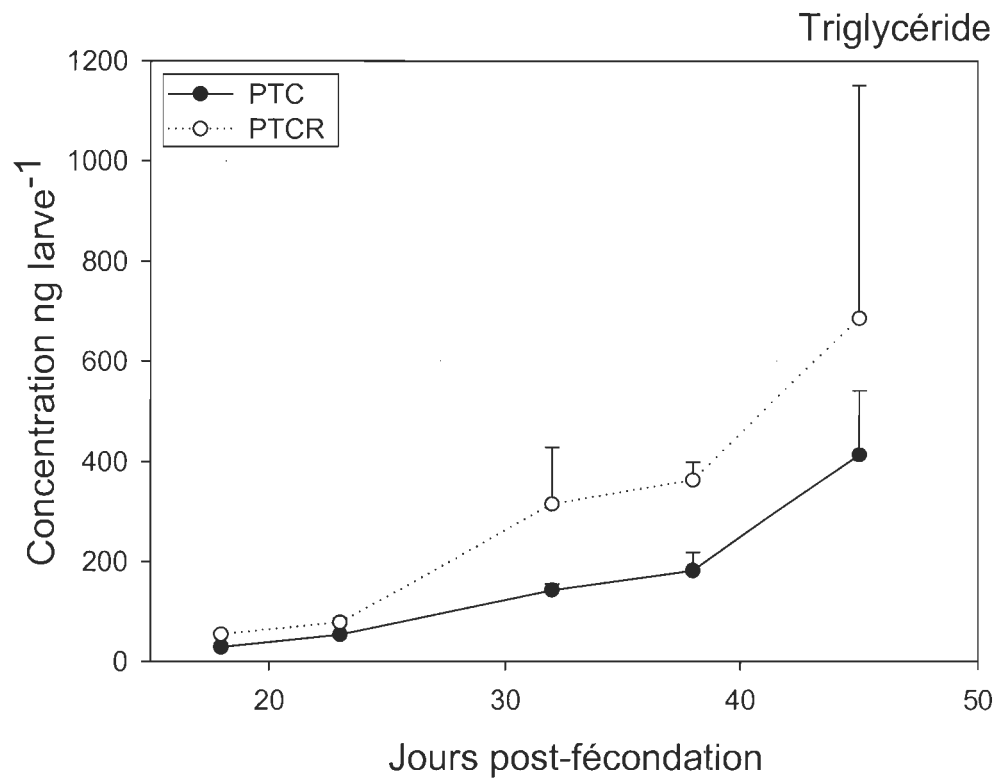
ANNEXE 2 : *Pecten maximus*. Survie des larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation (moyenne \pm e-t; n=3 réplicats bassin par régime).



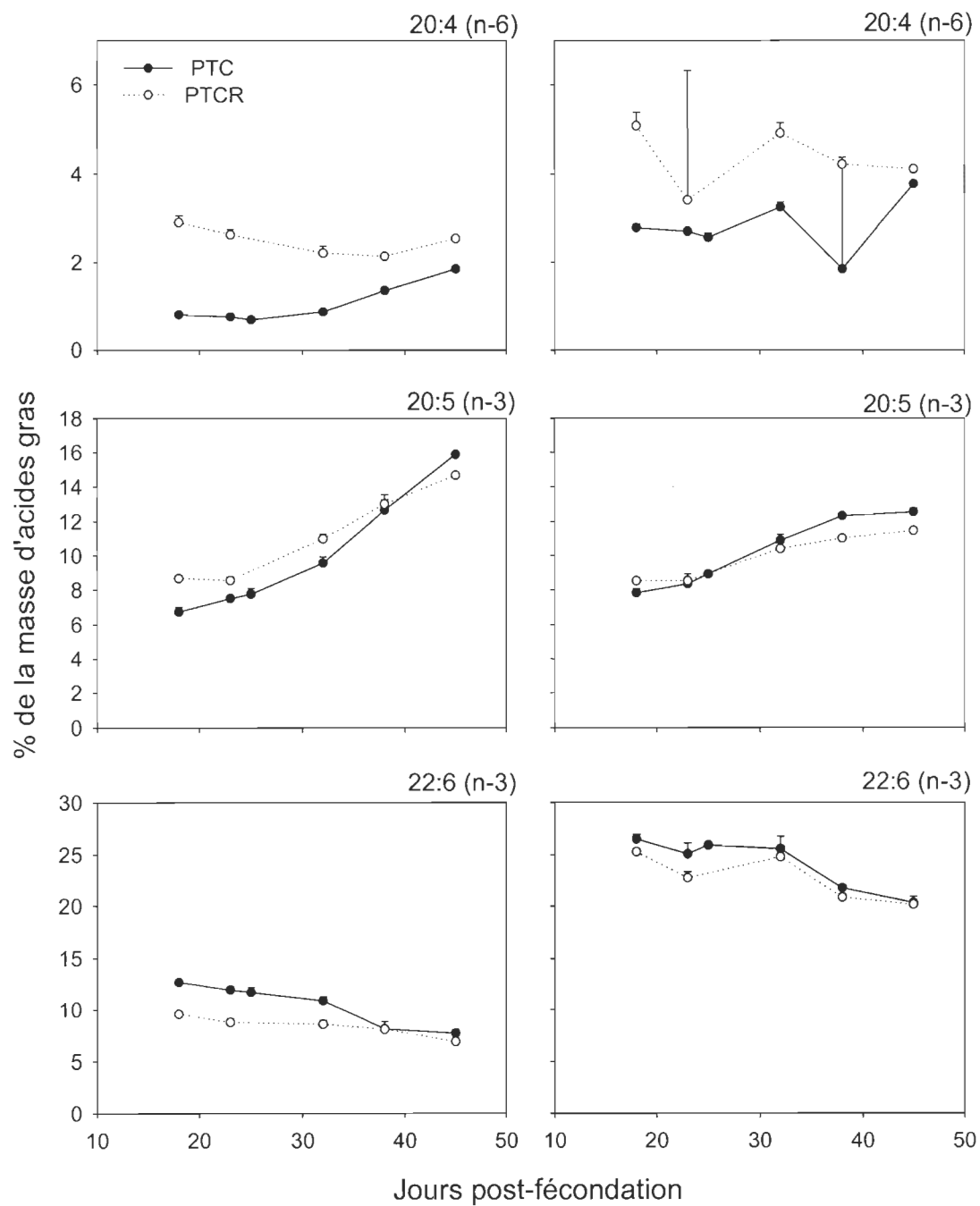
ANNEXE 3 : *Pecten maximus*. Apparition de double barre chez les larves nourries avec PTC et PTCR en fonction des jours post-fécondation (moyenne \pm e-t; n=3 réplicats bassin par régime).

ANNEXE 4 : *Pecten maximus*. Matière organique (%) et contenu biochimique en ng larve⁻¹ nourries avec les régimes PTC et PTCR pour les jours 18-23-32-38 et 45 (moyenne \pm e-t).

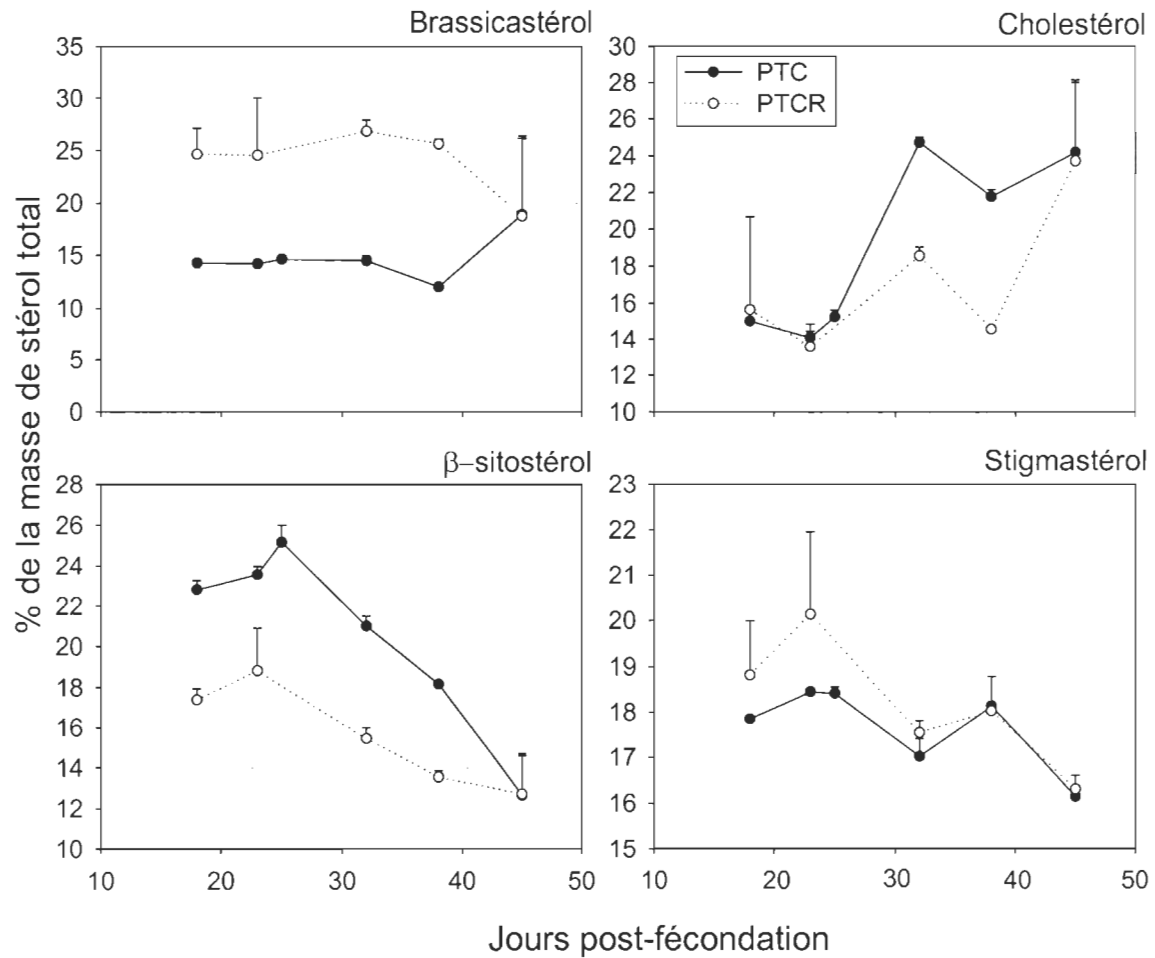
Jours	Régime	Matière organique %	Protéines ng larve ⁻¹	Lipides ng larve ⁻¹	Glucides ng larve ⁻¹
18	PTCR	60,10 \pm 0,99	261.86 \pm 21.03	87.11 \pm 6.50	24.15 \pm 3.73
	PTC	51,10 \pm 3,87	170.28 \pm 20.94	47.60 \pm 5.27	12.29 \pm 2.47
23	PTCR	55,96 \pm 5,40	319.31 \pm 63.70	117.33 \pm 13.84	32.17 \pm 4.90
	PTC	55,28 \pm 2,78	253.76 \pm 19.61	86.39 \pm 6.24	22.75 \pm 1.40
32	PTCR	45,97 \pm 0,14	784.27 \pm 472.90	181.21 \pm 105.08	60.25 \pm 36.06
	PTC	52,28 \pm 0,43	533.08 \pm 32.93	120.91 \pm 19.81	31.87 \pm 7.93
38	PTCR	51,28 \pm 3,42	2971.82 \pm 139.06	495.76 \pm 28.38	210.96 \pm 45.03
	PTC	47,58 \pm 0,78	2561.41 \pm 221.54	427.51 \pm 9.40	123.42 \pm 23.26
45	PTCR	36,41 \pm 6,87	6655.26 \pm 219.59	1386.30 \pm 29.40	918.23 \pm 356.16
	PTC	41,38 \pm 3,41	4178.41 \pm 100.45	935.33 \pm 68.91	635.56 \pm 171.76



ANNEXE 5 : *Pecten maximus*. Concentration en triglycérides dans les larves nourries avec les régimes PTC et PTCR (moyenne \pm e-t).



ANNEXE 6 : *Pecten maximus*. Composition en AA (20:4n-6), EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) pour les lipides neutre et polaire dans les larves nourries avec les régimes PTCR et PTC, exprimée en % de la masse d'acides gras totaux (moyenne \pm e-t).



ANNEXE 7 : *Pecten maximus*. Concentration de cholestérol, brassicastérol, stigmasterol and β -sitostérol dans les larves nourries avec les régimes PTCR et PTC en fonction des jours post-fécondation, exprimée en % de la masse de stérol total (moyenne \pm e-t).

