

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

—
ECOLE DOCTORALE
VÉGÉTAL – ENVIRONNEMENT – NUTRITION – AGROALIMENTAIRE – MER

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Optimisation des conditions hydrobiologiques
pour la conservation de l'huître creuse
Crassostrea gigas en système re-circulé**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie des organismes

Spécialité : Biologie marine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Florence BUZIN

Le 28 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : M^{elle} Christine DUPUY, professeur, Université de La Rochelle
M. Tristan RENAULT, cadre de recherche, IFREMER La Tremblade

Examineurs : M. Sébastien LEFEBVRE, professeur, Université de Lille 1
M. Jean-Paul BLANCHETON, cadre de recherche, IFREMER Palavas les flots

Directeur de thèse : M. Laurent BARILLÉ, professeur, Université de Nantes

Co-directeur de thèse: M. Joël HAURE, cadre de recherche, IFREMER Bouin

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux organismes financeurs de ce travail de thèse, la région Pays de Loire et IFREMER, pour le co-financement de ma bourse de thèse au cours de ces trois années.

Je remercie le Pr. Christine Dupuy et le Dr. Tristan Renault, rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que le Pr. Sébastien Lefebvre et le Dr. Jean-Paul Blancheton qui ont également accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, Jérôme Hussenot, Patrick Lassus, Sébastien Lefebvre, Vona Méléder, Joël Haure et Laurent Barillé pour leur analyse de mon travail, leurs conseils avisés et leur contribution scientifique à ces travaux, tout au long de ces trois années.

Un grand et chaleureux merci à mes deux directeurs de thèse, Laurent Barillé et Joël Haure. Merci à tous deux de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de l'avoir encadré avec disponibilité et enthousiasme. Merci aussi pour votre soutien dans les moments d'essoufflements !

Merci Laurent pour ton encadrement « à distance », ton recul vis-à-vis de mon travail m'a permis de garder le cap. Merci pour l'ensemble des corrections apportées aux manuscrits de publications et de thèse.

Merci Joël pour ton encadrement, quotidien celui-là, pour les discussions, les conseils et je suis désolée pour les cheveux blancs supplémentaires...

Merci à Sébastien Lefebvre d'avoir assuré ma formation en modélisation et merci à Jérôme Hussenot pour son aide et ses conseils pour l'élaboration des expérimentations. Merci à Ewa Lukomska pour les analyses CHN.

Merci aux stagiaires, Tsiri et Katia, pour avoir assuré les expérimentations dont les résultats ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Pour avoir travaillé plusieurs années en aquaculture, j'ai pris pour habitude de vivre dans des coins reculés et isolés de toute vie sociale...enfin presque. Après avoir repris mes études sur Brest et Nantes, me voilà à Bouin, autre coin calme... Mais, mon petit côté « rustique » (l'auteur de ce terme se reconnaîtra) m'a conféré semble t-il une certaine capacité d'adaptation et je crois que j'ai fini par prendre goût à la Vendée...

Un grand merci à toute l'équipe de la station de Bouin qui m'a accueillie pendant ces trois années. Merci Karen pour ta constante bonne humeur et pour toutes ces petites attentions. Merci Mathias et Béatrice pour votre soutien technique indispensable, la réalisation de cette thèse aurait été impossible sans votre collaboration quotidienne. Merci à Max pour la production de phytoplancton et à Christian pour la maintenance du matériel. Merci à Hubert pour la construction et l'aménagement des systèmes re-circulés, outils indispensables à ce sujet de thèse !

Merci à tous pour toutes ces heures de nettoyage forcées d'huîtres ...

Merci à ma famille et plus particulièrement à ma sœur Agnès, pour son soutien permanent depuis le début de ces sept années de reprise d'étude. Sans son soutien moral et matériel, je ne serais jamais aller jusqu'au bout de cette thèse.

Un chaleureux merci à Richard, mon fournisseur d'huîtres mais qui est aussi devenu ma bouée d'oxygène pendant ces trois années de durs labeurs. Il faut même avouer que tu as pris une grande place dans ma vie ... il va falloir que je reste à Bouin... !

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	17
1. Contexte de l'étude : gestion des risques _____	1
1.1- Situation économique de l'ostréiculture _____	1
1.2- Une production soumise à des contraintes _____	3
1.3- Les moyens de prévention du risque _____	5
2. Comment préserver les mollusques bivalves ? _____	7
2.1- Les techniques disponibles _____	7
2.2- Système re-circulé : état de l'art _____	9
2.3- La sauvegarde de l'huître en système re-circulé : objectifs de l'étude _____	12
CHAPITRE 1 : Les conditions de sauvegarde des huîtres à terre.....	17
1.1- Introduction _____	19
1.2- Stockage de l'huître Pacifique <i>Crassostrea gigas</i> hors d'eau à basse température: biométrie, eau intervalvaire et évaluation sensorielle _____	21
1.2.1- Abstract _____	23
1.2.2- Introduction _____	23
1.2.3- Material and methods _____	25
1.2.4- Results _____	27
1.2.5- Discussion _____	32
1.3- Les conditions de sauvegarde de l'huître en système re-circulé _____	36
1.3.1- Introduction _____	36
1.3.2- Bilan des connaissances sur les systèmes re-circulés appliqués aux mollusques bivalves _____	36
1.3.2.1. Le dispositif expérimental.....	37
1.3.2.2. Les paramètres hydrobiologiques	40
1.3.3- Conditions particulières de l'étude _____	43
1.3.3.1. Bassins expérimentaux	43
1.3.3.2. Paramètres hydrobiologiques	49
1.3.4- Conclusion _____	53
CHAPITRE 2 : Réponses de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> à deux paramètres environnementaux : le stress thermique lié au transfert en système re-circulé et la vitesse du courant.....	55
2.1- Introduction _____	57
2.2- Evaluation du stress suite à un choc thermique chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> à l'aide de trois indicateurs _____	58
2.2.1- Introduction _____	58
2.2.2- Matériel et méthodes _____	59

2.2.3- Résultats	63
2.2.4- Discussion	71
2.2.5- Conclusion	73
2.3- Impact de la vitesse du courant sur les réponses physiologiques de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	74
2.3.1- Introduction	74
2.3.2- Matériel et méthodes	75
2.3.3- Résultats	78
2.3.4- Discussion	80
2.3.5- Conclusion	85
CHAPITRE 3 : Analyse des flux d'azote et application au système re-circulé à l'aide de la modélisation	87
3.1- Introduction	89
3.2- Excrétion ammoniacale et taux de nitrification potentiel chez l'huître Pacifique <i>Crassostrea gigas</i> : application à un système re-circulé	90
3.2.1- Abstract	92
3.2.2- Introduction	92
3.2.3- Material and methods	94
3.2.3.1. TAN excretion measurement	94
3.2.3.2. Potential nitrification rates	96
3.2.3.3. Statistical analysis	96
3.2.4- Results	97
3.2.4.1. TAN excretion measurement	97
3.2.4.2. Potential nitrification rates	99
3.2.5- Discussion	101
3.2.5.1. TAN excretion measurement	101
3.2.5.2. Potential nitrification rates (PNR)	102
3.2.5.3. Application to a recirculating tank	103
3.2.6- Conclusion	105
3.3- Modélisation de la sauvegarde de l'huître Pacifique <i>Crassostrea gigas</i> en système re-circulé	106
3.3.1- Introduction	106
3.3.2- Matériel et méthodes	108
3.3.3- Résultats	118
3.3.4- Discussion	133
3.3.5- Conclusion	142
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	145
BIBLIOGRAPHIE	153

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1. Evolution de la production française de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> et de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> de 1998 à 2008 (FAO, 2010).	2
Figure 2. Répartition de la production ostréicole française selon les régions en 2007 (FranceAgrimer, 2010).	2
Figure 3. Nombre de jours de fermeture des zones de production conchylicole du littoral français métropolitain entre 1984 et 2003 en raison d'algues toxiques (données modifiées de Belin, 2004).	7
Figure 4. Fréquence des fermetures de zones de production, tous mollusques confondus en raison de bloom d'algues toxiques sur le département du Finistère entre 1984 et 2010. En noir : toutes fermetures quelle que soit la durée, en rouge : fermetures inférieures ou égales à 30 jours (données personnelles et modifiées de Belin (2004)).	14
Figure 5. Variations in Pacific oyster total weight (A), dry flesh weight and fresh flesh weight (B). C: control, n.s.: not significant, $p > 0.05$; ; $p < 0.05$, vertical bar = 95 % confidence interval.	28
Figure 6. Variations in intervalval water index in oysters stored in a cold-room for 22 days. For each date, n= 40.	29
Figure 7. Sensory analysis: Evolution of 18 sensory attributes, n.s.: not significant,	31
Figure 8. Frequency of bivalve production-site closures following toxic algal bloom on the French coasts between 1984 and 2003 (modified from Belin, 2004).	35
Figure 9. Exemples de systèmes re-circulés pour bivalves. A : Vue schématique du système re-circulé utilisé par Henley et al. (2001) pour la conservation de moules d'eau douce (Unionidae). B : Vue schématique du système re-circulé proposé par Christophersen et al. (2006) pour l'élevage de larves de coquilles Saint-Jacques (<i>Pecten maximus</i>).	40
Figure 10. Vue en 3 dimensions du système re-circulé expérimental élaboré pour le stockage d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> . Les flèches rouges indiquent le sens du courant d'eau. PC : Pompe à chaleur, UV : Ultraviolet.	44
Figure 11. Vue générale des 12 systèmes re-circulés. ea : entrée d'eau dans le système re-circulé, bh : bac contenant les paniers d'huîtres, pc : pompe à chaleur assurant la thermorégulation de l'eau et équipée d'une lampe UV, pm : pompe à membranes apportant le phytoplancton au système re-circulé, bph : bac de stockage du phytoplancton tr : tuyau PVC assurant le retour de l'eau en début de bac.	45
Figure 12. A : Stockage dans des clayettes pouvant contenir 15 kg d'huîtres, placées dans un bac de type « raceway » de 1300 l. B : Utilisation de paniers d'une capacité de 3 kg disposés dans les bacs expérimentaux de type « raceway » de 90 l.	45
Figure 13. Evolution de l'azote ammoniacal total, des nitrites et des nitrates de deux systèmes re-circulés contenant des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> , l'un équipé d'un filtre biologique et l'autre sans filtre biologique (Bourneuf, données non publiées).	46
Figure 14. Concentrations bactériennes mesurées dans un système re-circulé équipé d'un traitement UV et dans un système sans UV (sans réplikat). La concentration en bactéries	

- (flore totale mise en culture sur du milieu Zobell) est comptabilisée après 21 jours de stockage de 15 kg d'huîtres, sans renouvellement, sans apport de nourriture et à 16°C. CFU : Colony Forming Unit. 47
- Figure 15.** Schéma du fonctionnement du système re-circulé utilisé dans cette étude. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau. P : pompe, PC : pompe à chaleur, UV : lampe ultra-violet. 48
- Figure 16.** A : Partie aval du bac de stockage. pr : pompe faisant circuler l'eau dans la pompe à chaleur, te : entrée d'eau dans la pompe à chaleur, ts : sortie d'eau de la pompe à chaleur, s : sortie d'eau du bac, sv : évacuation de l'eau du système re-circulé par surverse, pc : pompe chaleur. B : Détails de 4 systèmes re-circulés couplés, al : point d'arrivée d'air pour le système d'air-lift, ae : arrivée d'eau de mer pour le renouvellement d'eau dans le système re-circulé. 48
- Figure 17.** A : Photo en microscopie optique de la diatomée *Skeletonema costatum*. 50
- Figure 18.** Pertes de poids sec chez l'huître *Crassostrea gigas* soumise à quatre conditions de température différentes et sans apport de nourriture, après 5 semaines de stockage. 51
- Figure 19.** Relation établie entre le débit d'air (l.min⁻¹) apporté par l'air-lift et la vitesse du courant (cm.s⁻¹) créée et mesurée dans le bac de stockage des huîtres. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types, n=12. 52
- Figure 20.** Dispositif expérimental permettant le suivi des trois indicateurs de stress lors d'un choc thermique. A : traitement de l'eau, B : bacs tampons où est effectué le mélange eau et microalgue, C : bancs d'écophysiologie et bacs contenant les huîtres pour les mesures de rouge neutre. FS : filtre à sable, BT : bac tampon, RRN : rétention de rouge neutre. S.c : *Skeletonema costatum*, ⊗ : pompe, ⊘ : vanne. 61
- Figure 21.** Evolution de la filtration chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ▲ : de 16°C à 10°C, B. : ▲ de 16°C à 22°C. — : Filtration mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9).. 64
- Figure 22.** Evolution de la filtration chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ▲ : de 10°C à 16°C, B. ▲ : de 22°C à 16°C — : Filtration mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9).. 65
- Figure 23.** Evolution de la consommation d'oxygène chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ■ : de 16°C à 10°C, B. ■ : de 16°C à 22°C, — : consommation d'oxygène mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9). 67
- Figure 24.** Evolution de la consommation d'oxygène chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ■ : de 10°C à 16°C, B. ■ : de 22°C à 16°C, — : consommation d'oxygène mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9). 68
- Figure 25.** Vue au microscope optique (X 400) d'hémocytes d'huître *Crassostrea gigas* après une coloration au rouge neutre. A : hémocyte dont les lysosomes ont des membranes déstabilisées et dont le rouge neutre s'est répandu dans le cytosol, B : hémocyte dont les lysosomes ont les membranes sont restées imperméables, ls : lysosomes aux membranes stables. 69
- Figure 26.** Pourcentage de déstabilisation des lysosomes chez l'huître *Crassostrea gigas* après un choc thermique d'une amplitude de 6°C à partir de 16°C. a : observation 30 min après le choc thermique, b : après 60 min, c : après 120 min et d : après 180 min. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance, p< 0.05; n=6. 70
- Figure 27.** Dispositif de mesures de l'effet du courant sur les réponses physiologiques de 45 huîtres *Crassostrea gigas* disposées dans un panier (a). b : arrivée de l'eau mise en mouvement par l'air-lift ; c : panier vide placé pour limiter l'impact des turbulences dues

à l'air-lift lors des mesures des vitesses de courant importantes. d : arrivée d'eau de mer de renouvellement.	77
Figure 28. Effet de la vitesse du courant sur la filtration chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> . Les barres d'erreurs représentent les écarts types, n=3.....	78
Figure 29. Effet de la vitesse du courant sur la consommation d'oxygène chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> . Les barres d'erreurs représentent les écarts types, n =3.	79
Figure 30. Turbulences engendrées par le système d'air-lift réglé à un débit de 40 l.min ⁻¹	81
Figure 31. Effect of temperature and food level (with carbon concentration as the descriptor) on the Total Ammonia Nitrogen (TAN) excretion rate of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> . The physiological rate was standardized to the dry weight of soma (DW _{soma}) (see Materials and Methods) $p < 0.05$; $r^2 = 0.54$	98
Figure 32. Estimation of the Potential Nitrification Rates (PNR) of the bacterial population colonizing the oyster shell. Nitrite accumulation is expressed per unit of the internal (●) and the external (▲) shell surface area (cm ²). Each point is the mean value and error bars represent standard deviations (n=3).	99
Figure 33. Estimation of the Potential Nitrification Rates from the bacterial population colonizing the oyster soft tissue. Nitrite accumulation is expressed per unit of total tissue dry weight (DW _{total}). Each point is the mean value and error bars represent standard deviations (n=3).	100
Figure 34. Daily Potential Nitrification Rate (PNR) for different parts of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>	101
Figure 35. Change in the Total Ammonia Nitrogen (TAN) concentration during the storage of a stock of 180 kg of <i>Crassostrea gigas</i> in a recirculating tank.	104
Figure 36. Modèle conceptuel simplifié associant les processus physiologiques de l'huître, les flux de matières azotées dissoutes, les compartiments (grisé) et les variables forçantes (en rouge) au sein du système re-circulé.	108
Figure 37. Evolution des paramètres environnementaux des 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> . A : Evolution des concentrations en chlorophylle <i>a</i> (µg.l ⁻¹). B : Evolution des concentrations en matières en suspension (MES) (mg.l ⁻¹). Les barres correspondent aux écarts types (n=3).	119
Figure 38. A : Evolution de la température (°C) des 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> . Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (n=288). B : Evolution de la concentration en phytoplancton (mesures quotidiennes) apporté à l'ensemble des 6 systèmes re-circulés pendant les 5 semaines de sauvegarde d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i>	119
Figure 39. Simulation de l'évolution de la matière organique particulaire (MOP) au cours de la sauvegarde d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> pendant 5 semaines dans 6 systèmes re-circulés (SR) soumis à des conditions différentes (tableau 8).● : MOP observée, — : MOP simulée. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (n=3).	121
Figure 40. Evolution des poids sec, poids de soma et poids de réserve des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> sur les 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines. — : poids sec simulé, — : poids de soma simulé, — : poids de réserve simulé, ● : poids sec observé. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95% (n=40).	124
Figure 41. Simulation de l'évolution des fonctions liées à l'alimentation chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> au cours d'une sauvegarde de 5 semaines en système re-circulé. — : consommation organique, — : ingestion organique, — : absorption organique, --- : filtration.	125

- Figure 42.** Simulation de l'évolution de l'énergie absorbée chez l'huître *Crassostrea gigas* au cours d'une sauvegarde de 5 semaines en système re-circulé. — : respiration, — : assimilation, — : bilan énergétique..... 126
- Figure 43.** Evolution des concentrations en éléments azotés mesurées au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en système re-circulé de 5 semaines. A : Evolution de l'azote ammoniacal total. B : Evolution de l'azote nitrique. 127
- Figure 44.** Evolution de l'activité de nitrification (act nitrif) observée à partir de l'évolution de la concentration en azote ammoniacal total au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en système re-circulé..... 129
- Figure 45.** Simulation de l'évolution de l'azote ammoniacal total (N-NH₄⁺/NH₃) et de l'azote nitrique (N-NO₃⁻) au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines dans 6 systèmes re-circulés (SR) soumis à des conditions différentes (tableau 8). --- : Azote Ammoniacal Total : simulations, ● : Azote Ammoniacal Total: observations, Δ : N-NO₃⁻ : simulations, - - - : N-NO₃⁻ : observations. 131
- Figure 46.** Indice de sensibilité (IS) pour les différents paramètres du modèle élaboré à l'occasion de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en systèmes re-circulés (SR). Une variation, non simultanée de +10 % (noir) et -10 % (gris) de chaque paramètre, est présentée pour les deux types de SR (SR 1 et SR 3) et pour trois variables d'états : Poids sec, NH₄ et NO₃⁻. Seuls les paramètres les plus sensibles ont été retenus. 132
- Figure 47.** Simulation de l'effet de trois apports de phytoplancton (cellules.ind⁻¹.jour⁻¹) sur l'évolution de trois variables, le poids sec, l'azote ammoniacal total et l'azote nitrique au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines. Système re-circulé (SR 1), caractérisé par un volume de 1300 l et par une charge de 138 kg.m⁻³. Système re-circulé (SR 3), caractérisé par un volume de 90 l et par une charge de 167 kg.m⁻³. 136
- Figure 48.** Evolution des concentrations en nitrites observées au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant cinq semaines dans 6 systèmes re-circulés soumis à des conditions expérimentales différentes. 139
- Figure 49.** Simulation de l'effet de trois températures, 13°C, 16°C et 22°C sur l'évolution de trois variables, le poids sec, l'azote ammoniacal total et l'azote nitrique au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines. Système re-circulé (SR 1), caractérisé par un volume de 1300 l et par une charge de 138 kg.m⁻³. Système re-circulé (SR 3), caractérisé par un volume de 90 l et par une charge de 167 kg.m⁻³. 141

Tableaux

Tableau 1. Description of the attributes used for the sensory assessment.....	26
Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques et teneurs en nutriments de l'eau salée souterraine disponible sur le polder de Bouin en baie de Bourgneuf (Vendée, France).....	49
Tableau 3. Résultats de l'ANOVA à deux facteurs sur l'effet de l'heure de prélèvement et de la température sur la déstabilisation des lysosomes au cours du test de RRN.	71
Tableau 4. Correspondance entre les vitesses de courant appliquées au bac de stockage (V_b) et celles estimées à l'intérieur d'un panier (V_p).....	80
Tableau 5. Summary of the experimental conditions tested for the excretion measurement of <i>Crassostrea gigas</i> . Mean carbon concentrations (as food level descriptors) are provided with their standard deviation (SD) (n=3). For the oyster biometry, all variables are given with means and SD (n=53). C= carbon; N= nitrogen; DW= dry weight.	97
Tableau 6. Results of a two-way ANOVA on the effect of temperature and food on the excretion rate of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> . P= probability.	98
Tableau 7. For the sake of comparison, literature data of TAN excretion measured by different authors for the oyster <i>Crassostrea gigas</i> . n.a: not available, Chl a: chlorophyll a, C: carbon, * : oyster species, <i>Saccostrea commercialis</i>	102
Tableau 8. Conditions expérimentales testées au cours de la sauvegarde d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> pendant 5 semaines selon les systèmes re-circulés (SR).	109
Tableau 9. Variables appliquées au modèle couplant réponses écophysiologicals de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé.	115
Tableau 10. Equations des processus utilisées dans le modèle couplant réponses écophysiologicals de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé.	116
Tableau 11. Paramètres utilisés dans le modèle couplant réponses écophysiologicals de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé (SR).	117
Tableau 12. Caractéristiques biométriques des huîtres en début et en fin d'expérimentation quelles que soient les conditions expérimentales. Les moyennes sont indiquées avec les écarts types (n=40).	122
Tableau 13. Bilan en azote (en g de N) du SR 1 réalisé à partir des données du modèle.	129

INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte de l'étude : gestion des risques

1.1- Situation économique de l'ostréiculture

L'ostréiculture moderne est née en 1853 lorsque les biologistes Coste et De Bon introduisent les techniques de culture de l'huître en France, faisant ainsi passer la production de la cueillette à l'élevage. L'espèce principalement cultivée aujourd'hui est l'huître creuse *Crassostrea gigas*, importée du Japon dans les années 1970, tandis que l'huître plate *Ostrea edulis*, espèce indigène des côtes européennes, ne fait l'objet que d'une production marginale (Bonnet et Troadec, 1985).

En 2007, pour une production nationale conchylicole (ensemble des mollusques cultivés) de 193.620 tonnes représentant une valeur de 400 millions d'euros, la production d'huîtres s'élève à 113.200 tonnes (soit 58,5 %) pour une valeur de 268 millions d'euros (soit 67 %) (FranceAgrimer, 2010). Si en terme de quantités vendues, la conchyliculture ne représente que 27,4 % des produits de la mer (pêche et aquaculture) (FranceAgrimer, 2010), la part de la production de mollusques représente 79,5 % de la production aquacole française (FAO, 2010) et l'ostréiculture représente un quart des ventes des produits de la mer. Entre 2001 et 2008, quelle que soit l'espèce considérée, la production ostréicole se caractérise par une relative stabilité (Fig. 1). En 2008, la production d'huîtres plates est de 1920 tonnes plaçant la France au 1^{er} rang mondial pour cette espèce et la production d'huîtres creuses est de 111.000 tonnes plaçant la France au 1^{er} rang européen. La région Poitou-Charentes est la principale région productrice française avec 47 % des huîtres produites, suivie de la Bretagne avec 23,5 %, tandis que la région des Pays de Loire ne représente que 6 % de la production nationale (Fig. 2). En 2007, le secteur représente 9100 emplois équivalents temps plein soit 82,5 % des emplois du secteur aquacole (Source : Ifremer - SIH 2008 / DPMA- recensement piscicole 2007).

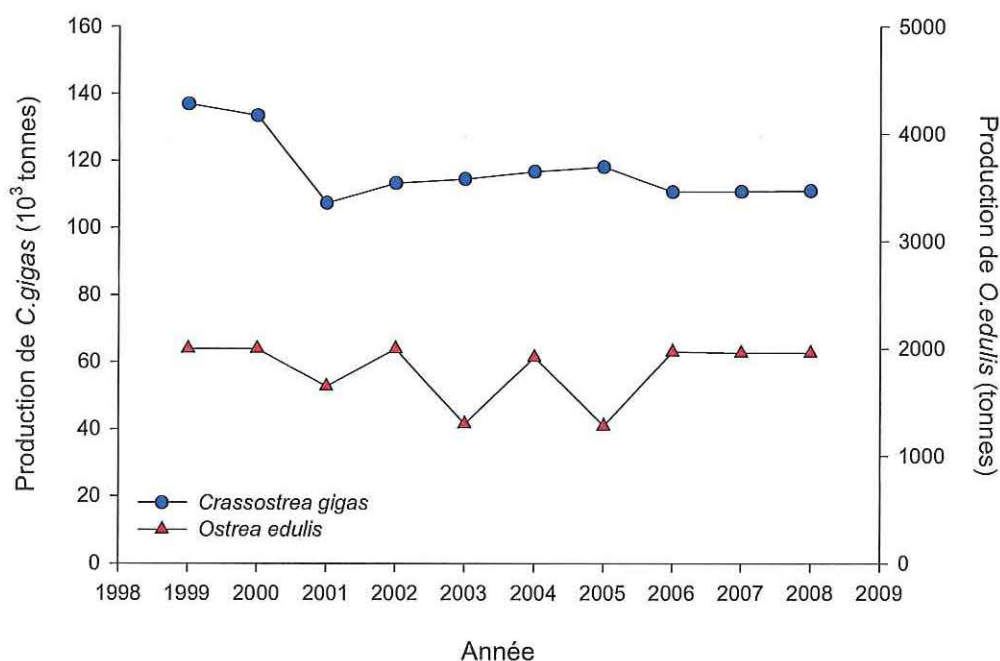


Figure 1. Evolution de la production française de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de l'huître plate *Ostrea edulis* de 1998 à 2008 (FAO, 2010).

Le secteur ostréicole représente ainsi une part significative de la production marine française et porte l'image d'une activité traditionnelle qui fait partie de la culture du littoral français. Cependant, cette filière doit régulièrement composer avec les aléas environnementaux. Les surmortalités qui frappent durement la filière depuis 2008 (Sauvage et al., 2010; Segarra et al., 2010) risquent d'avoir des conséquences économiques importantes et nécessitent, une nouvelle fois, que des solutions techniques soient trouvées pour que l'activité perdure.

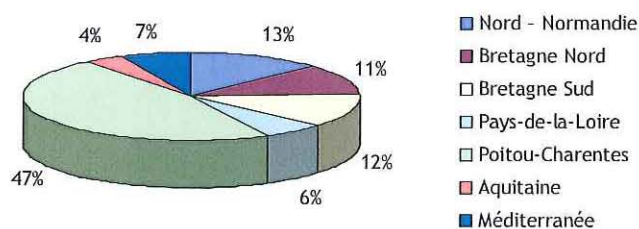


Figure 2. Répartition de la production ostréicole française selon les régions en 2007 (FranceAgrimer, 2010).

1.2- Une production soumise à des contraintes

Historiquement, la profession a dû faire face à plusieurs épizooties majeures touchant d'abord l'huître plate, en 1920-1927 (maladie non identifiée) puis en 1969 et 1979 en raison, respectivement, des maladies Martélioïse et Bonamioïse qui ont entraîné des mortalités massives d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Bonnet et Troadec, 1985). Les agents pathogènes de ces deux maladies sont des protozoaires appartenant à l'ordre des Haplosporidies (Sprague, 1979). *Marteilia refringens* est observé au niveau de l'épithélium stomacal et des diverticules digestifs des huîtres et il se caractérise par un cycle de vie complexe lui donnant un caractère saisonnier (Audemard et al., 2001; Grizel et al., 1974). *Bonamia ostreae* infecte les hémocytes des huîtres et les cellules épithéliales des branchies et de l'estomac et il reste infectieux toute l'année (Arzul et al., 2009). La production de l'huître plate était alors concentrée en Bretagne, et c'est dans cette région que les retombées économiques ont été les plus importantes avec des pertes estimées à 1,8 milliard de francs en 1983 (Grizel, 1992).

Entre 1966 et 1969, l'huître creuse d'origine portugaise (*Crassostrea angulata*) a été touchée par une maladie d'origine virale appelée « maladie des branchies » qui provoquait des nécroses au niveau des branchies et des palpes labiaux (Comps et Duthoit, 1976). Puis une seconde maladie, imputée à un virus de type iridovirus et infectant les hémocytes, a entraîné en 1973 la disparition brusque et presque définitive de tous les stocks, sauvages et cultivés (Bonnet et Troadec, 1985; Renault et Novoa, 2004). A partir de 1970, l'introduction de naissains de l'espèce *Crassostrea gigas* en provenance du Japon a permis le réensemencement des gisements naturels. Des huîtres adultes ont été importées du Canada pour relancer la production dont les pertes s'élevaient alors à 60 000 tonnes par an (Grizel et Héral, 1991).

Depuis 1993, des mortalités récurrentes ont été constatées en périodes estivales sur le naissain et les juvéniles (Renault et al., 1994a; Soletchnik et al., 1999). Ce phénomène s'est intensifié à partir de 2008 et les mortalités ont atteint un taux de 80 à 100 % sur certains sites (Segarra et al., 2010) mettant de nombreux professionnels en difficulté économique. Si l'héspèsvirus Os HV-1 a été identifié comme une des causes les plus probables de ces pics de mortalités estivales (Renault et al., 1994), l'étiologie des mortalités semble multi-factorielle et résulterait d'une interaction complexe entre le statut physiologique de l'hôte, l'environnement et un organisme pathogène (Gagnaire et al., 2006b). Le programme MOREST (MORTALITÉS ESTIVALES de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 2001-2006) a permis d'identifier quatre facteurs environnementaux pouvant exercer

une influence sur les mortalités (Samain et McCombie, 2008). Le premier serait une température de 19°C au-dessus de laquelle les risques d'apparition des mortalités sont favorisés (limite thermique remise en question depuis 2008). A cela s'ajoute l'intensité des pluies qui provoque un apport d'eau douce et de ses produits associés (agricoles, domestiques, industriels) (Samain et McCombie, 2008). Ce phénomène a des conséquences non négligeables sur les zones ostréicoles d'estuaires et de baies qui sont soumises à de fortes pressions anthropiques (Mori, 1979; Menesguen, 1992). L'excès de nutriments peut mener à un risque d'eutrophisation et d'efflorescence d'algues toxiques (Camargo et Alonso, 2006; Bricker et al., 2008) modifiant la structure des peuplements de producteurs primaires dans la colonne d'eau (Baeta et al., 2011). Les ressources trophiques de l'huître sont alors modifiées qualitativement et quantitativement et peuvent être à l'origine d'un déficit énergétique perturbant la physiologie des individus (Mori, 1979). Enfin, les pratiques culturales sont elles-mêmes soupçonnées d'être un élément de risque supplémentaire pour les huîtres qui, mises en culture à proximité du sédiment, sont susceptibles d'être gênées par des relargages de H₂S et de NH₃ (Soletchnik et al., 2005). Ce phénomène représente alors un stress et peut interagir avec l'état physiologique des bivalves (Soletchnik et al., 2006) et conduire à des mortalités additionnelles.

Parallèlement à ces facteurs de mortalités bien identifiés, d'autres auteurs incriminent des causes plus générales telles qu'un élevage monospécifique (Grizel, 1992) ou un excès de biomasse d'huîtres en élevage (Bonnet et Troadec, 1985; Héral, 1989), renforcé aujourd'hui par le fait que l'espèce *Crassostrea gigas*, en raison de son caractère invasif, prolifère depuis le milieu des années 90 entraînant la formation de bancs naturels (Lejart, 2009). Ainsi, dans certaines baies, le stock d'huîtres sauvages peut être du même ordre de grandeur que celui des huîtres cultivées avec une colonisation significative des zones de production ostréicoles (Cognie et al., 2006). D'autres compétiteurs comme la crépidule *Crepidula fornicata* peuvent également contribuer à une diminution des ressources disponibles pour les huîtres (Decottignies, 2006). L'ostréiculture doit aussi faire face à des menaces plus locales, telles que des pollutions aux hydrocarbures comme celles faisant suite à l'échouage de l'Amoco Cadiz en 1978 ou de l'Erika en 1999 (Bado Nilles, 2008) ou des pollutions d'origines bactériennes ponctuelles ou récurrentes (Marchand et al., 2010). Enfin, les développements d'efflorescences (blooms) de phytoplancton toxique sont aussi une contrainte majeure pour la production ostréicole (Lassus et al., 2004; Perez Agundez et Mongruel, 2010).

1.3- Les moyens de prévention du risque

Dans un but de protection sanitaire et pour une meilleure connaissance de la qualité de l'eau des zones conchylicoles et des zones de pêche à pied, l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a mis en place et développé plusieurs réseaux et veilles sanitaires dont les suivis sont réalisés par les Laboratoires Environnement Ressources répartis tout le long du littoral. Le réseau REMI (REseau de contrôle Microbiologique) évalue la qualité microbiologique du littoral, découpé en zone, et son adéquation avec les classements de l'administration (Direction Départementale des Territoires et de la Mer) (Marchand et al., 2009). A cet effet, un protocole strict est établi mentionnant trois niveaux d'alerte, avec une alerte préventive en cas de risque de contamination telle qu'une forte pluviométrie (niveau 0). Le niveau 1 est déclenché lorsque qu'il y a une contamination détectée (notamment en surveillance régulière) et un niveau 2 en cas de contamination persistante. Le dispositif prévoit alors une information immédiate de l'administration afin qu'elle puisse prendre les mesures adaptées en terme de protection de la santé des consommateurs et une surveillance renforcée jusqu'à la levée du dispositif d'alerte, avec la réalisation de prélèvements et d'analyses supplémentaires (Marchand et al., 2010). Le seuil microbiologique déclenchant une surveillance renforcée est défini pour chaque classe de qualité, classe A (≥ 1000 *Escherichia coli* /100 g de C.L.I. ; Chair et Liquide Intervalvaire), classe B ($\geq 4\ 600$ *E. coli* /100 g de C.L.I.) et classe C ($\geq 46\ 000$ *E. coli* /100 g de C.L.I.). La levée du dispositif d'alerte nécessite l'obtention de résultat inférieur à ces valeurs seuils (Marchand et al., 2009). Un troisième réseau, le réseau REPHY (REseau de surveillance PHYtoplancton et phycotoxines) fait le suivi spatio-temporel des flores phytoplanctoniques, du contexte hydrologique et des événements phycotoxiniques associés (http://envlit.ifremer.fr/infos/rephy_info_toxines). Les phycotoxines représentant un risque pour la santé humaine (Rehnstam-Holm et Hernroth, 2005) sont actuellement en France liées à trois familles de toxines : i) toxines lipophiles incluant les diarrhéiques ou DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) pouvant provoquer des intoxications de type diarrhémique, ii) toxines paralysantes ou PSP (Paralytic Shellfish Poison), neurotoxines pouvant provoquer des intoxications paralysantes graves, voire mortelles, iii) toxines amnésiantes ou ASP (Amnesic Shellfish Poison) qui sont des neurotoxines pouvant conduire à des atteintes neurologiques graves, voire mortelles, avec perte de mémoire (Belin et Raffin, 1998). Enfin, le réseau ROCCH (REseau d'Observation de la Contamination Chimique) est chargé du suivi de la concentration de trois métaux réglementés (Cd, Hg et Pb) (Marchand et al., 2009). Deux autres réseaux viennent renforcer le dispositif de surveillance des zones côtières en France, le réseau REPAMO (REseau de PATHologie des MOLLusques) qui a pour

mission le suivi zoosanitaire des cheptels conchylicoles avec pour objectifs de i) suivre les maladies à déclaration obligatoire dans un cadre réglementaire européen, ii) surveiller la santé des mollusques marins de pêche ou d'élevage, iii) étudier les mortalités anormales. L'Observatoire Conchylicole (anciennement réseau REMORA, REseau Mollusques des Rendements Aquacoles) est en charge du suivi de la survie et la croissance des mollusques et de la qualité de lots cultivés de l'huître *Crassostrea gigas* (www.ifremer.fr/remora).

Si les mortalités chroniques d'huîtres constatées n'entraînent pas directement de fermetures de ventes de mollusques, le dépassement des seuils cités précédemment (microbiologie, phycotoxine, contaminants chimiques) conduit à la fermeture ponctuelle ou au déclassement sanitaire des zones ostréicoles pouvant entraîner une suspension de la commercialisation (Pérez Agundez et al., 2010). Ainsi en France, entre 1984 et 2003, les interdictions administratives de vente et de ramassage des mollusques, en raison de la présence de phycotoxines montrent une tendance cyclique et à la hausse avec un maximum observé de 1460 jours cumulés en 1989 et de 2606 jours cumulés en 2002 (Fig.3), soit une hausse de 56 % sur un peu plus d'une décennie (Belin, 2004). A ce constat, il faut ajouter les déclassements et les mises en alerte de zones en raison de contaminations bactériologiques. Ainsi, si la qualité microbiologique des zones s'améliore jusqu'en 2002, une dégradation s'est ensuite amorcée et elle semble s'intensifier d'année en année avec en 2008, une répartition des zones de qualité A, B, C qui est respectivement de 2 %, 92 %, 6 % (Amouroux, 2009). Cependant, la mise à disposition de données plus récentes sur l'impact des phénomènes d'efflorescences d'algues toxiques fait actuellement défaut. Leurs compilations au sein d'une base de données permettraient éventuellement de confirmer la tendance croissante observée jusqu'en 2003 et serait un outil à la disposition des différents acteurs intéressés par la filière conchylicole (administratifs, scientifiques et professionnels). Le Bihan et Pardo (2010) soulignent la difficulté à évaluer les pertes financières subies par les ostréiculteurs en raison de la présence des blooms d'algues toxiques, mais les principaux préjudices sont une insuffisance de trésorerie, une baisse du chiffre d'affaire et des pertes de clients. A cela s'ajoute la détérioration de l'image du produit vendu auprès du consommateur (Dubuisson-Quellier, 2001; Pérez Agundez et al., 2010) et la difficulté à obtenir des indemnités et à mettre en place un système d'assurance viable (Le Bihan et Pardo, 2010).

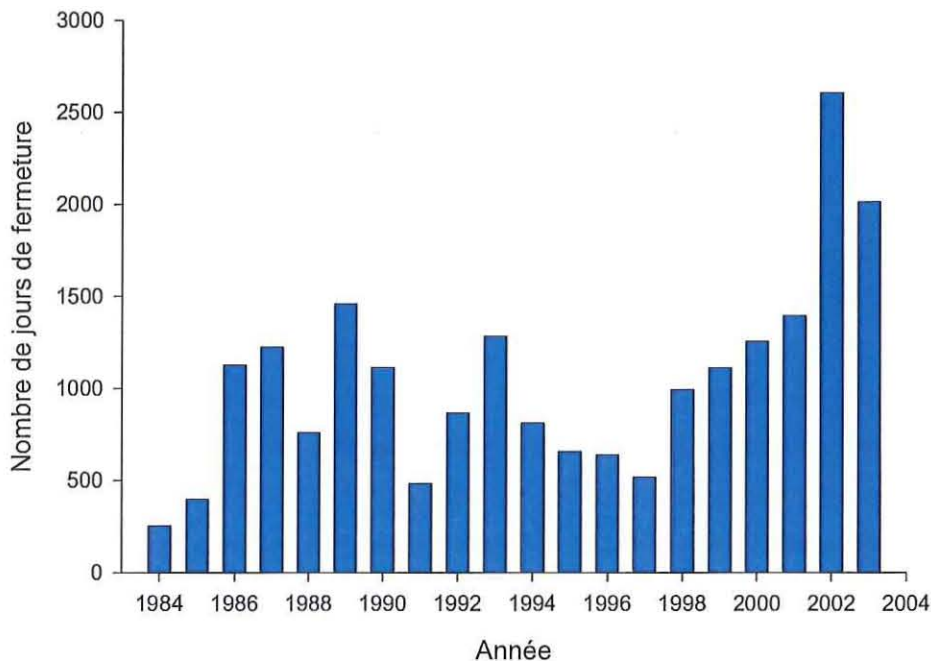


Figure 3. Nombre de jours de fermeture des zones de production conchylicole du littoral français métropolitain entre 1984 et 2003 en raison d'algues toxiques (données modifiées de Belin, 2004).

2. Comment préserver les mollusques bivalves ?

2.1- Les techniques disponibles

Afin de commercialiser des bivalves respectant les normes sanitaires en vigueur, les producteurs se heurtent le plus souvent aux interdictions de vente et disposent de peu de moyens alternatifs. Face aux contaminations bactériologiques, la purification des bivalves est le procédé imposé par la réglementation (Directive CEE 91/492) et seul l'éloignement des zones de production de la côte, et donc des sources de contamination, a été étudié comme autre solution (Brenner et al., 2009). La purification consiste alors à placer des bivalves dans des bassins alimentés en eau propre pendant plusieurs heures. Les méthodes utilisées pour diminuer les charges en bactéries sont diverses, l'eau peut être traitée par chloration, par irradiation aux ultra-violets, par ozonation ou par un traitement aux iodophores ou même par une combinaison de deux méthodes (Boulter et al., 1999; De Abreu Corrêa et al., 2007). Si l'indicateur suivi est alors la concentration en *Escherichia*

coli (Règlement CEE 2073/2005), tous les agents infectieux (bactéries et virus) ne sont pas éliminés à la même vitesse (Rehnstam-Holm et Hernroth, 2005) et la durée de la purification sera dépendante de l'espèce de bivalve considérée et des paramètres de l'eau telles que la température, la turbidité et la salinité (Jackson et Ogburn, 2009; Love et al., 2010).

Le traitement des bivalves contaminés par des algues toxiques fait actuellement l'objet de plusieurs études mais aucune solution fiable n'est proposée aux producteurs. L'élimination de l'organe qui concentre la toxine (la glande digestive) est une méthode pratiquée uniquement sur la coquille Saint-Jacques (Blanco et al., 2002a) et les procédés utilisés par les industriels telles que la stérilisation ou la cuisson des bivalves ont permis de réduire les concentrations en toxines mais en proportion insuffisante (Etheridge, 2010). Les travaux menés actuellement visent à améliorer les techniques de détection des toxines (Jackson et Ogburn, 2009; Etheridge, 2010) et à comprendre leur cinétique d'accumulation et de purification (Mafrá et al., 2010; Röder et al., 2011) à l'aide de la modélisation des mécanismes de contamination et de décontamination (Blanco et al., 2002b; Guéguen, 2009; Lassus et al., 2007). Les méthodes de décontamination explorées ont révélé l'effet positif de l'apport en nourriture sur l'élimination des toxines avec une cinétique présentant deux phases, une première rapide puis une lente (Marcaillou et al., 2010). A l'occasion du programme COMSAUMOL (Maintien de la Commercialisation par la Sauvegarde et la Détoxification des Mollusques, 2008-2011), différentes voies de décontamination ont été investiguées. La décontamination de la moule (*Mytilus edulis*) par un apport de microalgues fourrages a permis d'estimer une durée de 14 à 18 jours pour ramener les concentrations en toxines sous le seuil sanitaire (Marcaillou et al., 2010). D'autres procédés physico-chimiques utilisant des oxydants (ozones, peroxyde d'hydrogène) ou des tensioactifs (lécithine) ont été testés et semblent prometteurs car ils pourraient ramener le temps de décontamination à 10 jours (Haure et al., 2011). Des apports de microalgues fourrages (*Skeletonema costatum*) à des huîtres *Crassostrea gigas* pourraient permettre une décontamination des individus en 5 jours (Haure et al., 2011). Cependant, il est important de prendre aussi en compte les coûts induits par les traitements proposés pour que la décontamination reste économiquement supportable par les producteurs. Par ailleurs, ce type de procédés nécessite d'isoler les bivalves du milieu naturel pour maîtriser la gestion de l'eau et de la nourriture et pour le contrôle de certains paramètres. La sauvegarde à terre d'un stock de bivalves dans une structure préservée du milieu naturel devenu momentanément insalubre, permettrait alors de détoxifier des animaux contaminés et d'assurer le maintien de la commercialisation (Pérez Agundez et al., 2010).

La sauvegarde des bivalves à terre peut aussi être appliquée en conditions émergées avec un maintien des bivalves en chambre froide à une température adéquate. La conservation en chambre froide est une solution simple et couramment utilisée par les conchyliculteurs afin de prolonger la durée de vie des bivalves hors de l'eau. Cependant, cette méthode doit être appliquée tout en maintenant la qualité du produit et en respectant les normes sanitaires en vigueur (Règlement (CE) 2073/2005). Il est alors nécessaire de définir une durée de conservation optimale pour une sauvegarde à une température définie. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce sujet et les informations sur les conditions de stockage des bivalves sont rares (Bird et al., 1995 ; Boyd et al., 1980; Cao et al, 2009 a,b ; Khan et al., 2005). La sauvegarde de bivalves en structure à terre peut aussi être réalisée en conditions immergées et dans le contexte d'une interdiction de prise d'eau dans le milieu naturel, la principale contrainte est alors la limitation en eau, impliquant le confinement du stock de bivalves dans un volume d'eau peu ou pas renouvelé. Face à ce problème, la sauvegarde d'huîtres en système re-circulé est un procédé qui peut être envisagé.

2.2- Système re-circulé : état de l'art

La filière piscicole

Depuis la fin des années 80, la filière aquacole piscicole a développé des systèmes re-circulés avec pour objectif une production intensive de poissons sur des bases économiques compétitives (Losordo et al., 1999; Timmons et Ebeling, 2007). Actuellement, dix espèces de poissons sont produites en système re-circulé en Europe (Martins et al., 2010) couvrant l'ensemble du cycle de production depuis le stockage des géniteurs, l'écloserie, jusqu'au grossissement. Le développement de ces structures permet de faire face à la fois à des contraintes environnementales et économiques. La limitation des surfaces exploitables par l'aquaculture et la disponibilité en eau de plus en plus limitée représentent des contraintes techniques identifiées en amont d'un élevage aquacole. En aval, la maîtrise des rejets en terme de pollutions biologiques, c'est à dire par excès de matières organiques rejetées et pertes accidentelles de poissons dans le milieu naturel, sont aussi des motivations amenant au développement des systèmes re-circulés (Martins et al., 2010). L'utilisation de ces structures permet par ailleurs d'augmenter les densités de poissons en élevage, de travailler en milieu contrôlé en limitant l'impact des pollutions et des problèmes pathologiques sur le cheptel. Cette sécurisation du stock permet alors d'améliorer la productivité de l'élevage et d'assurer une activité économique viable

(Martins et al., 2010). Actuellement, les études menées dans le domaine des systèmes re-circulés visent à améliorer la qualité de l'eau en développant des processus de dénitrification pour contrôler les concentrations en nitrate (Grguric et al., 2000; Lee et al., 2000; Menasveta et al., 2001; Aslan et Dahabb, 2008; Singer et al., 2008), des techniques de concentration des boues pour l'élimination des matières particulaires et des traitements à l'ozone (Martins et al., 2010).

La filière des crustacés

La filière de l'élevage de la crevette est la seconde à s'être intéressée au système re-circulé pour faire face à de sévères pathologies depuis la fin des années 1990 qui ont entraîné des pertes économiques estimées à plusieurs milliards de dollars (Menasveta et al., 2001; Wang, 2003). La qualité de l'eau est alors aussi le problème principal et les études concernent surtout l'élimination des nitrates (Kuhn et al., 2010). Outre les élevages de crevettes, une étude montre la faisabilité de l'élevage de l'écrevisse du genre *Cherax* en système re-circulé avec cependant un taux de croissance inférieur à celui constaté en élevage en extérieur (Rodríguez-Canto et al., 2002), mais l'utilisation de ces systèmes ne semble pas s'être étendue à d'autres espèces de crustacés.

Les systèmes intégrés re-circulés

Dans un même objectif d'amélioration de la qualité de l'eau et pour une valorisation économique des rejets, des études se multiplient sur l'élevage intégré de plusieurs espèces, occupant des niveaux trophiques complémentaires (Troell et al., 2003). Ainsi, Wang (2003) a étudié la faisabilité d'un traitement des effluents d'un élevage de crevettes par des microalgues, elles-mêmes consommées par des bivalves. Une autre étude associait un élevage de crevettes avec un traitement des effluents intégrant des marais (Lin et al., 2003). Shpigel et Blaylock (1991) ont travaillé sur le traitement de rejets d'élevages intensifs de poissons par la culture d'huîtres *Crassostrea gigas* dans le cadre d'un système intégré semi re-circulé (Shpigel et al., 1997). La faisabilité de l'association de la production de plusieurs espèces tels que l'ormeau, l'oursin et la daurade (Schuenhoff et al., 2003) ou le tilapia et l'huître *Crassostrea gigas* ont aussi fait l'objet d'une étude en système semi re-circulé (Miranda et al., 2010). Les systèmes intégrés apparaissent alors comme un moyen économique de réduire l'impact environnemental des élevages en diminuant les charges particulaires et les nutriments dissous des eaux de rejets.

La filière des mollusques marins

Finalement, c'est au début des années 2000 que la réflexion et les essais d'élevage de bivalves en système re-circulé se développent pour différents motifs telles qu'une sécurisation de la production vis-à-vis du milieu naturel (Buchanan et al., 1998; Wikfors et al., 2004) ou pour une meilleure maîtrise des conditions d'élevages (O'Beirn et al., 1998). Aux Etats-Unis, la sauvegarde d'espèces en voie de disparition comme la moule d'eau douce a été à l'initiative de la mise au point de systèmes re-circulés pouvant couvrir l'ensemble du cycle de production avec dans certains cas des études de faisabilité allant jusqu'à une estimation des coûts (O'Beirn et al., 1998; Henley et al., 2001). A cette occasion, les croissances et les taux de survie ont été étudiés pour différentes espèces d'Unionidés (Jones et al., 2005) avec des résultats probants sur des durées de 14 à 22 semaines (O'Beirn et al., 1998; Henley et al., 2001).

La filière de la coquille Saint-Jacques s'est aussi intéressée à un niveau expérimental à la mise au point de système re-circulé avec pour objectif le développement d'une production commerciale permettant de diminuer la pression sur les stocks naturels (Widman et al., 2003). Les essais portent alors sur l'effet de différents taux de renouvellement sur la survie de naissains de *Pecten maximus* (Christophersen et al., 2006) ou sur l'efficacité de différents filtres biologiques pour l'élevage d'*Argopecten irradians irradians* (Widman, 1999; Widman et al., 2003).

Le développement de nurseries de clams *Mercenaria mercenaria* apparaît aux Etats-Unis dans les années 2000 pour répondre à une demande croissante des consommateurs (Pfeiffer et al., 1999) et a également été à l'origine de production en système re-circulé, incluant une automatisation de la production et une recherche de gains de productivité (Pfeiffer et Rusch, 2000).

Aux Etats-Unis toujours, Demetropoulos et Langdon (2004) ont mis au point un élevage d'ormeaux en circuit re-circulé et en co-culture avec l'algue *Palmaria mollis* pour une meilleure gestion de la productivité de chacune des deux espèces et une sécurisation de la production face aux problèmes pathologiques déjà rencontrés.

L'étape de purification des bivalves, mise en place lorsqu'ils sont impropres à la consommation, peut aussi être effectuée en système re-circulé (Boulter et al., 1999) avec les mêmes objectifs que dans le cas d'une production, à savoir une réduction des coûts énergétiques et des besoins en eau, une gestion des rejets d'effluents contaminés, une maîtrise des paramètres permettant une épuration optimale et une souplesse dans la localisation géographique des structures de purification (De Abreu Corrêa et al., 2007; Zhu et al., 1999).

La filière des huîtres

Une synthèse bibliographique réalisée par Hussenot (2006) a montré que les informations disponibles sur l'élevage de l'huître en système re-circulé restent limitées. Les premiers essais remonteraient à 1976, au cours desquels Epifanio et Mootz (1976) montrent la faisabilité d'un grossissement de post-larves d'huîtres en système re-circulé pendant 46 semaines. Une seconde étude analyse les points clefs d'un élevage d'huîtres en système re-circulé dans l'objectif d'une production commerciale (Thielker, 1981). Elle présente comme particularité d'avoir intégré la production de microalgue au système d'élevage. Ces travaux ont montré l'impact de la densité des huîtres stockées et du taux de renouvellement de l'eau sur la qualité de l'eau recyclée. Les systèmes re-circulés ont aussi été utilisés avec succès dans le cadre de travaux de laboratoire dans un but de conservation de bivalves en milieu confiné, avec de faibles densités et pour une durée de 22 mois (Macmillan et al., 1994) ou pour la maturation de géniteurs d'huîtres *Crassostrea virginica* sur 5 semaines de conditionnement (Buchanan et al., 1998) .

Finalement, l'élevage de l'huître en système re-circulé s'est limité à des études expérimentales et à des co-cultures en systèmes intégrés (Hussenot, 2006). L'absence de développement des systèmes re-circulés adaptés à l'élevage de l'huître provient à la fois d'un manque d'intérêt économique et de l'image d'un produit intimement liée à son origine et à l'aspect traditionnel de sa culture en milieu naturel (Hussenot, 2006). Cependant, l'apparition de mortalités sévères depuis 2008 et les risques croissants liés au développement d'algues toxiques (Lassus et al., 2004; Frias et Segovia, 2010; Pérez Agundez et al., 2010) incitent la filière conchylicole à développer ces procédés. Depuis peu, l'intérêt pour ce sujet se développe à l'exemple du projet européen REPROSEED (2010-2014) dont un des axes est dédié à la mise au point d'élevages larvaires de bivalves en système re-circulé ou encore des travaux de Frias et Segovia (2010) qui ont montré la faisabilité de la gestion de géniteurs en systèmes re-circulés.

2.3- La sauvegarde de l'huître en système re-circulé : objectifs de l'étude

Les systèmes re-circulés pour mollusques bivalves, et notamment les huîtres, peuvent être envisagés comme recours possibles aux risques en conchyliculture. Cela peut être le cas dans les situations d'interdiction de vente suite à l'apparition de microalgues toxiques dans les écosystèmes d'élevage naturels conchylicoles (Haure et al., 2011). Les préjudices économiques encourus par la profession peuvent être dramatiques si des solutions à terre ne sont pas prises en considération pour i) sauvegarder des animaux sains

en période d'alerte ou ii) les détoxifier le plus rapidement en situation de crise. D'autre part, les mortalités d'huîtres juvéniles qui se font connaître depuis ces quelques dernières années, amènent les acteurs de la filière conchylicole à, entre autres solutions, introduire des souches d'huîtres en provenance de pays tiers, hors U.E. Les conditions d'observations qu'exige la quarantaine, pourront se faire dans des bassins re-circulés avant la mise en élevage dans le milieu naturel, pour sécuriser l'environnement. Ce type de sauvegarde doit être techniquement fiable mais également économiquement viable. Une étude technico-économique en baie de Bourgneuf (Pérez Agundez et al., 2010) montre que seuls 10 % des ostréiculteurs sont équipés d'un dispositif de stockage fonctionnant en circuit fermé et 23% ont un matériel de traitement de l'eau tel qu'un système d'aération ou un traitement UV. Les structures actuellement utilisées pour une purification ou pour simplement un stockage avant leur commercialisation permettent de conserver des huîtres sur une durée allant de 24 heures à 2 semaines. Cette étude souligne alors que l'investissement dans une structure de sauvegarde représente des coûts additionnels plus ou moins supportables selon la taille des entreprises et qu'un tel investissement n'est pas créateur de valeur ajoutée, mais correspond à une sauvegarde des revenus (Pérez Agundez et al., 2010). Par ailleurs, en plus du coût des bassins re-circulés, il peut être nécessaire d'envisager un traitement de l'eau. En effet, lors d'une interdiction de prise d'eau pour raison sanitaire, le système re-circulé choisi doit pouvoir fonctionner sans renouvellement d'eau ou avec une eau épurée de tout agent toxique par filtration (Castaing et al., 2010). L'utilisation du système re-circulé dans le cadre de la détoxification d'huîtres contaminées nécessiterait aussi un traitement des eaux de rejets pour éviter la contamination du milieu naturel dans le cas de microalgues toxiques pouvant s'enkyster (*Alexandrium sp.*).

L'objectif de cette étude est de définir les conditions hydrobiologiques optimales pour la sauvegarde d'un stock d'huîtres confiné dans un volume d'eau limité pendant une durée de 4 semaines. Cette durée a été choisie suite à l'analyse des fréquences de fermetures de ventes constatées depuis 1984 dans le département du Finistère qui fait partie de la région la plus touchée par les blooms de microalgues produisant des DSP (Perez Agundez et Mongruel, 2010). Ainsi, les fermetures de ventes d'une durée inférieure ou égale à 30 jours représentent en moyenne 61 % de l'ensemble des fermetures de ce département (Fig. 4) et l'évolution des fermetures, outre un phénomène qui semble cyclique, semble montrer une fréquence croissante renforçant la nécessité de trouver une solution de sauvegarde sur de longue durée.

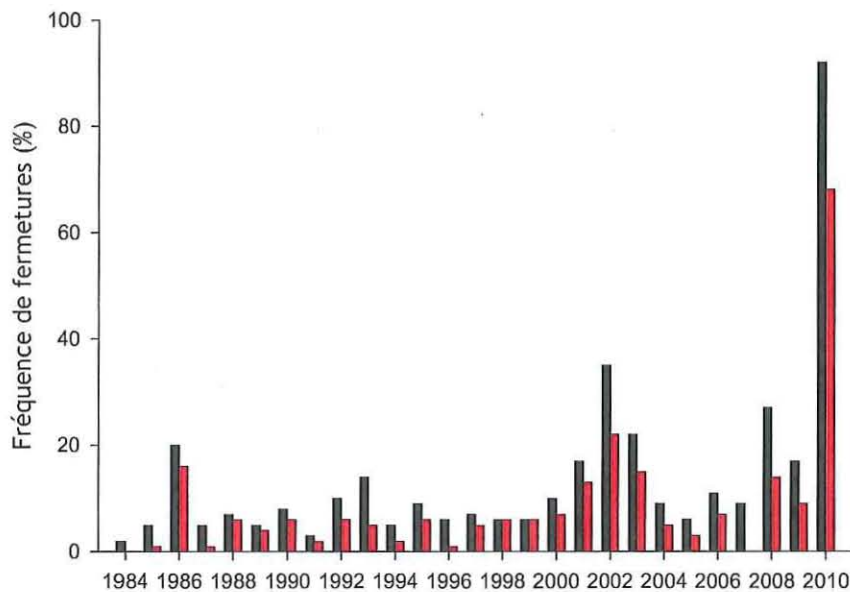


Figure 4. Fréquence des fermetures de zones de production, tous mollusques confondus en raison de bloom d'algues toxiques sur le département du Finistère entre 1984 et 2010. En noir : toutes fermetures quelle que soit la durée, en rouge : fermetures inférieures ou égales à 30 jours (données personnelles et modifiées de Belin (2004)).

Au cours de la sauvegarde, les paramètres hydrobiologiques d'élevage devront être en accord avec les exigences physiologiques des animaux pour satisfaire les conditions optimales de survie, de maintien du poids et de conservation de la qualité sensorielle des produits.

Le **chapitre 1** traite de la faisabilité biologique de la sauvegarde de l'huître *C. gigas* en chambre froide et en système re-circulé. Le choix du système re-circulé utilisé au cours de cette étude y sera décrit ainsi que la gestion des paramètres hydrobiologiques.

Le **chapitre 2** concerne l'effet de deux variables forçantes sur le comportement de l'huître, le stress et la vitesse du courant. En effet, le transfert d'un stock de bivalves du milieu naturel vers un système re-circulé est réalisé sans acclimatation progressive. Le stress subi est alors évalué par le suivi de deux indicateurs physiologiques, le taux de filtration et la consommation d'oxygène, et d'un indicateur biochimique, la rétention du rouge neutre par les lysosomes. La deuxième partie sera consacrée à l'effet de la vitesse du courant sur les réponses physiologiques de l'huître. L'homogénéisation des nutriments (phytoplancton et oxygène) dans le système re-circulé, le traitement de l'eau et la recirculation du volume d'eau, impliquent l'application d'un courant au sein du système. Au cours du **chapitre 3**, une loi d'excrétion de l'azote ammoniacal total chez l'huître a été établie en fonction de la température et de la quantité de nourriture apportée afin

d'évaluer les flux d'azote issus de leur métabolisme. L'efficacité de la nitrification réalisée par les populations bactériennes qui se situent sur la coquille des huîtres a été prise en compte pour estimer l'évolution des quantités d'azote ammoniacal qui peut être préjudiciables aux bivalves. L'ensemble des résultats obtenus dans les chapitres précédents a ensuite été synthétisé lors de l'élaboration d'un modèle simulant le fonctionnement d'un système re-circulé. L'évolution de quatre variables d'état a été analysée : l'huître, le phytoplancton, les biodépôts et les matières azotées dissoutes, en fonction de différentes conditions applicables au système. Ce modèle permettra alors d'anticiper sur les besoins physiologiques des huîtres lors d'une transposition des systèmes re-circulés à l'échelle d'une entreprise ostréicole.

CHAPITRE 1 : Les conditions de sauvegarde des huîtres à terre

1.1- Introduction

Le maintien de la commercialisation des bivalves lors des interdictions de ventes représente un enjeu majeur pour les producteurs (Perez Agundez et Mongruel, 2010). Or, actuellement aucun procédé fiable pour décontaminer les mollusques n'est applicable (Etheridge, 2010) et seules des dispositions permettant de les soustraire à toute contamination peuvent être envisagées. La sauvegarde à terre est une solution qui peut être réalisée selon deux méthodes distinctes : la sauvegarde hors d'eau et les systèmes recirculés. La première méthode s'appuie sur la capacité des huîtres à rester émergées tout en conservant leur intégrité vis-a-vis de l'environnement. Le maintien de la qualité du produit devient le problème majeur car les produits aquatiques sont reconnus comme étant relativement périssables (Chang et al., 1998). L'augmentation de la concentration bactérienne dans les tissus de l'organisme est responsable de leur dégradation et de l'évolution de leurs caractéristiques sensorielles (Aaraas et al., 2004). La concentration bactérienne est donc le critère de qualité principal, soumis à une réglementation européenne (Règlement (CE) 2073/2005). La température, en raison de son impact sur l'évolution des populations bactériennes (Boyd et al., 1980), est un paramètre déterminant pour estimer la durée de conservation des bivalves hors d'eau. Les conditions et les limites de conservation des produits marins ont davantage été étudiées sur le poisson frais et chez certains crustacés, alors que peu de données sont disponibles sur les mollusques (Erkan, 2005). En plus d'un critère bactériologique (Khan et al., 2005; Cao et al., 2009a), l'évolution de la qualité des bivalves peut aussi être suivie et estimée à l'aide d'une large gamme d'indicateurs : biochimiques (Chang et al., 1998), histologiques (Aaraas et al., 2004) ou liés aux caractéristiques sensorielles du produit (Boyd et al., 1980; Nortvedt et Tuene, 1998; Chytiri et al., 2004; Cao et al., 2009b). L'ostréiculteur doit se conformer à la réglementation concernant la concentration bactérienne mais il sera aussi attentif à la qualité générale de son produit, en terme de caractéristique organoleptique mais aussi en terme d'aspect visuel. Les conditions de sauvegarde en chambre froide devront lui assurer un maintien de la masse des tissus pour éviter un amaigrissement du bivalve ainsi que des pertes d'eau intervalvaire, et enfin des mortalités réduites. Des paramètres biométriques tels que le poids sec de chair, le poids total ou le volume d'eau intervalvaire pourraient être utilisés par le producteur comme indicateurs de qualité faciles à appliquer. Ainsi, l'étude de la sauvegarde d'un stock d'huîtres en chambre froide à 3°C et en atmosphère humide contrôlée a permis de mettre au point un indicateur de qualité sensible, basé sur l'absence ou la présence d'eau intervalvaire. Son application, associée à d'autres indicateurs de qualité, a permis d'estimer une durée de sauvegarde maximale permettant le maintien de la qualité du produit. Les quelques études ayant abordé ce sujet

mentionnent des durées de sauvegarde pour l'huître de l'ordre de 10 à 13 jours (Bird et al., 1995; Boyd et al., 1980; Cao et al., 2009b), ce qui rend ce procédé applicable uniquement pour des interdictions de ventes de courtes durées. Or, l'analyse des fréquences des fermetures de zones de production, en raison de la présence d'algues toxiques, montre que les fermetures d'une durée de 15 jours ou moins correspondent à une moyenne de 32 % des fermetures entre 1984 et 2003 (Belin, 2004). Par conséquent, ce procédé de stockage en chambre froide ne représente qu'une solution partielle pour soutenir la commercialisation.

La seconde méthode de sauvegarde à terre consiste à maintenir des huîtres en conditions immergées, de manière durable en conservant leurs fonctions d'alimentation avec des coûts métaboliques permettant le maintien de leur masse initiale. L'utilisation du système re-circulé est alors une alternative qui permet une gestion de l'ensemble des paramètres critiques tels que la température, la nourriture, les matières en suspension ou les gaz dissous (Frias et Segovia, 2010). Par ailleurs, cette technique a été mise au point et adaptée à diverses espèces marines (Pfeiffer et Rusch, 2000; Menasveta et al., 2001; Christophersen et al., 2006; Martins et al., 2010), alors que peu d'informations sont disponibles concernant les bivalves (Hussenot, 2006). D'un point de vue de la qualité du bivalve, si le seuil bactérien réglementaire reste le même que dans le cas du stockage hors d'eau, le confinement dans un système re-circulé peut induire des modifications de la qualité de la chair, comme cela a été démontré chez le poisson lorsqu'il est soumis à des conditions d'élevage et des régimes alimentaires différents (Grigorakis, 2007; Cardinal et al., 2011). De même, la qualité sensorielle de l'huître pourrait évoluer (Pennarun et al., 2003) pendant la sauvegarde et le produit proposé au consommateur pourrait présenter des caractéristiques sensorielles différentes de celles attendues (Ratel et al., 2007). L'aspect économique de l'utilisation d'un système re-circulé est aussi à prendre en compte en terme d'investissement et de coût de fonctionnement (Perez Agundez et Mongruel, 2010), la structure même du système doit alors être simple pour être un procédé économiquement supportable par le producteur. Enfin, la filière du poisson dispose d'une expérience de plusieurs décennies dans le domaine du système re-circulé (Timmons et Ebeling, 2007; Martins et al., 2010), mais toutes les techniques ne peuvent pas être transférées directement à la sauvegarde des huîtres en raison d'un comportement différents des animaux. La prise en compte de ces différences et l'objectif d'un maintien de la qualité des huîtres et non d'un grossissement ont été les lignes de conduites suivies lors de cette étude qui a permis de définir les conditions hydrobiologiques optimales pour la sauvegarde de l'huître *C. gigas* en système re-circulé.

1.2- Stockage de l'huître Pacifique *Crassostrea gigas* hors d'eau à basse température: biométrie, eau intervalvaire et évaluation sensorielle

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication acceptée en mai 2011 et parue dans le journal « International Journal of Food Science and Technology, » et ils sont présentés en pages suivantes.

International Journal of Food Science and Technology 2011, 46, 1775-1782

**1.2- Cold-storage of Pacific oysters out of water:
biometry, intervalval water and sensory assessment**

Florence Buzin^{1,2*}, Violaine Baudon¹, Mireille Cardinal³, Laurent Barillé², Joël Haure¹

¹ IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Polder des Champs, Bouin, F-85230 France

² Université de Nantes, Mer Molécules Santé EA 2160, Faculté des Sciences et des Techniques, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, Nantes, F-44322 France

³ IFREMER, Laboratoire Science et Technologie de la Biomasse Marine, BP 21105, rue de l'île d'Yeu, Nantes Cedex 3, F-44331 France

* corresponding author:

TEL: (33) 02 5168 89 41; FAX: (33) 02 51 49 34 12,

EMAIL : florence.buzin@ifremer.fr

1.2.1- Abstract

Due to the important economic activity of oyster production in France, microalgal toxic events represent a significant constraint for shellfish farmers who face closures of bivalve production-sites. The frequency of closures of 3 weeks or less represents half of the total closures along the French coasts. Cold-storage could be a simple and affordable solution for temporary and short-term storage before commercialisation. A stock of marketable Pacific oyster *Crassostrea gigas* was therefore stored during 22 days in non-immersed conditions at 3°C with 100% humidity. At the end of the experiment, the oyster mortality rate remained at a low level of less than 3.5 %. The sensory attributes, odour, appearance, texture and flavour, did not show significant variations. However, the oyster total weight and fresh flesh weight exhibited losses of 10.5 % and a 16.6 % after 15 days of storage. At the same time, intervalval water showed a decrease in quality with 20 % of the samples characterized by an absence of intervalval water with a flesh more or less moist. These results suggested that the cold-storage represents a partial solution to sustain the commercialisation of bivalves during closures of 15 days.

1.2.2- Introduction

The value of mollusc production in France is over 350 million euros for an average yield of 188,000 tons, mainly Pacific oyster *Crassostrea gigas* and blue mussel *Mytilus edulis* (FAO, 2009). This economic activity is hindered however by water-quality crises resulting in toxic algal blooms that contaminate bivalves by ingestion of microalgae. These events can be observed all along the French coast, from Northern Brittany with summer episodes of *Alexandrium minutum* to the Mediterranean in the Thau lagoon with autumn episodes of *A. catenella* (Lassus et al., 2004). In 1998, an *A. tamarense* bloom appeared in the Thau lagoon which led to the closure of fishing, collecting and forwarding of shellfish during two months (Abadie et al., 1999). Shellfish farmers are thus subjected to significant constraints due to legislation prohibiting sales during toxic algal blooms, and must also face consumer mistrust of bivalves (Shumway, 1990). During periods of toxic events, cold-storage could be a simple and affordable solution for temporary and short-term storage before commercialisation. Very few relevant studies have been carried out and information about storage conditions is scarce (Bird et al., 1995; Cao et al., 2009a). Although refrigeration has already been shown to extend shelf-life, variability among species and storage conditions has also been observed. Pacific oyster *Crassostrea gigas* survived for up to 14 days at 5°C, while the survival life of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* was shorter (Bird et al., 1995). In addition to survival, a major issue in storage techniques is the variation in bivalve quality.

A wide range of parameters has been used in the literature to assess bivalve quality (Khan et al., 2005). Chemical parameters often used for fish have been applied to bivalves. Among them, the quantification of total volatile basic nitrogen (Cao et al., 2009b; Goulas et al., 2005), results from the degradation of nitrogenous compounds by microbial activity (Ruiz-Capillas et Moral, 2005) or post-mortem nucleotide catabolism. This parameter results from different breakdown products of adenosine triphosphate (Chang et al., 1998). The pH variations are commonly measured for oyster (Cao et al., 2009b) and fish (Tejada et Huidobro, 2002) to describe microbiological spoilage. Additional techniques have been used to evaluate end-product quality. Histological analyses are performed to observe tissue modifications, particularly pronounced in the digestive system (Aaraas et al., 2004), while bacteriological analysis provides information on the growth of the bacterial spoilage population. The speed of tissue degradation can be assessed (Cao et al., 2009b) and the analysis of the bacterial composition reveals the dominance of Gram negative bacteria like *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* (Cao et al., 2009b). Spoilage bacteria and tissue degradation are strongly correlated with flavour changes (Boyd et al., 1980; Gram et Huss, 1996; Aaraas et al., 2004) and end-product quality can be evaluated through sensory assessment to determine the maximum storage time compatible with food safety for consumers. Sensory assessment is a time-consuming procedure which requires the mobilisation of trained panellists (Chang et al., 1998) but is considered by some authors as the most accurate quality predictor (Khan et al., 2005). Usually two to three sensory criteria are assessed, such as appearance and odour (Aaraas et al., 2004), but flavour and texture have also been evaluated (Boyd et al., 1980). Until now, biometric measurements have never been used to assess bivalve quality in the context of cold-storage. Total and dry weights are, however, common variables dealing with somatic and gonadic variations (Haure et al., 1998; Méléder et al., 2001). Simple to obtain, they could be used in addition to other parameters to assess the efficiency of a storage process (Orban et al., 2002). Intervalval water can also be used (Orban et al., 2002) as a simple tool to describe the physiological status of the bivalve. The loss of intervalval fluid induces flesh dryness and the concentration of excreted metabolites (Pekkarinen, 1997; Datta et al., 2005) and can give information about adductor muscle vitality (Fleury et al., 2005).

The objective of this study is to evaluate the effects of storage on the commercial bivalve *Crassostrea gigas* in a cold-room with controlled humidity and temperature and to assess its shelf-life. Biometric measurements, an estimation of intervalval water, bacterial measurements and sensory assessment have all been used to monitor the variations in bivalve quality during storage.

1.2.3- Material and methods

This experiment took place in May-June 2008, when algal toxic bloom episodes occur most frequently on European coasts, with subsequent restrictions on shellfish sales (Belin, 2004). The frequency of bivalve production-sites closures for 3 weeks or less represents half of the total closures along the French coasts and it was therefore decided to test the storage process during 22 days. A marketable oyster stock *Crassostrea gigas* (104 kg total weight, n=1418 with a mean total individual weight: $73.33 \pm$ (S.D.) 7.84 g, n=40) with a Lawrence and Scott Index of $50.71 \pm$ (S.D.) 3.72 , n=40 (Lawrence et Scott, 1982) which corresponds to: $1000 \times (\text{flesh dry weight}) / (\text{total weight} - \text{shell weight})$ was collected from Bourgneuf Bay on the French Atlantic coast (46-47°N, 1-2°W) and placed in a cold-room at 3°C and 100% humidity in non-immersed conditions. All the individuals were arranged in bulk (15 kg per sieve). The 100 % humidity was maintained in the cold room with an atomiser humidifier (Herrmidifier, Fedders, North America) controlled by a humidistat. This installation broke down the water droplets into a fine mist and atomised the moisture into the air. According to the literature, marine organisms are usually stored at a temperature ranging between 1 and 5°C, so an intermediate temperature of 3°C was chosen for this study.

For each sampling day (0, 4, 8, 11, 15 and 22), forty bivalves (a total of 240 individuals) have been removed from the cold-room and sacrificed in order to measure the intervalval water and the biometric parameters (dry, fresh and total weight). Another 320 individuals have been removed for the sensory assessments, which were carried out on the same date.

Biometry and mortality

Oysters were randomly sampled (n=40) for each sampling day. For each individual, the total weight and the fresh flesh weight after draining on absorbent paper (30 seconds) were measured on a Mettler Toledo balance. After 48 hours of freezing at -20°C, the flesh were lyophilised (CHRIST Alpha 1/6) at -54°C for 48 hours and then weighed to determine the dry weight. The mortality quantification was carried out after 22 days, at the end of the experiment, and expressed as the percentage of dead oysters relative to the initial number.

Intervalval water

A qualitative Intervalval Water Index (IWI), based on visual observation of the bivalves, was established according to a qualitative scale with three levels:

Level 0: intervalval water present, flesh correctly moist

Level 1: absence of intervalval water, flesh still moist

Level 2: absence of intervalval water, dry flesh

For each sample of 40 oysters taken from the cold-room, the proportion of individuals presenting the above-mentioned characteristics was established.

Sensory assessment

Sensory characteristics of oysters were assessed by 8 panellists belonging to the trained sensory panel of IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea). A conventional descriptive analysis based on ISO standard norm 13299 (2003) was performed. Panellists were required to score the intensity of each characteristic describing odour, appearance, texture and flavour using an unstructured scale ranging from 0 to 10. These descriptors, chosen in a previous study on oysters (Cardinal et al., 2000), are described in Table 1. Sensory sessions were organised throughout the storage period and samplings took place for every 4 days. The availability of the assessors for the sensory assessment led to a final sampling after 7 days (i.e. day 15 then day 22).

Tableau 1. Description of the attributes used for the sensory assessment

Attribute	Description
Odour	global intensity; seaweed; mud
Appearance	water and flesh quantity in the shell; green colour of gills
Texture	crunchy; fleshy; humidity
Flavour	global intensity; seaweed; iodized; salty; sweetened; hazelnut taste; astringency; back bitter taste

Oysters were opened one hour before the test and the first water was removed from the shell. Each panellist received three oysters taken from the cold-room and coded by a three-digit number. The order of evaluation of the samples varied from one assessor to another. The tests were carried out in individual partitioned booths as described in ISO norm 8589 (1988) and equipped with a computerised system to collect and analyse the data (Fizz, Biosystem, Couternon, France).

Microbiological analysis

Microbiological analysis was carried out by the National Reference Laboratory of Shellfish Microbiology, in IFREMER Nantes, France. Quantification of *Escherichia coli* was performed by BacEval software (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Austria) on samples collected on the last day of the experiment. A bacterial suspension with a 1/10 dilution was prepared from the flesh and the intervalval water of 10 individuals. Analyses were achieved using the direct impedancemetry technique with a BacTrac 4300 analyser (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Austria). The protocol followed the French Norm (NF V 08-106) based on the measurement of impedance variation at 44°C during cycles of 5 minutes.

Statistical analysis

Statgraphics Plus Centurion XV.I software (Sigma Plus, Paris, France) was used to check the normality and heteroscedasticity of data distributions and for subsequent statistical analysis. A one-way ANOVA was performed to analyse the significant differences among each biometric variable (fresh, dry and total weight) and sensory attributes during the storage process. The *a posteriori* test of Dunnett was used to test each mean against the mean at day 0 taken as the control (Zar, 2010). The significant statistical level was set at $p < 0.05$.

1.2.4- Results

Mortality and biometric parameters

The oyster mortality rate remained at a low level, with less than 3.5 % mortality after 22 days of cold-storage in non-immersed conditions. During the 22 days of the experiment, the fresh flesh weight and the total weight showed a significant difference between samples (Fig. 5) (one way ANOVA, $p < 0.05$) while no significant difference has been observed for the dry flesh weight (one way ANOVA, $p = 0.66$). The total weight presented a significant decrease at day 15 compared to the control (Dunnett-test $p < 0.001$) which corresponds to a 10.5 % weight loss. However, the decrease in the fresh flesh weight has been observed earlier, at day 8 (Dunnett-test, $p < 0.05$) with a 16.6 % loss, thus exhibiting a variation, not synchronized with the total weight. The dry flesh weight was the most stable biometric parameter throughout the experiment.

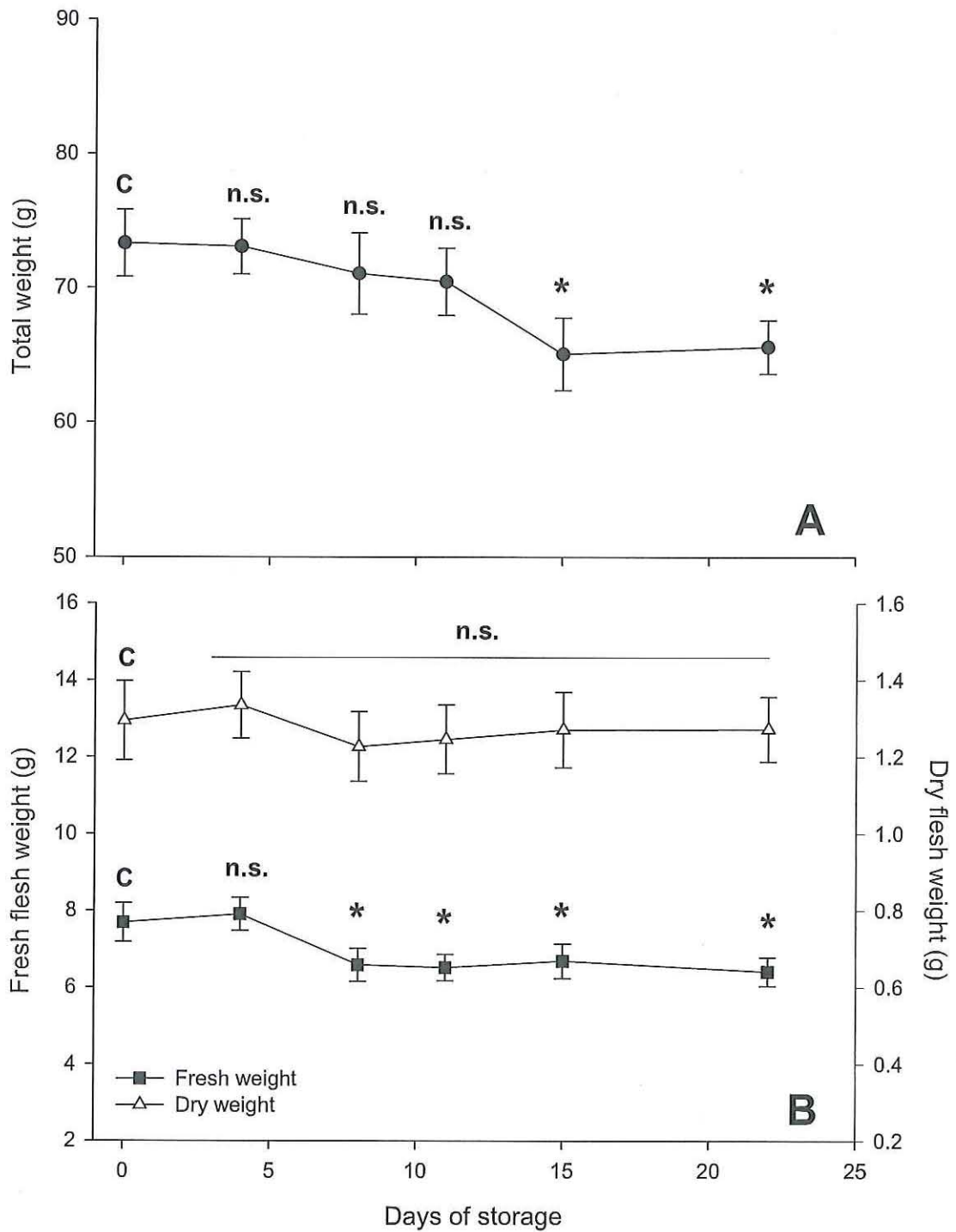


Figure 5. Variations in Pacific oyster total weight (A), dry flesh weight and fresh flesh weight (B). C: control, n.s.: not significant, $p > 0.05$; * : $p < 0.05$, vertical bar = 95 % confidence interval.

Intervalval water index (IWI)

A deterioration in quality appeared after 15 days of cold-storage (Fig. 6) when 5 % of the samples showed an absence of intervalval water with a flesh still moist, while 15 % was identified by the last IWI level, characterised by an absence of intervalval water and a dry flesh. This indicated a loss of water due to an alteration in the adductor muscle strength needed to keep the two mollusc valves firmly closed. A Pearson correlation showed that IWI (level 0) was significantly correlated with the total weight ($r=0.92$, $p<0.05$).

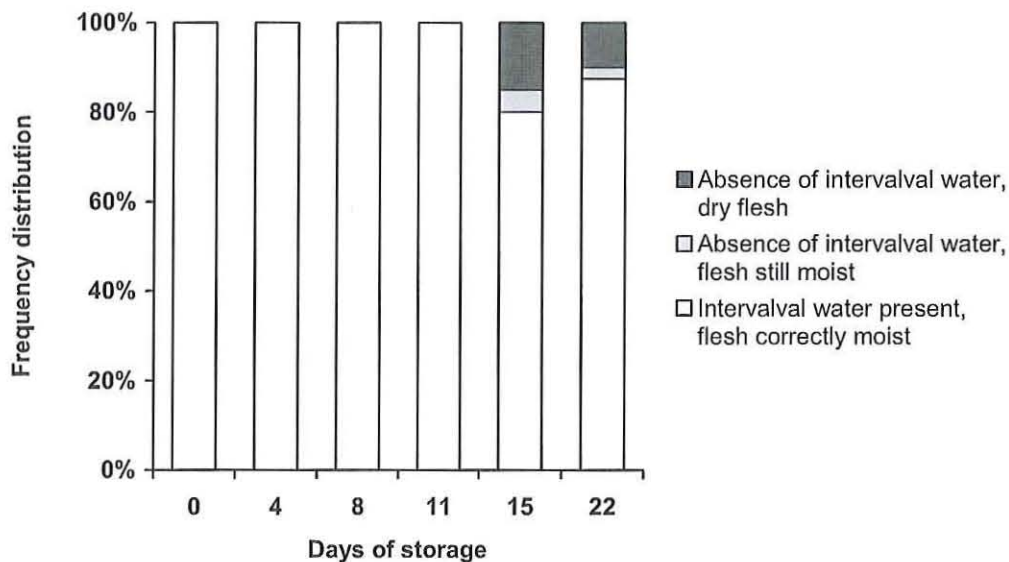


Figure 6. Variations in intervalval water index in oysters stored in a cold-room for 22 days. For each date, $n=40$.

Microbiological analysis

The enumeration of bacteria involved in faecal contamination was done as required by European law ((CE) N°2073/2005) in order to ensure consumer safety. An examination of impedance curves (not presented) correlated with detection times showed that concentrations of *Escherichia coli* remained well below the acceptability limit with 130 *E. coli* in 100 g flesh and intervalval water, and indicated an absence of faecal contamination after 22 days of storage.

Sensory assessment

According to the statistical analyses, all the attributes were stable during the 22 days of the experiment with no significant difference between the first day and day 0 taken as a control (ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 7). The odour of mud was the only attribute showing an increasing trend though this was not significant. The oyster flavour, odour, texture and appearance did not show significant variations after 22 days of cold-storage at 3°C and 100 % humidity.

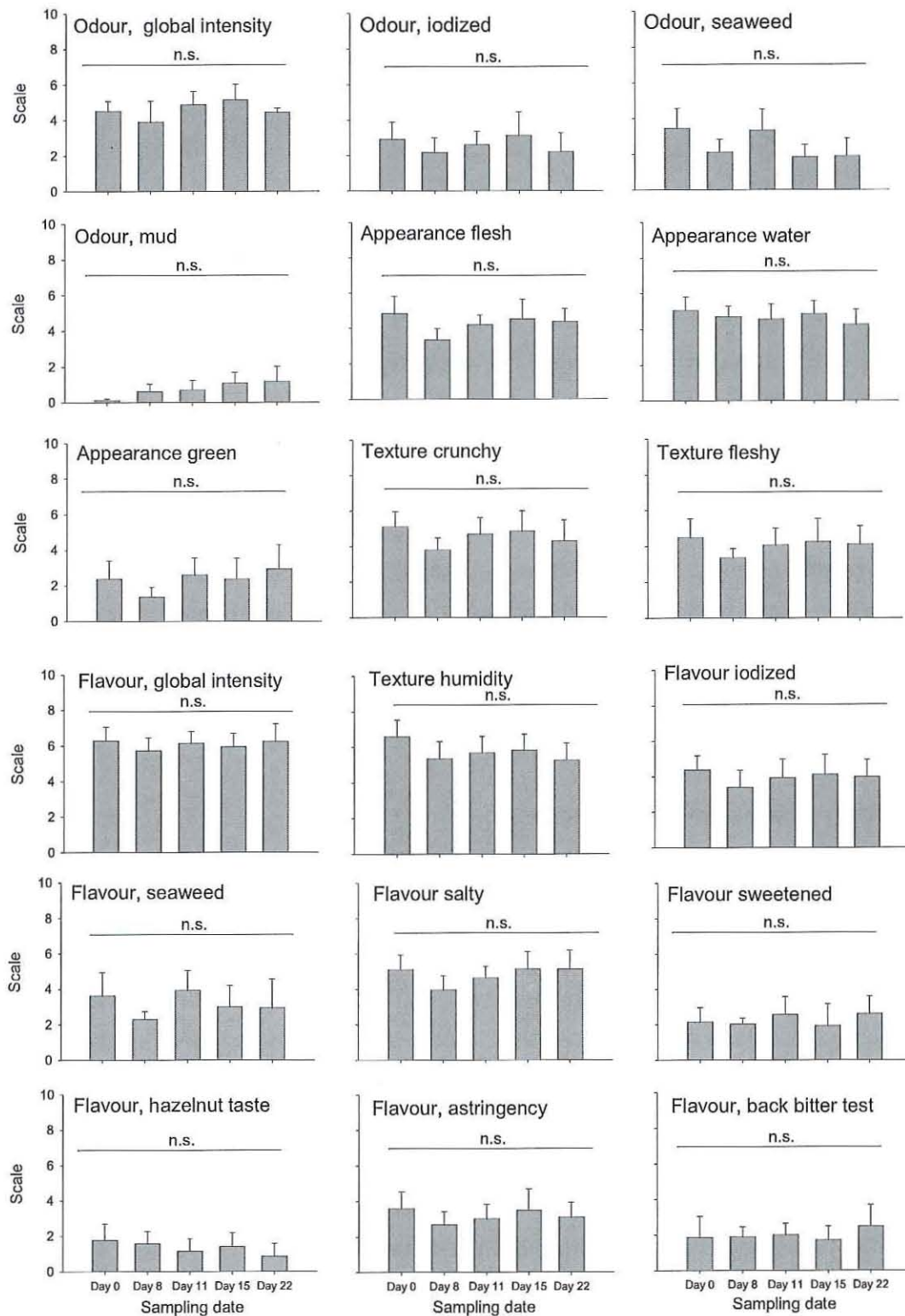


Figure 7. Sensory analysis: Evolution of 18 sensory attributes, n.s.: not significant, vertical bar = 95% confidence interval, n=9.

1.2.5- Discussion

Oyster survival

The mortality observed in this study was low and does not represent a critical issue for the storage process. Bird *et al.* (1995) observed 14 % of oysters gaping or dead after 11 days and 75 % after 15 days of storage at 5°C while Aaraas *et al.* (2004) observed a 6% mortality after three weeks of cold-storage at 5°C. A lower mortality of 3.5 % was observed in this study after three weeks of cold-storage. The storage conditions seem to have a major influence and could explain the high mortality rate observed by Bird *et al.* (1995). They kept the oysters in covered plastic bins while Aaraas *et al.* (2004) worked with oysters packed in polystyrene boxes with holes for drainage and aeration and the humidity was retained by moistened wood wool. In our study, the use of sieves to store the oysters avoided a stuffy environment and a humidity of 100 % was continuously applied. Consequently, more homogeneous conditions of temperature and humidity were regularly maintained. These conditions probably contributed to the low mortality rate recorded in this study.

Evaluation of the quality estimators

During the cold-storage, the oysters lost water and the fresh flesh was the first variable involved. After 8 days, the fresh flesh weight showed a decrease which can be explained by a transfer of the water from the flesh into the intervalval water, a phenomenon which did not affect the total weight (Fig. 5A - day 8). This step was followed by a subsequent loss of this intervalval water after 15 days (IWI results), with a concomitant significant decrease in the total weight. The dry weight measurement did not show significant variations during the experiment. This parameter presents a dynamics different from the fresh and the total weight because it does not take into account the intervalval water. The decrease of 10.5 % of the total weight versus the control represents a potential loss of income harmful to the shellfish producer if the cold-stored oyster stock is to be sold right after the storage process.

IWI is an index based on visual observations and can be considered as a simple tool to evaluate intervalval water conservation. In fact, an oyster that presents a health problem tends to keep its adductor relaxed (Poulet *et al.*, 2003), leaving its valves open which results in the intervalval water leaking out. Several authors have suggested that this

mechanical response of the adductor muscle may be a useful indicator of the health status of the mollusc (Millman, 1967; Morrison, 1996).

The oyster sensory assessment was not a limiting factor for this storage process and none of the attributes was significantly influenced by a cold-storage of 22 days (ANOVA, $p > 0.05$). However, this result does not support the observations of Boyd *et al.* (1980) who found that flavour was the discriminating parameter after 13 days of cold-storage regarding only three global attributes, flavour, odour and texture, for *Crassostrea gigas*. Other authors assessed the overall attribute with a global score (Cao *et al.*, 2009b) and only four attributes (odour, body colour, fluid and texture) and limited the cold-storage to 11 days at 5°C. This study, based on a more detailed sensory analysis, has shown that a longer storage at 3°C does not modify the sensory evolution of the oyster *C. gigas*. This result represents a real asset for the producer who is assured of marketing a product with the same taste as the product placed in the cold-room 22 days earlier.

Microbiological analysis

The bacterial concentration measured in the oyster flesh and in the intervalval water after 22 days of storage was below the European threshold (230 MPN of *Escherichia coli* for 100 g of wet flesh and intervalval water) ensuring the safety of the consumer. *E. coli* is part of the *Enterobacteriaceae* family and some strains of this family are capable of producing a putrid odour (Gennari *et al.*, 1999). However, according to Boyd *et al.* (1980), it appears unlikely that faecal coliforms multiply in live shellstock at 11°C or lower while authors confirmed that at 5°C the *Enterobacteriaceae* proportion represented 1 % of the microbial flora whereas at 0°C, *Enterobacteriaceae* growth was completely inhibited (Cao *et al.*, 2009b). Consequently, our results are in accordance with these previous findings. At the same time, the bacterial population present in raw oyster also consists of 22 % *Pseudomonas* and 20 % *Vibrionaceae* species (Cao *et al.*, 2009b) and *Pseudomonas* and *Shewanella* are known to be involved in the spoilage of shellfish (Cao *et al.*, 2009b) and fish products (Gennari *et al.*, 1999; Gram, Huss, 1996). The link between bacterial activity and the evolution of sensory attributes has already been demonstrated (Aaraas *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 1980) even if some authors have suggested that bacterial analysis should be carried out in conjunction with sensory assessment (Boyd *et al.*, 1980; Khan *et al.*, 2005). In the present study, the health threshold imposed by the European legislation for marketing was not exceeded and concerned only an *E. coli* quantification.

Shelf-life in cold-storage conditions

Among the authors who have worked on cold-storage with *C. gigas*, Boyd *et al.* (1980) observed that it was possible to maintain a high quality shelf-life for 13 days at 2-3°C with flavour as the limiting parameter. Cao *et al.* (2009b) reported a shorter shelf-life at 5°C according to the parameters considered: 10 days with a microbiological threshold of 10⁷ CFU/g or 11 days considering the sensory assessment total score. For Bird *et al.* (1995), the high mortality limited the experimentation to 11 days. In the context of this study, the need to find simple parameters was important for shellfish farmers in order to enable them to assess shellfish product quality easily. Aaraas *et al.* (2004) have already advanced this argument but no study had previously tested biometric parameters to assess variations in bivalve quality. Regarding our results, the evolution of the Intervalval Water Index and the total weight indicate a threshold of 15 days of cold-storage. These two parameters are correlated and seem rather sensitive so could be reliable for assessing oyster quality while remaining simple for the shellfish producer to apply.

The loss of intervalval water could slightly modify the final aspect of the marketed product, which remain however fit for consumption. Indeed, the conservation of the sensory characteristics of the oysters, supported by an acceptable bacterial level, indicates that cold storage at 3°C for 15 days did not alter the shelf-life of the bivalves and remains an interesting and low-cost process for short-term storage. The sensory attributes and bacterial level remained also acceptable at the end of the experiment, after 22 days. Nevertheless, we suggest that the cold-storage process should not be extended beyond 15 days considering all estimators of oyster quality.

Cold-storage for the oyster industry

The technical feasibility of such a process must also be supported by an economic interest and the storage time should cover the periods when sales are prohibited. An analysis of the frequency of bivalve production-site closures recorded on French coasts between 1984 and 2003 (Belin, 2004) (Fig. 8) reveals that there were closures lasting 15 days or less every year, except for 1994, and this can represent up to 50 % of the total closures, as was the case for the year 1986. The analysis also gave 32 % as an average of the closure of the production-sites during these 20 years. The cold-storage process proposed in this study therefore represents a partial solution to sustain the commercialisation of bivalves during these periods.

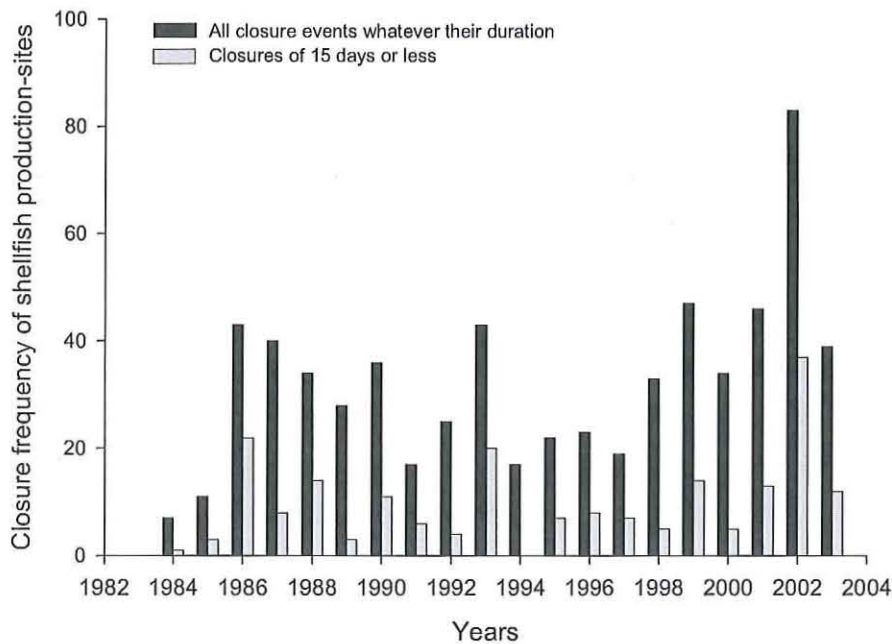


Figure 8. Frequency of bivalve production-site closures following toxic algal bloom on the French coasts between 1984 and 2003 (modified from Belin, 2004).

Outside the critical period, the potential investment in a cold-room can also be exploited as a storage space for oysters and other species for direct commercialisation but the economic considerations must be taken into account to analyse its profitability. Indeed, an economic comparison of cold-storage with other processes, such as re-circulating systems (Buchanan et al., 1998), must be carried out in order to provide information to shellfish producers to help them choose the system that corresponds best to their technical and economic capacities.

Acknowledgements

We wish to thank Martial Catherine and Jacques Dupont from IFREMER (Nantes, France) for the microbiological analysis.

1.3- Les conditions de sauvegarde de l'huître en système re-circulé

1.3.1- Introduction

Le maintien de la commercialisation des bivalves lors des interdictions de ventes représente un enjeu majeur pour les producteurs (Perez Agundez et Mongruel, 2010). Or, actuellement aucun procédé fiable pour décontaminer les mollusques n'est applicable (Etheridge, 2010) et seules des dispositions permettant de les soustraire aux sources de contamination en période d'alerte peuvent être envisagées. La sauvegarde à terre est une solution qui peut être réalisée selon deux méthodes distinctes : la sauvegarde hors d'eau et les systèmes re-circulés. La première méthode a permis d'estimer une durée de sauvegarde maximale permettant le maintien la qualité du produit pendant 15 jours, ce qui rend ce procédé applicable uniquement pour des fermetures de ventes de courtes durées et ne représente alors qu'une solution partielle pour soutenir la commercialisation. La seconde méthode de sauvegarde à terre consiste à maintenir des huîtres en système re-circulé avec une gestion de l'ensemble des paramètres importants tels que la température, la nourriture, les matières en suspension ou les gaz dissous (Frias et Segovia, 2010). Le choix du matériel et la simplicité de l'organisation du système re-circulé sont deux paramètres qui ont été favorisés afin que ce procédé soit peut coûteux et donc supportable économiquement. L'organisation des différents éléments du système est inspirée des systèmes re-circulés existant dans le domaine piscicole. Les dimensions choisies ont été retenues pour une utilisation expérimentale du système re-circulé. Ce choix a permis un meilleur contrôle possible et une analyse fine des processus d'oxygénation, de nutrition et de gestion de la qualité de l'eau.

1.3.2- Bilan des connaissances sur les systèmes re-circulés appliqués aux mollusques bivalves

L'isolement du système re-circulé vis-à-vis du milieu extérieur a permis de gérer et de stabiliser le mieux possible la température pour ainsi maîtriser au mieux les coûts énergétiques (Epifanio et Mootz, 1976; Macmillan et al., 1994; O'Beirn et al., 1998; Wikfors et al., 2004). Par ailleurs, travailler en salle obscure a permis aussi de limiter la lumière qui favoriserait une croissance non contrôlée du phytoplancton apporté comme nourriture dans le système. Seuls les systèmes re-circulés intégrant la culture d'algue ont cherché à tirer avantage de la lumière naturelle (Henley et al., 2001).

1.3.2.1. Le dispositif expérimental

Le bac de stockage

L'expérience acquise par la filière du poisson dans le domaine du système re-circulé est importante mais toutes les techniques ne peuvent pas être transférées directement à la sauvegarde des huîtres en raison d'un comportement différents des animaux. Ainsi, le choix du type de bac de stockage n'a pas été dicté par les mêmes contraintes. Pour le grossissement de poissons en système re-circulé, le besoin de travailler avec un volume d'eau le plus homogène possible et le fait de pouvoir éliminer les matières particulaires à l'aide d'un courant ramenant les particules au centre du bac, a favorisé le développement des bacs de forme cylindro-conique et de grande taille (Losordo et al., 1999; Summerfelt, 2007). Les études sur le maintien ou le grossissement de bivalves en système re-circulé ont été réalisées avec des bacs de type « raceway » (ayant la forme d'un couloir)(Buchanan et al., 1998; Macmillan et al., 1994; O'Beirn et al., 1998; Thielker, 1981), construits le plus souvent en fibre de verre (Macmillan et al., 1994). Par ailleurs, les bassins de type « raceway » sont mieux adaptés pour recevoir des clayettes ou « mannes » de forme rectangulaire qui sont largement utilisées par les professionnels. Les études précédemment menées sur les bivalves en système re-circulé ont été réalisées dans des volumes de stockage allant de 145 l (Henley et al., 2001) à 2100 l (Mann et Ryther, 1977) avec une majorité des études travaillant avec des bacs de 400 l (Buchanan et al., 1998; Macmillan et al., 1994; Thielker, 1981).

En ce qui concerne la charge (masse d'huîtres par volume d'eau), le calcul de la biomasse chez le poisson correspond principalement à la chair alors que chez des huîtres de taille commerciale, la chair représente moins de 10 % du poids total frais. Si seule la capacité de stockage est considérée, les charges utilisées dans cette étude restent néanmoins comparables à celles pratiquées par la filière du poisson. Dans la littérature, les charges décrites ont été estimées pour certaines à environ 40 kg.m⁻³, pour de la coquille Saint-Jacques (Buchanan et al., 1998). Les autres auteurs ont travaillé avec de faibles charges, inférieures à 1 kg.m⁻³ (Macmillan et al., 1994), ou de l'ordre de 14 kg.m⁻³ (Frias et Segovia,(2010) ou bien celles-ci ne sont pas précisées. Ainsi, Mann et Ryther (1977) ont analysé l'effet de différentes densités (nombre d'individus par clayettes) sur la croissance d'huîtres mais sans indiquer les charges. D'un point de vue général, le caractère expérimental de beaucoup d'études n'a pas incité les auteurs à tester des charges importantes (Epifanio et Mootz, 1976; Buchanan et al., 1998).

Le traitement de l'eau

Dans tout système re-circulé, le maintien de la qualité chimique et biologique de l'eau est primordial (Wikfors et al., 2004). En cas de qualité insuffisante, le poisson montrera des signes de stress ou de pathologie laissant le temps au pisciculteur de réagir pour résoudre le problème avant de constater la mort de l'animal. Avec l'huître, le manque de réaction immédiate et son caractère sessile rendent pratiquement impossible une détection précoce d'un problème lié à la qualité de l'eau ou à une pathologie et seule la mort constatée de l'individu est un indicateur d'une mauvaise conduite d'élevage, mais trop tardif. Ainsi la qualité de l'eau est également une préoccupation majeure pour la sauvegarde de l'huître en système re-circulé. Chez le poisson, les particules solides, constituées des fèces, des bioflocs (bactéries vivantes et mortes) et de la nourriture non consommée (Summerfelt et Vinci, 2007), doivent impérativement être éliminées du système car leur décomposition est consommatrice d'oxygène et productrice d'une grande quantité d'azote ammoniacal (Losordo et al., 1999). En effet, l'aliment distribué chez le poisson est riche en protéine (environ 45 %) (Blancheton, 2000) et dans ce cas, l'utilisation des bacs cylindro-coniques facilite l'élimination des particules en les concentrant en son centre pour y être prélevées. L'eau chargée est ensuite épurée des particules par un filtre à sable, un filtre à tambour ou un collecteur de particules plus ou moins sophistiqué avant d'être réinjectée dans le bassin (Losordo et al., 1999; Summerfelt et Vinci, 2007). Chez les bivalves, l'utilisation de bac de type « raceway » et la présence des clayettes dans la structure limitent le transport des particules en suspension et leur élimination par l'eau d'évacuation. L'élimination des biodépôts, des bioflocs et de la nourriture non consommée du système n'a encore fait l'objet d'aucune étude et la solution choisie reste l'accumulation en fond de bac puis le retrait par siphonage à l'occasion d'une rotation du stock de bivalves ou lorsque les quantités sont jugées trop importantes (Macmillan et al., 1994).

Parmi les éléments qui influent sur la qualité de l'eau, l'excès d'azote sous forme dissoute peut être problématique. Il provient majoritairement de l'excrétion azotée des huîtres ou des poissons, mais aussi de la dégradation des biodépôts et du phytoplancton non consommé (Timmons et Ebeling, 2007). Une large gamme de biofiltres ont été mis au point avec pour objectif l'optimisation de la surface spécifique colonisable par la population bactérienne assurant la nitrification des matières azotées (Sandu et al., 2002; Malone et Pfeiffer, 2006; Timmons et Ebeling, 2007). Les populations bactériennes, hétérotrophes et autotrophes (Gregory et al., 2010), la cinétique du processus de nitrification et les facteurs l'influençant ont été étudiés de manière approfondie (Zhu et Chen, 2001; 2002; Chen et al., 2006; Michaud et al., 2006) afin d'optimiser l'efficacité des biofiltres. Cependant, ils ont été mis au point pour l'élevage des poissons et leur

application aux bivalves présente un inconvénient lié au type de nourriture apporté. Ainsi, Wikfors et al.(2004) et Hussenot (2006) soulignent le risque de piégeage du phytoplancton dans le filtre biologique et Widman et al.(2003) insistent sur l'importance de ce paramètre dans le choix du biofiltre. Parmi les auteurs ayant travaillé avec des bivalves en système re-circulé, seul Thielker (1981) a alterné phases de nourrissage et de traitement de l'eau pour palier ce problème, les autres auteurs ont inclus un filtre biologique sans prendre en compte cette contrainte.

Enfin, la qualité de l'eau dépend également du contrôle des micro-organismes tels que les bactéries et virus, qui en cas de forte concentration peuvent être de grands consommateurs d'oxygène (Blancheton, 2000). Pour limiter leur développement, deux méthodes sont appliquées en aquaculture, le traitement de l'eau par ozonation ou par irradiation aux ultra-violets (UV) (Summerfelt et al., 2009). A une concentration donnée et pour un temps de contact déterminé, l'ozone dissous et ses résidus tuent les micro-organismes en perturbant l'intégrité des membranes des bactéries et des virus (Liltved et Summerfelt, 2007). Les UV utilisés sont des UV-C qui détruisent les micro-organismes en altérant leur acide nucléique et en bloquant la réplication de leur ADN (Liltved et Summerfelt, 2007). De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les conditions optimales d'utilisation de ces deux techniques qui peuvent être utilisées en association sur un même système (Sharrer et Summerfelt, 2007; Summerfelt et al., 2009; Wietz et al., 2009). Chaque système présente des avantages et des inconvénients spécifiques (Mamane et al., 2010). L'ozone oxyde les molécules organiques améliorant la qualité de l'eau et présente un taux de réaction rapide mais il a la caractéristique de produire des sous-produits nocifs pour les organismes aquatiques, tels que des bromines et des bromates (Sharrer et Summerfelt, 2007). Ce procédé a aussi l'inconvénient d'être assez onéreux (Summerfelt, 2003). Le traitement UV ne produit pas de résidu et son action a été démontrée sur un certain nombre de protistes mais sa perte d'efficacité lorsque la turbidité est trop importante reste son principal inconvénient (Mamane et al., 2010; Summerfelt et al., 2009). Le procédé utilisé majoritairement en système re-circulé pour bivalves est le traitement UV (Epifanio et Mootz, 1976; Macmillan et al., 1994; Buchanan et al., 1998; O'Beirn et al., 1998), et cette solution a été retenue dans ce travail.

Organisation des éléments du système re-circulé

Le principe du système re-circulé utilisé dans cette étude se rapproche de celui décrit par Henley et al.(2001) qui ont mis au point un système pour des volumes de 145 à 350 l, avec une oxygénation renforcée par l'addition de pierres et une indépendance du bac contenant les bivalves vis-à-vis de celui collectant l'eau de retour, avec l'air-lift (Fig.

19 A). Christophersen et al.(2006) ont proposé un système similaire pour de l'élevage de juvéniles de *Pecten maximus* dans un volume de 2500 l (Fig. 19 B).

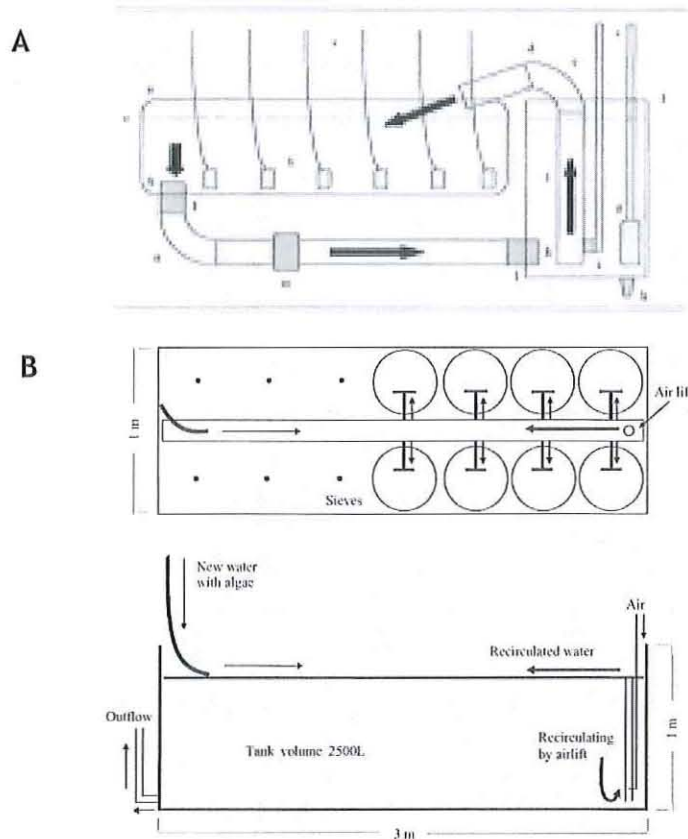


Figure 9. Exemples de systèmes re-circulés pour bivalves. A : Vue schématique du système re-circulé utilisé par Henley et al. (2001) pour la conservation de moules d'eau douce (*Unionidae*). B : Vue schématique du système re-circulé proposé par Christophersen et al.(2006) pour l'élevage de larves de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*).

1.3.2.2. Les paramètres hydrobiologiques

Les conditions de sauvegarde sont étroitement liées aux paramètres hydrobiologiques appliqués aux bivalves. La nourriture (phytoplancton) et la température sont les deux variables à optimiser pour gérer au mieux la conservation du poids des individus (Mann et Ryther, 1977). D'autres paramètres doivent être maintenus à des seuils non limitant, telles que la concentration en oxygène et la vitesse du courant.

La nourriture

Si les bivalves se différencient des poissons par leur comportement sessile, leur alimentation est aussi un point de différence important. Les méthodes pratiquées dans les études décrites sont diverses. Certains auteurs ont tenté de coupler la culture de phytoplancton au système re-circulé (Thielker, 1981; Henley et al., 2001) en utilisant les

eaux de rejets riches en azote et en phosphore comme milieu de culture (Mann et Ryther, 1977). D'autres auteurs ont apporté du phytoplancton sous forme de pâtes d'algues (Buchanan et al., 1998) ou d'algues séchées (Macmillan et al., 1994) provenant d'une culture indépendante (O'Beirn et al., 1998) réalisée en intérieur (Epifanio et Mootz, 1976) ou en extérieur (Mann et Ryther, 1977). Certains ont proposé une automatisation de la distribution du phytoplancton aux bivalves, qui est apportée soit de manière séquencée (Thielker, 1981; Henley et al., 2001) soit en continu. Cependant, si le succès du système re-circulé passe par une gestion précise de la qualité de l'eau et des bivalves, il est aussi impératif de maîtriser la production de microalgues toute l'année avec des concentrations régulières (Hussenot, 2006). Or, la production de phytoplancton est un poste qui représente une part importante du coût de production (Christophersen et al., 2006) et un temps de main d'œuvre non négligeable. Les espèces de microalgues apportées aux huîtres en système re-circulé sont relativement variées, Epifanio et Mootz (1976) ont retenu *Carteria chuii* et *Isochrysis galbana* parmi 4 espèces testées comme étant celles donnant les meilleures croissances d'huîtres. Le plus souvent deux espèces ont été apportées simultanément avec *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* les plus couramment citées (Epifanio et Mootz, 1976; Mann et Ryther, 1977; Thielker, 1981; Macmillan et al., 1994; Buchanan et al., 1998; Frias et Segovia, 2010).

La température

Dans le système re-circulé, la température agit à la fois sur la population bactérienne responsable de la nitrification (Zhu et Chen, 2002) et sur les réponses physiologiques des bivalves. La température module la cinétique des réactions chimiques (Zhu et Chen, 2002) et influence l'activité bactérienne de manière plus ou moins significative selon les conditions environnementales (oxygénation, concentrations en substrat) (Chen et al., 2006). C'est également un paramètre essentiel qui régie l'écophysiologie de l'huître (Barillé et al., 1997a; Boulès et al., 2009; Grangeré et al., 2009; Pouvreau et al., 2006). Son effet sur la filtration et la consommation d'oxygène ont fait l'objet de modélisation (Bougrier et al., 1995; Haure et al., 1998). Pour *Crassostrea gigas*, une relation hyperbolique a été proposée par Bougrier et al. (1995) avec un optimum thermique de 19°C. La température a aussi un effet sur l'excrétion en azote ammoniacal de l'huître (Bayne, Scullard, 1977; Boulter, Wilson, 1998; Emerson, 1969; Shpigel et al., 1992) ayant une influence sur la qualité de l'eau du système re-circulé. La température, couplée à la photopériode modulent le cycle gamétogénique avec un début de maturation à 8-11°C (Fabioux et al., 2005) et une ponte possible à partir de 18°C chez *C.gigas* (Dutertre et al., 2009). Le risque de ponte doit être écarté pour éviter que les huîtres ne libèrent leurs gamètes dans l'eau, ce qui occasionnerait une perte de masse des individus

et un apport de matière organique pouvant détériorer la qualité de l'eau du système re-circulé. Ainsi, le seuil de 18°C ne doit pas être dépassé pour éviter tout problème. Enfin, les phénomènes de surmortalités des huîtres constatées depuis 2008 (Segarra et al., 2010) semblent liées à la température qui a été identifiée comme un facteur directement ou indirectement déterminant au dessus de 19°C (Malham et al., 2009). De plus, la température a un effet sur l'activité des hémocytes qui sont impliqués dans les mécanismes de défense de l'huître (Gagnaire et al., 2006a). Il apparaît donc important de sauvegarder les huîtres dans une gamme de température n'entraînant pas de mortalité liée directement à la physiologie de l'individu ou à la virulence de l'hespèsvirus Os HV-1. En effet, ce virus, identifié comme organisme pathogène fortement impliqué dans les mortalités estivales (Renault et al., 1994a), est d'autant plus virulent lorsque la température dépasse 16-17°C (Cochennec et al., 2011). Ainsi, au vu des contraintes biologiques citées, une gamme de température allant de 14°C à 18°C est proposée pour permettre une sauvegarde optimale des huîtres dans un système re-circulé. Par ailleurs, cette gamme de température n'affectera pas le potentiel de nitrification car les bactéries nitrifiantes sont caractérisées par une grande capacité d'adaptation (Wheaton et al., 1994). Zhu et Chen (2002) ont démontré que, dans le cas de filtre biologique et lors d'une limitation en oxygène, la température n'a pas d'effet significatif sur la nitrification entre 14 et 27°C.

La vitesse du courant et l'oxygénation

Le courant a un effet à la fois physique et biologique sur le milieu et les bivalves. Il participe au transport des biodépôts vers une zone potentielle de décantation. Si dans le cas d'un élevage de poissons une vitesse de 15 à 30 cm.s⁻¹ est requise pour un transport des particules décantables vers le centre du bac (Summerfelt, 2007), une vitesse de 1 à 2 cm.s⁻¹ est nécessaire pour un transport des biodépôts sur une distance de 2 à 5 m (Kusuki, 1978). Cependant, ce phénomène reste difficile à constater dans des bacs où sont disposées des clayettes. Le courant permet aussi une homogénéisation du phytoplancton apporté et de l'oxygène et leur transport vers les huîtres. Cependant, il apparaît difficile de dissocier les effets du courant lui-même, de l'impact de la qualité et de la quantité de seston qu'il véhicule (Grizzle et al., 1992). Une faible vitesse de courant peut occasionner un manque de renouvellement d'eau aux environs des huîtres et un risque de déplétion en nourriture et d'accumulation des déchets (Kirby-Smith, 1972). Le courant peut participer à une remise en suspension de la matière particulaire en fonction de sa vitesse. Ainsi, dans le cas d'une sauvegarde en système re-circulé, le maintien d'une filtration optimale des individus et l'impact minimal de la vitesse du courant sur la qualité de l'eau sont des paramètres importants. Parmi les auteurs ayant travaillé avec des bivalves en système re-

circulé, seul Thielker (1981) mentionne l'effet du courant et des caractéristiques hydrauliques induites par la disposition des clayettes dans le bac, qu'il établit comme suffisante pour l'oxygénation du milieu. Le choix d'utiliser un système de pompe air-lift pour l'application d'un courant a été fait par plusieurs auteurs (Thielker, 1981; Henley et al., 2001; Christophersen et al., 2006; Frias et Segovia, 2010) quand d'autres ont opté pour l'utilisation d'une pompe ou d'un système Venturi (Buchanan et al., 1998; Macmillan et al., 1994). Enfin, le courant provoque des turbulences qui, si elles participent à une bonne homogénéisation du milieu, ont aussi un impact sur l'épaisseur des biofilms développés sur les parois du système en raison d'un phénomène d'abrasion (Timmons et Ebeling, 2007). Le débit influence de manière croissante le taux d'élimination de l'azote ammoniacal (Ebeling et Wheaton, 2006), en raison du taux de transfert des nutriments du milieu dans le biofilm (Chen et al., 2006) alors que Zhu et Chen (2001) ont démontré, à l'aide du nombre de Reynolds, qu'un flux turbulent favorisait la nitrification .

1.3.3- Conditions particulières de l'étude

1.3.3.1. Bassins expérimentaux

L'outil expérimental utilisé tout au long de cette étude a été conçu par l'équipe de la station IFREMER de Bouin (Vendée) pour les expérimentations prévues dans le cadre du programme COMSAUMOL. Cet outil est constitué de 12 systèmes re-circulés identiques qui ont permis de tester différentes variables avec réplication, dans le cadre de plans expérimentaux. Toutes les expérimentations ont été réalisées dans une salle aveugle (dans l'obscurité), isolée thermiquement et thermorégulée à l'aide d'une pompe à chaleur air-air (Soonko, puissance 2.63 à 3 KW).

Le bac de stockage

L'exploitation maximale du volume d'eau du bac, dans un but de rentabilité économique (Martins et al., 2010) a orienté le choix vers un bac de stockage de type « raceway », rectangulaire (2,07 X 0,14 X 0,23 m) et de section parallélogramme, en résine polyester et d'un volume de 90 l (Fig. 9). Ce volume réduit a permis de travailler avec 12 systèmes re-circulés sans avoir à manipuler des quantités d'huîtres trop importantes (Fig. 10).

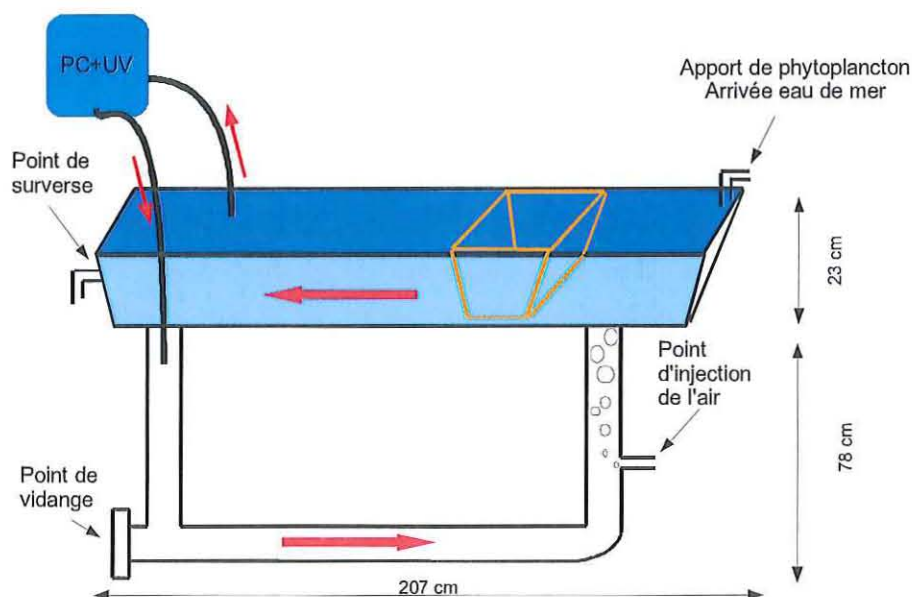


Figure 10. Vue en 3 dimensions du système re-circulé expérimental élaboré pour le stockage d'huîtres *Crassostrea gigas*. Les flèches rouges indiquent le sens du courant d'eau. PC : Pompe à chaleur, UV : Ultraviolet.

La forme du bac a été conçue pour être adaptée le mieux possible à celle des paniers contenant les huîtres. Des expérimentations ont été réalisées dans le but de valider le principe de la sauvegarde en système re-circulé à une échelle plus importante. A cette occasion, des bacs de 1300 l ont été testés permettant de stocker une biomasse de 180 kg. Des clayettes ont alors été utilisées pour contenir les huîtres. Ce mode de conditionnement facilite la manipulation des huîtres et reste un outil quotidiennement utilisé par les ostréiculteurs (Fig. 11).

Dans cette étude, la biomasse maximale utilisée a été de 15 kg d'huîtres de taille commerciale permettant de travailler avec des charges maximales de 167 kg.m^{-3} , comparables à celles habituellement pratiquées en élevage de poissons qui dépasse couramment les 100 kg.m^{-3} (Blancheton, 2000).



Figure 11. Vue générale des 12 systèmes re-circulés. *ea* : entrée d'eau dans le système re-circulé, *bh* : bac contenant les paniers d'huîtres, *pc* : pompe à chaleur assurant la thermorégulation de l'eau et équipée d'une lampe UV, *pm* : pompe à membranes apportant le phytoplancton au système re-circulé, *bph* : bac de stockage du phytoplancton *tr* : tuyau PVC assurant le retour de l'eau en début de bac.

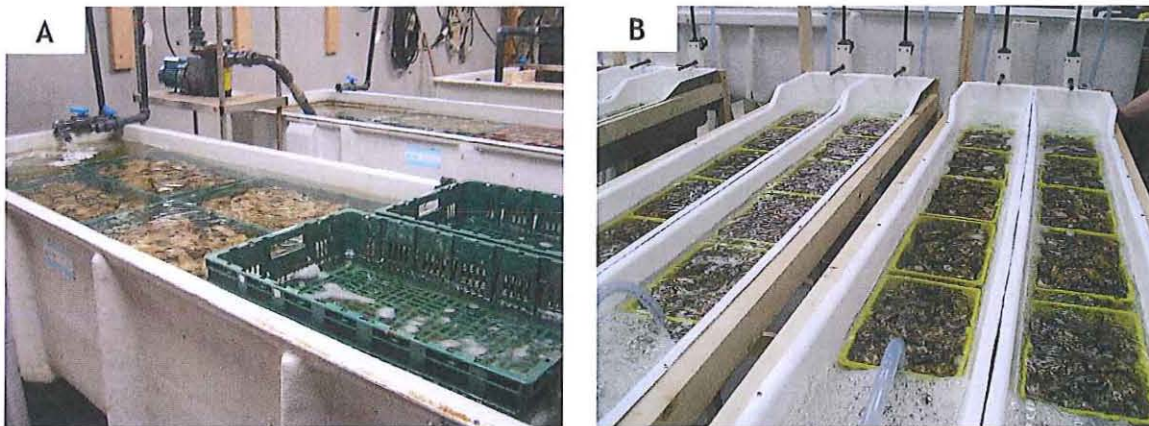


Figure 12. A : Stockage dans des clayettes pouvant contenir 15 kg d'huîtres, placées dans un bac de type « raceway » de 1300 l. B : Utilisation de paniers d'une capacité de 3 kg disposés dans les bacs expérimentaux de type « raceway » de 90 l.

Le traitement de l'eau

Le système re-circulé a été assemblé sans filtre biologique, permettant une économie de moyen et de temps puisqu'il faut compter 3 à 4 semaines pour qu'une population nitrifiante se développe et devienne pleinement efficace (Sandu et al., 2002). Ce choix est justifié par une expérimentation préliminaire, réalisée à la station IFREMER de

Bouin en 2008, qui a montré que l'évolution des différentes formes azotées (azote ammoniacal total, nitrite et nitrate) était identique pour un système re-circulé équipé ou non d'un filtre biologique (Fig. 12). L'hypothèse de la présence d'une population bactérienne nitrifiante provenant des bivalves eux-mêmes a alors été émise et testée lors de ce travail de doctorat (Welsh et Castadelli, 2004).

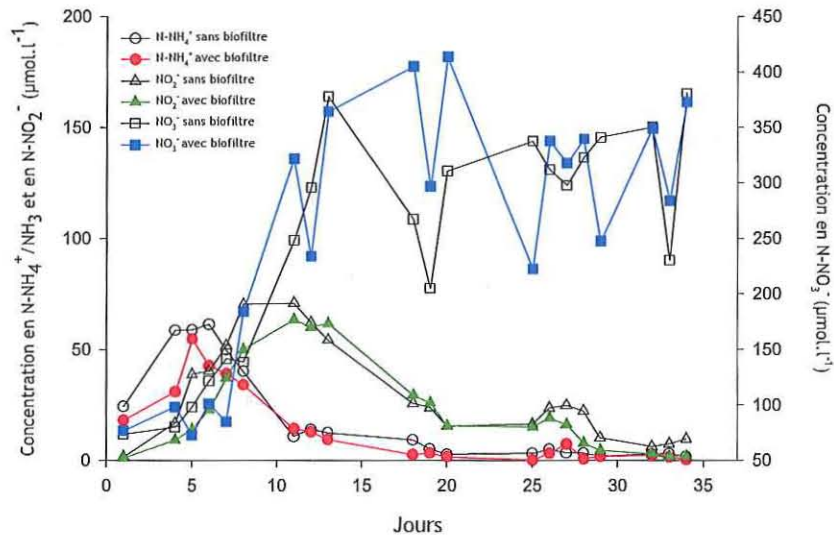


Figure 13. Evolution de l'azote ammoniacal total, des nitrites et des nitrates de deux systèmes re-circulés contenant des huîtres *Crassostrea gigas*, l'un équipé d'un filtre biologique et l'autre sans filtre biologique (Bourneuf, données non publiées).

Chaque bac a été équipé d'une pompe à chaleur (TECO, Ravenna, Italie) contenant une lampe UV d'une puissance de 14 Watt. L'efficacité des UV sur la population bactérienne a été vérifiée à l'occasion de comptages bactériens effectués sur un bac sans UV et sur un bac avec UV (Fig. 13).

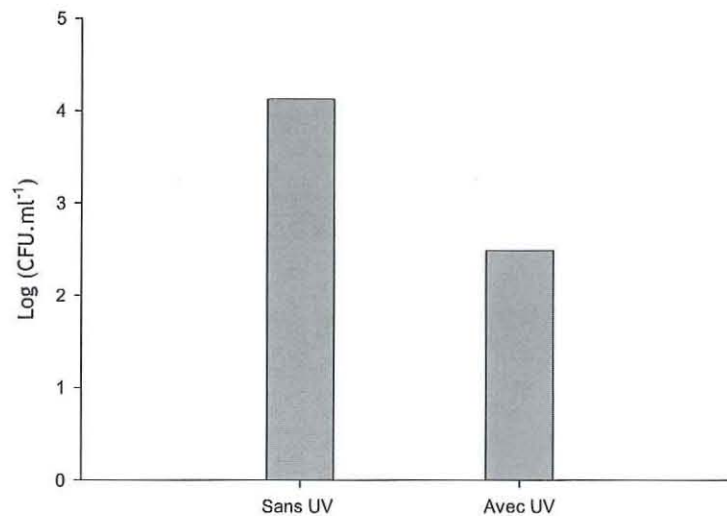


Figure 14. Concentrations bactériennes mesurées dans un système re-circulé équipé d'un traitement UV et dans un système sans UV (sans répliat). La concentration en bactéries (flore totale mise en culture sur du milieu Zobell) est comptabilisée après 21 jours de stockage de 15 kg d'huîtres, sans renouvellement, sans apport de nourriture et à 16°C. CFU : Colony Forming Unit.

Organisation des éléments du système re-circulé

L'économie d'espace a incité certains auteurs à superposer les bacs de stockage et à profiter de l'écoulement de l'eau en gravitaire pour l'alimentation en eau de chacun (Macmillan et al., 1994). Dans une même optique d'économie de moyen, le système mis en place dans cette étude est constitué d'un bac, alimenté en eau de mer filtrée à 45 µm (filtre à sable), par un tuyau PVC (diamètre 100 mm) placé à une extrémité et l'évacuation s'effectue à l'autre extrémité en fond de bac par un tuyau ramenant l'eau en tête du bac (Fig. 14). La pompe à chaleur (pc) régulant la température et équipée d'une lampe UV, a été placée en dérivation, en aval (Fig. 15 A). Le tuyau amenant l'eau à la pompe à chaleur (pc) est raccordé à une pompe de circulation de type pompe pour aquarium (EHEIM, Compact 1000) d'un débit de circulation de 1000 l.h⁻¹. Cette dernière est placée en aval du bac (Fig. 15 A). Un point de vidange a été installé au plus bas du bac. La re-circulation de l'eau est assurée par un air-lift placé dans le tuyau de retour qui permet ainsi l'apport de nourriture aux huîtres et l'oxygénation du milieu (Christophersen et al., 2006)(Fig. 15 B).

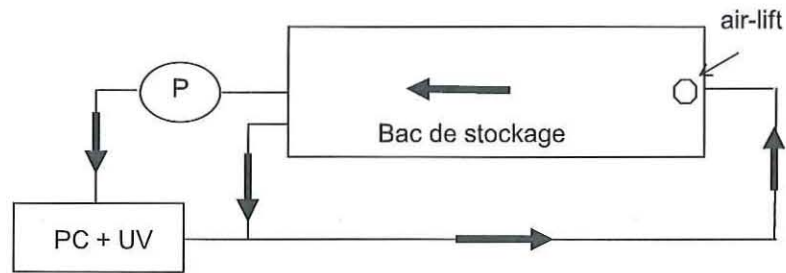


Figure 15. Schéma du fonctionnement du système re-circulé utilisé dans cette étude. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau. P : pompe, PC : pompe à chaleur, UV : lampe ultra-violet.

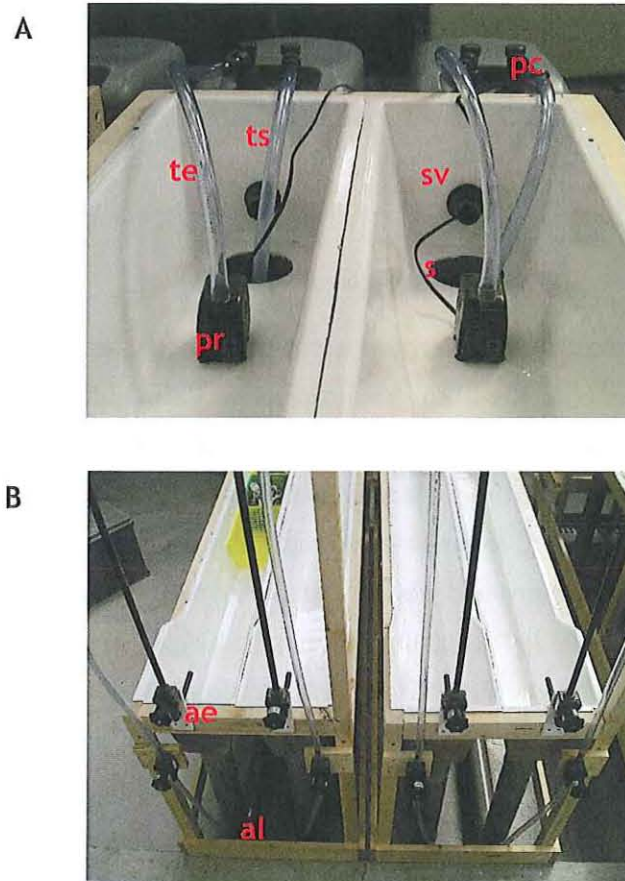


Figure 16. A : Partie aval du bac de stockage. pr : pompe faisant circuler l'eau dans la pompe à chaleur, te : entrée d'eau dans la pompe à chaleur, ts : sortie d'eau de la pompe à chaleur, s : sortie d'eau du bac, sv : évacuation de l'eau du système re-circulé par surverse, pc : pompe chaleur. B : Détails de 4 systèmes re-circulés couplés, al : point d'arrivée d'air pour le système d'air-lift, ae : arrivée d'eau de mer pour le renouvellement d'eau dans le système re-circulé.

1.3.3.2. Paramètres hydrobiologiques

La nourriture

Dans cette étude, le choix de l'espèce et du mode de production ont été dictés par une particularité du site. La station de l'IFREMER de Bouin est située dans un polder caractérisé par d'importantes nappes aquifères accessibles à une profondeur de -5 à -15 m (Baud, 1988). L'eau salée qui est prélevée à l'aide d'un forage présente des caractéristiques physico-chimiques et des teneurs en nutriments propices à la culture de microalgues (Tableau 2), alors qu'elle est inutilisable pour l'élevage de bivalves sans traitement préalable (pH relativement acide pour l'eau de mer et forte teneur en fer, Tableau 2) (Baud, 1988). Cette opportunité permet alors la culture de microalgues en grand volume et à faible coût (Méléder et al., 2001). Par ailleurs, la culture de la diatomée planctonique *Skeletonema costatum* s'est imposée en raison du caractère ubiquiste de cette espèce et de sa propension à dominer les peuplements de microalgues dans les claires de la baie de Bourgneuf (Rincé, 1979; Baud, 1988). Cette diatomée est ainsi cultivée localement pour l'affinage et l'élevage intensif d'huîtres et de palourdes adultes et juvéniles. *Skeletonema costatum* a notamment permis l'obtention des meilleurs bilans énergétiques estimés pour des huîtres adultes, en comparaison de trois autres espèces de microalgues du genre *Nitzschia spp.* pouvant être cultivées en grand volume avec de l'eau salée souterraine (Baud et Bacher, 1990; Bacher et Baud, 1992; Barillé et al., 2003).

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques et teneurs en nutriments de l'eau salée souterraine disponible sur le polder de Bouin en baie de Bourgneuf (Vendée, France).

Température (°C)	Salinité (‰)	pH	N-NH ₄ ⁺ (μmol.l ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (μmol.l ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (μmol.l ⁻¹)	P-PO ₄ ³⁻ (μmol.l ⁻¹)	Si-SiO ₃ (μmol.l ⁻¹)	Fe total (mg.l ⁻¹)
13,5	30,4	7,25	307,5	0,2	0,3	24,6	178,9	3,3

Pour les besoins de cette étude, la diatomée *Skeletonema costatum* (Fig. 16 A) a été cultivée sur des cycles de 2 à 4 jours selon la saison. La culture est réalisée en extérieur et en bassin en béton d'un volume de 70 m³ (Fig. 16 B). Elle est ensuite stockée dans un bac cylindro-conique dans la salle abritant les systèmes re-circulés. Chaque système re-circulé est équipé d'une pompe doseuse à membrane (Milton Roy, LMI) d'un débit de 25 l.h⁻¹ qui apporte le phytoplancton dans chaque bac (Fig. 16 C).

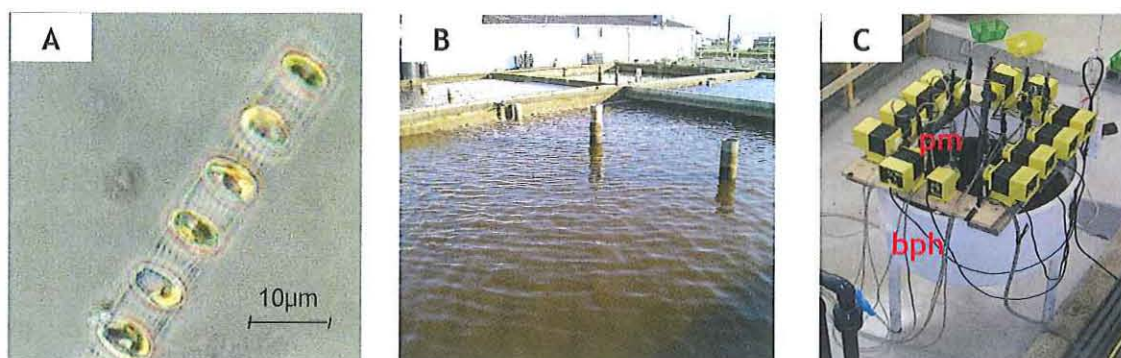


Figure 17. A : Photo en microscopie optique de la diatomée *Skeletonema costatum*.
B : Système de production en bassin extérieur de la microalgue *Skeletonema costatum*.
C : Bac cylindroconique de stockage du phytoplancton (bph), pm : pompes doseuses à membranes distribuant le phytoplancton à chaque système re-circulé.

La température

Un seuil de température de 18°C ne doit pas être dépassé pour éviter tout problème pathologique. La limite inférieure de l'intervalle de température considéré comme optimal pour la sauvegarde d'huîtres a été définie à l'occasion d'une expérimentation préliminaire réalisée en 2008 à la station de Bouin. Les résultats ont montré que des individus maintenus pendant 5 semaines à 18 et 22°C, sans apport de nourriture, ont subi une perte de poids plus importante que des individus maintenus dans les mêmes conditions mais à 10°C et 14°C (Fig. 17). Ainsi, il est possible de sauvegarder des huîtres pendant 5 semaines sans apport de nourriture à conditions de rester à 14°C ou en dessous. Cependant, si l'on veut étendre l'utilisation du système re-circulé à un procédé de détoxification, il est impératif de nourrir les huîtres (Guéguen et al., 2008) et donc de rester au-dessus de 14°C pour maintenir leur activité de filtration. De plus, il ne paraît pas opportun, dans un objectif de maîtrise des dépenses énergétiques de descendre à une température de 10°C.

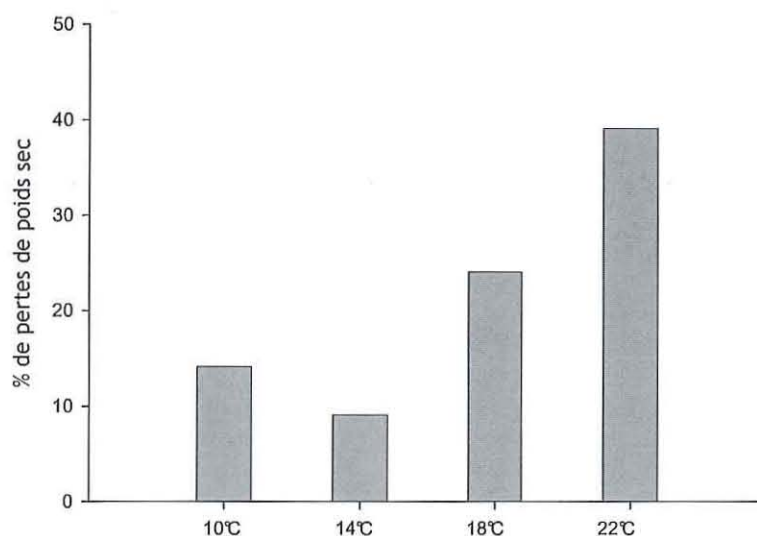


Figure 18. Pertes de poids sec chez l'huître *Crassostrea gigas* soumise à quatre conditions de température différentes et sans apport de nourriture, après 5 semaines de stockage.

La vitesse du courant et l'oxygénation

La vitesse du courant est initiée dans le circuit par un système de pompage par air-lift qui a aussi pour intérêt d'oxygéner l'eau. En effet, le système d'air-lift consiste à injecter de l'air à la base d'un tube submergé vertical. Les bulles de gaz suspendues dans le fluide, de densité inférieure au liquide, montent rapidement dans la canalisation. Par effet d'inertie, l'eau est entraînée vers le haut induisant ainsi un courant (Sandu et al., 2002). Le débit d'air apporté permet alors de régler la vitesse de courant et de gérer l'oxygénation de milieu. Dans notre structure, la hauteur du bac de stockage (21 cm) limite le débit d'air à 70 l/min sous peine de perte d'eau par débordement. Des débits inférieurs à 10 l/min entraînent une diminution de la concentration en oxygène qui descend alors à des valeurs inférieures à 5 mg.l⁻¹, pour 15 kg d'huîtres stockées à 165 kg.m⁻³ et à 16°C. Une relation débit d'air-vitesse de courant (Fig. 18) a été établie pour l'ensemble des expérimentations et elle reste spécifique au système re-circulé expérimental utilisé dans le cadre de ces expérimentations. Les mesures de vitesse de courant ont été réalisées à l'aide d'un débitmètre à ultra-son (Fuji, Portaflow) et d'un débitmètre à air (VPFlomate, VPF-R 0 30-mo 50-01). Le débit d'eau est mesuré au niveau du tuyau de retour (tr) (Fig.10), avec la pompe de re-circulation de la pompe chaleur en fonctionnement. La vitesse du courant créée au niveau du bac de stockage des huîtres a été calculée selon la relation : $V_b \text{ (cm.s}^{-1}\text{)} = D_t / S$, avec V_b la vitesse calculée dans le bac, D_t (l.h⁻¹) le débit d'eau mesuré dans le tuyau et S (cm²) la section du bac. Cette vitesse calculée correspond à celle mesurée en amont des paniers contenant les huîtres, inférieure

à celle ressentie par une huître qui serait située au milieu de panier. La vitesse du courant au sein du panier a été calculée en estimant la surface de la section correspondant aux interstices entre les huîtres et elle représente une valeur 1,5 fois supérieure à la vitesse induite en amont des paniers.

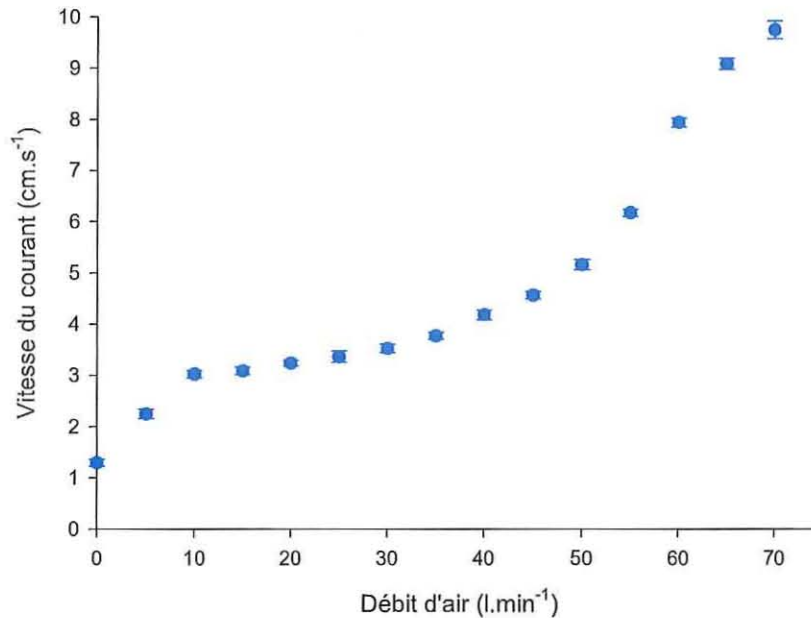


Figure 19. Relation établie entre le débit d'air (l.min⁻¹) apporté par l'air-lift et la vitesse du courant (cm.s⁻¹) créée et mesurée dans le bac de stockage des huîtres. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types, n=12.

Cette relation présente la particularité de ne pas être linéaire et se compose de quatre phases. A un débit d'air nul, une vitesse de courant résiduelle est mesurée, imputable au courant créé par la pompe à chaleur. Entre 0 et 10 l.min⁻¹, la vitesse de courant est proportionnelle au débit d'air appliqué ; entre 10 et 50 l.min⁻¹, la vitesse de courant et le débit d'air n'évoluent plus de manière linéaire en raison de pertes de charges qui augmentent avec le débit d'air. Ces pertes de charges sont imputables au passage de l'eau au sein des paniers remplis d'huîtres. Entre 50 et 65 l.min⁻¹, le volume d'eau arrivant sur les paniers est trop important et l'eau passe préférentiellement au-dessus des paniers diminuant ainsi les pertes de charge. Enfin, à partir de 65 l.min⁻¹ la quantité d'air arrivant dans le tuyau devient trop importante pour laisser l'eau remonter en surface et l'on atteint un seuil limite d'efficacité de l'air-lift. Finalement, la quantité d'air à apporter pour une utilisation optimale de l'air-lift se situe entre 0 et 50 l.min⁻¹ ce qui correspond à une vitesse de courant comprise entre 3 et 5 cm.s⁻¹.

1.3.4- Conclusion

La sauvegarde de bivalves a été étudiée au moyen d'une structure présentant la caractéristique d'être économe. Le choix de travailler sans filtre biologique a nécessité de comprendre le phénomène observé et a fait l'objet d'une étude spécifique présentée dans le chapitre 3. Cette caractéristique est un avantage non négligeable par rapport aux systèmes re-circulés utilisés pour le poisson et qui pourrait être aussi vérifiée sur des huîtres plus jeunes tel que du naissain. Le type de structure de système re-circulé présenté dans cette étude est finalement comparable à celui utilisé dans d'autres études, ce qui conforte notre choix mais la suppression du filtre biologique reste innovant. Les flux d'azote dissous deviennent alors un paramètre important à analyser pour comprendre leur évolution dans le système re-circulé et pour rester sous les limites acceptables pour les bivalves. L'identification de la gamme de température de 14-18°C permet de concilier des conditions favorables au maintien de la qualité des huîtres avec une limitation des dépenses énergétiques. L'oxygénation n'est pas un facteur limitant en raison de la présence du système d'air-lift, alors qu'en cas de nécessité, il est toujours possible d'apporter ponctuellement de l'air. Ainsi, l'analyse de la structure du système re-circulé montre la nécessité de concentrer la suite de cette étude sur l'identification de l'impact du courant sur la filtration de l'huître et sur la compréhension du processus de nitrification qui paraît se développer sur un support inhabituel. Enfin, un aspect inédit du comportement des huîtres dans ce contexte sera analysé : le stress subit par les bivalves lors de leur placement dans le système re-circulé.

**CHAPITRE 2 : Réponses de l'huître
Crassostrea gigas à deux paramètres
environnementaux : le stress thermique lié
au transfert en système re-circulé et la
vitesse du courant**

2.1- Introduction

L'optimisation des conditions hydrobiologiques pour la sauvegarde de l'huître *Crassostrea gigas* en système re-circulé est abordée à la fois avec la notion de stress subi par les bivalves et par l'étude de l'impact de la vitesse du courant sur leurs réponses physiologiques. Il est reconnu qu'il n'existe pas d'indicateur de stress universel utilisé en toute circonstance mais une panoplie d'indicateurs qui ont été mis au point pour mesurer le stress à différents niveaux d'organisation des organismes, de la cellule à l'individu (Tremblay et al., 2007).

La recherche d'un indicateur de stress simple et rapide à appliquer, combinée à une analyse réalisée à un niveau d'organisation inférieure, a conduit à tester un indicateur cellulaire, la stabilité des lysosomes présents dans les hémocytes. Cet indicateur a été suivi à l'aide du test de rétention du rouge neutre (Hauton et al., 1998), utilisé par plusieurs auteurs pour décrire le phénomène de stress chez les bivalves marins (Harding et al., 2004; Zhang et Li, 2006). L'observation de l'effet du stress à deux niveaux d'organisation permet alors une analyse plus complète de ces conséquences sur la physiologie des bivalves. Dans cette étude, l'effet du stress a aussi été analysé au niveau de l'individu avec deux indicateurs physiologiques couramment utilisés, la filtration et la consommation d'oxygène (Bayne, 1975; Hutchinson et Hawkins, 1992), et qui sont reconnus comme étant fortement influencés par les facteurs environnementaux (Bougrier et al., 1995; Chaparro et al., 2008). Dans les conditions de sauvegarde en système re-circulé, la vitesse du courant est un facteur important et son impact sur la filtration et la croissance des bivalves a fait l'objet dans la littérature de résultats contradictoires (Wildish et Miyares, 1990; Wildish et al., 1992; Wilson-Ormond et al., 1997) selon les bivalves et peu de données sont disponibles concernant les huîtres. La mesure de l'effet de la vitesse du courant sur les réponses physiologiques a été réalisée directement dans le système re-circulé pour éliminer tout effet lié au dispositif expérimental. L'analyse de l'effet du courant sur la consommation en oxygène a aussi été réalisée et constitue un résultat novateur.

2.2- Evaluation du stress suite à un choc thermique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* à l'aide de trois indicateurs

2.2.1- Introduction

Dans le milieu naturel ou en conditions expérimentales, des variations non graduelles des variables physico-chimiques peuvent être à l'origine d'un stress chez les bivalves. La plupart des expérimentateurs prévoient des périodes plus ou moins longues pour adapter les animaux aux conditions de leur étude afin de mesurer les effets des différents facteurs. Les temps d'acclimatation sont très variables selon les auteurs, pouvant être journalier (Harding et al., 2004) mensuel (Camus et al., 2000) ou hebdomadaire (Tirard et al., 1997). Il est important de connaître les capacités d'adaptation des organismes aux variations brutales du milieu ambiant pour deux raisons essentielles, i) diminuer le stress des individus pour limiter les fluctuations de leurs réponses physiologiques, ii) mesurer le niveau de stress pour l'anticiper et améliorer la survie des individus. Le transfert d'un stock de bivalves du milieu naturel à une structure fonctionnant en re-circulation s'accompagne de changements physico-chimiques importants dont les principaux peuvent être des variations de température, de salinité, de nourriture et de vitesse du courant. Dans ce contexte, il est important de connaître le temps d'acclimatation nécessaire aux bivalves pour retrouver un état caractérisé par une absence d'altération des réponses physiologiques. Parmi les facteurs reconnus pour avoir un impact sur les huîtres, la température apparaît comme le plus influent. De plus, ayant un rôle majeur sur l'alimentation, la reproduction et le métabolisme (Alunno-Bruscia et al., 2011; Barillé et al., 2011), elle exacerbe l'effet d'autres facteurs environnementaux, comme des contaminants à l'approche des limites de tolérance des organismes (Svendsen et al., 2007) ou la salinité à des températures extrêmes limitant ainsi la croissance des huîtres (Hauton et al., 1998). Au cours de leur processus d'élevage, les huîtres subissent inmanquablement des variations brusques de température, à l'occasion d'un transfert d'un site vers un autre (Aaraas et al., 2004; Qu et al., 2009) ou d'opération de tri et de nettoyage entraînant une exposition à l'air à des températures variables (Song et al., 2007; Qu et al., 2009). Le transfert d'huîtres des parcs d'élevage vers un système re-circulé s'accompagne de variations de température qui peuvent être importantes. Pour estimer l'impact de ces variations, il a été choisi de tester l'intensité du stress dû à un choc thermique à l'aide de trois indicateurs, la filtration, la consommation d'oxygène et la stabilité membranaire des lysosomes. La filtration et la consommation d'oxygène sont des variables physiologiques fortement influencées par les facteurs environnementaux, telles que la qualité de la nourriture, la salinité et la température (Bayne, 1975; Bougrier et al.,

1995; Chaparro et al., 2008). Ces deux réponses physiologiques sont utilisées lors de l'élaboration de bilan énergétique pour estimer les gains liés à l'alimentation (filtration) et les pertes associées aux dépenses métaboliques (Cardoso et al., 2006). La stabilité lysosomale est un indicateur biochimique de stress physiologique au niveau cellulaire (Hauton et al., 1998). Les lysosomes sont le siège de changements les plus rapidement décelables chez les organismes marins dans le cas d'un stress (Harding et al., 2004). Le test de rétention de rouge neutre est alors utilisé pour mesurer les changements de la stabilité membranaire des lysosomes (Moore, 1988). Les lysosomes sont des organites impliqués dans la digestion enzymatique intra et extra-cellulaire et dont le pH est compris entre 3,5 et 5. Le rouge neutre est une base faible, piégée par protonation au sein des lysosomes (Ringwood et al., 1998). Chez l'huître, une variation de la température modifie l'activité enzymatique au sein des lysosomes des hémocytes perturbant leur fonctionnement (Zhang et al., 2006). Les propriétés physiques des lipides membranaires sont altérées, entraînant alors un dysfonctionnement des membranes lysosomales par une réduction de leur fluidité (Pernet et al., 2007). Un stress provoque ainsi une déstabilisation membranaire des lysosomes qui libèrent le rouge neutre dans le cytosol de l'hémocyte. Le test de la stabilité lysosomale consiste alors à évaluer la proportion des lysosomes qui retiennent le rouge neutre lorsqu'un individu a été soumis à un stress. Ce test a été réalisé selon le protocole modifié de Lowe et al. (1995).

Dans cette étude, ces trois indicateurs ont été testés au cours d'une variation brutale de la température d'amplitude identique, d'une part en augmentation de 10°C à 16°C et d'autre part en diminution de 22°C à 16°C. Cette expérience a permis de mesurer le temps nécessaire aux bivalves pour présenter une stabilisation des paramètres écophysologiques, ou temps d'adaptation, à travers les mesures des indicateurs de stress retenus.

2.2.2- Matériel et méthodes

Conditionnement du matériel biologique

Un lot de 40 kg d'huîtres (600 individus d'un poids total moyen de $67,58 \pm$ (ET) 8,27 g et d'un Indice de Condition AFNOR de 9,3) a été prélevé dans la Baie de Bourgneuf (46-47°N, 1-2°O, Vendée, France) en février 2009. Au cours de la première semaine, les bivalves issus du milieu naturel à 5°C, ont été placés dans une structure expérimentale et maintenus en circuit ouvert et nourris avec la microalgue *Skeletonema costatum*. La température a alors été élevée à 16°C à raison de 1,5°C par jour. Une gamme de température optimale pour la sauvegarde de l'huître en système re-circulé a été définie

entre 14°C et 18°C. Le choix d'acclimater les huîtres à une température de 16°C a permis de se situer au milieu de cet intervalle de température. Des variations de températures brutales ont été testées, d'une amplitude de 6°C allant au-delà de 14°C et de 18°C. L'expérimentation s'est ensuite déroulée en deux phases : au cours de la première phase, une partie des bivalves a subi une diminution brusque (en moins de 50 minutes) de la température de 16°C à 10°C, alors qu'une autre partie du stock a subi une augmentation brusque de la température de 16°C à 22°C, un dernier lot restant à 16°C comme témoin. Les différents indicateurs de stress ont été mesurés suite à ces chocs de température et cette étape s'est achevée lorsque ces derniers se sont stabilisés. Les lots conservés à 10°C et 22°C ont ensuite été ramenés à 16°C afin de déterminer si un éloignement de la température d'acclimatation de 16°C ou un retour vers celle-ci a entraîné une réaction similaire ou non des indicateurs de stress.

Le dispositif expérimental

L'évolution de la filtration et de la consommation d'oxygène a été mesurée sur 18 bivalves répartis sur deux bancs de mesure des réponses écophysiologiques et la mesure de la rétention de rouge neutre (RRN) a été réalisée sur le reste des bivalves répartis dans trois bacs de 100 litres dont la température a aussi été maintenue à 10°C, 16°C et 22°C. Le dispositif expérimental se présente sur trois niveaux (Fig. 20). Le premier correspond au traitement thermique de l'eau de mer et le second aux bacs tampons où s'effectue le mélange de l'eau et du phytoplancton. Le troisième correspond à la distribution aux enceintes individuelles permettant la mesure des réponses écophysiologiques et aux bacs contenant les huîtres servant aux tests RRN. Pour les bacs tampons, l'eau de mer a été préalablement filtrée sur un filtre à sable puis passée par un échangeur thermique alimenté par une eau de forage à 13°C. L'eau réchauffée a ensuite été répartie sur trois circuits disposant chacun d'une pompe à chaleur afin d'obtenir une eau thermorégulée à 10°C, 16°C ou 22°C. Chaque bac tampon a ensuite alimenté les trois bacs contenant les bivalves pour la mesure du RRN et les deux bancs de mesures des réponses écophysiologiques pour l'obtention de la filtration et de la consommation d'oxygène. Les bivalves utilisés pour la mesure du RRN ont été stockés dans trois bacs cylindro-coniques de 100 l avec un renouvellement d'eau par heure. Sur chaque banc d'écophysiologie, 9 enceintes contiennent chacune une huître et une enceinte vide sert de témoin de sédimentation. Les enceintes d'un volume de 2 l sont alimentées avec un débit de 10 l.h⁻¹, en circuit ouvert. Sur les deux bancs d'écophysiologie et sur les trois bacs cylindro-coniques, la température a été mesurée en continu à raison d'une mesure toutes les 10 minutes, les autres paramètres tels que le taux d'oxygène, la salinité et le pH ont été

contrôlés deux fois par jour. Les huîtres ont été nourries avec la diatomé *Skeletonema costatum* mise en culture dans deux cylindres en scobalite (250 l) en salle thermorégulée (16°C) avec un apport d'eau de forage en continu et une lumière artificielle de 24/24h. Une concentration en phytoplancton de 10 cellules. μl^{-1} a été maintenue à dans chaque bac tampon.

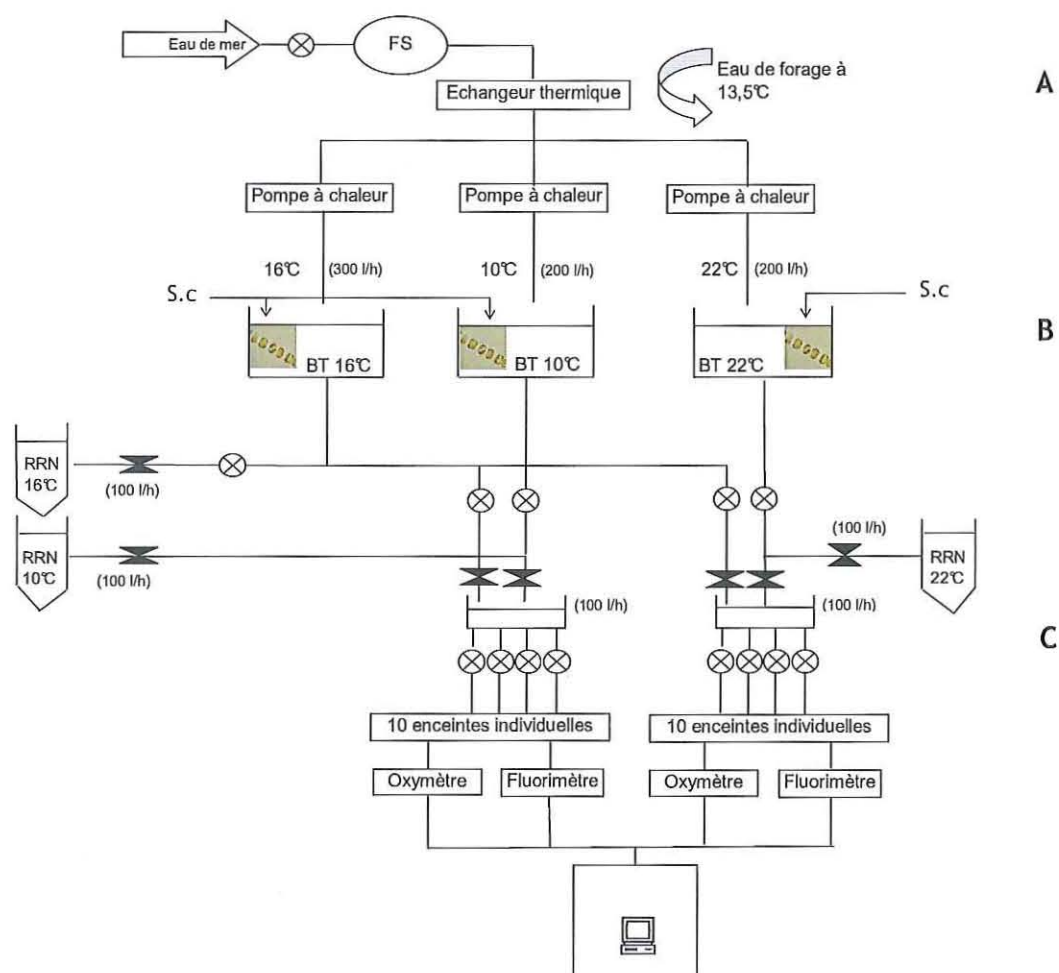


Figure 20. Dispositif expérimental permettant le suivi des trois indicateurs de stress lors d'un choc thermique. A : traitement de l'eau, B : bacs tampons où est effectué le mélange eau et microalgue, C : bancs d'écophysiologie et bacs contenant les huîtres pour les mesures de rouge neutre. FS : filtre à sable, BT : bac tampon, RRN : rétention de rouge neutre. S.c : *Skeletonema costatum*, ⊗ : pompe, ⊘ : vanne.

Mesures des réponses physiologiques

La filtration (F) et la consommation en oxygène (CO) de chaque individu ont été estimées toutes les 10 minutes, respectivement par des mesures de fluorimétrie (sonde Seapoint, Sensors, Inc.) et des mesures de concentration d'oxygène (sonde WTW). Les résultats ont ensuite été moyennés sur une heure pour l'ensemble des 9 individus. Les

mesures ont été collectées et traitées par le logiciel Labview (National Instrument, Austin Texas). La filtration (F , $\text{l.h}^{-1}.\text{individu}^{-1}$) a été calculée selon la relation suivante :

$F = [(F_e - F_s) / F_e] \cdot D$, avec F_e = Fluorescence mesurée à la sortie des enceintes servant de témoin de sédimentation, F_s = Fluorescence mesurée à la sortie des enceintes contenant les individus, D = Débit (l.h^{-1}). La consommation d'oxygène (CO , $\text{mg.h}^{-1}.\text{individu}^{-1}$) a été calculée selon la relation suivante : $CO = (O_e - O_s) \cdot D$ avec O_e = concentration en oxygène à la sortie des enceintes servant de témoin de sédimentation ; O_s = concentration en oxygène à la sortie des enceintes contenant les individus. Afin de comparer des individus de taille différente, les réponses physiologiques ont été standardisées à celle d'un animal d'un gramme de poids sec à l'aide de la formule proposée par Bayne et Newell (1983) :

$Y_s = (W_s / W_e)^b \cdot Y_e$, avec Y_s pour la réponse standardisée, W_s le poids standard (1 g), W_e le poids observé, Y_e la réponse observée et b le coefficient d'allométrie. Des coefficients d'allométrie de 0,62 et de 0,74 ont été appliqués pour respectivement, la filtration et la consommation d'oxygène (Haure et al., 1998). En fin d'expérience, le poids sec a été déterminé pour chacun des 18 individus. Les chairs ont été congelées à -20°C pendant 48 heures puis lyophilisées (CHRIST Alpha 1/6) à -54°C pendant 48 heures et pesées sur une balance Mettler Toledo.

Mesures de la stabilité lysosomale

A partir du muscle adducteur du bivalve, 500 μl d'hémolymphe contenant des hémocytes ont été prélevés à l'aide d'une seringue et mis dans un tube Eppendorf. L'hémolymphe a ensuite été conservée au bain-marie à la température expérimentale avec un ajout de 500 μl de solution saline iso-osmotique. Une solution mère de rouge neutre a ensuite été préparée avec 20 mg de colorant (CI 50040, Sigma) dilué dans 1 ml de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et 10 μl de cette solution ont été ajoutés à 5 ml de solution physiologique saline. Une fois tous les prélèvements réalisés, 50 μl de solution d'hémocytes ont été déposés sur une lame (en triplicat) pour une incubation de 15 min sur glace, dans une atmosphère humide et à l'abri de la lumière. Après cette première étape de fixation des hémocytes sur la lame, 40 μl de solution de rouge neutre ont été déposés sur les hémocytes et les lames ont à nouveau été mises à incuber en chambre humide et froide. Ces lames ont ensuite été observées au microscope (grossissement X 400) après 30 minutes d'incubation. Pour chaque condition de température, l'expérimentation a été réalisée pendant 1h30 à raison d'un prélèvement toutes les 30 minutes sur 3 individus (avec 3 réplicats par individu) et les lysosomes de 25 hémocytes ont été observés pour chaque réplicat. Le pourcentage de lysosomes déstabilisés a ainsi été comptabilisé.

Analyse statistique

Le logiciel Statgraphics Plus Centurion XV.I (Sigma Plus, Paris, France) a été utilisé pour vérifier la normalité et l'homoscédasticité de la distribution des données et pour les analyses subséquentes. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour analyser les différences entre les résultats obtenus sur le test de RRN selon la température et l'heure de prélèvement.

2.2.3- Résultats

Influence des variations thermiques sur les réponses physiologiques

Le pH moyen sur l'ensemble des bacs et des bancs d'écophysiologie était de $8,02 \pm$ (ET) $0,16$ et la salinité de $31,8 \pm$ (ET) $0,2$ ‰. Les huîtres conservées à la température de référence de 16°C ont une filtration moyenne de $3,35 \pm$ (ET) $1,13$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ et une consommation d'oxygène de $1,02 \pm$ (ET) $0,45$ $\text{mg O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Une variation brusque de la température de 16°C à 10°C (Fig. 21 A) a provoqué une perturbation de la filtration pendant 27 heures au cours de laquelle celle-ci a évolué de manière anarchique avec une amplitude de variation de $3,92$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ et une filtration minimale de $1,24$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Cette phase a ensuite été suivie d'une stabilisation de la filtration qui est restée supérieure de $0,5$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ à la filtration observée à 16°C puis au bout de 40 heures la filtration est revenue à une valeur proche de celle mesurée à 16°C , à $3,64 \pm$ (ET) $0,38$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Lorsque les huîtres ont subi brusquement une augmentation de la température de 16°C à 22°C (Fig. 21 B), une période de perturbation de la filtration a aussi été constatée pendant 27 heures avec une amplitude de variation plus importante de $4,94$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Au bout de 27 heures, la filtration est restée nettement supérieure à la valeur mesurée à 16°C avec en moyenne une filtration de $5,57 \pm$ (ET) $0,48$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, sans retour à la filtration de la température d'acclimatation. Par la suite, lorsque la température a été ramenée de 10°C à 16°C (Fig. 22 A), la filtration a présenté une perturbation de 4 heures avec une faible amplitude de variation de $1,88$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ puis un retour à la filtration mesurée à la température d'acclimatation. Un retour de la température de 22°C à 16°C (Fig. 22 B) a entraîné une chute de la filtration qui a évolué de manière oscillante autour d'une moyenne de $2,15 \pm$ (ET) $0,45$ $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, sans montrer de retour à la filtration de la température d'acclimatation.

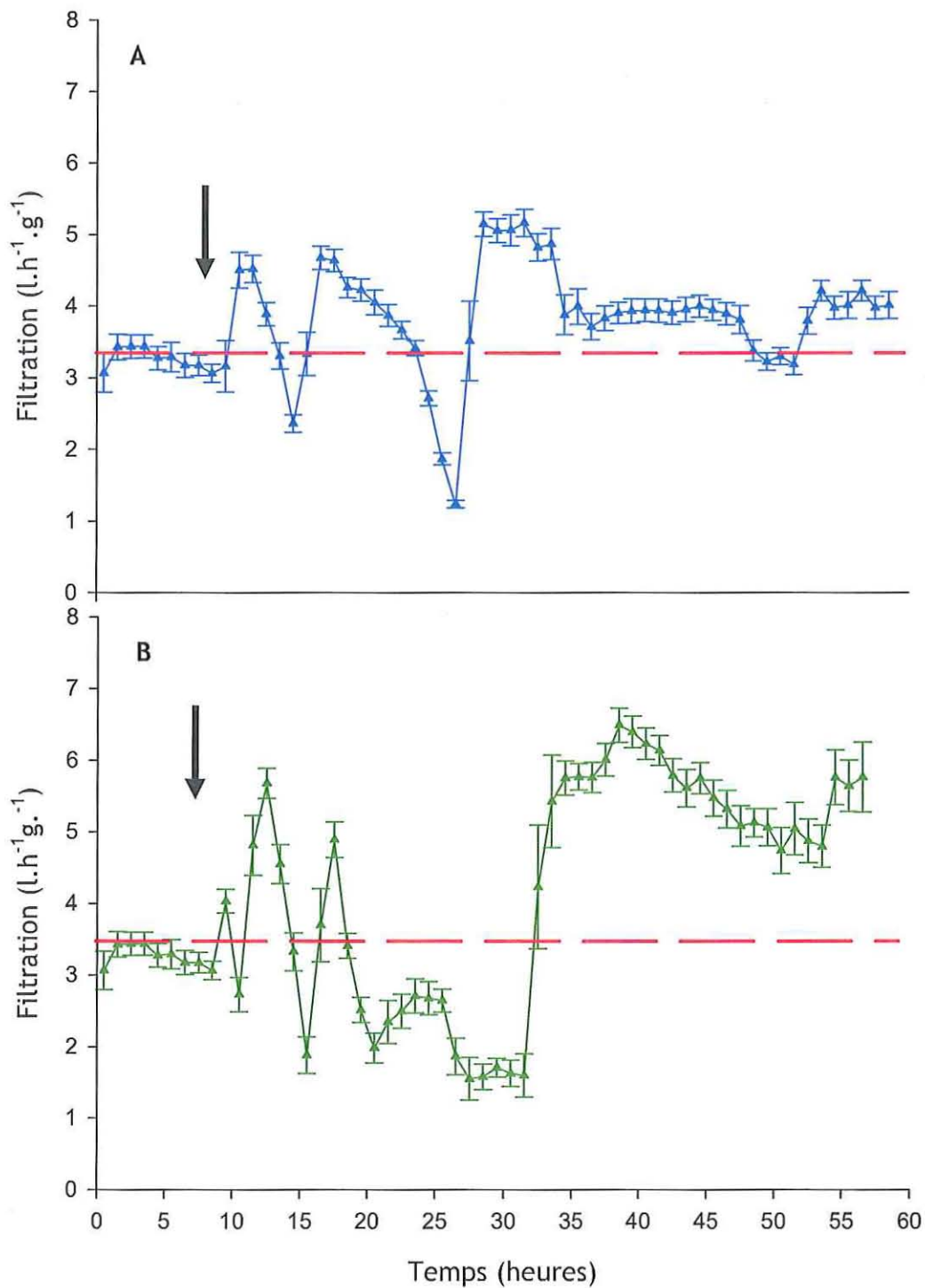
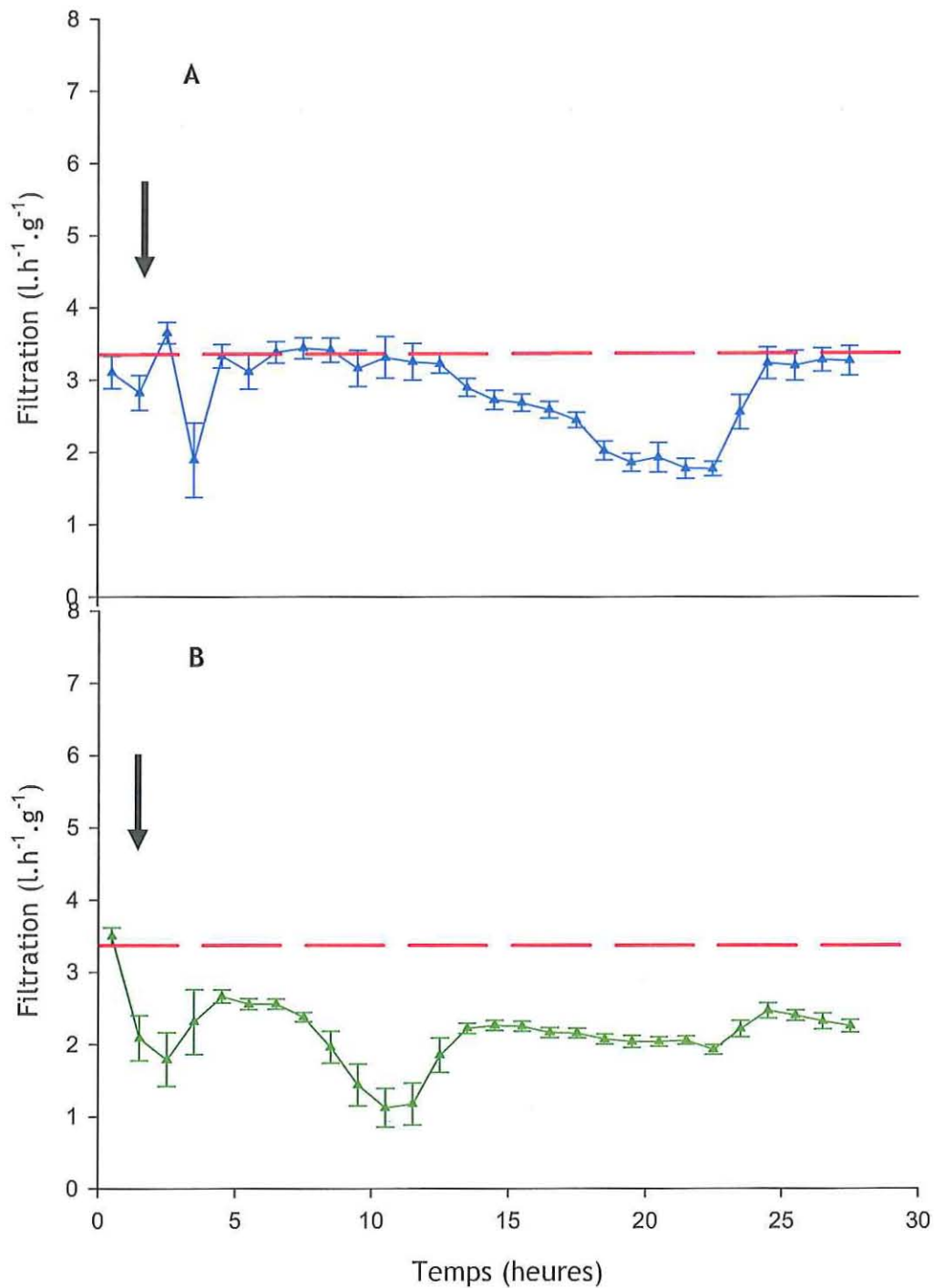


Figure 21. Evolution de la filtration chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. \blacktriangle : de 16°C à 10°C, B. : \blacktriangle de 16°C à 22°C. — : Filtration mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9).



Suite à la baisse soudaine de température de 16°C à 10°C, les huîtres ont diminué leur consommation d'oxygène (Fig. 23 A) qui est restée inférieure à celle mesurée à 16°C même après 45 heures d'expérimentation. La consommation d'oxygène moyenne a alors été de $0,59 \pm (ET) 0,20 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, contre $1,02 \pm (ET) 0,45 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ à 16°C. L'augmentation brusque de la température de 16°C à 22°C s'est accompagnée de variations importantes de la consommation d'oxygène avec une amplitude de $1,25 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ et avec une variabilité individuelle plus importante (écart-types plus importants). Au bout de 45 heures, la consommation d'oxygène est revenue à des valeurs proches de celles constatées à 16°C. Le retour à une température de 16°C n'a pas permis aux huîtres placées à 10°C (Fig. 24 A) de retrouver une consommation d'oxygène propre à celle mesurée à 16°C alors qu'il semble que les huîtres placées à 22°C (Fig. 24 B) retrouvent une consommation d'oxygène propre à celle mesurée à 16°C, 25 heures après le second choc thermique.

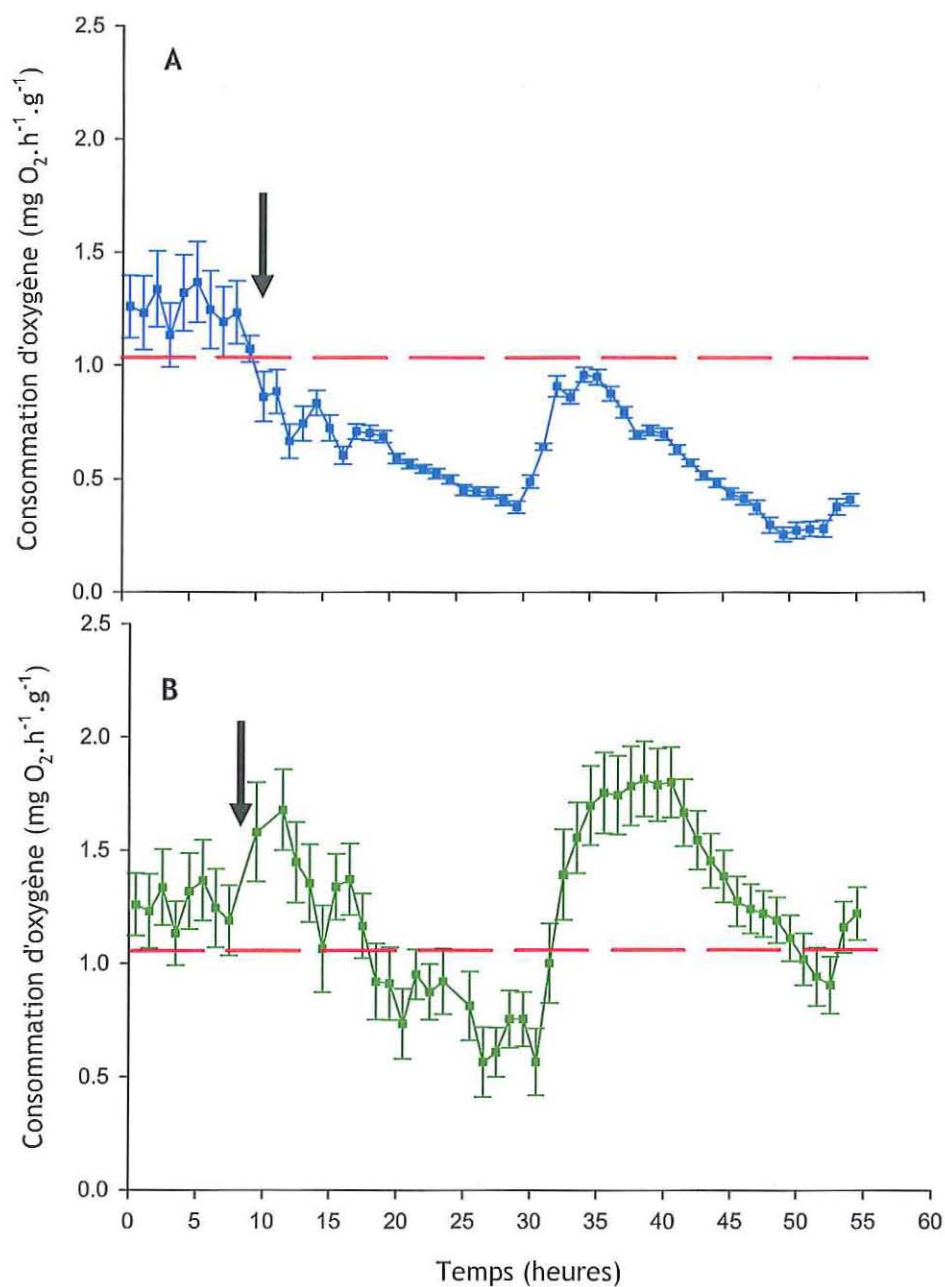


Figure 23. Evolution de la consommation d'oxygène chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ■ : de 16°C à 10°C, B. ■ : de 16°C à 22°C, — : consommation d'oxygène mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9).

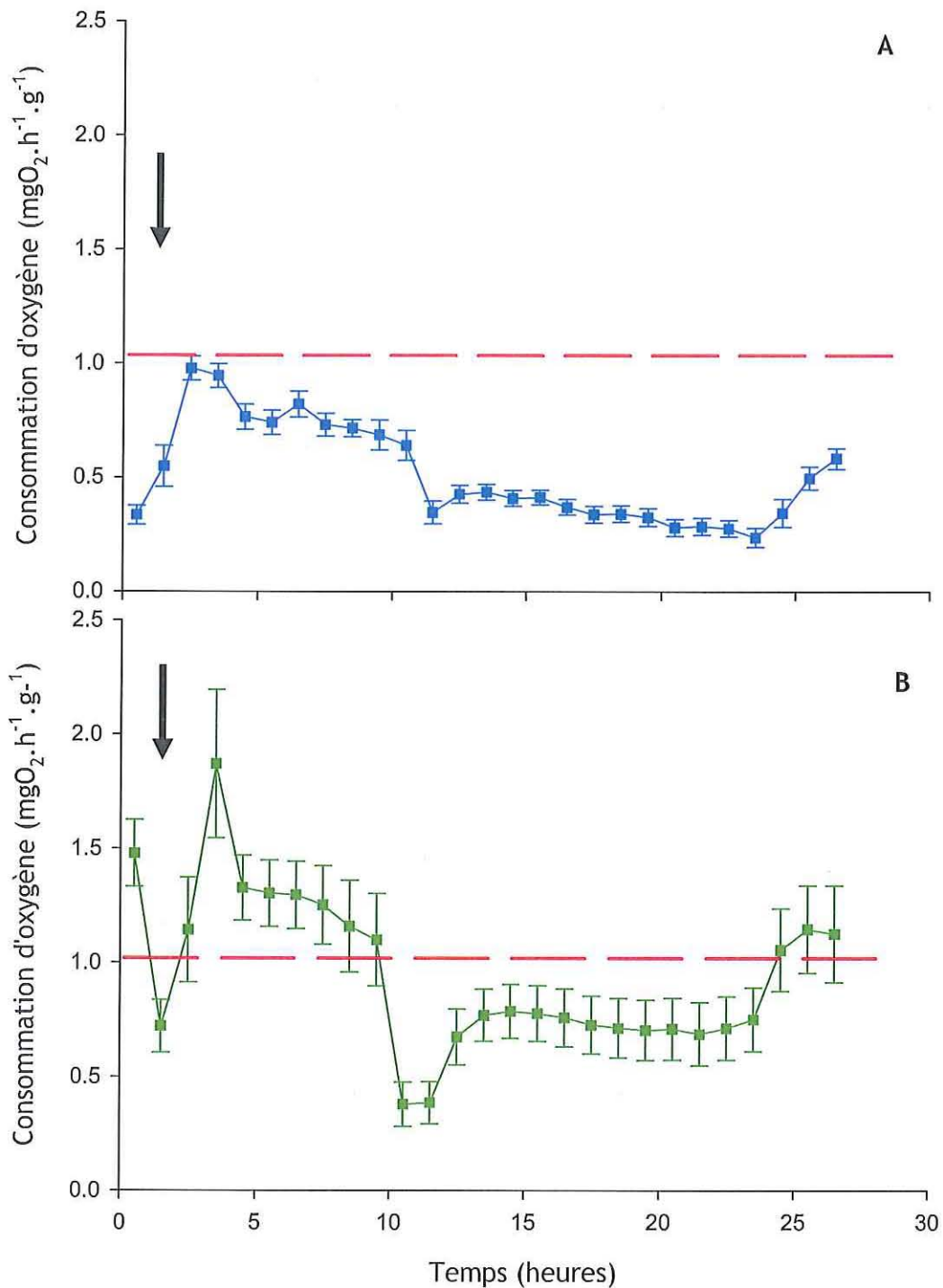


Figure 24. Evolution de la consommation d'oxygène chez l'huître *Crassostrea gigas* suite à un choc thermique (flèche noire) A. ■ : de 10°C à 16°C, B. ■ : de 22°C à 16°C, — : consommation d'oxygène mesurée à 16°C. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance (n=9).

La stabilité lysosomale

L'observation de l'aspect et de la couleur des lysosomes au microscope (X 400) a permis d'identifier les hémocytes dont les lysosomes ont des membranes devenues perméables provoquant la libération du rouge neutre dans leur cytosol (Fig. 25, cellule A). Ceci a permis de distinguer les cellules dont les membranes lysosomales sont restées stables, identifiables par la présence de points rouges (Fig. 25, cellule B).

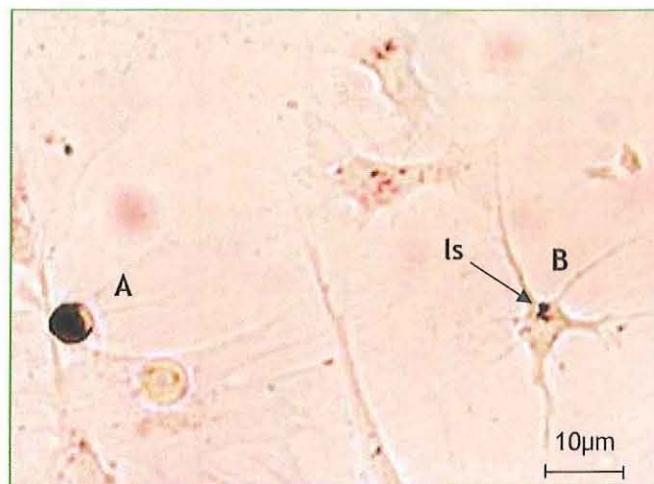


Figure 25. Vue au microscope optique (X 400) d'hémocytes d'huître *Crassostrea gigas* après une coloration au rouge neutre. **A** : hémocyte dont les lysosomes ont des membranes déstabilisées et dont le rouge neutre s'est répandu dans le cytosol, **B** : hémocyte dont les lysosomes ont les membranes restées imperméables, **ls** : lysosomes aux membranes stables.

Après le choc thermique, les pourcentages de déstabilisation n'ont pas dépassé les 40 % quelle que soit la température considérée (Fig. 26). Le comportement des lysosomes est resté le même, que le choc thermique soit de 6°C en augmentation ou en diminution. La température n'a pas eu d'effet significatif sur la proportion de lysosomes déstabilisés (ANOVA, $p > 0,05$). Par contre, l'heure à laquelle les prélèvements d'hémolymphe ont été effectués après le choc thermique a une influence sur le pourcentage de déstabilisation (Tableau 3).

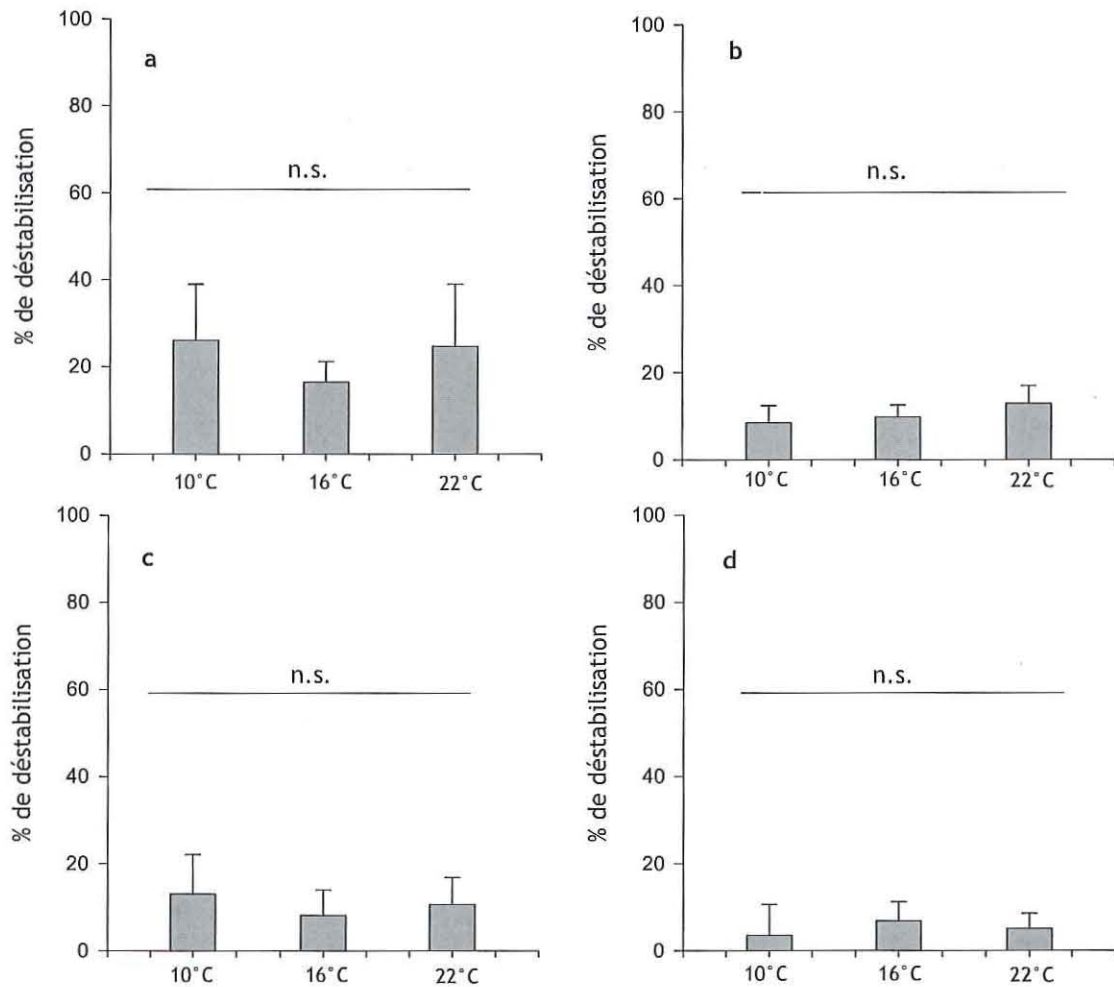


Figure 26. Pourcentage de déstabilisation des lysosomes chez l'huître *Crassostrea gigas* après un choc thermique d'une amplitude de 6°C à partir de 16°C. *a* : observation 30 min après le choc thermique, *b* : après 60 min, *c* : après 120 min et *d* : après 180 min. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance, $p < 0.05$; $n=6$.

La proportion de lysosomes déstabilisés a été significativement plus importante une demi-heure après le choc thermique qu'après une, deux et trois heures. Les prélèvements ont tous été réalisés dans les mêmes conditions et par le même expérimentateur. Les huîtres à 16°C n'ayant pas subi de stress thermique, cette déstabilisation des lysosomes plus importante doit avoir pour origine une perturbation autre que thermique.

Tableau 3. Résultats de l'ANOVA à deux facteurs sur l'effet de l'heure de prélèvement et de la température sur la déstabilisation des lysosomes au cours du test de RRN.

ANOVA	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Heure de prélèvement	3080,01	3	1026,67	8,42	< 0,001
Température	271,7	2	135,85	1,11	0,333
Interaction	886,94	6	147,82	1,21	0,309
Résidu	9633,36	79	121,94		

2.2.4- Discussion

Influence des variations thermiques sur les réponses physiologiques

La filtration mesurée à 16°C ($3,35 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) est inférieure à celle calculée avec la relation de Bougrier et al. (1995) qui donne une filtration de $4,7 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ mais elle reste cohérente par rapport aux résultats obtenus par Barillé et al. (1993) de $2,2 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, Deslous-Paoli et al. (1987) avec $4,03 \pm 2,19 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ mesurées à 20-22°C, Soletchnik et al. (1991) qui trouvent une filtration variant de 2,4 à $4,8 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ pour des températures allant de 14 à 19°C, et de Bayne (2009) qui propose une filtration de $3,4 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ à 20°C. Les différences entre les résultats de cette étude et ceux de Bougrier et al. (1995) peuvent provenir de l'espèce de microalgue apportée aux huîtres (Palmer, 1980; Barillé et al., 2003), ces auteurs ayant travaillé avec un mélange (*Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans*) alors que cette étude a été réalisée avec du *Skeletonema costatum*. Cette différence peut aussi être attribuée à des variations de la taille des organes palléaux dont les branchies (Barillé et al., 2000; Dutertre et al., 2007) ou à des différences génétiques au sein même de l'espèce (Ren et al., 2000). La consommation d'oxygène mesurée à 16°C ($1,02 \pm (\text{ET}) 0,45 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) est proche de celle calculée à partir de l'équation de Bougrier et al. (1995) de $0,75 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$. Ces valeurs restent cohérentes avec celles rencontrées dans la littérature qui vont de $0,8 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ à 18°C (Mao et al., 2006), $1,33 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ à 19°C (Haure et al., 2003) à $1,55 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ à 20°C (Bayne, 2009).

Une variation brusque de la température d'une amplitude de 6°C en augmentation ou en diminution a provoqué dans les deux cas des variations de la filtration sur une période de 27 heures, avec cependant une amplitude moins importante ($3,92 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) lorsque la température est descendue à 10°C que lorsqu'elle a été augmentée à 22°C ($4,94 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$). Par contre, la consommation d'oxygène a présenté des fluctuations importantes

(amplitude de $1,25 \text{ mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ à 22°C) quelle que soit la température et ne semble pas retrouver une valeur stable même près 50 heures d'expérimentation. La consommation d'oxygène est restée toute fois inférieure à 10°C qu'à 16°C avec une moyenne de $0,59 \pm 0,20 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, ce qui reste en adéquation avec la consommation d'oxygène calculée selon la relation de Bougrier et al.(1995) de $0,48 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Un retour à la température d'acclimatation de 16°C n'a pas permis aux huîtres placées préalablement à 22°C de retrouver une filtration correspondant à cette température après 30 heures d'expérimentation. La filtration est restée nettement inférieure à celle observée à 16°C alors que les huîtres préalablement placées à 10°C ont rapidement retrouvé une filtration similaire à celle mesurée à 16°C . Par contre, la consommation d'oxygène des huîtres préalablement placées à 10°C , une fois ramenée à 16°C n'a pas retrouvée sa valeur initiale alors que les huîtres préalablement placées à 22°C ont une consommation d'oxygène irrégulière qui a oscillée de part et d'autre de la valeur moyenne mesurée à 16°C même au bout de 30 heures. A l'occasion de ce choc thermique, les deux réponses physiologiques n'ont pas réagi de la même manière, l'huître a régulé plus rapidement sa filtration que sa consommation d'oxygène quel que soit le sens du choc thermique. Or, une adaptation rapide des réponses physiologiques aux conditions environnementales changeantes est importante afin de perturber le moins possible le métabolisme des huîtres et donc leur équilibre énergétique (Wilbur et Hilbish, 1989). Face au choc thermique, l'huître semble réduire sa consommation d'oxygène pour minimiser ses pertes énergétiques (Bayne et Newell, 1983). La plupart des études ont démontré l'effet des variations progressives de température sur la physiologie des huîtres (Bayne et Newell, 1983; Shpigel et al., 1992; Haure et al., 1998; Mao et al., 2006), mais peu d'informations sont disponibles sur l'effet d'un choc thermique. Le sujet a davantage été étudié au niveau cellulaire par l'analyse de l'expression de protéines (Jackson et al., 2011) ou le comportement des lysosomes (Zhang et Li, 2006). Le temps de perturbation de la filtration nécessite donc une période d'acclimatation de 27 heures au minimum, l'expérience n'ayant pas été menée assez longtemps pour déterminer le temps nécessaire pour que la consommation d'oxygène retrouve son niveau attendu à 16°C .

Influence des variations thermiques sur la stabilité lysosomale

Le test du rouge neutre est reconnu comme étant un indicateur sensible du stress causé par des variations de température (Hauton et al., 2001; Keppler, 2007; Zhang et al., 2006) et les lysosomes représentent un site de détection précoce de la réponse des bivalves (Harding et al., 2004). Ce test a montré qu'il n'y a pas de déstabilisation des membranes significativement différentes entre des huîtres maintenues à 16°C et celles

ayant subi un choc thermique d'une amplitude de $\pm 6^{\circ}\text{C}$. Les taux observés de déstabilisation membranaire inférieur à 40 % pourraient alors provenir de la toxicité naturelle du rouge neutre créant un stress additionnel aux cellules (Lowe et Pipe, 1995; Hauton et al., 2001). La méthode du test de rouge neutre utilisée dans cette étude a été inspirée par Ringwood et al. (1998) qui n'effectuait qu'un seul comptage après 60 min d'incubation. Cependant, d'autres études ont utilisé un autre protocole consistant à suivre une lame contenant des hémocytes pendant 180 min et à déterminer le temps au bout duquel la lame présentait 50 % des hémocytes avec des lysosomes déstabilisés (Harding et al., 2004; Hauton et al., 2001; Zhang et al., 2006). Des essais préliminaires ont permis de tester cette méthode mais sans résultat, les 50 % d'hémocytes présentant des lysosomes déstabilisés n'ont jamais été observés, même après 180 min d'incubation. Ainsi, le choix de l'une ou l'autre des méthodes a mené à un résultat similaire. Cependant, si dans cette étude, une variation brusque de température d'une amplitude de 6°C n'a pas provoqué de stress, Zhang et al. (2006) ont montré qu'une variation de température d'une amplitude de 10°C (5°C , 15°C et 25°C) à une salinité de 37 ‰ a été à l'origine d'une déstabilisation lysosomale significative chez des huîtres *C. gigas* et selon cet auteur, un changement brutal de la température a le même effet qu'une variation progressive. Par ailleurs, le temps d'acclimatation de 24 h à 16°C peut ne pas avoir été suffisant alors que ce même auteur a procédé à 7 jours d'acclimatation pour un choc thermique d'une amplitude plus importante.

2.2.5- Conclusion

L'évaluation d'un stress implique que les indicateurs utilisés soient sensibles et faciles à mettre en œuvre (Tremblay et al., 2007) ce qui est le cas de la mesure de la stabilité lysosomale dans les hémocytes d'huîtres. Les résultats obtenus lors de cette expérience suggèrent que le transfert d'un stock d'huîtres du milieu naturel vers un système re-circulé, avec une différence de température n'excédant pas 6°C , n'entraîne pas de stress à l'échelle cellulaire. Si la filtration a montré une perturbation au minimum d'une journée, il est alors nécessaire de prendre en compte ce temps d'acclimatation pour qu'une détoxification de bivalves contaminés pas des algues toxiques soit pleinement efficace (Guéguen et al., 2008). Parallèlement, l'objectif du maintien du poids des huîtres dans le cadre de la sauvegarde ne serait pas concerné pour une période si courte. Pour une sauvegarde d'huîtres en système re-circulé, le choix de la gamme de température de 14°C à 18°C (chapitre 1.2) a été conforté par les résultats de Zhang et Li (2006) qui ont déterminé qu'une gamme de 13°C à 17°C était optimale pour assurer une stabilité des

membranes lysosomales chez *C.gigas*. Outre l'effet de la température sur la physiologie des bivalves, la mise à sec et le tri des bivalves sont aussi des facteurs à l'origine d'un stress chez les bivalves (Harding et al., 2004; Zhang et Li, 2006) qui seraient des processus à prendre en compte lors de placement d'huîtres en système re-circulé.

2.3- Impact de la vitesse du courant sur les réponses physiologiques de l'huître *Crassostrea gigas*

2.3.1- Introduction

Le maintien de la qualité des bivalves placés en système re-circulé passe par la conservation du poids des individus. La filtration est alors la réponse physiologique à optimiser par la gestion des facteurs environnementaux. Parmi ceux-ci, le volume d'eau mis en mouvement dans le système re-circulé permet le transport et l'apport aux huîtres de la nourriture (Denis et al., 1999). Le caractère sessile de l'huître la rend alors entièrement dépendante du flux d'eau, pour son approvisionnement en oxygène et en microalgues. Plusieurs auteurs ont montré les effets de la vitesse du courant sur les bivalves, que cela soit au niveau individuel (Grizzle et al., 1992; Kirby-Smith, 1972) ou populationnel (Dame et al., 1984) en soulignant la difficulté à établir une relation claire entre le flux d'eau et la croissance des bivalves (Newell et Langdon, 1996). La vitesse du courant agit sur la croissance des bivalves suspensivores en interaction avec un ensemble de variables telles que la qualité (Wildish et al., 1992) et la quantité de seston (Grizzle et Morin, 1989) mais aussi la densité des bivalves, induisant une possible compétition entre les individus (Kirby-Smith, 1972; Wildish et Kristmanson, 1985). Un flux turbulent ou laminaire influence différemment le déplacement des matières en suspension et modifie la prise de nourriture par le bivalve (Kirby-Smith, 1972; Wildish et Kristmanson, 1985). La remise en suspension des biodépôts par un courant trop important entraîne une augmentation de la concentration en matière en suspension dans le milieu (Widdows et al., 1998; Mitchell, 2006) qui peut perturber l'activité de filtration (Soletchnik et al., 1991; Barillé et Prou, 1993; Barillé et al., 1997b). Cependant, le courant permet aussi le transport des biodépôts (Kusuki, 1978) vers une zone de sédimentation pouvant être mis à profit pour leur élimination du système re-circulé. La population bactérienne responsable de la nitrification des matières azotées accumulées dans le système re-circulé est aussi sensible aux turbulences engendrées par le courant (Zhu et Chen, 2001; Timmons et Ebeling, 2007). La vitesse de ce courant doit alors aussi favoriser cette nitrification qui

contrôle la concentration en azote ammoniacal et donc la qualité de l'eau du système re-circulé.

L'effet du courant sur les réponses physiologiques a été étudié chez plusieurs bivalves tels que les coquilles Saint-Jacques *Placopecten magellanicus* (Kirby-Smith, 1972; Wildish et al., 1992) et *Argopecten irradians* (Eckman et al., 1989) montrant une inhibition de la filtration et de la croissance pour une vitesse croissante, alors que d'autres études ont donné des résultats contradictoires selon l'espèce de moules considérée. Chez *Mytilus edulis*, la filtration diminue pour une vitesse croissante (Wildish et Miyares, 1990) alors que le phénomène inverse a été observé chez *Mytilus galloprovincialis* (Denis et al., 1999). Seule l'huître *Crassostrea virginica* a fait l'objet d'une étude démontrant l'effet négatif du courant sur la croissance entre 2 et 9 cm.s^{-1} (Grizzle et al., 1992; Wilson-Ormond et al., 1997) mais aucun seuil inhibiteur de la vitesse n'a été déterminé pour l'huître *C. gigas*. Or, la connaissance de l'effet du courant sur la physiologie de l'huître permettra de choisir au mieux la vitesse à appliquer au courant dans le système re-circulé afin d'en assurer le bon fonctionnement et de maintenir la qualité du bivalve. L'étude présentée ici a permis de mesurer l'impact de la vitesse de courant sur la filtration et la consommation d'oxygène d'une population d'huîtres *C. gigas* soumise à une gamme de vitesse comprise entre 0 et 7,9 cm.s^{-1} .

2.3.2- Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental

Des huîtres triploïdes d'un poids total moyen de $69,53 \pm$ (ET) 7,00 g ont été prélevées sur des parcs ostréicoles dans la baie de Bourgneuf en Vendée (46-47°N, 1-2°O). Après élimination des épibiontes par brossage, elles ont été placées dans un panier (45 individus par panier) à raison d'un panier par bac pour une période d'acclimatation de 24 h à 48 h à la vitesse de courant d'expérimentation, à une température de 16°C et sans apport de nourriture. Le choix de travailler avec des huîtres triploïdes a permis de limiter l'effet de la gamétogenèse et d'éviter tout risque de ponte pendant les expérimentations. Une gamme de température optimale pour la sauvegarde de l'huître en système re-circulé a été définie entre 14°C et 18°C (chapitre 1.2). La température de 16°C a été choisie afin de se situer au milieu de cet intervalle de température et pour optimiser la gestion des coûts d'énergie du système re-circulé. Le courant d'eau appliqué au bac a été induit par un système d'air-lift placé dans le tuyau d'entrée d'eau du bac. Le débit d'air apporté permet de régler la vitesse du courant appliqué au bac. Un étalonnage a préalablement été réalisé à l'aide d'un débitmètre à ultra-son (Fuji, Portaflow). Les mesures ont ensuite

été converties en vitesse de courant théorique par la formule suivante : Vitesse du courant (cm.s^{-1})= (débit mesuré / section mouillée du bac) et un abaque a été établi (Fig. 18). Pour chaque vitesse de courant testée, un panier de 45 huîtres a été placé dans un bac de 90 l fonctionnant en re-circulation et un panier vide a été placé en amont pour limiter l'effet des turbulences lors des expérimentations réalisées aux vitesses importantes (Fig. 27). De l'eau de mer, préalablement passée sur filtre à sable (filtration à $45 \mu\text{m}$) a été apportée à chaque bac avec un débit d'eau de 72 l.h^{-1} , soit un renouvellement horaire de 80 %, et avec une concentration en phytoplancton (*Skeletonema costatum*) de $1,43.10^4 \text{ cellules.ml}^{-1}$. Afin de caractériser les conditions du milieu, deux prélèvements d'eau ont été réalisés en début et en fin de chaque expérimentation, la quantité de seston totale a été évaluée à partir de la filtration de 0,5 l d'eau sur un filtre Fisherbrand de porosité $0,7 \mu\text{m}$ préalablement pesé. Les résidus salins ont été éliminés par un rinçage du filtre avec de l'eau distillée. Le filtre a ensuite été mis à l'étuve à 50°C pendant 24 heures. La pesée du filtre ainsi déshydraté donne la masse des matières en suspension totale. Le filtre a ensuite été placé dans un four à 450°C pendant une heure pour détruire la fraction organique. La pesée du filtre donne la masse du seston minéral. Le seston organique est déduit par différence entre le seston total et la fraction minérale. Afin de quantifier les concentrations en carbone et en hydrogène, des volumes d'eau de 35 à 200 ml ont été filtrés sur filtre Fisherbrand ($0,7 \mu\text{m}$). Les filtres ont ensuite été conservés à -25°C avant leur traitement par analyseur CHN (Flash EA 1112 NC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham). La salle d'expérimentation comprend 12 bacs fonctionnant individuellement en re-circulation. Chaque vitesse a été testée en triplicat et un quatrième bac contenant un panier rempli de coquilles vides a été placé dans les mêmes conditions expérimentales pour servir de témoin de sédimentation. Ainsi, à chaque série d'expérimentation, l'effet de trois vitesses a pu être mesuré. Les expérimentations se déroulent sur une période de 3 heures au cours desquelles des vitesses de courant allant de 0 à $7,9 \text{ cm.s}^{-1}$ ont été testées.



Figure 27. Dispositif de mesures de l'effet du courant sur les réponses physiologiques de 45 huîtres *Crassostrea gigas* disposées dans un panier (a). b : arrivée de l'eau mise en mouvement par l'air-lift ; c : panier vide placé pour limiter l'impact des turbulences dues à l'air-lift lors des mesures des vitesses de courant importantes. d : arrivée d'eau de mer de renouvellement.

Suivi des fonctions physiologiques

Pour toutes les expérimentations, la concentration d'oxygène a été mesurée toutes les 20 minutes à l'aide d'une sonde à membrane WTW à l'extrémité de chaque bac et des mesures de fluorimétrie ont été réalisées avec un fluorimètre (Turner Designs 10-AU) sur un prélèvement d'eau réalisé en sortie de bac. La filtration (F , $l \cdot h^{-1} \cdot \text{individu}^{-1}$) a été calculée selon la relation suivante : $F = [(F_e - F_s) / F_e] \cdot D$ avec F_e = Fluorescence mesurée à la sortie des bacs servant de témoin de sédimentation ; F_s = Fluorescence mesurée à la sortie des bacs contenant les individus ; D = Débit ($l \cdot h^{-1}$). La consommation d'oxygène (CO , $mg \cdot h^{-1} \cdot \text{individu}^{-1}$) a été calculée selon la relation suivante : $CO = (O_e - O_s) \cdot D$ avec O_e = concentration en oxygène à la sortie des bacs de témoin de sédimentation ; O_s = concentration en oxygène à la sortie bacs contenant les individus. Afin de comparer des individus de tailles différentes, les réponses physiologiques ont été standardisées à celle d'un animal d'un gramme de poids sec à l'aide de la formule proposée par Bayne et Newell (1983) : $Y_s = (W_s / W_e)^b \cdot Y_e$, avec Y_s pour la réponse standardisée, W_s le poids standard d'un g, W_e le poids observé, Y_e la réponse observée et b le coefficient d'allométrie. Des coefficients d'allométrie de 0,62 et de 0,74 ont été appliqués respectivement pour la filtration et la consommation d'oxygène (Haure et al., 1998).

En fin d'expérience, le poids sec de la population de chaque panier a été déterminé ($n=45$). Les chairs ont été congelées à -20°C pendant 48 heures puis lyophilisées (CHRIST Alpha 1/6) à -54°C pendant 48 heures et pesées sur une balance Mettler Toledo.

2.3.3- Résultats

Sur l'ensemble des expérimentations, la température et la salinité ont été stables avec respectivement $15,99 \pm$ (ET) $0,39$ °C et $33,51 \pm$ (ET) $1,20$ ‰. La concentration en seston total mesurée sur l'ensemble des expérimentations a été de $11,51 \pm$ (ET) $5,53$ mg.l⁻¹ avec une concentration en matière organique de $3,58 \pm$ (ET) $1,39$ mg.l⁻¹, et une concentration en matière inorganique de $8,21 \pm$ (ET) $4,23$ mg.l⁻¹. La fraction organique du seston total représentait en moyenne 31,1 %, essentiellement composée par l'apport de microalgues *Skeletonema costatum*. La concentration en carbone des matières en suspension mesurée sur l'ensemble des expérimentations a été de $0,59 \pm$ (ET) $0,14$ mg.l⁻¹ et la concentration en azote a été de $0,12 \pm$ (ET) $0,05$ mg.l⁻¹. Le rapport C/N caractérisant la matière en suspension est alors de 4,92. Douze vitesses de courant testées ont montré un effet négatif significatif sur la filtration des huîtres (ANOVA, $p < 0,05$) (Fig. 28). Pour une vitesse de courant nulle, la filtration a été de $5,57 \pm$ (ET) $0,12$ l.h⁻¹.g⁻¹ diminuant jusqu'à $2,98 \pm$ (ET) $0,31$ l.h⁻¹.g⁻¹ pour une vitesse de $7,9$ cm.s⁻¹. La relation entre la vitesse de courant et la filtration des huîtres a été décrite par une relation linéaire significative ($p < 0,05$), caractérisée par un coefficient de détermination de 0,81. Les dimensions du bac de stockage n'ont pas permis de tester des vitesses supérieures en raison de pertes d'eau par débordement et de la limite d'utilisation du système d'air-lift (chapitre 1).

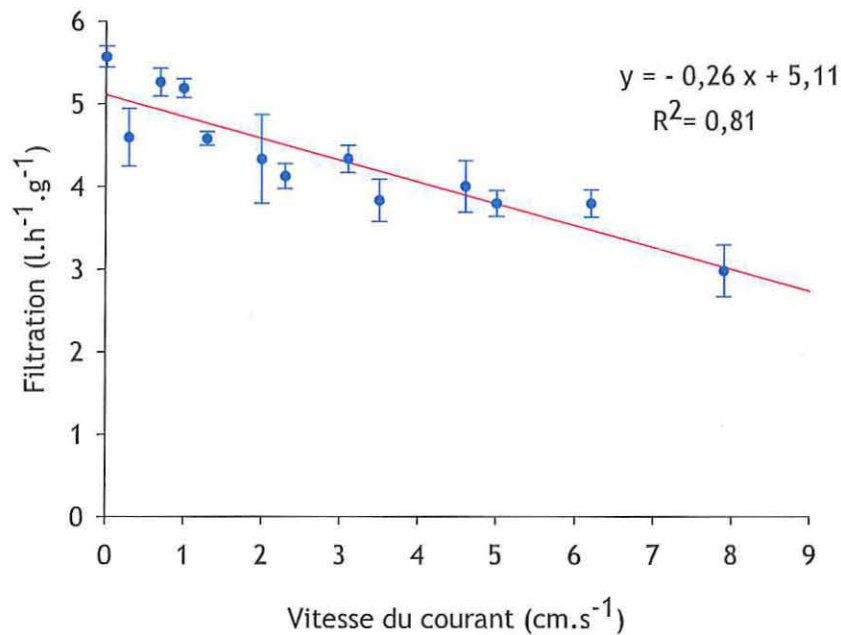


Figure 28. Effet de la vitesse du courant sur la filtration chez l'huître *Crassostrea gigas*. Les barres d'erreurs représentent les écarts types, $n=3$.

Une vitesse de courant croissante a un effet négatif significatif sur la consommation d'oxygène ($p < 0,05$; $R^2 = 0,84$) qui décroît jusqu'à une vitesse de $3,5 \text{ cm.s}^{-1}$, au delà de laquelle elle se stabilise (Fig. 29). La consommation d'oxygène a diminué de $3,31 \pm (\text{ET}) 0,74 \text{ mgO}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ pour une vitesse de courant de $0,3 \text{ cm.s}^{-1}$ à $0,27 \pm (\text{ET}) 0,02 \text{ mgO}_2.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à partir de $3,5 \text{ cm.s}^{-1}$.

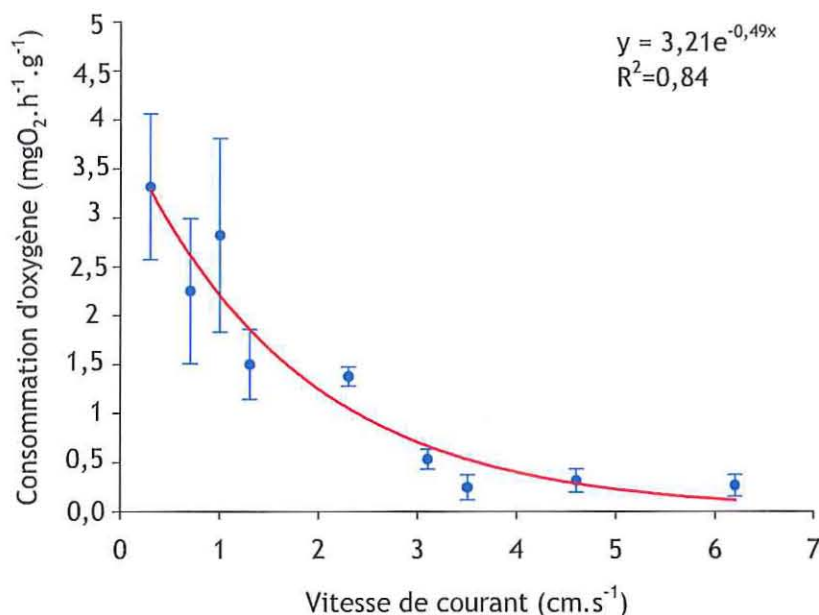


Figure 29. Effet de la vitesse du courant sur la consommation d'oxygène chez l'huître *Crassostrea gigas*. Les barres d'erreurs représentent les écarts types, $n = 3$.

La vitesse de courant mesurée correspond à celle appliquée au bac et calculée par conversion du débit d'eau créée par l'air-lift. Cette vitesse vient s'appliquer à l'ensemble du panier contenant les huîtres, cependant les huîtres situées au milieu du panier ont été soumises à une vitesse de courant supérieure. Une relation entre ces deux vitesses a été établie à partir de l'estimation de la surface de la section correspondant aux interstices entre les huîtres. Cette surface a été obtenue par mesure du volume d'eau déplacé par un panier d'huîtres tel que : $V_p = D / (S_p - (V_h/L))$, avec V_p la vitesse calculée au sein du panier (cm.s^{-1}), D le débit appliqué au circuit ($\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$), S_p la section du panier (cm^2), V_h le volume d'eau déplacé par le panier d'huîtres (cm^3) et L la longueur du panier (cm). La vitesse théorique au sein du panier a été estimée à 1,5 fois celle calculée dans le bac. Ainsi, les vitesses de courant théoriques estimées au milieu du panier ont varié de 2 à 12 cm.s^{-1} (Tableau 4).

Tableau 4. Correspondance entre les vitesses de courant appliquées au bac de stockage (V_b) et celles estimées à l'intérieur d'un panier (V_p).

V_b (cm.s ⁻¹)	1,3	2,3	3,1	3,5	4,6	6,2	7,9
V_p (cm.s ⁻¹)	2,0	3,4	4,7	5,3	6,9	9,4	12,0

2.3.4- Discussion

Les réponses physiologiques de la population d'huîtres ont montré des valeurs particulièrement élevées au cours de cette étude. Ainsi, selon le modèle de Bougrier et al. (1995), la filtration de l'huître à 16°C est de 4,71 l.h⁻¹.g⁻¹ sans considération de vitesse de courant, alors que la filtration mesurée au cours de cette étude a atteint 5,57 ± (ET) 0,12 l.h⁻¹.g⁻¹ sans courant. De même, la consommation d'oxygène selon le modèle de Bougrier et al. (1995) serait de 0,75 mgO₂.h⁻¹.g⁻¹ à 16°C alors qu'une consommation d'oxygène de 3,31 ± 0,74 mgO₂.h⁻¹.g⁻¹ a été mesurée à la vitesse de courant la plus faible. Cette valeur reste élevée au regard des consommations d'oxygène mentionnées dans la littérature avec 0,8 mgO₂.h⁻¹.g⁻¹ à 18°C (Mao et al., 2006), 1,33 mgO₂.h⁻¹.g⁻¹ à 19°C (Haure et al., 2003) et 1,55 mgO₂.h⁻¹.g⁻¹ à 20°C (Bayne, 2009). L'utilisation d'huîtres triploïdes ne peut expliquer ces différences, puisqu'il a été démontré que le niveau de ploïdie n'a pas d'effet significatif sur la consommation d'oxygène et la filtration (Shpigel et al., 1992; Kesarcodi-Watson et al., 2001a). La concentration en seston de 11,51 ± (ET) 5,53 mg.l⁻¹ a représenté un faible niveau de turbidité, sans impact sur la filtration des huîtres (Barillé et al., 1997b). De même, la qualité de la nourriture décrite n'a pas été une contrainte pour les huîtres, le rapport C/N proche de 5 illustre une dominance de carbone d'origine vivante correspondant aux apports de phytoplancton non dégradé (Happ et al., 1977; Wilson-Ormond et al., 1997). Il reste difficile d'expliquer ces fortes valeurs et des variations de la taille des branchies (Barillé et al., 2000; Dutertre et al., 2007) ou des différences génétiques au sein même de l'espèce peuvent être avancés (Ren et al., 2000).

La filtration de l'huître décroît linéairement avec une augmentation de la vitesse du courant de 0 à 7,9 cm.s⁻¹ alors que la consommation d'oxygène a montré une décroissance linéaire jusqu'à une vitesse de 3,5 cm.s⁻¹ puis elle s'est stabilisée. Cette stabilisation peut être expliquée par un biais expérimental lié à l'utilisation du système d'air-lift. Pour obtenir une vitesse de courant de 3,5 cm.s⁻¹, il faut appliquer un débit d'air de 40 l.min⁻¹ qui a créé des turbulences importantes (Fig. 30), ramenant systématiquement la concentration en oxygène de l'eau à des valeurs proches de la saturation. Ce

phénomène a probablement masqué une partie de la consommation réelle, sous-estimant ainsi les valeurs mesurées.



Figure 30. Turbulences engendrées par le système d'air-lift réglé à un débit de 40 l.min⁻¹.

Les résultats obtenus à l'occasion de cette étude ont montré que plus la vitesse de courant appliquée au système re-circulé est importante, plus l'huître ralentit ses fonctions d'alimentation et de respiration. Ces résultats corroborent majoritairement les observations mentionnées dans la littérature et les phénomènes qui expliquent l'impact de la vitesse du courant sur la croissance des bivalves ont surtout été étudiés chez la coquille Saint-Jacques. Ainsi, Kirby-Smith (1972) et Eckman et al. (1989) ont observé une relation négative entre la vitesse de courant et la croissance d'*Argopecten irradians concentricus* entre 0,21 cm.s⁻¹ et 17 cm.s⁻¹ et Wildish et al. (1987) ont aussi démontré un impact négatif de la vitesse de courant sur la croissance et la filtration chez *Placopecten magellanicus* dans une gamme de vitesse allant de 0 à 20 cm.s⁻¹. L'effet de la vitesse du courant a été également étudié chez la moule *Mytilus edulis* (Wildish et Miyares, 1990), la palourde *Ruditapes decussatus* (Sobral et Widdows, 2000) et le clam *Mercenaria mercenaria* (Grizzle et Morin, 1989) alors que très peu d'auteurs ont abordé le cas de l'huître. Seuls Grizzle et al. (1992) ont démontré l'effet négatif de la vitesse du courant sur la croissance de *Crassostrea virginica* à l'occasion d'une étude comparant la réaction de bivalves dotés ou dépourvus de siphons. Wilson-Ormond et al. (1997) ont proposé une analyse de l'effet de la densité et la quantité de nourriture en fonction du flux d'eau à micro-échelle sur une population d'huîtres *C. virginica*. C'est une approche multifactorielle qui est préférée pour étudier au mieux cette problématique (Eckman et al., 1989; Grizzle et Morin, 1989). En effet, plusieurs facteurs interagissent et doivent être pris en compte pour comprendre ce phénomène. Plusieurs études, qui n'abordent d'ailleurs jamais l'impact de la vitesse du courant sur la consommation d'oxygène, ont montré l'importance de corrélérer la vitesse du courant avec la concentration en phytoplancton du milieu en raison d'un effet

concurrentiel (Grizzle et Morin, 1989). Ainsi, à une faible vitesse de courant, le même volume d'eau peu avoir été re-filtré plusieurs fois par les bivalves entraînant une déplétion en nourriture (Sobral, Widdows, 2000; Wilson-Ormond et al., 1997) et une baisse de la croissance des individus. Au sein d'une population, la position de l'individu en amont ou en aval favorisera ou non son accès à la nourriture (Wilson-Ormond et al., 1997) et le flux d'eau minimal à apporter est alors fonction de la densité de la population et la quantité de nourriture (Kirby-Smith, 1972; Wildish et Kristmanson, 1985; Wilson-Ormond et al., 1997). La disponibilité en nourriture est alors dépendante de l'interaction de trois éléments, la quantité de nourriture présente dans la colonne d'eau, la vitesse du courant et la densité de la population (Wilson-Ormond et al., 1997). Si la quantité de nourriture apportée est cruciale, sa qualité est aussi importante même si elle reste indépendante de la vitesse du courant. Elle joue un impact non négligeable sur la croissance des individus (Wilson-Ormond et al., 1997). Wildish et al. (1992) ont aussi démontré un effet significatif de la concentration en phytoplancton sur la filtration chez *Placopecten magellanicus*. Pour mesurer l'impact de la vitesse du courant, les mesures de filtration et de croissance des individus doivent être alors réalisées en s'assurant que la concentration en phytoplancton ne soit pas un facteur limitant, par un apport suffisant de phytoplancton ou en travaillant avec une densité d'individus limitée (Wildish et al., 1987; Wildish et Miyares, 1990). Ce problème a d'ailleurs été rencontré par Wildish et Kristmanson (1985) qui ont observé un effet positif de la vitesse de courant sur la croissance de la moule *Mytilus edulis* sur une gamme de 0,10 à 3,89 cm.s⁻¹, lié à la diminution de l'effet de déplétion en nourriture. Par la suite, Wildish et Miyares (1990) et Denis et al. (1999) ont montré l'effet négatif de la vitesse de courant sur la filtration respectivement des moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* pour une gamme de vitesse allant de 6 à 30 cm.s⁻¹. Mais cette phase de croissance positivement corrélée avec la vitesse du courant a aussi été observée chez d'autres auteurs et sur d'autres espèces. Wildish et al. (1992) ont identifié chez *Placopecten magellanicus* une vitesse de courant optimisant la filtration, jusqu'à une valeur limite au-delà de laquelle la filtration chute. Or, nos résultats n'ont pas permis de observer cette phase, l'effet déplétion à petite vitesse de courant n'a pas eu lieu, la concentration en phytoplancton apportée pour une population de 45 huîtres semble avoir été suffisante et la filtration a subi l'impact de phénomènes autres dès les plus faibles vitesses. Parmi les facteurs qui ont été avancés pour expliquer cet effet négatif de la vitesse du courant sur la filtration, et à plus long terme sur la croissance des bivalves, Wildish et Kristmanson (1985) ont mentionné l'influence d'un flux turbulent, par opposition à un flux laminaire, sur l'homogénéisation du seston, mais ils ont précisé que ce facteur intervenait, dans leurs conditions expérimentales, pour des vitesses de courant inférieures à 3 cm.s⁻¹. Ekman et al. (1989) ont définitivement écarté l'influence de ce

facteur, mais ils ont montré l'impact significatif de l'orientation de juvéniles d'*Argopecten irradians concentricus* par rapport à la direction du flux, avec leur face antérieure préférentiellement orientée face au flux, les individus ont alors été soumis ainsi à des conditions hydrodynamiques locales favorables (Wildish et al., 1987). La différence de pression subie entre l'ouverture inhalante et exhalante du bivalve a été avancé comme explication (Wildish et al., 1987). Une pression trop importante au niveau de la partie inhalante du bivalve perturberait l'activité ciliaire entraînant alors une diminution de l'activité de pompage chez la moule pour des vitesses supérieures à 25 cm.s^{-1} (Eckman et al., 1989; Wildish et Miyares, 1990). Selon Grizzle et al. (1992) une croissance individuelle maximale pourrait être attendue pour une vitesse de courant approchant la vitesse de pompage du bivalve. La comparaison entre le comportement du clam *Mercenaria mercenaria*, bivalve fouisseur et donc doté de siphons, et de l'huître *Crassostrea virginica*, bivalve sessile sans siphon, a montré que les premiers disposent de siphons inhalants et exhalants proches et donc exposés à la même vitesse de courant ne subissant ainsi pas de différence de pression contrairement aux huîtres (Grizzle et al., 1992). Par ailleurs, chez un bivalve disposant de siphons, le diamètre des siphons et donc la surface sensible à la pression est inférieure à la partie inhalante d'un bivalve sans siphon permettant une meilleure gestion de la pression ambiante. La capacité de *Mercenaria mercenaria* à expulser le volume d'eau exhalant à une hauteur différente de celle où s'effectue le pompage dans la colonne d'eau, limite aussi le risque de repompage d'un même volume d'eau épurée des particules de nourriture (Sobral et Widdows, 2000). Ces stratégies permettent alors aux bivalves siphonnés une filtration plus importante et une meilleure croissance que les bivalves non fouisseurs (Sobral et Widdows, 2000). L'incapacité des huîtres et des moules à se déplacer pour bénéficier de meilleures conditions hydrodynamiques renforce cette différence, rendant les bivalves non fouisseurs plus sensibles au manque de nourriture en cas de faible débit d'eau et donc de vitesse de courant insuffisante, ou en cas de pression trop forte lors de vitesse importante. Ces différents travaux ont permis d'expliquer que les bivalves siphonnés ont montré une corrélation positive entre leur croissance et la vitesse de courant, à la différence des huîtres, des coquilles Saint-Jacques et des moules (Grizzle et Morin, 1989; Grizzle et al., 1992). C'est donc surtout un effet mécanique qui serait alors à l'origine de la diminution de la filtration en cas de vitesse de courant croissante allant jusqu'à un arrêt de la filtration et une fermeture des valves des individus (Wildish et Kristmanson, 1985; Wilson-Ormond et al., 1997). Ce phénomène limite ainsi la prise de nourriture et la consommation en oxygène et oblige le bivalve à réduire son métabolisme (Riisgård et al., 2003). Les différentes réponses des bivalves à une augmentation de la vitesse de courant révèlent leur capacité d'adaptation physiologique (Denis et al., 1999; Eckman et al., 1989; Wildish

et al., 1992) avec une régulation de la filtration et la fermeture des valves (Riisgård et al., 2003). Ce phénomène serait tout autant développé pour des huîtres organisées en récif et soumises à de forts courants de marée (Kirby-Smith, 1972) pouvant aller jusqu'à 100 cm.s^{-1} (Wildish et Kristmanson, 1988). D'autres paramètres ont pu interférer avec la vitesse de courant lors des mesures de filtration et plus largement de croissance. L'augmentation de la vitesse de courant induit une remise en suspension du seston et une augmentation de la turbidité (Sobral et Widdows, 2000). Les effets de la turbidité sur la filtration ont largement été étudiés chez l'huître (Barillé et al., 1997b) avec une filtration perturbée partir de 60 mg.l^{-1} de matière en suspension (Soletchnik et al., 1991; Barillé et Prou, 1993) et une saturation de la filtration à 192 mg.l^{-1} (Barillé et Prou, 1993; Barillé et al., 1997a). Enfin la méthodologie utilisée pour mesurer la filtration peut aussi être une source de variations, chaque méthode ayant ses avantages et ses inconvénients (Wildish et Kristmanson, 1988). Plusieurs études ont été réalisées en laboratoire à l'aide d'un dispositif utilisant des tuyaux parcourus par un courant d'eau à débit constant, initié par une différence de hauteur d'eau et un apport en nourriture composé de seston issu du milieu naturel (Kirby-Smith, 1972; Wildish et Kristmanson, 1985; Wildish et al., 1987; Eckman et al., 1989; Grizzle et al., 1992). Si ce dispositif a permis de tester l'effet du seston naturel, il peut présenter un risque de déplétion par une absence de gestion des concentrations algales à faible vitesse de courant, avec un risque de mesurer davantage un effet déplétion qu'un véritable impact de la vitesse de courant (Riisgård, 2001). D'autres auteurs ont pris en compte ce biais et ont travaillé avec du phytoplancton de culture permettant de gérer la concentration et la vitesse du courant a été créée par une hélice assurant ainsi une indépendance des deux paramètres (Wildish et Miyares, 1990; Wildish et al., 1992; Denis et al., 1999; Sobral et Widdows, 2000). Pour l'étude présentée ici, le choix de mesurer l'effet de la vitesse de courant sur les réponses physiologiques dans le système re-circulé lui-même a permis de travailler en conditions réelles, l'indépendance de l'apport du phytoplancton et du courant a permis d'éviter une déplétion du milieu. Cependant, les dimensions importantes du bac et le calcul de la vitesse à partir d'un débit ont pu être à l'origine d'approximations. La consommation d'oxygène n'a pas été mentionnée par les auteurs cités ici et aucune étude n'a fait état de l'impact de la vitesse du courant sur cette réponse physiologique. Nos mesures ont montré une évolution de la consommation d'oxygène similaire à celle de la filtration jusqu'à $3,5 \text{ cm.s}^{-1}$. L'influence d'un effet mécanique de la vitesse du courant sur la consommation d'oxygène est donc très probable. La pression subie par les branchies augmenterait avec la vitesse, limitant alors l'absorption de l'oxygène, avec pour conséquence une consommation réduite par l'huître.

2.3.5- Conclusion

Les résultats présentés dans cette étude ont montré l'effet significatif de la vitesse du courant sur les réponses physiologiques de l'huître *Crassostrea gigas*. Cette influence n'avait jusqu'ici jamais été étudiée pour cette espèce et reste en accord avec l'ensemble des résultats observés sur les bivalves suspensivores. La pression croissante induite par une vitesse de courant en augmentation aurait un effet mécanique sur les structures ciliaires responsables de la filtration et le fonctionnement de la branchie (Barillé, 1994; Beninger et Dufour, 1996; Beninger et al., 2005) et le même phénomène serait aussi probablement à l'origine des résultats observés pour la consommation d'oxygène. Les mesures effectuées concernent une filtration estimée sur 3 heures et une extrapolation à une croissance, où un maintien du poids des individus, sur une période de cinq semaines permettrait de déterminer précisément la vitesse de courant à appliquer au système re-circulé. Cependant, la vitesse de courant n'agit pas uniquement sur les huîtres mais sur l'ensemble du système re-circulé. Elle influence le transport des particules en suspensions, principalement les biodépôts, et l'activité de la population bactérienne impliquée dans le traitement des matières azotées dissoutes. L'effet de la vitesse de courant sur la nitrification a peu été étudié dans le cadre des systèmes re-circulés, mais ce processus est crucial pour la conservation de la qualité de l'eau. La transformation de l'azote ammoniacal excrété par les huîtres par l'activité de nitrification réalisée par la population bactérienne nécessite alors d'être étudiée et prise en compte pour être intégrée à une analyse globale du fonctionnement du système re-circulé. Une modélisation de l'ensemble des paramètres et des réponses physiologiques de l'huître, où la vitesse du courant serait une variable forçante, permettrait de simuler les conditions optimales nécessaires pour atteindre les objectifs de conservation des huîtres.

CHAPITRE 3 : Analyse des flux d'azote et application au système re-circulé à l'aide de la modélisation

3.1- Introduction

Les matières azotées dissoutes ont un rôle important dans la gestion de la qualité de l'eau en système re-circulé (Timmons et Ebeling, 2007). L'identification des sources et des processus de transformation est nécessaire pour un contrôle des flux d'azote. La quantification de l'azote ammoniacal total ($N-NH_4^+/NH_3$), des nitrites et des nitrates font l'objet d'un suivi particulier afin que les concentrations n'atteignent pas les seuils de toxicité des bivalves. Le système re-circulé est caractérisé par une simplification des flux en azote en comparaison avec un écosystème en milieu naturel. En effet, l'absence de sédiment évite toute interaction avec les communautés bactériennes impliquées dans l'oxydation des composés organiques et la régénération des nutriments (Herbert, 1999). La fixation de l'azote par la production primaire est exclue en raison de l'absence de croissance de végétaux, assurée par une mise à l'obscurité du système re-circulé. La principale source d'azote identifiée est issue de l'excrétion azotée des huîtres dont l'importance est liée aux conditions environnementales. L'excrétion azotée a alors été estimée en fonction de deux paramètres déterminants, la quantité de nourriture apportée et la température. La loi d'excrétion établie a permis de quantifier le flux majeur d'entrée d'azote du système alors que le principal processus de transformation de l'azote ammoniacal en nitrate est la nitrification. Le choix de ne pas équiper le système re-circulé d'un filtre biologique a nécessité de comprendre le rôle des populations bactériennes associées aux huîtres dans ce processus. Une estimation du taux de nitrification potentiel lié aux différentes parties du bivalve (coquille et chair) a permis de quantifier le flux de transformation de l'azote ammoniacal total en nitrate.

La dernière partie de ce travail de thèse a été consacrée à la modélisation de l'ensemble des processus intervenant dans le système re-circulé. Ce modèle permet d'associer les réponses physiologiques des huîtres, filtration, respiration et excrétion azotée et les différents flux d'azote afin d'optimiser les conditions de sauvegarde et d'assurer le maintien de la qualité de l'eau du système. Cette modélisation a permis de simuler les conditions optimales et les limites de la sauvegarde des huîtres en système re-circulé pour une transposition future de nos prototypes de recherche au milieu professionnel.

3.2- Excrétion ammoniacale et taux de nitrification potentiel chez l'huître Pacifique *Crassostrea gigas* : application à un système re-circulé

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise au journal « Aquaculture » et ils sont présentés en pages suivantes.

Ammonia excretion and potential nitrification rates of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: application to a recirculation tank

Florence Buzin^{1,2*}, Béatrice Dupuy¹, Sébastien Lefebvre³, Laurent Barillé², Joël Haure¹

¹ IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Polder des Champs, Bouin, F-85230 France

² Université de Nantes, Mer Molécules Santé EA 2160, Faculté des Sciences et des Techniques, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, Nantes, F-44322 France

³ Université de Lille 1 Sciences et Technologies, CNRS, UMR 8187 Laboratoire d'Océanographie et de Géoscience, Wimereux Marine Station, 28 av. Foch, Wimereux, F-62930 France

* corresponding author:

TEL: (33) 02 5168 89 41; FAX: (33) 02 51 49 34 12,

EMAIL: florence.buzin@ifremer.fr

3.2.1- Abstract

In response to the closure of shellfish production sites due to crises in relation to water quality crisis, land-based recirculating systems could be used to store bivalves during these difficult periods. In such systems, the food supply and the water temperature are two variables that could influence the bivalve excretion rate of ammonia whose concentration may become critical for the water quality. In this study, we estimated the Total Ammonia Nitrogen (TAN, $\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3$) excretion of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* over a range of temperatures and food levels. We further investigated whether the bacterial population associated with the oysters could act as a natural biofilter by measuring of the Potential Nitrification Rate (PNR) of the shell and the soft tissue. The TAN excretion rate varied significantly with temperature and food levels and represented a mean excretion rate of $0.53 \pm 0.18 \mu\text{mol N.h}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$. The PNRs were significantly different depending on the shell surface considered with a PNR of $0.42 \pm 0.11 \text{ nmol N.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for the internal part, $0.96 \pm 0.15 \text{ nmol N.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for the external part of the shell and $59 \text{ nmol N.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ for the soft-tissues. The extrapolation of these results to an oyster stock of 180 kg kept in a recirculating tank showed that a total surface of 46.6 m^2 was available for the nitrifying bacterial population. The key role played by this bacterial population colonizing the bivalve shell suggest that such an oyster stock could be stored in a recirculating tank without the addition of a biofilter, which would represent a real economical advantage.

3.2.2- Introduction

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* represents a large part of the French mollusc production with 112,760 tons in 2007 (FAO, 2009) but the occurrence of production-site closures due to water quality crises is now destabilizing this economic activity more frequently. To deal with this problem, risk management must be seriously taken into account and research must be carried out to develop sustainable solutions. One option is to use recirculating systems on land to store bivalves during a water crises. Usually, these systems are used for the growing-on of aquatic organisms in a controlled environment, with the objective of high economic productivity per unit volume of rearing space (Timmons et Ebeling, 2007). This process requires the management of multiple water quality variables (Losordo et al., 1999; Frias et Segovia, 2010; Martins et al., 2010). However, although this technique is well developed in fish farming (Timmons et Ebeling, 2007), the majority of the information cannot be directly applied to bivalves.

Oysters stored in a recirculating system for a given period require a food supply to avoid weight loss and to maintain their quality. Food level and temperature represent two key variables for the oyster energy budget (Alunno-Bruscia et al., 2011), controlling energy acquisition, excretion and metabolic expenditure. Although ammonia fluxes are assumed to be only a minor component of the oyster energy budget (Barillé et al., 1997a; Kesarcodi-Watson et al., 2001 a,b) they can become critical in a recirculating or depuration system (Boulter et Wilson, 1998). The general trend for bivalves is an increasing ammonia excretion with increasing temperature (Emerson, 1969; Bayne et Scullard, 1977; Shpigel et al., 1992; Boulter et Wilson, 1998) while excretion is negatively related to food level in juvenile Sydney rock oysters (Kesarcodi-Watson et al., 2001a), with no effect on adults. However, there are only a few fragmentary studies on the Pacific oyster *C. gigas* and these do not consider both parameters (Shpigel et al., 1992; Boulter et Wilson, 1998). The effect of temperature and food level on the ammonia excretion rate should therefore be investigated in *C. gigas* since most of the literature relates to other species.

Although, overall, molluscs appear rather tolerant to high ammonia concentration (Boardman et al., 2004), various effects of ammonia accumulation have been reported such as cellular stress (Keppler, 2007), disruption of the filtration activity (Epifanio et Srna, 1975) and a significant decrease in growth (Colt et Armstrong, 1981). Among the different forms of nitrogen, Total Ammonia Nitrogen (TAN for $\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3$) and nitrite are known to be toxic at high concentration (Colt et Armstrong, 1981) and remain a major obstacle to conserving good water quality. For nitrites, the first disruption were recorded above the rather high concentration of $2.10^{-2} \text{ NO}_2^- \text{ mol.l}^{-1}$ for *Crassostrea virginica* (Epifanio et Srna, 1975) and this nitrogen form remains an intermediate stage when the nitrification is efficient. For a recirculating tank, the water renewal should be considered as minimal and is not the solution for a significant TAN elimination. On the other hand, nitrification is usually the process used in closed systems to reduce TAN concentration with the use of a biofilter (Losordo et al., 1999; Chen et al., 2006; Aslan et Dahabb, 2008). In this work, we investigated whether the bacterial population associated with the oysters could act as a natural biofilter. In fact, Welsh and Castadelli (2004) have shown that the presence of a bacterial population associated with the shells and tissue of filter-feeding bivalves could have a significant nitrifying activity but this has not yet been investigated in the oyster *C. gigas*. The distribution of the bacterial population between the shell and the tissue of oysters and its activity could provide an estimation of the Potential Nitrification Rate (PNR) of the bivalve. With these data, we tried to establish a nitrogen budget at the level of a population of oysters stored in a recirculating tank, and to see if the efficiency of nitrification by the bacterial population harboured by the oysters could compensate the TAN input linked to their dissolved excretion.

Two experiments were set up to assess the ammonia fluxes. First, we estimated TAN excretion of the oyster over a range of temperatures and food levels. The second experiment measured the PNR of the two main parts of the bivalve, the shell and the tissue. These results were used to predict the TAN variations in a recirculating tank.

3.2.3- Material and methods

3.2.3.1. TAN excretion measurement

Biological material and experimental set-up

Experiments were carried out in 2009 at the IFREMER experimental station of Bouin (France) located in a polder used by oyster producers. It was decided to test the influence of three temperatures, 13°C, 16°C and 22°C, crossed with three food levels, on oyster ammonia excretion (Table 5). The temperature ranges were previously determined by studying the oyster filtration activity and considering the economic cost of temperature management in a recirculating system. The food levels were estimated by a Scope For Growth model (Méléder et al., 2001) at a concentration such that oysters stored for 5 weeks would maintain their dry weight (DW). Oysters were collected for each experiment from nearby the Bourgneuf Bay on the French Atlantic coast (46-47°N, 1-2°W). Triploid oysters were chosen to avoid gametogenesis and spawning during the experiments. They were cleaned of epibionts by brushing, placed in a 60-litre tanks and acclimated for 5 days without food at the temperature corresponding to the experiment. The water was previously filtered on a sand filter at 50 µm and the open flow was 250 l.h⁻¹.

Feeding stage

During the second stage, the oysters were distributed in 3 tanks and conditioned for 5 days at the experimental temperature. The first tank (C1) was not fed, the second one (C2) was fed with the diatom *Skeletonema costatum*, at a concentration of 10⁶ cells.ml⁻¹ and distributed with a flow rate of 1.5 l.h⁻¹, and the third tank (C3) was fed with the same algal culture with a flow rate of 12.5 l.h⁻¹. This microalgae has been successfully used in large-scale units to grow and fatten Pacific oysters (Méléder et al., 2001). Twice a day, a water sample was taken from every tank to assess the food levels. The water was filtered on a Whatman GF/C filter (0.7µm) and the carbon (C) concentration was subsequently

measured using a CHN analyser (Flash EA 1112 NC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham).

Excretion measurement

The ammonia excretion was measured on six oysters randomly chosen for each condition. Each oyster was placed individually in a 2-litre beaker filled with filtered seawater (0.22 µm). Two empty shells were used as the control. All the beakers were placed in a tank equipped with a heat pump to ensure the thermo-regulation of the water. The beakers were covered to avoid evaporation and to maintain a stable salinity. Oxygen saturation was ensured by the aeration of each beaker. During the experiment, the oysters were starved without water renewal and the bacterial activity was neutralized by the addition of 10 mg.l⁻¹ oxolinic acid to avoid a loss of TAN (N-NH₄⁺/NH₃) by the nitrification process. The TAN concentration was measured twice a day for 8 days by the indo-phenol blue method (Solorzano, 1969). At the end of the experiment, the dry weight (DW) was determined for each individual by freezing the flesh at -20°C for 48 hours followed by a lyophilization (CHRIST Alpha 1/6) at -54°C for 48 hours and then by weighing on a Mettler Toledo balance. The C and N content of the tissues were determined on the same samples using the CHN analyser.

The TAN production estimated for each oyster was standardized using the allometric relationship established by Bayne and Newell (1983), with an allometric coefficient of 0.6 (Bayne et Svensson, 2006). According to Van Haren and Kooijman (1993), the excretion rate does not depend on the whole body of the oyster but should be related to the soma. For this reason, the excretion rate was standardized to an animal of 1 g of dry weight of soma (DW_{soma}) using the following formula $Y_s = (W_s / W_e)^b \cdot Y_e$ where Y_s is the standardized rate, W_s the standard weight (here 1 g DW_{soma}), W_e the observed weight, Y_e the observed rate and b the allometric coefficient (here 0.6, see above).

The calculation of the weight of the soma was based on the relation between the stoichiometric C/N distribution and the biochemical composition of the tissue (Gnaiger et Bitterlich, 1984). The carbon content of a bivalve tissue is well correlated to glycogen content and the correspondence between protein and nitrogen composition has been demonstrated (Rodhouse et al., 1984; Hawkins et al., 1985; Smaal et Vonck, 1997). According to the observations of Marin Leal et al. (2008) an oyster with a minimum reserve presents a C/N ratio of *ca.* 5 adjusted to 4 in this study. The soma dry weight (DW_{soma}) was thus calculated as follows: $DW_{soma} = DW_{total} - [(C/N) - 4] / C/N \cdot DW_{total}$

3.2.3.2. Potential nitrification rates

This experiment was inspired by the protocol proposed by Welsh and Castadelli (2004) to measure the Potential Nitrification Rate (PNR) of different parts of a mollusc, expressed as a flux per unit time. In our experiment, the shells and the flesh of nine oysters (mean total weight (\pm SD) of 59.35 ± 7.80 g) were distributed in 9 beakers. These oysters had been kept in the recirculating system for several days to enable the bacterial population to be fully efficient. Three shells per beaker (in triplicate), were used to measure the PNR of the internal shell surface, three other shells per beaker to measure the external shell surface (in triplicate) and three flesh per beaker (in triplicate) were used to measure the PNR associated with the soft tissue. The external or the internal parts of half of the shells not being considered were sterilized with an absorbent paper soaked in ethanol and then rinsed to eliminate the residual ethanol. A beaker without shell or flesh was used as a control. All the beakers were filled with 2 litres of filtered seawater ($0.22 \mu\text{m}$) and maintained at 16°C with aeration. They were covered to avoid a change in the salinity by evaporation. Each beaker was supplemented with 0.5 mM ammonium chloride as a nitrification substrate and 10 mM sodium chlorate (not a limiting concentration in order to provide maximum rates) was added to inhibit the oxidation of nitrite (Belser et Mays, 1980). The nitrite concentration was measured once a day using the Greiss reaction (Bendschneider et Robinson, 1952) and the nitrate concentration was measured to check the efficiency of the inhibitor. The analyses of NO_3^- were performed using the MerKoquant Kit[®] based on the resorcin reaction. In order to measure the total surface area of an oyster shell and to calculate the PNR relative to this surface, a sheet of aluminium was applied to each shell, weighed and the result converted into a surface area (cm^2) using a pre-established relationship (Welsh et Castadelli, 2004). Finally, the DW of the oysters was determined as described previously.

3.2.3.3. Statistical analysis

Statgraphics Plus Centurion XV.I software (Sigma Plus, Paris, France) was used to check the normality and homoscedasticity of data distributions and for subsequent statistical analysis. Where appropriate, Student-Newman-Keuls (SNK) tests were then carried out *a posteriori*. A two-way ANOVA was performed to assess the significance of food and temperature conditions on oyster ammonia excretion. A stepwise non-linear regression was subsequently applied to model ammonia excretion according to the two variables. For the second experiment, a t-test was performed to compare the PNR of the internal and the external surface of the shell.

3.2.4- Results

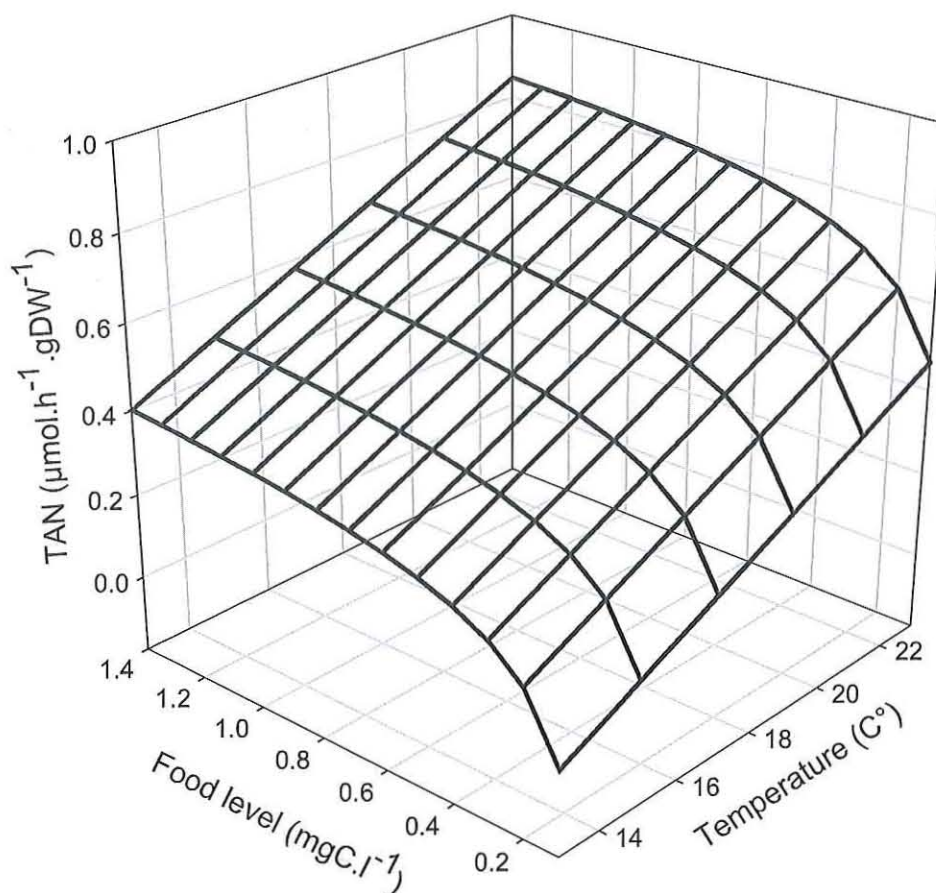
3.2.4.1. TAN excretion measurement

The food levels in the experimental tanks were assessed for each condition (Table 5) with the carbon concentration corresponding to the supplied microalgae (*Skeletonema costatum*). Analysis of variance indicated that each condition was significantly different from every other one (ANOVA, $p < 0.05$; SNK test, $p < 0.05$). The mean C/N ratio of the oysters was 5.92 corresponding to individuals with a low level of reserves. This was confirmed by the estimation of the weight of the soma which represented, on average, 85% of the total DW (Table 5).

Tableau 5. Summary of the experimental conditions tested for the excretion measurement of *Crassostrea gigas*. Mean carbon concentrations (as food level descriptors) are provided with their standard deviation (SD) ($n=3$). For the oyster biometry, all variables are given with means and SD ($n=53$). C= carbon; N= nitrogen; DW= dry weight.

Food condition	Food level (mgC.l ⁻¹)	Temperature (°C)
C1	0.18 ± 0.04	13, 16, 22
C2	0.44 ± 0.04	13, 16, 22
C3	1.38 ± 0.27	13, 16, 22
Oyster biometry		
C/N	Total DW (g)	Soma DW (g)
5.92 ± 0.63	1.82 ± 0.53	1.52 ± 0.37

The TAN excretion of the Pacific oyster varied between 0.02 $\mu\text{mol TAN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ DW_{soma} at 13°C to 0.85 $\mu\text{mol TAN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ DW_{soma} at 22°C with the highest food level (expressed as carbon), with a mean excretion rate of $0.53 \pm 0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ whatever the conditions. The oyster TAN excretion rate was significantly influenced by temperature and food level (two-way ANOVA, Table 6), without significant interaction of both variables. The smaller P-value observed with temperature indicates a stronger effect of this factor on the physiological rate. A model of the TAN excretion rate of Pacific oyster was then established according to temperature and food concentration (mgC.l⁻¹)(Fig.31) ($p < 0.05$; $r^2 = 0.54$): $\text{TAN} = 0.044 * \text{Temperature} - (0.207 / \text{Food}^{0.433})$



$$\text{TAN} = 0.044 * \text{Temperature} - (0.207 / \text{Food level}^{0.433})$$

Figure 31. Effect of temperature and food level (with carbon concentration as the descriptor) on the Total Ammonia Nitrogen (TAN) excretion rate of the oyster *Crassostrea gigas*. The physiological rate was standardized to the dry weight of soma (DW_{soma}) (see Materials and Methods) $p < 0.05$; $r^2 = 0.54$)

Tableau 6. Results of a two-way ANOVA on the effect of temperature and food on the excretion rate of the oyster *Crassostrea gigas*. P= probability.

ANOVA	Sum of squares	Df	Mean squares	F value	P value
Temperature	1.34	2	0.67	16.4	<0.001
Food	0.32	2	0.16	3.9	0.028
Interaction	0.18	4	0.04	1.1	0.366
Residual	1.35	33	0.04		

3.2.4.2. Potential nitrification rates

The inhibition of the oxidation of nitrite into nitrate was successfully validated by a concentration of nitrate which did not change during the experiment whatever the conditions (one-way ANOVA, $F = 0.52$, $p = 0.84$) with a mean value of $33.72 \pm (\text{SD}) 6.24 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Nitrite was accumulated linearly during 40 hours for the external and the internal surfaces of the shell (Fig.32). The nitrite concentration was always higher for the external shell surface suggesting a more efficient nitrification process. The PNR was estimated by the slopes of each linear regression which showed a significantly higher flux for the external surface compared to the internal surface (t-test, $p < 0.05$). For the PNR experiment, the mean shell surface areas of oysters (total weight of $59.2 \pm 6.6 \text{ g}$ ($\pm \text{SD}$)) was $73.63 \pm 6.14 \text{ cm}^2$ for the internal surface and $102.10 \pm 8.14 \text{ cm}^2$ for the external surface. The PNR measured for the internal surface was $0.42 \pm 0.11 \text{ nmol N.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and $0.96 \pm 0.15 \text{ nmol N.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for the external surface of the shell.

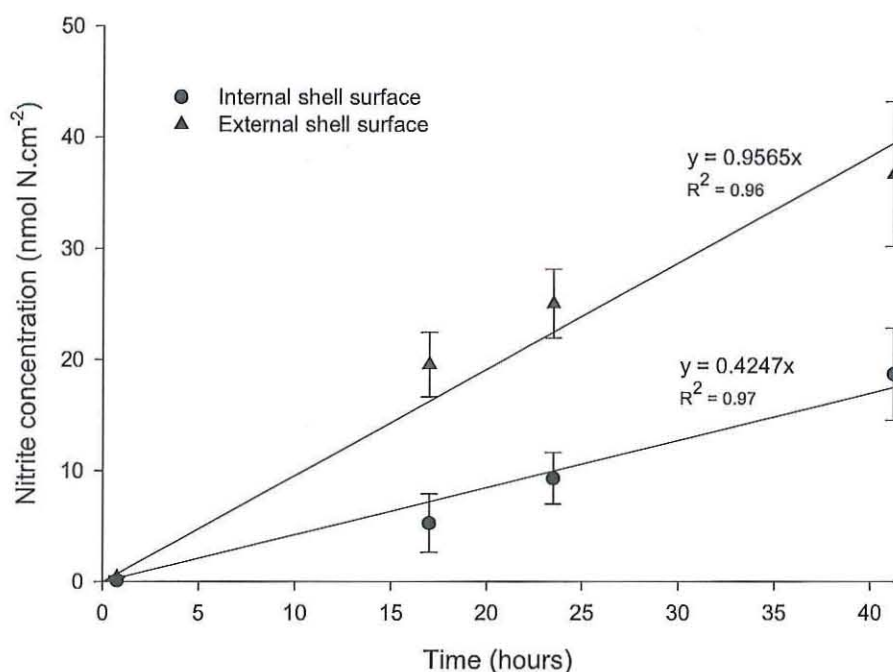


Figure 32. Estimation of the Potential Nitrification Rates (PNR) of the bacterial population colonizing the oyster shell. Nitrite accumulation is expressed per unit of the internal (●) and the external (▲) shell surface area (cm^2). Each point is the mean value and error bars represent standard deviations ($n=3$).

For the flesh, the nitrite accumulation first presented a lag phase of 17 hours and then increased linearly (Fig.33) with a PNR of $59 \text{ nmol N.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (calculated on the linear phase).

The daily PNR relative to the external surface represented $23.04 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{day}^{-1}$ and $10.08 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{day}^{-1}$ for the internal surface. To compare these different sources of nitrification (shell vs. flesh), data were expressed at the level of an individual. The PNR linked to the internal surface of the shell represented 22 % of the total flux ($742.19 \text{ nmol.ind}^{-1}.\text{day}^{-1}$) while the major part was due to the external surface of the oyster shell with 69 % ($2352.4 \text{ nmol.ind}^{-1}.\text{day}^{-1}$). The PNR associated with the soft tissue represented only 9 % of the total nitrification activity and corresponded to $309.5 \text{ nmol.ind}^{-1}.\text{day}^{-1}$ (Fig.34). These data underline the importance of the shell surface area available for the settlement of a nitrifying bacterial population.

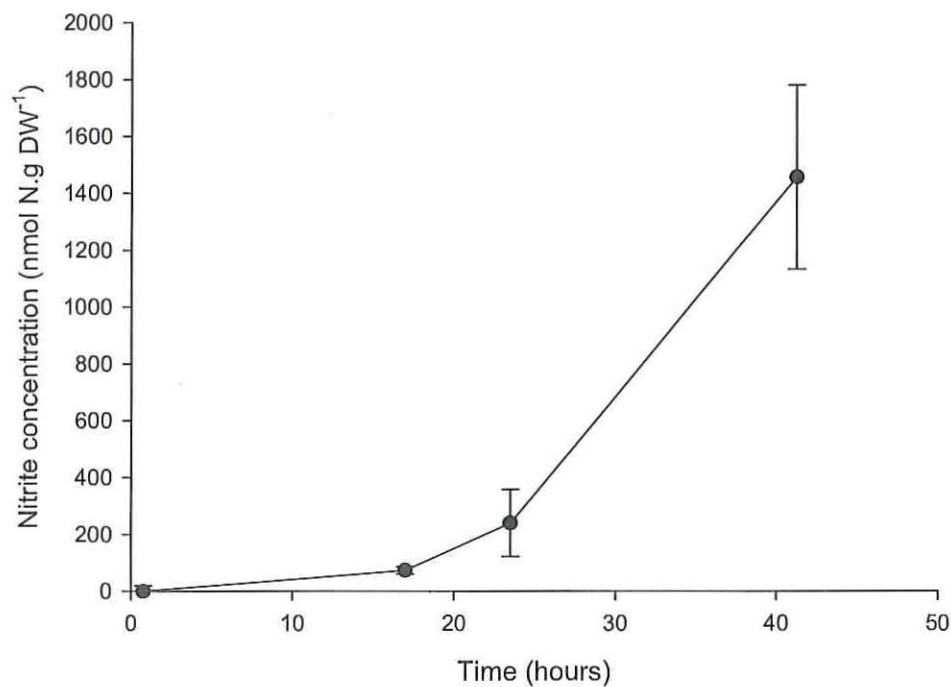


Figure 33. Estimation of the Potential Nitrification Rates from the bacterial population colonizing the oyster soft tissue. Nitrite accumulation is expressed per unit of total tissue dry weight (DW_{total}). Each point is the mean value and error bars represent standard deviations ($n=3$).

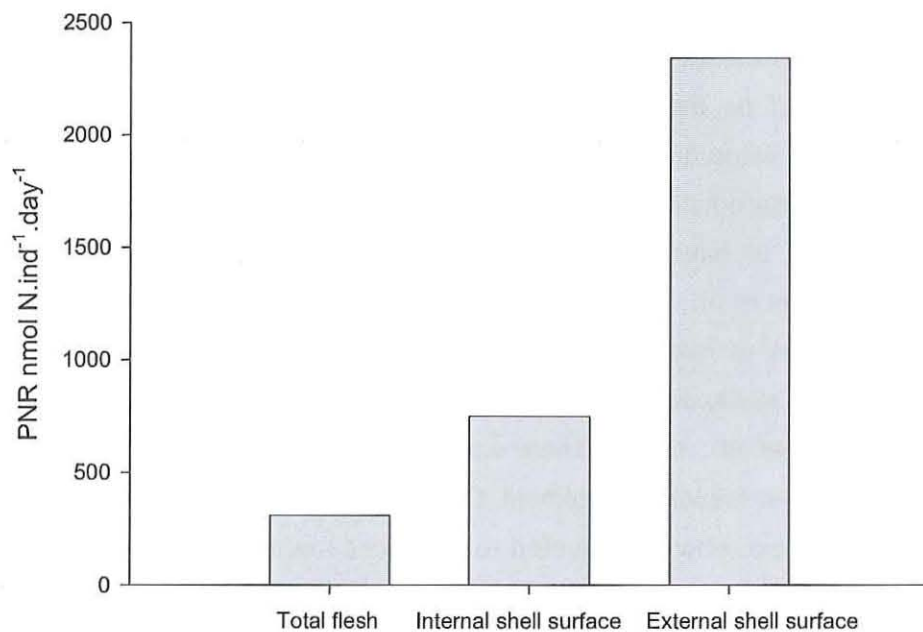


Figure 34. Daily Potential Nitrification Rate (PNR) for different parts of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

3.2.5- Discussion

3.2.5.1. TAN excretion measurement

Ammonium is the primary N-excretion product in bivalves. The effect of temperature and food concentration on Pacific oyster TAN excretion was clearly demonstrated in this study and for a range of variables characteristic. This result is consistent with most previous works on bivalve excretion (Emerson, 1969; Bayne et Scullard, 1977; Shpigel et al., 1992; Boulter et Wilson, 1998; Kesarcodi-Watson et al., 2001a). However, Kesarcodi-Watson et al. (2001a) did not find an influence of food concentration on adult Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* excretion and observed a negative relationship for juveniles. Our data on the TAN excretion rate are lower than those available in the literature for the oyster *Crassostrea gigas* (Table 7). The highest value of excretion measured in this study ($0.85 \mu\text{molN.h}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$) was obtained at a temperature of 22°C and a food concentration of 1.38 mgC.l^{-1} . This is one order of magnitude lower than the maximum value previously found for *C.gigas* (Shpigel et al., 1992, Table 7), but is consistent with the results obtained by Kesarcodi-Watson et al. (2001 a,b) for the oyster *Saccostrea commercialis*. Mao et al. (2006) measured a higher TAN excretion in the field but showed a strong variability according to the season, which included the variation of a large set of parameters such as food availability, temperature,

oxygen consumption and gametogenesis of the oyster. Fiala-Medioni et al. (1983) obtained values three-fold higher than the maximum TAN excretion rate presented in this study, despite a lower experimental temperature and food concentration and we hypothesize that this result could be explained by a longer acclimation period (10 to 15 days). Similarly, the highest value of Shpigel et al., (1992) was obtained with oysters fed for 35 days before TAN measurements. The present study was carried out with triploid oysters which do not invest or have a reduced energy investment in reproduction (Allen et Downing, 1986; Shpigel et al., 1992). Their energy allocation strongly limit gametogenesis, which reduces the risk of massive gamete release through spawning in the recirculating system. The effect of ploidy on oyster ammonia excretion is controversial in the literature. According to Shpigel et al., (1992), there was no significant difference in the ammonia excretion rate between triploid and diploid *C.gigas* oysters while Davis (1988) underlined that a lower nitrogen excretion contributed to a reduced metabolic cost for the triploids of the same species compared to diploid individuals. Kesarcodi-Watson et al. (2001b) similarly measured a significant difference for *Saccostrea commercialis* with an excretion 43 % greater for diploid adults than triploid adults. The low excretion rate observed in this study could be partly related to the triploid status of the oyster (cf. Fiala-Medioni et al. (1983), Table 7).

Tableau 7. For the sake of comparison, literature data of TAN excretion measured by different authors for the oyster *Crassostrea gigas*. n.a: not available, Chl a: chlorophyll a, C: carbon, *: oyster species, *Saccostrea commercialis*.

References	$\mu\text{mol N h}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$	Temperature (°)	Food supply	Ploidy
Fiala-Medioni et al., 1983	2.81	15	0.016 mgC.l ⁻¹	diploid
Shpigel et al., 1992	8-9	8-15	n.a.	dipl/tripl
Kesarcody et al., 2001b	2.14	23	n.a.	diploid
Kesarcody et al., 2001b	1.22	23	n.a.	triploid
Mao et al., 2006	5.4	23	1.73 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Chl a	n.a.
This study	0.85	22	1.38 mgC.l ⁻¹	triploid

3.2.5.2. Potential nitrification rates (PNR)

Nitrification involves the oxidation of ammonia to nitrate. To estimate the PNR of nitrifying populations to oxidize ammonium, the last step of the nitrification process was inhibited. For the nitrification of the TAN, the PNR of the external surface of the shell measured for the oyster *Crassostrea gigas* (23.04 nmolN.cm⁻².day⁻¹) at 16°C was slightly

higher than for other suspension-feeding bivalves such as *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum* whose PNR, at 20°C, were 18 ± 11.1 and 26.5 ± 7.8 $\text{nmol.cm}^{-2}.\text{day}^{-1}$ respectively, considering the difference in temperature (Welsh et Castadelli, 2004). This difference could be explained by the external structure of the shell which is much smoother for these bivalves compared to the oyster shell surface. On the other hand, the method used to assess the oyster shell surface probably underestimated the real surface area. In fact, the crevices of the shells of the oysters were difficult to reach with the aluminium sheet. However, this study provides a first estimation of the potential nitrifying activity of the bacterial population carried by the oysters, which can be used to scale-up data to a population level. The extrapolation of the results to an oyster population kept in a recirculating tank (n=2655 individuals, mean total weight (\pm SD): 67.8 ± 9.78 g), corresponding to a total surface area of 46.6 m^2 , gives a PNR estimation of $342 \mu\text{mol.h}^{-1}$ ($83 \mu\text{mol.h}^{-1}$ for the internal surface and $259 \mu\text{mol.h}^{-1}$ for the external surface). In our conditions, the specific surface area calculated was $360 \text{ m}^2/\text{m}^3$ which is comparable to the biofilters used in fish recirculating systems that usually provide a specific surface area of between 100 and $300 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Tseng et Wu, 2004; Timmons et al., 2006; Pedersen et al., 2007). The estimation of the specific surface area enabled the efficiency of the biofilter to be assessed. It corresponded to the surface area of the medium available for bacterial growth per unit of volume (Timmons et Ebeling, 2007).

3.2.5.3. Application to a recirculating tank

The TAN fluxes determined in the present study were extrapolated to an oyster population and compared to experimental data. This comparison was to show whether the excretion flux from the bivalves could be balanced by the nitrification flux of the bacterial population present on the oyster shells. For this objective, a stock of 180 kg of oysters of commercial size, (mean DW_{total} of 0.76 ± 0.24 g (SD) and mean DW_{soma} of $0.63 \text{ g} \pm 0.23$ (SD), n= 2655 individuals and total weight of 67.8 ± 9.78 g (SD)) was placed in a recirculating tank for 5 weeks at 16°C. The tank had a total volume of 1900 litres and the food supply was adjusted with a culture of *Skeletonema costatum* with a flow of 10 l.h^{-1} as single fluid renewal. The mean carbon concentration in the system, used as the food descriptor, was 1.38 ± 0.27 (SD) mg C.l^{-1} . The TAN concentration was measured three times a week by the indo-phenol blue method (Solorzano, 1969) and the oyster DW_{total} (n=40) was determined at the end of the experiment. The change in the TAN concentration during the experiment (Fig.35) showed a stabilized period after 480 hours, which suggests that the recirculating system had reached an equilibrium with a TAN production compensated

by a fully efficient bacterial nitrification (steady state period). Then, the mean residual TAN concentration measured was 3.3 ± 0.91 (SD) $\mu\text{mol N.l}^{-1}$. The excretion law and the PNR established in the present study were applied to the oyster population and represented a PNR of $452.77 \mu\text{mol N.h}^{-1}$ (PNR related to the surface of shells and soft tissue) and a TAN excretion of $876.33 \mu\text{mol N.h}^{-1}$. The theoretical balance in TAN should lead to a residual of $423.56 \mu\text{mol N.h}^{-1}$ corresponding to a TAN concentration of $42.35 \mu\text{molN.l}^{-1}$ (calculated with 10 l.h^{-1} as flow renewal). The difference observed between the experimental data and the theoretical calculation underlines the influence of other fluxes, not taken into account here. Indeed, the TAN fluxes relative to the fluid renewal ($33 \mu\text{mol.l}^{-1}$), the ammonification of the biodeposits and the remaining food accumulated in the system, and the volatilization of the ammonia (Lefebvre et al., 2001b) must all be taken into account for an overall TAN budget. However, the nitrification carried out by the bacterial population linked to the oysters (shell surfaces and tissues) appeared sufficient to balance the TAN concentration. Moreover, both the TAN concentration calculated ($42.35 \mu\text{molN.l}^{-1}$) and measured in the recirculating system ($3.3 \mu\text{molN.l}^{-1}$) remained below the critical level of $800 \mu\text{mol.l}^{-1}$ quoted by Epifanio and Srna (1975) as a threshold value beyond which oyster feeding processes are altered.

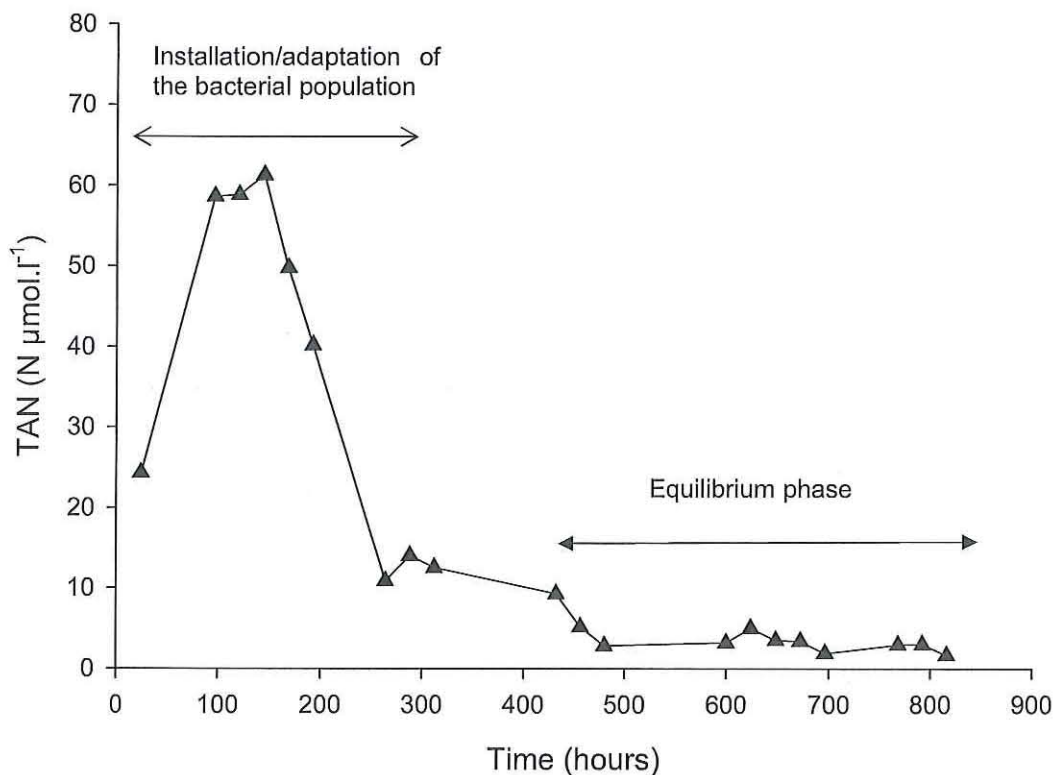


Figure 35. Change in the Total Ammonia Nitrogen (TAN) concentration during the storage of a stock of 180 kg of *Crassostrea gigas* in a recirculating tank.

3.2.6- Conclusion

The dissolved excretion and oxidation of the ammonia represent two nitrogen fluxes that should be balanced to avoid toxicity for oysters stored in a recirculating tank. The approach of the TAN excretion combined with the Potential Nitrification Rate underlines the key role played by the bacterial population colonizing the oyster shell. Its nitrifying efficiency suggests that an oyster stock could be stored in a recirculating tank without the addition of a biofilter which would represent a real economic advantage.

3.3. Modélisation de la sauvegarde de l'huître Pacifique *Crassostrea gigas* en système re-circulé

3.3.1- Introduction

La sauvegarde en système re-circulé nécessite de prendre en compte un ensemble de paramètres à adapter au mieux aux exigences des huîtres pour maintenir la stabilité de leurs réponses physiologiques. Des paramètres, tels que la température et la vitesse de courant, ont donc été définis et l'organisation du système a été élaborée dans un but d'économie de moyen et de simplicité de fonctionnement. L'ajustement de chacun des paramètres a été réalisé dans un objectif de maintien du poids des individus, une survie optimale et un maintien de la qualité de l'eau avec des concentrations en éléments azotés dissous restant sous les seuils de toxicité. La modification d'un élément tel que le nombre d'individus ou le volume de stockage remet en question les ajustements et ces changements doivent être anticipés pour assurer la généralisation du système. Ainsi, le transfert aux professionnels du procédé de sauvegarde des bivalves en système re-circulé va s'accompagner d'un changement d'échelle qui pourrait avoir un impact sur les conditions hydrodynamiques subies par les huîtres, accompagné de variations de la qualité des bivalves. La modélisation du fonctionnement du système re-circulé est alors un outil d'aide à la compréhension de la dynamique du système qui permet aussi de tester des hypothèses et de synthétiser des mécanismes empiriques (Burford et Lorenzen, 2004).

En aquaculture, l'azote joue un rôle majeur dans la gestion de la qualité de l'eau assurant à la fois un rôle de sels nutritifs pour les producteurs primaires et représentant un élément toxique pour les animaux élevés (Lorenzen et al., 1997; Lefebvre et al., 2001b; Burford et Lorenzen, 2004). La modélisation des flux d'azote prend en compte le rôle du sédiment dans la minéralisation des éléments azotés dans les structures développées en marais (Lefebvre et al., 2001a) ou l'efficacité de filtres biologiques dans les systèmes de production hors-sol (Gutiérrez-Estrada et al., 2004; Malone et Pfeiffer, 2006; Guerdat et al., 2011). Cependant, les procédés de transformation de l'azote ammoniacal restent souvent spécifiques à chaque système (Lefebvre et al., 2001b; Ferreira et al., 2009) et le stockage d'huîtres hors sol et sans filtre biologique permet de considérer notre système re-circulé comme un cas de figure nouveau caractérisé par sa simplicité, ce qui a nécessité la mise au point d'un modèle spécifique. Parmi les nombreux modèles écophysiologiques existants appliqués à l'huître (Barillé et al., 1997a; Ren et Ross, 2001; Pouvreau et al., 2006; Alunno-Bruscia et al., 2011), la température et la nourriture sont deux variables forçantes majeures ayant un impact sur la croissance des bivalves en élevage dans le

milieu naturel (Bourlès et al., 2009; Grangeré et al., 2009) ou en milieu contrôlé dans des claires ou des bacs d'élevage (Méléder et al., 2001; Pouvreau et al., 2006). Les réponses physiologiques de l'huître ont été simulées selon le modèle mis au point par Barillé et al. (1997a), basé sur le concept du Scope for Growth (Bayne et Newell, 1983). L'alimentation est alors considérée comme une succession d'étapes pré et post-ingestives. L'allocation de l'énergie va en priorité à la maintenance, le reste étant ensuite alloué à la croissance de l'individu, à l'élaboration de ses réserves et à la gamétogenèse. La filtration, l'ingestion et l'assimilation sont successivement simulées sous l'influence des facteurs exogènes qui sont caractérisés par une certaine stabilité dans un milieu entièrement contrôlé tel qu'un système re-circulé. Le modèle fonctionne de façon simplifiée, en particulier pour toutes les formulations faisant intervenir les matières en suspension dont les seuils de perturbation se situent tous au-delà de 60 mg.l^{-1} , et qui ne sont jamais atteints. Par contre, l'effet de la vitesse du courant, le rôle de biofiltre mis en évidence au niveau des coquilles des huîtres, l'apport en phytoplancton et la température ont été pris en compte. Un modèle déterministe et empirique a ainsi été mis au point permettant de coupler les deux sous modèles (Fig. 36), l'un intégrant les réponses physiologiques des huîtres, filtration, respiration et excrétion ammoniacale, le second simulant l'évolution des flux et des processus associés à l'azote dissous au sein du système re-circulé. A la différence de la majorité des modèles précédemment cités, le stockage des huîtres en système re-circulé a pour objectif le maintien du poids sec et non la croissance des individus. Dans ce contexte, l'apport en nourriture peut être limité permettant de favoriser la qualité de l'eau qui sera aussi dépendante de la disponibilité en eau. Le modèle comprend un compartiment « huître » soumis à un ensemble de variables forçantes représenté par des paramètres physico-chimiques telles que la température et la vitesse du courant, mais aussi par des variables en lien avec la structure d'élevage comme le taux de renouvellement, le volume d'eau et la charge en huîtres dans le circuit. Le compartiment correspondant aux biodépôts produits par les huîtres a aussi été associé en raison de son impact sur la qualité de l'eau. Enfin, l'azote issu de l'excrétion dissoute des huîtres et de la dégradation des biodépôts représente un troisième compartiment caractérisé par des pertes sortant du système re-circulé. La calibration du modèle a ensuite été réalisée à partir d'un jeu de données issu d'expérimentations menées sur six systèmes re-circulés caractérisés par des volumes, des charges et des conditions expérimentales différentes.

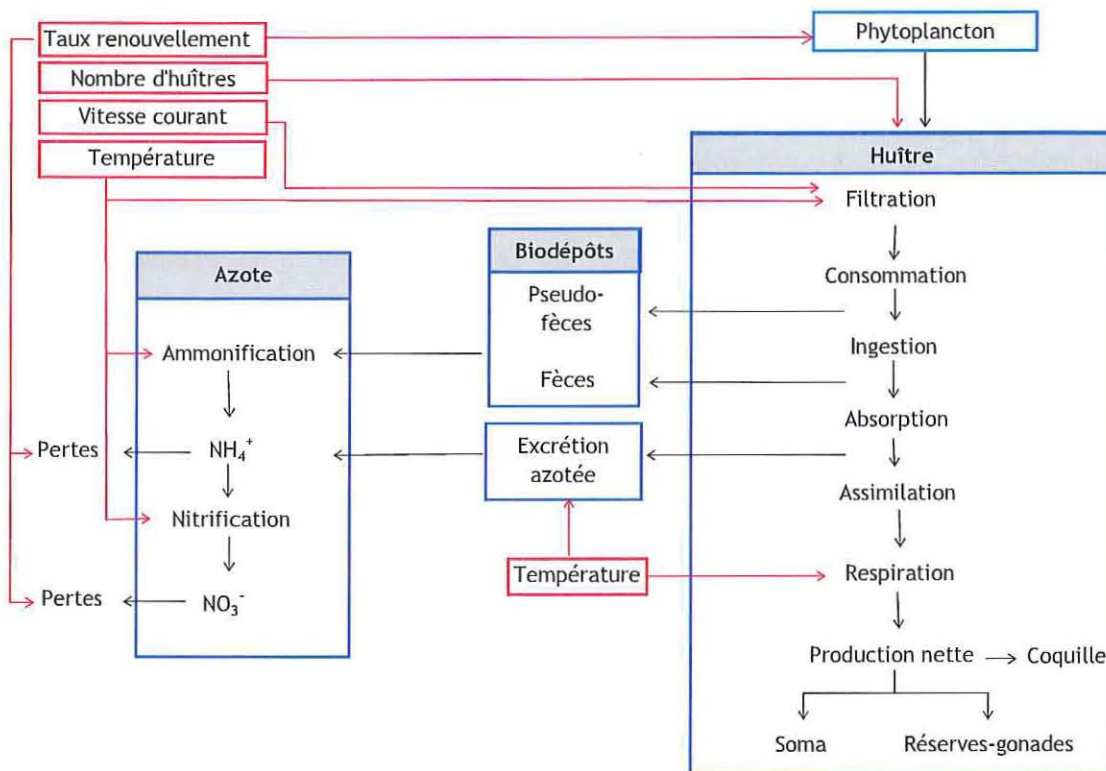


Figure 36. Modèle conceptuel simplifié associant les processus physiologiques de l'huître, les flux de matières azotées dissoutes, les compartiments (grisé) et les variables forçantes (en rouge) au sein du système re-circulé.

3.3.2- Matériel et méthodes

Mesures expérimentales

Une série d'expérimentations a été réalisée en 2011 à la station IFREMER de Bouin (Vendée) afin de mesurer l'impact des conditions de sauvegarde d'une population d'huîtres *Crassostrea gigas* en système re-circulé pendant 5 semaines. Un stock de 370 kg d'huîtres (poids sec de $0,90 \pm (ET) 0,30$ g provenant de la baie de Bourgneuf ($46-47^\circ\text{N}$, $1-2^\circ\text{O}$) a été réparti dans six systèmes re-circulés soumis à des conditions expérimentales différentes (Tableau 8). L'impact de la charge en huîtres (kg.m^{-3}), de la quantité de phytoplancton apportée, de la vitesse de courant et du taux de renouvellement a été mesuré sur l'évolution du poids sec des individus et sur la concentration en azote ammoniacal total et en nitrate de l'eau. Il a par ailleurs été choisi de travailler avec des huîtres triploïdes afin de limiter l'impact de la gamétogenèse sur l'évolution du poids sec et pour écarter tout risque de ponte pendant les 5 semaines de sauvegarde. Les huîtres ont été réparties en clayettes de 10 kg pour les systèmes re-circulés 1 et 2 et en paniers de 3 kg pour les systèmes 3 à 6. Les expérimentations se sont déroulées à 16°C , une valeur médiane de la

gamme de température définie comme optimale pour l'utilisation du système re-circulé (chapitre 1.2).

Tableau 8. Conditions expérimentales testées au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines selon les systèmes re-circulés (SR).

	SR 1	SR 2	SR 3	SR 4	SR 5	SR 6
Volume (m ³)	1,3	1,3	0,09	0,09	0,09	0,09
Charge (kg.m ⁻³)	138	92	167	167	167	167
Taux de renouvellement (%.h ⁻¹)	1,25	1,25	1,50	1,50	1,50	10,00
Vitesse du courant (cm.s ⁻¹)	3	3	3	3	8	3
Apport phyto (cellules.huître ⁻¹ .jour ⁻¹)	1.10 ⁸	1.10 ⁸	1.10 ⁸	0,5.10 ⁸	1.10 ⁸	1.10 ⁸

Les huîtres ont été nourries en continu à raison de 10⁸ cellules par individu et par jour avec la microalgue *Skeletonema costatum* cultivée en cycle et en milieu ouvert (chapitre 1.2). Cette quantité a été préalablement déterminée comme optimale pour le maintien du poids sec des huîtres soumises à un stockage de 5 semaines en conditions d'affinage (Méléder et al., 2001). Un comptage de la concentration cellulaire a été effectué quotidiennement à la loupe binoculaire avec une cellule de Malassez et des mesures de concentration en chlorophylle *a* ont été réalisées deux fois par semaine par méthode fluorimétrique (Lorenzen, 1967). Le suivi des paramètres physiques de l'eau a été réalisé quotidiennement (température, salinité, pH et concentration en oxygène) et la qualité de l'eau a été estimée par une mesure bihebdomadaire de la concentration en matière en suspension (MES) et en matière organique particulaire (MOP), réalisée par filtration d'un volume d'eau sur un filtre de papier de verre Fisherbrand GF/C de porosité 0,7 µm et préalablement pesé. Après élimination des résidus salins par un rinçage à l'eau distillée, le filtre a été mis à l'étuve à 50°C pendant 24 heures puis pesé pour obtenir la masse des matières en suspension totales (MES). Après crémation à 450°C pendant une heure, la MOP a été déduite par différence entre la MES totale et la fraction minérale. Les matières azotées dissoutes ont été quantifiées deux fois par semaine sans réplicat. La concentration en azote ammoniacal total a été mesurée par la méthode du bleu d'indophénol (Solorzano, 1969) et les analyses en azote issu des nitrates (N-NO₃⁻) ont été réalisées à l'aide du MerKoquant Kit® dont le principe consiste à réduire les nitrates en nitrites par acidification puis à les quantifier à l'aide d'une réaction à la résorcine. Une mesure du poids sec a été réalisée une fois par semaine sur 40 individus pour les SR 1 et 2 et uniquement en début et en fin d'expérimentation pour les SR 3 à 6 dont la quantité d'huîtres (15 kg) ne permettait pas un prélèvement d'individus trop important. Pour cette mesure, la chair de chaque huître a été congelée à -20°C pendant 48 heures suivi d'une lyophilisation (CHRIST Alpha 1/6) à -54°C pendant 48 heures et d'une pesée (balance

Mettler Toledo, Viroflay, France). Les chairs ont ensuite été conservées pour une quantification du carbone et de l'azote avec un analyseur CHN (Flash EA 1112 NC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Elaboration du modèle

Le modèle simule dans le temps l'évolution de 6 variables d'état (Tableau 9) : le poids du compartiment réserve (RESERVE) et du compartiment somatique (SOMA) dont la somme correspond au poids sec de chair de l'huître (Poids sec) et qui sera comparé aux observations issues des expérimentations. L'évolution du compartiment gonade n'a pas été simulée, le choix de travailler avec des huîtres triploïdes a permis de limiter la gamétogenèse et aucune énergie n'a été allouée à la reproduction. Les valeurs initiales des variables RESERVE et SOMA ont été déterminées à partir du ratio C/N. Selon les observations de Marín Leal et al. (2008), une huître avec un minimum de réserve présente un rapport C/N d'environ 5. Cependant, les valeurs de C/N mesurées sur les individus issus des expérimentations ont été inférieures à 5 et nous ont amené à considérer une valeur de 4 comme C/N minimum. Le poids sec de soma a alors été calculé selon la relation :

$$\text{SOMA} = \text{Poids sec} - [((\text{C/N}) - 4) / (\text{C/N})] \cdot \text{Poids sec}$$

En début d'expérimentation, chaque système re-circulé est rempli avec une eau de mer passée sur un filtre à sable (porosité de 45 µm) et qui présente alors une charge en MES de 14 ± (ET) 1,68 mg.l⁻¹, une MOP de 2,4 ± (ET) 0,02 mg.l⁻¹ et une concentration en chlorophylle *a* de 2,5 ± (ET) 0,04 µg.l⁻¹. Au cours de l'expérimentation, l'apport de phytoplancton, *Skeletonema costatum*, représente la seule nourriture apportée à l'huître et les MES n'ont pas dépassées des valeurs de 30 mg.l⁻¹. La filtration de l'huître est considérée optimale et constante pour une charge en MES inférieur à 60 mg.l⁻¹ (Raillard et al., 1993; Barillé et al., 1997b), ainsi aucun paramètre affectant la filtration ou simulant un colmatage n'a été appliqué. Cette filtration est optimale à une température de 19°C (4,8 l.h⁻¹.g⁻¹ de poids sec) (Bougrier et al., 1995) et l'effet d'une température s'éloignant de 19°C a été traduite par l'équation établie par ces auteurs. Deux coefficients sont appliqués à la fonction de filtration, l'un traduisant l'effet de la vitesse du courant et le second régulant le temps d'activité de filtration de l'animal (Haure et al., 2003). Enfin, la filtration est aussi fonction de la masse de tissu somatique et un coefficient allométrique de 0,44 a été préféré à 0,62, utilisé dans le chapitre 2 de ce document, car c'est un paramètre du modèle proposé par Bougrier et al. (1995) et utilisé pour simuler la filtration. Les particules de microalgues filtrées ont été totalement retenues par les branchies et la consommation organique est proportionnelle à la quantité de nourriture disponible dans le milieu. Les particules minérales consommées sont rejetées sous forme de pseudo-fèces à

partir d'un seuil de $4,6 \text{ mg.l}^{-1}$ de MES (Deslous-Paoli et al., 1992). Les particules non éliminées ont ensuite été ingérées (consommation moins pseudo-fèces) sans contrainte puisque seules des concentrations en MES supérieures à 150 mg.l^{-1} perturbent les mécanismes de sélection pré-ingestive (Barillé et Prou, 1993). La nourriture ingérée a ensuite été absorbée avec une efficacité d'absorption maximale dont la valeur retenue a été établie par Méléder et al. (2001) à l'occasion de mesures réalisées avec la microalgue *Skeletonema costatum*. Les particules non absorbées ont alors été rejetées sous forme de fèces. L'excrétion dissoute est déduite de l'absorption pour obtenir l'assimilation. Chez l'huître *Crassostrea gigas*, le principal rejet dissous est issu du métabolisme azoté et est représenté majoritairement par l'excrétion d'azote ammoniacal ($\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3$) (Srna et Baggaley, 1976). Une série d'expérimentations réalisée à la station de Bouin a permis d'établir une loi d'excrétion fonction de la température, pour une gamme de 13°C à 22°C , et de l'apport de nourriture quantifié par sa concentration en carbone (chapitre 3.1). De l'énergie assimilée, une partie est utilisée pour la respiration afin de couvrir les besoins métaboliques liés à la croissance et la maintenance de l'organisme. Le reste est alloué à la construction de la coquille et à l'élaboration du soma et des réserves (la reproduction n'étant pas prise en compte). La respiration a été calculée à partir de la relation décrite par Bougrier et al., (1995) et elle a été rapportée au poids de soma puisqu'il peut être considéré que les réserves et les gonades ne nécessitent pas de maintenance (Van Haren et Kooijman, 1993).

Dans le cadre de ce système re-circulé, le phytoplancton (PHYTOPLANCTON) est considéré comme une variable d'état et non une variable forçante. Cette variable est alimentée par un flux d'apport en microalgues caractérisé par un débit d'apport (l.h^{-1}) et une concentration en cellules (cellules.l^{-1}). Les flux de sortie correspondent à la consommation en microalgues par les huîtres et à la perte de cellules algales par renouvellement de l'eau du système re-circulé. La nourriture disponible pour les huîtres est donc un stock de phytoplancton présent dans l'eau et résultant de plusieurs flux. Ce stock est quantifié en mg de MOP et suivi à l'aide de la variable auxiliaire (Conc MOP, Tableau 9) correspondant à une concentration en MOP (mg.l^{-1}). La MOP, descripteur du phytoplancton, est alors l'unité utilisée dans les compartiments « huître » et « biodépôts ».

Les biodépôts (BIODEPOT) sont représentés par une variable d'état constituée des pseudo-fèces et des fèces des huîtres. La production de pseudo-fèces organiques correspond à un mécanisme de sélection pré-ingestive. Elle a été estimée à 30 % de la matière organique consommée (CONSO org) dans des conditions de faibles charges en MES (Lefebvre, 2000). La production de fèces est déduite de la loi d'efficacité d'absorption (EA) appliquée à l'ingestion de la matière organique (Méléder et al., 2001). Ces biodépôts

organiques s'accumulent dans le système re-circulé formant une couche au fond du bac, et subissent un processus d'ammonification libérant de l'azote ammoniacal, substrat pour la population bactérienne responsable de la nitrification (Sornin et al., 1983; Herbert, 1999). Le taux d'ammonification utilisé est dépendant de la température et provient des travaux de Lefebvre et al. (2001b). L'ammonification est un processus qui intervient principalement dans la zone aérobie du sédiment (Chapelle, 1995), il est ainsi supposé que ce processus n'a lieu que sur la surface des biodépôts, hypothèse traduite par l'application d'un coefficient (Régul bdp).

Les deux dernières variables d'état correspondent aux matières azotées, l'azote ammoniacal total ($N-NH_4^+/NH_3$) et l'azote issu des nitrates ($N-NO_3^-$). L'azote ammoniacal total provient à la fois de l'excrétion azotée des huîtres et de l'ammonification des biodépôts. L'eau de mer alimentant le système re-circulé apporte aussi de l'azote ammoniacal à une concentration de $0,386 \mu\text{mol.l}^{-1} N-NH_4^+/NH_3$, l'apport par le milieu de culture du phytoplancton restant négligeable. Une fraction de l'azote ammoniacal total (AAT) est éliminée du système à l'issue de processus telle qu'une volatilisation (Lefebvre et al., 2001b; Thoman et al., 2001), regroupés sous un seul flux (pertes NH_4). Le flux d'azote majeur est constitué par la nitrification au cours de laquelle l'azote ammoniacal total est d'abord transformé en nitrites. Ces derniers ne sont pas pris en compte dans le modèle car ils restent faiblement représentés dans un milieu bien oxygéné (Malone et Pfeiffer, 2006). Epifanio et Srna (1975) montrent, par ailleurs, que les concentrations en nitrites et en nitrates habituellement constatés en système re-circulé ne présentent pas de risque pour l'huître *Crassostrea virginica*, contrairement à l'AAT. Ces auteurs ont observé que la filtration de l'huître est perturbée à partir d'une concentration de $800 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (soit 11mg.l^{-1}) d'ammonium. Dans le processus de nitrification, les nitrites sont ensuite transformés en nitrates, variable d'état également alimentée par l'eau de mer et le milieu de culture du phytoplancton à hauteur respectivement de $26,45 \mu\text{mol.l}^{-1} N-NO_3^-$ et de $114,8 \mu\text{mol.l}^{-1} N-NO_3^-$. Au niveau de cette variable d'état, deux types de pertes ont été identifiées, le renouvellement de l'eau du circuit et un ensemble de processus comprenant à la fois l'assimilation de l'azote par des micro-organismes (algues, bactéries et champignon), en milieu anaérobie et aérobie (Thoman et al., 2001; Van Rijn, 2002) et une possible dénitrification (perte d'azote sous forme N_2O et N_2). Ces pertes ont été regroupées sous un seul flux (Pertes NO_3).

Les variables annexes permettent de suivre l'évolution des différentes réponses physiologiques de l'huître pendant la simulation. Ces différentes variables évoluent au cours du temps en fonction de cinq variables environnementales forçantes :

- i) la température, a été définie comme la plus adaptée à la sauvegarde en système re-circulé pour un intervalle de 14 à 18°C (chapitre 1.2). Chez l'huître,

elle a un effet direct sur les réponses physiologiques de filtration et de respiration (Bougrier et al., 1995) et un effet significatif a été démontré sur l'excrétion azotée (chapitre 3.1). La température intervient aussi dans les processus du cycle de l'azote telles que l'ammonification (Chapelle, 1995) et la nitrification (Zhu et Chen, 2002).

- ii) la vitesse du courant a un effet significatif sur la filtration et la respiration des huîtres (chapitre 2.2) mais elle a été appliquée uniquement sur la filtration, l'effet constaté sur la respiration étant discutable à forte vitesse, il a été choisi de ne pas l'intégrer dans le modèle. Par simplification, l'impact possible de la vitesse sur la nitrification n'a pas non plus été pris en compte.
- iii) le débit de phytoplancton et la concentration en cellules sont deux variables forçantes influençant la quantité de microalgues disponible pour les huîtres. Cette microalgue est une diatomée, *Skeletonema costatum*, qui est cultivée sur eau de forage et peut être apportée en continue ou de manière séquencée au système re-circulé. Une relation établie à partir de données expérimentales a permis de convertir la concentration algale (nombre de cellules d'algue par litre) en MOP (mg.l^{-1}) en lui appliquant un coefficient de $4,34.10^{-8}$. Ces variables forçantes interviennent au niveau de la consommation et de l'efficacité d'absorption (Barillé et al., 1997a).
- iv) le nombre d'huîtres stockées dans le système re-circulé conditionne la répétition de l'ensemble des processus lié au compartiment simulant le fonctionnement d'une huître.
- v) le taux de renouvellement agit par dilution et élimination de la nourriture apportée et des matières azotées dissoutes du système re-circulé.

La modélisation a été réalisée à l'aide du logiciel STELLA 9.1.3 (High Performance Systems, Hannover, NH, USA). Le modèle a été construit à partir des données issues de la littérature et certains paramètres ont été calibrés à partir d'une expérimentation réalisée en 2008 dans un système re-circulé de 1920 l avec les mêmes conditions expérimentales que décrites en Matériel et Méthodes. Les résultats des simulations ont ensuite été comparés avec les observations issues des expérimentations réalisées sur les six systèmes re-circulés. Dans le compartiment « huître », l'activité de filtration (actfilt) a été calibrée pour ajuster au mieux l'évolution du poids sec aux observations et pour le compartiment « azote », l'efficacité de la nitrification (act nitrif) et les coefficients de perte des matières azotées dissoutes (coef NH4 et coef NO3) ont été calibrés pour ajuster l'évolution des variables AAT (NH4) et N-NO₃⁻ (NO3) aux observations. Enfin, le paramètre contrôlant l'ammonification des biodépôts (Régul bdp) a été calibré par rapport à l'évolution de la

variable NH₄. Les processus qui ont permis de simuler l'évolution des réponses physiologiques de l'huître et de quantifier les matières azotées dissoutes ont été regroupés dans le tableau 10. Les paramètres utilisés dans le modèle, issus des données bibliographiques ou provenant d'une calibration sont fournis dans le tableau 11.

Analyse de sensibilité

Une analyse de sensibilité a été réalisée sur plusieurs paramètres pour évaluer leur impact sur les résultats du modèle. Chaque paramètre a été modifié de + ou - 10 % et le résultat de chaque simulation a été analysé en utilisant un indice de sensibilité (IS) qui a permis de calculer le pourcentage moyen de variation des variables poids sec, AAT et NO₃⁻ selon le système re-circulé considéré (SR 1 et SR 3) (Bacher et Gangnery, 2006).

$$IS = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n \frac{|X_h^1 - X_h^0|}{X_h^0} \cdot 100 \quad (\%)$$

avec n le nombre d'heures de simulation, X_h^0 , la variable d'état simulée de manière standard à l'heure h et X_h^1 la valeur modifiée de la variable à l'heure h.

Tableau 9. Variables appliquées au modèle couplant réponses écophysiologicals de l'huître *Crassostrea gigas* et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé.

Variables	Unités	Description
Variables d'état		
BIODEPOT	mg MOP	Biomasse de biodépôts
NH4	mg N	Quantité d'azote ammoniacal total ($\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3^-$)
NO3	mg N	Quantité de nitrate (N-NO_3^-)
SOMA	g	Poids de soma
RESERVE	g	Poids de réserve
PHYTOPLANCTON	mg MOP	Biomasse de phytoplancton
Variables forçantes		
Température	°C	Température de l'eau
Vitesse courant	cm.s^{-1}	Vitesse du courant
Débit phyto	l.h^{-1}	Débit d'apport du phytoplancton dans le système re-circulé
Conc phyto	cellules.l^{-1}	Concentration en phytoplancton apportée
Rythm distri	-	Distribution ou non de phytoplancton
VolumeBac	litre	Volume total du système re-circulé
Tx renouv	l.h^{-1}	Renouvellement de l'eau du système re-circulé
Conc NH4e	mg.l^{-1}	Concentration en ($\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3^-$) de l'eau entrant dans le système
Conc NO3e	mg.l^{-1}	Concentration en N-NO_3^- de l'eau entrant dans le système
Conc NO3p	mg.l^{-1}	Concentration en N-NO_3^- du phytoplancton entrant dans le système
nb indiv	-	Nombre d'huîtres stockées dans le système
Variables auxiliaires		
ABSorg	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Absorption organique
ABS energ	$\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Quantité d'énergie absorbée
act nitrif	%	Efficacité de la nitrification
Assimil org.	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Assimilation organique
Bilan énerg	$\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Quantité d'énergie disponible pour la croissance et les réserves
Conc MOP	mg.l^{-1}	Concentration en MOP
Conc NH4	mg.l^{-1}	Concentration en $\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3$
Conc NO3	mg.l^{-1}	Concentration en NO_3^-
CONSO	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Consommation organique
Distri	-	Distribution ou non de phytoplancton
ExcrétionN	$\text{mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Excrétion d'azote ammoniacal total en masse
Fèces Org	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Production de fèces organiques
FILT	$\text{l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Filtration de l'huître
Gain soma	$\text{g.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Bilan horaire du soma
Gain poids sec	$\text{g.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Bilan horaire du poids sec
INGorg	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Ingestion organique
MaxSoma	$\text{g.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Maximum de croissance somatique
PFOrg	$\text{mg MOP.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Production de pseudofèces organiques
Poids sec	g	Biomasse totale de chair sèche (Poids soma + Poids réserve)
RESP	$\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$	Respiration

Tableau 10. Equations des processus utilisées dans le modèle couplant réponses écophysiologicals de l'huître *Crassostrea gigas* et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé.

Processus	Unités	Equations
Absorption : ABSorg	mg MOP.h ⁻¹ .ind ⁻¹	EAmax * INGorg
ABS éner	J.h ⁻¹ .ind ⁻¹	E_MOP * ABSorg
Apport phyto	mg MOP.h ⁻¹	Conv_MOP* Distri
Ammonification	mg MOP.h ⁻¹	Tx_Ammonif * (Conc_MOP_bdp + Conc_MOP)
Assimil éner.	J.h ⁻¹ .ind ⁻¹	ABS_énerg - (ExcretionN * E azote)
Bilan éner	J.h ⁻¹ .ind ⁻¹	ASSIMIL - RESP
Consommation: CONSO org	mg MOP.h ⁻¹ .ind ⁻¹	FILT * Conc_MOP
Concentration NO3 eau entrée système	mg N.h ⁻¹	(Dbt_eau * Conc_NO3e) + (Débit_phyto*Conc_NO3_p)
Conv MOP	mg MOP.h ⁻¹	Conc_phyto * coef_phy
conv MOP en C	mgC.l ⁻¹	(conv1 * Conc_MOP) - conv2
Dbt eau	l.h ⁻¹	VolumeBac * Tx_renouv
Distri	-	IF (Rythm_distri =0) THEN 0 ELSE Débit_phyto
EFFET TEMP	°C	temp * (Température-19)^2
EFFET VIT	cm.s ⁻¹	vit * Vitesse_courant
entrée NH4 dans système	mg N-NH ₄ ⁺ .h ⁻¹	Dbt_eau * Conc_NH4_e
ExcrétionN	mg N-NH ₄ ⁺ .h ⁻¹ .ind ⁻¹	(exc1* Température + exc2 / conv_C^exc3) * SOMA * 0.014
Fèces organique: Forg tot	mg MOP.h ⁻¹ .ind ⁻¹	(INGorg-ABSorg) * nb_indv
Filtration: FILT	l.h ⁻¹ .ind ⁻¹	((filtmax -EFFET_TEMP - EFFET_VIT)*(SOMA^coef_allo_filt)*actfilt)
Gain coq	J.h ⁻¹ .ind ⁻¹	Org_coq * 100
Gain réserv	g.h ⁻¹ .ind ⁻¹	IF (Bilan_énerg - Gain_coq - Gain_soma) >0 THEN ((Bilan_énerg - Gain_coq)/E_psec - Gain_soma) ELSE Bilan_énerg/E_psec
Gain soma	g.h ⁻¹ .ind ⁻¹	IF (Bilan_énerg - Gain_coq) > 0 THEN min(MaxSoma, (Bilan_énerg - Gain_coq)/E_psec) ELSE Bilan_énerg/E_psec
Ingestion: INGorg	mg MOP.h ⁻¹ .ind ⁻¹	CONSO_org - PFOrg
MaxSoma	J.h ⁻¹	(Maxsom1 * SOMA + Maxsom2) / 24
Nitrification	mg N.h ⁻¹	(Js_max *(Surface_coq_huître * nb_indv) * Conc_NH4 / (Ks+Conc_NH4)) * act_nitri
Org coq	mg.h ⁻¹ .ind ⁻¹	IF (Bilan_énerg>0) THEN (coq * Bilan_énerg) ELSE 0
Pertes NH4	mg N-NH4.h ⁻¹	coef NH4, SR1ou SR3 * Conc_NH4
Pertes NO3	mg N.h ⁻¹	coef NO3, SR1 ou SR3 * Conc_NO3
Pseudo-fèces organique: PFOrg	mg MOP.h ⁻¹ .ind ⁻¹	CONSO org * Tx bdp
Pseudo-fécès organique: PFOrg tot	mg MOP.h ⁻¹	PFOrg * nb_indv
Respiration: RESP	J.h ⁻¹ .ind ⁻¹	(resp1 + (resp2 * resp3^Température) * SOMA ^coef_allo_resp) * resp4 * E_02
sortie NH4 dans le système	mg N-NH4.h ⁻¹	(Dbt_eau +Débit_phyto) * Conc_NH4
Sortie NO3 du système	mg N.h ⁻¹	(Dbt_eau+Débit_phyto) * Conc_NO3
Sortie phyto	mg MOP.h ⁻¹	(Dbt_eau +Débit_phyto)* Conc_MOP
Surf coq tot	m ²	(Surf_coq_extern+Surf_coq_intern)/10000

Tableau 11. Paramètres utilisés dans le modèle couplant réponses écophysologiques de l'huître *Crassostrea gigas* et évolution des matières azotées dissoutes dans le système re-circulé (SR).

Paramètres	Valeurs	Unités	Définition	Références
actfilt	0.5	-	Taux d'activité de la filtration	Calibration
am	0,002	h ⁻¹	Taux d'ammonification	Lefebvre et al., 2001
coef allo resp	0,8	-	Coefficient d'allométrie appliqué à la respiration	Bougrier et al., 1995
coef allo filt	0,44	-	Coefficient d'allométrie appliqué à la filtration	Bougrier et al., 1995
coef NH ₄ , SR1	28	-	Coefficient de perte d' N-NH ₄ ⁺ /NH ₃ pour les SR 1et 2	Calibration
coef NH ₄ , SR3	2	-	Coefficient de perte d' N-NH ₄ ⁺ /NH ₃ pour les SR 3 à 6	Calibration
coef NO ₃ SR1	32	-	Coefficient de perte d' N-NO ₃ ⁻ pour les SR 1et 2	Calibration
coef NO ₃ SR3	1,6	-	Coefficient de perte d' N-NO ₃ ⁻ pour les SR 3 à 6	Calibration
coef phy	4,34.10 ⁻⁸	-	Coefficient de conversion du phytoplancton (cell.l ⁻¹) en MOP (mg.l ⁻¹)	Cette étude
conv1	0,1462	-	Paramètre de l'équation de conversion des MOP en mgC ⁻¹	Chapitre 2.2
conv2	-0,0893	-	Paramètre de l'équation de conversion des MOP en mgC ⁻¹	Chapitre 2.2
coq	2,08.10 ⁻³	-	Proportion d'énergie allouée à la coquille par heure	Méléder et al., 2001
EA max	0,79	-	Efficacité d'absorption maximale	Méléder et al., 2001
E azote	24.87	J.mg ⁻¹	Conversion de N-NH ₄ ⁺ /NH ₃ en Joule	Bayne et al., 1985
E MOP	20,3	J.mg ⁻¹	Conversion des MOP en Joule	Bayne et al., 1987
EO2	13,8	J.mg O ₂ ⁻¹	Conversion des quantités d'oxygène consommée en Joule	Bayne et Newell, 1983
E psec	20231	J.g ⁻¹	Conversion du poids sec en Joule	Barillé et al., 1997
exc1	0,447016	-	Paramètre de la loi d'excrétion d'azote ammoniacal total	Chapitre 3.1
exc2	-0,20716	-	Paramètre de la loi d'excrétion d'azote ammoniacal total	Chapitre 3.1
exc3	0,43335	-	Paramètre de la loi d'excrétion d'azote ammoniacal total	Chapitre 3.1
filtmax	4,8	l.h ⁻¹ .g ⁻¹	Filtration maximale à 19°C	Bougrier et al., 1995
Js max	graph.	g.cm ⁻² .h ⁻¹	Taux de nitrification maximal de N-NH ₄ ⁺ /NH ₃	Chen et al., 2002
Ks	2	mg.l ⁻¹	Constante de demi-saturation de la nitrification	Chen et al., 2002
Kt	0,07	°C ⁻¹	Taux d'augmentation de la température	Garber, 1984
Maxsom1	0,015	-	Paramètre de la croissance somatique maximale	Méléder et al., 2001
Maxsom2	0,006	-	Paramètre de la croissance somatique maximale	Méléder et al., 2001
Régul bdp	0,001	-	Proportion des biodépôts soumis à l'ammonification	Calibration
resp1	-0,432	-	Paramètre de l'équation de respiration	Bougrier et al., 1995
resp2	0,613	-	Paramètre de l'équation de respiration	Bougrier et al., 1995
resp3	1,042	-	Paramètre de l'équation de respiration	Bougrier et al., 1995
resp4	0,75	-	Paramètre de l'équation de respiration	Bougrier et al., 1995
temp	0,013	-	Effet de la température sur la filtration	Bougrier et al., 1995
Suf coq intern	73,3	cm ²	Surface de la face interne d'une coquille d'huître	Chapitre 3.1
Suf coq extern	102,1	cm ²	Surface de la face externe d'une coquille d'huître	Chapitre 3.1
Tx bdp	0,3	-	Proportion de MOP consommée rejetée sous forme de biodépôts	Lefebvre, 2000
vit	0,2883	-	Effet de la vitesse du courant sur la filtration	Chapitre 2.2

3.3.3- Résultats

Evolution des paramètres environnementaux

En fin d'expérimentation et dans les six systèmes re-circulés (SR), les mortalités n'ont pas dépassé 1 % et les paramètres physiques de l'eau sont restés stables pendant les 5 semaines de sauvegarde avec une température de $16,35 \pm$ (ET) $0,16^\circ\text{C}$, une concentration en oxygène supérieure à 80 % de saturation, un pH de $8,22 \pm$ (ET) $0,29$ et une salinité de $31,79 \pm$ (ET) $0,59$ ‰. La concentration en chlorophylle *a* et la concentration en matière en suspension (MES) sont deux paramètres environnementaux observés et suivis pendant les expérimentations.

La concentration en chlorophylle *a* (Fig. 37 A) a montré un pic après 4 jours de sauvegarde, plus marqué pour le SR 5, suivi d'une chute puis d'une stabilisation des valeurs inférieures à $1 \mu\text{g Chl } a \cdot \text{l}^{-1}$. L'accumulation du phytoplancton les 4 premiers jours (96 h), pourrait attester d'un manque d'activité des huîtres et d'une possible période d'acclimatation plus marqué pour le SR 5 soumis à une vitesse de courant plus importante. Les concentrations en phéophytine *a* ont présenté la même évolution que la chlorophylle *a* (résultats non présentés) avec des valeurs allant de $13 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ à $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ en fin d'expérimentation, montrant la part importante des cellules phytoplanctoniques dégradées. Les concentrations en MES (Fig. 37 B) ont été caractérisées par des valeurs comprises entre 4 et $15 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, excepté pour le SR 3 à la première mesure. Seul le SR 1, avec un grand volume (1300 l) et une charge en huîtres de $138 \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$, a présenté une concentration en MES supérieure aux autres SR. La température est restée stable pendant les cinq semaines de sauvegarde (Fig. 38 A) et le phytoplancton apporté en continu à l'ensemble des systèmes re-circulés avait une concentration moyenne de $0,9 \cdot 10^9 \pm$ (ET) $0,17 \text{cellules} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fig. 38 B). La concentration a évolué entre $0,6$ et $1,2 \cdot 10^9 \text{cellules} \cdot \text{l}^{-1}$, avec des variations journalières liées à des conditions météorologiques irrégulières. Les concentrations en cellules ont cependant semblé se stabiliser pendant les 10 derniers jours de l'expérimentation avec une moyenne de $1 \cdot 10^9 \pm$ (ET) $0,09 \text{cell} \cdot \text{l}^{-1}$. La même microalgue, avec la même concentration, est apportée à chaque SR, seul le débit ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$) d'apport est réglé de manière différente selon le SR pour apporter de $10^8 \text{cellules} \cdot \text{huître}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$. Le SR 4 dont l'apport est de $0,5 \cdot 10^8 \text{cellules} \cdot \text{huître}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ (Tableau 8) aura alors un débit d'apport deux fois moins important que pour le SR 3.

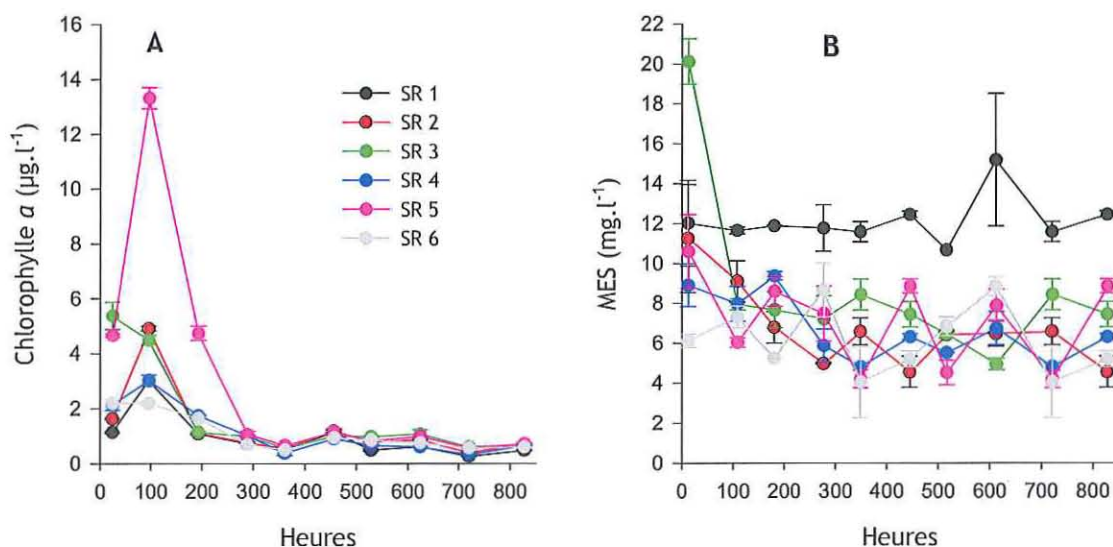


Figure 37. Evolution des paramètres environnementaux des 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines de l'huître *Crassostrea gigas*. A : Evolution des concentrations en chlorophylle a ($\mu\text{g.l}^{-1}$). B : Evolution des concentrations en matières en suspension (MES) (mg.l^{-1}). Les barres correspondent aux écarts types ($n=3$).

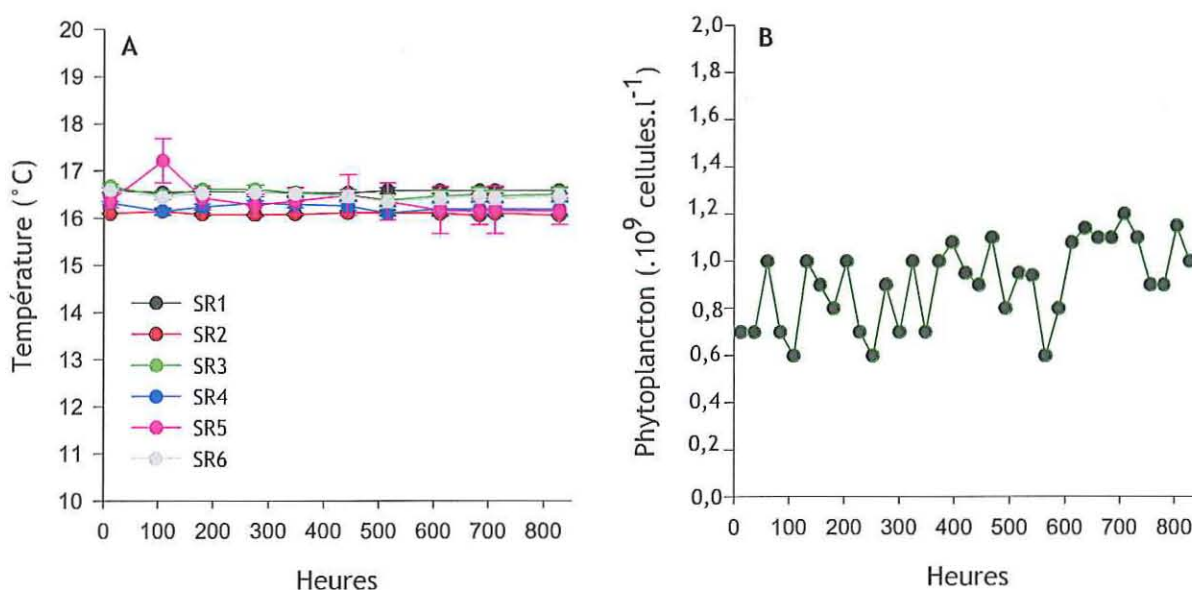


Figure 38. A : Evolution de la température ($^{\circ}\text{C}$) des 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines de l'huître *Crassostrea gigas*. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types ($n=288$). B : Evolution de la concentration en phytoplancton (mesures quotidiennes) apporté à l'ensemble des 6 systèmes re-circulés pendant les 5 semaines de sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas*.

Evolution de la matière organique particulaire

L'évolution de la variable d'état PHYTOPLANCTON a été suivie à partir de la variable auxiliaire « Conc MOP » qui correspond au stock de phytoplancton ramené au volume d'eau (mg MOP.l⁻¹). Pour chaque condition expérimentale (Tableau 8), l'évolution de la MOP a été simulée et comparée aux concentrations en MOP observées dans le milieu (Fig. 39). Les concentrations en MOP observées dans le milieu ont été variables avec des valeurs comprises entre 1 et 4,7 mg.l⁻¹. Une comparaison entre les concentrations moyennes en MOP des différents SR a montré une différence significative uniquement pour le SR1 (ANOVA, $p < 0,05$; $F=3,32$) alors que les concentrations en MOP des autres systèmes ont été homogènes (ANOVA, $p=0,66$; $F=0,60$). La simulation des concentrations en MOP a montré des valeurs comprises entre 0,10 et 0,35 mg MOP.l⁻¹, jusqu'à 13 fois inférieures aux valeurs observées. L'analyse des données a montré une différence significative entre les concentrations moyennes en MOP simulées (ANOVA, $p < 0,001$; $F=17,54$), avec des valeurs homogènes pour les SR 3, 5 et 6 et pour les SR 2 et 4. Les différences constatées entre les concentrations en MOP simulées et observées peuvent avoir pour origine une sous-estimation des valeurs par le modèle ou un biais expérimental qui a entraîné une sur-estimation des concentrations observées. La présence dans le système re-circulé de matière organique autre que celle apportée par le phytoplancton est peu probable, mais la prise en compte de matière organique détritique dans les mesures de concentration en MOP est une hypothèse qui pourrait expliquer ces observations. En début d'expérimentation, l'eau ayant servi à remplir le système re-circulé avait une concentration en MOP de 2,4 mg.l⁻¹, cet apport initial semble rapidement consommé et il peut être considéré comme négligeable.

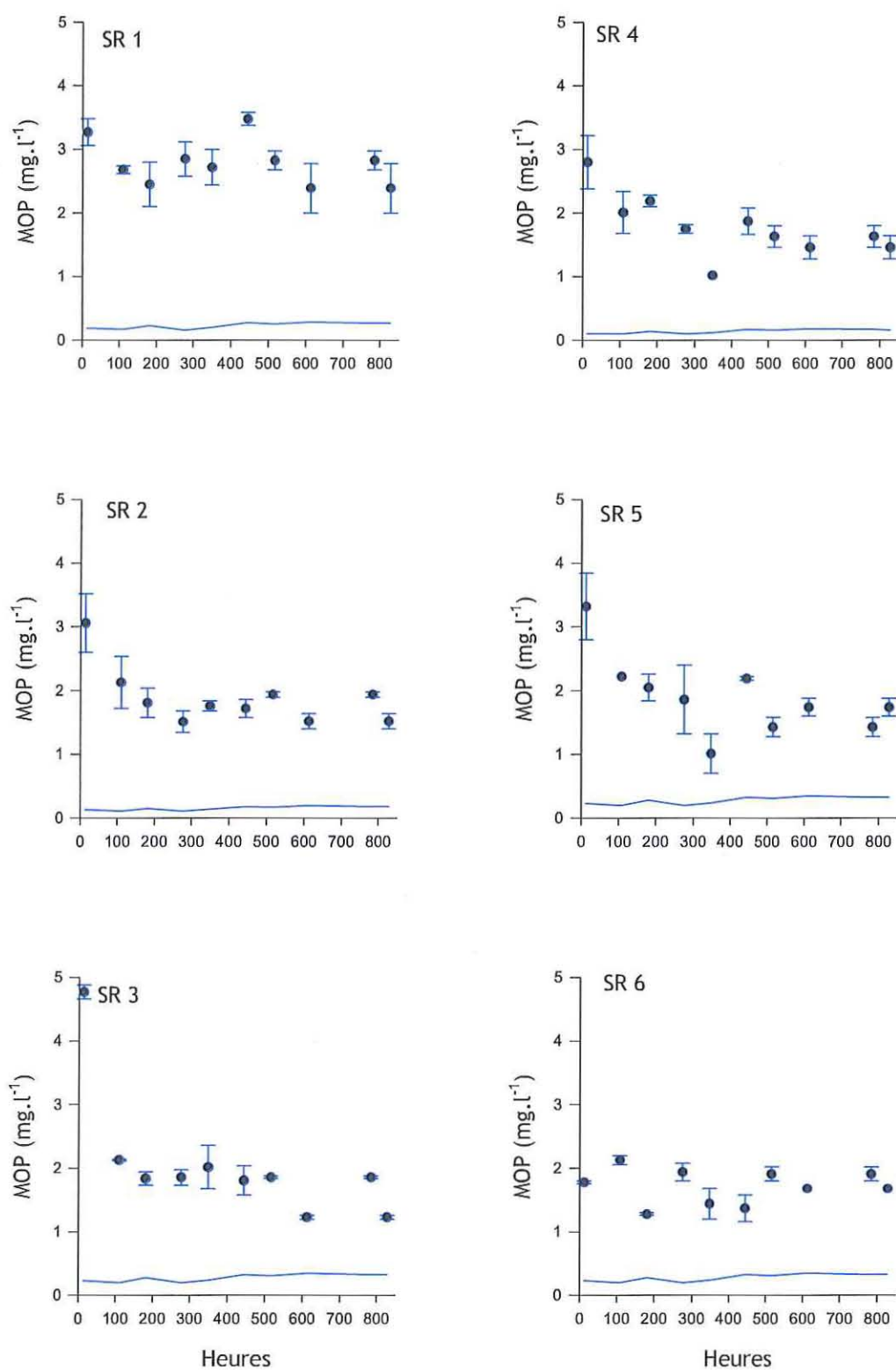


Figure 39. Simulation de l'évolution de la matière organique particulaire (MOP) au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines dans 6 systèmes re-circulés (SR) soumis à des conditions différentes (tableau 8). ● : MOP observée, — : MOP simulée. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (n=3).

Evolution du poids sec

En début d'expérimentation, les huîtres avaient un poids sec moyen de 0,9 g et un rapport C/N inférieur à 5 suggérant de faibles réserves (Tableau 12). A la fin de la période de sauvegarde, les huîtres ont significativement perdu du poids (ANOVA, $p < 0,05$; $F=9,20$), mais les poids sec mesurés en fin d'expérimentation n'ont pas présenté de différences significatives selon les conditions expérimentales (ANOVA, $p= 0,30$; $F = 1,21$).

Tableau 12. Caractéristiques biométriques des huîtres en début et en fin d'expérimentation quelles que soient les conditions expérimentales. Les moyennes sont indiquées avec les écarts types ($n=40$).

	Poids sec (g)	C/N	Poids soma (g)
1 ^{er} jour	0,90 ± 0,30	4,65 ± 0,20	0,78 ± 0,03
35 ^{ème} jour	0,64 ± 0,18	4,34 ± 0,08	0,60 ± 0,03

La calibration du paramètre concernant l'activité de filtration a fourni une valeur de 50 %, inférieure aux mesures antérieures (Méléder et al., 2001; Haure et al., 2003). Seuls les SR 1 et 2 avaient un stock d'huîtres suffisant pour effectuer une mesure par semaine des poids sec, poids de soma et poids de réserve des huîtres. Les mesures de ces paramètres biométriques pour les SR 3 à 6 ont été réalisées uniquement en début et en fin d'expérimentation (Fig. 40). Les pertes de poids sec simulées ont représenté jusqu'à 30 % du poids initial pour les SR 2, 4 et 5 alors qu'elles ne sont que de 14 à 15 % pour les trois autres systèmes (SR 1, 3 et 6). Cependant, le modèle a sous-estimé la perte de poids sec pour ces trois SR, notamment le SR1 en fin d'expérimentation, alors qu'il a correctement simulé l'évolution du poids sec des SR 4 et 5, caractérisés par un apport en nourriture plus faible de moitié (SR 4) et une vitesse de courant plus importante (SR 5). Dans ces deux cas, la filtration est la fonction directement influencée par les paramètres testés. L'évolution du poids sec du SR 2 a été sous-estimée dès la 324^{ième} heure à la différence du SR 1 dont le poids sec a été estimé correctement pour la majorité de la simulation. Le manque de mesures intermédiaires ne permet pas de statuer pour les SR 3 et 6. Le poids de réserve diminue pendant toute la période de simulation et les réserves disparaissent complètement pour la moitié des SR (2, 4 et 5). L'hypothèse d'une disparition totale des réserves pour les autres SR est très probable, si l'expérimentation avait été poursuivie.

La filtration moyenne sur l'ensemble des SR a été de $1,55 \pm (ET) 0,24 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$, seul le SR 5 a montré une filtration moins importante ($1,03 \pm (ET) 0,03 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) alors que ce système re-circulé est caractérisé par une vitesse de courant plus importante (Fig. 41). L'évolution de la filtration présente une décroissance sur l'ensemble des SR qui s'explique par son mode de calcul basé sur le poids de soma des individus. Le poids de soma décroît tout au long de l'expérimentation entraînant alors une diminution de la filtration. La

différence entre la matière organique consommée et celle ingérée correspond à la MOP éliminée sous forme de pseudo-fèces et la différence entre la MOP ingérée et la MOP absorbée correspond aux fèces. Ainsi, la proportion de matière organique absorbée représente $55,25 \pm (ET) 1,1 \%$ de la quantité de matière organique consommée (Fig. 41). A partir de 500 heures, la consommation organique a augmenté pour l'ensemble des systèmes re-circulés en lien avec l'amélioration de la concentration en cellules du phytoplancton observée sur les 10 derniers jours d'expérimentation. La production de pseudo-fèces organiques simulée pour l'ensemble des systèmes re-circulés est de $0,13 \pm (ET) 0,05 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g poids sec}^{-1}$ et la production de fèces organiques simulée s'est élevée à $0,06 \pm (ET) 0,02 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g poids sec}^{-1}$.

Le bilan énergétique (Fig. 42) a été négatif tout au long de l'expérimentation et quel que soit le SR. Les dépenses énergétiques représentées par la respiration ont donc été plus importantes que l'acquisition d'énergie par l'assimilation de la nourriture, soulignant une sous alimentation des huîtres. Ce bilan évolue vers une perte nulle au cours de l'expérimentation, ce qui peut être mis en relation avec le mode de calcul de l'excrétion azotée et de la respiration qui sont deux fonctions basées sur le poids de soma qui décroît lui-même tout au long de l'expérimentation. Les pertes entre l'énergie absorbée et l'énergie assimilée correspondent à l'excrétion azotée et se sont élevées à plus de 60 % pour le SR 4 et ont représenté une moyenne de 30 % pour les SR 1, 3 et 6. La respiration s'est élevée en moyenne à $5 \pm (ET) 0,5 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ et présente une évolution linéaire et décroissante tout au long des 5 semaines d'expérimentation.

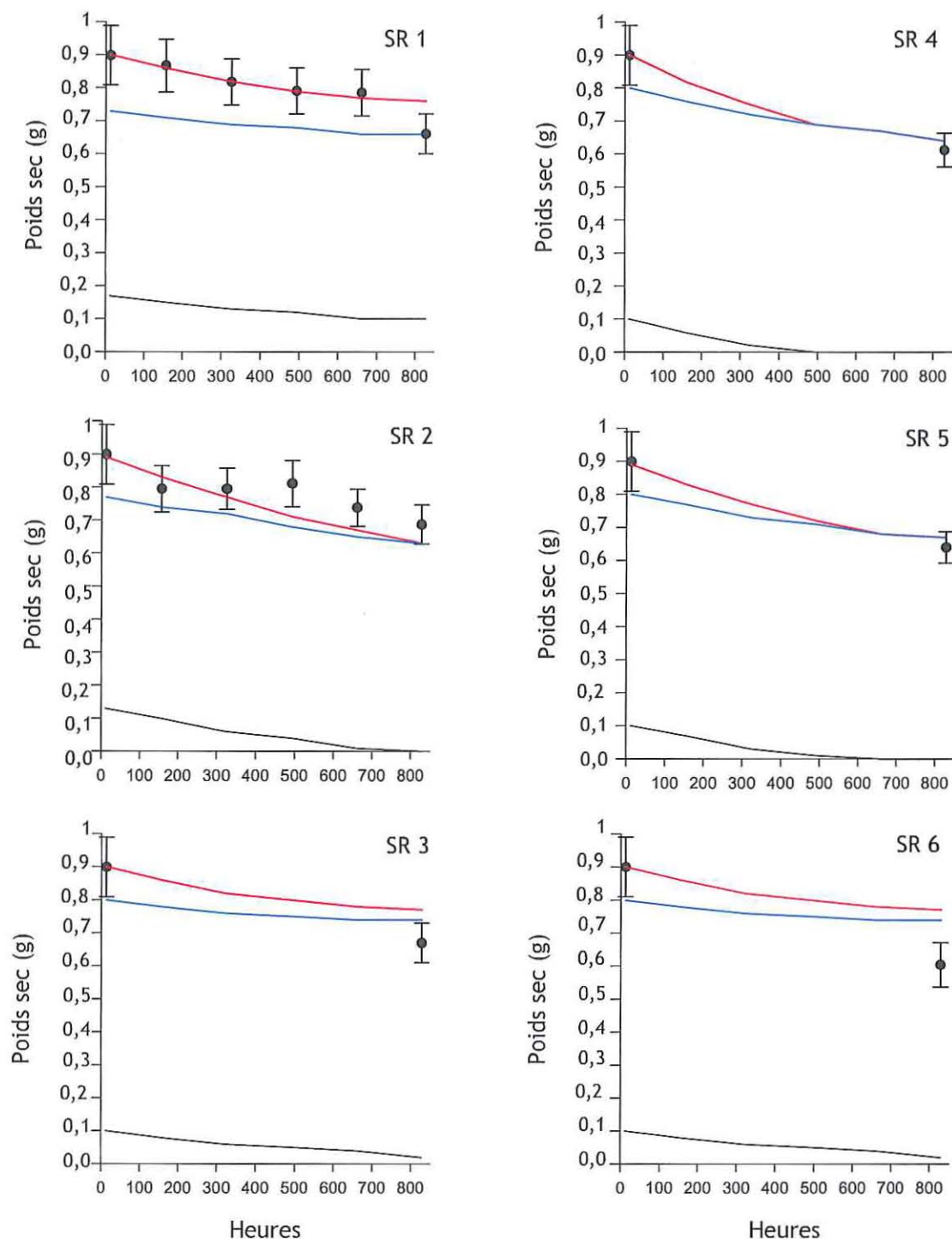


Figure 40. Evolution des poids sec, poids de soma et poids de réserve des huîtres *Crassostrea gigas* sur les 6 systèmes re-circulés (SR) au cours d'une sauvegarde de 5 semaines. — : poids sec simulé, — : poids de soma simulé, — : poids de réserve simulé, ● : poids sec observé. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95% (n=40).

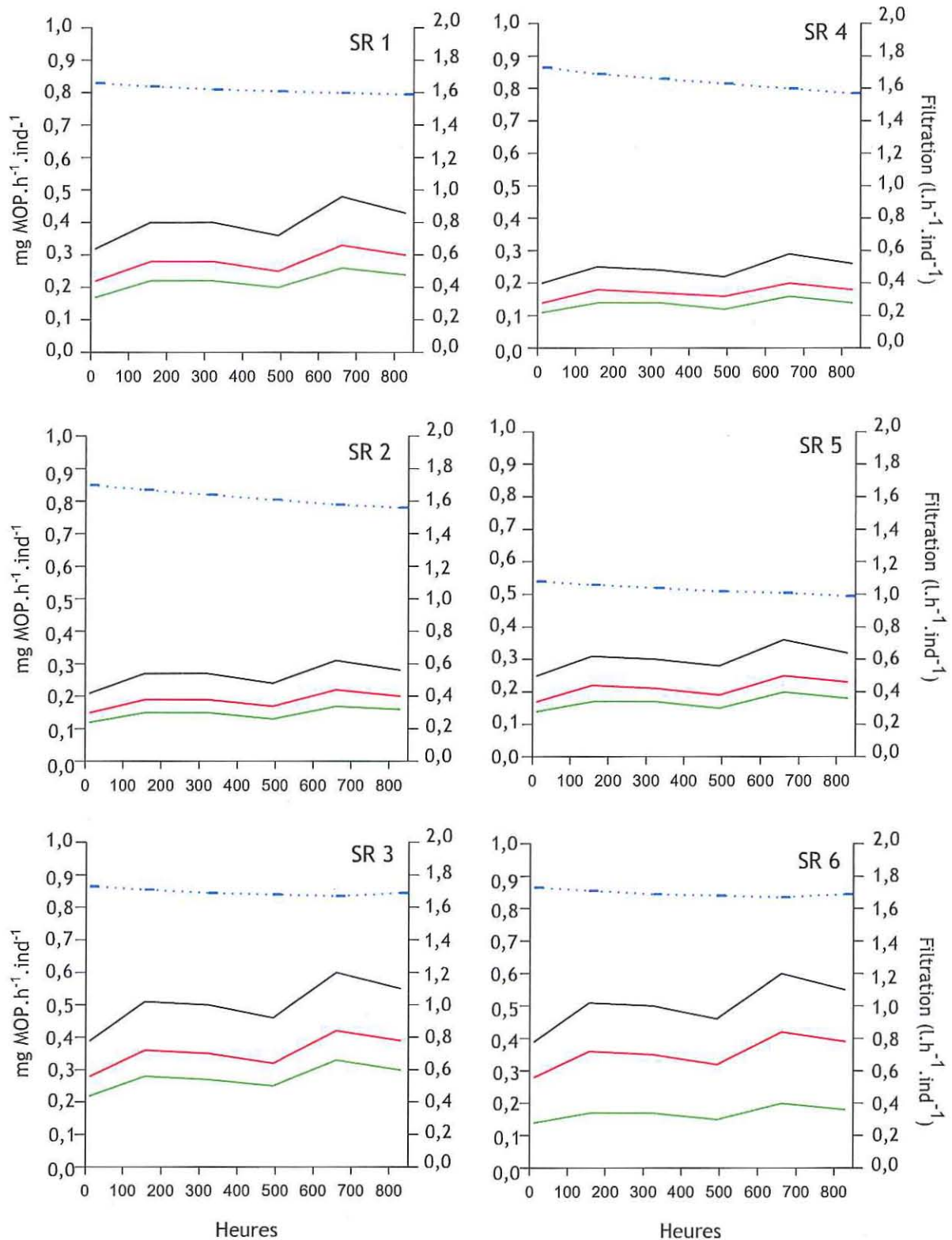


Figure 41. Simulation de l'évolution des fonctions liées à l'alimentation chez l'huître *Crassostrea gigas* au cours d'une sauvegarde de 5 semaines en système re-circulé. — : consommation organique, — : ingestion organique, — : absorption organique, - - - : filtration.

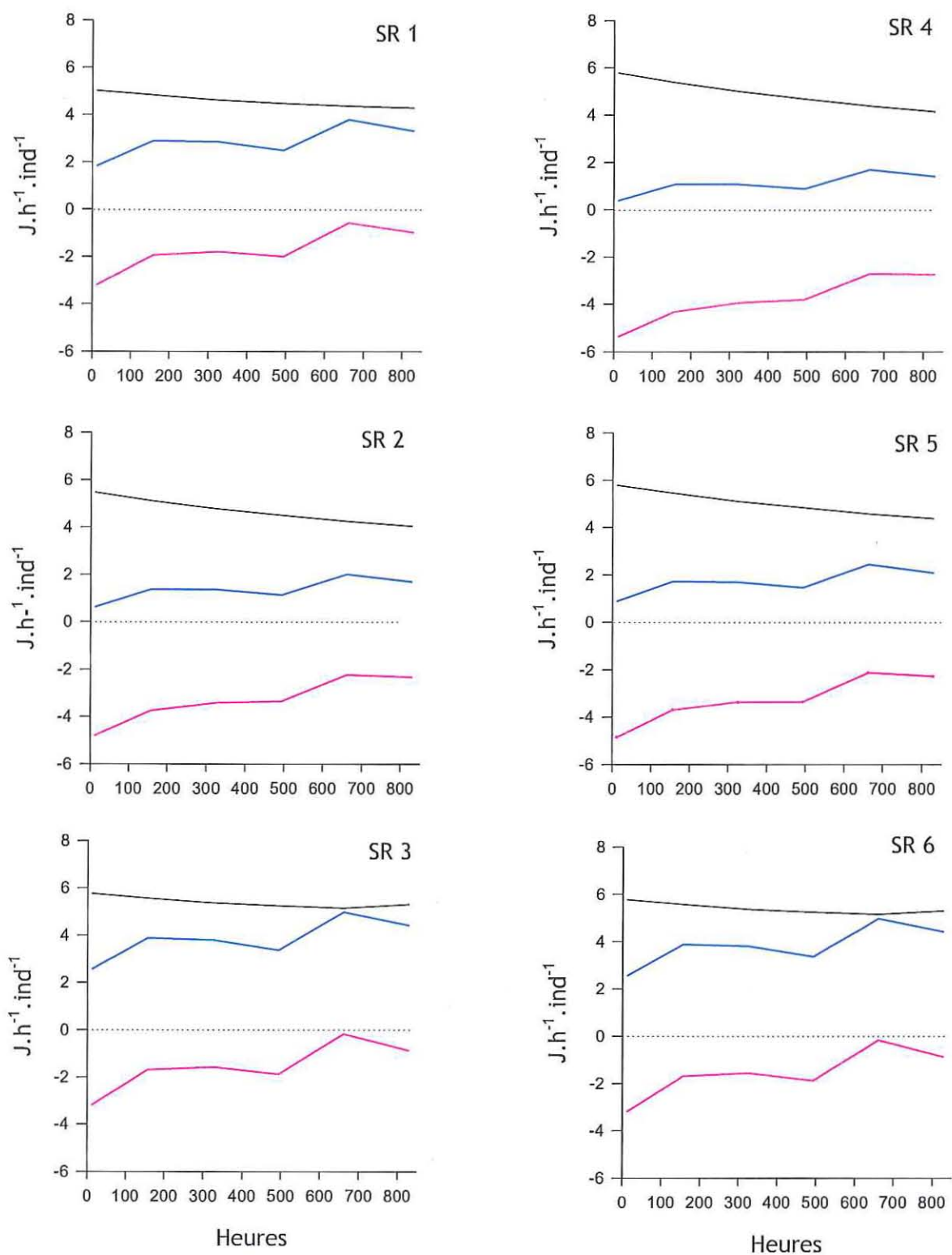


Figure 42. Simulation de l'évolution de l'énergie absorbée chez l'huître *Crassostrea gigas* au cours d'une sauvegarde de 5 semaines en système re-circulé. — : respiration, — : assimilation, — : bilan énergétique.

Evolution des matières azotées dissoutes

Après 180 h d'expérimentation, l'azote ammoniacal total (AAT) a montré un pic de concentration (Fig. 43 A), plus ou moins élevé selon les conditions de stockage, suivi d'une chute puis d'une stabilisation à partir de 480 h. Les concentrations en azote nitrique (N-NO₃⁻) (Fig. 43 B) ont montré un pic plus marqué pour les SR 3, 4 et 5 après 300 h d'expérimentation suivi d'une stabilisation des concentrations à partir de 400 h.

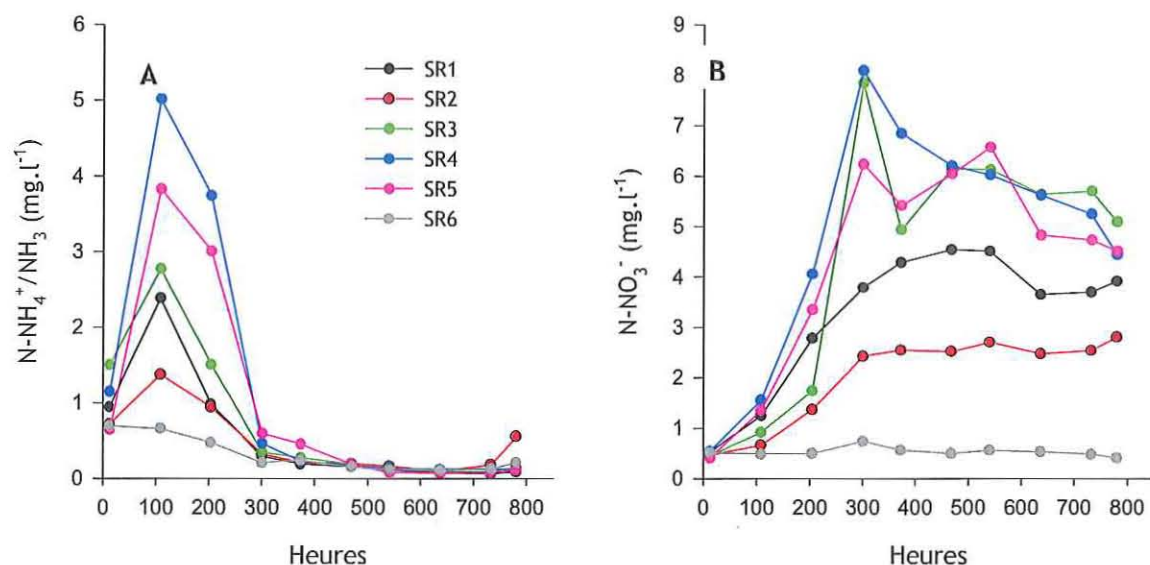


Figure 43. Evolution des concentrations en éléments azotés mesurées au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en système re-circulé de 5 semaines. A : Evolution de l'azote ammoniacal total. B : Evolution de l'azote nitrique.

Cette deuxième phase est caractérisée par des différences significatives entre les 6 SR (ANOVA, $p < 0,05$; $F = 74,12$) et une homogénéité des concentrations en nitrate entre les SR 3, 4, 5 (ANOVA, $p = 0,67$; $F = 0,41$). Ainsi, les deux facteurs testés dans ces systèmes, la vitesse du courant et la quantité de nourriture, n'influencent pas les concentrations en nitrate. Les concentrations en matières azotées dissoutes ont été les plus faibles dans le SR 6 en raison de la dilution engendrée par le taux de renouvellement de 10 % par heure. Les SR 1 et 2, caractérisés par des charges moins importantes, ont montré des concentrations plus faibles que les autres systèmes ne dépassant pas les 2,5 mg.l⁻¹ de AAT et 5 mg.l⁻¹ de nitrate. Ce sont finalement les SR 3, 4 et 5 qui ont montré des concentrations les plus importantes, pouvant atteindre 5 mg.l⁻¹ en AAT et 8 mg.l⁻¹ en nitrate. Les systèmes SR 3 à SR 5 étaient caractérisés par les charges les plus importantes. En ce qui concerne la modélisation, la variable d'état N-NH₄⁺/NH₃ est alimentée par l'azote issu de l'ammonification des biodépôts et par l'excrétion des huîtres. La quantité de biodépôts soumise à l'ammonification a été estimée à 1 % de la MOP. Les flux sortants

sont multiples : i) l'azote ammoniacal total (AAT) quitte le système par renouvellement de l'eau, ii) les pertes liées à une volatilisation de l'azote (pertes NH_4) et iii) la nitrification transformant l'AAT en N-NO_3^- . Le coefficient caractérisant les pertes en $\text{N-NH}_4^+/\text{NH}_3$ a été calibré à l'aide des concentrations d'AAT mesurées expérimentalement. Cette calibration n'a pas permis d'obtenir une valeur unique pour l'ensemble des 6 conditions testées. Une valeur de 28 a donc été retenue pour les SR 1 et 2 et de 2 pour les SR 3 à 6 (Tableau 11). Les pertes constatées sur les SR 1 et 2 ont été plus de 14 fois supérieures à celles constatées dans les SR 3 à 6 (Tableau 11). La différence dans la taille des bacs (90 l contre 1300 l) et l'hydrodynamisme peuvent être à l'origine d'un dégazage (air-lift) plus important expliquant cet écart. La nitrification est le flux principal d'élimination de l'AAT, elle a été modélisée à partir de l'équation de Monod avec une constante de demi-saturation (K_s) et un taux maximal de nitrification (J_{max}) établis pour des filtres biologiques utilisés en système re-circulé de poissons (Tableau 11). La surface prise en compte dans cette équation correspond à la surface des coquilles des huîtres (faces internes et faces externes) qui servent de support aux bactéries nitrifiantes. Ces surfaces ont été mesurées pour des huîtres de tailles commerciales (60-80 g) comme démontré au chapitre 3.1 et représentent en moyenne $73,3 \text{ cm}^2$ (face interne) et 102 cm^2 (face externe). L'évolution des concentrations en matières azotées dissoutes (Fig. 43) suggère que la nitrification n'est pleinement efficace qu'au bout de plusieurs jours et que cette activité augmente progressivement. Les mesures expérimentales ont montré une décroissance de la concentration en AAT au bout d'une centaine d'heures seulement (Fig. 43) mettant en évidence que l'activité de nitrification par la population bactérienne n'est pas pleinement efficace dès le premier jour de sauvegarde. Ainsi, une simulation de la suppression de la nitrification a permis d'observer une accumulation exponentielle de l'azote ammoniacal total pendant les 70 premières heures due à l'accumulation de l'azote issu de l'excrétion azotée des huîtres et à l'ammonification des biodépôts (résultats non présentés). Pour modéliser ce phénomène, une variable (act nitrif) a été calibrée (Fig. 44).

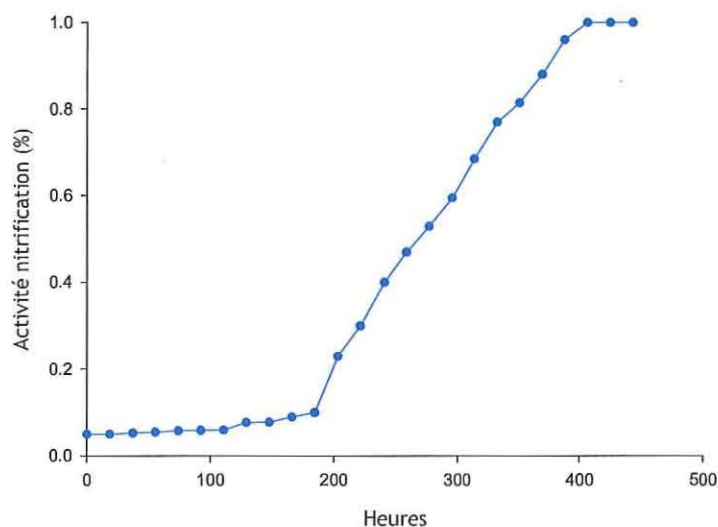


Figure 44. Evolution de l'activité de nitrification (act nitrif) observée à partir de l'évolution de la concentration en azote ammoniacal total au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en système re-circulé.

Un bilan des flux d'azote (Tableau 13) a été réalisé à partir des valeurs simulées par le modèle. La quantité d'azote a été estimée dans la chair des huîtres en tenant compte de la perte de poids sec entre le début et la fin de l'expérimentation (différence entre N entrant et N sortant). L'apport de phytoplancton, la perte d'azote (AAT et nitrate) par le renouvellement du volume d'eau (résultant uniquement de l'apport de phytoplancton dans le cas du SR 1) et les pertes en AAT et en nitrate ont été calculées sur 800 heures d'expérimentation et quantifiées en g d'azote. Les pertes en AAT ont été estimées par calibration du modèle et correspondent aux pertes possibles par volatilisation de l'azote ammoniacal. Les pertes en nitrate, estimées par calibration, regroupent l'assimilation de l'azote par des micro-organismes (algues, bactéries et champignon) en milieu anaérobie et

Tableau 13. Bilan en azote (en g de N) du SR 1 réalisé à partir des données du modèle.

	N entrant	N sortant
Huîtres (chairs)	218,40	160,21
Phytoplancton	54,90	
Renouvellement		52,96
Pertes AAT		14,78
Pertes NO ₃ ⁻		87,74
Bilan (g de N)	273,30	315,70

aérobie (Thoman et al., 2001; Van Rijn, 2002) et une possible perte par dénitrification (pertes d'azote sous forme N_2O et N_2). Ces pertes en nitrate prennent donc aussi en compte l'azote piégé dans le système re-circulé et ne représentent pas qu'une perte d'azote du système. L'azote est aussi piégé dans le système au niveau des biodépôts, (estimé à 4 g de N) et dans le volume d'eau (estimé à 5,3 g de N). Les quantités d'azote entrant dans le système re-circulé sont de 273,3 g de N pour une quantité sortante de 315,70 g de N. Ce bilan n'est donc pas équilibré et la différence de 42,4 g de N correspondrait alors à l'azote piégé dans le système et 33,1 g de N (différence constatée moins l'azote piégé dans les biodépôts et le volume d'eau) ne sont pas identifiés. L'amaigrissement des huîtres au cours des 5 semaines de sauvegarde s'est traduit par une perte d'azote de 58,19 g de N (218,4 moins 160,21 g de N) et autant d'azote ont été apporté par le phytoplancton (54,90 g de N) que perdu par le renouvellement de l'eau du système re-circulé (52,96 g de N).

Les simulations de l'évolution des matières azotées dissoutes (Fig. 45) ont montré des résultats proches des valeurs observées avec un écart pour les SR 4 et 5. Le modèle a sous estimé l'effet de la dilution liée au taux de renouvellement pour la concentration en $N-NO_3^-$ du SR 6, avec une augmentation de l'azote nitrique montrant une pente plus importante que les valeurs expérimentales. Comme pour les valeurs observées, le modèle a simulé une croissance de l'AAT avec un pic au bout de 100 h d'expérimentations puis une chute de concentrations après 400 h pour se stabiliser à une valeur résiduelle inférieure à $0,1 \text{ mg } N-NH_4^+ \cdot l^{-1}$. Le modèle a aussi correctement simulé la croissance de l'azote nitrique jusqu'à un plateau atteint au bout de 300h. Seuls les SR 4 et 5, caractérisés par un apport en nourriture moins important et une vitesse de courant plus forte, ont vu leurs concentrations en AAT et $N-NO_3^-$ simulées sous estimées par rapport aux valeurs expérimentales. Ce constat permet de suggérer que la vitesse du courant et l'apport en nourriture sont deux variables forçantes dont les effets n'ont pas été correctement transcrits dans le modèle et nécessiteraient alors une étude plus approfondie.

Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité (Fig. 46) a montré que le paramètre resp 3 a été le plus influent pour les trois variables testées (poids sec, NH_4 et NO_3) avec des variations allant de 86 à plus de 120 % lorsque ce paramètre est augmenté de 10 % et de 33 à 82 % pour une diminution de 10 %. La forte sensibilité des variables à ce paramètre, impliqué dans le calcul de la respiration, s'explique par la formulation de l'équation de Bougrier et al. (1995) qui est de type exponentielle. Les variables NH_4 et NO_3 sont en plus sensibles aux paramètres exc1 et Ks qui sont impliqués dans la loi d'excrétion azotée et dans la

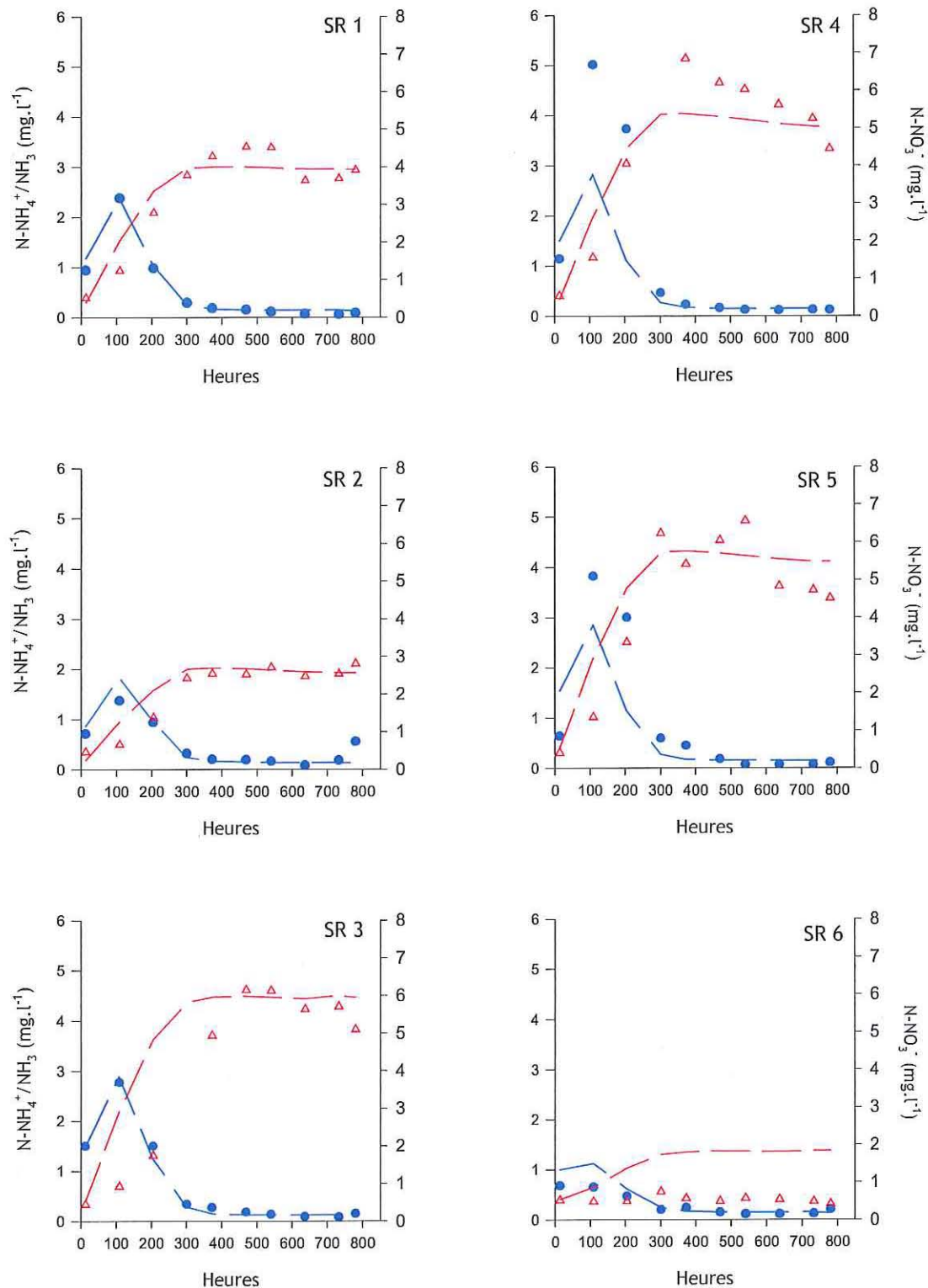


Figure 45. Simulation de l'évolution de l'azote ammoniacal total ($N-NH_4^+/NH_3$) et de l'azote nitrique ($N-NO_3^-$) au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines dans 6 systèmes re-circulés (SR) soumis à des conditions différentes (tableau 8).
 --- : Azote Ammoniacal Total : simulations, ● : Azote Ammoniacal Total: observations, ▲ : $N-NO_3^-$: simulations, - - - : $N-NO_3^-$: observations.

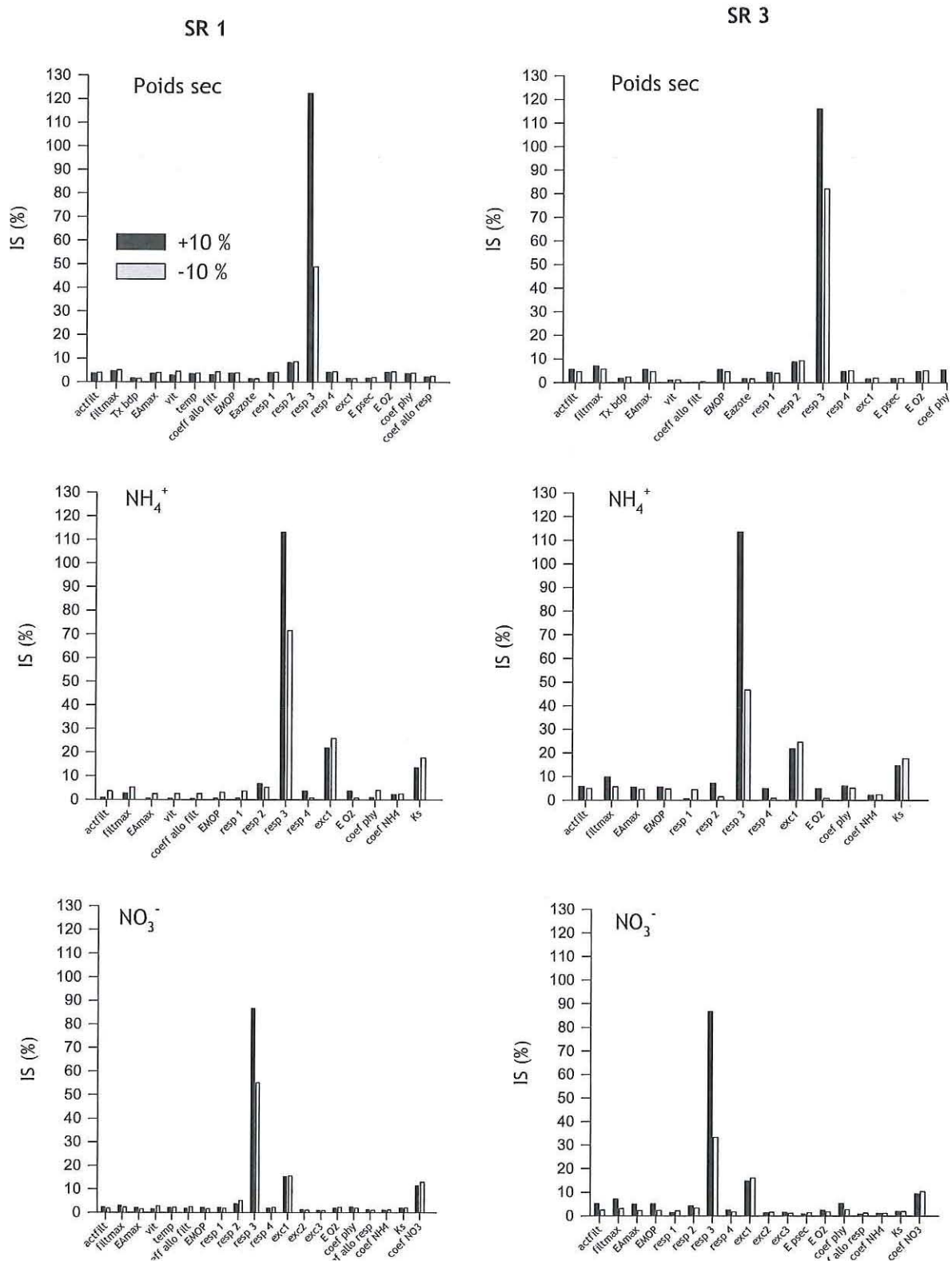


Figure 46. Indice de sensibilité (IS) pour les différents paramètres du modèle élaboré à l'occasion de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* en systèmes re-circulés (SR). Une variation, non simultanée de +10 % (noir) et -10 % (gris) de chaque paramètre, est présentée pour les deux types de SR (SR 1 et SR 3) et pour trois variables d'états : Poids sec, NH_4 et NO_3^- . Seuls les paramètres les plus sensibles ont été retenus.

nitrification. Ils représentent les deux principaux flux alimentant les variables NH_4 et les NO_3 . Enfin, le paramètre modulant les pertes en nitrates, coef NO_3 , influence de 9 à 13 % la concentration en nitrates dans les deux SR testés. L'ensemble des autres paramètres ont montré des sensibilités similaires quel que soit le type de système re-circulé considérés, le SR 1 d'un volume de 1300 l ou le SR 3 de 90 l.

3.3.4- Discussion

Evolution du poids sec

L'accumulation du phytoplancton les 4 premiers jours (96 h) laisse supposer une activité de filtration réduite des huîtres en début d'expérimentation et une possible période d'acclimatation plus marquée pour le SR 5 soumis à la vitesse de courant la plus importante. Les huîtres prélevées dans le milieu naturel au mois de mars ont été directement placées dans les systèmes re-circulés (16°C) et ont alors subi un choc thermique certain de 6 à 7 $^\circ\text{C}$ (température estimée à $10\text{-}11^\circ\text{C}$ en mars). Les expérimentations réalisées sur l'évaluation du stress (chapitre 2.1) ont montré une perturbation de l'activité de filtration de l'huître d'une trentaine d'heures pour une même amplitude de variation de température (de 6°C). Dans la présente étude, la prise de nourriture semble débiter au bout de 4 jours ce qui suggère une sous-estimation de cette période d'acclimatation ou bien que d'autres phénomènes se sont cumulés, perturbant les bivalves plus longtemps. L'impact de la vitesse du courant dans le SR 5 serait ainsi à prendre en compte comme un paramètre supplémentaire pour déterminer cette durée d'acclimatation. Cet effet de la vitesse du courant a été nettement visible sur la filtration des huîtres du SR 5 qui a été inférieure à celle des autres SR (Fig. 41). De plus, l'impact de la vitesse du courant sur le poids sec des individus semble sensiblement le même que celui induit par une réduction de l'apport de nourriture.

La proportion de phéophytine mesurée dans les cultures de phytoplancton représente 4 % de la chlorophylle *a* (données personnelles) alors que les quantités de phéophytine mesurée dans les SR ont été jusqu'à 4 fois supérieures aux concentrations en chlorophylle *a*. Ainsi, la part importante des produits dégradés de la chlorophylle *a* témoigne de la forte présence de matière détritique dans l'eau du système re-circulé et les faibles valeurs en chlorophylle *a* suggèrent qu'une faible quantité de phytoplancton est restée en suspension.

Une corrélation de Pearson ($r^2= 0,31$; $p < 0,05$) montre qu'aucune corrélation n'a pu être établie entre la concentration en MOP mesurée dans le milieu et la concentration mesurée en chlorophylle *a*, ce qui permet de suggérer que la MOP présente dans le système re-circulé ne provient pas uniquement d'organismes chlorophylliens tel que le

phytoplancton apporté comme nourriture. La présence de matière détritique dans l'eau laisse supposer que les biodépôts produits par les huîtres seraient remis en suspension après une sédimentation dans le fond du bac de stockage. Ces biodépôts sont composés d'une part de matière organique correspondant à une fraction des microalgues consommées et rejetées sous forme de pseudo-fèces et de mucus enrobant l'ensemble des particules organiques et inorganiques. Ces agrégats de biodépôts sont à nouveau remis en suspension dans l'eau puis filtrés et consommés par les huîtres, subissant un nouveau traitement des particules, via les mécanismes de sélection pré-ingestive. Le coefficient de 30 % qui s'applique à la production de pseudo-fèces pourrait être sous-estimé. En effet, les huîtres peuvent opérer un rejet sélectif plus efficace de la matière organique dégradée (Pastoureaud et al., 1996; Barillé et al., 1997b). La remise en suspension de cette matière organique détritique pourrait être attribuée à l'air-lift qui assure la mise en mouvement de la masse d'eau mais qui a l'inconvénient de créer des turbulences qui ont apparemment limité la sédimentation des particules biodéposées. Ce phénomène est d'autant plus probable pour les SR 1 et 2 dont les volumes d'eau étaient plus importants et qui ont nécessité un apport d'air de 120 l.min^{-1} , contre 10 l.min^{-1} pour les autres systèmes re-circulés. Ces rejets sous forme de pseudo-fèces se sont élevés en moyenne à $0,13 \pm (\text{ET}) 0,05 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ et la production de fèces, qui correspond aux MOP ingérés mais non absorbés, s'est élevée à $0,06 \pm (\text{ET}) 0,02 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$. La production de fèces organiques est donc deux fois moins importante que la production organique de pseudo-fèces, or cette proportion semble sous-estimée car pour des valeurs de MES inférieures à 10 mg.l^{-1} , la quantité de fèces produite devrait être équivalente ou supérieure aux pseudo-fèces (Deslous-Paoli et al., 1992). Ces auteurs ont aussi estimé une production de pseudo-fèces organiques de $0,39$ à $0,77 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ et de fèces organiques de $0,94$ à $1,07 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ pour une concentration en MES de 6 à 8 mg.l^{-1} . De même, Barillé et al. (2003) ont mesuré des productions de fèces de $3 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ et de pseudo-fèces de $5 \text{ mg MOP.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ pour des concentrations en MES de 15 mg.l^{-1} et en MOP comprises entre $3,3$ et $5,7 \text{ mg.l}^{-1}$, confirmant une sous-estimation des biodépôts par le modèle.

Le modèle n'a pas permis non plus de simuler correctement l'évolution de la concentration en MOP. Ce constat pourrait être expliqué par les hypothèses émises précédemment, les concentrations en MOP observées ont pris en compte de la matière détritique remise en suspension alors que le modèle n'a pas été construit pour simuler ce phénomène. Les faibles concentrations en MOP simulées suggèrent que les quantités de phytoplancton apportées dans le système re-circulé sont faibles et l'évolution des poids sec des individus a conforté ce constat. La simulation des concentrations en MOP a montré que le modèle a réagi de la même manière pour les SR 3, 5 et 6 laissant supposer que la vitesse de courant et le taux de renouvellement n'ont pas d'effet sur les concentrations en

MOP. Les concentrations en MOP des SR 2 et 4 ont présenté une évolution similaire suggérant que le modèle réagit de la même manière pour un apport de phytoplancton plus faible (SR 4) ou une dilution plus importante dans le milieu (SR 2).

La perte de poids sec des huîtres dans les six conditions testées indique que les quantités de phytoplancton (10^8 cellules.huître⁻¹.jour⁻¹) apportées au cours des 5 semaines de sauvegarde ont été insuffisantes alors qu'elles étaient estimées suffisantes dans des conditions d'affinage pour une température légèrement plus faible de 14°C (Méléder et al., 2001). Les mortalités ont été faibles mais pourraient augmenter si la durée de la sauvegarde était prolongée de quelques jours. En effet, la disparition totale des réserves et la diminution du poids du soma suggèrent que les huîtres sont en condition d'amaigrissement (Fig. 40). Une simulation de l'évolution du poids sec des huîtres au cours de 5 semaines de sauvegarde pour les 6 SR a permis de définir une concentration optimale de phytoplancton à apporter (courbes non présentées). Les SR 1, 3 et 4 nécessiteraient un apport de 2.10^8 cellules.huître⁻¹.jour⁻¹ alors que le SR 2, 5 et 6 nécessiterait un apport de 3.10^8 cellules.huître⁻¹.jour⁻¹. Cet apport est sensible à la fois à la charge en huîtres (SR 2), la vitesse du courant (SR 5) et le taux de renouvellement (SR 6). Ainsi, le SR 2 a une charge inférieure aux autres SR (90 kg.m^{-3} contre 138 et 167 kg.m^{-3}) ce qui implique un apport de phytoplancton moins important que pour le SR 1, pour un même volume et donc une dilution plus importante des cellules alors que les huîtres des deux SR ont une filtration équivalente ($1,6 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$). Les huîtres du SR 5 ont montré une filtration moins élevée en raison d'une vitesse de courant de 8 cm.s^{-1} contre 3 cm.s^{-1} pour les autres SR, une concentration de phytoplancton supérieure est donc nécessaire pour compenser cet effet. Enfin, le taux de renouvellement de 10 % par heure appliqué au SR 6 dilue le phytoplancton, nécessitant un apport plus important pour permettre aux huîtres de filtrer une quantité de microalgues suffisante pour maintenir un bilan énergétique positif.

Une simulation de l'effet de trois concentrations distinctes de phytoplancton sur les variables, poids sec, concentration en AAT et en azote nitrique (Fig. 47) montre qu'un apport de phytoplancton de 3.10^8 cellules.ind⁻¹.jour⁻¹ entraînerait une prise de poids de plus de 150 % pour les huîtres, sans pour autant perturber la qualité de l'eau puisque les concentrations en AAT évoluent peu, ne dépassant pas le seuil de $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ et les valeurs en fin d'expérimentation restent inférieures à 1 mg.l^{-1} . L'azote nitrique présente une évolution différente avec, pour un apport de 3.10^8 cellules.ind⁻¹.jour⁻¹, une augmentation de sa concentration de 30 % par rapport à celle observée avec un apport de nourriture 3 fois moins important. Au bout de 800 heures, ces concentrations en azote nitrique ne sont pas stabilisées et il serait intéressant de connaître leur évolution au-delà de 5 semaines de sauvegarde.

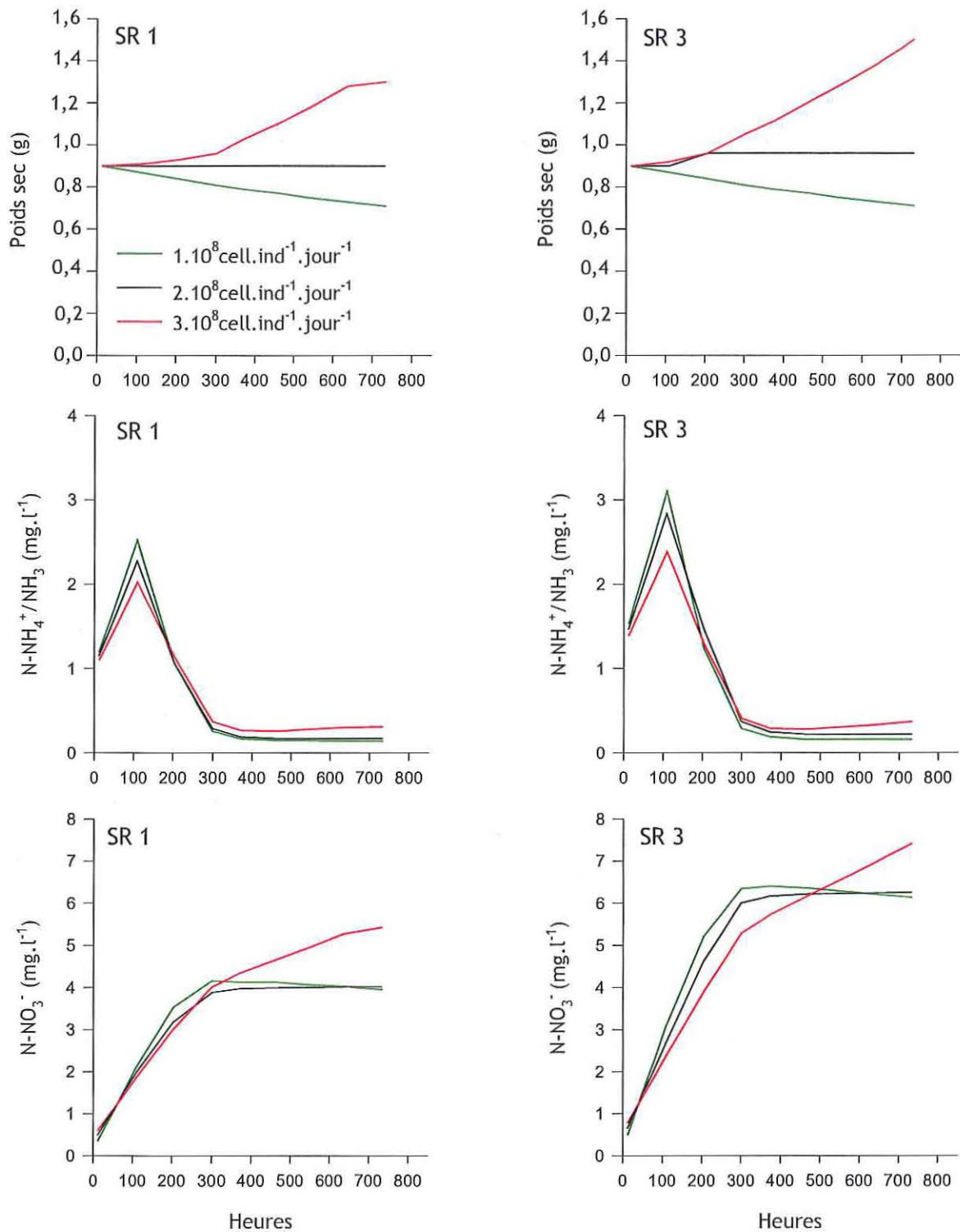


Figure 47. Simulation de l'effet de trois apports de phytoplancton (cellules.ind⁻¹.jour⁻¹) sur l'évolution de trois variables, le poids sec, l'azote ammoniacal total et l'azote nitrique au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines. Système re-circulé (SR 1), caractérisé par un volume de 1300 l et par une charge de 138 kg.m⁻³. Système re-circulé (SR 3), caractérisé par un volume de 90 l et par une charge de 167 kg.m⁻³.

Evolution des matières azotées dissoutes

La perte d'azote du système re-circulé constatée à partir des données expérimentales a été transcrite dans le modèle par deux flux (AAT et nitrate) qui peuvent regrouper un ensemble de phénomènes. L'estimation réalisée dans le bilan (Tableau 13) montre que les pertes d'azote représentent 37 % de l'azote entrant dans le système mais cette forte proportion inclue aussi de l'azote piégé dans le système re-circulé. Cependant, des pertes élevées en azote ont été mentionnées dans des systèmes re-circulés de poissons où le déficit peut représenter 9 à 21 % de l'azote entrant dans le système (Thoman et al., 2001). L'absence de lumière et les faibles concentrations en phytoplancton permettent d'éliminer une perte possible par assimilation de l'azote par les microalgues, malgré une similarité entre l'évolution des concentrations en AAT et de la concentration en chlorophylle *a*. De même, l'absence de sédiment permet d'éliminer toute possibilité de piégeage par ce substrat. Par contre, les processus engendrés par les populations bactériennes sont plus probablement impliqués. Les conditions d'oxygénation et les concentrations en oxygène constatées suggèrent que si des zones anoxiques se sont développées dans le système re-circulé au cours des 5 semaines de sauvegarde, elles sont rares et pourraient être éventuellement localisées au niveau des biodépôts accumulés en fond de bac. Les pertes en azote par dénitrification peuvent alors être considérées comme minimales puisque ce processus est réalisé par des bactéries hétérotrophes fonctionnant en anaérobiose (Herbert, 1999). Deux autres processus peuvent être mis en cause : la réduction des nitrates par assimilation (assimilatory nitrate reduction) qui est un processus réalisé en aérobiose convertissant les nitrates en nitrites puis en ammoniacal. Il permet aux bactéries, champignons et aux algues d'assimiler de l'azote pour la biosynthèse de leurs composants cellulaires (Timmons et Ebeling, 2007). Le second processus est la réduction des nitrates par dissimilation (dissimilatory nitrate reduction) ; il emprunte le même parcours métabolique (NO_3^- puis NO_2^- et NH_4^+) mais c'est un processus respiratoire utilisé par les bactéries hétérotrophes en condition anoxique (Timmons et Ebeling, 2007). Ce second procédé de transformation des nitrates a donc peu de risque d'être actif dans nos conditions. Si *a priori* la réduction des nitrates, ou ammonification des nitrates, semble avoir peu de chance d'être la cause principale des pertes d'azote constatées dans nos conditions, certaines études ont souligné que ce processus n'est pas rare dans les systèmes aquacoles en raison de l'hétérogénéité du milieu, ainsi des courtes périodes d'anaérobiose dans un environnement normalement aérobique pourraient conduire à des pertes d'azote non négligeables (Timmons et Ebeling, 2007). L'accumulation de matière organique pourrait avoir été à l'origine de micro-sites subissant des conditions anoxiques et se manifestant par des accumulations de nitrites dans le milieu. Or, les concentrations en nitrites (Fig. 48) ont atteint 43 mg.l^{-1} après 270 heures d'expérimentation en relation

avec le processus de nitrification pour se stabiliser à des valeurs de 1 mg.l^{-1} en fin d'expérimentation montrant l'absence d'accumulation en raison de processus bactériens supplémentaires. D'autres causes doivent être recherchées pour justifier cette perte. Le piégeage de l'azote par les bactéries colonisant les coquilles des huîtres (Hernández-Zárate et Olmos-Soto, 2006) ou par les micro-organismes associés aux bivalves peut être une autre piste mais un puit d'azote non identifié existe potentiellement dans le système re-circulé qui reste difficile à identifier avec les données acquises dans cette étude. Parmi les autres processus impliqués dans les flux d'azote, la nitrification est sensible à un ensemble de facteurs tels que la concentration en oxygène et le pH du milieu. Ainsi, une concentration en oxygène minimum de 2 mg.l^{-1} est requise (Wheaton et al., 1994) et le pH doit être compris entre 7 et 9 pour ne pas devenir un facteur limitant la nitrification (Chen et al., 2006). Les données expérimentales collectées montrent que la concentration en oxygène reste supérieure à 90 % de saturation, (soit $7,1 \text{ mg.l}^{-1}$ à 16°C et 34 ‰) et le pH se situe entre 7,7 à 8,2, ces facteurs ne sont donc pas limitant dans notre système. La nitrification de l'azote ammoniacal est modélisée selon l'équation de Monod avec les paramètres proposés par Chen *et al.* (2002) issus de l'étude de biofilms présents dans les filtres biologiques de systèmes re-circulés. Plusieurs études ont montré que la température n'a pas d'effet significatif sur le taux de nitrification dans une gamme de 14 à 18°C (Zhu et Chen, 2002; Malone et Pfeiffer, 2006) mais pour plus de sensibilité du modèle, l'influence de la température a été prise en compte et associée au taux de nitrification maximal ($J_s \text{ max}$). L'équation de la nitrification est rapportée à une surface de biofilm. Dans nos conditions, les coquilles des huîtres représentent elles-mêmes une surface spécifique non négligeable de $360 \text{ m}^2/\text{m}^3$ avec une activité nitrifiante importante (chapitre 3.1). Par ailleurs, les parois des bacs et des tuyaux composant le système re-circulé qui sont aussi potentiellement des supports pour le développement de biofilms ont été négligés. En effet, en début de stockage les parois sont indemnes de biofilm et il faut entre 13 à 20 jours à un biofilm afin qu'il atteigne sa densité maximum, selon le type d'organismes mis en élevage (Wietz et al., 2009). Ainsi, seule la surface des faces internes et externes des coquilles d'huîtres ont été prises en compte pour évaluer la nitrification.

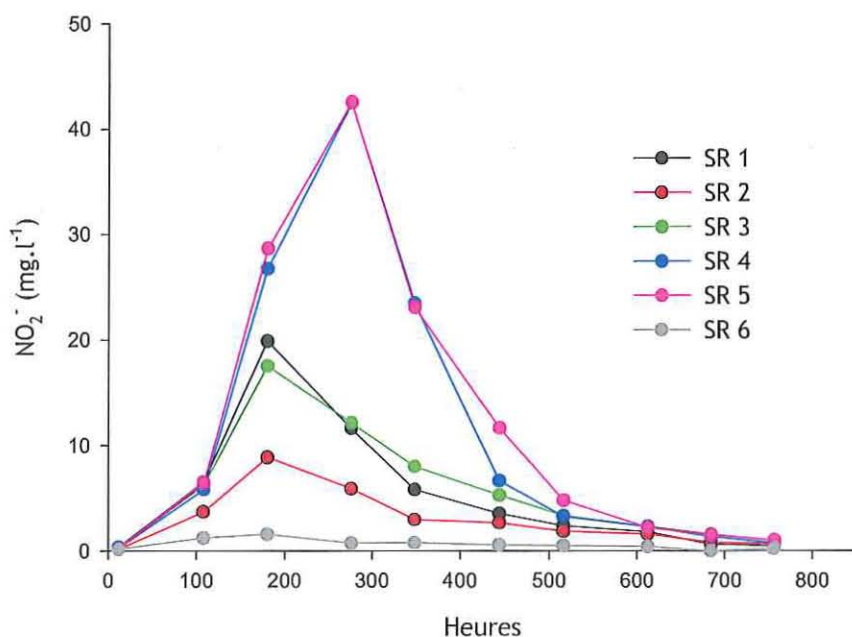


Figure 48. Evolution des concentrations en nitrites observées au cours de la sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant cinq semaines dans 6 systèmes re-circulés soumis à des conditions expérimentales différentes.

L'évolution de l'activité de nitrification (Fig. 44) est similaire à la courbe de croissance d'une population bactérienne caractérisée par une première phase de latence, observée au cours des 180 premières heures, puis une croissance exponentielle de 180 heures à 390 heures suivie d'un plateau. Ainsi, à partir de 390 heures, l'activité nitrifiante des bactéries est pleinement efficace et stable. Une perturbation de l'environnement, telles qu'une limitation en substrat (AAT ou nitrites), une accumulation de métabolites inhibiteurs ou de produits finaux ou un manque d'espace, pourraient perturber la croissance de la population bactérienne et l'activité de nitrification (Juska, 2011). Or, l'absence d'accumulation des AAT après 300 heures (Fig. 43) et des nitrites après 500 heures (Fig. 48) d'expérimentation montre que l'activité bactérienne n'a pas été perturbée et suggère alors une stabilité du milieu et l'absence de facteurs limitants. Le décalage dans l'évolution des concentrations en AAT, en nitrites et en nitrates montre la présence de deux populations bactériennes différentes. La population bactérienne oxydatrice de l'AAT est représentée par des espèces telles que *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio* alors que *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* et *Nitrospira* oxydent les nitrites en nitrates (Neubacher et al., 2008). En plus de ces bactéries autotrophes à croissance lente, des bactéries hétérotrophes, à croissance plus rapide, sont aussi impliquées dans la nitrification (Mével et Chamroux, 1986; Hagopian et Riley, 1998). Le produit final de la nitrification est les

nitrates dont la concentration se stabilise au cours du temps. Actuellement, les nitrates dans les systèmes re-circulés adaptés à l'élevage piscicole représentent un facteur limitant et leur élimination est assurée par le renouvellement de l'eau et le développement des techniques de dénitrification (Timmons et Ebeling, 2007).

Les résultats expérimentaux sur les matières azotées dissoutes ont montré un effet très net du taux de renouvellement de l'eau qui à 10 % par heure suffit à contenir les concentrations en AAT et en nitrates sous un seuil de 1 mg.l^{-1} (SR 6) au bout de cinq semaines de sauvegarde. Ce constat est favorable à une sauvegarde d'huîtres en système re-circulé dans une situation de restriction en eau. Par ailleurs, la charge est un facteur montrant une corrélation avec les valeurs d'AAT et l'azote nitrique. Le système re-circulé soumis à la vitesse de courant de 8 cm.s^{-1} (SR 5) a montré un pic de concentration en chlorophylle *a* plus important que les autres systèmes re-circulés et un pic de concentration en AAT parmi les deux plus élevés. Une vitesse plus importante nécessite un débit d'air de l'air-lift plus important produisant donc plus de turbulences et remettant d'avantage les matières particulaires en suspension. Enfin, les concentrations en AAT, nitrites et nitrates n'ont pas dépassé les seuils identifiés chez *Crassostrea virginica* comme étant perturbateur de la filtration et qui sont de 11 mg.l^{-1} pour les AAT, 140 mg.l^{-1} pour les nitrites et supérieur à 2000 mg.l^{-1} en nitrate (Epifanio et Srna, 1975).

La gamme de température définie comme la plus adaptée pour la sauvegarde d'huîtres de taille commerciale en système re-circulé a été définie entre 14 et 18°C (chapitre 1.2). Cependant, le modèle reste valide pour une température allant de 13°C à 22°C car la loi d'excrétion azotée a été élaborée dans ces limites (chapitre 3.1). Une simulation de l'effet de trois températures, 13°C , 16°C et 22°C (Fig. 49) a été réalisée sur les trois variables, poids sec, NH_4 et NO_3 , avec un apport de nourriture de 10^8 cellules.huître $^{-1}$.jour $^{-1}$. Les résultats ont montré que le poids sec de l'huître pouvait décroître en dessous de $0,6 \text{ g}$ après cinq semaines de sauvegarde à 22°C soit près de 35 % de pertes par rapport au poids initial, alors que la perte de poids serait limitée entre 5 et 7% à 13°C , selon le système re-circulé considéré en raison de coûts métaboliques plus élevés à 22°C qu'à 13°C (Bougrier et al., 1995). A 22°C et pour une charge en huîtres de 167 kg.m^{-3} , la concentration en AAT pourrait atteindre plus de $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ et serait limitée à 3 mg.l^{-1} à 13°C . Le pic de concentration en AAT observé après 100 heures d'expérimentation varie finalement peu selon la température. Par contre, les concentrations en azote nitrique simulées à 22°C s'élèvent à plus de $7,5 \text{ mg.l}^{-1}$ pour le SR 3 et à 5 mg.l^{-1} pour le SR 1. Une augmentation de température de 16°C à 22°C provoque donc une accumulation de N-NO_3^- plus importante dans le SR 3 que dans le SR 1, probablement en lien avec des pertes moins importantes constatées sur les systèmes re-circulés de 90 l. Quelles que soient les conditions de température simulées, les

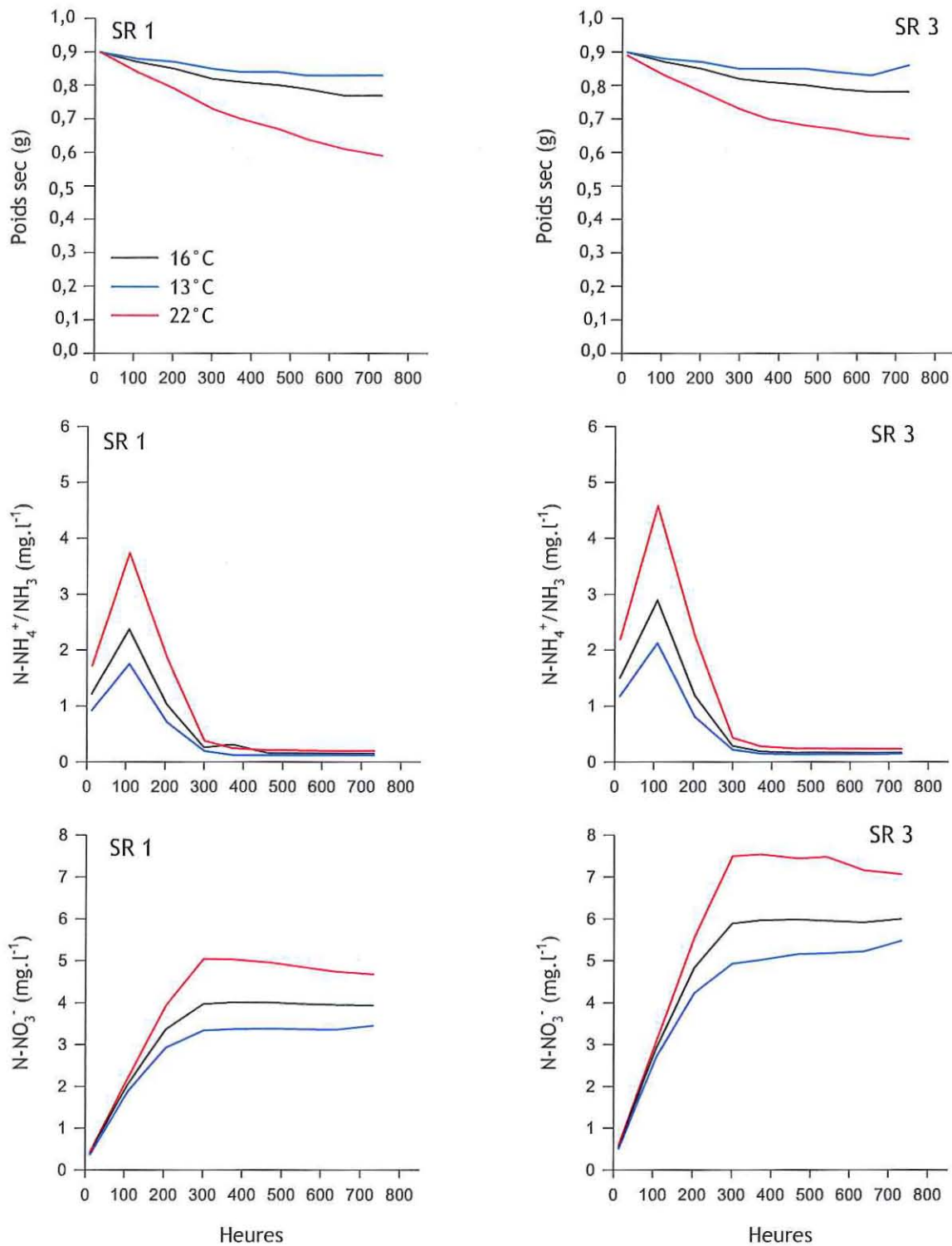


Figure 49. Simulation de l'effet de trois températures, 13°C, 16°C et 22°C sur l'évolution de trois variables, le poids sec, l'azote ammoniacal total et l'azote nitrique au cours d'une sauvegarde d'huîtres *Crassostrea gigas* pendant 5 semaines. Système re-circulé (SR 1), caractérisé par un volume de 1300 l et par une charge de 138 kg.m⁻³. Système re-circulé (SR 3), caractérisé par un volume de 90 l et par une charge de 167 kg.m⁻³.

concentrations en AAT sont en général supérieures aux concentrations mentionnées par d'autres auteurs étudiant le stockage de bivalves en système re-circulé: 0,067 mg.l⁻¹ (Epifanio et Mootz, 1976), 0,1 à 4,2 mg.l⁻¹ (Buchanan et al., 1998) ou inférieure à 0,1 mg.l⁻¹ (O'Beirn et al., 1998) et cependant, les concentrations simulées restent en dessous des seuils de toxicité pour l'huître (Epifanio et Srna, 1975).

3.3.5- Conclusion

La quantité de nourriture apportée aux bivalves est apparue nettement insuffisante pour atteindre l'objectif du maintien du poids des individus pendant cinq semaines de sauvegarde. Les conditions de confinement dans le système re-circulé semblent avoir influencé le comportement des matières particulaires et l'accessibilité des particules phytoplanctoniques aux huîtres. Une concentration en phytoplancton de 2 à 3,5.10⁸ cellules.huître⁻¹.jour⁻¹, selon les conditions expérimentales, devra ainsi être apportée à des bivalves d'un poids total moyen de 60 g pour maintenir leur poids sec constant. Cette quantité, 2 à 3 fois supérieure à celle apportée, souligne que les conditions trophiques, initialement basée sur un procédé d'affinage contrôlé en grand volume (Méléder et al., 2001) n'était pas adaptées à une sauvegarde en système re-circulé qui nécessite un apport en nourriture plus important. Une simulation a montré qu'une augmentation de la température à 22°C n'altère pas les conditions de sauvegarde alors qu'un apport de phytoplancton trois fois plus important que celui testé entraînerait une production d'azote nitrique nécessitant éventuellement la mise en place d'un procédé de dénitrification, comme pratiqué dans les systèmes piscicoles. L'action de remise en suspension des matières particulaires par le système d'air-lift et l'accumulation des biodépôts, pouvant aussi être remis en suspension, sont les deux paramètres pouvant expliquer cette différence. Les simulations réalisées ont montré qu'une sauvegarde à 22°C ne présenterait pas de risque pour le maintien de la qualité de l'eau, avec un apport de nourriture adaptée au maintien du poids sec des huîtres pendant cinq semaines de sauvegarde. L'élimination des biodépôts sera un sujet à approfondir lors d'un transfert à une échelle plus importante pour que ce paramètre ne devienne limitant pour le succès de ce procédé. Les mortalités très faibles et le maintien de la qualité de l'eau permettent cependant de valider la faisabilité d'une sauvegarde d'huîtres en système re-circulé pendant cinq semaines et avec des charges importantes de 167 kg.m⁻³. Un taux de renouvellement de 1,25 % à 10 % par heure permet de maintenir la qualité de l'eau, mais un apport de nourriture sous une forme plus concentrée pourrait permettre de diminuer davantage le renouvellement en eau du système re-circulé, en cas de restriction totale en approvisionnement en eau.

La modélisation a ici été un outil d'aide à la compréhension des mécanismes influençant le comportement des bivalves. En plus de la mise évidence du rôle de l'air-lift sur la remise en suspension des matières particulaires, l'élaboration du modèle a permis de mettre en évidence une perte d'azote du système qui peut s'élever à 30 % de l'azote entrant. Ces pertes ont été mentionnées dans la littérature sur des systèmes re-circulés piscicoles et le phénomène semble lié à une activité bactériologique, mais le sujet nécessiterait d'être approfondi pour une meilleure compréhension du phénomène.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Un procédé novateur

L'ensemble des études présentées dans ce manuscrit a permis de décrire un procédé de sauvegarde novateur à plusieurs égards. L'utilisation d'un système re-circulé pour la sauvegarde d'huîtres constitue une solution nouvelle alors que le stockage en chambre froide est plus généralement pratiqué par les professionnels. Les circonstances qui ont motivé le choix d'une sauvegarde sont encore un point d'originalité de l'étude. L'utilisation de système re-circulé se veut une réponse aux problèmes de microalgues sécrétant des toxines dont la fréquence d'apparition des blooms serait en augmentation ces dernières années (Belin, 2004). Le système re-circulé peut de plus devenir multifonctionnel, servant à sauvegarder une population de bivalves pour permettre à l'ostréiculteur de continuer à commercialiser son produit, pour une mise en quarantaine de souches exotiques ou pour une détoxification d'individus contaminés par des phycotoxines.

Les systèmes re-circulés appliqués aux bivalves ont fait l'objet de très peu d'études (Hussenot, 2006), tandis que l'élevage des poissons et des crevettes ont été les pionniers dans ce domaine. Pour l'aquaculture de ces organismes, l'optimisation des conditions de stockage était nécessaire pour la survie technique et économique de la filière (Martins et al., 2010). Le comportement sessile des bivalves et leur mode d'alimentation différent de celui des autres espèces aquacoles et n'ont pas permis de transférer directement les connaissances issues de la filière poisson ou crevette. Un certain nombre de paramètres hydrobiologiques ont donc dû être redéfinis. La complexité des structures des systèmes re-circulés habituellement mis en place a ici été revue pour favoriser un outil simple d'utilisation et moins onéreux. Ainsi, contrairement aux systèmes re-circulés mis au point pour les poissons, un système re-circulé expérimental a été conçu en adaptant la forme du bac aux clayettes utilisées par les ostréiculteurs afin d'optimiser le volume de stockage. La possibilité remarquable de fonctionner en re-circulation sans filtre biologique pour traiter les rejets azotés est une autre spécificité du stockage de bivalves.

Les réponses physiologiques au centre de l'étude

L'optimisation des conditions hydrobiologiques des huîtres a été réalisée dans des conditions expérimentales cadrées. La nécessité de limiter les risques pathologiques a imposé le choix d'une gamme de température d'une faible amplitude allant de 14 à 18°C. Une température standard de 16°C a été retenue pour l'ensemble des expérimentations. Le choix du matériel biologique s'est orienté vers des animaux de taille commerciale (46 à 85 g) et triploïdes, pour limiter le risque de ponte lié à la mise en place de la gamétogenèse. Le maintien du poids des individus pendant la sauvegarde est une priorité

économique pour les éleveurs et l'alimentation des huîtres a ainsi été analysée en détail à l'occasion de chaque expérimentation. La filtration des individus a été suivie à l'occasion d'un choc de température qui a montré une perturbation de cette réponse physiologique pendant quelques heures sans pour autant démontrer un réel impact sur le maintien du poids sec. La vitesse du courant perturbe la filtration de l'huître probablement en raison d'un effet mécanique lié à la pression exercée sur l'appareil de filtration des individus. Le maintien du poids des huîtres dépend également de l'apport d'une ration alimentaire suffisante, or la quantité de cellules phytoplanctoniques déterminée à l'occasion de procédé d'affinage (Méléder et al., 2001) ne semble pas adaptée aux conditions spécifiques d'un système re-circulé et la modélisation de l'ensemble du procédé de sauvegarde a permis de proposer une ration 2 à 3 fois supérieure, selon les conditions expérimentales. Enfin, les réponses physiologiques des bivalves sont aussi intimement liées à la qualité de l'eau et la concentration en matières azotées dissoutes a été l'autre sujet important des travaux présentés dans ce manuscrit. L'excrétion azotée des huîtres a été décrite en tenant compte de l'apport de nourriture et de la température, deux facteurs environnementaux clefs dans le système re-circulé. Moins important que ce qui est décrit dans la littérature, le flux d'azote ammoniacal qui en résulte est par contre totalement consommé par la population bactérienne associées aux coquilles des huîtres et par le probable dégazage lié au système d'air-lift. La mise en évidence de l'activité de nitrification par une population bactérienne localisée sur les faces internes et externes de la coquille des huîtres justifie l'absence de filtre biologique et représente une spécificité de la sauvegarde des bivalves en système re-circulé.

Perspectives

La sauvegarde d'huîtres en système re-circulé est donc réalisable pour une population d'individus de taille commerciale et sans objectif de croissance. Un renouvellement du volume d'eau à raison de 1 à 10 % par heure est suffisant pour maintenir la qualité de l'eau durablement et peut permettre d'envisager une utilisation de ce procédé dans des zones géographiques éloignées de la mer, en vue d'un rapprochement des points de ventes. Dans les conditions expérimentales testées ici, l'apport de nourriture a imposé un renouvellement minimum de 1 % par heure. Un autre mode de distribution pourrait alors être prospecté pour encore réduire le renouvellement, en ayant recours à un apport en microalgues deshydratées ou concentrées sous forme de pâte (Macmillan et al., 1994; Buchanan et al., 1998). Le coût de ce type d'approvisionnement devra être pris en compte pour être applicable. La facilité de production de la diatomé *Skeletonema costatum* sur le site de l'IFREMER de Bouin, n'a pas incité à tester d'autres espèces

d'algues dans le cadre de ces expérimentations, or d'autres auteurs ont travaillé avec *Isochrysis galbana* (Epifanio et Mootz, 1976), *Tetraselmis sp.* (Frias et Segovia, 2010) ou *Chaetoceros calcitrans* (Buchanan et al., 1998). Des études seront nécessaires pour connaître l'impact de différentes espèces d'algue sur la qualité de l'eau (matière en suspension, quantité d'azote excrété). L'intégration de la population de bivalves à un système couplant plusieurs espèces aquacoles (Shpigel et al., 1997; Miranda et al., 2010), est une autre solution pour résoudre le problème de l'approvisionnement en nourriture, mais peut être difficile à mettre en œuvre dans le cas d'un stockage ponctuel et soudain, en réponse à une interdiction de commercialisation. L'apport en nourriture reste donc un problème à résoudre en raison du coût de production et du temps de main d'œuvre nécessaire, alors que la filière du poisson a confié la production de l'aliment à des industriels, une solution similaire pourrait être développée avec la mise au point de granulés d'algues déshydratées par exemple.

Le consommateur reste très attaché aux qualités gustatives de l'huître, illustré par l'intérêt pour les appellations et les labels (Cardinal et al., 2000), et une sauvegarde en système re-circulé pourrait modifier les caractéristiques organo-sensorielles des huîtres, même si l'étude sur le stockage en chambre froide n'a pas montré de modification de ces caractéristiques après 15 jours en conditions émergées et à 3°C (Buzin et al., 2011). Cependant, le maintien dans une eau peu renouvelée, l'apport de nourriture monospécifique et les conditions environnementales pourraient modifier les qualités gustatives des huîtres. Le suivi de l'évolution des qualités sensorielles des huîtres pourrait alors être réalisé afin de garantir au consommateur un produit identique à celui préalablement placé en sauvegarde. A défaut, une démarche commerciale de labélisation pourrait être envisagée pour valoriser ce produit alors considéré comme nouveau.

Pour un transfert du procédé de sauvegarde en système re-circulé aux professionnels, un certain nombre de sujets doivent encore être approfondis. Ainsi, une sauvegarde réalisée sur 4 semaines avec un stock de 180 kg d'huîtres n'a pas soulevé le problème de l'élimination des biodépôts, or pour un stock d'une tonne, l'accumulation des fèces et pseudo-fèces risque d'être à l'origine de zones d'anoxies favorisant une dénitrification et risquant le relargage de produits toxiques de dégradation tel que du sulfure d'hydrogène. Si ce processus est à l'heure actuelle une voie d'élimination de l'azote des systèmes re-circulés pour poissons et crevettes (Grguric et al., 2000), la prolifération de bactéries hétérotrophes consommatrices d'oxygène et l'augmentation des matières en suspension nécessiteront d'évacuer les biodépôts du système. Le mode d'élimination doit aussi faire l'objet d'une réflexion car un siphonage du fond des bacs est difficile en présence des clayettes contenant les huîtres et obligerait à remplacer le volume d'eau perdu. Une remise en suspension des biodépôts pour une élimination par

surverse augmenterait la concentration en matière particulaire du milieu et pourrait gêner la filtration des huîtres. Cependant, l'élimination de la matière particulaire des systèmes re-circulés reste un problème quelle que soit l'espèce considérée à cause du coût engendré (Menasveta et al., 2001).

Enfin, l'utilisation des systèmes re-circulés pourrait être élargie au naissain d'huîtres en réponse aux mortalités liées à l'hépèsvirus Os HV-1 avec une sauvegarde qui se déroulerait du mois de mars au mois d'octobre permettant aux ostréiculteurs de sauver leur début de cycle de production. La sauvegarde pourrait aussi être testée sur d'autres espèces telles que la moule et la coquille Saint-Jacques dont la production et la pêche sont aussi soumises aux interdictions de commercialisation en raison de la présence d'algues toxiques. La structure des bassins, les quantités de nourriture, le maintien de la qualité de l'eau et le comportement des bivalves nécessiteraient alors d'être redéfinis avec une gestion des systèmes re-circulés probablement différente.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aaraas R, Hernar IJ, Vorre A, Bergslien H, Lunestad BT, Skeie S, Slinde E, Mortensen S, (2004). Sensory, Histological, and Bacteriological Changes in Flat Oysters, *Ostrea edulis* L., during Different Storage Conditions. *Journal of food science* 69: 205-210.
- Abadie E, Amzil Z, Belin C, Comps M-A, Elzière-Papayanni P, Lassus P, Le Bec C, Marcaillou-Le Baut C, Nézan E, Poggi R, (1999). Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*, Episode de novembre à décembre 1998 Report No. 884, Ifremer, pp 45. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/884/>.
- Allen JSK, Downing SL, (1986). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102: 197-208.
- Alunno-Bruscia M, Bourlès Y, Maurer D, Robert S, Mazurié J, Gangnery A, Gouletquer P, Pouvreau S, (2011). A single bioenergetics growth and reproduction model for the oyster *Crassostrea gigas* in six Atlantic ecosystems. Accepted after minor revision. *Journal of Sea Research* <http://archimer.ifremer.fr/doc/00037/14836/>:
- Amouroux I, (2009). Bilan National REMI 2008, Ifremer, pp 61. <http://envlit.ifremer.fr/content/download/60426/432588/version/2/file/RapportNationalREMI2008Edition2009.pdf>.
- Arzul I, Gagnaire B, Bond C, Chollet B, Morga B, Ferrand S, Robert M, Renault T, (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Diseases of aquatic organisms* 85: 67-75.
- Aslan S, Dahabb M, (2008). Nitritation and denitritation of ammonium-rich wastewater using fluidized-bed biofilm reactors. *Journal of Hazardous Materials* 156: 56-63.
- Bacher C, Baud J-P, (1992). Intensive rearing of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in an upwelling system: optimization of biological production. *Aquatic Living Resources* 5: 89-98.

B

- Bacher C, Gangnery A, (2006). Use of dynamic energy budget and individual based models to simulate the dynamics of cultivated oyster populations. *Journal of Sea Research* 56: 140-155.
- Bado Nilles A, (2008). Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle.
- Baeta A, Niquil N, Marques JC, Patrício J, (2011). Modelling the effects of eutrophication, mitigation measures and an extreme flood event on estuarine benthic food webs. *Ecological Modelling* 222: 1209-1221.
- Barillé L, (1994). Observations des éléments structuraux intervenant dans les mécanismes de nutrition pré-ingestifs chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. *Haliotis* 23: 123-137.

- Barillé L, Bougrier S, Geairon P, Robert J-M, (1993). Alimentation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* à l'aide de navicules bleues *Haslea ostrearia* (Simonsen) de différentes tailles. *Oceanologica acta* 17: 201-210.
- Barillé L, Haure J, Cognie B, Leroy A, (2000). Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 837-843.
- Barillé L, Haure J, Pales-Espinosa E, Morançais M, (2003). Finding new diatoms for intensive rearing of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture* 217: 501-514.
- Barillé L, Héral M, Barillé-Boyer A-L, (1997a). Modélisation de l'écophysiologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. *Aquatic Living Resources* 10: 31-48.
- Barillé L, Lerouxel A, Dutertre M, Haure J, Barillé-Boyer A-L, Pouvreau S, Alunno-Bruscia M, (2011). Growth of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in a high-turbidity environment: Comparison of model simulations based on scope for growth and dynamic energy budgets. *Journal of Sea Research*: in press.
- Barillé L, Prou J, (1993). Modelling Japanese oyster physiological processes under natural tidal variation in suspended particulate matter. International Council. for the Exploration of the Sea, Copenhagen (Denmark). Mariculture Committee: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/03827/>.
- Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D, (1997b). Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 212: 149-172.
- Baud J-P, (1988). Mise au point d'une stratégie de prégrossissement intensif en nurserie de palourdes (*R. philippinarum*) et d'huîtres (*C. gigas*) dans la région de la baie de Bourgneuf, Ifremer, pp 89.
- Baud J-P, Bacher C, (1990). Use of saline ground water for intensive rearing of *Ruditapes philippinarum* juveniles in a nursery system. *Aquaculture* 88: 157-178.
- Bayne BL, (1975). Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis* L. with special reference to the effects of oxygen tension and salinity. *Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp.*: 231-238.
- Bayne BL, (2009). Carbon and nitrogen relationships in the feeding and growth of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 374: 19-30.
- Bayne BL, Newell RC, (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In: Wilburg KM, Saleuddin, A.S.M. (ed) *The Mollusca*, Vol 4. Academic Press, London, p 407-515.
- Bayne BL, Scullard C, (1977). Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). *Journal of Marine Biology Ass.* 57: 355-369.
- Bayne BL, Svensson S, (2006). Seasonal variability in feeding behaviour, metabolic rates and carbon and nitrogen balances in the Sydney oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 332: 12-26.

- Belin C, (2004). Bilan sur 20 ans des interdictions administratives de vente et de ramassage des coquillages, pour présence de phycotoxines, sur le littoral français 1984-2003, Ifremer, Nantes (France), pp 84. <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/documents.htm#1>.
- Belin C, Raffin B, (1998). Toxic and harmful phytoplankton species on the French coast from 1984 to 1995, results of the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network (REPHY), Ifremer, pp 256.
- Belser LW, Mays EL, (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 505-510.
- Bendschneider K, Robinson RJ, (1952). A New Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite in Sea Water. *Journal of Marine Research* 11: 87-96.
- Beninger PG, Cannuel R, Jaunet S, (2005). Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates. *Marine Ecology Progress Series* 295: 191-199.
- Beninger PG, Dufour SC, (1996). Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudolamellibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Marine Ecology Progress Series* 137: 133-138.
- Bird PD, Glenda AJ, Holliday J, Boronowsky A, (1995) Effect of storage on the quality of purified live Pacific and Sydney rock oysters. *Conference Internationale sur la Purification des Coquillages*. Ifremer, Rennes, p 315-322.
- Blancheton JP, (2000). Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering* 22: 17-31.
- Blanco J, Acosta CP, Bermúdez de la Puente M, Salgado C, (2002). Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquatic Toxicology* 60: 111-121.
- Boardman GD, Starbuck SM, Li X, Hudgins DB, Kuhn DD, (2004). Toxicity of Ammonia to Three Marine Fish and Three Marine Invertebrates. *Environmental Toxicology* 19: 134-142.
- Bonnet M, Troadec J-P, (1985) La conchyliculture en France: Importance économique, aléas et contraintes, axes de recherche privilégiés. In: Ifremer (ed) Séminaire International sur la conchyliculture. Ifremer, La Rochelle, p 26.
- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquières G, (1995). Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134: 143-154.
- Boulter M, Seaver M, Masson D, Roden C, (1999). Depuration Centre Management, Revised Course Notes 1999, Seafish Industry Authority and Board Iascaigh Mhara, pp 210.
- Boulter M, Wilson P, (1998). The use of physiological assessment techniques for determining the relative activity rates of bivalve shellfish during simulated depuration. *Journal of Shellfish Research* 17: 1627-1631.
- Bourlès Y, Alunno-Bruscia M, Pouvreau S, Tollu G, Leguay D, Arnaud C, Gouletquer P, Kooijman SALM, (2009). Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster

Crassostrea gigas: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research* 62: 62-71.

Boyd NS, Wilson NDC, Hall BI, (1980). Storage of live Pacific oysters out of water. *New Zealand Journal of Science* 23: 171-176.

Brenner M, Ramdohr S, Effkemann S, Stede M, (2009). Key parameters for the consumption suitability of offshore cultivated blue mussels (*Mytilus edulis*) in the German Bight. *European Food Research and Technology* 230: 255-267.

Bricker SB, Longstaff B, Dennison W, Jones A, Boicourt K, Wicks C, Woerner J, (2008). Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: A decade of change. *Harmful Algae* 8: 21-32.

Buchanan JT, Roppolo GS, Supan JE, Tiersch TR, (1998). Conditioning of eastern oysters in a closed, recirculating system. *Journal of Shellfish Research* 17: 1183-1189.

Burford MA, Lorenzen K, (2004). Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization. *Aquaculture* 229: 129-145.

Buzin F, Baudon V, Cardinal M, Barillé L, Haure J, (2011). Cold storage of Pacific oysters out of water: biometry, intervalval water and sensory assessment. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 1775-1782.

C

Camargo J, Alonso Á, (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32: 831-849.

Camus L, Grosvik BE, Borseth JF, Jones MB, Depledge MH, (2000). Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Marine environmental Research* 50: 325-329.

Cao R, Xue C-H, Liu Q, (2009a). Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 131: 272-276.

Cao R, Xue C-h, Liu Q, Xue Y, (2009b). Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech Journal of Food Sciences* 27: 102-108.

Cardinal M, Cornet J, Donnay-Moreno C, Gouyguou JP, Bergé JP, Rocha E, Soares S, Escórcio C, Borges P, Valente LMP, (2011). Seasonal variation of physical, chemical and sensory characteristics of sea bream (*Sparus aurata*) reared under intensive conditions in Southern Europe. *Food Control* 22: 574-585.

Cardinal M, Demaimay M, Berdagué JL, (2000) Peut-on caractériser et identifier l'origine des huîtres? Conference proceedings 6 èmes journées Européennes Agro-Industrie et Méthodes Statistiques, Pau, France

Cardoso JFMF, Witte JIJ, van der Veer HW, (2006). Intra- and interspecies comparison of energy flow in bivalve species in Dutch coastal waters by means of the Dynamic Energy Budget (DEB) theory. *Journal of Sea Research* 56: 182-197.

- Castaing JB, Massé A, Pontié M, Séchet V, Haure J, Jaouen P, (2010). Investigating submerged ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes for seawater pre-treatment dedicated to total removal of undesirable micro-algae. *Desalination* 253: 71-77.
- Chang KLB, Chang J, Shiao C-Y, Pan BS, (1998). Biochemical, Microbiological, and Sensory Changes of Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*) under Partial Freezing and Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 682-686.
- Chaparro OR, Montiel YA, Segura CJ, Cubillos VM, Thompson RJ, Navarro JM, (2008). The effect of salinity on clearance rate in the suspension-feeding estuarine gastropod *Crepidula dilatata* under natural and controlled conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 861-868.
- Chapelle A, (1995). A preliminary model of nutrient cycling in sediments of a Mediterranean lagoon. *Ecological Modelling* 80: 131-147.
- Chen S, Ling J, Blancheton J-P, (2006). Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering* 34: 179-197.
- Christophersen G, Torkildsen L, Van der Meeren T, (2006). Effect of increased water recirculation rate on algal supply and post-larval performance of scallop (*Pecten maximus*) reared in a partial open and continuous feeding system. *Aquacultural Engineering* 35: 271-282.
- Chytiri S, Chouliara I, Savva IN, Kontominas MG, (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology and safety* 21: 157-165.
- Cochennec N, Baud J-P, Pépin JF, Benabdelmouna A, Soletchnik P, Lupo C, Garcia C, Arzul I, Boudry P, Huvet A, Pernet F, Bachere E, Bedier E, Petton B, Gaussem F, Stanisière JY, Dégremont L, (2011). Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : acquis des recherches en 2010, Ifremer, pp 32. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00033/14423/>.
- Cognie B, Haure J, Barillé L, (2006). Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259: 249-259.
- Colt JE, Armstrong DA, (1981) Nitrogen Toxicity to Crustaceans, Fish, and Molluscs. In: Allen LK, EC (ed) *Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. Bethesda, MD (USA) of the Fish Culture Section American Fisheries Society, Traverse City, MI (USA), p 34-47.
- Comps M, Duthoit J-L, (1976). Viral infection associated with "gills disease" of the portuguese oyster *Crassostrea angulata* LMK. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris* 283: 1595-1597.

D

- Dame RF, Zingmark RG, Haskin E, (1984). Oyster reefs as processors of estuarine materials. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 83: 239-247.

- Datta S, Xue Q, Janes M, Losso J, La Peyre J, (2005). Potential use of lysosyme from shell liquor of eastern oysters against bacteria causing food poisoning and food spoilage. *Journal of Shellfish Research* 24: 650.
- Davis JP, (1988). Energetics of sterile triploid oysters uncouple the reproductive and somatic effort of diploids. *Journal of Shellfish Research* 7: 114, Abstract.
- Decottignies P, (2006). Mécanismes d'alimentation et régimes trophiques de deux mollusques suspensivores invasifs en baie de Bourgneuf, *Crassostrea gigas* et *Crepidula fornicata* : comparaison et implications. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, Nantes.
- Demetropoulos C, Langdon C, (2004). Pacific dulse (*Palmaria mollis*) as a food and biofilter in recirculated, land-based abalone culture systems. *Aquacultural Engineering* 32: 57-75.
- Denis L, Alliot E, Grzebyk D, (1999). Clearance rate responses of Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to variations in the flow, water temperature, food quality and quantity. *Aquatic Living Resources* 12: 279-288.
- Deslous-Paoli J-M, Héral M, Gouletquer P, Boromthanasarat W, Razet D, Garnier J, Prou J, Barillé L, (1987). Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles/Seasonal evolution of the filtration of intertidal molluscs in natural conditions. *Océanis* 13: 575-579.
- Deslous-Paoli J-M, Lannou A-M, Geairon P, Bougrier S, Raillard O, Héral M, (1992). Effects of the feeding behaviour of *Crassostrea gigas* (Bivalve Molluscs) on biosedimentation of natural particulate matter. *Hydrobiologia* 231: 85-91.
- Dubuisson-Quellier S, (2001). Impacts des informations produites par l'IFREMER sur la qualité des eaux littorales dans la production et la commercialisation des coquillages, pp 271. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1740/>.
- Dutertre M, Barillé L, Haure J, Cognie B, (2007). Functional responses associated with pallial organ variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 139-151.
- Dutertre M, Beninger PG, Barillé L, Papin M, Rosa P, Barillé A-L, Haure J, (2009). Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquatic Living Resources* 22: 319-329.

E

- Ebeling JM, Wheaton FW, (2006). In-situ Determination of Nitrification Kinetics and Performance Characteristics for a Bubble-Washed Bead Filter. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 7:
- Eckman JE, Peterson CH, Cahalan JA, (1989). Effects of flow speed, turbulence, and orientation on growth of juvenile bay scallops *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 132: 123-140.
- Emerson DN, (1969). Influence of salinity of ammonia excretion rates and tissue constituents of euryhaline invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 29: 1115-1133.

Epifanio, Mootz, (1976). Growth of oysters in a recirculating maricultural system. Proceedings of the National Shellfisheries Association 65: 32-37.

Epifanio CE, Srna RF, (1975). Toxicity of Ammonia, Nitrite Ion, Nitrate Ion, and Orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. Marine Biology 33: 241-246.

Erkan N, (2005). Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and selected chemical decomposition indicators. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2625-2630.

Etheridge SM, (2010). Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. Toxicon 56: 108-122.

F

Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, Le Pennec M, Pouvreau S, (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture 250: 458-470.

FAO, (2009). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp

FAO, (2010). Fishery and Aquaculture Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 100. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>.

Ferreira JG, Sequeira A, Hawkins AJS, Newton A, Nickell TD, Pastres R, Forte J, Bodoy A, Bricker SB, (2009). Analysis of coastal and offshore aquaculture: Application of the FARM model to multiple systems and shellfish species. Aquaculture 289: 32-41.

Fiala-Medioni A, Copello M, Colomines JC, (1983) Relations trophiques entre huître et milieu: influence de la concentration et de la taille des particules. Actes de Colloques n°1. Bases biologiques de l'aquaculture. Ifremer, Montpellier, France, p 63-74.

Fleury PG, Janssoone X, Nadeau M, Guderley H, (2005). Force production during escape responses : sequential recruitment of the phasic and tonic portions of the adductor muscle in juvenile sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin) Journal of Shellfish Research 24: 905-911.

FranceAgrimer, (2010). Les filières pêche et aquaculture en France, Montreuil-sous-Bois, pp 31.

Frias R, Segovia M, (2010). Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: First step toward the development of conditioning and maturation protocols. Journal of Shellfish Research 29: 303-308.

G

Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T, (2006a). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish & Shellfish Immunology 20: 536-547.

- Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T, (2006b). Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254: 606-616.
- Garber JH, (1984). Laboratory study of nitrogen and phosphorus remineralization during the decomposition of coastal plankton and seston. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 18: 685-702.
- Gennari M, Tomaselli S, Cotrona V, (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiology* 16: 15-28.
- Gnaiger E, Bitterlich G, (1984). Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62: 289-298.
- Gram L, Huss HH, (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33: 121-137.
- Grangeré K, Ménesguen A, Lefebvre S, Bacher C, Pouvreau S, (2009). Modelling the influence of environmental factors on the physiological status of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in an estuarine embayment; The Baie des Veys (France). *Journal of Sea Research* 62: 147-158.
- Gregory SP, Shields RJ, Fletcher DJ, Gatland P, Dyson PJ, (2010). Bacterial community responses to increasing ammonia concentrations in model recirculating vertical flow saline biofilters. *Ecological Engineering* 36: 1485-1491.
- Grguric G, Wetmore SS, Fournier RW, (2000). Biological denitrification in a closed seawater system. *Chemosphere* 40: 549-555.
- Grigorakis K, (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272: 55-75.
- Grizel H, (1992). Epidemiologie des bivalves. Workshop on Pathology MEDRAP II. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6580/>:
- Grizel H, Héral M, (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil - Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 47: 399-403.
- Grizzle RE, Langan R, Huntting Howell W, (1992). Growth responses of suspension-feeding bivalve molluscs to changes in water flow: differences between siphonate and nonsiphonate taxa. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 162: 213-228.
- Grizzle RE, Morin PJ, (1989). Effect of tidal currents, seston, and bottom sediments on growth of *Mercenaria mercenaria*: results of a field experiment. *Marine Biology* 102: 85-93.
- Guéguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z, (2008). Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources* 21: 13-20.

Guerdat TC, Losordo TM, Classen JJ, Osborne JA, DeLong D, (2011). Evaluating the effects of organic carbon on biological filtration performance in a large scale recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 44: 10-18.

Gutiérrez-Estrada JC, de Pedro-Sanz E, López-Luque R, Pulido-Calvo I, (2004). Comparison between traditional methods and artificial neural networks for ammonia concentration forecasting in an eel (*Anguilla anguilla* L.) intensive rearing system. *Aquacultural Engineering* 31: 183-203.

H

Hagopian DS, Riley JG, (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering* 18: 223-244.

Happ G, Gosselink JG, Day JWJ, (1977). The Seasonal Distribution of Organic Carbon in a Louisiana Estuary. *Estuarine and Coastal Marine Science* 5: 695-705.

Harding JM, Couturier C, Parsons GJ, Ross NW, (2004). Evaluation of the neutral red assay as a stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus spp.*) in relation to post-harvest processing activities and storage conditions. *Aquaculture* 231: 315-326.

Haure J, Hussenot J, Buzin F, Lassus P, Claire M-LB, Mondeguer F, Sechet V, Royer F, Zouher A, Cardinal M, Belin C, Le Grel L, Le Bihan V, Jaouen P, Massé A, Castaing JB, Sabiri N, Pontié M, (2011). COMSAUMOL (maintien de la COMMercialisation et de la SAUvegarde des MOLLusques) : Rapport final, Ifremer, Université de Nantes, GEPEA, pp 92.

Haure J, Huvet A, Palvadeau H, Nourry M, Penisson C, Martin JLY, Boudry P, (2003). Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture* 218: 539-551.

Haure J, Penisson C, Bougrier S, Baud J-P, (1998). Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture* 169: 211-224.

Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S, (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology B- Biochemistry & Molecular Biology* 119: 619-623.

Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S, (2001). Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology* 11: 143-153.

Hawkins AJS, Salkeldl PN, Bayne BL, Gnaiger E, Lowel DM, (1985). Feeding and resource allocation in the mussel *Mytilus edulis*: evidence for time-averaged optimization. *Marine Ecology Progress Series* 20: 273-287.

Henley WF, Zimmerman LL, Neves RJ, (2001). Design and Evaluation of Recirculating Water Systems for Maintenance and Propagation of Freshwater Mussels. *North American Journal of Aquaculture* 63: 144-155.

Héral M, (1989). Traditional oyster culture in France. In: TEC (ed) *Aquaculture*, Barnabé G., Vol 1. Ellis Horwood, p 342-387.

Herbert RA, (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 23: 563-590.

Hernández-Zárate G, Olmos-Soto J, (2006). Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. Journal of Applied Microbiology 100: 664-672.

Hussenot J, (2006). Les systèmes aquacoles en eau recyclée pour les mollusques bivalves, Ifremer, pp 16.

Hutchinson S, Hawkins LE, (1992). QUANTIFICATION OF THE PHYSIOLOGICAL-RESPONSES OF THE EUROPEAN FLAT OYSTER *OSTREA-EDULIS* L TO TEMPERATURE AND SALINITY. Journal of Molluscan Studies 58: 215-226.

J

Jackson KL, Ogburn DM, (2009). Review of Depuration and its Role in Shellfish Quality Assurance, pp 95.

Jackson SA, Uhlinger KR, Clegg JS, (2011). Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of hsp/hsc70 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 317: 168-174.

Jones JW, Mair RA, Neves RJ, (2005). Factors Affecting Survival and Growth of Juvenile Freshwater Mussels Cultured in Recirculating Aquaculture Systems. North American Journal of Aquaculture 67: 210-220.

Juska A, (2011). Minimal models of growth and decline of microbial populations. Journal of Theoretical Biology 269: 195-200.

K

Keppler CJ, (2007). Effects of ammonia on cellular biomarker responses in oysters (*Crassostrea virginica*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 78: 63-66.

Kesarcodi-Watson A, Klumpp DW, Lucas JS, (2001a). Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*): II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. Aquaculture 203: 195-216.

Kesarcodi-Watson A, Lucas JS, Klumpp DW, (2001b). Comparative feeding and physiological energetics of diploid and triploid Sydney rock oysters, (*Saccostrea commercialis*): I. Effects of oyster size. Aquaculture 203: 177-193.

Khan MA, Parrish CC, Shahidi F, (2005). Quality indicators of cultured Newfoundland blue mussels (*Mytilus edulis*) during storage on ice: microbial growth, pH, lipid oxidation, chemical composition characteristics, and microbial fatty acid contents. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 7067-7073.

Kirby-Smith WW, (1972). Growth of the bay scallop: The influence of experimental water currents. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 8: 7-18.

Kuhn DD, Drahos DD, Marsh L, Flick Jr GJ, (2010). Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 43: 78-82.

Kusuki Y, (1978). Fundamental studies on the deterioration of oyster growing grounds. 3. Sinking rates and distance of transport of the faeces of Japanese oyster. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 44: 971-973.

L

Lassus P, Baron R, Garen P, Truquet P, Pierre G, Masselin P, Bardouil M, Leguay D, Amzil Z, (2004). Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 17: 207-214.

Lawrence DR, Scott GI, (1982). The Determination and Use of Condition Index of Oysters. *Estuaries* 5: 23-27.

Le Bihan V, Pardo S, (2010) Les limites de la couverture des risques en aquaculture : le cas des conchyliculteurs en France. Laboratoire LEMNA, Université de Nantes, Nantes, p 17.

Lee PG, Lea RN, Dohmann E, Prebilsky W, Turk PE, Ying H, Whitson JL, (2000). Denitrification in aquaculture systems: an example of a fuzzy logic control problem. *Aquacultural Engineering* 23: 37-59.

Lefebvre S, (2000). Les cycles de l'azote et du phosphore dans un système aquacole intégré poisson-phytoplancton-bivalve: études expérimentales et modélisations. Thèse de Doctorat, Université de Nantes

Lefebvre S, Bacher C, Meuret A, Hussenot J, (2001a). Modeling approach of nitrogen and phosphorus exchanges at the sediment-water interface of an intensive fishpond system. *Aquaculture* 195: 279-297.

Lefebvre S, Bacher C, Meuret A, Hussenot J, (2001b). Modelling Nitrogen Cycling in a Mariculture Ecosystem as a Tool to Evaluate its Outflow. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52: 305-325.

Lejart M, (2009). Study of the invasive process of *Crassostrea gigas* in Brittany : Spatial inventory, dynamics and ecological consequences. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

Liltved H, Summerfelt ST, (2007). Ozonation and UV-Irradiation. *Recirculating Aquaculture*, Vol. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY, p 439-482.

Lin Y-F, Jing S-R, Lee D-Y, (2003). The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture. *Environmental Pollution* 123: 107-113.

Lorenzen CJ, (1967). Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography* 12: 343-346.

Lorenzen K, Struve J, Cowan VJ, (1997). Impact of farming intensity and water management on nitrogen dynamics in intensive pond culture: a mathematical model applied to Thai commercial shrimp farms. *Aquaculture Research* 28: 493-507.

- Losordo TM, Masser MP, Rakocy JE, (1999). Recirculating Aquaculture Tank Production Systems. A Review of Component Options, pp 12. http://aquanic.org/publicat/usda_rac/efs/srac/453fs.pdf.
- Love DC, Lovelace GL, Sobsey MD, (2010). Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. International Journal of Food Microbiology 143: 211-217.
- Lowe DM, Pipe RK, (1995). Contaminant-induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. Aquatic Toxicology 30: 357-365.
- Lowe DM, Soverchia C, Moore MN, (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic Toxicology 33: 105-112.

M

- Macmillan RJ, Cawthorn RJ, Whyte SK, Lyon PR, (1994). Design and maintenance of a closed artificial seawater for long-term holding of bivalve shellfish. Aquacultural Engineering 13: 241-250.
- Malham SK, Cotter E, O'Keeffe S, Lynch S, Culloty SC, King JW, Latchford JW, Beaumont AR, (2009). Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. Aquaculture 287: 128-138.
- Malone RF, Pfeiffer TJ, (2006). Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. Aquacultural Engineering 34: 389-402.
- Mamane H, Colorni A, Bar I, Ori I, Mozes N, (2010). The use of an open channel, low pressure UV reactor for water treatment in low head recirculating aquaculture systems (LH-RAS). Aquacultural Engineering 42: 103-111.
- Mann R, Ryther JH, (1977). Growth of six species of bivalve molluscs in a waste recycling-aquaculture system. Aquaculture 11: 231-245.
- Mao Y, Zhou Y, Hongsheng Y, Wang R, (2006). Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. Aquaculture 253: 322-333.
- Marcaillou C, Haure J, Mondeguer F, Courcoux A, Dupuy B, Pénisson C, (2010). Effect of food supply on the detoxification in the blue mussel, *Mytilus edulis*, contaminated by diarrhetic shellfish toxins. Aquatic Living Resources 23: 255-266.
- Marchand M, Amouroux I, Bedier E, Belin C, Claisse D, Daniel A, Denis J, Lampert L, Le Mao P, Maisonneuve C, Ropert M, (2010). Qualité du milieu marin littoral. Synthèse nationale de la surveillance, Edition 2010., Ifremer, Nantes, France, pp 54. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00032/14346/>.
- Marchand M, Amouroux I, E. Bédier E, C. Belin C, D. Claisse D, G. Durand G, D. Soudant D, (2009). Bulletin de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Synthèse nationale de l'année 2008, IFREMER, Nantes, pp 60.
- Marín Leal J, Dubois S, Orvain F, Galois R, Blin J-L, Ropert M, Bataillé M-P, Ourry A, Lefebvre S, (2008). Stable isotopes (d13C, d15N) and modelling as tools to estimate

the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Marine Biology* 153: 673-688.

Martins CIM, Eding EH, Verdegem MCJ, Heinsbroek LTN, Schneider O, Blancheton JP, d'Orbcastel ER, Verreth JAJ, (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering* 43: 83-93.

Méléder V, Barillé-Boyer A-L, Baud J-P, Barillé L, Cognie B, Rosa P, (2001). Modélisation de l'affinage de l'huître *Crassostrea gigas* alimentée avec la diatomée *Skeletonema costatum*. *Aquatic Living Resources* 14: 49-64.

Menasveta P, Panritdam T, Sihanonth P, Powtongsook S, Chuntapa B, Lee P, (2001). Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquacultural Engineering* 25: 35-49.

Menesguen A, (1992). Eutrophication in the coastal zone and its modelling. *Hydroécologie Appliquée* 4: 55-77.

Mével G, Chamroux S, (1986). Nitrifiants autotrophes et hétérotrophes en littorale et estuarienne, 2. Colloque International de Bacteriologie Marine, IFREMER, Brest (France), pp 293-300. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/973/>.

Michaud L, Blancheton JP, Bruni V, Piedrahita R, (2006). Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering* 34: 224-233.

Millman BM, (1967). Mechanism of Contraction in Molluscan Muscle. *American Zoologist* 7: 583-591.

Miranda A, Lizarraga-Armenta J, Rivas-Vega M, Lopez-Elias JA, Nieves-Soto M, (2010). Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Cultured With Tilapia, *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus* in a Recirculation System. *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY* 41: 764-772.

Mitchell IM, (2006). In situ biodeposition rates of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) on a marine farm in Southern Tasmania (Australia). *Aquaculture* 257: 194-203.

Moore MN, (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series* 46: 81-89.

Mori K, (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 53: 361-369.

Morrison CM, (1996). The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*, Adductor and mantle musculature. Chap. 4 169-183 edn. Maryland Sea Grant College, pp 734.

N

Neubacher E, Prast M, Cleven E-J, Berninger U-G, (2008). Ciliate grazing on *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospiramoscoviensis*: Is selectivity a factor for the nitrogen cycle in natural aquatic systems? *Hydrobiologia* 596: 241-250.

Newell RIE, Langdon CJ, (1996). Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. In: Kennedy VS NR, and Eble AF (ed) The eastern oyster *Crassostrea virginica*, Vol. University of Maryland Sea Grant Publications, Maryland, p 185- 229.

Nortvedt R, Tuene S, (1998). Body composition and sensory assessment of three weight groups of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*/fed three pellet sizes and three dietary fat levels. *Aquaculture* 61: 295-313.

O

O'Beirn FX, Neves RJ, Steg MB, (1998). Survival and growth of juvenile freshwater mussels (Unionidae) in a recirculating aquaculture system. *American Malacological Bulletin* 14: 165-171.

Orban E, Di Lena G, Navigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R, (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry* 77: 57-65.

P

Palmer RE, (1980). Behavioral and rhythmic aspects of filtration in the Bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), and the oyster, *Crassostrea Virginica* (Gmelin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 45: 273-295.

Pastoureaud A, Héral M, Prou J, Razet D, Russu P, (1996). Particle selection in the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) studied by pigment HPLC analysis under natural food conditions. *Oceanologica acta* 19: 79-88.

Pedersen LF, Pedersen PB, Sortkjær O, (2007). Temperature-dependent and surface specific formaldehyde degradation in submerged biofilters. *Aquacultural Engineering* 36: 127-136.

Pekkarinen M, (1997). Seasonal changes in calcium and glucose concentrations in different body fluids of *Anodonta anatina* (L.) Bivalvia: Unionidae. *Netherlands Journal of Zoology* 47: 31-45.

Pennarun A-L, Prost C, Haure J, Demaimay M, (2003). Comparison of Two Microalgal Diets. 1. Influence on the Biochemical and Fatty Acid Compositions of Raw Oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2006-2010.

Perez Agundez J, Mongruel R, (2010) Technological adaptation to harmful algal bloom events: a socioeconomic analysis ICES Annual Science Conference. Ifremer, Nantes, France

Pérez Agundez JA, Mongruel R, Girard S, Cochet J-M, (2010). Viabilité économique des procédés de sauvegarde et détoxification accélérée de coquillages cultivés face aux efflorescences de microalgues toxiques Université de Bretagne Occidentale, IFREMER, pp 67. www.umr-amure.fr.

Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H, (2007). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* 210: 2999-3014.

Pfeiffer TJ, Lawson TB, Rusch KA, (1999). Northern quahog, *Mercenaria mercenaria*, seed clam waste characterization study: precursor to a recirculating culture system design. *Aquacultural Engineering* 20: 149-161.

Pfeiffer TJ, Rusch KA, (2000). An integrated system for microalgal and nursery seed clam culture. *Aquacultural Engineering* 24: 15-31.

Poulet SA, Lennon J-F, Plouvenez F, Jalabert F, Correc G, Cueff A, Lacoste A, (2003). A non destructive tool for the measurement of muscle strength in juvenile oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 217: 49-60.

Pouvreau S, Bourles Y, Lefebvre S, Gangnery A, Alunno-Bruscia M, (2006). Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research* 56: 156-167.

Q

Qu Y, Li X, Yu Y, Vandepier M, Babidge P, Clarke S, Bott K, Li H, (2009). The effect of different grading equipment on stress levels assessed by catecholamine measurements in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquacultural Engineering* 40: 11-16.

R

Raillard O, Deslous-Paoli J-M, Heral M, Razet D, (1993). Modelling growth and feeding of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in Marennes Oleron Bay (France). *Oceanologica acta* 16:

Ratel J, Berge P, Berdague J-L, Cardinal M, Engel E, (2007). Mass Spectrometry Based Sensor Strategies for the Authentication of Oysters According to Geographical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 321-327.

Rehnstam-Holm A-S, Hernroth B, (2005). Shellfish and Public Health: A Swedish Perspective. *Ambio* 43: 139-144.

Ren JS, Ross AH, (2001). A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling* 142: 105-120.

Ren JS, Ross AH, Schiel DR, (2000). Functional descriptions of feeding and energetics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *Marine Ecology Progress Series* 208: 119-130.

Renault T, Le Deuff R-M, Cochennec N, Maffart P, (1994). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire* 145: 735-742.

Renault T, Novoa B, (2004). Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17: 397-409.

Riisgård HU, (2001). On measurement of filtration rates in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series* 211: 275-291.

- Riisgård HU, Kittner C, Seerup DF, (2003). Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 284: 105-127.
- Rincé Y, (1979). Cycle saisonnier des peuplements phytoplanctoniques et microphytobentiques des claires ostréicoles de la baie de Bourgneuf. *Revue Algol.* 14: 297-311.
- Ringwood AH, Conners DE, Hoguet J, (1998). Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 166: 163-171.
- Rodhouse PG, Roden CM, Hensey MP, Ryan TH, (1984). Resource allocation in *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture. *Marine Biology* 84: 27-34.
- Rodríguez-Canto A, Arredondo-Figueroa JL, Ponce-Palafox JT, Rouse DB, (2002). Growth Characteristics of the Australian Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*, cultured in an Indoor Recirculating System. *Journal of Applied Aquaculture* 12: 59 - 64.
- Ruiz-Capillas C, Moral A, (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry* 89: 347-354.

S

- Samain JF, McCombie H, (2008). Summer Mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, The Morest Project. *Quaeedn.*, pp 332.
- Sandu SI, Boardman GD, Watten BJ, Brazil BL, (2002). Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with a plastic bead medium. *Aquacultural Engineering* 26: 41-59.
- Sauvage C, Boudry P, De Koning DJ, Haley CS, Heurtebise S, Lapègue S, (2010). QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics* 41: 390-399.
- Schuenhoff A, Shpigel M, Lupatsch I, Ashkenazi A, Msuya FE, Neori A, (2003). A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture* 221: 167-181.
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T, (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92-99.
- Sharrer MJ, Summerfelt ST, (2007). Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquacultural Engineering* 37: 180-191.
- Shpigel M, Barber BJ, Mann R, (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161: 15-25.

- Shpigel M, Blaylock RA, (1991). The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as a biological filter for a marine fish aquaculture pond. *Aquaculture* 92: 187-197.
- Shpigel M, Gasith A, Kimmel E, (1997). A biomechanical filter for treating fish-pond effluents. *Aquaculture* 152: 103-117.
- Shumway SE, (1990). A Review of the Effects of Algal Blooms on Shellfish and Aquaculture. *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY* 21: 65-104.
- Singer A, Parnes S, Gross A, Sagi A, Brenner A, (2008). A novel approach to denitrification processes in a zero-discharge recirculating system for small-scale urban aquaculture. *Aquacultural Engineering* 39: 72-77.
- Smaal AC, Vonck APMA, (1997). Seasonal variation in C, N and P budgets and tissue composition of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 153: 167-179.
- Sobral P, Widdows J, (2000). Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 245: 111-125.
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P, (2006). Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252: 328-338.
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K, (2005). Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24: 197-207.
- Soletchnik P, Prou J, Héral M, Barillé L, Razet D, Guezennec L, (1991). Influence de la charge particulaire sur la filtration d'une population d'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin estuarien de Marennes-d'Oléron (France): Analyse de deux cycles de marée. *Mariculture Committee, Shellfish Committee*:
- Solorzano L, (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14: 799-801.
- Song L, Li X, Clarke S, Wang T, Bott K, (2007). The effect of size on the response of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to changes in water temperature and air exposure. *Aquacult Int* 15: 351-362.
- Sornin J, Feuillet- Girard M, Héral M, Deslous-Paoli J-M, (1983). Effet des biodépôts de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) sur l'accumulation de matières organiques dans les parcs du bassin de Marennes-Oléron. *Journal of Molluscan Studies Suppt.* 12A:
- Sprague V, (1979). Classification of the Haplosporidia. *Marine Fisheries Review* 41: 40-44.
- Srna RF, Baggaley A, (1976). Rate of Excretion of Ammonia by the Hard Clam *Mercenaria mercenaria* and the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 36: 251-258.
- Summerfelt ST, (2003). Ozonation and UV irradiation--an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering* 28: 21-36.

- Summerfelt ST,(2007). Culture units. in Recirculating Aquaculture, Vol. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY, p 115-170.
- Summerfelt ST, Sharrer MJ, Tsukuda SM, Gearheart M, (2009). Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquacultural Engineering* 40: 17-27.
- Summerfelt ST, Vinci B,(2007). Solids Capture. Recirculating Aquaculture, Vol. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY, p 171-232.
- Svendsen C, Hankard PK, Lister LJ, Fishwick SK, Jonker MJ, Spurgeon DJ, (2007). Effect of temperature and season on reproduction, neutral red retention and metallothionein responses of earthworms exposed to metals in field soils. *Environmental Pollution* 147: 83-93.

T

- Tejada M, Huidobro A, (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology* 215: 1-7.
- Thielker JL, (1981). Design and test operation of an intensive controlled-environment oyster production system. *Journal of the World Mariculture Society* 12: 79-93.
- Thoman ES, Ingall ED, Davis DA, Arnold CR, (2001). A nitrogen budget for a closed, recirculating mariculture system. *Aquacultural Engineering* 24: 195-211.
- Timmons MB, Ebeling JM, (2007). Recirculating Aquaculture. edn. Cayuga Aqua Ventures, pp 975.
- Timmons MB, Holder JL, Ebeling JM, (2006). Application of microbead biological filters. *Aquacultural Engineering* 34: 332-343.
- Tirard CT, Grossfeld RM, Levine JF, Kennedy-Stoskopf S, (1997). Effect of Osmotic Shock on Protein Synthesis of Oyster Hemocytes In Vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 116: 43-49.
- Tremblay R, Myrand B, Proulx D, (2007). Atelier de travail: "Indicateurs de stress chez les mollusques", Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec, pp 75.
- Troell M, Halling C, Neori A, Chopin T, Buschmann AH, Kautsky N, Yarish C, (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226: 69-90.
- Tseng K-F, Wu K-L, (2004). The ammonia removal cycle for a submerged biofilter used in a recirculating eel culture system. *Aquacultural Engineering* 31: 17-30.

V

- Van Haren RJF, Kooijman SALM, (1993). Application of a dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 31: 119-133.
- Van Rijn J,(2002). Denitrification. Recirculating Aquaculture, Vol. Cayuga Aqua Ventures, p 369-396.

W

- Wang J-K, (2003). Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering* 28: 37-46.
- Welsh DT, Castadelli G, (2004). Bacterial nitrification activity directly associated with isolated benthic marine animals. *Marine Biology* 144: 1029-1037.
- Wheaton FW, Hochheimer JN, Kaiser GE, Krones MJ, Libey GS, Easter CC, (1994). Nitrification principles. In: Timmons MB, Losordo, T.M. (ed) *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*, Vol. Elsevier, Amsterdam, p 101-126.
- Widdows J, Brinsley MD, Bowley N, Barrett C, (1998). A Benthic Annular Flume for *In Situ* Measurement of Suspension Feeding/Biodeposition Rates and Erosion Potential of Intertidal Cohesive Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46: 27-38.
- Widman JC, (1999). Reflections on biofilter selection for shellfish culture. *Journal of Shellfish Research* 17: 364.
- Widman JC, Wikfors GH, Stiles S, Goldberg R, Smith B, Choromanski J, (2003). Development and Testing of a Recirculating Seawater Nursery System for the Culture of Bay Scallops, *Argopecten irradians irradians* for Ongrowing and Stock Enhancement or Restoration, NOAA/OAR's National Marine Aquaculture Initiative, Milford, pp
- Wietz M, Hall MR, Høj L, (2009). Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 266-277.
- Wikfors GH, Widman JC, Smith BC, Veilleux D, Choromanski J, Meseck SL, Goldberg R, Stiles S, (2004). NEFSC Develops RAS System For Domesticated Bivalves. *Global Aquaculture Advocate* June 2004: 53-54.
- Wilbur AE, Hilbish TJ, (1989). Physiological energetics of the ribbed mussel *Geukensia demissa* (Dillwyn) in response to increased temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 131: 161-170.
- Wildish DJ, Kristmanson DD, (1985). Control of suspension feeding bivalve production by current speed. *Helgoland Marine Research* 39: 237-243.
- Wildish DJ, Kristmanson DD, (1988). Growth response of giant scallops to periodicity of flow. *Marine Ecology Progress Series* 42: 163-169.
- Wildish DJ, Kristmanson DD, Hoar RL, DeCoste AM, McCormick SD, White AW, (1987). Giant scallop feeding and growth responses to flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 113: 207-220.
- Wildish DJ, Kristmanson DD, Saulnier AM, (1992). Interactive effect of velocity and seston concentration on giant scallop feeding inhibition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155: 161-168.
- Wildish DJ, Miyares MP, (1990). Filtration rate of blue mussels as a function of flow velocity: preliminary experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 142: 213-219.

Wilson-Ormond EA, Powell EN, Ray SM, (1997). Short-Term and Small-Scale Variation in Food Availability to Natural Oyster Populations: Food, Flow and Flux. *Marine Ecology* 18: 1-34.

Z

Zar JH, (2010). *Biostatistical analysis*. Fifth edition. Pearson International Edition. Pearson International Edition, pp 960.

Zhang ZH, Li XX, (2006). Evaluation of the effects of grading and starvation on the lysosomal membrane stability in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by using neutral red retention assay. *Aquaculture* 256: 537-541.

Zhang ZH, Li XX, Vandeppeer M, Zhao W, (2006). Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256: 502-509.

Zhu S, Chen S, (2001). Impacts of Reynolds number on nitrification biofilm kinetics. *Aquacultural Engineering* 24: 213-229.

Zhu S, Chen S, (2002). The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering* 26: 221-237.

Optimisation des conditions hydrobiologiques pour la conservation de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en système re-circulé

Le maintien de la commercialisation des bivalves lors des interdictions de ventes représente un enjeu économique majeur en conchyliculture. Pour assurer la survie et maintenir la qualité des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, la sauvegarde à terre peut être envisagée de deux façons i) hors d'eau en chambre froide à 3°C et humidité contrôlée qui permet de conserver la qualité sensorielle des bivalves durant 15 jours, ou ii) en système re-circulé pour conserver en eau pendant 30 jours, des animaux disponibles à la vente. Les huîtres sont stockées à 167 kg.m⁻³ dans un bac équipé d'un système d'air-lift avec une eau traitée par UV et thermorégulée. Un apport minimum de nourriture permet le maintien du poids sec. La température optimale de sauvegarde des huîtres a été déterminée à 16°C pour limiter les mortalités et s'affranchir des risques de ponte. Le stress thermique dû au transfert des huîtres dans cet environnement entraîne une perturbation des réponses écophysiologicals de l'ordre de trente heures. La vitesse de courant, indispensable au transport de la nourriture et à l'oxygénation, a un effet négatif significatif sur la filtration des bivalves. L'excrétion dissoute des huîtres a été quantifiée en fonction de la température et de l'apport de nourriture. L'azote ammoniacal excrété par les bivalves subit une nitrification due à l'activité des bactéries essentiellement présentes sur les coquilles des huîtres. Ce processus permet de maintenir les concentrations en NH₄⁺ et NO₃⁻ sous le seuil de toxicité pour les bivalves. Une modélisation des flux d'azote et des matières organiques au sein du système re-circulé a permis de simuler les conditions optimales de conservation des huîtres en terme de poids sec et de survie.

Mots clefs : *Crassostrea gigas*, huître Pacifique, système re-circulé, écophysiology, sauvegarde, modélisation

Optimization of hydrobiological parameters for the storage of the oyster *Crassostrea gigas* in recirculating systems

The maintenance of bivalve commercialisation during periods when sales are prohibited represents a major economic issue for shellfish-farming. To ensure their survival and to preserve the oyster *Crassostrea gigas* quality, their storage in land-based systems has been studied i) out of water in a cold room at 3°C with controlled humidity, enabling the bivalve sensory quality to be retained for 15 days, and ii) in recirculating systems in immersed conditions for 30 days. For the latter, the oysters were stored at 167 kg.m⁻³ density in a tank equipped with an air-lift system, with water treated with UV and thermoregulated. A minimum of food was supplied to avoid mass tissue loss. A temperature of 16°C was defined as optimal to limit mortality and to avoid spawning risks. The thermal stress linked to the transfer of oysters into this environment induced disruptions of the ecophysiological responses for around 30 hours. The speed of the water current within the system, which is essential to transport food and oxygen, presented a significant negative effect on bivalve clearance rate. The oyster nitrogen excretion was quantified according to the temperature and food supply. The ammonia excreted by bivalves is nitrified by a bacterial population which is mainly located on the oyster shells. This process keeps NH₄⁺ and NO₃⁻ concentrations below the toxic level for the bivalve. The modelling of nitrogen and organic matter fluxes in the recirculating system enabled the optimal conditions of storage to maintain oyster dry weight and survival to be simulated.

Keywords: *Crassostrea gigas*, Pacific oyster, recirculating system, ecophysiology, safeguard, modelling