



université de bretagne
occidentale



Développement
économique, Innovation
et Exportation

Québec 

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Marine Holbach

Préparée à Rimouski, QC, Canada

La sensibilité des larves de pectinidés aux conditions d'élevage : le flux ouvert comme alternative aux mortalités massives

Thèse soutenue le (date à préciser)
devant le jury composé de :

Yves-Marie Paulet

Professeur, UBO-IUEM / *Président du jury*

Céline Audet

Professeur, UQAR-ISMER / *Rapporteur*

Luc Comeau

Ph.D., Ministère des Pêches et des Océans Canada / *Rapporteur*

Pierre Boudry

Ph.D., IFREMER / *Codirecteur de thèse*

Réjean Tremblay

Professeur, UQAR-ISMER / *Directeur de thèse*

René Robert

Ph.D., IFREMER / *Directeur de thèse*

À ma grand-mère, mes parents
et mon mari.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais exprimer mes remerciements aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à l'accomplissement de cette belle histoire transatlantique.

Tout d'abord merci au Professeur **Réjean Tremblay** et au Docteur **René Robert** qui, en tant que directeurs, ont cru en moi et m'ont donné la chance de réaliser cette thèse. Merci **Réjean** pour ta disponibilité, ton aide et ton écoute dans mes plus grands moments de doute. Merci **René** pour tes conseils et suggestions scientifiques qui m'ont beaucoup appris sur le métier de chercheur.

Ma reconnaissance va au Docteur **Pierre Boudry** qui a également permis à ce projet de voir le jour. Merci d'avoir pris part au cheminement de ce doctorat et d'avoir été d'une aide précieuse lors de la rédaction des articles.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur **Céline Audet** pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que présidente du jury. Merci également au Docteur **Luc Comeau** et au Professeur **Yves-Marie Paulet** pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit et l'intérêt porté à mon travail. Merci encore pour vos précieux commentaires.

J'exprime également mes plus chaleureux remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de mes expériences, sans qui tout le travail d'écloserie et de laboratoire n'aurait pu être réalisé. Du côté de la France, je pense particulièrement aux équipes du laboratoire Ifremer de physiologie des invertébrés marins : **Bruno, Philippe, Pierrick, Claudie, Catherine, Luc, Dominique, Virgil, Marc, Jacqueline, Jean-Louis** et tous les autres, merci pour votre bonne humeur. Du côté du Québec, je pense à toute

l'équipe de l'Ismer avec un merci spécial à **Iften** pour son humour et pour m'avoir enseigné les techniques d'analyses des lipides qui ont changé ma vie et pour tout le reste !

La réalisation d'une thèse en cotutelle n'est pas chose aisée aussi bien humainement, scientifiquement qu'administrativement. J'adresse ainsi mes remerciements à **Véronique Loiseau, Yvette Lemonnier, Élisabeth Bondu, Martine Belzile, Brigitte Dubé, Nancy Lavergne et Catherine Méthot** pour leur efficacité dans le traitement des nombreux dossiers administratifs.

Un tel projet ne se réalise pas sans appuis financiers. Je voudrais pour cela remercier le « Ministère du Développement Économique de l'Innovation et de l'Exportation » du Québec, le projet européen « Reproseed », le regroupement « Ressources Aquatiques Québec », les « Fonds de Recherches du Québec: Nature et Technologie », l'Ismer et l'UQAR.

Aussi, je voudrais remercier tout particulièrement mon **Cricri** qui m'a inculqué les techniques d'élevage et m'a donné le goût de continuer dans cette voie. Merci pour tous ces beaux moments !

Je pense à **Isabelle Quéau** qui me soutient depuis mon Master 2 et qui au delà de nourrir des milliers de larves m'a permis d'avancer sur la bonne voie dans cette aventure. Merci pour ton écoute, ton soutien et nos fous rire.

Un grand merci aux étudiants que j'ai rencontrés à l'Ifremer, un merci spécial à **Nico, Ricou, Isma, Antoine, Myrina, Fiz** et les autres pour nos discussions scientifiques, mais surtout pour tous nos bons moments passés ensemble.

Merci à **Isa et Sam** de m'avoir accueillie plusieurs mois et de m'avoir soutenue. Merci à **Aurore** pour son soutien et ses réunions Tupperware qui changent les idées.

Enfin merci à mes amis du Québec : **Renée**, ton amitié m'est précieuse et tu as tellement fait pour moi durant cette aventure. **Nico** le gars du Nord avec qui on peut parler de tout et qui dépanne tous les ordi capricieux. **Blandyne**, merci pour nos délires, nos

voyages et pour ton aide précieuse jusqu'au sprint final. **Mickey et Zazou, JB et Isa, Charline et Julien** merci pour votre bonne humeur. **Marie**, pour tous tes conseils et nos pauses thé. **Christine**, la première québécoise que j'ai rencontrée, ma colloc, mon amie. Le bureau « sans fenêtre », toute la gang des midis de la cafet' de l'Ismer et tout le labo de Réjean. Merci à tous ceux qui ont lu, relu, corrigé et amélioré ce manuscrit... et tous les autres aussi.

Je ne peux pas oublier d'évoquer mes séjours gaspésiens qui m'ont permis de terminer cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Merci à **Jean-Philippe Hébert** (Fermes Marines du Québec) et **Jean Côté** (Regroupement des Pêcheurs Professionnels de Gaspésie du Sud) de m'avoir offert l'opportunité de collaborer à des projets scientifiques captivants. Merci à **Maryann, Michaël, Andrée, Steven, Pierre et Ginette**, vous m'avez fait découvrir la générosité québécoise à l'état pur.

Enfin, je ne remercierai jamais assez ma famille de m'avoir toujours soutenue. **Jean et Denise** qui m'ont toujours inspirée et guidée, merci pour votre aide et vos conseils dans tous les domaines. **La famille Jaffré** au grand complet pour leur soutien et leur accueil. À **mes parents** de m'avoir permis de réaliser mes études et d'aller jusqu'au bout de mes aspirations. Merci de toujours croire en moi et de me soutenir dans chacun de mes choix. À **Grégory et Maud**, merci de votre soutien de tous les instants. À **mes grands-parents**. Partir loin de vous est très difficile mais voir votre fierté est ma plus belle récompense.

Je terminerai par mon formidable mari qui m'a toujours aidée et soutenue malgré la distance. Merci **Mikaël** d'avoir accepté de quitter ta Bretagne natale et ta famille pour vivre cette fin d'aventure avec moi. Merci pour ton amour qui m'a permis de terminer sereinement ce travail. Je t'aime Dr Jaffré !

RÉSUMÉ

Dans de nombreux pays, l'aquaculture de pectinidés dépend aujourd'hui du succès de la production contrôlée de juvéniles. Néanmoins, les fortes variations des taux d'éclosion des œufs et de la survie larvaire, enregistrées à ce jour, rendent cette production imprévisible. Les élevages larvaires en flux ouvert de coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) ont été développés en Norvège et présentent des résultats prometteurs. Malheureusement, les rendements de production encore faibles et l'impossibilité de travailler à fortes densités restent un frein majeur au développement de cette technique. En France, une technique en flux-ouvert, en petit volume (5 L), et à forte densité (≤ 300 larves mL⁻¹) a été développée pour les ostréidés. Des expériences préliminaires visant à décliner ce système d'élevage aux larves de *P. maximus* se sont avérées infructueuses : retard de croissance et forte mortalité en quelques jours. Il est reconnu que les larves de pectinidés doivent faire face à des contraintes diverses en éclosion : bactériologiques, physiologiques et environnementales. Elles sont également plus sensibles que les larves des autres espèces de bivalves comme par exemple l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*). Il apparaît donc nécessaire aujourd'hui d'identifier plus clairement l'origine des phénomènes perturbant le bon développement des larves en flux ouvert afin d'améliorer la qualité des élevages et les rendements larvaires.

Ainsi cette thèse cherche à (1) contrôler la qualité sanitaire des stades précoces de *P. maximus*, et (2) comprendre la sensibilité des larves face aux conditions d'élevage en flux ouvert. Elle est axée sur trois chapitres regroupant quatre expériences.

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de la présence du sédiment lors du conditionnement des géniteurs. Il a clairement été mis en évidence que la présence de sédiment favorisait la contamination des œufs émis et des larves-D qui en découlent par des bactéries du genre *Vibrio*. Les profils lipidiques des œufs et des larves-D issus des deux conditionnements étaient similaires, indiquant que l'absence de sédiment n'impacte pas la gamétogénèse. Les larves issues de ces géniteurs conditionnés sans sédiment et élevées en eau stagnante, ont enregistré des taux de mortalité significativement supérieurs aux larves issues de géniteurs conditionnés avec sédiment.

Nous avons également cherché à déterminer l'impact du bullage sur la physiologie des larves. Pour cela nous avons étudié les performances larvaires et suivi des indicateurs de stress tels que l'activité des enzymes du stress oxydatif (Catalase, Superoxyde Dismutase) et du métabolisme énergétique (Citrate Synthase). Quelle que soit l'intensité du bullage, nous avons observé une réduction de la croissance et une mortalité précoce par rapport au lot témoin qui pourrait être expliquée par la diminution observée dans la consommation de nourriture par les larves.

Enfin, deux autres expériences ont permis de déterminer quels paramètres d'élevage en flux ouvert seraient les plus favorables au développement des larves de coquille Saint-Jacques. Dans un premier temps, l'influence sur le développement larvaire de l'utilisation d'enceintes circulaires et rectangulaires à fond plat a été testée. Des résultats encourageants ont été obtenus dans les enceintes rectangulaires à fond plat, avec des taux de survie et de compétence jamais observés lors de nos tests réalisés dans les enceintes développées pour les ostréidés. Dans un second temps, des élevages en flux ouvert ont été réalisés dans les enceintes rectangulaires afin d'étudier l'impact de l'intensité du renouvellement d'eau sur le développement et la physiologie des larves via les indicateurs de stress cités plus haut. Un renouvellement complet de l'enceinte toutes les 4 heures, a eu le même impact sur les performances larvaires et la physiologie qu'un renouvellement deux fois plus rapide. En ajoutant un bullage dans ce système, nous avons constaté la mort de toutes les larves en fin d'élevage. Il semblerait donc que le bullage soit le paramètre le plus perturbant pour les larves de coquille Saint-Jacques.

Grâce à l'étude et à la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la lutte contre le stress des larves de *P. maximus* en flux ouvert, ce projet de doctorat donne des clés permettant d'améliorer cette technique d'élevage tout en limitant l'utilisation de produits chimiques en milieu contrôlé.

Mots clés pectinidés, *Pecten maximus*, éclosion, élevage larvaire, flux ouvert, contamination bactérienne, prophylaxie, physiologie larvaire, indices de stress.

ABSTRACT

In many countries, aquaculture of pectinids depends on the success of artificial spat production in hatchery. This production is always unpredictable due to the variability of hatching rate and larval survival. Flow-through larval rearing systems were developed in Norway for the King scallop *Pecten maximus* and showed promising results. Unfortunately the system needs to be optimized since the larval yields and the densities used are still relatively low. In France, a small-scale (5 L) and high-density (≤ 300 larva mL⁻¹) flow-through larval rearing system was successfully developed for oysters. First trials in such system and in similar conditions with *P. maximus* failed as we registered slower growth and high mortality rate in only a few days. It is known that pectinids larvae are more sensitive to environmental conditions than the oyster *Crassostrea gigas*, for example. Nowadays, it is important to identify and to understand the phenomena disturbing larval development in flow-through system to improve larval quality and production yields.

In this context, this thesis focuses on (1) controlling the sanitary quality of the early life stage of *P. maximus* and (2) understanding the sensitivity of larvae in flow-through larval rearing. This document is divided into 3 chapters based on 4 experiments.

First, we verified the influence of sediment used during *P. maximus* broodstock conditioning. This work has shown that using broodstock conditioning without sediment could reduce contamination of gametes and D-larvae by *Vibrio*. Furthermore, both treatments led to similar fatty acids profiles in oocytes and resulting larvae, suggesting that broodstock conditioning was physiologically similar with or without sediment. The larvae obtained from broodstocks conditioned without sediment had the highest survival rates when reared in a static system.

Secondly, we tried to determine the influence of aeration on larval physiology. Larval performances and stress index as antioxidant defenses (catalase and superoxide dismutase) and energetic metabolism (citrate synthase) enzyme activities were examined. Whatever the intensity of aeration tested, the larval growth was lesser than in control condition with a higher and earlier mortality. These results could be related to the rapid decrease of larval food uptake after the set up of the aeration.

Lastly, two experiments were conducted to have a better understanding of the influence of tank shape, seawater renewal and aeration on scallop larval development. In the first experiment, we compared the influence on larvae of circular and rectangular flat-bottomed tanks. Larvae reared in flat-bottomed rectangular tanks exhibited the best overall

performances with survival and competency rates higher than any other results obtained in the flow-through rearing system for oysters. In the second experiment, flow-through larval rearing was conducted in rectangular tanks to study the influence of the water renewal on larval development and physiology with the same stress indexes mentioned above. No differences in larval development and physiology were detected between the two intensities of water inflow ($\frac{1}{4}$ tank renewal h^{-1} and $\frac{1}{2}$ tank renewal h^{-1}). Aeration associated to flow-through induced massive mortalities. This variable appeared to be the most deleterious for scallop development.

This doctoral project provided some indications how improving *P. maximus* flow-through rearing system while limiting the use of antibiotic through a better understanding the physiological mechanisms involved in the larval response to a stressful environment.

Key words pectinids, *Pecten maximus*, hatchery, larval rearing, flow-through, bacterial contamination, prophylaxis, larval physiology, stress index.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
TABLE DES MATIÈRES	XVII
LISTE DES TABLEAUX.....	XX
LISTE DES FIGURES	XXII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
LE DÉVELOPPEMENT DE LA CONCHYLICULTURE.....	1
L'AVÈNEMENT DE LA PECTINICULTURE.....	6
<i>PECTEN MAXIMUS</i> , UNE ESPÈCE MODÈLE EN EUROPE	7
OBTENTION ARTIFICIELLE DE NAISSAINS	8
Conditionnement de géniteurs	9
Élevage larvaire.....	14
Les problèmes d'infections bactériennes.....	17
Comment lutter contre les bactéries pathogènes en milieu contrôlé?.....	18
Les différents systèmes d'élevage larvaire	19
Le système traditionnel : l'élevage en séquentiel	19
Une méthode prometteuse : Le flux ouvert	21
TESTS PRÉLIMINAIRES	24
LES STRESS CHEZ LES LARVES	26
OBJECTIFS DE RECHERCHE	27
CHAPITRE 1 LA SURVIE DES LARVES DE <i>PECTEN MAXIMUS</i> ISSUES DE GÉNITEURS CONDITIONNÉS EN PRÉSENCE D'ÉRYTHROMYCINE ET SANS SÉDIMENT	31

1.1 RÉSUMÉ	32
1.2 SCALLOP LARVAL SURVIVAL FROM ERYTHROMYCIN TREATED BROODSTOCK AFTER CONDITIONING WITHOUT SEDIMENT	33
CHAPITRE 2 LE BULLAGE EST UNE SOURCE DE STRESS POUR LES LARVES DE <i>PECTEN MAXIMUS</i>.....	51
2.1 RÉSUMÉ	53
2.2 AERATION IS A SOURCE OF STRESS FOR GREAT SCALLOP (<i>PECTEN MAXIMUS</i>) LARVAE	54
CHAPITRE 3 LES CONSÉQUENCES DU RENOUELEMENT D'EAU ET DE LA FORME DE L'ENCEINTE D'ÉLEVAGE SUR LES LARVES DE <i>PECTEN MAXIMUS</i> : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES.....	75
3.1 RÉSUMÉ	77
3.2 INCIDENCE OF TANK SHAPE AND WATER RENEWAL ON <i>PECTEN MAXIMUS</i> LARVAE: PRELIMINARY RESULTS	78
CHAPITRE 4 DES OUTILS SIMPLES POUR AMÉLIORER LA PRODUCTION DE NAISSAINS DE PECTINIDÉS	93
4.1 UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE CIBLÉ APPLIQUÉ DURANT L'EMBRYOGENÈSE POUR RÉDUIRE L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ÉLEVAGES DE PECTINIDÉS	93
4.2 DIMINUER L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ÉLEVAGES DE PECTINIDÉS EN APPLIQUANT DES TRAITEMENTS CIBLÉS ET DE COURTE DURÉE À PARTIR DU STADE LARVE-D97	
4.3 CALIBRATION D'UN OUTIL DE DÉTERMINATION RAPIDE DE LA QUANTITÉ DE RÉSERVE DES LARVES DE <i>PLACOPECTEN MAGELLANICUS</i>	99
DISCUSSION GÉNÉRALE	105
LIMITER LA PROLIFÉRATION BACTÉRIENNE GRÂCE À LA PROPHYLAXIE	107
Le sédiment comme source de contamination chez les géniteurs.....	107
Une utilisation raisonnée des antibiotiques	108
Des traitements courts et ciblés sur les géniteurs	108
Des traitements courts et ciblés sur les larves	110
Traitement ciblé durant l'embryogenèse	110
Traitements ciblés et de courte durée durant le développement larvaire	111
Limites et avantages	112

LA SENSIBILITÉ DES LARVES AUX CONDITIONS D'ÉLEVAGE.....	113
Des besoins différents selon l'espèce cultivée.....	113
Le bullage : plus dommageable que profitable.....	115
De nouveaux paramètres pour le flux ouvert	116
Le flux d'eau.....	116
Forme de l'enceinte et hydrodynamisme.....	117
L'importance d'un fond plat.....	120
Limites et avantages.....	121
SYNTHÈSE	121
PERSPECTIVES	123
Des outils prédictifs de la qualité des larves pour les professionnels	123
Détermination de la qualité sanitaire	123
Détermination de la qualité physiologique	125
Les agents biologiques de contrôle bactérien au secours de l'environnement	126
La marennine	126
Les probiotiques.....	126
La recirculation : une nouvelle gestion des systèmes en flux ouvert	127
Pas de progrès technologique sans recherche fondamentale	129
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Fatty acids profiles of neutral and polar fractions from oocytes and D-larvae	44
Table 2 : Activities of CAT (catalase), SOD (superoxide dismutase) and CS (citrate synthase), in <i>Pecten maximus</i> larvae exposed to four aeration levels (0, 100, 155 and 270 ml min ⁻¹) and with (T) or without antibiotic treatment (NT).....	64
Table 3 : Larval performances at the end of the experiment, on day 22 in two different flow-through systems (50 L rectangular tanks and 35 L circular tanks)	84
Table 4 : Survival, growth, competence yield, and <i>Vibrio</i> on total flora load (V/FT) of <i>Pecten maximus</i> larvae reared in 50 L rectangular tanks, in flow through at three different water flow renewal: 0 (no inflow), 12.5 L h ⁻¹ (¼), 25 L h ⁻¹ (½), on day 17 and day 22.....	85
Table 5 : Larval performances estimated by survival, growth, and competency yield and <i>Vibrio</i> contamination on total flora (V/FT) measured at 17 dpf (days post fertilization) and 22 dpf on larvae reared in 50 L flow-through rectangular tanks using 0.25 volume of renewed water per hour (treatment ¼) with or without aeration.....	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustrations de différents types de collecteurs utilisés pour les principales espèces conchylicoles	2
Figure 2 : Représentation de différentes techniques utilisées pour le grossissement des pectinidés	3
Figure 3 : Anatomie de la coquille Saint-Jacques, <i>Pecten maximus</i>	8
Figure 4 : Exemple de bac de conditionnement de géniteurs en flux ouvert avec fond sableux (d'après Helm <i>et al.</i> (2006))	10
Figure 5 : Évolution macroscopique des changements de la gonade de <i>Pecten maximus</i> , d'après l'échelle de Mason (1958).	12
Figure 6 : Cycle de vie de <i>P. maximus</i> ; En : endotrophie, M : mixotrophie et Ex : exotrophie (d'après Le Pennec <i>et al.</i> (2003))	13
Figure 7 : Photos de larves de <i>Pecten maximus</i> en transition entre le stade véligère et pédivéligère (environ 200 µm)	15
Figure 8 : Exemples de bacs d'élevage larvaire en séquentiel	20
Figure 9 : Montage réalisé lors du changement d'eau et grossissement sur un tamis servant à récolter les larves (adapté de Helm <i>et al.</i> (2006))	21
Figure 10 : Schéma d'un système d'élevage en flux ouvert de 150 L	22
Figure 11 : A- Schéma explicatif d'un système en flux ouvert de 5 L (adapté de Gonzalez-Araya <i>et al.</i> (2012a)) ; B- photo du dispositif mis en place à l'écloserie expérimentale d'Ifremer Argenton (source : Marine Holbach)	23
Figure 12 : Survie larvaire de <i>Pecten maximus</i> (pourcentage moyen avec erreur standard) six jours après fécondation en fonction de trois systèmes d'élevage : des	

flûtes en flux ouvert (5 L FO A-), des flûtes en séquentiel avec antibiotique (5 L SEQ A+), et des bacs 150 L à fond conique en séquentiel avec antibiotique (150 L SEQ A+).....	24
Figure 13 : Part des vibrions dans la flore totale des larves de <i>Pecten maximus</i> élevées dans trois différents systèmes d'élevage: des flûtes en flux ouvert (5 L FO A-), des flûtes en séquentiel avec antibiotique (5 L SEQ A+), et des bacs 150 L à fond conique en séquentiel avec antibiotique (150 L SEQ A+).....	25
Figure 14 : Schematic of the experimental design: NT- without antibiotic, E- 2 days selected antibiotic treatment.....	38
Figure 15 : Mean oocytes and D-larvae bacterial contamination (mean $\pm$ SE) between two different broodstock conditioning: SA, presence of sandy-bottom and NSA, without any sediment	41
Figure 16 : A- Larval survival (%); B- <i>Vibrio</i> contamination (CFU larva ⁻¹) of larvae into four different conditions.	42
Figure 17 : Evolution of mortalities in <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min ⁻¹	61
Figure 18 : Microalgal consumption of <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min ⁻¹ , one and three days after aeration set up on day 13 post- fertilization	62
Figure 19 : Evolution of shell length in <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min ⁻¹	63
Figure 20 : Evolution of mortalities in <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to two different aeration levels, 0, 100 ml min ⁻¹ and reared with antibiotic treatment (T) or without antibiotic treatment (NT).....	65
Figure 21 : microalgae consumption of <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed to two different aeration levels, 0, 100 ml min ⁻¹ and reared with antibiotic treatment (T) or without antibiotic treatment (NT), one and three days after aeration set up on day 13 post-fertilization	66
Figure 22 : Evolution of shell length in <i>Pecten maximus</i> larvae, exposed to two different aeration levels: 0, 100 ml min ⁻¹ and reared with antibiotic treatment (T) or	

without antibiotic treatment (NT), one and three days after aeration set up on day 13 post-fertilization.....	67
Figure 23 : Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and citrate synthase (CS) in <i>Pecten maximus</i> larvae reared in 50 L rectangular tanks, in flow through at three different water flow renewal: 0 (no inflow), 12.5 L h ⁻¹ (¼), 25 L h ⁻¹ (½), on day 17. At 12.5 L h ⁻¹ seawater renewal an aeration of 300 ml h ⁻¹ was also implemented (¼ + air).....	87
Figure 24 : A- Pourcentages de larves-D obtenus et pourcentages de larves normalement formées après 48 h d'incubation selon trois traitements antibiotiques (NT : sans traitement, C : chloramphénicol, E : érythromycine).....	95
Figure 25 : Évolution de la survie larvaire de <i>P. maximus</i> selon trois traitements antibiotiques (NT, C, E) appliqués durant l'embryogenèse	96
Figure 26 : Analyse d'image de la fluorescence des lipides larvaires au microscope à épifluorescence (x10), à l'aide du logiciel ImageJ	101
Figure 27 : A- Évolution de la taille (µm) des larves en fonction du temps. B- Évolution du pourcentage de fluorescence des larves pendant l'élevage. C- Évolution de la quantité de lipides de réserve des larves (µg/mg poids sec) au cours de l'élevage. Les barres représentent l'erreur standard	103
Figure 28 : Régression linéaire entre le pourcentage de fluorescence des larves, obtenue par analyses d'images, et la quantité de lipides de réserve (µg mg ⁻¹ de poids sec), obtenue par analyses biochimiques	103
Figure 29 : Photographies de coquilles de larves d' <i>Argopecten purpuratus</i> tamisées régulièrement et obtenues par microscope électronique à balayage : a- abrasion de la coquille et b- dommages au niveau de la charnière	106
Figure 30 : Représentation schématique des enceintes rectangulaires à fond plat utilisées dans le chapitre 3	118
Figure 31 : Représentation de la vitesse d'un flux d'eau entrant latéralement et placé au fond d'une enceinte rectangulaire	119
Figure 32 : Schéma bilan présentant les améliorations proposées afin de pallier aux mortalités massives des larves de pectinidés	122

Figure 33 : Schéma d'un système en recirculation utilisé pour les larves d'*A. purpuratus* présentant le biofiltre, la pompe de recirculation (P) et le filtre UV 128

INTRODUCTION GÉNÉRALE

LE DÉVELOPPEMENT DE LA CONCHYLICULTURE

Les rudiments de l'aquaculture telle qu'on la connaît aujourd'hui ont été élaborés par les civilisations d'Asie et d'Europe afin de sustenter les populations déjà très friandes des produits de la mer. Elle débuta par l'avènement de la pisciculture, *i.e.* l'élevage des poissons, avec l'élevage traditionnel de la carpe commune (*Cyprinus carpio*) en Chine, il y a plusieurs millénaires. L'aquaculture de mollusques marins, aussi appelée conchyliculture est née également sur les côtes d'extrême orient (Chine, Corée, Japon) où les riverains plantaient des pieux pour récolter les huîtres et les moules qui s'y fixaient. Il s'agissait alors de captage naturel, et il a fallu attendre le début de notre ère pour que les Romains confectionnent les premiers parcs ostréicoles. En France, l'élevage de moules sur bouchot fait son apparition dès le Moyen-Âge et il faudra attendre le XIX^e siècle pour commencer à codifier les différentes technologies de cultures de mollusques (Lubet et Mathieu, 1999, Pillay et Kutty, 2005, Lucas et Southgate, 2012). Ce type de culture, destinée à la commercialisation, implique une phase d'obtention de juvéniles, ou naissains, appelée captage, suivie d'une période de pré-grossissement, pendant laquelle le naissain grandit sur son support initial ou en casiers, et enfin le grossissement durant lequel les animaux atteindront leur taille de commercialisation. Une manière simple de récolter du naissain consiste à immerger, dans les milieux connus de fixation naturelle de l'espèce ciblée, des substrats additionnels. La nature de la surface de ce substrat peut dépendre de l'espèce concernée. Il peut s'agir de roches, de pieux en bois ou encore des collecteurs artificiels desquels les juvéniles pourront être facilement retirés. Il existe toutefois certains obstacles à la fixation des larves, notamment les salissures dues à l'établissement d'organismes plus gros et/ou prédateurs (ascidies, macroalgues, étoile de mer, etc.). Afin de les limiter, il est

nécessaire que les collecteurs ne soient pas en permanence opérationnels, mais déposés uniquement lors du créneau le plus propice à la fixation de l'espèce convoitée. Les collecteurs d'huîtres sont aujourd'hui constitués de coupelles en plastique ou de demi-tubes recouverts ou non de chaux, tandis que des cordes effilochées sont préférentiellement utilisées pour les moules, des sacs faits de filets, de type « sac d'oignon », remplis de fils de pêche sont utilisés pour les pectinidés. Enfin, les palourdes ne se fixent pas sur un support mais préféreront des substrats de sable et de boues vaseuses, soit en utilisant directement le fond benthique ou en intégrant des tapis favorisant la métamorphose (Figure 1).



Figure 1 : Illustrations de différents types de collecteurs utilisés pour les principales espèces conchylicoles. A- coupelles de plastique (huîtres – source : Ifremer, L. Toulouat), B- tuiles recouvertes de chaux (huîtres – source : Ifremer), C- cordes effilochées (moules – modifié de Lucas et Southgate (2012)), D- sacs en filet appelés « sac d'oignon » (pectinidés – www.FAO.org) et E- tapis benthique (myes – modifié de Myrand *et al.* (2012))

Les juvéniles grandiront sur ce substrat, en pleine mer, jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille suffisante pour être décrochés et déplacés dans des structures aux densités contrôlées jusqu'à l'atteinte de la taille commerciale : dans des poches (ostréiculture), sur des bouchots ou des boudins en suspension (mytilliculture) ou dans des lanternes ou des cages (Pectiniculture – Figure 2).

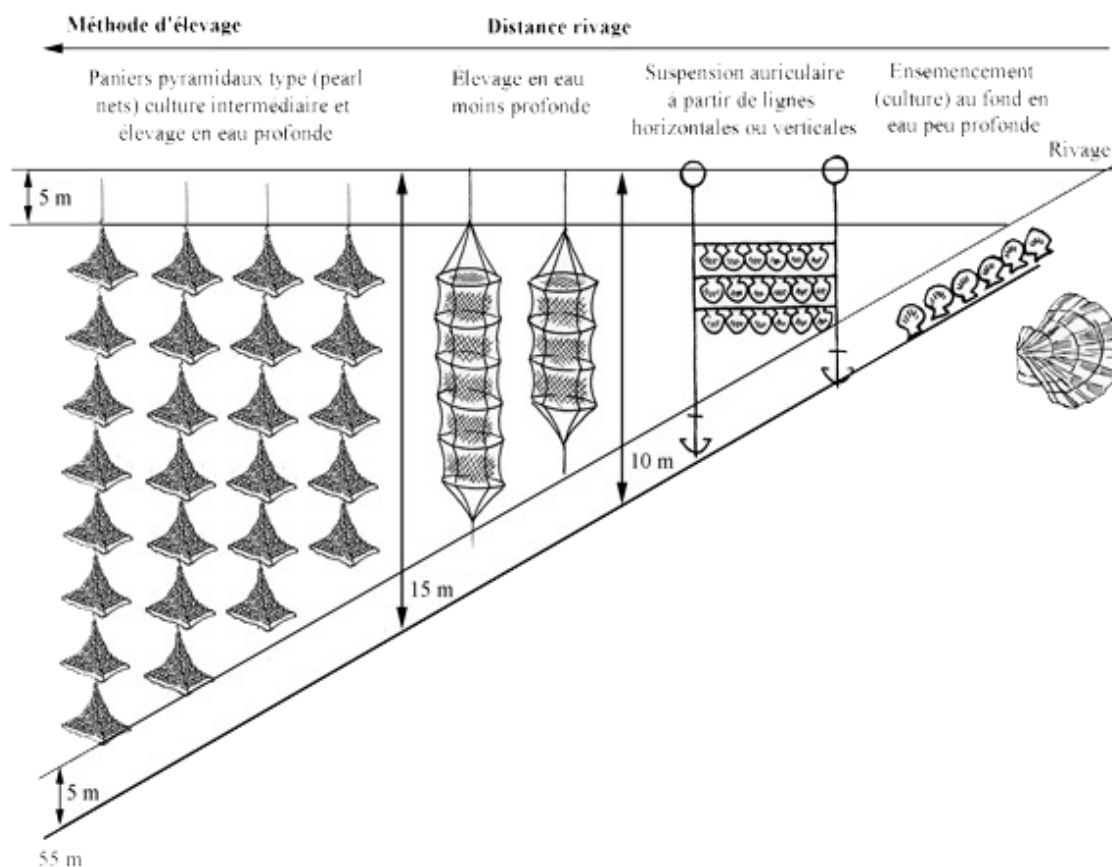


Figure 2 : Représentation de différentes techniques utilisées pour le grossissement des pectinidés. (Source : FAO, 2009)

Les mollusques bivalves sont d'excellents candidats pour l'aquaculture, car ce sont des animaux filtreurs qui trouvent leur nourriture directement dans le milieu naturel. Durant la phase de grossissement en mer, les coûts d'achat de nourriture sont donc inexistants. De plus, les techniques d'élevage utilisées sont relativement simples et peu coûteuses en main

d'œuvre. Aujourd'hui, dans un contexte d'expansion perpétuelle de la population mondiale, il est reconnu que l'utilisation des ressources marines issues de la pêche atteint presque son maximum (FAO, 2014). L'aquaculture, qui n'était à l'origine qu'une alternative destinée à faciliter la récolte des produits de la mer, est rapidement devenue une nécessité permettant de soutenir la demande des marchés. La conchyliculture ne fait pas exception à la règle. En effet, la production conchylicole mondiale a augmenté de 98 % depuis les années 50 avec plus de 15 millions de tonnes en 2012, pour une valeur de plus de 15 milliards de dollars (FAO, 2014). Ces chiffres placent la culture des mollusques au deuxième rang de la production aquacole globale avec 7 millions de tonnes sur le marché mondial. Ces dernières années, l'utilisation de la conchyliculture pour contrer l'eutrophisation estuarienne est de plus en plus étudiée par la communauté scientifique (Gifford et al., 2007; Gren et al., 2009). En effet, les bivalves comme les huîtres et les moules par exemples sont de bon candidat pour de la bioremédiation car ils ont la capacité de capter des particules et surtout l'azote dissous dans les eaux estuarienne (Carmichael et al., 2012; Higgins et al., 2011). Toutefois, le développement de cette activité ne doit pas se faire au détriment de l'environnement. Il doit, en effet, suivre une évolution raisonnée dans le but de limiter son empreinte sur les écosystèmes. Afin d'assurer la pérennité de ce secteur d'activité dans un contexte de développement durable, les études d'impacts se sont multipliées (*e.g.* Davenport *et al.* (2009). Ces études se sont concentrées sur l'effet des exploitations conchylicoles sur la qualité du milieu et sur la biodiversité des compartiments benthiques, *i.e.* relatif aux fonds marins. McKindsey *et al.* (2011) ont détaillé notamment l'impact à plusieurs niveaux de la mytiliculture sur l'environnement, comme l'introduction de structures physiques pouvant altérer la dynamique sédimentaire et générer des habitats propices à l'établissement de nombreux organismes benthiques. Cela pourrait favoriser ainsi l'apparition d'espèces nuisibles ou invasives, renforcée par des changements dans les communautés planctoniques (McKindsey *et al.*, 2007). En plus de ce problème d'attraction d'espèces indésirables, l'apport de biodépôts rejetés par les moules a pour conséquence un accroissement de l'eutrophisation et une modification des différents processus

biogéochimiques nocifs à l'environnement, dans des milieux abrités (McKindsey *et al.*, 2011).

Quatre groupes de mollusques sont les grands représentants de la conchyliculture : les huîtres (ostréiculture), les moules (mytiliculture), les palourdes (vénériculture) et les pectinidés (pectiniculture). Les pectinidés sont très appréciés des consommateurs pour la finesse de leur chair. Avec 1,7 millions de tonnes issues de l'aquaculture contre 750 000 tonnes pêchées en 2012, ils représentent un marché de près de 3 milliards de dollars. La pêche est supportée par seulement quelques espèces possédant un muscle adducteur de taille suffisante et regroupées en bancs suffisamment denses (Norman *et al.*, 2006). C'est notamment le cas de *Patinopecten yessoensis* au Japon et en Corée, d'*Argopecten purpuratus* au Chili et au Pérou, de *Placopecten magellanicus* sur les côtes orientales du continent nord-américain, de *Pecten maximus* en Europe et d'*Argopecten irradians* en Chine. Ces cinq espèces représentent à elles seules 89 % des pêches mondiales en 2012, selon la FAO (Food and Agriculture Organization - (FAO, 2014)). Leur croissance rapide, leur maturité sexuelle précoce ainsi que leur valeur commerciale élevée sont très appréciées des mariculteurs, qui continuent leur exploitation malgré les effondrements massifs des stocks naturels apparus au cours du XX^e siècle.

Ces brusques chutes ont plusieurs origines connues, comme le développement des outils de pêche qui a favorisé une pêche intensive des coquillages (MacKenzie, 1979, Buestel *et al.*, 1982, Avendaño et Cantillánez, 1996, Goldberg *et al.*, 2000). Ce fut le cas au Chili par exemple, où les tonnages débarqués ont chuté de 4997 à 492 tonnes entre 1980 et 1989 (Avendaño, 1993). Dans d'autres régions, des variations de paramètres environnementaux, comme la quantité et la qualité du phytoplancton, la prédation et la compétition spatiale se sont ajoutées aux méfaits d'une pêche intensive. En effet, l'apparition de phytoplancton toxique décima les stocks d'*Argopecten irradians* aux États-Unis (Casper *et al.*, 1987), la prédation par les oursins et des étoiles de mer fut le principal facteur pour *Argopecten purpuratus* au Japon (Nose, 1985) alors que la compétition spatiale avec une espèce invasive, *Crepidula fornicata* impacta *Pecten maximus* dans les eaux Françaises (Chauvaud

et al., 1996). Dans tous ces cas, le développement de techniques aquacoles a été nécessaire afin de pallier l'effondrement des stocks naturels et soutenir le marché par le réensemencement et/ou l'élevage en structures spécialisées.

L'AVÈNEMENT DE LA PECTINICULTURE

C'est au début des années 60 que la pectiniculture a réellement pris son essor au Japon, afin de renforcer les stocks de *P. yessoensis*. Le captage naturel de juvéniles fut utilisé en premier lieu afin de réensemencer les baies surexploitées. Des élevages en paniers suspendus en pleine mer furent par la suite mis en place (Figure 2) afin d'éviter les problèmes de prédation et faciliter l'effort de pêche (Muller-Feuga et Querellou, 1973). Devant l'augmentation croissante des besoins, des élevages à haute densité furent réalisés, mais la propagation massive d'épizooties a affaibli une deuxième fois les stocks dans les années 70, démontrant une méconnaissance des besoins de cette espèce et la nécessité d'une meilleure gestion des cultures (Buestel, 1979). La maîtrise de la production ainsi que l'optimisation des cultures suspendues du pétoncle japonais ont conduit à une augmentation des tonnages débarqués de 57 000 t dans les années 70 à 510 000 t dans les années 2000 (Kosaka et Ito, 2006). Face à ces résultats spectaculaires, de nombreux pays ont tenté de copier le modèle japonais afin de consolider leur propre stock. Malgré cela la production est toujours restée en deçà de la demande, le captage naturel étant insuffisant et de nature trop aléatoire. Il est très vite devenu nécessaire de recourir à la production contrôlée de juvéniles afin de garantir le repeuplement des stocks naturels. Des écloséries ont alors vu le jour dès les années 70 notamment pour *P. maximus*, *P. magellanicus* et *A. purpuratus*, garantissant ainsi aux producteurs un apport régulier en naissains (Boucher et Dao, 1989, Avendaño, 1993, Parsons et Robinson, 2006). L'émergence de cette nouvelle industrie nécessita le développement des connaissances sur la biologie des différentes espèces de pectinidés exploitées, tant au niveau du conditionnement des géniteurs, qu'au niveau des élevages larvaires et de la production de juvéniles (Devauchelle et Mingant, 1991, Couturier *et al.*, 1995, Riquelme *et al.*, 1995, Utting et Millican, 1998, Caers *et al.*, 1999,

Martinez *et al.*, 2000, Avendaño-Herrera *et al.*, 2001, Bergh et Strand, 2001, Jorquera *et al.*, 2001).

***PECTEN MAXIMUS*, UNE ESPÈCE MODÈLE EN EUROPE**

En Europe, *P. maximus* est une espèce très exploitée de par sa grande répartition le long des côtes occidentales et sa très haute valeur commerciale (Brand, 2006). En 2012, la majorité des Coquilles Saint-Jacques consommées était issue de la pêche avec 63 681 tonnes contre seulement 78 tonnes issues de l'aquaculture (FAO, 2014). On la trouve en milieu subtidal peu profond (< 250 m) sur des fonds sableux ou de graviers fins dans lesquels elle peut se dissimuler des prédateurs en s'y enfouissant (Priol, 1930, *bet al.*, 1999). C'est une espèce suspensivore qui peut se nourrir de planctons, de bactéries, de détritiques organiques et de matières inorganiques (Beninger et Decottignies, 2005, MacDonald *et al.*, 2006). Elle est hermaphrodite fonctionnelle, c'est-à-dire qu'un individu produit simultanément des œufs et des spermatozoïdes dès sa maturité sexuelle. Cette particularité est très remarquable chez cette espèce par la double coloration de la gonade, blanchâtre pour la partie mâle et rouge corail spécifique aux pectinidés pour la partie femelle (Figure 3). Dans les régions nordiques, les individus atteignent leur maturité sexuelle au bout de deux à trois ans, contre seulement un an dans les régions plus au Sud. Dans ces régions plus chaudes, la taille commerciale d'environ 11 cm est rapidement atteinte, au bout d'un an contre quatre à six ans dans les régions plus froides (Antoine, 1979). Les premiers tests de production en laboratoire furent réalisés au début des années 70 (Gruffydd et Beaumont, 1970, Comely, 1972). La production à grande échelle fut, quant à elle, développée en France notamment dans les années 80 avec la création, en Bretagne, de l'écloserie du Tinduff (Robert *et al.*, 1994a, Dao *et al.*, 1995b, Robert et Gerard, 1999). Elle fut justifiée par le déclin important des débarquements en Rade de Brest de 1500-2600 tonnes dans les années 50 à 100-300 tonnes à partir de 1963. La production contrôlée de naissains de coquille Saint-Jacques destinés au réensemencement est rapidement devenue une nécessité, la faiblesse du nombre de reproducteurs en milieu naturel ne permettant pas

un recrutement suffisant malgré l'utilisation de collecteurs artificiels. Les premiers résultats de production expérimentale étaient encourageants (Buestel *et al.*, 1982), mais il faudra attendre 1999 pour dresser un bilan des productions annuelles et une analyse de leur variabilité (Robert et Gerard, 1999). Ces travaux ont constitué le premier référentiel des productions de l'écloserie commerciale. La coquille Saint-Jacques est aujourd'hui un modèle très utilisé par les scientifiques européens ce qui fait d'elle une espèce cible pour la pratique de culture extensive, mais également pour des recherches sur l'optimisation des techniques d'élevage (Andersen *et al.* (2011) pour revue).

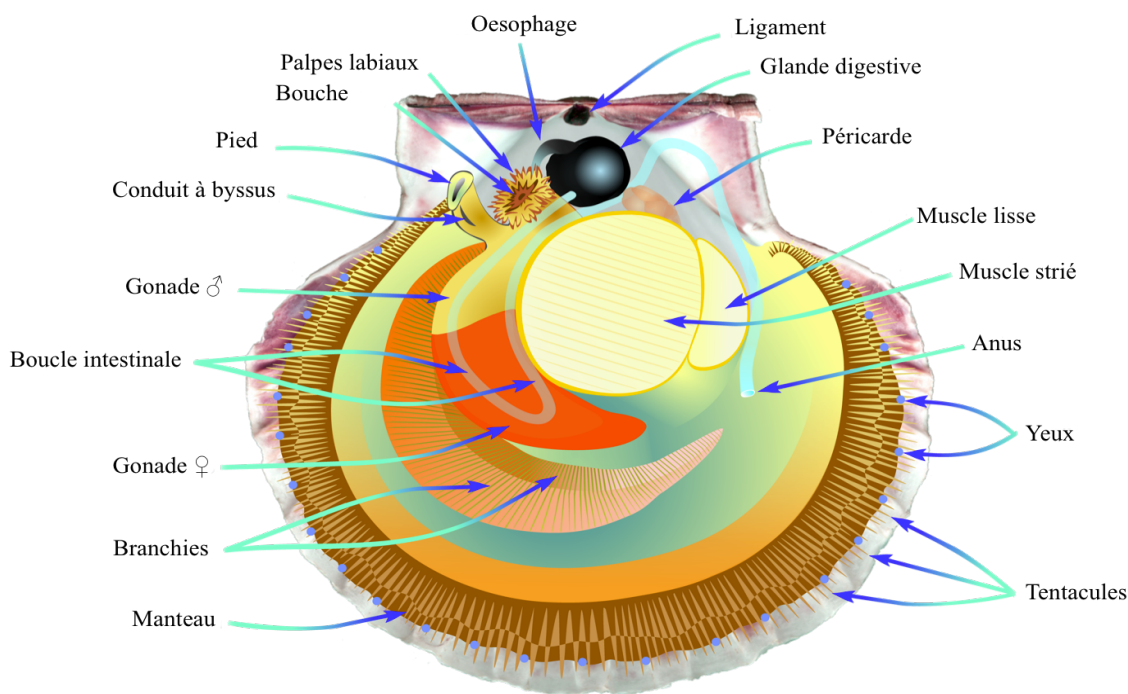


Figure 3 : Anatomie de la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*. (Source : Ifremer, Sylvie Gros)

OBTENTION ARTIFICIELLE DE NAISSAINS

L'obtention de naissains de qualité est l'objectif ultime des écloseries commerciales mais cela ne peut se faire sans l'appui de la recherche. En effet, les écloseries commerciales travaillent souvent en étroite collaboration avec des instituts de recherche ce qui permet de

faire le lien entre recherche fondamentale et amélioration de la production. C'est le cas avec Scalpro en Norvège et Le Tinduff en France. C'est dans ce contexte que le projet européen ReproSeed s'inscrit. Celui-ci regroupe des chercheurs européens dans le but d'améliorer la production de naissains de bivalve en couplant recherche fondamentale et appliquée. Cette thèse s'inscrit directement dans les thématiques de ce projet qui se focalise sur chaque étape nécessaire à l'obtention de naissains.

CONDITIONNEMENT DE GÉNITEURS

Chez les bivalves, la production de naissains de bonne qualité en éclosérie passe tout d'abord par l'utilisation de géniteurs pleinement matures. Pour cela, ces derniers sont généralement prélevés dans leur milieu naturel au moment de la période de ponte. Contrairement aux ostréidés, chez qui la méthode de lacération des gonades (ou stripping en anglais) est largement utilisée, les œufs de pectinidés doivent nécessairement passer par l'oviducte pour achever leur maturation et être fécondables (Widowati *et al.*, 1992). Pour cette famille de mollusques l'émission des gamètes est donc déclenchée par des chocs thermiques (Gruffydd et Beaumont, 1970); *i.e.* par une succession d'augmentation brutale suivie de baisse de la température de l'eau de 6 °C. Afin, de réaliser plusieurs pontes annuelles, de nombreux auteurs se sont penchés sur l'utilisation de bivalves conditionnés en éclosérie permettant de mieux contrôler la maturation et d'optimiser la gamétogenèse (Heasman *et al.*, 1996, Berntsson *et al.*, 1997, Utting et Millican, 1997, Andersen et Ringvold, 2000, Martinez *et al.*, 2000, Velasco et Barros, 2007, Gonzalez-Araya *et al.*, 2012b). Le conditionnement classique de *P. maximus* s'effectue en flux ouvert dans des bacs de grand volume (Figure 4) avec un fond sableux pour simuler le milieu naturel (Cochard et Devauchelle, 1993, Soudant *et al.*, 1996b, Utting et Millican, 1997, Bergh et Strand, 2001, Magnesen *et al.*, 2006).

L'environnement physique et la nutrition des géniteurs jouent un rôle prédominant, ils doivent être le plus proche possible des conditions environnementales naturelles durant leur cycle de reproduction. Parmi les facteurs influençant la reproduction des pectinidés, la

température apparaît comme le facteur principal (Sastry, 1963), avec une valeur optimale variable selon la région. Ainsi on parle souvent de degrés jour pour quantifier la durée d'un conditionnement de bivalves (Mann, 1979). Cette valeur prend en compte la température d'induction de la gamétogenèse de l'espèce (8 °C chez la coquille Saint-Jacques) ainsi que la température de conditionnement. Cela permet d'adapter rigoureusement la durée du conditionnement selon les régions. Il est également possible de réaliser un conditionnement à partir de géniteurs dont les gonades sont entièrement vides (Stade 0 - Figure 5) ou ayant récemment initié leur gamétogenèse (Stade 1 à 3 - Figure 5). Ainsi, en Bretagne, les conditionnements sont réalisés à 15 °C pendant 6 à 8 semaines si les gonades ne sont pas vidées (Devauchelle et Mingant, 1991, Cochard et Devauchelle, 1993, Robert et Gerard, 1999) et 11 semaines pour des animaux au stade 0 (Soudant *et al.*, 1996a

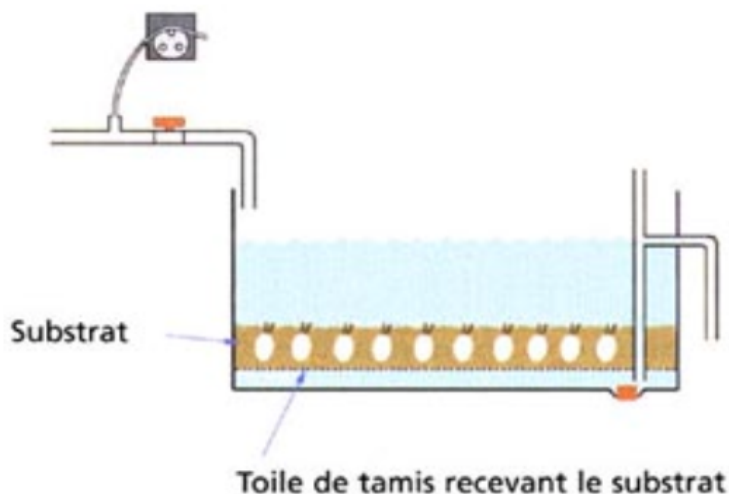


Figure 4 : Exemple de bac de conditionnement de géniteurs en flux ouvert avec fond sableux (d'après Helm *et al.* (2006))

Un autre facteur influençant la reproduction des pectinidés est la photopériode (Couturier, 1990, Devauchelle et Mingant, 1991, Paulet et Boucher, 1991, Saout *et al.*, 1999, Duinker *et al.*, 2000, Mallet et Carver, 2009). Chez *P. maximus*, la photopériode apparaît aussi importante que la température (Utting et Millican, 1998). Toutefois, cela ne semble pas être une règle générale pour tous les pectinidés, car pour *A. ventricosus* la durée d'ensoleillement ne semble pas avoir d'incidence (Mallet et Carver, 2009). Ce facteur

jouerait plus un rôle de déclencheur de gamétogenèse, qui reste toutefois contrôlé en priorité par la température qui pourrait l'accélérer ou l'inhiber (Barret et Devauchelle, 1997).

Des photopériodes croissantes mimant le rythme circadien ont été souvent utilisées afin de favoriser la synchronisation de la maturité des animaux (Duinker *et al.*, 2000). Toutefois, l'utilisation de longues photopériodes fixes, entre 14 et 16 h, est désormais fréquente dans la littérature afin de permettre un développement gonadique rapide (Cochard et Devauchelle, 1993, Robert et Gerard, 1999, Andersen et Ringvold, 2000).

À ces facteurs environnementaux s'ajoute l'impact de la nutrition sur l'obtention de gamètes de qualité optimale. En effet, les larves-D (Figure 6) obtenues 48 heures après la fécondation sont endotrophes durant les premiers jours de leur vie.

Elles survivent donc uniquement grâce à leurs réserves énergétiques transférées par la mère à l'œuf. Ces larves, appelées également véligères (Figure 6), deviennent exotrophes en une dizaine de jours. Dès lors, leur unique source d'énergie proviendra de leur alimentation. Entre ces deux phases, il existe un stade de mixotrophie permettant d'assurer le relais entre l'utilisation des réserves de l'œuf (Figure 6) et l'alimentation externe stricte (Soudant *et al.*, 1998a). De la qualité des œufs émis va donc dépendre la survie des larves durant les dix premiers jours, ce qui influencera par conséquent le nombre de larves qui attendra la métamorphose (Figure 6).

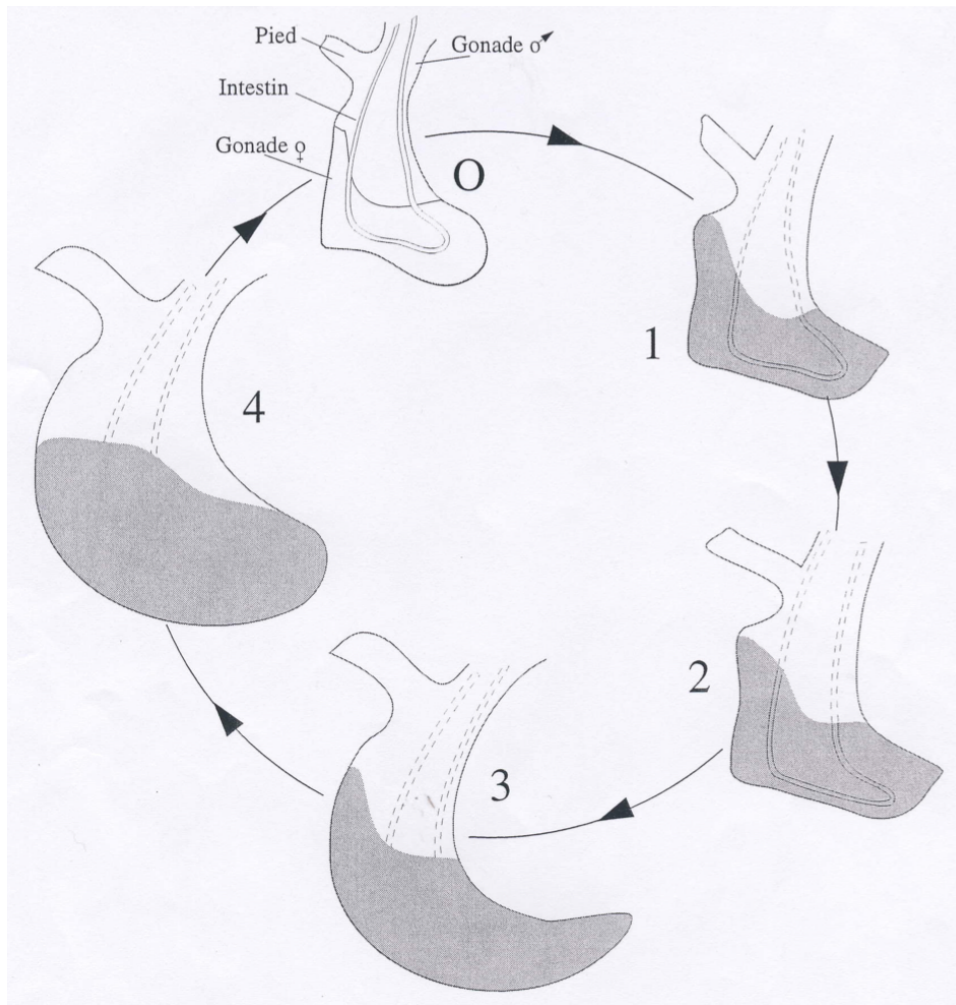


Figure 5 : Évolution macroscopique des changements de la gonade de *Pecten maximus*, d'après l'échelle de Mason (1958). **0** : La gonade est molle, translucide et anguleuse. La boucle intestinale est bien visible et il n'existe que peu de différences dans la coloration entre la partie mâle et femelle. **1** : La maturation a débuté. La gonade est encore petite, peu épaisse et anguleuse. La partie mâle est blanchâtre et la boucle de l'intestin n'est visible qu'au niveau de la partie femelle. **2** : La gonade commence à s'arrondir, mais la partie femelle reste anguleuse. La différence de coloration entre le testicule et l'ovaire est nette, le testicule est granuleux. La boucle intestinale est uniquement visible sur le bord de la paroi de l'ovaire. **3** : La gonade est nettement arrondie, mais peu gonflée. **4** : C'est la fin de la maturation. La gonade est très gonflée et arrondie. Elle occupe la majeure partie de l'animal. On ne voit plus du tout l'intestin (d'après Casse (1995))

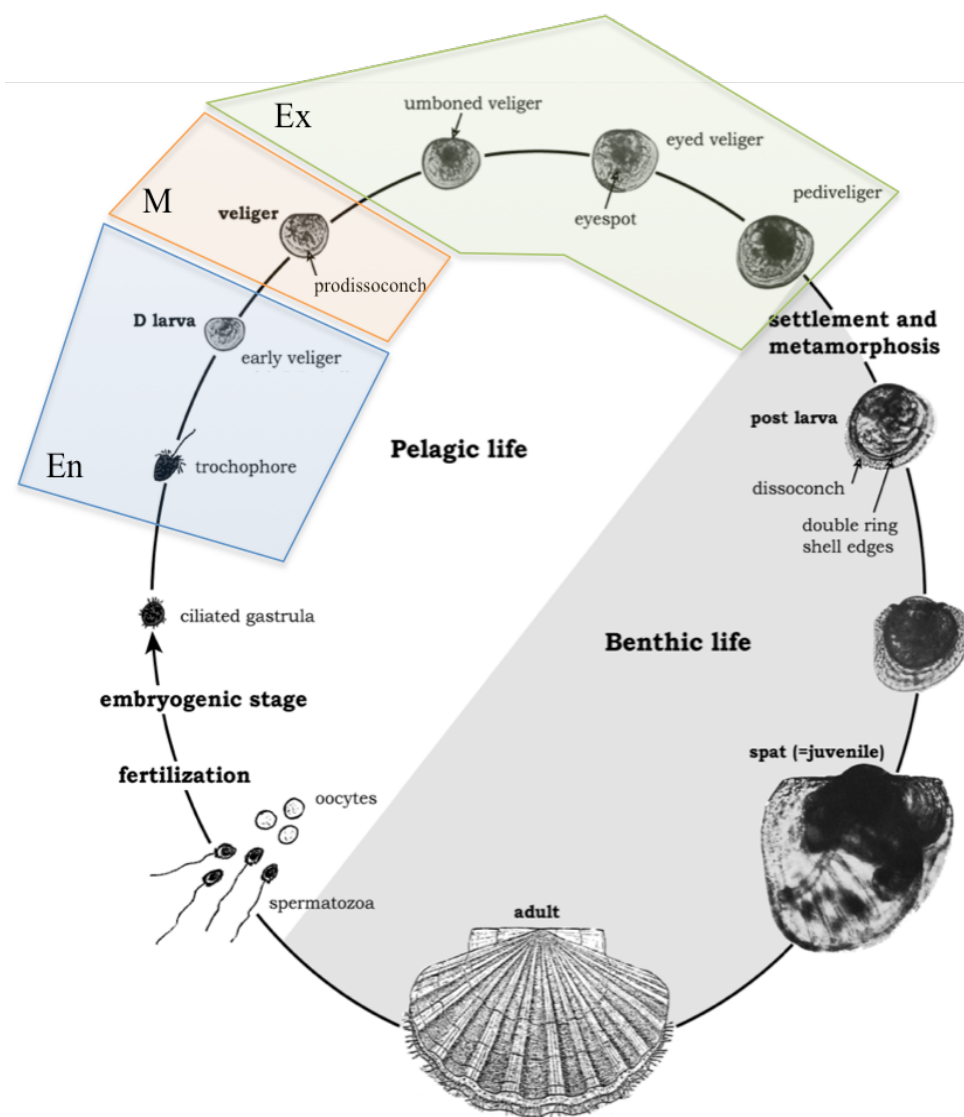


Figure 6 : Cycle de vie de *P. maximus* ; En : endotrophie, M : mixotrophie et Ex : exotrophie (d'après Le Pennec *et al.* (2003))

Pour améliorer la qualité des œufs produits, le régime alimentaire des géniteurs est constitué d'un mélange plurispécifique de microalgues afin d'obtenir tous les éléments essentiels à l'accumulation de réserves et des éléments essentiels nécessaires à un bon développement larvaire précoce (Whyte *et al.*, 1987). L'importance du contenu lipidique des œufs dans le succès d'éclosion des larves, et notamment le pourcentage d'acides gras

polyinsaturés à longue chaîne (AGPI à plus de 20 carbones), est largement soulignée dans la littérature (Dorange et Le Pennec, 1989, Delaunay *et al.*, 1992, Pernet et Tremblay, 2004). D'après Utting et Millican (1997), l'acide éicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n3), l'acide arachidonique (AA, 20 :4n6) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n3) sont les AGPI les plus importants et doivent nécessairement se retrouver dans le bol alimentaire des géniteurs. En effet, les mollusques ont une très faible capacité de biosynthèse de ces éléments essentiels, qui se fait grâce à une machinerie enzymatique impliquant des désaturases et élongases à partir des précurseurs à plus courte chaîne que sont l'acide linoléique (18 :2n6) et l'acide linolénique (18 :3n3) (Delaunay *et al.*, 1992, Glencross, 2009).

Dans le monde marin, le phytoplancton est la source majeure de ces acides gras polyinsaturés essentiels pour la survie et la croissance des animaux. Un apport de microalgues contenant en mélange des diatomées du genre *Chaetoceros*, et *Skeletonema*, de l'haptophycée *Pavlova lutheri* et du flagellé *Tisochrysis lutea* (anciennement *Isochrysis affinis galbana* (Bendif *et al.*, 2013)) permet de respecter un équilibre adéquat (Robert *et al.*, 1994b, Soudant *et al.*, 1998a, Robert *et al.*, 2004). En terme de quantité de nourriture, des rations journalières comprises entre 8×10^9 et 10×10^9 cellules algales jour⁻¹ géniteur⁻¹ permettent un bon déroulement de la gamétogenèse ce qui équivaut à environ 5 % du poids sec des individus (Utting et Millican, 1998, Robert et Gerard, 1999, Andersen *et al.*, 2011).

ÉLEVAGE LARVAIRE

Comme précisé précédemment, la qualité du régime alimentaire et la quantité de nourriture sont primordiales pour permettre aux larves de survivre après la phase endotrophe. La quantité de réserve accumulée pendant leur développement permettra aux larves de se métamorphoser avec succès. Cette étape critique du développement larvaire des bivalves survient autour de 30 jours après la fécondation chez *P. maximus* à 16 °C (Figure 6). Elle est caractérisée par trois transformations anatomiques majeures: 1) l'apparition sur le bord de la coquille dite prodissoconque (prodissoconch - Figure 6), d'une

double barre (double ring - Figure 6) correspondant à l'élaboration d'une gouttière où prendra naissance la nouvelle coquille post-larvaire, 2) un allongement du pied (Figure 7B) sécrétant un byssus permettant la fixation au substrat et 3) la perte du vélum associée au développement des branchies (Robert *et al.*, 1999, Cragg, 2006).

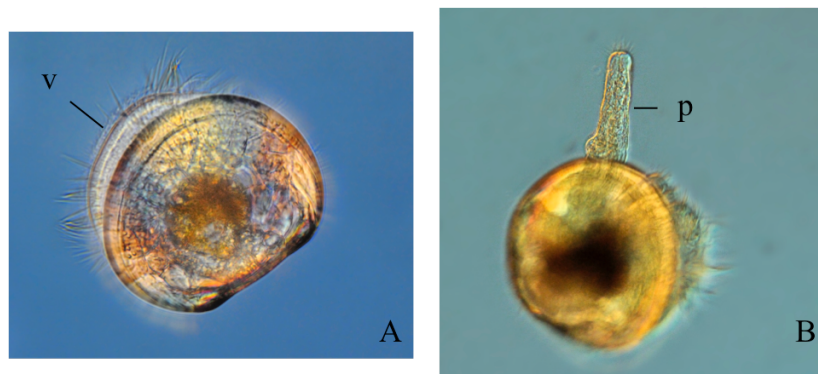


Figure 7 : Photos de larves de *Pecten maximus* en transition entre le stade véligère et pédivéligère (environ 200 µm). A- Larve véligère nageant avec le vélum (v) apparent et B- larves pédivéligères avec le pied (p) visible. (Source : Ifremer, Olivier Dugornay)

À ce stade critique de leur développement, les larves peuvent mesurer jusqu'à 250 µm et arrêtent de s'alimenter jusqu'à ce que leurs branchies deviennent fonctionnelles (Veniot *et al.*, 2003). La réorganisation tissulaire qu'elles subissent leur demande une grande quantité d'énergie nécessitant une importante accumulation préalable de réserves énergétiques (Whyte *et al.*, 1987, Hardy, 1991, Beninger *et al.*, 1994). Aucune relation n'a pu être établie entre les réserves lipidiques des œufs et la survie à long terme (Le Pennec *et al.*, 1990) alors que nous avons plus haut vu que celles-ci influencent le taux d'éclosion et le pourcentage de larves-D. Ainsi la larve véligère de *P. maximus*, comme celle des autres mollusques, va devoir se nourrir de grande quantité de microalgues pour grandir et accumuler des réserves afin d'acquérir tous les éléments essentiels à la métamorphose.

Nous avons évoqué précédemment l'importance des AGPI dans les œufs afin d'obtenir des larves-D de bonne qualité. Leur acquisition et leur intégration dans les membranes cellulaires lors du développement larvaire favorisent la croissance et la survie des larves (Soudant *et al.*, 1998a, Soudant *et al.*, 1998b, Pernet et Tremblay, 2004). Ces dernières

auront des besoins similaires en terme de qualité de nourriture que les géniteurs qui doivent produire les œufs, car elles doivent répondre à la même contrainte finale : réussir à se développer sur des réserves. Il a été largement démontré que ces acides gras ont deux fonctions physiologiques principales selon leur composition (Glencross, 2009). Le DHA est majoritairement impliqué dans le maintien de la structure et des fonctions des membranes cellulaires (Hulbert *et al.*, 2005), alors que l'EPA et l'AA sont essentiellement des précurseurs des eicosanoïdes, qui sont des hormones biologiquement actives comme les prostaglandines, molécules impliquées, entre autres, dans la réponse au stress (Howard et Stanley, 1999). L'EPA et le DPA (acide docosapentaénoïque, 22:5 n-6) pourraient également avoir un rôle dans la structure et le maintien des fonctions biologiques des membranes cellulaires (Hall *et al.*, 2002, Pernet *et al.*, 2005, Parrish *et al.*, 2007, Pernet *et al.*, 2007). Il a été démontré que la croissance, la survie et le succès à la métamorphose des larves de pectinidés étaient dépendants de la quantité de DHA et EPA et de leur ratio (Soudant *et al.*, 1998b), un déficit en DHA pouvant inhiber la métamorphose (Pernet et Tremblay, 2004). De plus, de bons résultats de croissance de larves de *P. maximus* ont été associés à la composition en stérols des microalgues utilisées et particulièrement à la teneur en cholestérol et brassicastérol, molécules très importantes pour l'intégrité des membranes cellulaires (Soudant *et al.*, 1998a, Gagné *et al.*, 2010). Ainsi les teneurs en AGPI et en stérols des microalgues fourrages ont un impact direct sur le développement larvaire et la métamorphose des larves de pectinidés. De nombreux travaux scientifiques permettant de définir un régime alimentaire optimal en ont découlé (Delaunay *et al.*, 1992, Robert et Trintignac, 1997, Utting et Millican, 1998, Nevejan *et al.*, 2003, Pernet et Tremblay, 2004, Pernet *et al.*, 2005, Tremblay *et al.*, 2007, Gagné *et al.*, 2010). De nombreuses études rapportent un mélange de flagellés et de diatomées dans des proportions différentes et avec des espèces différentes comme *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros sp* ainsi que *Skeletonema marinoi*. La nature des microalgues utilisées peut être ajustée en fonction de l'âge des larves comme l'ajout de *Rhodomonas salina* qui facilite la métamorphose, mais qui est trop grande pour être assimilée correctement dans les premiers jours de mixotrophie et/ou d'exotrophie (Tremblay *et al.*, 2007, Gagné *et al.*, 2010). Les rations

journalières sont également calculées en fonction des densités larvaires afin de ne pas générer un excès de matière organique qui favoriserait un développement bactérien à l'intérieur des enceintes d'élevage.

Les problèmes d'infections bactériennes

Les larves de pectinidés sont reconnues pour être plus difficiles à élever que les larves d'autres mollusques. En effet, les larves de moules ou d'huîtres sont bien moins sensibles aux paramètres biotiques (bactéries) et abiotiques (technique d'élevage et type d'enceinte) des élevages (Robert et Gerard, 1999, Helm *et al.*, 2006). Le mode de vie des pectinidés en milieu naturel pourrait être à l'origine de leur fragilité. Vivant dans la zone de balancement des marées, les huîtres et les moules sont plus souvent confrontées à des variations de grande amplitude des paramètres environnementaux tels que la température, la salinité, la turbulence... (Somero, 2002, Moeser *et al.*, 2006). Ainsi ces dernières pourraient être mieux armées pour résister aux conditions d'élevage en milieu contrôlé. Les mécanismes causant les fortes mortalités observées en écloserie sont encore mal connus, même si différentes bactéries pathogènes des larves, et plus spécifiquement de *P. maximus*, ont pu être isolées. C'est le cas de *Vibrio pectinidicida* (Lambert *et al.*, 1998), de *Vibrio splendidus* et de certaines souches de *Pseudomonas* (Sandaa *et al.*, 2008). En écloserie, les infections bactériennes sont reconnues comme étant la cause principale de mortalité larvaire chez les pectinidés (Jacq *et al.*, 1992, Riquelme *et al.*, 1995, Nicolas *et al.*, 1996, Jorquera *et al.*, 2001, Torkildsen *et al.*, 2005). Les stades véligères sont les plus vulnérables aux contaminations bactériennes et notamment à celles du genre *Vibrio* (MacGladdery *et al.*, 2006). La sensibilité des larves à la présence des vibrionaceae a été démontrée chez plusieurs espèces de pectinidés comme *Argopecten ventricocus* (Sainz *et al.*, 1998), *Argopecten purpuratus* (Riquelme *et al.*, 1995) et *Pecten maximus* (Nicolas *et al.*, 1996). Ces bactéries pathogènes sont particulièrement virulentes, car elles peuvent entraîner des mortalités larvaires massives et affecter les post-larves (Figure 6), considérées comme plus robustes (Elston et Leibovitz, 1980, Lodeiros *et al.*, 1987). Par exemple, il a été démontré

chez *A. ventricosus* que l'émission d'œufs déjà contaminés, via les géniteurs, provoquait des fortes proliférations bactériennes dans les enceintes d'élevage seulement 24h après la fécondation (Sainz-Hernández et Maeda-Martínez, 2005). La présence de *Vibrio* dans la flore bactérienne des gonades de *A. purpuratus* a été confirmée et la contamination des premiers stades larvaires résulterait d'un transfert de bactéries des géniteurs vers leurs gamètes (Riquelme *et al.*, 1994). Un tel processus a pu également être mis en évidence chez *Ostrea edulis* (Lodeiros *et al.*, 1987). Cette dernière incube ses larves pendant 8 à 10 jours dans la cavité palléale, autour des branchies, avant de les relâcher dans le milieu, ce qui favorise la transmission de bactéries du géniteur à la larve. Bien que ce comportement ne concerne pas les pectinidés, une spécificité propre à l'anatomie de cette famille pourrait favoriser la transmission géniteur-larve. En effet, il a été établi chez *P. maximus* que le passage de la boucle intestinale dans la gonade permettrait le passage de nutriments entre ces deux organes (Figure 3 - Le Pennec *et al.* (1992) et Beninger *et al.* (2003)). Il est donc envisageable qu'un tel processus facilite la contamination des gamètes au travers de la paroi intestinale. La production de gamètes exempts de charge bactérienne suite à un conditionnement adéquat apparaît essentielle pour la réussite des élevages larvaires de pectinidés. Dans un contexte de production de larves et de juvéniles aux rendements faibles et plus qu'aléatoires (Robert et Gerard, 1999, Bergh et Strand, 2001), la mise en place de bonnes mesures prophylaxiques (mesures permettant de limiter la propagation des microorganismes) lors du cycle de production en éclosérie devient donc une nécessité.

Comment lutter contre les bactéries pathogènes en milieu contrôlé?

Dès la mise en cause des contaminations bactériennes dans les mortalités massives observées en écloséries de bivalves, l'utilisation préventive et curative d'antibiotiques s'est généralisée (Le Pennec et Prieur, 1977, Nicolas *et al.*, 1996, Robert *et al.*, 1996). De plus, des procédés de filtration fine (0,2-1 µm) et l'utilisation de filtres à rayons ultraviolets ont été mis en place afin de limiter l'entrée de ces microorganismes dans les systèmes d'élevage (Helm *et al.*, 2006). En ce qui concerne la coquille Saint-Jacques européenne,

celle-ci était traitée en routine par l'adjonction d'antibiotiques à la concentration de 8 ppm dans les écloséries expérimentales et commerciales (Le Pennec et Prieur, 1977, Nicolas *et al.*, 1996, Robert *et al.*, 1998, Torkildsen *et al.*, 2000, Campa-Córdova *et al.*, 2005). Le chloramphénicol était largement utilisé en Europe, car il permettait un fort abattement de la flore bactérienne grâce à son large spectre. Or, depuis son interdiction dans les écloséries commerciales en 1994 (Anonymous, 1994), des solutions alternatives se sont avérées nécessaires et d'autres techniques de prophylaxie ont été testées. C'est le cas notamment d'agents antimicrobiens tel que l'érythromycine, l'acide oxalinique, le florphénicol, l'oxytétracycline et même des antifongiques (Robert *et al.*, 1998, Torkildsen *et al.*, 2002, Miranda *et al.*, 2013). Toutefois, l'utilisation de ces composés chimiques n'est pas une méthode durable à cause de l'émergence possible de souches bactériennes résistantes (Akinbowale *et al.*, 2006, Cordero *et al.*, 2012). D'autres scientifiques se sont intéressés au développement d'une technique d'élevage en flux ouvert de gros volume (Andersen *et al.* (2011), pour revue). Son principe et ses avantages seront détaillés ultérieurement. Pour finir, l'application de probiotiques (Kesarcodi-Watson *et al.* (2008), pour revue) durant les stades larvaires semble également prometteuse en favorisant la colonisation du système digestif des larves par des bactéries non pathogènes. Par exemple, l'ajout dans le milieu d'élevage d'un assemblage de souches bactériennes composé de *Phaeobacter gallaeciensis*, *Alteromonas macleodi* et *Neptunomonas* sp. semble être bénéfique aux élevages de *P. maximus* en eau stagnante (Genard *et al.*, 2014, Kesarcodi-Watson *et al.*, sous-presse).

Les différents systèmes d'élevage larvaire

Le système traditionnel : l'élevage en séquentiel

Les élevages traditionnels de larves de pectinidés sont généralement opérés dans de grandes enceintes cylindriques avec un fond conique d'un volume pouvant être compris entre 150 et 10 000 L (Figure 8). Ils sont réalisés en eau de mer stagnante et nécessitent un changement d'eau tous les deux jours (Cochard et Gérard, 1987, Helm *et al.*, 2006).

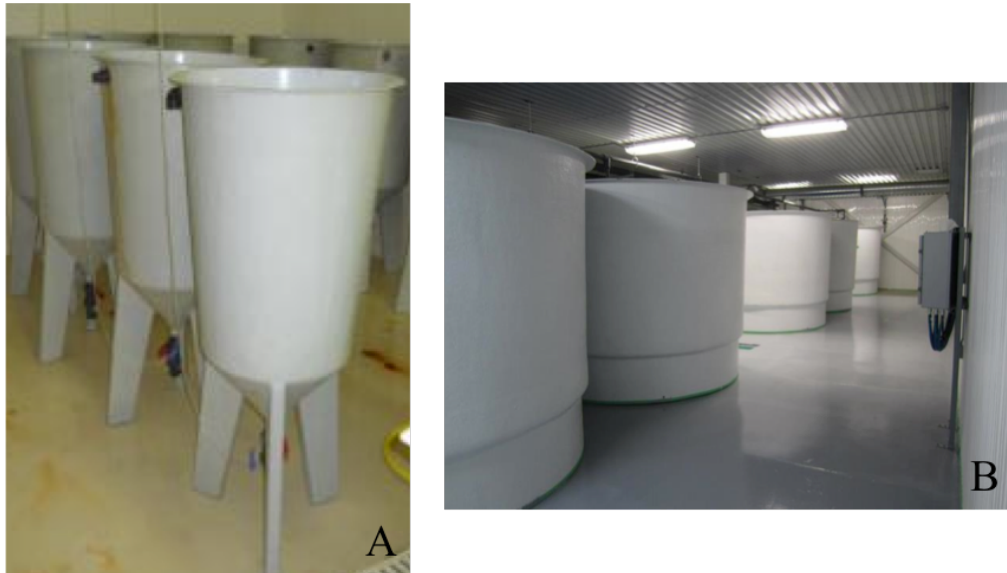


Figure 8 : Exemples de bacs d'élevage larvaire en séquentiel. A- cylindres coniques de 150 L et B- bacs de 10 000 L avec fond légèrement incliné (source : Marine Holbach)

Pour ce faire l'eau des bacs d'élevage est vidée sur des tamis de tailles différentes selon l'âge des larves (Figure 9). Ces dernières sont rincées délicatement afin de ne pas créer d'abrasion au niveau des coquilles ou du vélum, avant d'être remises dans de l'eau neuve. Ce système qualifié de séquentiel ou « batch » en anglais, nécessite l'ajout de nourriture une à deux fois par jour. Cet apport important de matière organique a l'inconvénient d'être très favorable au développement microbien (Jacq *et al.*, 1992). De plus, afin d'accélérer le cycle de développement et d'augmenter les rendements de production, des températures élevées ainsi que de fortes densités de larves sont utilisées. Les problèmes de variabilité de production observés sont exacerbés par ces paramètres qui sont des facteurs pouvant favoriser les proliférations bactériennes (Nicolas *et al.*, 1996, Ruiz-Ponte *et al.*, 1998, Ruiz-Ponte *et al.*, 1999). Comme cité précédemment l'ajout d'antibiotique est souvent nécessaire à la réussite de ce type d'élevage. En ce qui concerne la coquille Saint-Jacques européenne, celle-ci est traitée en routine par l'adjonction d'antibiotique à la concentration de 8 ppm dans les écloséries expérimentales et commerciales qui utilisent ce procédé (Robert et Gerard, 1999, Bergh et Strand, 2001, Helm *et al.*, 2006).

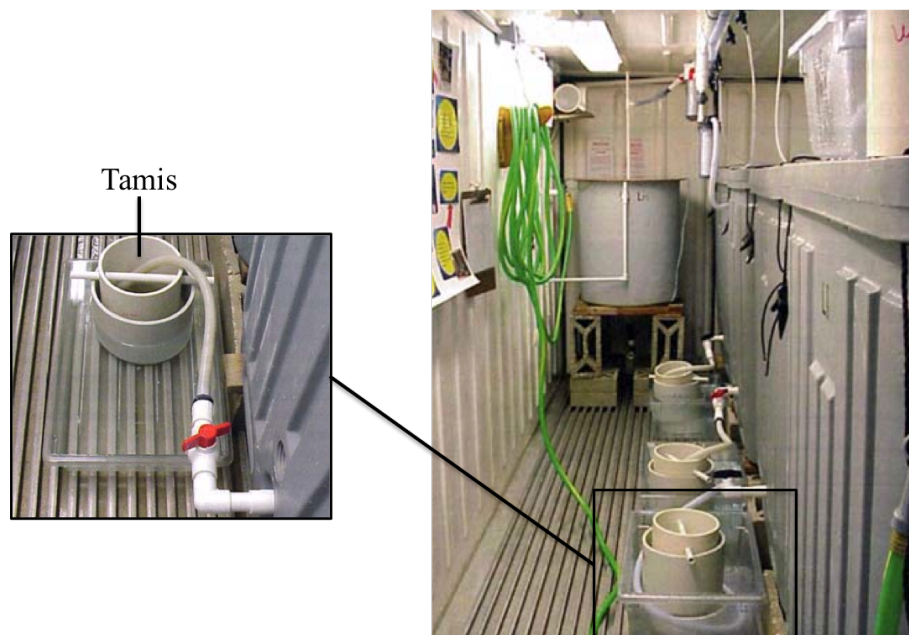


Figure 9 : Montage réalisé lors du changement d'eau et grossissement sur un tamis servant à récolter les larves (adapté de Helm *et al.* (2006))

Une méthode prometteuse : Le flux ouvert

Le flux ouvert fut développé pour les larves de *P. maximus*, par des scientifiques norvégiens dans les années 2000 en partenariat avec une entreprise locale Scalpro (Andersen *et al.* (2011), pour revue). Cette technique assure un environnement stable, de bonne qualité et riche en nourriture grâce à un apport continu d'eau neuve mélangée à des microalgues. Cela permet d'éviter la manipulation des larves lors de changements d'eau répétés, ce qui diminue fortement le stress et permet aux larves de croître dans les meilleures conditions. D'un autre point de vue, des économies de main d'œuvre non négligeables sont appréciées par les professionnels. Cependant, les élevages sont réalisés jusqu'à ce jour dans des enceintes de gros volume (800 – 4 000 L) avec un renouvellement d'eau faible (un renouvellement par jour) et à faibles densités de larves (< 6 larves ml^{-1}), ce qui limite fortement l'application commerciale de cette technologie (Magnesen *et al.*, 2006). Même si les résultats ne sont pas encore spectaculaires avec une survie de 20 % et un rendement à la métamorphose de 7 % en moyenne (Magnesen *et al.*, 2006), les élevages

en flux ouvert semblent prometteurs et sont également utilisés chez plusieurs espèces de bivalves.

En France, une attention particulière a été portée au développement d'un système d'élevage en flux continu pour l'obtention de pédivéligères de *Crassostrea gigas*. La production de cette espèce d'huître, très prisée des consommateurs, nécessite un approvisionnement en juvéniles important. L'optimisation du rendement en éclosion est au cœur des préoccupations scientifiques notamment au sein de l'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer). Cette nouvelle technique fut d'abord développée dans des bacs d'élevage de 150 L à des densités larvaires de 30 larves ml^{-1} (Figure 10). Dans ce système les larves présentaient des taux de métamorphose pouvant aller jusqu'à 87 % à 27 °C (Rico-Villa *et al.*, 2008).

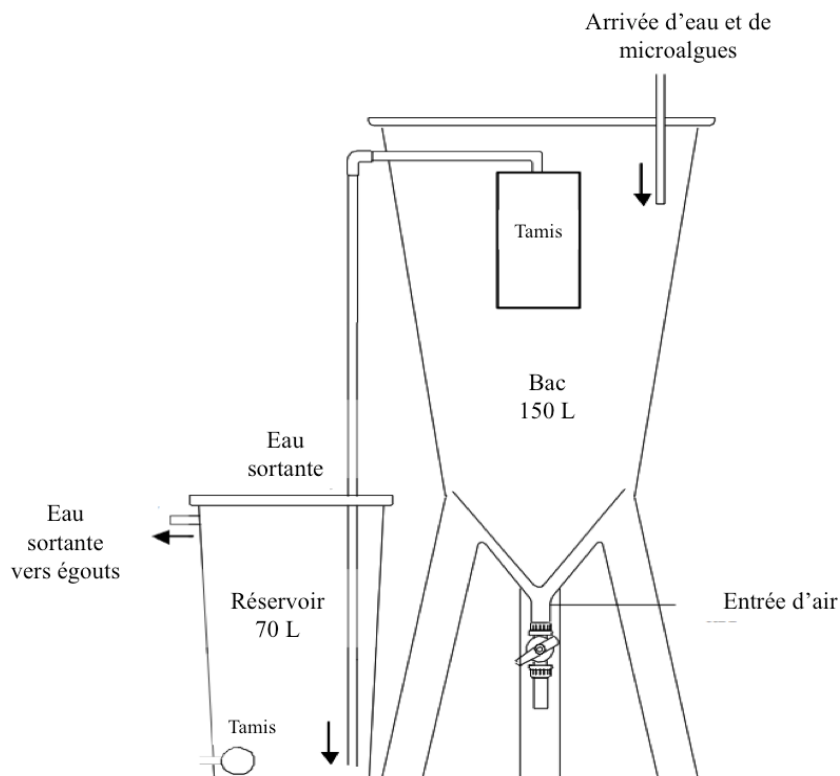


Figure 10 : Schéma d'un système d'élevage en flux ouvert de 150 L. Le tamis permet de retenir les larves à l'intérieur de l'enceinte d'élevage tout en permettant le renouvellement de l'eau mer. Il est modulable en fonction de la croissance larvaire (adapté de Rico-Villa *et al.* (2008))

Dans le but de réduire encore la main d'œuvre et de faciliter la manutention des larves, les chercheurs de l'Ifremer ont repensé le design des enceintes en flux ouvert. Testés avec *C. gigas* et *Ostrea edulis* ces bacs de faible volume (5 L), qualifiés de « flûtes », ont très vite présenté des résultats spectaculaires (Figure 11). Il s'agit d'enceintes transparentes de 104 cm de haut et de 9 cm de diamètre. Un bullage était appliqué à 0.5 L min^{-1} pour homogénéiser le milieu et le renouvellement complet de la colonne d'eau avait lieu toutes les heures. La taille des mailles de tamis utilisés (Figure 11) est également adaptable en fonction de la croissance des larves. Ainsi, il a été possible de travailler avec des densités larvaires allant jusqu'à $300 \text{ larves ml}^{-1}$ chez *C. gigas* avec des taux de survie de 85 % et de compétence à la métamorphose de 28 % (Petton et al 2009). De plus, en travaillant à 5 larves ml^{-1} , Gonzalez-Araya *et al.* (2012a) ont enregistré des taux de survie et de fixation chez *O. edulis* de près de 75 % et 60 % respectivement.

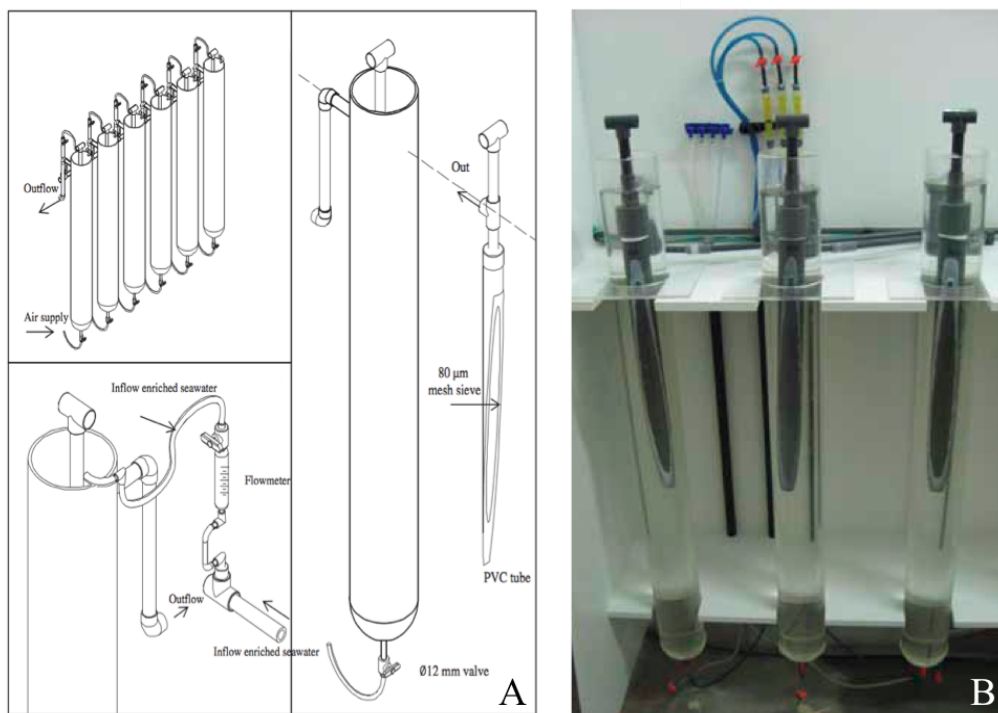


Figure 11 : A- Schéma explicatif d'un système en flux ouvert de 5 L (adapté de Gonzalez-Araya *et al.* (2012a)) ; B- photo du dispositif mis en place à l'écloserie expérimentale d'Ifremer Argenton (source : Marine Holbach)

TESTS PRÉLIMINAIRES

À la vue des très bons résultats obtenus pour les ostréidés, nous avons voulu décliner cette technique sur *P. maximus*. Nous avons ainsi conduit un élevage larvaire de coquille Saint-Jacques dans ce système, disponible à l'écloserie expérimentale d'Ifremer Argenton, et en séquentiel, en utilisant le même lot initial de larves. Trois méthodes d'élevage ont été comparées : le flux ouvert (FO) dans les flûtes de 5 L sans antibiotique (5 L FO A-), un élevage en séquentiel (SEQ) dans ces mêmes flûtes avec antibiotique (5 L SEQ A+), et un autre élevage en séquentiel dans des bacs 150 L à fond conique avec antibiotique (150 L SEQ A+) comme référence. Avec seulement 35 % de survie après 6 jours d'élevage en flux ouvert à 30 larves ml⁻¹, ce système montra vite ses limites pour notre espèce d'étude (Figure 12). Les deux autres conditions réalisées en séquentiel avec antibiotique présentaient des survies similaires autour de 55 % avec des croissances 1,5 fois plus rapides.

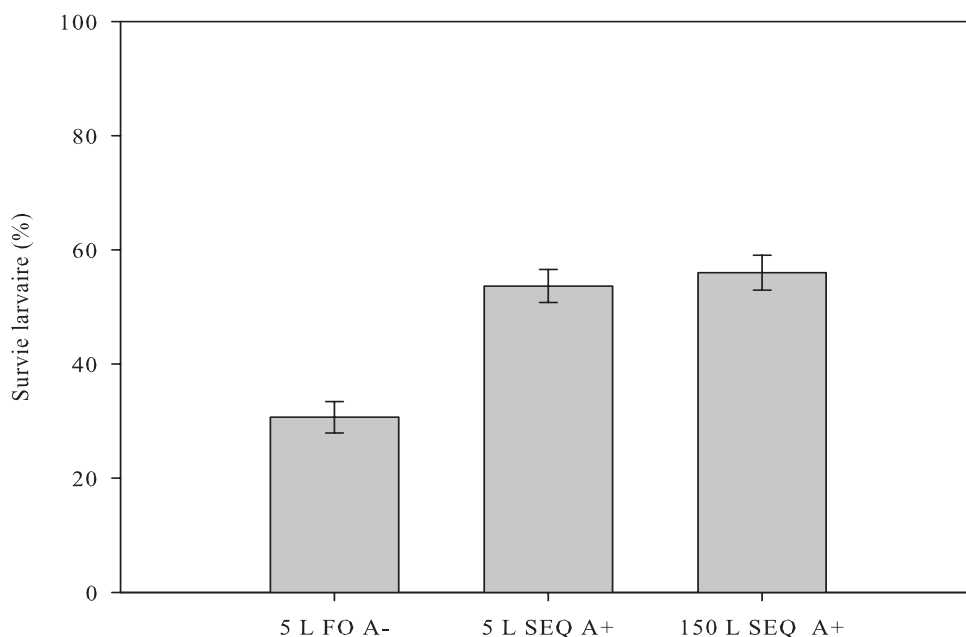


Figure 12 : Survie larvaire de *Pecten maximus* (pourcentage moyen avec erreur standard) six jours après fécondation en fonction de trois systèmes d'élevage : des flûtes en flux ouvert (5 L FO A-), des flûtes en séquentiel avec antibiotique (5 L SEQ A+), et des bacs 150 L à fond conique en séquentiel avec antibiotique (150 L SEQ A+). (Résultats présentés au congrès Physiomar10)

Les analyses bactériologiques ont montré que l'environnement des flûtes favorise le développement des *Vibrio*, même avec une faible proportion initiale autour de 1 % par larve (Figure 13). Ainsi ces résultats préliminaires confortent l'importance de la charge bactérienne des premiers stades larvaires, mais ils soulignent également la forte sensibilité des larves de pectinidés aux conditions d'élevage.

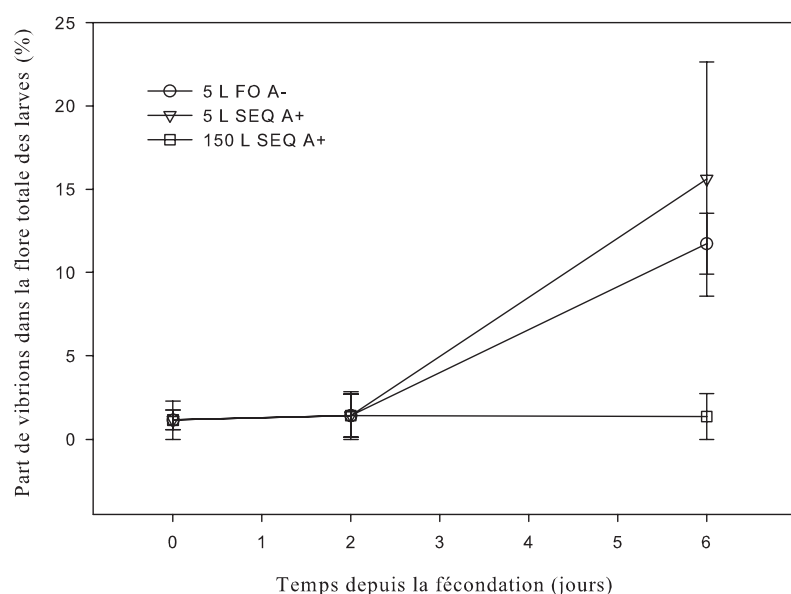


Figure 13 : Part des vibrions dans la flore totale des larves de *Pecten maximus* élevées dans trois différents systèmes d'élevage: des flûtes en flux ouvert (5 L FO A-), des flûtes en séquentiel avec antibiotique (5 L SEQ A+), et des bacs 150 L à fond conique en séquentiel avec antibiotique (150 L SEQ A+). (Résultats présentés au congrès Physiomar10)

Ces résultats préliminaires ont conforté les résultats rapportant une plus grande sensibilité des larves de pectinidés aux conditions d'élevage que celles des ostréidés. Les paramètres d'élevage appliqués dans ces enceintes pourraient directement être en lien avec les mortalités rencontrées. En effet, contrairement à ce qui est proposé par Helm *et al.* (2006) pour les pectinidés, ces flûtes possèdent un important rapport surface sur volume (S/V) de 0,585. De plus, la présence du bullage et du flux d'eau important pourrait créer un

environnement complètement différent de leur milieu naturel et donc trop stressant pour les larves.

LES STRESS CHEZ LES LARVES

Nous définirons comme stress tout paramètre pouvant provoquer un changement dans le métabolisme de la larve. Ils peuvent être d'origines diverses. Ici nous parlerons de stress bactérien pour tout changement lié à la contamination des larves, ou alors de stress physique en lien direct avec les paramètres d'élevage décrits plus haut.

Un stress bactérien agira sur la formation d'espèces réactive de l'oxygène (ROS : Reactiv Oxygen Species) qui à trop fortes teneurs dans l'organisme deviennent toxique : c'est ce qu'on appelle un stress oxydatif. Ces ROS sont produits, entre autres, au niveau cellulaire pendant l'élimination de corps étrangers lors d'une infection bactérienne (Canesi *et al.*, 2002). Leur implication dans les défenses immunitaires de bivalves a été démontrée pour plusieurs espèces (Anderson *et al.*, 1992, Lambert et Nicolas, 1998, Labreuche *et al.*, 2006). La mise en place de défenses antioxydantes a été mise en évidence par Genard *et al.* (2013) chez les larves de *C. gigas* en présence de bactéries pathogènes. La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) sont des enzymes clés de ce système de défense qui associées permettent la transformation de ROS en molécules d'eau. L'étude de l'activité de ces deux enzymes renseigne ainsi sur le niveau d'activation des défenses immunitaires et donc sur l'intensité du stress bactérien (Lacoste *et al.*, 2002, Samain *et al.*, 2007).

Un stress physique agira plutôt sur l'activité métabolique larvaire, et donc sur les besoins énergétiques. En effet, les paramètres physiques au sein desquels se trouvent les larves agissent directement sur les demandes en énergie, et donc sur l'activité du métabolisme. Chez la crevette, *Mysis relicata*, Gregg et Bergersen (1980) ont montré que la présence de bullage dans l'eau abimait les animaux en plus de les empêcher de s'alimenter et de les fatiguer par une nage ininterrompue. De telles répercussions physiques sur les

individus créent une demande importante d'énergie qui peut être mesurée grâce à l'étude de l'activité de la citrate synthase (CS - Moran et Manahan (2003), enzyme clé dans la formation d'adénosine triphosphate (ATP), source principale d'énergie cellulaire (Childress et Somero, 1979, Dahlhoff, 2004). Ainsi, les différents outils biochimiques décrits ici pourront être utilisés afin de déterminer la part d'implication d'un stress bactérien et/ou d'un stress physique chez les larves de *P. maximus* selon les conditions d'élevage utilisées.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Ce projet de recherche s'articule autour de deux objectifs principaux : i) contrôler la qualité sanitaire des stades larvaires précoces de *P. maximus* (Chapitre 1) et ii) comprendre la sensibilité des larves face aux conditions d'élevage en flux ouvert (Chapitre 2 et 3).

Chapitre 1 : “La survie des larves de *Pecten maximus* issues de géniteurs conditionnés en présence d'érythromycine et sans sédiment”

Les mortalités massives provoquées par des contaminations bactériennes des élevages sont considérées comme le problème majeur de la production de naissains en éclosiers (Devauchelle et Mingant, 1991, Andersen *et al.*, 2011). Nos résultats préliminaires ainsi que ceux de Sainz-Hernández et Maeda-Martínez (2005) ont démontré que des contaminations bactériennes précoces provoquaient des proliférations bactériennes suffisantes pour faire périr les élevages en quelques jours. La qualité sanitaire des adultes a été mise en cause dans les fortes teneurs en bactéries trouvées dans les œufs et donc dans les larves-D d'*O. edulis* et d'*A. purpuratus* (Lodeiros *et al.*, 1987, Riquelme *et al.*, 1994). Il existerait donc un transfert microbien entre les géniteurs et leur gamète qui pourrait être facilité chez les pectinidés par l'existence de relation étroite entre leur intestin et leur gonade, l'intestin traversant intégralement les organes reproducteurs (Le Pennec *et al.*, 1992, Beninger *et al.*, 2003). Afin de limiter la contamination bactérienne des œufs et des larves-D, nous faisons ici l'hypothèse que le transfert de bactéries entre les géniteurs et

leurs gamètes pourrait être limité par la mise en place de mesures prophylactiques spécifiques lors du conditionnement des géniteurs. Ainsi, l'amélioration de la qualité sanitaire des géniteurs pourrait permettre la production de larves-D en éclosion sans antibiotique. L'article issu de ce chapitre est sous presse dans *Aquaculture*.

Chapitre 2 : “Le bullage est une source de stress pour les larves de *Pecten maximus*”

Les mortalités observées lors des élevages réalisés dans le système en flux ouvert de 5 L démontrent un inconfort de la larve de *P. maximus*. Gregg et Bergersen (1980) ont montré que chez la crevette, *Mysis relicata*, la présence de bullage empêchait les individus de s'alimenter correctement, provoquait des abrasions sur les animaux et augmentait les mortalités. L'objectif principal de ce chapitre est de mesurer l'influence de différentes intensités de bullage sur la physiologie des larves afin de pouvoir adapter les techniques d'élevage en flux ouvert et d'améliorer les rendements de production en éclosion. Nous faisons l'hypothèse que la présence de bullage dans les enceintes d'élevage en flux ouvert influence négativement le développement larvaire en réduisant la capacité d'alimentation des larves. L'article issu de ce chapitre est destiné à être soumis dans *Aquaculture*

Chapitre 3 : “Les conséquences du renouvellement d'eau et de la forme de l'enceinte d'élevage sur les larves de *Pecten maximus* : Résultats préliminaires”

La sensibilité des larves de pectinidés à la forme des bacs d'élevage est évoquée par Helm *et al.* (2006). D'après eux, des élevages réalisés dans des bacs avec un rapport S/V faible procurerait plus de surface de repos et empêcherait la formation d'amas de larves, conditions favorables au développement bactérien. Horvath et Crane (2010) ont reconstitué en laboratoire des forces hydrodynamiques par agitation de la masse d'eau, dans des enceintes avec des larves de moule zébrée, *Dreissena polymorpha*. Ils ont constaté rapidement l'apparition de mortalités importantes, quelle que soit l'intensité testée. Dans le système en flux ouvert de 5 L utilisé pour les ostréidés (Gonzalez-Araya *et al.*, 2012a), le

rapport S/V est élevé (0,585) et l'absence de surface plane ne rendrait donc pas optimales les conditions d'élevage. Le flux d'eau entrant élevé de 5 L h^{-1} ainsi que la conformation de l'enceinte créent un important hydrodynamisme. Dans ce chapitre, l'objectif est d'identifier l'impact de la configuration de l'enceinte et du flux d'eau sur la physiologie de larves de *P. maximus* élevées en flux ouvert. Nous posons ainsi les hypothèses que (H1) des enceintes à fond plat possédant un rapport S/V inférieur à 0.585 amélioreraient la survie des larves élevées en flux ouvert et que (H2) dans ces enceintes, un renouvellement d'eau trop important serait néfaste au bon développement larvaire. L'article issu de ce chapitre sera soumis dans *Aquatic Living Resources*.

CHAPITRE 1

LA SURVIE DES LARVES DE *PECTEN MAXIMUS*

ISSUES DE GÉNITEURS CONDITIONNÉS EN

PRÉSENCE D'ÉRYTHROMYCINE ET SANS SÉDIMENT

Ce premier article, intitulé « *Scallop larval survival from erythromycin treated broodstock after conditioning without sediment* », fut corédigé par moi-même ainsi que par René Robert, Pierre Boudry, Bruno Petton, Philippe Archambault et Réjean Tremblay. Il fut accepté le 7 octobre 2014 pour publication dans sa version finale par les éditeurs de la revue *Aquaculture*. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. René Robert, Pierre Boudry et Réjean Tremblay ont fourni l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration de la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. Bruno Petton a contribué à l'échantillonnage, l'analyse et au traitement des données de bactériologie. Philippe Archambault a participé de près à la réalisation des analyses statistiques. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision de l'article. Une version abrégée de cet article a été présentée à la conférence internationale Physiomar12 à Saint-Jacques de Compostelle en septembre 2012.

Congrès Physiomar12, Saint-Jacques de Compostelle, Espagne. “*The sanitary quality improvement of scallop *Pecten maximus* larval rearing*”. Holbach M., Petton B., Mingant C., Lebrun L., Quéau I., Le Souchu P., Tremblay R. and Robert R.

1.1 RÉSUMÉ

Les bactéries pathogènes sont connues pour être la cause principale des mortalités larvaires observées chez *Pecten maximus* en éclosure. De ce fait, la production artificielle de juvéniles repose sur l'addition d'antibiotiques durant toute la période d'élevage. Toutefois, il est aujourd'hui nécessaire de trouver des alternatives à l'utilisation de produits chimiques néfastes pour l'homme et l'environnement. Cette étude porte sur la recherche de méthodes de prophylaxie permettant de diminuer les mortalités larvaires en réduisant le transfert des bactéries des œufs aux larves de *Pecten maximus* tout en limitant l'utilisation d'antibiotique. Dans le but de diminuer la charge bactérienne dans les élevages larvaires, nous avons appliqué un traitement durant le conditionnement des géniteurs d'une part, et à partir du stade larve-D d'autre part. Les animaux ont été conditionnés pendant deux mois en présence de sédiment (SA) et sans sédiment (NSA) et deux traitements de 6 jours à l'érythromycine ont été appliqués. L'absence de sédiment a permis de réduire considérablement les teneurs en vibrions des œufs (NSA: $0,003 \pm 0,002$ CFU œuf⁻¹ SA: $0,57 \pm 0,17$ CFU œufs⁻¹) et des larves-D (NSA: 0.14 ± 0.05 CFU larve-D⁻¹ SA: 0.51 ± 0.002 CFU larve-D⁻¹). La survie larvaire après 15 jours d'élevage a été améliorée de 52 % grâce au retrait du sédiment lors du conditionnement. En revanche, l'application d'un traitement de deux jours à l'érythromycine sur les larves-D n'a pas eu d'impact sur la survie des larves et cela peu importe la méthode de conditionnement des adultes. Ce travail démontre qu'il est possible de diminuer la contamination des œufs de *P. maximus* lorsque les géniteurs sont conditionnés sans sédiment et sous l'action d'érythromycine. Il propose ainsi une alternative à l'utilisation massive d'antibiotiques dans les élevages de coquille Saint-Jacques.

1.2 SCALLOP LARVAL SURVIVAL FROM ERYTHROMYCIN TREATED BROODSTOCK AFTER CONDITIONING WITHOUT SEDIMENT

Auteurs

Marine Holbach^{a,b}, René Robert^{b,c}, Pierre Boudry^b, Bruno Petton^b, Philippe Archambault^a, Réjean Tremblay^{a*}

Institutions

^a: Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, G5L 3A1 Rimouski, Québec, Canada

^b: Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539 LEMAR), Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France

^c: Ifremer, Unité Littoral, Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France

ABSTRACT

Pathogenic bacteria are known to be one of the main factors affecting *Pecten maximus* larval survival in hatcheries. As a result, juvenile production often relies on the use of antibiotics during larval culture. However, limitations of the usage of chemicals such as chloramphenicol in aquaculture have been reinforced due to their negative environmental impact and alternatives are accordingly needed. Thus, the importance of bacterial transfer from oocytes to larvae has been studied here as well as procedures to limit larval mortality in *P. maximus*. In order to reduce bacterial contamination during larval development, we focused on two periods, broodstock conditioning and post-fertilization. The animals were conditioned for 2 months with two erythromycin treatments of 6 days, with (SA) or without sandy-bottom (NSA). The absence of sediment strongly reduced contamination by *Vibrios* of oocytes (NSA: 0.003 ± 0.002 CFU oocyte⁻¹ SA: 0.57 ± 0.17 CFU oocyte⁻¹) and D-larvae (NSA: 0.14 ± 0.05 CFU D-larva⁻¹ SA: 0.51 ± 0.002 CFU D-larva⁻¹). It also enhanced survival by 52% at 15 days post fertilization, whereas a two days antibiotic treatment of D-larvae did not improve subsequent survival, regardless of broodstock conditioning method. Furthermore, both treatments led to similar fatty acids profiles in oocytes and resulting larvae, suggesting that broodstock conditioning was physiologically similar with or without sediment. This work has shown that gametes contamination could be reduced when sandy-bottom is removed during broodstock conditioning under bacterial control with erythromycin. The present results contribute to a reduced utilization of antimicrobial agents for great scallop larval rearing in controlled condition.

Key words scallop, broodstock conditioning, larval survival, vibriosis

INTRODUCTION

Compared to oysters or clams (Loosanoff and Davis, 1963; Walne, 1966), the production of Pectinid juveniles for aquaculture, enhancement of populations or sea ranching through reliable hatchery processes is more recent (Dao et al., 1995; Helm et al.,

2004). After the first laboratory trials (Gruffydd and Beaumont, 1972), seed supply by hatcheries progressed rapidly. First results of experimental production were encouraging (Buestel et al., 1982), but despite recent progress (Magnesen et al., 2006) juvenile production remains, however, unpredictable due to high variations in larval survival, often associated with massive bacterial infections (Andersen et al., 2011; Devauchelle and Mingant, 1991). To limit bacterial contamination and sustain production of juveniles, the preventive or systematic use of antimicrobial agents seems the solution for some Pectinid hatcheries (Le Pennec and Prieur, 1977; Nicolas et al., 1996; Robert et al., 1996; Torkildsen et al., 2005; Uriarte et al., 2001). Larval survival is generally improved but such a practice is unsustainable as it increases the risk of selecting resistant bacteria (Akinbowale et al., 2006; Riquelme et al., 1994, Cordero Otto et al., 2012).

Among heterotrophic bacteria, some *Vibrios* are known to be particularly virulent and have been reported to induce severe and rapid larval mortalities of molluscs (Elston and Leibovitz, 1980; Lambert et al., 1998; Lodeiros et al., 1987). Vertical transfer of bacteria from broodstock to gametes and larvae of different bivalve species has been described in many studies (Avendaño-Herrera et al., 2001; Lodeiros et al., 1987; Prado et al., 2013; Riquelme et al., 1994) and could result in *Pecten maximus* in a transfer of bacteria from the intestinal loop to the gonad (Beninger et al., 2003; Le Pennec et al., 1992). For the contamination at early life stages, *Vibrio* were shown to be released into seawater rearing by *Argopecten ventricosus* during spawning, inducing bacterial blooms in tanks 24 h post-incubation (Sainz-Hernández and Maeda-Martínez, 2005).

The main objective of the present study was to assess different possibilities to limit the microbial load in early life stages of *P. maximus* larvae. On one hand, the influence of sediment during broodstock conditioning was studied because we hypothesised that early gametes contamination might be induced during broodstock conditioning. Most bivalves do not need sediment to be conditioned in hatchery but scallops are generally maintained in tanks with sand or gravel to mimic their natural environment (Utting and Millican, 1997). This sediment could favour bacterial development by trapping microorganisms and

becoming a potential gametes infection source. On the other hand, the hypothesis that a short and early treatment, target on broodstock bacterial flora, could noticeably reduce bacterial proliferation and accordingly enhance larval survival was studied. To determine the influence of the presence of sediment during broodstock conditioning on larval quality, fatty acids content and composition have been determined on each oocyte and D-larva sample. Total fatty acids accumulation and composition in bivalve larvae have been largely demonstrated to be a good indicator of larval quality (Delaunay et al., 1992; Gagné et al., 2010; Glencross and Smith, 2001; Le Pennec et al., 1990; Marty et al., 1992; Pernet and Tremblay, 2004; Soudant et al., 1996).

MATERIALS AND METHODS

Broodstock sampling and conditioning

Three-four year-old great *scallops* were collected by diving in the Bay of Brest (Finistère, France) in March 2011 and transferred to the Ifremer experimental hatchery of Argenton (Finistère, France). One hundred and twenty individuals (mean shell height: 108.5 ± 0.7 mm) were distributed in 8 tanks of 300 L (15 adults per tank). According to Mason macroscopic scale (Mason, 1958), modified by Robert et al. (1994), maturation stages ranged from 1 to 3 with 2 as mean value. Broodstock treatments carried out in duplicate corresponded to tanks equipped with coarse autoclaved sandy-bottom (SA) or without any sediment (NSA).

During conditioning, the photoperiod was maintained at 15:9 and tanks supplied with flow-through filtered (1 μ m) and UV-treated seawater (50 L h⁻¹). Broodstock were continuously fed with *Pavlova lutheri* (P), *Tisochrysis lutea* (T) and *Skeletonema marinoi* (S), at 1:1:1 equivalent volume and daily ration of 8×10^9 cells animal day⁻¹. Two antibiotic treatments were applied during a 6 day-period in stagnant seawater with circulation pumps. The first when animals arrived at the hatchery and the second 4 weeks later. The selected antibiotic (see specific section 2.3 for details) was used at 8 ppm every two days

corresponding to seawater renewal. The rest of the conditioning was realized in a continuous water flow. The temperature was raised at the beginning of the experiment by one degree per day until it reached 15°C.

Selection of the tested antibiotic

At the onset of the experiment, a portion of gonad and hemolymph of seven scallops were collected and homogenized in sterile seawater (SSW). After 10^{-1} SSW dilution, 100 µl of homogenate was plated onto marine agar. Small discs containing different antibiotics (erythromycin, penicillin, ampicillin, kanamycin, oxytetracycline, tetracycline, streptomycin, ticarcillin, chloramphenicol, flumequin, florfenicol, nalidixic acid, amoxicillin and gentamicin: Sigma-Aldrich, France) were laid in different zones of the culture (Gibson et al., 1998; Prado, et al., 2013; Riquelme et al., 1996) and inhibition zones were compared thereafter (Furones, 2001; Mayr-Harting et al., 1972). In our case, erythromycin appeared to be the most efficient antibiotic by presenting the cleanest and largest inhibition zone. This chemical agent has been used for all experiments described in this study.

Larval rearing

After 7 weeks, 37% and 40% of the broodstocks spawned after thermal stimulation (+5°C) for **SA** and **NSA** conditions respectively. Oocytes were fertilized as described in Gruffydd and Beaumont (1970). After 48 h of incubation in 150-L cylinder-cone shape tanks in stagnant seawater at 18°C, $19.5 \pm 7.9\%$ and $41.2 \pm 0.2\%$ of **SA** and **NSA** oocytes respectively hatched into D-larvae. Veliger larvae were reared in 5-L beakers in stagnant filtered (1 µm) and UV-treated seawater, renewed each second day, at 18°C. Each batch of larvae, originating from two previous broodstock treatments (**SA** and **NSA**), was exposed to two different larval treatments: **NT**- without antibiotic, **E**- treated with selected antibiotic during 2 days (from 2 to 4 days post-fertilization: dpf; Figure 14).

The selected antibiotic (see specific section 2.3 for details) was added in rearing seawater at a concentration of 8 mg L⁻¹ (Robert et al., 1996). Larvae, at an initial density of

10 veligers mL^{-1} , were fed daily a PTS mixture to ensure 60 cells μL^{-1} in the water (1:1:1 equivalent volume). The experiment ended on day 15, at the beginning of the strict exotrophic larval phase to avoid potential confounding effect with trophic conditions.

Broodstock conditioning		Larval rearing	
<i>Substrate</i>		<i>Antibiotic treatment (from 2 to 4 dpf)</i>	
Sediment SA	—	Untreated NT	n=3
		Erythromycin E	n=3
No Sediment NSA	—	Untreated NT	n=3
		Erythromycin E	n=3

Figure 14 : Schematic of the experimental design: NT- without antibiotic, E- 2 days selected antibiotic treatment

Monitoring of bacterial load

Oocytes were sampled for bacterial analysis. During the larval rearing, bacterial concentration was achieved by sampling each larval replicate on a weekly basis. Total flora and *Vibrio* loads were estimated by the plate counting method, using marine agar and Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-sucrose (TCBS) respectively (Azandegbe et al., 2010). They were expressed as Colony Forming Units, CFU larvae^{-1} or oocytes^{-1} for each crushed sample (Thomas potter in sterile atmosphere before plate inoculation).

Lipid analysis

Samples of eggs (50 000) and 2 day-old larvae (25 000) were collected onto pre-combusted (450°C) Whatman GF/C filters, rinsed with 6% ammonium formate and

stored at -80°C in 2 ml of CH_2Cl_2 -MeOH (2:1), under nitrogen atmosphere. Lipids were extracted in dichloromethane-methanol (Folch et al., 1957) as described in Parrish (1987) and separated into neutral (including triglycerides, free fatty acids, and sterols) and polar (including mainly phospholipids) fractions as described in (Pernet et al, 2006). All fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared as described in Lepage and Roy (1984) and analysed in MSMS scan mode on a Polaris Q ion trap coupled to a Trace GC (Thermo Finnigan, Mississauga, ON, CA), as described in Gendron et al. (2013).

Statistical analysis

We used Permutational Analyses of Variances (PERMANOVA - PRIMER-E 6.0 PERMANOVA plus; PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK) because of non-normal distribution of our larval rearing databases. This approach is more accurate than non-parametric analysis, because it uses similarities, like ANOVAs, but using the permutations method (9999 permutations). Only homoscedasticity must be verified by using the PERMDISP test (Anderson et al., 2008). When t-Tests were necessary, they were achieved using the software R (2012) following Shapiro-Wilk normality test. If data were not normal, Wilcoxon-Mann-Whitney tests were preferred to t-Tests.

For oocytes and D-larvae contamination, two-way cross PERMANOVAs, were performed to compare *Vibrio* and total flora contamination. Sources of variation in the PERMANOVA were: “Broodstock conditioning” (two fixed levels: NSA or SA) and “Ontogenic stage” (two fixed levels: oocytes and D-larvae) and their interaction. The resemblance matrixes were calculated on Euclidean distances as it was recommended by (Anderson, et al., 2008) for univariate analysis.

For larval rearing data, two-way crossed PERMANOVAs, based on Euclidean resemblances, were realized for 10 dpf and 15 dpf separately, as homoscedasticity was not achieved when we include the factor “Date” (survival: $p_{(\text{PERMDISP})} = 0.0001$; $F_{(1-33)} = 19.383$; *Vibrio* contamination: $p_{(\text{PERMDISP})} = 0.038$; $F_{(1-33)} = 7.911$; total flora contamination: $p_{(\text{PERMDISP})} = 0.0001$; $F_{(2-30)} = 28.43$). Sources of variation in the

PERMANOVAs were: “Broodstock conditioning” (two fixed levels: **NSA** or **SA**) and “Treatment” (two fixed levels: **E** or **NT**) and their interaction.

Univariate two-way crossed PERMANOVAs, based on Euclidean resemblances, were used to compare total fatty acids contents in the neutral and polar part of oocytes and D-larvae. Sources of variation were “Broodstock conditioning” (two levels fixed, **NSA** or **SA**), “Ontogenic stage” (two levels fixed, oocytes or D-larvae).

RESULTS

Bacterial load of oocytes and D-larvae before antibiotic treatment

Estimated *Vibrio* load was higher for oocytes ($p = 0.00042$; $W = 187$) and D-larvae ($p = 0.0016$; $t = 5.47$; $df = 6$) originating from broodstock conditioned with sediment (**SA**) than without sediment (**NSA**) (Figure 15A). It remained steady between oocytes and D-larvae in **SA** condition ($p = 0.31$; $W = 24$); whereas, the *Vibrio* load increased significantly from oocytes to D-larvae in **NSA** condition ($p = 0.00083$; $W = 0$). However, **NSA** D-larvae *Vibrio* concentration remained 3.6 fold lower than in **SA** D-larvae (Figure 15A).

Similar trends were observed when considering total flora of oocytes ($p = 0.00096$; $W = 186$) and D-larvae ($p = 0.047$; $t = 2.5$; $df = 6$), with higher loads for gametes and offspring originated from **SA** broodstock (Figure 15B). Regardless of conditioning treatments, total flora contamination increased significantly from oocytes to D larvae (**SA**: $p = 0.000002$; $t = -6.62$; $df = 20$; **NSA**: $p = 0.007$; $W = 3$). The transfer of bacteria from oocytes to D-larvae was higher from broodstock conditioned without sediment (**NSA**: 7 fold increment) than in sand-bed (**SA**: 4.4 fold increment), but **NSA** amount did not reach total flora load of **SA** D-larvae (Figure 15B).

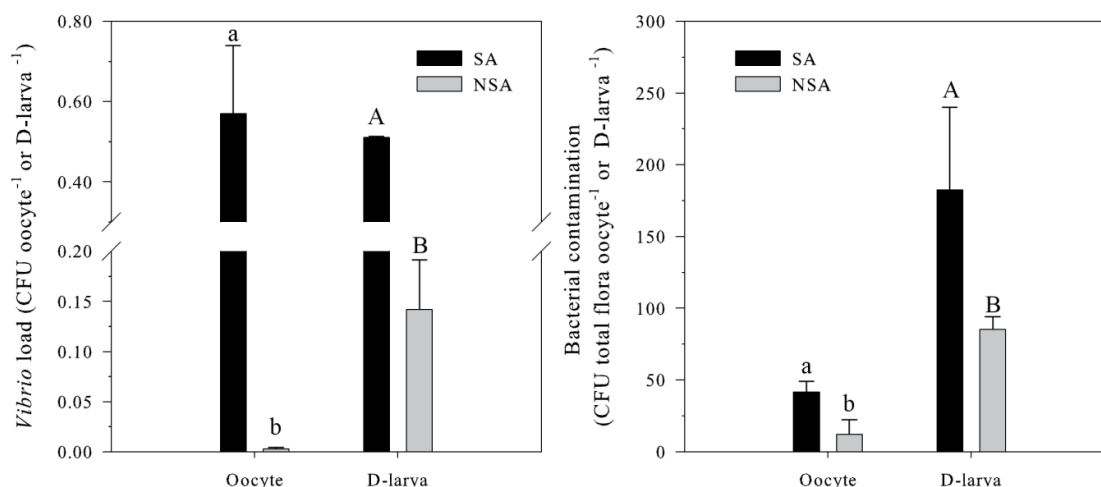


Figure 15 : Mean oocytes and D-larvae bacterial contamination (mean $\pm$ SE) between two different broodstock conditioning: **SA**, presence of sandy-bottom and **NSA**, without any sediment. A- *Vibrio* load and B- total flora (CFU oocyte⁻¹ or CFU larva⁻¹). Different letters show significant differences $p < 0.05$. Capital and lowercase letters correspond to separate analyses

Larval survival and bacterial load after antibiotic treatment

Regardless of date, no significant differences in larval survival (Figure 16A) were observed when considering larval antibiotic treatment ($p = 0.881$, Pseudo- $F_{(1-11)} = 0.02$ at 10 dpf; $p = 0.34$, Pseudo- $F_{(1-11)} = 0.92$ at 15 dpf). In contrast, significant differences in larval survival were observed between broodstock conditioning procedures (**NSA** versus **SA**) on day 10 ($p = 0.011$; Pseudo- $F_{(1-11)} = 11.79$) and 15 ($p = 0.017$; Pseudo- $F_{(1-11)} = 8.88$). Larvae originated from **NSA** broodstock showed 52% higher survival on days 15 (Figure 16A) than those originating from **SA** broodstock.

Levels of *Vibrio* in D-larvae were close to 0 for all treatments, but increased over time until day 15, when significant differences between broodstock conditioning factor ($p = 0.016$; Pseudo- $F_{(1-11)} = 12.03$), with values more than twice higher in larvae originating from **SA** broodstock (Figure 16B). In contrast, larval antibiotic treatment between 2 to 4 days post-fertilization did not induce significant differences in *Vibrio* load of larvae at day

10 ($p = 0.71$; Pseudo- $F_{(1-11)} = 0.16$) and 15 ($p = 0.60$; Pseudo- $F_{(1-11)} = 0.298$) (Figure 16B). Similar trends were observed for total flora load in larvae but no significant differences related to broodstock conditioning or antibiotic factor were found due to high heterogeneity between replicates (Figure 16C).

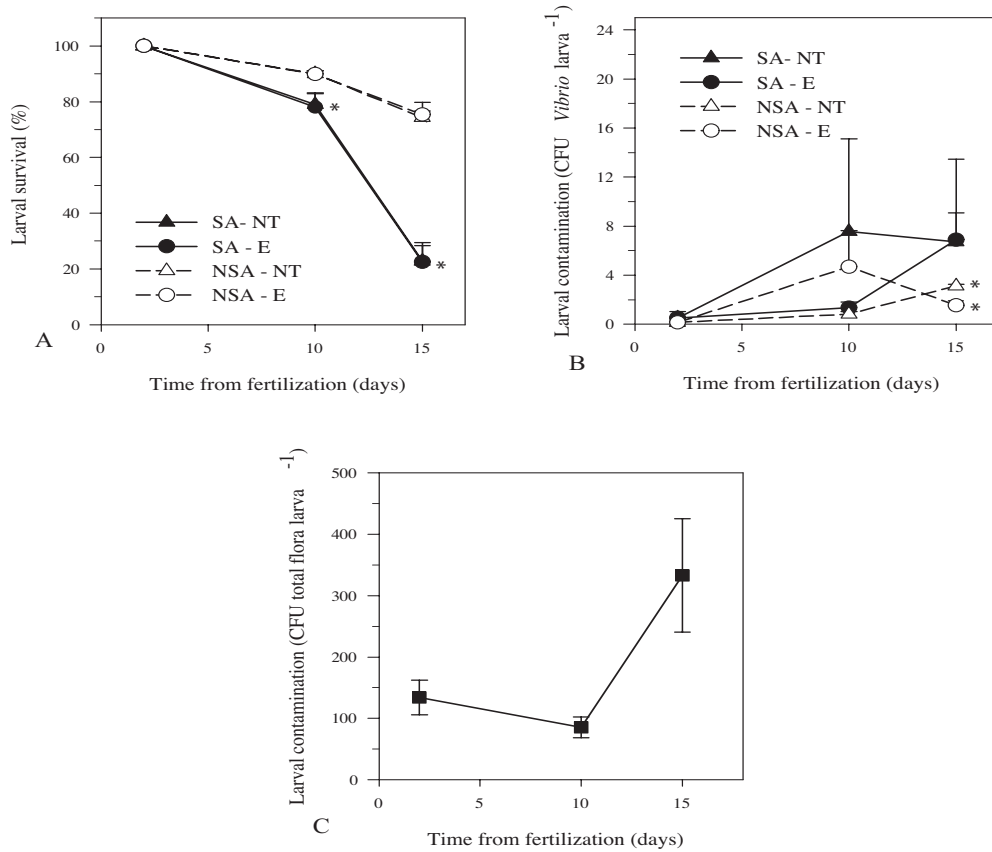


Figure 16 : A- Larval survival (%); B- *Vibrio* contamination (CFU larva⁻¹) of larvae into four different conditions. **SA** - NT: Presence of sediment during broodstock conditioning and larvae reared without antibiotic; **SA** - E: Presence of sediment during broodstock conditioning and larvae reared with erythromycin treatment between 2 to 4 days post-fertilization; **NSA** - NT: Absence of sediment during broodstock conditioning and larvae reared without antibiotic; **NSA** - E: Absence of sediment during broodstock conditioning and larvae reared with erythromycin treatment between 2 to 4 days post-fertilization; C- Mean of total flora contamination of larvae during larval rearing (CFU larva⁻¹), data were pooled as there were no statistical differences. Asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$). Asterisks correspond to the two **SA** conditions (mean $\pm$ SE)

Characteristics of oocytes and larvae lipids

Fatty acids profiles of the neutral and polar lipid fraction of oocytes and D-larvae are given in Table 1. Considering the effects of broodstock conditioning, no significant differences were detected in oocytes and D-larvae fatty acids composition of each fraction (neutral: $p = 0.60$; Pseudo- $F_{(1-31)} = 0.6$; polar: $p = 0.22$; Pseudo- $F_{(1-31)} = 1.5$).

When considering total fatty acids content (Table 1), no significant differences were observed for the factor “Broodstock conditioning” in any lipid fraction (Neutral: $p = 0.52$; Pseudo- $F_{(1-31)} = 0.42$ and Polar: $p = 0.89$; Pseudo- $F_{(1-31)} = 0.019$).

DISCUSSION

Broodstock conditioning and gametes contamination

Oocytes originating from scallops conditioned in tanks with sediments (SA) were more contaminated by bacteria, and specifically by *Vibrio*. Despite the use of autoclaved sediment, the accumulation of algae and feces created an organic matter layer, which might favor bacterial development (Essid et al., 2007; La Rosa et al., 2004; Richardson et al., 2008). The prophylactic measures implemented in the sandy-bottom tanks were clearly inefficient because bacteria accumulated significantly in SA oocytes. Moreover, sediment is known to act as a bacterial reservoir (Chelossi et al., 2003), which could be a major source of broodstock microbial contamination. *Vibrios* are prevalent in the bivalve microflora (MacGladdery et al., 2006; Pruzzo et al., 2005). They are resistant to digestion and able to become established in the digestive tract of bivalves (Prieur et al., 1990). In *P. maximus*, the intestine is partially included in the gonad where it makes a loop (Le Pennec et al., 1992). Tissues transfer could be promoted and facilitate infection of gonads and specifically maturing oocytes (Beninger et al., 2003). This anatomic particularity could support the idea of a direct vertical transfer between scallops and gametes.

Table 1 : Fatty acids profiles of neutral and polar fractions from oocytes and D-larvae. Data obtained from sediment and non-sediment conditionings were pooled as they were non-significant. Values in bold represent essential fatty acids contributing to differences between oocytes and D-larvae for each lipid fraction. Results are express as % of total fatty acid (mean $\pm$ SE)

	Neutral					Polar				
	Oocytes		D-larvae			Oocytes		D-larvae		
C14:0	5.9	$\pm$ 0.51	2.1	$\pm$ 2.08		1.1	$\pm$ 1.13	0.0	$\pm$ 0.00	
C15:0	0.2	$\pm$ 0.07	0.0	$\pm$ 0.00		0.0	$\pm$ 0.00	0.0	$\pm$ 0.00	
C16:0	15.6	$\pm$ 0.28	20.5	$\pm$ 0.95		9.8	$\pm$ 1.11	7.6	$\pm$ 2.59	
C17:0	0.0	$\pm$ 0.00	0.0	$\pm$ 0.00		0.0	$\pm$ 0.00	0.0	$\pm$ 0.00	
C18:0	1.9	$\pm$ 0.18	0.3	$\pm$ 0.08		5.1	$\pm$ 0.18	4.1	$\pm$ 1.33	
C22:0	0.2	$\pm$ 0.05	1.2	$\pm$ 0.59		0.1	$\pm$ 0.09	0.0	$\pm$ 0.00	
Σ SFA	23.8	$\pm$ 0.38	24.1	$\pm$ 0.62		16.1	$\pm$ 1.97	11.7	$\pm$ 3.91	
C16:1 (n-7)	4.4	$\pm$ 1.96	10.9	$\pm$ 1.00		0.2	$\pm$ 0.20	0.0	$\pm$ 0.00	
C17:1 (n-7)	0.1	$\pm$ 0.15	0.0	$\pm$ 0.00		4.4	$\pm$ 1.48	2.4	$\pm$ 0.56	
C18:1 (n-9)	2.4	$\pm$ 1.36	0.0	$\pm$ 0.00		0.2	$\pm$ 0.20	0.0	$\pm$ 0.00	
Σ MUFA	7.0	$\pm$ 0.74	10.9	$\pm$ 1.00		4.8	$\pm$ 1.48	2.4	$\pm$ 0.56	
C18:2 (n-6)	2.2	$\pm$ 0.19	0.0	$\pm$ 0.00		0.0	$\pm$ 0.00	0.0	$\pm$ 0.00	
C18:3 (n-6)	9.1	$\pm$ 0.38	2.4	$\pm$ 2.39		4.8	$\pm$ 0.10	19.2	$\pm$ 1.74	
C18:3 (n-3)	2.4	$\pm$ 0.06	4.8	$\pm$ 0.43		0.5	$\pm$ 0.28	0.0	$\pm$ 0.00	
C18:4 (n-3)	9.2	$\pm$ 0.36	2.3	$\pm$ 2.31		4.8	$\pm$ 0.06	18.8	$\pm$ 1.72	
C20:3 (n-6)	0.8	$\pm$ 0.05	0.0	$\pm$ 0.00		0.2	$\pm$ 0.16	0.0	$\pm$ 0.00	
C20:3 (n-3)	0.1	$\pm$ 0.09	1.6	$\pm$ 0.55		0.0	$\pm$ 0.00	0.0	$\pm$ 0.00	
C20:4 (n-6) (AA)	2.4	$\pm$ 0.01	1.5	$\pm$ 0.05		5.3	$\pm$ 0.15	5.0	$\pm$ 0.22	
C20:5 (n-3) (EPA)	25.4	$\pm$ 0.13	22.3	$\pm$ 4.06		22.4	$\pm$ 2.20	11.7	$\pm$ 0.38	
C22:6 (n-3) (DHA)	17.6	$\pm$ 0.87	30.1	$\pm$ 0.31		41.1	$\pm$ 2.81	31.4	$\pm$ 0.49	
Σ PUFA	69.2	$\pm$ 0.35	65.0	$\pm$ 0.39		79.0	$\pm$ 0.49	85.9	$\pm$ 3.35	
Σ EFA	45.3	$\pm$ 1.02	53.9	$\pm$ 4.43		68.8	$\pm$ 0.76	48.0	$\pm$ 0.11	
Total (pg individual⁻¹)	227	$\pm$ 8	112	$\pm$ 14		67	$\pm$ 2.5	93	$\pm$ 11.7	

Bacterial load of gametes and larval survival

Oocytes and D-larvae originated from broodstock conditioned with or without sediment exhibited similar quantities of neutral and polar lipids as well as similar FA profiles (Table 1). Broodstock were accordingly conditioned with the same diet and, despite a potential trapping of food by sediment, it did not interfere with storage and gamete biochemical composition. Neutral lipids or triacylglycerols are the primary endogenous energy reserve fueling basal metabolism in bivalve larvae (Ben Kheder et al., 2010a, b; Gallager and Mann, 1986; Holland and Spencer, 1973). Thus, differential performances of larvae that originated from **SA** or **NSA** broodstock (20 and 80% survival, on 15 dpf, respectively) were not related to lipids content. In contrast, *Vibrio* loads were higher for **SA** larvae on day 15 and might explain the differential mortality recorded. Indeed, it has been reported that larval rearing can collapse when *Vibrio* concentration is very low during spawning (Luna-González et al., 2002). Sediment allows bacterial development by getting them substrate and organic matter (Essid et al., 2007; La Rosa et al., 2004; Richardson et al., 2008) and explained undoubtedly the earlier mortality of **SA** larvae more contaminated initially (day 2).

A short and early erythromycin treatment (two consecutive days from day 2 to 4), based on broodstock bacterial flora, did not improve long-term *P. maximus* larval performance. The selection of suitable antibiotic by antibiograms, to depress bacterial flora is considered as a good long-term solution for fish farming by Furones (2001). Each group of broodstocks is specific and often associated to particular bacterial communities, which can be more or less sensitive to a given antibiotic. The use of erythromycin during broodstock conditioning could have favored the development of some less sensitive bacteria, which could thereafter be found in the gametes. We suggest that the different bacterial loads registered in oocytes and D-larvae could correspond to bacteria less sensitive to this specific antibiotic.

CONCLUSION

In a way to limit bacterial transfer from adults to their gametes and D-larvae, we exposed in this study the advantages of removing sediment during scallops' broodstock conditioning. As broodstock were not physiologically affected by the privation of substrate, sediment could clearly be removed from traditional scallop conditioning method (like French hatcheries). Unfortunately, the test, which aimed to reduce antibiotic treatment of batch culture until metamorphosis by a short specific treatment of two days applied on D-larvae, did not improve the short-term survival of larvae. The application of this prophylactic method for reducing gametes contamination could be investigated with the subsequent use of flow-through larval rearing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the technician team of Ifremer's Argenton station – C. Mingant, I. Quéau, L. Lebrun, and P. Le Souchu – for algal production and technical support. We are also grateful to the “Ministère du Développement Economique, de l'Innovation et de l'Exportation “ (MDEIE), which contributed to the funding of a Ph.D. scholarship and to “Ressource Aquatiques Québec” (RAQ), and “Fonds de Recherches du Québec: Nature et Technologie“ (FRQNT), for travel grant to M. Holbach. This work was carried out during the UE funded ReproSeed project (FP7-KBBE 245119), which contributed to its functional outlays.

REFERENCES

- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1103-1113.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster. *Can. J. Zool.* 89, 579-598.
- Anderson, M., Gorley, R., Clarke, K., 2008. Plymouth: Primer-E; 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods, 214.

- Avendaño-Herrera, R., Dekovic, M., Riquelme, C., 2001. Establishment of beneficial bacteria in the digestive tract and gonads of adult *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in mass culture. *Rev. Biol. Mar. Oceaenogr.* 36, 31-41.
- Azandegbe, A., Garnier, M., Andrieux, F., Kerouel, R., Philippon, X., Nicolas, J.L., 2010. Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. *Dis. Aquat. Organ.*, 91(3), 213-221.
- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., Robert, R., 2010a. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture*. 305, 165-173.
- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., Robert, R., 2010b. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices: Part B: Effects of temporary food deprivation. *Aquaculture*. 308, 174-182.
- Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205, 83-92.
- Buestel, D., Cochard, J.-C., Dao, J.-C., Gerard, A., 1982. Production artificielle de naissain de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.). Premiers résultats en rade de Brest. *Vie Marine - Annales de la Fondation océanographique Ricard*. 4, 24-28.
- Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G., Banat, I.M., 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*. 219, 83-97.
- Cordero O. X., Wildschutte H., Kirkup B., Proehl S., Ngo L., Hussain F., Le Roux F, Mincer T., Polz M. F. (2012). Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance. *Science*, 337(6099), 1228-1231.
- Dao, J.C., Barret, J., Devauchelle, N., Fleury, P.G., Robert, R., 1995. Rearing of scallops (*Pecten maximus*) in France, from hatchery to intermediate culture, results of a 10 years programme (1983-1993). In: *Proceedings of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture*, 121-134 "Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species". Gajardo, G. et Coutteau, P. (eds), Impresora Creces, Santiago, Chile.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 209-219.
- Devauchelle, N., Mingant, C., 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.* 4, 41-51.
- Elston, R., Leibovitz, L., 1980. Pathogenesis of Experimental Vibriosis in Larval American Oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 964-978.
- Essid, N., Mahmoudi, E., Boufahja, F., Dellali, M., Beyrem, H., Aissa, P., 2007. Impact of mussel pseudo-feces on heterotrophic bacteria densities in the mussel farm sector of the Bizerte Lagoon (Tunisia). *Revue des Sciences de l'Eau*. 20, 383-392.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

- Furones, M.D., 2001. Sampling for antimicrobial sensitivity testing: a practical consideration. *Aquaculture*. 196, 303-309.
- Gagné, R., Tremblay, R., Pernet, F., Miner, P., Samain, J.-F., Olivier, F., 2010. Lipid requirements of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval and post-larval development in relation to addition of *Rhodomonas salina* in diet. *Aquaculture*. 309, 212-221.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*. 56, 105-121.
- Gendron, L., Tremblay, R., Belvin, S., Genard, B., Motnikar, S., Côté, J. 2013. Condition, survival and growth in situ of hatchery-reared stage IV lobster (*Homarus americanus*) fed *Artemia* and lipid-rich wild zooplankton. *Aquaculture* 416–417, 380–389.
- Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 169, 111-120.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., 2001. A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.* 7, 59-69.
- Gruffydd, L.D., Beaumont, A.R., 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgoland Mar. Res.* 20, 486-497.
- Gruffydd, L.D., Beaumont, A.R., 1972. A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. *Mar. Biol.* 15, 350-355.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. FAO, Rome.
- Holland, D.L., Spencer, B.E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53, 287-298.
- La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A., Maugeri, T.L., 2004. Benthic microbial indicators of fish farm impact in a coastal area of the Tyrrhenian Sea. *Aquaculture*. 230, 153-167.
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., Corre, S., 1998. *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 481-487.
- Le Pennec, M., Prieur, D., 1977. Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins. *Aquaculture*. 12, 15-30.
- Le Pennec, M., Guguen, F., Cochard, J.C., Paulet, Y.M., Dorange, G., 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, bivalve) et les performances des larves en élevage. *Haliotis*. 10, 101-113.
- Le Pennec, M., Dorange, G., Beninger, P., Donval, A., Widowati, I., 1992. Trophic relationships gonad-intestinal loop in *Pecten maximus*. *Soc. Franc. Malaco.* 13, 57-70.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391-1396.

- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P., Toranzo, A.E., 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. 65, 15-29.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of Bivalve Mollusks. in: Russell, F.S. (Ed.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, pp. 1-136.
- Luna-González, A., Maeda-Martinez, A., Sainz, J., Ascencio-Valle, F., 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Organ.* 49, 221-226.
- MacGladdery, S.E., Bower, S.M., Getchell, R.G., 2006. Chapter 11 : Diseases and parasites of scallops. in: Sandra E., S., Jay G., P. (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier, pp. 595-650.
- Magnesen, T., Bergh, O., Christophersen, G., 2006. Yields of great scallop, *Pecten maximus*, larvae in a commercial flow through rearing system in Norway. *Aquacult. Int.* 14, 377-394.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.
- Mason, J., 1958. The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L.), in Manx waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 37, 653-671.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W., 1972. Methods for studying bacteriocins. *Method. Microbiol.* 7A, 315-422.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Organ.* 27, 67-76.
- Parrish, C.C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by iatroscan flame ionization detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 722-731.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 73-86.
- Pernet F., Pelletier C.J., Milley J., 2006, Comparison of three solid- phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. *J. Chromatogr. A* 1137, 127-137.
- Prado, S., Dubert, J., da Costa, F., Martínez-Patiño, D., Barja, J.L., 2013. Vibrios in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney). *J. Fish Dis.* 37, 209-217.
- Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J., Plusquellec, A., Vigneulle, M., 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28, 277-352.
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L., 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ. Microbiol.* 7, 761-772.
- Richardson, N., Ruesink, J., Naeem, S., Hacker, S., Tallis, H., Dumbauld, B., Wisheart, L., 2008. Bacterial abundance and aerobic microbial activity across natural and oyster aquaculture habitats during summer conditions in a northeastern Pacific estuary. *Hydrobiologia*. 596, 269-278.

- Riquelme, C., Chavez, P., Morales, Y., Hayashida, G., 1994. Evidence of a parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamack, 1819). *Biol. Res.* 27, 129-134.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* 15, 369-374.
- Robert, R., Miner, P., Nicolas, J.L., 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Int.* 4, 305-313.
- Robert, R., Miner, P., Mazuret, M., Connan, J.-P., 1994. Ecloserie expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspective. *Equinoxe.* 49, 20-33.
- Sainz-Hernández, J.C., Maeda-Martínez, A.N., 2005. Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquac. Res.* 36, 1611-1618.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 1996. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult. Int.* 4, 191-200.
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Magnesen, T., Bergh, Ø., 2005. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquacult. Int.* 13, 575-592.
- Uriarte, I., Farías, A., Castilla, J.C., 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacult. Eng.* 25, 139-147.
- Utting, S.D., Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture.* 155, 45-54.
- Walne, P.R., 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest., Ser. II.* 25.

CHAPITRE 2

LE BULLAGE EST UNE SOURCE DE STRESS POUR LES LARVES DE *PECTEN MAXIMUS*

Ce deuxième article, intitulé « Aeration is a source of stress for great scallop (*Pecten maximus*) larvae », fut corédigé par moi-même ainsi que par Philippe Miner, Pierre Boudry, René Robert et Réjean Tremblay. La version présentée ici sera soumise au journal *Aquaculture* au début du mois novembre 2014. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. Philippe Miner, Pierre Boudry, René Robert et Réjean Tremblay ont fourni l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration de la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. Philippe Miner a grandement contribué à la réalisation des élevages et de l'échantillonnage, des analyses biochimiques et de croissances larvaires. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision de l'article. Les résultats présents dans cet article ont fait l'objet de présentations : à la réunion annuelle du regroupement Ressources Aquatiques Québec à Rimouski en novembre 2013, à la conférence annuelle de la National Shellfisheries Association à Jacksonville (État-unis) en avril 2014. René Robert a également exposé ces résultats lors du congrès de l'European Aquaculture Society à San Sebastian (Espagne) en octobre 2014.

Réunion annuelle Ressources Aquatiques Québec (RAQ 2013), Rimouski, Québec.
"Comment les paramètres d'élevage perturbent-ils le bon développement larvaire de *Pecten maximus*?" *Holbach M., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R., Robert R.

Réunion annuelle de la National Shellfisheries Association (NSA 2014), Jacksonville, USA. “*How rearing parameters disturb Pecten maximus larval development ?*” Holbach M., Robert R., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R.

Réunion annuelle de l’European Aquaculture Society (EAS 2014), San Sebastian, Espagne. “Optimization of *Pecten maximus* flow-through larval rearing method”. Holbach M., Robert R., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R.

2.1 RÉSUMÉ

La production aquacole de *Pecten maximus* repose sur l'obtention de juvéniles collectés en milieu naturel ou produits en éclosérie. Malgré des améliorations importantes, les taux de survie larvaire sont toujours très variables et rendent la production de juvéniles en éclosérie imprévisible. Cette étude examine l'influence de l'application d'un bullage dans les systèmes d'élevage sur le développement et la physiologie des larves. En effet, les turbulences créées dans les enceintes pourraient être une source de stress pour les larves de *P. maximus* réputées beaucoup plus sensibles que celles des ostréidés. Pour cela, quatre conditions de bullage croissantes ont été appliquées à des larves, et leur impact sur la survie, la croissance, les défenses antioxydantes (catalase and superoxide dismutase) et le métabolisme énergétique (citrate synthase) a été mesuré. Une autre condition a permis de distinguer le rôle de la flore microbienne dans l'apparition des mortalités en appliquant un traitement antibiotique sur des larves élevées en présence de bullage. Ainsi, nous avons constaté que lorsque le bullage excédait 100 ml min^{-1} , la survie et la croissance larvaire diminuaient drastiquement comparé à la condition témoin sans bullage (25-65 % vs 95 % ; $1 \mu\text{m d}^{-1}$ vs $3,5 \mu\text{m d}^{-1}$). De plus, en présence de bullage, l'activité de la citrate synthase augmentait alors que la consommation algale était réduite. Ces observations sont le reflet d'une augmentation du métabolisme énergétique des larves élevées en présence de bullage. Le bullage utilisé en routine dans les élevages larvaires en flux ouvert de l'huître *Crassostrea gigas* serait létal pour les larves de *P. maximus*. Ces résultats devraient être pris en considération lors des futures études sur l'optimisation des paramètres d'élevage en flux ouvert destinés aux larves de pectinidés.

2.2 AERATION IS A SOURCE OF STRESS FOR GREAT SCALLOP (*PECTEN MAXIMUS*) LARVAE

Auteurs

Marine Holbach^{a,b}, Philippe Miner^b, Pierre Boudry^b, René Robert^{b,c}, Réjean Tremblay^a

Institutions

^a: Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, G5L 3A1 Rimouski, Québec, Canada.

^b: Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR, UMR 6539 UBO/CNRS/IRD/Ifremer), Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France.

^c: Ifremer, Unité Littoral, Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France.

ABSTRACT

Aquaculture of the great scallop, *Pecten maximus*, relies on supply of juveniles collected in the wild or produced in hatcheries. Despite significant improvements, hatchery production remains unpredictable, notably due to poor larval survival rates. Turbulence, being a possible source of stress in larvae, the present study examined the influence of aeration on scallop larval development and physiological stress. The effects of four aeration conditions on larval survival, growth antioxidant defenses (catalase and superoxide dismutase) and energetic metabolism (citrate synthase) enzyme activities were examined during a first trial. The second experiment focused on the role of bacteriological load associated to turbulence stress on larval mortality. When aeration exceeded 100 ml mn^{-1} , scallop larval survival and growth were severely depressed compared with the control (25-65% vs 95%; $1 \text{ } \mu\text{m d}^{-1}$ vs $3.5 \text{ } \mu\text{m d}^{-1}$). When larvae were exposed to aeration, citrate synthase activity fluctuated and feeding activity decreased. Both phenomena led to an increase of energetic metabolism of larvae reared with aeration. Antibiotic treatment reduced considerably bacterial load and improved larval survival but had no effect on larval consumption and growth. Aeration is accordingly detrimental for *Pecten maximus* larvae and this should be considered for future development of scallop rearing methods.

Key word Scallop, aeration, physiological index, improvement of larval rearing methods.

INTRODUCTION

The great scallop (*Pecten maximus*) production mostly relies on fisheries of wild stocks, but hatcheries propagation increasingly contributes to population enhancement and sea-ranching (Dao et al., 1995). Despite global technical improvements, hatchery production of scallops remains unpredictable due to large variations in larval survival, often associated with bacterial contaminations (Andersen et al., 2011). Prophylactic use of antibiotics is common in larval rearing of pectinids but their use can have negative effects on the environment and human health (Karunasagar et al., 1994; Willingham et al., 1996; Cabello, 2006). Alternative ways to improve production are nevertheless in progress by: decreasing and/or targeting the use of antibiotics to suitable stages of development (Holbach et al., 2015), exploring probiotics (Riquelme et al., 1997; Kesarcodi-Watson et al., *in press*), fungicides (Torkildsen et al., 2002), and development of novel rearing systems (Andersen et al., 2000; Sarkis et al., 2006). In Norway, improvement of larval rearing has been attempted by developing a large-scale flow-through system (Andersen et al., 2011). In France, newly designed flow-through larval rearing system in 5-L containers reported higher survival (>70%) in oysters, *Ostrea edulis* (Gonzalez Araya et al., 2012) and *Crassostrea gigas* (Petton et al., 2009). This small-scale system allowed working at higher larval density and smaller rearing structure than the Norwegian large-scale system. Unfortunately, this technique was unsuccessful for *P. maximus* larval rearing, as first trials led to 70% mortalities in few days (Holbach, 2015). This small-scale system which differed by a high surface on volume ratio and a rapid water renewal ($5 \text{ L h}^{-1} = 100\% \text{ renewal h}^{-1}$) maintained the quality of larval environment; whereas, aeration allowed homogenization of food and larvae in the water column. We hypothesized that turbulence related to this high water movement could be detrimental to scallop larvae.

The main objective of the present study was to determine the influence of aeration on larval scallop performances and to assess their physiological stress through enzyme activity measures. We proposed to study the energetic status the physiological condition level of

bivalve larvae by measuring the activity of citrate synthase (CS), a key enzyme in the formation of ATP (Moran and Manahan, 2003) and antioxidant enzymes, such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) (Philipp et al., 2008; Genard et al., 2011).

MATERIALS AND METHODS

Animal maintenance

Two-day old D-larvae, originating from a commercial scallop hatchery (Tinduff, Finistère, France), were transferred to Ifremer experimental facilities (Argenton, Finistère, France). During the 8 following days, larvae were reared in 150-L cylinder-cone shape tanks with low aeration (250 ml min⁻¹). From day 8 to 10 post fertilization (dpf), a two-day preventive chloramphenicol treatment, at 8 ppm, was applied. On day 11, larvae were retained on a 100-μm mesh sieve and transferred to 5-L flat-bottom beakers. Until the end of pelagic larval phase (23 dpf), seawater was renewed every second day with 1 μm-filtered and UV-treated seawater at 19°C. Larvae were reared at a density of 10 ml⁻¹ and fed with two flagellates, *Pavlova lutheri* and *Tisochrysis lutea* plus one diatom, *Skeletonema marinoi* to ensure 60 cells μl⁻¹ available each day (20/20/20 equivalent cell volume) over the whole experiment.

Experimental design

On day 13, four aeration conditions were applied (n = 3): no aeration (control: **0**), low aeration (**100** ml min⁻¹), medium aeration (**155** ml min⁻¹) and high aeration (**270** ml min⁻¹). Larvae were reared without antibiotic over the whole experiment (25 dpf). The lowest aeration value used here corresponded to the same visual water disturbance in 150-L cylinder-cone shape tanks and the highest to the one of a 5-L flow-through for flat oyster larvae (Gonzalez et al., 2012). Two other conditions were realised (n=3) with antibiotic treatment for larvae reared in still water (**0 T**) and with a low aeration (**100 T**). In those cases chloramphenicol was added at 8 ppm (Robert et al., 1996) at water change during the whole experimentation (25 dpf).

Monitoring

Larval mortality, growth and metamorphosis competence were recorded every second day. Shell length was measured using image analysis (software Image SXM by the National Institutes of Health) and mortality accessed by counting, under the microscope, the number of translucent larval shells. The criterion of double ring appearance at the margin of the shell was used to estimate metamorphosis competence (number of larvae that began metamorphosis; Gérard et al., 1989).

Phytoplankton concentration was determined 48 and 96 hours following aeration exposure, in all tanks, by means of an electronic particle counter (Multisizer 3 – Beckman) equipped with a 100- μm aperture. Larval food uptake was expressed as clearance rate ($\% \text{ day}^{-1}$) corresponding to the percentage of the total algal ration consumed daily. Positive results will represent efficient microalgae consumption; whereas negative values will denote low food uptake, lower than microalgae growth.

Biochemical analyses

At 17 dpf, 50 000 larvae ($\approx 50 \text{ mg}$ wet weight minimum regardless to ontogenic stage) were collected on a 20- μm mesh and stored at -80°C , but only for the larvae reared without antibiotic. Samples were weighed and homogenised in a Tris HCl buffer (pH 7.4) as described in Guévelou et al. (2013). Total protein extraction was realized using an Ultra-Turax (Kinematica Kriens-Lu) in an ice-bath followed by a centrifugation at 15 000 g during 20 min at 4°C .

Total protein amount was obtained using a DC protein assay (BIO RAD) using bovine serum albumin as standard in a microplate reader (Bio-Tek Synergy) as well as KC4 version 3 software (Bio-Tek Instrument Inc.). The activity of the three enzymes were analysed with the same microplate reader and software than protein content analyses, by applying a suitable program.

Briefly, CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined using the decrease of absorbance at 240 nm, due to H_2O_2 consumption. Total SOD (EC 1.15.1.1) activity was assessed with a SOD determination kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer protocol using the absorbance at 450 nm after 30 min incubation at 37°C. CS (EC 4.1.3.7) activity was obtained using the method of Childress and Somero (1979) by measuring the absorbance at 412 nm during 10 min.

Statistical analyses

Permutational Analyses of Variances (PERMANOVA - PRIMER-E 6.0 PERMANOVA plus; PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK) were preferred to classical ANOVAs, as it can be used on non-normal data observed in our larval rearing databases. When t-Tests were necessary, they were achieved using the software R (2012) following Shapiro-Wilk normality test. If data were not normal, Wilcoxon-Mann-Whitney tests were preferred to t-Tests.

For larvae reared without antibiotic, larval mortality, growth, and algal consumption were analysed with a univariate one-way PERMANOVAs (9999 permutations), based on Euclidean resemblances. Source of variation in the PERMANOVAs was “aeration” with 4 fixed levels **0, 100, 150 and 270** ml mn^{-1} . Larval mortality was detailed on day 21 pf, at the onset of mortality event; whereas, growth and bacterial load were studied two days preceding mortalities, on day 19. Algal consumption was examined at 24h and 72h separately in an one-way PERMANOVA as homoscedasticity was not achieved for the factor “time” in the two-way crossed PERMANOVA ($p_{(\text{PERMDISP})} = 0.0322$). CAT, SOD and CS activities were compared using one-way PERMANOVAs, with “aeration” as a source of variation.

To assess the impact of antibiotic on larvae reared with aeration, larval mortality, growth, and algal consumption were analysed with a univariate two-way crossed PERMANOVAs (9999 permutations), based on Euclidean resemblances. Sources of variation in the PERMANOVAs were “aeration” with 2 fixed levels (**0 and 100**)

corresponding to **0** and **100** ml min⁻¹, respectively, and “antibiotic” with 2 fixed levels (**NT** and **T**) corresponding to untreated larvae and chloramphenicol treated larvae. Larval mortality was analyzed on day 23, at the onset of mortalities; whereas, growth and bacterial contamination were studied on day 21, two days prior to mortality event. Algal consumption was examined at 24h and 72h separately as homoscedasticity was not achieved for the factor “time” in a two-way crossed PERMANOVA ($p_{\text{PERMDISP}} = 0.0048$). Finally, t-Tests were realized to compare **100 NT** and **100 T** enzymes activities (CAT, SOD, CS) at 17 dpf, to estimate the influence of antibiotic on the energetic status of the larvae in a stressful environment.

RESULTS

Impact of aeration

On day 21, aeration significantly impacted larval survival ($p = 0.0007$, $\text{PF}_{(3-11)} = 37.7$). Larvae reared at the upper aeration exhibited high mortalities $74.1 \pm 2.9\%$ (Figure 17) significantly different from others (**270** vs **0**: $p_{\text{(MC)}} = 0.0001$, $t = 24.02$; **270** vs **100**: $p_{\text{(MC)}} = 0.012$, $t = 4.44$; **270** vs **155**: $p_{\text{(MC)}} = 0.0018$, $t = 7.53$). Compared with 270 ml min⁻¹, aeration treatments of 155 ml min⁻¹ and 100 ml min⁻¹, led to lower mortalities, with an overall mean of $37.5 \pm 1.8\%$ (Figure 17), with no significant differences on larval survival between both intermediate treatments ($p_{\text{(MC)}} = 0.7$, $t = 0.40$). Control larvae displayed low mortalities ($3.7 \pm 0.5\%$: Figure 17). All larvae exposed to the highest aeration (270 ml min⁻¹), died on day 23; whereas, those exposed to intermediate aerations (100 and 155 ml min⁻¹) collapsed on day 25. In contrast, larvae reared without any aeration exhibited low mortalities with only $3.4 \pm 0.2\%$ at the end of the experiment.

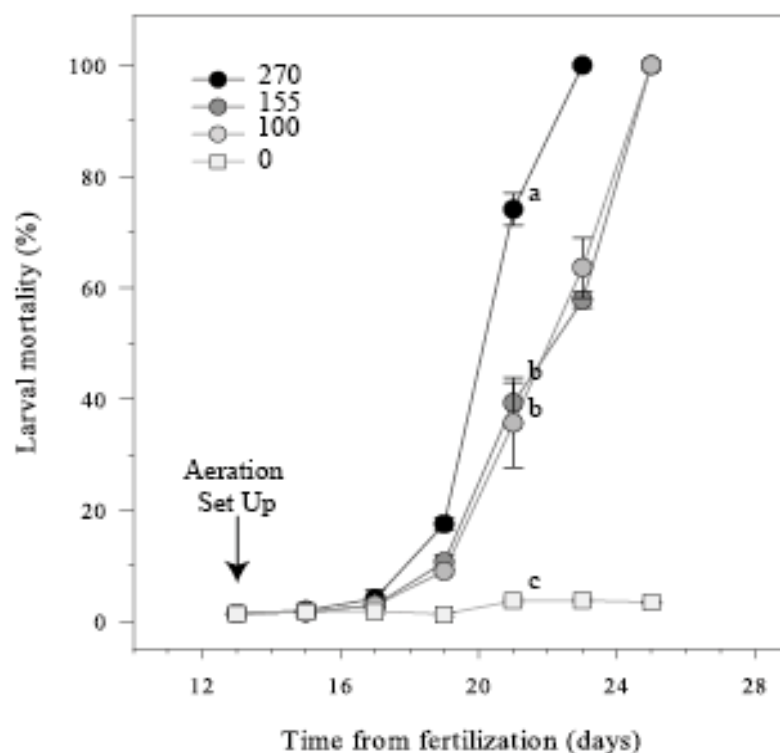


Figure 17 : Evolution of mortalities in *Pecten maximus* larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min⁻¹. Data are mean $\pm$ standard error and are expressed in percentage. Different letters indicate significant differences measured on day 21

Food consumption by the larvae, exposed to different levels of aeration, is presented in Figure 18. Regardless to aeration levels, aeration significantly depressed larval food consumption (24h: $p = 0.0001$, $PF_{(3-35)} = 51.1$; 72h: $p = 0.0001$, $PF_{(3-23)} = 98.3$); whereas, larvae reared in still water exhibited positive microalgae consumption.

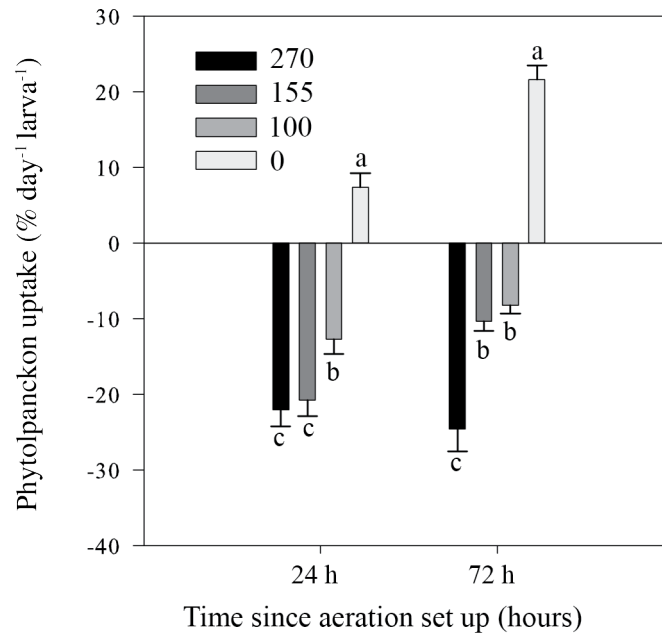


Figure 18 : Microalgal consumption of *Pecten maximus* larvae, exposed to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min⁻¹, one and three days after aeration set up on day 13 post- fertilization. Data are mean $\pm$ standard error and are expressed as percentages of food uptake per day. Different letters indicate significant differences

When exposed to aeration, larval growth was affected with no significant size differences as regard to aeration levels, (**100** vs **155**: $p = 0.12$, $t = 1.63$; **100** vs **270**: $p = 0.20$, $t = 1.36$; **155** vs **270**: $p = 0.91$, $t = 0.12$). On day 19, mean larval length ranged from $169.7 \mu\text{m} \pm 0.5$ to $173.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$, corresponding to a daily growth of $\approx 1 \mu\text{m d}^{-1}$ (Figure 19). In contrast, larvae reared in still water were statistically larger than those submitted to aeration (**0** vs **100**: $p = 0.0001$, $t = 8.35$; **0** vs **155**: $p = 0.0001$, $t = 11.69$; **0** vs **270**: $p = 0.0002$, $t = 9.68$). On day 19, they exhibited a mean length of $185.7 \mu\text{m} \pm 1.0$, corresponding to a daily growth of $\approx 3.3 \mu\text{m d}^{-1}$ (Figure 19).

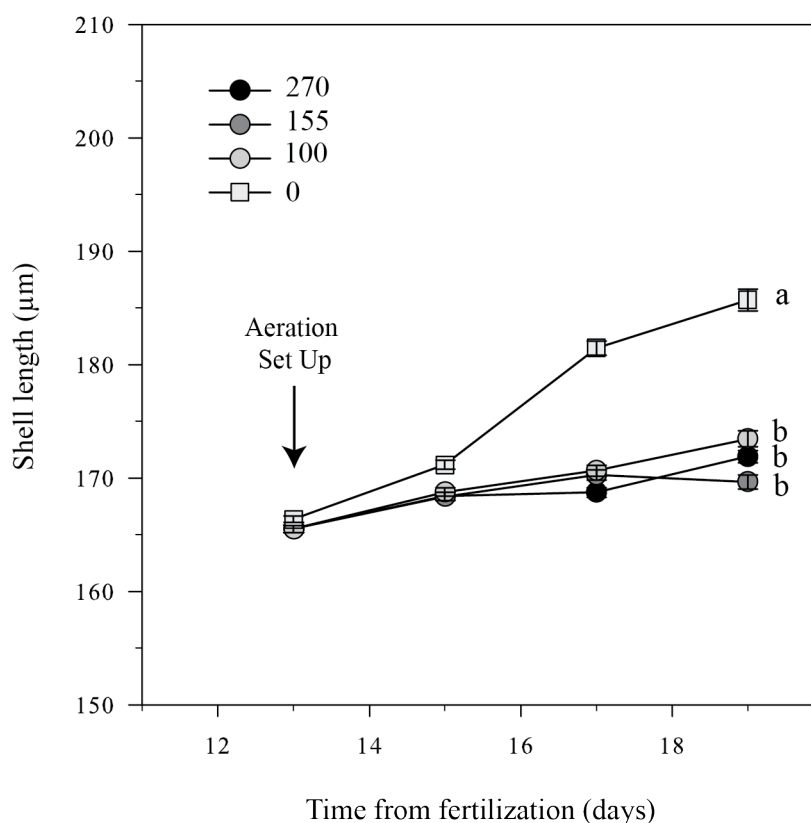


Figure 19 : Evolution of shell length in *Pecten maximus* larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to four different aeration levels, 0, 100, 155 and 270 ml min⁻¹. Data are mean $\pm$ standard error. Different letters indicate significant differences measured on day 19

Thus, when considering antioxidant defenses and specifically CAT activity, we found that larvae reared in still water or exposed to the lowest aeration intensity (100 ml mn⁻¹) presented similar results ($p_{(MC)} = 0.41$, $t = 0.9$) with an overall mean of 88.5 ± 2.25 U mg of protein⁻¹ (Table 2). For the two highest aeration exposure, larval CAT activities were similarly depressed ($p_{(MC)} = 0.52$, $t = 0.68$) with an overall mean of 63.5 ± 1.2 U mg of protein⁻¹ (Table 2).

Then, SOD activity of larvae exposed to aeration ≤ 155 ml mn⁻¹ were similar to the control (**0 vs 100**: $p_{(MC)} = 0.06$, $t = 2.7$; **0 vs 155**: $p_{(MC)} = 0.26$, $t = 1.3$; **0 vs 270**: $p_{(MC)} = 0.09$,

$t = 2.3$) with an overall mean of 3.8 ± 0.37 U mg of protein⁻¹ (Table 2). In contrast, larvae submitted to the highest aeration value (270 ml mn⁻¹) showed significant lower SOD activities than the 2 other aeration intensities (**270 vs 100**: $p = 0.0063$, $t = 5.6$ and **270 vs 155**: $p = 0.0098$, $t = 4.3$ - Table 2).

Finally, on day 17, CS activities were different for all the larvae reared with aeration (**100 vs 155**: $p_{(MC)} = 0.0006$, $t = 9.4$; **100 vs 270**: $p_{(MC)} = 0.004$, $t = 6.05$; **155 vs 270**: $p_{(MC)} = 0.02$, $t = 4.1$ – Table 2). The highest value was recorded in larvae exposed to 155 ml mn⁻¹ aeration.

Table 2 : Activities of CAT (catalase), SOD (superoxide dismutase) and CS (citrate synthase), in *Pecten maximus* larvae exposed to four aeration levels (0, 100, 155 and 270 ml min⁻¹) and with (T) or without antibiotic treatment (NT). Data are expressed as units per mg of proteins. Data are mean $\pm$ standard error. Different letters indicate significant differences for each enzyme studied.

		CAT U mg	SOD U mg protein ⁻¹	CS mU mg protein ⁻¹
17 dpf	0	84.3 $\pm$ 4.2 a	3.8 $\pm$ 0.4 a	6.9 $\pm$ 0.6 bc
	100	88.8 $\pm$ 2.5 a	4.2 $\pm$ 0.2 a	5.5 $\pm$ 0.3 c
	155	64.8 $\pm$ 3.3 b	4.5 $\pm$ 0.4 a	10.8 $\pm$ 0.5 a
	270	62.3 $\pm$ 1.4 b	2.8 $\pm$ 0.2 b	8.3 $\pm$ 0.4 b
17 dpf	100 NT	88.8 $\pm$ 2.5 a	4.2 $\pm$ 0.2 b	5.5 $\pm$ 0.3 b
	100 T	99.6 $\pm$ 3.6 a	5.5 $\pm$ 0.4 b	7.8 $\pm$ 0.4 a

Impact of the antibiotic treatment

On day 23, a significant interaction of “antibiotic” and “aeration” factors on larval mortalities was observed ($p = 0.004$, $PF_{(1-11)} = 87.3$). Indeed, larvae reared with low aeration (100 ml mn⁻¹) in untreated seawater (no antibiotic adjunction): **100 NT** showed high mortalities, significantly different from the other conditions (**100 NT vs 100 T**: $p_{(MC)} = 0.0007$, $t = 9.6$; **100 NT vs 0 NT**: $p_{(MC)} = 0.0003$, $t = 11.0$). In contrast, those exposed to low aeration (100 ml mn⁻¹) in seawater treated with antibiotic exhibited low mortalities (Figure 20). This

situation differed when considering larvae reared in still water, for which the lack of aeration presumably maintained larval mortalities low ($< 5\%$; $p_{(MC)} = 0.05$, $t = 2.7$). All untreated larvae, exposed to low aeration, died on day 25; whereas, those exposed to aeration plus antibiotic reached $15.3 \pm 1.1\%$ mortalities. In contrast, at the end of experiment, on day 25, larvae reared in still water, showed low mortalities $\approx 5.3\%$, regardless to antibiotic treatment (Figure 20).

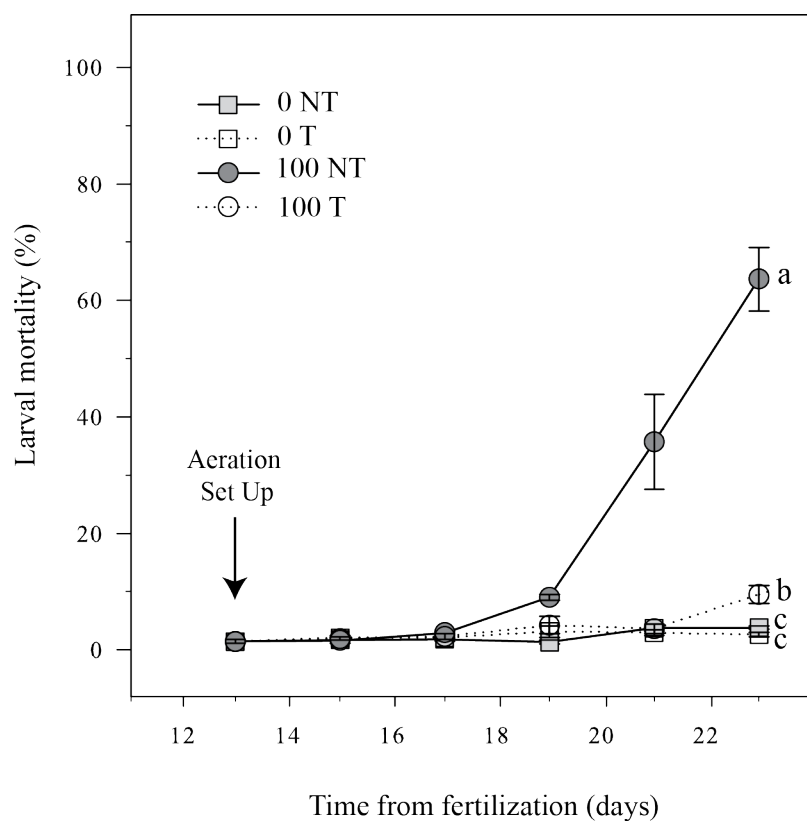


Figure 20 : Evolution of mortalities in *Pecten maximus* larvae, exposed, from day 13 post-fertilization, to two different aeration levels, 0, 100 ml min^{-1} and reared with antibiotic treatment (T) or without antibiotic treatment (NT). Data are mean $\pm$ standard error and are expressed in percentage. Different letters indicate significant differences measured on day 23

Food consumption followed the same trend than previously described in Figure 18 with a drastic reduction of microalgae consumption when larvae were exposed to aeration (Figure 21). Moreover, antibiotic treatment did not influence consumption 24h post aeration ($p = 0.48$, $t = 0.72$) or 72h latter ($p = 0.59$, $W = 22$). When larvae were reared in

still water, a similar trend was observed 24h post aeration ($p = 0.76$, $t = 0.31$); whereas, antibiotic addition significantly reduced grazing 72h post aeration ($p = 0.03$, $t = 2.8$; Figure 21).

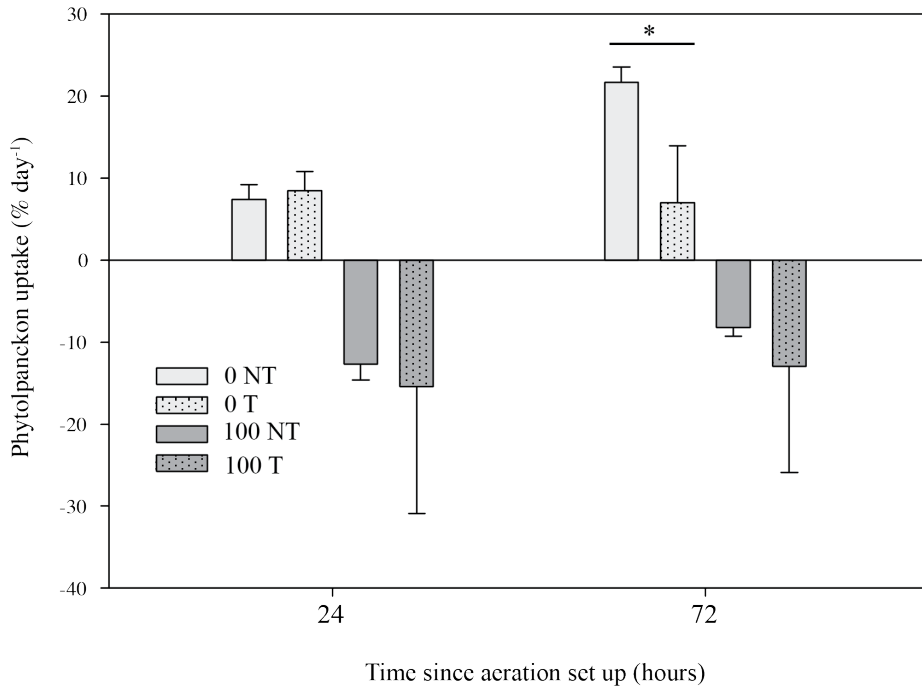


Figure 21 : microalgae consumption of *Pecten maximus* larvae, exposed to two different aeration levels, 0, 100 ml min⁻¹ and reared with antibiotic treatment (T) or without antibiotic treatment (NT), one and three days after aeration set up on day 13 post-fertilization. Data are mean $\pm$ standard error and are expressed as percentages of food uptake per day. An asterisk indicates significant differences

On day 21, a significant influence of “antibiotic” and “aeration” on larval size was found ($p = 0.016$, $PF_{(1-11)} = 9.3$). Indeed, when larvae were reared in still water they reached similar shell size ($p_{(MC)} = 0.25$, $t = 1.4$) with an overall mean of $193 \pm 1.3 \mu\text{m}$ (Figure 22). In contrast, the growth of larvae exposed to low aeration differed as regard to antibiotic addition. Thus, untreated larvae exhibited the lowest larval growth from day 15 (2 days post aeration) leading to a final mean length of $174.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$ on day 21 (Figure 22).

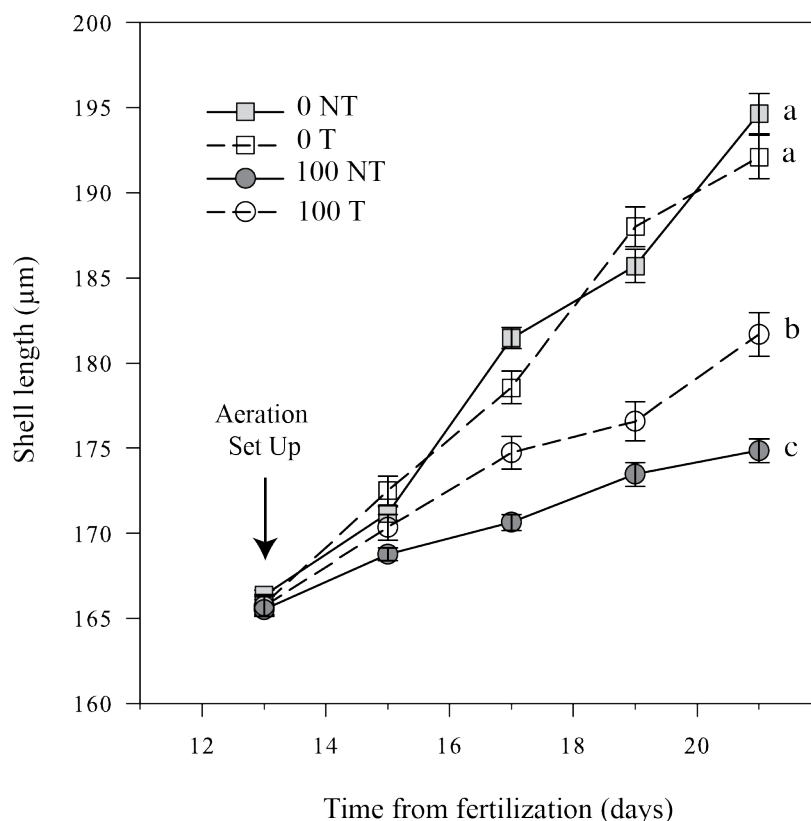


Figure 22 : Evolution of shell length in *Pecten maximus* larvae, exposed to two different aeration levels: 0, 100 ml min⁻¹ and reared with antibiotic treatment (T) or without antibiotic treatment (NT), one and three days after aeration set up on day 13 post-fertilization. Data are mean $\pm$ standard error. Different letters indicate significant differences measured on day 21

To precise the relative efficiency of antibiotic treatment on scallop larvae reared in stressful condition (aeration) statistical analyses were accordingly performed exclusively larvae reared with aeration plus antibiotic treatment (**100 T**) and larvae reared with aeration without antibiotic treatment (**100 NT** – Table 2). On day 17, no significant differences on CAT ($p = 0.07$, $t = 2.5$) and SOD ($p = 0.06$, $t = 2.5$) activities between treated and untreated larvae were detected, with overall means of 94.2 ± 1.7 U mg of protein⁻¹ and 4.8 ± 0.2 U mg of protein⁻¹ respectively. In contrast a significant increase of 29.5% for the CS activity in treated larvae could be noted ($p = 0.01$, $t = 4.3$).

DISCUSSION

In our study, larvae reared with aeration were smaller or even died on day 25; whereas, larvae reared in still water showed high survival (up to $96.2 \pm 0.4\%$) and grew up to a mean size of $196.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$ on day 25. No sign of defense mechanisms establishment was observed, but the energetic metabolism estimated by citrate synthase activity increased in presence of bubbling. At low aeration and antibiotic adjunction, the decrease of bacterial load reduced larval mortality but did not prevent low algal consumption and growth decreases.

In contrast to the control reared in still water, algal consumption by larvae was lower than algal proliferation 24 h after the beginning of the experiment regardless to aeration levels. The presence of aeration seemed to quickly impede larvae to feed normally. The absence of algal consumption had a rapid and direct impact on larval growth. The larvae reared with bubbling were 8% smaller and that could be easily related to the very low-feeding behavior of the larvae, compared to the control without aeration. Gregg and Bergersen (1980) reported that turbulence increased the mortality of the shrimp *Mysis relicta*. They suggested that the abrasions and exhaustion from continuous swimming and their inability to feed could be the principal cause of the mortality observed. We cannot assess such physical impact, like abrasion effect, of the aeration on scallop larvae, because observation of the shell with scanning electron microscopy should be necessary. This is however unlikely as larval density was relatively low in our study and similar to those observed for other bivalve species. Nevertheless, the aeration levels applied to zebra mussel larvae were much higher than in the present study and are likely to be related to species-specific sensitivity. In contrast with our results, some studies demonstrated the positive effect of turbulence in different larval development stage of mollusks. For example, Helm and Spencer (1972) reported that aeration improved growth and development of eyespot in *Ostrea edulis* larvae. The settlement success of *Potamocorbula amurensis* larvae (Crimaldi et al., 2002), *Mytilus edulis* larvae (Pernet et al., 2003) and *Ilyanassa obsoleta* larvae (Fuchs et al., 2004) was also positively correlated with aeration. This pattern is proposed as an

adaptation to disperse and settle more successfully in energetic coastal regions (Fuchs et al., 2011), which are very different from *P. maximus* natural habitat. They are found in extreme low tide down to 250 m and are known to be more abundant far away of high water streams (Brand, 2006). This could be a partial explanation of the well-known sensitivity of pectinid larvae (Helm et al., 2006).

The rise of the CS activity of larvae reared with aeration could be related to an increase of the energetic metabolism due to stress encountered in a turbulent environment. Positive correlation between respiration and CS activity has been clearly demonstrated in bivalves (Moran and Manahan, 2004; Meyer et al., 2007). This correlation and the high energetic metabolism registered in the present study could suggest that larvae never stop to swim until lethal exhaustion. The higher ATP production could be associated to the high energetic demand needed to support continuous swimming (Gregg and Bergersen, 1980). This behavior is different from that observed by Genard et al. (2011, 2013) showing a decrease of CS activity in oyster larvae which close their shell and sink in pathogenic stressful condition. Maybe the larvae were sampled too early to identify such a phenomenon. In deed, we sampled 4 days after bubbling application and the mortality process was not induced, in contrary to the larvae studied in Genard et al (2011, 2013).

Even when bacterial pressure was removed with antibiotic adjunction, larvae remained physiologically impacted by aeration as they still grew slower and exhibited higher mortalities than the control. Thus the major source of stress in this experiment was the presence of bubbling, as low aeration condition was sufficient to decrease sharply the ability of larvae to feed.

CONCLUSION

The objective of this study was to document the impact of aeration on *Pecten maximus* larval development, in order to improve great scallop larval rearing. The use of three physiological indices (i.e. enzyme activities) suggested that larvae fought against a physical

stress induced by aeration, which impacted their development. In addition to low feeding rate and slow growth, an increase of metabolism was suspected by the rise of the CS activity, which could finally induce the death. Oxidative defenses were not detected suggesting no direct implication of bacterial flora in larval death. The adjunction of antibiotic did not improve on a long-term scallop larval feeding and growth. Thus aeration should be avoided in future work on the optimization of pectinids larval production in controlled conditions. Further studies should focus on the development of a rearing system with hydrodynamics similar to the one observed in their natural environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Tinduff hatchery for providing scallop larvae as well as Claudie Quéré and Catherine Séguineau from Ifremer, for their assistance for enzymatic analyses. We are also grateful to the “Ministère du Développement Economique, de l’Innovation et de l’Exportation du Québec” (MDEIE), which contributed to the funding of a PhD scholarship, to “Ressource Aquatiques Québec” (RAQ), and to “Fonds de Recherches du Québec – Nature et technologies” (FRQNT), which provided travel grant to Marine Holbach. This work was carried out during the EU funded project ReproSeed (FP7-KBBE-2009-3), which partly supported functional outlays.

REFERENCES

- Andersen, S., Burnell, G., Bergh, O., 2000. Flow-through systems for culturing great scallop larvae. *Aquacult. Int.* 8, 249-257.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2006. Flow-through larval systems with different algal concentrations. *J. Shellfish Res.* 25, 264-264.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster11. *Can. J. Zool.* 89, 579-598.
- Brand, A.R., 2006. Chapter 12 Scallop ecology: Distributions and behaviour. in: Sandra E., S., Jay G., P. (Eds.), *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, pp. 651-744.

- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137-1144.
- Childress, J.J., Somero, G.N., 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52, 273-283.
- Crimaldi, J.P., Thompson J.K., Rosman, J.H., Lowe, R.J., Koseff, J.R., 2002, Hydrodynamics of larval settlement: the influence of turbulent stress events at potential recruitment sites. *Limnol. Oceanogr.* 47(4), 1137-1151.
- Dao, J.C., Barret, J., Devauchelle, N., Fleury, P.G., Robert, R., 1995. Rearing of scallops (*Pecten maximus*) in France, from hatchery to intermediate culture, results of a 10 years programme (1983-1993). In Proceedings of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture, 121-134 "Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species". G. Gajardo et P. Coutteau (eds), Impresora Creces, Santiago, Chile.
- Fuchs, H.L., DiBacco, C., 2011, Mussel larval responses to turbulence are unaltered by larval age or light conditions. *Limnology & Oceanography: Fluids & Environments* 1, 120-134.
- Fuchs, H.L., Mullineaux, L.S., Solow, A.R., 2004, Sinking Behavior of Gastropod Larvae (*Ilyanassa obsoleta*) in Turbulence. *Limnology and Oceanography* 49(6), 1937-1948.
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., Tremblay, R., 2011. Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquat. Living Resour.* 24, 247-260.
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., Tremblay, R., 2013. Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. *PLoS ONE*. 8, e64534.
- Gérard, A., Salaun, M., Tritar, S., 1989. Critères de compétence des larves à la métamorphose chez *Pecten maximus*. *Haliotis*. 19, 373-380.
- Gregg, R.E., Bergersen, E.P., 1980. *Mysis relicta*: Effects of Turbidity and Turbulence on Short-Term Survival. *T. Am. Fish. Soc.* 109, 207-212.
- Gonzalez Araya, R., Mingant, C., Petton, B., Robert, R., 2012. Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture*. 364, 272-280.
- Guévelou, E., Huvet, A., Galindo-Sánchez, C.E., Milan, M., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Quéré, C., Boudry, P., Corporeau, C., 2013. Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Biol. Reprod.* 89, Article 100, 101-115.

- Helm, M.M., Spencer, B.E., 1972. The importance of the rate of aeration in hatchery cultures of the larvae of *Ostrea edulis* L. J. Conseil. 34, 244-255.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2006. Ecloserie de bivalves: manuel pratique. Vol.471. Food & Agriculture Org.
- Holbach, M., 2015. La sensibilité des larves de pectinidés aux conditions d'élevage : le flux ouvert comme alternative aux mortalités massives. Université du Québec à Rimouski, pp 152.
- Holbach, M., Robert, R., Boudry, P., Petton, B., Archambault, P., Tremblay, R., 2015. Scallop larval survival from erythromycin treated broodstock after conditioning without sediment. Aquaculture 437, 312-317.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I., 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 128, 203-209.
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., Asmani, K., Robert, R., *in press*. Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. Aquac. Res., 1-10.
- Meyer, E., Green, A.J., Moore, M., Manahan, D.T., 2007. Food availability and physiological state of sea urchin larvae (*Strongylocentrotus purpuratus*). Mar. Biol. 152, 179-191.
- Moran, A.L., Manahan, D.T., 2003. Energy Metabolism During Larval Development of Green and White Abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. Biol. Bull. 204, 270-277.
- Moran, A.L., Manahan, D.T., 2004. Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 306, 17-36.
- Pernet F., R., Tremblay, E., Bourget, E., 2003. Settlement success, spatial pattern and behavior of mussel larvae *Mytilus* spp. in experimental 'downwelling' systems of varying velocity and turbulence. Mar. Ecol-Prog Ser. 260, 125-140.
- Petton, B., Le Souchu, P., Mingant, C., Robert, R., 2009. Determining hydrobiological larval rearing parameters for *Crassostrea gigas* in small volume flow-through containers. LARVI '09 – Fish & shellfish larviculture symposium, 07-10 September 2009, Ghent, Belgium, Book of Abstract, Special Publication EAS, No 38, 333-334.
- Philipp, E.E.R., Schmidt, M., Gsottbauer, C., Sanger, A.M., Abele, D., 2008. Size-and age-dependent changes in adductor muscle swimming physiology of the scallop *Aequipecten opercularis*. J. Exp. Biol. 211, 2492-2501.
- R Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. 154, 17-26.
- Robert, R., Miner, P., Nicolas, J.L., 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Int.* 4, 305-313.
- Sarkis, S., Helm, M., Hohn, C., 2006. Larval rearing of calico scallops, *Argopecten gibbus*, in a flow-through system. *Aquacult. Int.* 14, 527-538.
- Torkildsen, L., Coyne, R., Samuelsen, O.B., Magnesen, T., Bergh, Ø., 2002. Treatment of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents; searching for an alternative to chloramphenicol. *Aquacult. Int.* 10, 399-409.
- Willingham, E.M., Sander, J.E., Thayer, S.G., Wilson, J.L., 1996. Investigation of bacterial resistance to hatchery disinfectants. *Avian Dis.* 40, 510-515.

CHAPITRE 3

LES CONSÉQUENCES DU RENOUVELLEMENT D'EAU ET DE LA FORME DE L'ENCEINTE D'ÉLEVAGE SUR LES LARVES DE *PECTEN MAXIMUS* : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Ce troisième article, intitulé « *Incidence of tank shape and water renewal on Pecten maximus larvae: Preliminary results* », fut corédigé par moi-même ainsi que par René Robert, Pierre Boudry, Christian Mingant et Réjean Tremblay. La version présentée ici sera soumise au journal *Aquatic Living Resources* au courant du mois de novembre 2014. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. René Robert, Pierre Boudry et Réjean Tremblay ont fourni l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration de la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. Christian Mingant a grandement contribué à la réalisation des élevages et de l'échantillonnage. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision de l'article. Les résultats de cet article ont été présentés à la réunion annuelle du regroupement Ressources Aquatiques Québec à Rimouski en novembre 2013, à la conférence annuelle de la National Shellfisheries Association à Jacksonville (État-unis) en avril 2014. René Robert a également présenté ces résultats lors du congrès de l'European Aquaculture Society à San Sebastian (Espagne) en octobre 2014.

Réunion annuelle Ressources Aquatiques Québec (RAQ 2013), Rimouski, Québec. “Comment les paramètres d'élevage perturbent-ils le bon développement larvaire de *Pecten maximus*?” *Holbach M., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R., Robert R.

Réunion annuelle de la National Shellfisheries Association (NSA 2014), Jacksonville, USA. “*How rearing parameters disturb Pecten maximus larval development ?*” Holbach M., Robert R., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R.

Réunion annuelle de l'European Aquaculture Society (EAS 2014), San Sebastian, Espagne. “Optimization of *Pecten maximus* flow-through larval rearing method”. Holbach M., Robert R., Miner P., Mingant C., Boudry P., Tremblay R.

3.1 RÉSUMÉ

L'élevage de larves de bivalves en eau stagnante est une méthode largement utilisée de nos jours, mais elle est souvent associée à des contaminations bactériennes et des taux de mortalité élevés. Dans ce contexte, différents systèmes d'élevage en flux ouvert ont vu le jour pour différentes espèces de bivalves. La coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*, est considérée comme une espèce sensible aux conditions d'élevage et les premiers essais de production réalisés dans un système en flux ouvert à petite échelle ont rapidement échoués. Dans cette étude, des larves véligères ont été élevées dans un nouveau système en flux ouvert afin de mieux comprendre l'influence de différents paramètres (formes de l'enceinte, taux de renouvellement de l'eau et bullage) sur les performances larvaires, sur les défenses antioxydantes (catalase and superoxide dismutase) et sur le métabolisme énergétique (citrate synthase). Dans un premier temps, nous avons testé deux formes d'enceinte à fond plat : circulaire et rectangulaire. Les larves élevées dans des bacs rectangulaires de 50 L à fond plat ont présenté des taux de survie (75 %) et de compétence à la métamorphose (30 %) supérieurs à ceux des larves élevées dans des enceintes circulaires. Dans un second temps, deux taux de renouvellement d'eau différents ont été étudiés (25 and 50 % h⁻¹) et aucune différence n'a pu être détectée dans les performances larvaires et les indices de stress chez des larves. Enfin, l'ajout de bullage dans ce système rectangulaire a mené rapidement à la perte totale des élevages. L'ajout de ce paramètre n'a pas déclenché la mise en place de défenses antioxydantes mais a nettement augmenté le métabolisme énergétique des larves. Ainsi, ces résultats proposent un système d'élevage en flux ouvert de faible volume réalisé dans des enceintes à fond plat et sans aération, adapté aux larves de *P. maximus*. Des études supplémentaires permettraient de calibrer encore plus précisément les différents paramètres d'élevage, comme la densité et la quantité de nourriture, afin d'augmenter les rendements de production.

3.2 INCIDENCE OF TANK SHAPE AND WATER RENEWAL ON *PECTEN MAXIMUS* LARVAE: PRELIMINARY RESULTS

Auteurs

Marine Holbach^{a,b}, René Robert^{b,c}, Pierre Boudry^b, Christian Mingant^b, Réjean Tremblay^a

Institutions

^a: Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, G5L 3A1 Rimouski, Québec, Canada

^b: Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR, UMR 6539 UBO/CNRS/IRD/Ifremer), Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France

^c: Ifremer, Unité Littoral, Centre Bretagne - ZI de la Pointe du Diable - CS 10070 - 29280 Plouzané, France

ABSTRACT

Static rearing systems for bivalve larvae are widely used but often associated with high mortalities and bacterial contamination. To decrease them and to improve water quality, different flow-through larval rearing systems have been developed. The great scallop, *Pecten maximus*, is generally considered as a sensitive species, and larval development in small-scale flow-through systems has thus far failed. In this study, veliger larvae were reared in small-volume flow-through systems to better understand the influence of several parameters: tank shape, seawater renewal and aeration. Larvae reared in 50 L flat-bottomed rectangular tank exhibited better overall performances than those reared in circular tanks, with survival >75% and competent larvae $\approx$ 30%. In order to adapt flow-through rearing parameters two intensities of water renewal and the necessity of aeration were tested. No differences in larval development were noticed between the two intensities of water inflow (25 and 50% h⁻¹). Aeration associated to flow-through induced massive mortality. This parameter did not increase the activity of enzymes related to antioxidant defences, but an increase in energy demand, as measured by the citrate synthase activity, was noted. The feasibility of rearing *Pecten maximum* larvae in 50 L flat-bottomed rectangular flow-through with no aeration was shown and will allow further studies for scallop larval rearing optimization.

Key words Scallop larvae, water inflow, flow-through, larval rearing improvement

INTRODUCTION

The great scallop *Pecten maximus* has a high commercial value in Europe, and there is accordingly an increasing interest in scallop farming and hatchery development. Hatchery production of scallops is well established in several countries (Bergh and Strand 2001; Bourne 2000; Brokordt et al. 2011; Robert and Gerard 1999; Widman et al. 2001), but production still remains unpredictable due to large variations in larval survival that are often associated with bacterial infections (see Andersen et al. 2011, for review). The use of antibiotics during larval rearing prevents bacterial contamination and increases larval rearing success (Le Pennec and Prieur 1977; Nicolas et al. 1996; Robert et al. 1996; Torkildsen et al. 2005; Uriarte et al. 2001). To avoid the use of antibiotics, large-scale flow-through larval rearing systems (500 to 4 700 L) have been developed to provide better water quality and a constant food supply (Andersen et al. 2000; Magnesen et al. 2006). Results are promising, but the system needs to be optimized because the larval yield (6.9%) and densities used (3 larvae ml⁻¹) are still relatively low (Andersen et al. 2012).

A small-scale, high-density flow-through larval rearing system (5 L cylindrical tanks, 104 cm height × 9 cm diameter, aeration to homogenize food and larvae) was successfully developed for *Crassostrea gigas* (≈ 70% survival at 300 larvae ml⁻¹; Petton et al. 2009). However, to obtain similar larval rearing success, larval density had to be drastically decreased (to 5 larvae ml⁻¹) for *Ostrea edulis* (Gonzalez Araya et al. 2012). Our own trials in such system and in similar conditions with *P. maximus* were unsuccessful. Thus, 6 days post fertilization, larval survival were only 17.5 ± 4.2% in flow-through vs 47.0 ± 2.8% in static condition (Holbach, unpublished data).

The volume of the rearing system has been reported to be important for larval performance, especially for *P. maximus*. Thus Andersen et al. (2000) recorded better survival in larvae reared in 4700 L tanks compared to 500 L. Furthermore, aeration has been shown to depress larval growth and induced mortality (Holbach et al. soumis).

In the present study, we tested the hypothesis that small tank configuration and seawater renewal can significantly improve larval rearing performances. The aims of these experiments were firstly to determine the optimal rearing tank shapes for *P. maximus* larval development and then to test the influence of the flow-through parameters in the best rearing tank. Mortality, growth, and competence to metamorphosis were achieved to appreciate larval performance; whereas, their energetic status was estimated by measuring the activity of citrate synthase (CS), a key enzyme in the formation of adenosine triphosphate (ATP) (Moran and Manahan, 2003). The catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, two antioxidant enzymes, were also recorded as indicators of the larvae's oxidative stress during stressful events (Genard et al. 2011; Philipp et al. 2008). Activities of these enzymes have been demonstrated to be a powerful indicator of the physiological larval quality (Genard et al. 2011, Genard et al. 2014, Holbach et al. soumis).

MATERIALS AND METHODS

Experimentation on tank shapes

Two-day-old D-larvae from the Tinduff commercial scallop hatchery located near Brest, France, were transferred to Ifremer's experimental facility (Northern Brittany, France). A preventive treatment with chloramphenicol was applied for two days, during which larvae were maintained in a 150 L cylindrical-conical tank at 18°C and at a density of 14 larvae ml⁻¹ in gently aerated seawater; the antibiotic was added at 8 ppm (Robert et al. 1996). Two days later (4 dpf), larvae were transferred to two different triplicate treatments in flow-through, consisting of 50 L flat-bottomed rectangular tanks or flat-bottomed circular tanks. At this step, all larvae were reared in filtered (1 µm) UV-treated seawater at 18°C without antibiotics. Until the end of the pelagic larval phase (22 dpf), seawater was changed and containers cleaned in the static control (beakers) every second day, whereas flow-through tanks were cleaned weekly. Water inflow in flow-through corresponded to 0.25 of the tank volume per hour. Rearing density was 10 larvae ml⁻¹, which were fed two flagellates, *Pavlova lutheri* (P) and *Tisochrysis lutea* (T), and one diatom, *Skeletonema*

marinoi (S), at a density of 60 cells μl^{-1} (20/20/20, equivalent cell volume) until the larvae were considered ready to metamorphose (presence of double ring at the margin of the shell; Gérard et al. 1989). Yield of competent larvae was considered as the number of competent larvae divided by the initial number of D-larvae. Larval mortality and shell length were measured (Imaq Vision Builder software version 6.0) for each replicate and treatment at the end of the experiment (22 dpf). Student's t-tests (R, 2012) were used to compare larval performance between tank shapes only in flow-through since control (beakers) experienced massive mortalities before the end of the experiment due to a technical failure. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test.

Experimentation on water flow

For this experiment larvae were originated from the same source and underwent a similar two-day antibiotic treatment as previously described for the first experiment. Until 10 dpf, larvae were maintained in 150 L cylindrical-conical tanks at a density of 14 larvae ml^{-1} , fed PTS at 60 cells μl^{-1} . Seawater was renewed every second day with filtered (1 μm) UV-treated water at 18°C. At 10 dpf, larger larvae were collected on a 100 μm mesh and distributed at 10 larvae ml^{-1} in four triplicate treatments in 50 L flow-through rectangular tanks. Treatment **0** corresponded to an absence of water inflow (water was completely renewed every two days), $\frac{1}{4}$ corresponded to water flow of 25% of the tank volume per hour; $\frac{1}{2}$ to 50% of the tank volume per hour, and $\frac{1}{4}$ + **air** to a water flow of 25% of the tank volume per hour with aeration (300 ml min^{-1}). On days 17 and 22, mortality, shell length, and number of competent larvae were determined as described in the first experiment. Furthermore, the percentage of *Vibrio* in total larval flora was recorded, using plate counting method on previously crushed larvae, with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose medium for *Vibrio* culture and marine agar for total flora (Azandegbe et al. 2010).

On day 17, larvae were sampled to determine their total protein content and enzymatic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and citrate synthase (CS) as already detailed (Holbach et al., soumis). Briefly, 50 000 larvae were collected on a 20 μm mesh, weighed, and homogenized in Tris HCl buffer (pH 7.4) as described in Guévelou et

al. (2013). Total protein amounts were assessed using a DC protein assay (BIO RAD) in a microplate reader (Biot-Tek Synergy). This microplate reader was also used to analyze the activities of the three enzymes using the suitable programs. CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured using the decrease in absorbance at 240 nm following H₂O₂ consumption. Total SOD (EC 1.15.1.1) activity was measured at 450 nm after a 30 min incubation at 37°C with an SOD determination kit (Sigma-Aldrich). CS (EC 4.1.3.7) activity was determined using the method of Childress and Somero (1979) by measuring the absorbance at 412 nm for 10 min.

Because non-normal data characterized larval rearing datasets, permutational analyses of variance (PERMANOVA - PRIMER-E 6.0 PERMANOVA plus; PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK) were used instead of classical ANOVAs. This approach is more accurate than non-parametric analysis because it uses similarities - like ANOVAs - but with the permutations method (Anderson 2001). Homoscedasticity was verified using the PERMDISP test. A Monte-Carlo test was used to obtain probabilities when the number of permutations was less than 100 ($p_{(MC)}$; Anderson et al. 2008). When t-tests were necessary, they were applied using the R software (2012) following the Shapiro-Wilk normality test. On day 17, univariate one-way PERMANOVAs (9999 permutations) were used to evaluate the impact of flow rate on larval survival, growth, and bacterial contamination. The source of variation was flow-rate with three fixed levels (**0**, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$). The same PERMANOVAs were used for the three enzymes. As all larvae died before 22 dpf in the no water inflow treatment (**0**), t-tests were realized on larval mortality, growth, competence, and bacterial contamination between the $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{2}$ treatments. These tests were done on larval mortality, growth, *Vibrio* contamination, and enzymatic activities between the $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{4}$ + **air** treatment to measure the effect of aeration.

RESULTS

Larvae reared in rectangular tanks exhibited significant higher survival and competence, with values $\geq 11.6\%$ ($p = 0.038$, $t = 3.06$) and 20.5% ($p = 0.012$, $t = 4.41$), respectively (Table 4). However, larvae reared in circular tanks were longer (8.5%) than those reared in rectangular tanks ($p = 0.002$, $t = 7.1$; Table 3).

Table 3 : Larval performances at the end of the experiment, on day 22 in two different flow-through systems (50 L rectangular tanks and 35 L circular tanks). All larvae reared in static control died before day 22 and are not presented. Data are mean $\pm$ standard error; different letters indicate significant differences between treatments

Tank Shape	Survival (%)	Competency yield (%)	Size (μm)	growth ($\mu\text{m day}^{-1}$)
Rectangular	75.7 ± 5.4^a	29.2 ± 0.8^a	188.4 ± 2.0^b	4.4 ± 0.1^b
Circular	64.1 ± 1.9^a	8.7 ± 3.5^b	205.9 ± 1.5^a	5.1 ± 0.1^a

Water flow had little effects on larval performance (Table 4). On day 17, larvae from all treatments showed similar survival rates ($p = 0.57$, $\text{PF}_{(2-8)} = 0.60$), with a mean of $58.03 \pm 2.43\%$. Growth was lightly depressed at higher water flow renewal ($p_{(\text{MC})} = 0.008$, $\text{PF}_{(2-8)} = 11.1$), with larvae growing 1.3 times slower ($\frac{1}{2}$ vs 0 : $p_{(\text{MC})} = 0.015$, $t = 4.0$; $\frac{1}{2}$ vs $\frac{1}{4}$: $p_{(\text{MC})} = 0.04$, $t = 2.9$). Larval growth were similar between 0 and $\frac{1}{4}$ water renewal ($p_{(\text{MC})} = 0.13$, $t = 1.9$), with a mean of $5.9 \pm 0.2 \mu\text{m d}^{-1}$. The ratio of *Vibrio* to total bacterial flora was also impacted by water inflow ($p = 0.04$, $\text{PF}_{(2-8)} = 42.5$), with values 6.4 times higher ($\frac{1}{2}$ vs 0 : $p_{(\text{MC})} = 0.0004$, $t = 13.26$; $\frac{1}{2}$ vs $\frac{1}{4}$: $p_{(\text{MC})} = 0.003$, $t = 6.86$) in higher water inflow ($\frac{1}{2}$) compared to the other treatments (0 and $\frac{1}{4}$). The percentages of *Vibrio* were similar ($p_{(\text{MC})} = 1$, $t = 5.47 \times 10^{-4}$) in the 0 and $\frac{1}{4}$ treatments, with a mean of $1.98 \pm 0.68\%$. Larval enzyme activities measured on day 17 (Figure 23) showed no significant differences between treatments (CAT: $p = 0.07$, $\text{PF}_{(2-8)} = 3.49$; SOD: $p = 0.13$, $\text{PF}_{(2-8)} = 3.59$;

CS: $p = 0.08$, $PF_{(2-8)} = 4.68$). On 22 dpf, no differences in larval performances between the $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ treatments were observed and survival rates were similar ($p = 0.85$, $t = 0.2$), with a mean of $20.4 \pm 0.5\%$. Larvae had a mean growth rate of $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m d}^{-1}$ ($p = 0.93$, $t = 0.096$), a mean competency rate of $5.59 \pm 0.18\%$ ($p = 0.93$, $t = 0.098$), and *Vibrio* represented $0.62 \pm 0.19\%$ ($p = 0.45$, $t = 8.84$) of the total larval flora.

Table 4 : Survival, growth, competence yield, and *Vibrio* on total flora load (V/FT) of *Pecten maximus* larvae reared in 50 L rectangular tanks, in flow through at three different water flow renewal: 0 (no inflow), 12.5 L h^{-1} ($\frac{1}{4}$), 25 L h^{-1} ($\frac{1}{2}$), on day 17 and day 22. Data are mean $\pm$ standard error; different letters indicate significant differences among treatments

dpf	Volume of renewed tank water h^{-1}	Survival (%)	Growth ($\mu\text{m day}^{-1}$)	Size (μm)	V/FT (%)	Competency yield (%)
17	0	60.9 ± 69^a	6.1 ± 0.2^a	178.7 ± 1.2	2.0 ± 0.5^b	—
	$\frac{1}{4}$	60.0 ± 4.2^a	5.6 ± 0.2^{ab}	175.5 ± 1.2	2.0 ± 1.4^b	—
	$\frac{1}{2}$	53.2 ± 4.8^a	4.4 ± 0.4^b	166.7 ± 2.8	12.7 ± 1.0^a	—
22	0	0	0	0	0	0
	$\frac{1}{4}$	21.0 ± 8.5^a	3.8 ± 0.2^a	175.5 ± 1.2	0.8 ± 0.4^a	5.8 ± 2.6^a
	$\frac{1}{2}$	19.9 ± 3.7^a	3.8 ± 0.2^a	181.3 ± 1.9	0.4 ± 0.2^a	5.4 ± 2.2^a

The impact of aeration on performances of larvae reared in flow-through ($\frac{1}{4}$ vs $\frac{1}{4}$ + air) is reported in Table 5. On day 17, survival was similar regardless to the experimental conditions ($p = 0.41$, $t = 0.92$). However, larvae reared without aeration grew 1.4 times faster ($p = 0.002$, $t = 6.83$); whereas, *Vibrio* were 3.4 times less abundant ($p = 0.047$, $t = 2.84$). On the other hand, SOD activities were similar ($p = 0.36$, $t = 1.02$) between different treatments, with a mean of $1.7 \pm 0.2 \text{ U mg protein}^{-1}$, but CAT activity showed significant differences, with values 2.7 times higher ($p = 0.008$, $t = 4.8$) in larvae reared without aeration (Figure 23). Lastly CS activity was 1.7 times higher ($p = 4.8 \times 10^{-5}$, $t = 18.7$) in

larvae reared with aeration (Figure 23), which all died before the end of the experiment (Table 5).

Table 5 : Larval performances estimated by survival, growth, and competency yield and *Vibrio* contamination on total flora (V/FT) measured at 17 dpf (days post fertilization) and 22 dpf on larvae reared in 50 L flow-through rectangular tanks using 0.25 volume of renewed water per hour (treatment ¼) with or without aeration. Data are mean $\pm$ standard error; different letters indicate significant differences between treatments. No statistical analyses were done at day 22 since only one condition survived

dpf	Volume of renewed tank water h ⁻¹	Aeration (ml min ⁻¹)	Survival (%)	Growth (μ m day ⁻¹)	Size (μ m)	V/FT (%)	Competency yield (%)
17	¼	0	60.0 $\pm$ 4.2 ^a	5.6 $\pm$ 0.2 ^a	175.5 $\pm$ 1.2 ^a	2.0 $\pm$ 1.4 ^b	–
		300	53.0 $\pm$ 6.4 ^a	4.1 $\pm$ 0.2 ^b	165.0 $\pm$ 1.0 ^b	6.3 $\pm$ 0.4 ^a	–
22	¼	0	21.0 $\pm$ 8.5	3.8 $\pm$ 0.2	175.5 $\pm$ 1.2	0.8 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 2.6
		300	0	0	0	0	0

DISCUSSION

Larval rearing of scallops without antibiotic treatment is generally accomplished in large volume tanks (>500 L) to avoid mass mortality (Campa-Córdova et al. 2005; Magnesen et al. 2006; Merino et al. 2009; Pernet et al. 2003). Our results showed that small flat-bottomed rectangular tanks (50 L) can be successfully used (> 75% survival at pediveliger stage) in flow-through conditions with water inflow of at least 0.25 of the tank volume per hour. This high survival was obtained in the first experiment using larvae previously treated with antibiotics for only two days.

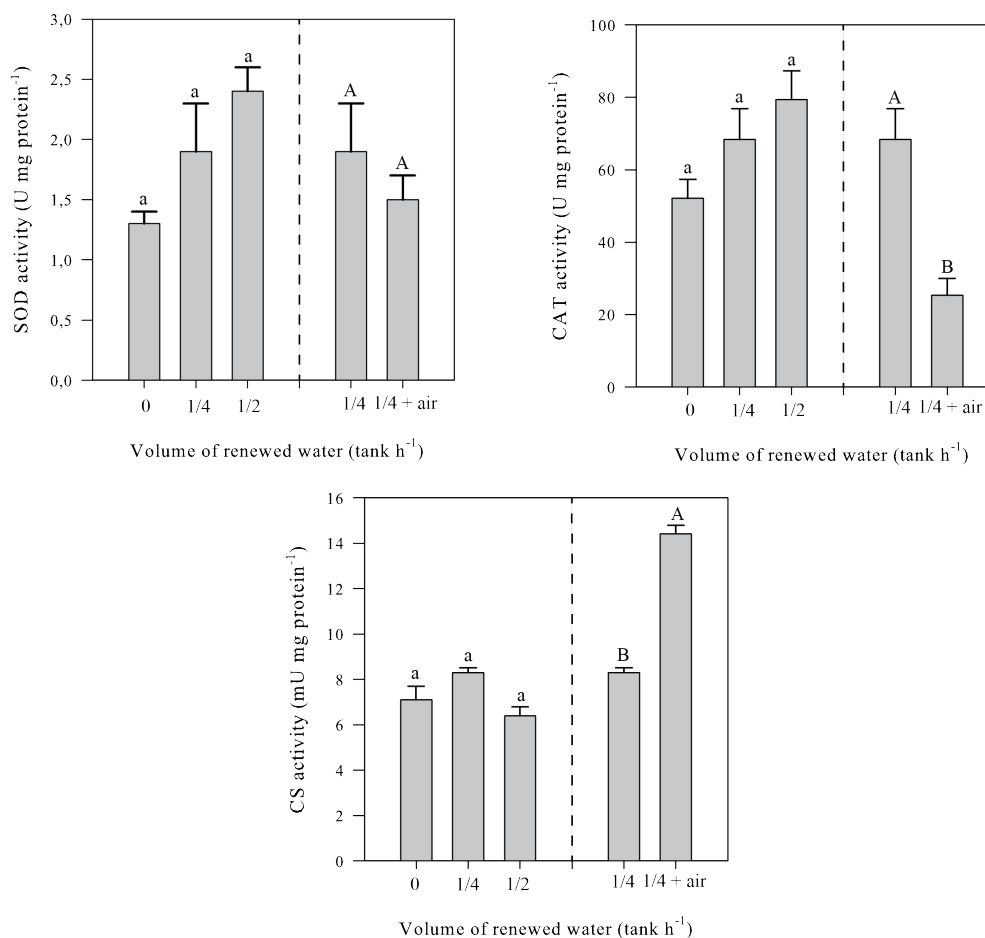


Figure 23 : Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and citrate synthase (CS) in *Pecten maximus* larvae reared in 50 L rectangular tanks, in flow through at three different water flow renewal: 0 (no inflow), 12.5 L h⁻¹ (1/4), 25 L h⁻¹ (1/2), on day 17. At 12.5 L h⁻¹ seawater renewal an aeration of 300 ml h⁻¹ was also implemented (1/4 + air). Data are mean $\pm$ standard error and different letters indicate significant differences between flow-through treatments and between aeration treatments

Several experiments have been carried out to determine the best configuration of cylindrical tanks with conical bottoms for rearing *P. maximus* larvae. Volumes tested varied from 500 to 4700L with densities from 1.5 to 13 larvae ml⁻¹ (Magnesen et al. 2006; Torkildsen and Magnesen 2004). These large volumes were very different from the 5 L

cylindrical-conical tanks used by Gonzalez Araya et al. (2012) for *O. edulis*. Our previous trials (Holbach, unpublished data) clearly showed that the narrow shape and the small conical bottom of this system was unsuitable for scallop larvae. In the present study we found that 50 L flat-bottomed tanks improved scallop larval performance. Compared to the 5 L cylindrical-conical tank previously developed for oysters and unsuccessfully applied for *P. maximus*, a larger volume probably allows stabilization of the environment and reduces the surface-to-volume ratio (S/V). This ratio has been suggested to be important for *P. maximus* larval rearing (Helm et al. 2006). In our study, we used tanks with S/V values (rectangular: 0.196) much lower than those of the 5 L flow-through system (0.585). Larvae reared in 35 L circular tanks grew faster but competence yields were three times lower than those recorded in the 50 L rectangular tanks. Because a greater number of larvae ready to metamorphose is preferred for hatchery purposes (Helm et al. 2006), we suggest that rectangular tanks are more appropriate and we used them for further experiments.

In the flat-bottomed flow-through tank without aeration, enzyme activities, used as indicators of physiological stress, indicated no stressful responses from scallop larvae. Indeed, no clear trend in the three enzymes studied through three different experimental conditions was noted. Water flow intensity did not affect larval survival, but growth was lower when larvae were reared at higher flow. This decrease in larval growth could be related to the higher proportion of *Vibrio* observed in the total flora of this treatment. On day 22, complete mortalities have been observed in the no water inflow treatment in flat-bottomed rectangular tanks. Even if the percentage of *Vibrio* was similar to the ¼ treatment on day 17, we observed a radical change in larval behaviour, as larvae stopped swimming and microalgae accumulation was observed on the bottom tanks. In this experiment, larvae were only treated with a two-day chloramphenicol treatment (between day 2 and day 4 post fertilization). This could be insufficient to protect the larvae against the fast deterioration of their environment due to the accumulation of microalgae. We suggest that potential eggs and/or diet quality changes could be responsible of the mortalities observed in flow-through system between experiment 1 ($75.7 \pm 5.4\%$) and experiment 2 ($21.0 \pm 8.5\%$).

When aeration was implemented in flow through CS activity was significantly higher, which could be a sign of increased metabolic rate. This enzyme activity was positively correlated with bivalve respiration in adult and larval stages (Moran and Manahan 2003). Whereas, Genard et al. (2011, 2013), reported a decrease in oyster larvae CS activity in stressful pathogenic conditions, the present results showed an opposite pattern for another source of stress, i.e. aeration, with an increase of oxidative metabolic rate. Thus an increase in ATP production could be related to a higher energy demand in support of increased larval swimming in a turbulent environment (Gregg and Bergersen 1980). Since larval growth was lower in the treatment with aeration, the increased metabolic rate does not seem sufficient to provide more energy for swimming without impacting larval performance. The proportion of *Vibrio* was also higher in larvae reared with aeration, but the lower CAT activity and the unchanged SOD activity suggest that the antioxidant defences were not activated. This rise of *Vibrio* could just be the consequence of the higher number of moribund larvae in this rearing condition.

CONCLUSION

Scallop larvae can be reared in flat-bottomed rectangular tanks as flow through with survival and yield of competent larvae much higher than in static condition. Regardless to the intensity of water renewal in flow-through, the seawater renewal intensity was less deleterious for scallop larval development than aeration. Further investigations are however needed to support higher larval densities for an optimization of the system and to determine the best compromise between production cost (algal production and water warming) and production yield.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Tinduff hatchery for providing larvae and the technical team of Argenton Ifremer station - I. Quéau, L. Lebrun, B. Petton - for algal production and

bacterial survey. We are also grateful to the “Ministère du Développement Economique, de l’Innovation et de l’Exportation du Québec”(MDEIE), which contributed to funding for a Ph.D. scholarship, to Ressource Aquatiques Québec (RAQ), and to Fonds de Recherches du Québec: Nature et Technologies (FRQNT), which provided a travel grant to Marine Holbach. This work was carried out during the EU funded project ReproSeed (FP7-KBBE-2009-3), which participated in operating outlays.

REFERENCES

- Andersen, S., Burnell, G., Bergh, O., 2000. Flow-through systems for culturing great scallop larvae. *Aquacult. Int.* 8, 249-257.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster. *Can. J. Zool.* 89, 579-598.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2012. Implications of larval diet concentration on post-larval yield in a production scale flow-through system for scallops (*Pecten maximus*, Lamarck) in Norway. *Aquacult. Int.*, 21(2), 435-452.
- Anderson, M., Gorley, R., Clarke, K., 2008. Plymouth: Primer-E; 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods, pp. 214.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32-46.
- Azandegbe, A., Garnier, M., Andrieux, F., Kerouel, R., Philippon, X., Nicolas, J.L., 2010. Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. *Dis. Aquat. Organ.*, 91, 213-221.
- Bergh, Ø., Strand, Ø., 2001. Great scallop, *Pecten maximus*, research and culture strategies in Norway: a review. *Aquacult. Int.* 9, 305-317.
- Brokordt, K.B., Nunez, G.A. Gaymer, C.F. 2011. Improving escape responses of hatchery-reared scallops *Argopecten purpuratus*. *Mar. Biol.* 158, 1311-1318.
- Bourne, N.F., 2000. The potential for scallop culture - the next millenium. *Aquacult. Int.* 8, 113-122.
- Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Zarain-Herzberg, M., Cáceres-Martínez, C.J., 2005. Prophylactic use of antibiotics in larval culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). *J. Shellfish Res.* 24, 923-930.
- Childress, J.J., Somero, G.N., 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52, 273-283.
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., Tremblay, R., 2011. Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquat. Living Resour.* 24, 247-260.

- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., Tremblay, R. 2013. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *PLOS One* 8, e64534.
- Genard B., O. Laroucher, et al., 2014, Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* (X34) after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*. *Aquat. Living Resour.* 27, 27-34
- Gérard, A., Salaun, M., Tritar, S., 1989. Critères de compétence des larves à la métamorphose chez *Pecten maximus*. *Haliotis* 19, 373-380.
- Gonzalez Araya, R., Mingant, C., Petton, B., Robert, R., 2012. Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture* 364, 272-280.
- Gregg, R.E., Bergersen, E.P., 1980. *Mysis relicta*: Effects of turbidity and turbulence on short-term survival. *T. Am. Fish. Soc.* 109, 207-212.
- Guévelou, E., Huvet, A., Galindo-Sánchez, C.E., Milan, M., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Quéré, C., Boudry, P., Corporeau, C., 2013. Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Biol. Reprod.* 89, 101-115.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2006. Ecloserie de bivalves: manuel pratique. Food & Agriculture Org., pp. 184.
- Holbach, M., Robert, R., Boudry, P., Miner, P., Tremblay, R., soumis. Impact of airflow rate on *Pecten maximus* larval development in hatchery. *Aquaculture*.
- Le Pennec, M., Prieur, D., 1977. Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins. *Aquaculture*. 12, 15-30.
- Magnesen, T., Bergh, O., Christophersen, G., 2006. Yields of great scallop, *Pecten maximus*, larvae in a commercial flow through rearing system in Norway. *Aquacult. Int.* 14, 377-394.
- Merino, G., Uribe, E., Soria, G., von Brand, E., 2009. A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems. *Aquacult. Eng.* 40, 95-103.
- Moran, A.L., Manahan, D.T., 2003. Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. *Biol. Bull.* 204, 270-277.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Organ.* 27, 67-76.
- Pernet, F., Tremblay, R., Bourget, E., 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: Larval growth, competency and settlement. *J. Shellfish Res.* 22, 377-388.
- Petton B., Le Souchu, P., Mingant, C., Robert R., 2009. Small volume flow-through containers for bivalve larval rearing. *Aquaculture Europe AE2009*, 14-17 August 2009, Trondheim (Norway). *Book of Abstracts*, 491-492 (poster).
- Philipp, E.R.R., Schmidt, M., Gsottbauer, C., Sanger, A.M., Abele, D., 2008. Size-and age-dependent changes in adductor muscle swimming physiology of the scallop *Aequipecten opercularis*. *J. Exp. Biol.* 211, 2492-2501.
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

- Robert, R., Miner, P., Nicolas, J.-L. 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Int.* 4, 305-313.
- Robert, R., Gerard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* 12, 121-130.
- Torkildsen, L., Magnesen, T., 2004. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) – Survival in different rearing systems. *Aquacult. Int.* 12, 489-507.
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Magnesen, T., Bergh, Ø. 2005. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquacult. Int.* 13, 575-592.
- Uriarte, I., Fariás, A., Castilla, J.C., 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacult. Eng.* 25, 139-147.
- Utting, S.D., Spencer, B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Laboratory leaflet. MAFF direct. Fish. Res., pp. 31.
- Widman, J., Choromanski, J., Robohm, R., Stiles, S., Wikfors, G., Calabrese, A., 2001. Manual for Hatchery Culture of the Bay Scallop. in: Service, N.M.F. (Ed.), *Argopecten irradians irradians*, Connecticut Sea Grant College Program, pp. 50.

CHAPITRE 4

DES OUTILS SIMPLES POUR AMÉLIORER LA PRODUCTION DE NAISSAINS DE PECTINIDÉS

4.1 UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE CIBLÉ APPLIQUÉ DURANT L'EMBRYOGENÈSE POUR RÉDUIRE L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ÉLEVAGES DE PECTINIDÉS

MISE EN CONTEXTE

Cette étude, présentée en septembre 2012 dans le cadre de la conférence internationale Physiomar12, avait pour but 1) d'interrompre la transmission de bactéries entre les œufs et les larves-D qui en découlent en agissant durant l'embryogenèse et 2) de vérifier son influence sur le développement larvaire. Cette période d'incubation de deux jours est connue pour être favorable à la prolifération bactérienne à cause de la matière organique disponible provenant du sperme et des œufs non fécondés (Gruffydd et Beaumont, 1970, Helm et al., 2006). Or, dans un contexte de développement d'une aquaculture respectueuse de l'environnement, l'utilisation systématique des antibiotiques est un souci majeur et il est nécessaire de développer des méthodes alternatives.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dix jours avant l'expérience, des antibiogrammes ont été réalisés à partir d'échantillons de gonades prélevés sur les géniteurs selon la méthode décrite par Furones (2001). L'érythromycine présentant la zone d'inhibition la plus large après une semaine d'incubation à 23 °C a été sélectionnée pour cette étude. La fécondation a été réalisée par choc thermique selon la méthode de Gruffydd et Beaumont (1970). Deux heures après la

fécondation, les ovocytes en division ont été répartis dans des béciers de 2 L (n=3), d'une part, et des cylindres coniques de 150 L (n=2), d'autre part. Trois conditions ont été testées : sans traitement antibiotique (NT), en présence de chloramphénicol comme référence (C) et en présence d'érythromycine (E). Les antibiotiques ont été utilisés à une concentration de 8ppm. L'expérience en béciers avait pour but de déterminer si le traitement antibiotique avait un impact sur le déroulement de l'embryogenèse. Pour cela, le taux d'éclosion larvaire et le taux de larves anormales ont été déterminés deux jours après la fécondation (Gruffydd et Beaumont, 1970). Le but de l'expérience en bassins de 150 L était de vérifier si le traitement appliqué durant l'embryogenèse influençait la survie des larves lors d'un élevage en séquentiel à 18 °C. Pour cela des béciers de 5 L ont été utilisés (n=3). Le renouvellement d'eau avait lieu tous les deux jours et les larves ont été nourries avec un mélange de trois microalgues : *Pavlova lutheri*, *Tisochrysis lutea* et *Skeletonema marinoi* à 60 cellules μl^{-1} en équivalent volumique. Des PERMANOVAs à un facteur (traitement antibiotique) ont été réalisées sur les pourcentages de larves-D et de larves anormales. Des PERMANOVAs à deux facteurs (temps et traitement antibiotique) ont été réalisées sur les taux de survie obtenus durant l'élevage larvaire.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Deux jours après la fécondation, les taux d'éclosion de larves-D (Figure 24) étaient statistiquement similaires selon les trois traitements appliqués durant l'embryogenèse avec une moyenne de $57,6 \pm 8,8 \%$ ($p = 0,88$; $\text{PF}_{(2-8)} = 0,12$). Aucune différence significative entre les taux de larves anormales obtenus n'a également pu être détectée ($p = 0,93$; $\text{PF}_{(2-8)} = 0,07$) pour les trois conditions testées. Après deux jours d'incubation le taux moyen d'anormalité observé était de $13,1 \pm 2,5 \%$. Ces résultats démontrent que l'application d'antibiotique durant les premiers jours de développement ne perturbe pas le déroulement normal de l'embryogenèse.

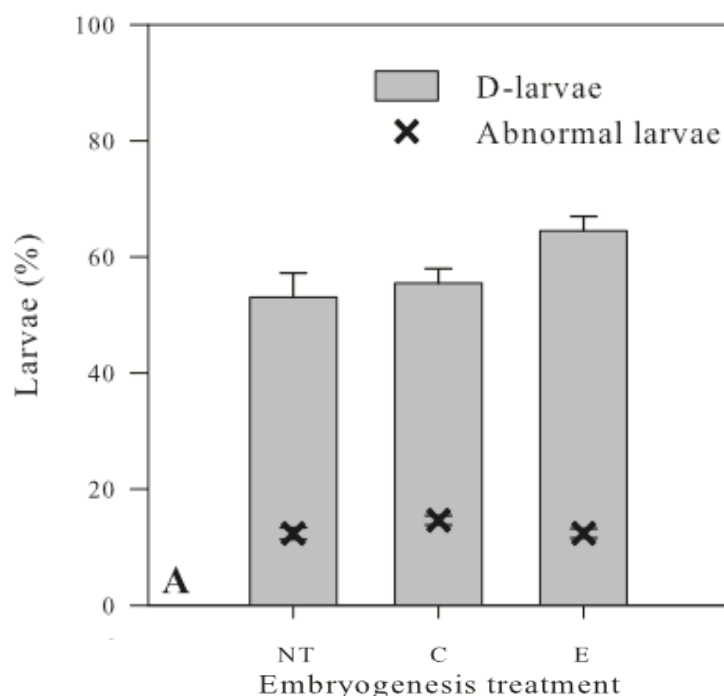


Figure 24 : A- Pourcentages de larves-D obtenus et pourcentages de larves normalement formées après 48 h d'incubation selon trois traitements antibiotiques (NT : sans traitement, C : chloramphénicol, E : érythromycine). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard.

La figure 25 montre que les larves n'ayant pas reçu de traitement antibiotique et celles ayant été mises en présence de chloramphénicol n'ont pas survécu au-delà de 18 jours d'élevage. Les larves ayant reçu un traitement avec l'antibiotique ciblé enregistraient, quant à elles, une survie moyenne de $33,0 \pm 20,1$ % au jour 18 pour finalement atteindre $13,5 \pm 6,5$ % en fin d'élevage. Même si la survie larvaire enregistrée en fin d'élevage est faible, la mortalité précoce des larves non traitées et traitées au chloramphénicol renforce l'hypothèse d'une influence positive d'un traitement antibiotique ciblé sur la flore bactérienne des géniteurs. De plus, l'application de ce traitement avant le stade larve-D pourrait autoriser le transfert de cette méthode à des élevages en flux ouvert. Néanmoins, la

variabilité entre les réplicas et le faible taux de survie obtenu au jour 22 pourraient souligner la nécessité d'un traitement légèrement plus long pour soutenir un taux de survie plus élevé jusqu'en fin d'élevage.

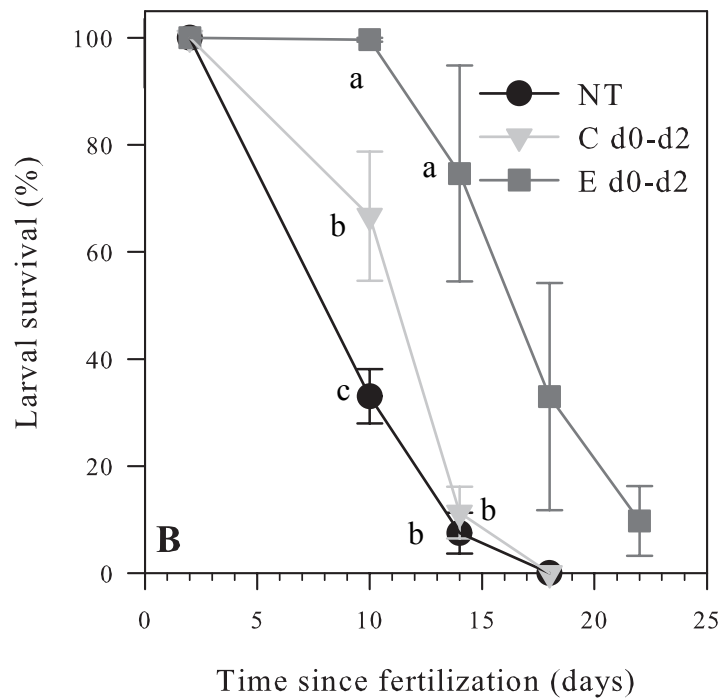


Figure 25 : Évolution de la survie larvaire de *P. maximus* selon trois traitements antibiotiques (NT, C, E) appliqués durant l'embryogenèse. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard et des lettres différentes indiquent une différence statistique

4.2 DIMINUER L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ÉLEVAGES DE PECTINIDÉS EN APPLIQUANT DES TRAITEMENTS CIBLÉS ET DE COURTE DURÉE À PARTIR DU STADE LARVE-D

MISE EN CONTEXTE

Le but de ce travail, présenté en septembre 2012 dans le cadre de la conférence internationale Physiomar12, était de démontrer que l'application de traitement unique de courte durée ou la répétition de traitements courts durant toute la période d'élevage pourraient améliorer la survie larvaire. Ces traitements appliqués à partir du stade larves-D pourraient réduire l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages en séquentiel et être utilisés comme alternatives temporaires aux échecs des élevages en flux ouvert de faibles volumes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dix jours avant l'expérience des antibiogrammes ont été réalisés à partir d'échantillons de gonades prélevés sur les géniteurs selon la méthode décrite par Furones (2001). La fluméquine, présentant la zone d'inhibition la plus large après une semaine d'incubation à 23 °C, a été sélectionnée pour cette étude. Des larves-D provenant d'une éclosérie commerciale française (Le Tinduff), ont été élevées en béciers de 5 L à 18 °C et alimentées sur un mélange de trois microalgues : *Pavlova lutheri*, *Tisochrysis lutea* et *Skeletonema marinoi* à 60 cellules μl^{-1} en équivalent volumique. Les changements d'eau ont eu lieu tous les deux jours. Cinq conditions ont été testées : sans traitement antibiotique (0), un unique traitement du jour 2 au jour 4 avec du chloramphénicol (2 jours C), un unique traitement du jour 2 au jour 4 avec de la fluméquine (2 jours F), un traitement de deux jours répétés tous les 6 jours durant la totalité de l'élevage (discontinu F) et un traitement continu à la fluméquine durant la totalité de l'élevage larvaire (continu F). Au jour 22, les taux de survie et de compétence larvaires ont été déterminés et les larves transférées dans un système de fixation larvaire appelée « downwelling ». Dix jours plus tard, les taux de fixation ont été déterminés.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans cette expérience aucune différence statistique n'a pu être détectée sur la survie, la compétence ainsi que sur les taux de fixation entre les différentes conditions étudiées (Table 6). Nous suggérons que la qualité physiologique et la qualité sanitaire du lot utilisé pour cette expérience étaient suffisantes pour réaliser des élevages sans antibiotique. Ces résultats ne nous permettent pas d'avancer dans notre recherche de méthodes d'optimisation des élevages larvaires de pectinidés ni dans la recherche de solutions permettant de réduire l'utilisation d'antibiotiques en aquaculture, mais ils renforcent la nécessité d'avoir des outils prédictifs permettant de déceler rapidement la qualité des lots de larves utilisés.

Table 6 : Survie et compétence à la métamorphose des larves de *P. maximus* après 22 jours d'élevage et taux de post-larves fixées après 10 jours de mise en fixation, selon différent temps de traitement antibiotique (C : chloramphénicol et F : fluméquine). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard et des lettres identiques signifient qu'aucune différence statistique n'a pu être détectée

Traitement	Jour 22		Jour 32
	Survie (%)	Compétence (%)	Fixation (%)
0	64.2 $\pm$ 5.5 ^a	38.5 $\pm$ 3.1 ^a	9.6 $\pm$ 1.9 ^a
2 jours C	65.0 $\pm$ 3.1 ^a	45.1 $\pm$ 2.9 ^a	11.4 $\pm$ 0.4 ^a
2 jours F	75.2 $\pm$ 3.3 ^a	52.2 $\pm$ 2.6 ^a	12.9 $\pm$ 0.7 ^a
Discontinu F	62.8 $\pm$ 6.5 ^a	48.3 $\pm$ 4.3 ^a	4.5 $\pm$ 0.8 ^a
Continu F	60.3 $\pm$ 4.4 ^a	47.7 $\pm$ 4.6 ^a	6.9 $\pm$ 1.3 ^a

4.3 CALIBRATION D'UN OUTIL DE DÉTERMINATION RAPIDE DE LA QUANTITÉ DE RÉSERVE DES LARVES DE *PLACOPECTEN MAGELLANICUS*

MISE EN CONTEXTE

La principale réserve énergétique des pectinidés est les lipides, comme chez la grande majorité des bivalves (Gallager et al., 1986). Il y a différentes classes de lipides, soit des lipides de réserve comme les triglycérides, et des lipides de structure des membranes, comme les phospholipides et les stérols. Des travaux récents réalisés sur le pétoncle géant *Placopecten magellanicus* suggèrent qu'une larve doit accumuler plus de 20 ng de triglycérides au jour 20 pour assurer la métamorphose (Pernet et al., 2003a, Pernet et al., 2006). Il est nécessaire aujourd'hui de pouvoir proposer aux professionnels des outils permettant de déterminer si les larves répondent à ce critère, sans passer par des analyses relevant du domaine de la recherche qui sont souvent trop coûteuses pour des écloséries commerciales

Une méthode simple de dosage des triglycérides par fluorescence a été validée dernièrement sur les larves d'huitres creuses *Crassostrea gigas* (Ben Kheder et al., 2010a; Ben Kheder et al., 2010b, c). En colorant les triglycérides, il est possible d'estimer leur pourcentage de recouvrement dans les larves par analyses d'image au microscope et ainsi d'avoir une estimation de leur concentration en quelques heures seulement. Ces travaux ont démontré une relation linéaire directe chez l'huitre entre cette méthode de coloration et les dosages par chromatographie. Nous proposons au travers de cette étude de tenter de calibrer cet outil pour les larves de *P. magellanicus*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les larves utilisées dans cette expérience provenaient des Fermes Marines du Québec. Trois jours après la fécondation ces larves ont été alimentées à satiété par un mélange de

microalgues : *Pavlova lutheri*, *Tisochrysis lutea* et *Chaetoceros muelleri*. Seule la technique de calibration de l'outil sera détaillée dans cette section.

Analyse colorimétrique

La calibration de l'outil de colorimétrie a été réalisée grâce à des analyses biochimiques, couplées à de l'observation de larves, directement analysées au moment des prélèvements. Cet indice correspond au ratio de la surface de lipides colorée au Rouge Neutre (Nile Red) sur la surface totale de la larve. Pour obtenir une bonne estimation, 50 à 100 larves étaient colorées par échantillon. Le rouge neutre était maintenu dans une solution mère (0.01g Nile Red + 40 ml d'acétone pure) et conservé à 5 °C pour plusieurs semaines. Les colorations étaient effectuées dans des plaques multipuits de 2 ml. Dans chaque puits, 5-10 larves et 2 ml d'eau de mer filtrée à 1 µm étaient mis en présence de 10 µl de la solution mère de Nile Red. Après 90 minutes, les larves étaient transférées dans un autre puits contenant 2 ml d'eau de mer filtrée à 1 µm. Quelques gouttes de formaldéhyde à 10 % étaient ajoutées pour fixer la coloration. Les photos étaient prises entre 5 minutes et 4 heures après la coloration grâce à un microscope Olympus à fluorescence de type FITC–SYBR filtre vert (450-490 nm d'excitation et 515-565 d'émission) et au logiciel d'analyses d'image Image J (Figure1).

Analyse biochimique

Environ 20 000 larves étaient prélevées en duplicata, sur des filtres GF/C 25 mm préalablement brûlés à 450 °C et pesés, afin de réaliser les analyses biochimiques. Le poids sec des larves était obtenu après passage des filtres à l'étuve à 70 °C pendant 48h. Les lipides étaient extraits par broyage dans un mélange de dichlorométhane : méthanol (2:1), à l'aide d'un broyeur en verre. Les lipides neutres étaient obtenus par séparation sur gel de silice grâce à un mélange de dichlorométhane : méthanol (98:2) (Marty et al., 1992). Ces fractions étaient ensuite analysées par chromatographie sur phase gazeuse afin d'obtenir les quantités totales de lipides neutres.

Une relation entre le contenu lipidique des larves obtenu par analyses d'images et celui obtenu par analyses biochimiques a été établie par une analyse de régression linéaire. Une fois la corrélation établie et validée statistiquement, l'équation de la droite de régression permet d'obtenir directement la quantité de lipides contenue dans les larves à partir du pourcentage de fluorescence.

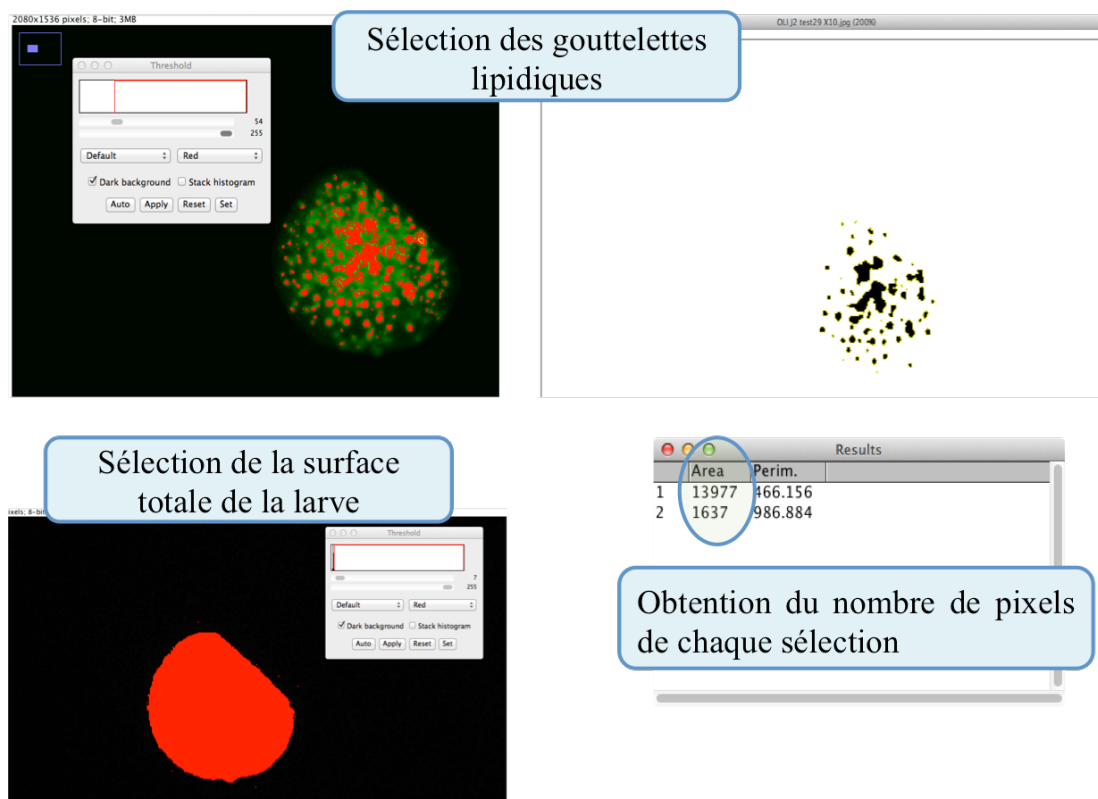


Figure 26 : Analyse d'image de la fluorescence des lipides larvaires au microscope à épifluorescence (x10), à l'aide du logiciel ImageJ

Analyse biochimique

Environ 20 000 larves étaient prélevées en duplicata, sur des filtres GF/C 25 mm préalablement brûlés à 450 °C et pesés, afin de réaliser les analyses biochimiques. Le poids

sec des larves était obtenu après passage des filtres à l'étuve à 70 °C pendant 48h. Les lipides étaient extraits par broyage dans un mélange de dichlorométhane : méthanol (2:1), à l'aide d'un broyeur en verre. Les lipides neutres étaient obtenus par séparation sur gel de silice grâce à un mélange de dichlorométhane : méthanol (98:2) (Marty et al., 1992). Ces fractions étaient ensuite analysées par chromatographie sur phase gazeuse afin d'obtenir les quantités totales de lipides neutres.

Une relation entre le contenu lipidique des larves obtenu par analyses d'images et celui obtenu par analyses biochimiques a été établie par une analyse de régression linéaire. Une fois la corrélation établie et validée statistiquement, l'équation de la droite de régression permet d'obtenir directement la quantité de lipides contenue dans les larves à partir du pourcentage de fluorescence.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les larves utilisées pour cette expérience présentent un retard de croissance évident dès le dixième jour d'élevage (Figure 27A). Les larves ne dépassent pas 140 µm au jour 32 alors qu'elles devraient dépasser les 220 µm. La quantité de lipides décroît continuellement pendant le développement larvaire (Figure 27C), révélant l'incapacité des individus à stocker des réserves malgré les quantités de nourritures à leur disposition. Les résultats de fluorescence (Figure 27B) vont dans le sens des analyses biochimiques et démontrent également un épuisement général des larves.

Malgré l'état physiologique des larves utilisées, une corrélation significative ($p = 0,032$) a pu être établie entre le pourcentage de fluorescence donné par analyse d'images et les quantités de lipides obtenues par les analyses biochimiques (Figure 28). La régression linéaire nous permet de dégager l'équation suivante : $P = [0,451 \times Q] + 1,303$

Avec : P, le Pourcentage de fluorescence (%) et Q, la Quantité de lipides (µg/poids sec).

Ainsi une fois P obtenu à l'aide de l'analyse d'image Q est obtenue grâce à l'équation suivante : $Q = [P - 1,303] / 0,451$

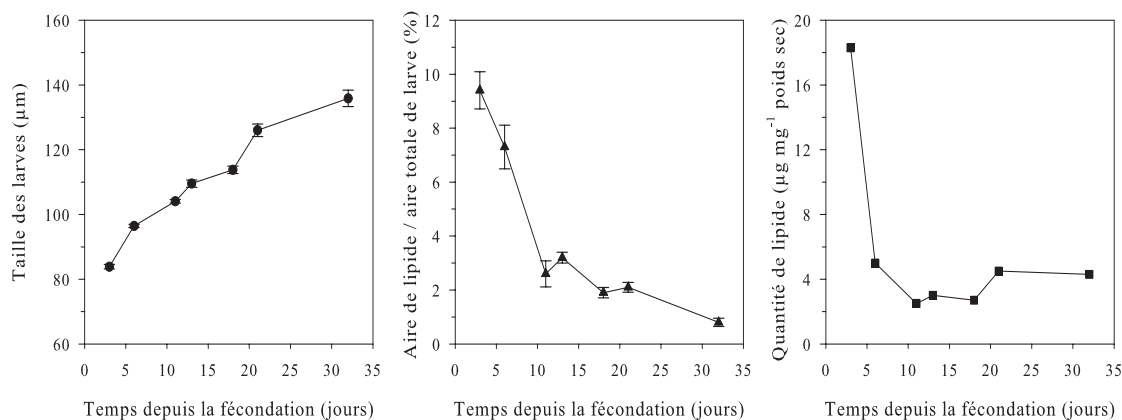


Figure 27 : A- Évolution de la taille (µm) des larves en fonction du temps. B- Évolution du pourcentage de fluorescence des larves pendant l'élevage. C- Évolution de la quantité de lipides de réserve des larves (µg/mg poids sec) au cours de l'élevage. Les barres représentent l'erreur standard

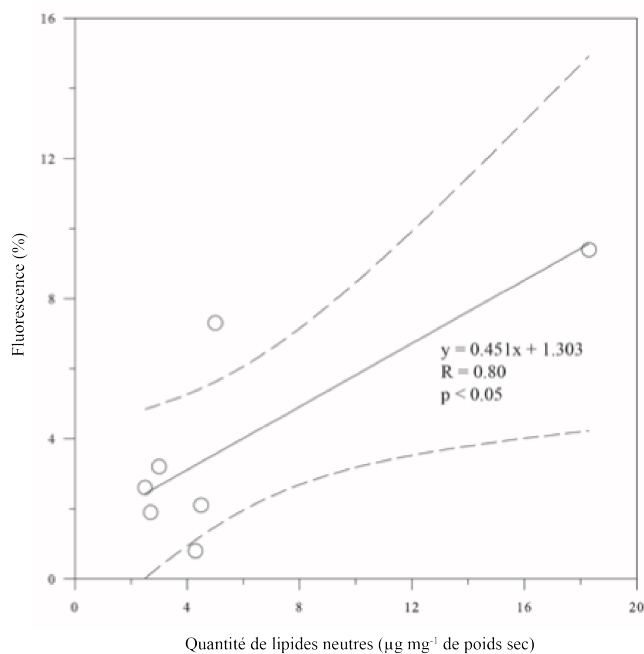


Figure 28 : Régression linéaire entre le pourcentage de fluorescence des larves, obtenue par analyses d'images, et la quantité de lipides de réserve (µg mg⁻¹ de poids sec), obtenue par analyses biochimiques

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans un monde où les populations humaines sont en perpétuelle augmentation, la demande de plus en plus forte en produits de la mer a nécessité une adaptation du secteur de la pêche, et notamment un recours à l'aquaculture afin de produire le naissain nécessaire au soutien des stocks naturels devenus surexploités. Aujourd'hui, la production aquacole de pectinidés repose majoritairement sur l'obtention artificielle de naissains en éclosérie, le captage en milieu naturel étant trop aléatoire (Boucher et Dao, 1989, Avendaño, 1993, Couturier *et al.*, 1995, Parsons et Robinson, 2006). Malgré les récentes avancées depuis les années 1970, les rendements de production fluctuent de façon récurrente et aléatoire à cause des variations majeures dans les taux de survie larvaire (Buestel *et al.*, 1982, Robert et Gerard, 1999). Les mortalités observées en milieu contrôlé sont généralement associées à des proliférations massives de bactéries (blooms) et notamment à des bactéries pathogènes du genre *Vibrio* (Jacq *et al.*, 1992, Riquelme *et al.*, 1995, Nicolas *et al.*, 1996, Jorquera *et al.*, 2001, Torkildsen *et al.*, 2005). Dans la plupart des écloséries de pectinidés, l'emploi préventif et/ou curatif d'antibiotiques permet de garantir la production dans un système d'élevage de gros volume en eau stagnante (Le Pennec et Prieur, 1977, Nicolas *et al.*, 1996, Robert *et al.*, 1996, Torkildsen *et al.*, 2000, Campa-Córdova *et al.*, 2005). Dans une société où le développement durable est au cœur des préoccupations, l'utilisation de produits chimiques doit nécessairement être limitée ou même évitée. Dans ce contexte, le développement des techniques en flux ouvert est une grande avancée. Aujourd'hui, cette technique a été développée chez *Pecten maximus* dans une éclosérie commerciale norvégienne (Andersen *et al.*, 2011) et chez *Argopecten gibbus* dans une éclosérie expérimentale des Bermudes (Sarkis *et al.*, 2006). Contrairement aux élevages en eau stagnante, cette technique garantit la stabilité de l'environnement grâce à l'apport continu d'eau neuve et de nourriture procurant un milieu de bonne qualité sanitaire et riche en

nourriture. Les changements d'eau répétés n'étant plus nécessaires, ce système permet également de faire des économies substantielles de main d'œuvre. De plus, les tamisages répétés des larves sont connus pour les fragiliser et limiter leur croissance, ce qui est évité dans le cas du flux ouvert (Figure 29 ; Merino *et al.*, 2009).

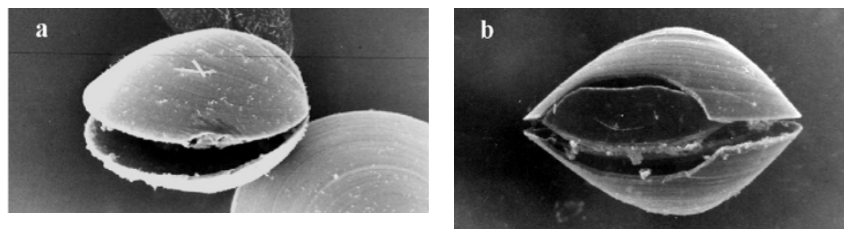


Figure 29 : Photographies de coquilles de larves d'*Argopecten purpuratus* tamisées régulièrement et obtenues par microscope électronique à balayage : a- abrasion de la coquille et b- dommages au niveau de la charnière. (D'après Merino *et al.*, 2009)

Cette méthode prometteuse n'est pas encore optimale, car elle nécessite, chez *P. maximus* par exemple, l'utilisation de grand volume (jusqu'à 4 000 L) avec de faibles taux de renouvellement (un renouvellement par jour) et des densités faibles autour de 1 larve ml^{-1} (Magnesen *et al.*, 2006). La réduction des volumes d'élevage et l'augmentation des densités larvaires rendraient cette technique d'élevage plus rentable en termes de gestion d'espace et rendements de production. Un tel compromis a pu être atteint chez *Crassostrea gigas* et dans une moindre mesure chez *Ostrea edulis* (Gonzalez-Araya *et al.*, 2012a). L'utilisation d'enceintes de 5 L permettant de travailler à 5 Larves ml^{-1} pour *O. edulis* et jusqu'à 300 larves ml^{-1} chez *C. gigas* résoudrait les problèmes de rentabilité de production de cette industrie. Malheureusement des travaux préliminaires, réalisés dans ces enceintes adaptées aux ostréidés, ont vite démontré leurs limites pour les larves de pectinidés (résultats présentés au congrès Physiomar10). Toujours dans le but d'améliorer la production de naissains il était important de comprendre les mécanismes impliqués dans les mortalités des larves de *P. maximus* élevées dans ce système qui s'est avéré performant.

Dans ce contexte, les résultats acquis au cours de cette étude ont permis d'identifier l'origine des phénomènes limitant l'élevage des larves de coquille Saint-Jacques en

système en continu en petit volume. Ils permettent néanmoins d'entrevoir des optimisations futures. Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, aux problèmes de contaminations microbiennes affectant les stades larvaires précoces, puis à l'identification des paramètres d'élevage en flux ouvert qui influencent la survie et la croissance des post-larves. Ce projet permet de proposer aux professionnels des pistes afin d'amélioration des techniques d'élevage de pectinidés en lien avec la physiologie des larves. Il a pour but d'augmenter les rendements de productions de pédivéligères, tout en limitant l'utilisation de produits chimiques.

LIMITER LA PROLIFÉRATION BACTÉRIENNE GRÂCE À LA PROPHYLAXIE

LE SÉDIMENT COMME SOURCE DE CONTAMINATION CHEZ LES GÉNITEURS

Il est très rapidement apparu que la charge bactérienne des premiers stades de développement larvaire pouvait être déterminante pour la réussite des élevages de pectinidés dans le système décliné pour les larves d'ostreïdés. Nos résultats préliminaires ont confirmé l'hypothèse selon laquelle les épisodes de mortalité massive observés sont en lien avec la présence de prolifération bactérienne (résultats présentés au congrès Physiomar10). Les travaux de Sainz-Hernández et Maeda-Martínez (2005) ont par ailleurs décrits l'importance de la charge bactérienne des stades larvaires précoces dans la perte rapide et totale des élevages de pectinidés. Ces informations confirment la nécessité de contrôler la qualité sanitaire des larves et donc des gamètes et des larvesD dont elles sont issues, par des méthodes de prophylaxie qui s'inscrivent dans le contexte actuel de développement durable. L'existence d'un potentiel transfert de bactéries entre les géniteurs et leurs gamètes suggérée par plusieurs auteurs (Lodeiros *et al.*, 1987, Le Pennec *et al.*, 1992, Riquelme *et al.*, 1994, Avendaño-Herrera *et al.*, 2001, Beninger *et al.*, 2003) nous a orienté vers une nouvelle méthode de conditionnement de géniteurs. Le sédiment favorise l'accumulation de microalgues et de fèces formant une couche de matière organique en surface, favorable au développement bactérien (La Rosa *et al.*, 2004, Essid *et al.*, 2007,

Richardson *et al.*, 2008). Le retrait de ce potentiel réservoir de bactéries (Chelossi *et al.*, 2003) des bacs de conditionnement a démontré, dans le chapitre 1, qu'il permettait l'obtention d'œufs de même qualité physiologique (*i.e.* de profils lipidiques identiques), mais de meilleure qualité sanitaire. Cet abaissement de la charge bactérienne s'est maintenu au stade larve-D, mais également jusqu'à 15 jours après la fécondation.

UNE UTILISATION RAISONNÉE DES ANTIBIOTIQUES

Des traitements courts et ciblés sur les géniteurs

Le principe de précaution nous a incité à réaliser cette expérience sous un contrôle antibiotique raisonné. En effet, il est de rigueur de limiter tant que possible les potentielles contaminations transversales lors d'un arrivage de nouveaux individus en éclosérie. C'est pourquoi nous avons traité les géniteurs au début du conditionnement. Cela a permis d'une part, d'abattre la charge bactérienne et, d'autre part, de débiter l'expérience avec une charge équivalente entre les géniteurs. Le deuxième traitement antibactérien, appliqué au milieu de la période de conditionnement, a permis quant à lui de garantir le bon déroulement de la gamétogénèse pour toutes les conditions étudiées. Nous parlons ici d'utilisation raisonnée de produits chimiques, car nous n'avons appliqué que deux traitements de faible durée à l'aide de l'antibiotique le plus efficace sur la flore bactérienne associée aux individus conditionnés. En effet, les antibiotiques à spectre large sont à proscrire des élevages, car ils peuvent favoriser l'émergence de flores bactériennes résistantes (Karunasagar *et al.*, 1994, Willingham *et al.*, 1996, Akinbowale *et al.*, 2006, Cordero *et al.*, 2012) et certains peuvent avoir de graves conséquences sur la santé humaine (Hanekamp *et al.*, 2003). Le chloramphénicol par exemple est responsable de certains cas de dégénérescence médullaire, *i.e.* de la destruction de la moelle osseuse, mais également de cas importants d'apparition de souches résistantes de bactéries (Lupin, 2009). En aquaculture, ce phénomène de résistance peut s'étendre largement par les rejets d'eaux usées dans le milieu naturel et par l'alimentation humaine (Sapkota *et al.*, 2008). Dans

notre cas les antibiogrammes ont révélé que la flore bactérienne associée aux animaux était plus sensible à l'érythromycine. D'après le dictionnaire Vidal (2014) cet ne provoque pas de maladies graves chez l'Homme chez qui il est fréquemment utilisé afin de traiter des infections mineures. Il est également utilisé régulièrement en médecine vétérinaire. Ainsi, dans notre étude, nous préconisons le retrait du sédiment lors du conditionnement comme mesure majeure de prophylaxie et nous n'avons utilisé que 12 jours de traitement antibiotique sur 56 jours de conditionnement. Ces améliorations ont permis de diminuer considérablement l'utilisation d'antibiotiques tout en réduisant la contamination des stades larvaires précoces, mais également d'améliorer la survie des larves 15 jours après fécondation. Les élevages ont été suspendus au début de la phase d'exotrophie stricte des larves afin de limiter l'influence des facteurs environnementaux comme la qualité des microalgues notamment, sur les performances larvaires.

Chez les pectinidés élevés en eau stagnante, les traitements larvaires ont lieu tous les deux jours jusqu'à la métamorphose. Si nous prenons l'exemple d'une écloserie expérimentale en Bretagne, où ont été réalisées les expériences présentées dans cette thèse, les antibiotiques sont généralement utilisés sur la coquille Saint-Jacques à 8 ppm (mg L^{-1}) dans des enceintes de 150 L à 10 larves ml^{-1} . Cela ramène à 12 g d'antibiotique la quantité nécessaire pour l'élevage d'un million de larves. En restant en France, l'écloserie commerciale du Tinduff traite de manière journalière ses élevages à l'aide 8 ppm d'antibiotique dans des enceintes de 450 L à 10 larves ml^{-1} . Cela revient à utiliser deux fois plus d'antibiotiques pour élever un million de larves, soit 24 g. Les résultats acquis dans le chapitre 1 ont nécessité 48 g d'érythromycine afin de conditionner 15 individus. Considérant une fécondité moyenne de 10 millions d'œufs par femelle et un taux d'obtention de larves-D moyen de 20 %, cela revient à utiliser 3,2 g d'antibiotique pour élever un million de larves.

Des traitements courts et ciblés sur les larves

Un traitement court de deux jours a été appliqué sur les larves-D provenant de géniteurs conditionnés sans sédiment. Celui-ci a, certes, réduit la contamination bactérienne des larves en fin d'expérience, mais sans aucune répercussion sur le taux de survie larvaire. Les bactéries les plus sensibles à l'érythromycine ayant disparu suite au traitement des géniteurs, la réalisation d'antibiogrammes sur des prélèvements de gonades, avant l'induction des pontes, aurait pu nous indiquer que les bactéries présentes possédaient une sensibilité différente à cet agent chimique. Ainsi, à l'avenir il serait judicieux d'utiliser un antibiotique ciblé sur la flore bactérienne des gonades quelques jours avant les pontes.

En parallèle des résultats principaux de cette thèse, nous avons pu tester, dans un premier temps, l'efficacité d'un traitement unique durant l'embryogenèse à l'aide d'un antibiotique ciblé (Figure 24), et dans un deuxième temps l'efficacité de traitements antibiotiques de courtes durées appliqués après l'obtention de larves-D (Table 6).

Traitement ciblé durant l'embryogenèse

L'objectif de cette première expérience consistait à couper la transmission de bactéries des œufs émis vers les larves D. Cette méthode pourrait être applicable lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser les techniques de prophylaxie décrites pour les expériences du chapitre 1. Cette idée part du principe que durant les deux jours d'incubation nécessaire à l'embryogenèse, la présence de sperme, d'œufs non fécondés et de bactéries associées peut favoriser les proliférations de ces dernières (Gruffydd et Beaumont, 1970, Helm *et al.*, 2006). Dans cette expérience, nous avons réalisé des antibiogrammes à partir d'échantillons de gonades prélevés sur des géniteurs conditionnés en éclosérie commerciale, dans du sédiment. L'érythromycine est apparue comme ayant le plus fort impact sur la flore bactérienne des produits sexuels des animaux testés. Nous avons ainsi pu vérifier l'influence de cet antibiotique ciblé, du chloramphénicol (largement utilisé dans la littérature : Robert *et al.* (1996), Torkildsen *et al.* (2000), Campa-Córdova *et al.* (2006)) et

de l'absence de traitement sur le déroulement de l'embryogenèse (Figure 24) et sur la survie des larves durant la totalité de l'élevage afin de tester l'efficacité des traitements à plus long terme (Figure 25).

D'une manière générale, cette étude démontre que l'application d'antibiotiques pendant les 48 h suivant la fécondation ne perturbe pas le développement des larves-D. En effet, les pourcentages d'obtention de larves-D ainsi que les pourcentages de larves-D présentant des malformations sont similaires entre les trois conditions testées et se rapprochent des taux présentés dans la littérature (Gruffydd et Beaumont, 1970, Le Pennec *et al.*, 2003). Ces larves élevées par la suite en séquentiel, dans des béciers de 5 L, ont conduit à des taux de survie statistiquement différents (Figure 25). En effet, les larves n'ayant pas reçu de traitement antibiotique et celles ayant été en présence de chloramphénicol sont mortes au bout de 18 jours de développement, alors que les larves élevées après l'application d'un antibiotique ciblé ont atteint le stade de compétence. Toutefois leur taux de survie en fin d'élevage larvaire était faible (10 %). Cette valeur est loin d'être optimale, mais elle pourrait être due à la qualité intrinsèque des larves, de la nourriture et/ou des conditions générales sous-optimales des élevages en petits volumes. L'unique traitement de 48 h à l'érythromycine à une concentration de 8 ppm pourrait nettement réduire les quantités d'antibiotiques utilisées lors des élevages de *P. maximus* en séquentiel. Ces résultats sont encourageants, mais sont néanmoins issus d'analyses exploratoires à utiliser avec prudence, même s'ils pourraient s'appliquer à des élevages en séquentiel et en flux ouvert.

Traitements ciblés et de courte durée durant le développement larvaire

L'objectif était ici de démontrer que l'application de traitement unique de courte durée ou la répétition de traitements brefs durant toute la période d'élevage pouvaient être des solutions permettant de réduire l'utilisation d'antibiotiques dans les éclosiers appliquant l'élevage séquentiel. Des antibiogrammes réalisés à partir de prélèvements de gonades, ont montré que la fluméquine présentait les meilleurs résultats d'abatteurs de la flore bactérienne. Cinq conditions différentes étaient étudiées : un témoin sans antibiotique, deux

jours de traitement (J2-J4) au chloramphénicol d'une part et à la fluméquine d'autre part, un traitement continu à la fluméquine pendant toute la phase larvaire et un traitement discontinu (deux jours sur six) jusqu'à la métamorphose (voir Annexe I, Tableau 1). Aucune différence n'a pu être observée entre toutes les conditions que ce soit en termes de survie, de compétence à la métamorphose et même de fixation. Les larves de ce lot ne nécessitaient donc pas de protection antibactérienne pour se rendre jusqu'à la fixation. Ces travaux dont les résultats sont présentés dans le chapitre 4 ont été présentés en septembre 2012, lors du congrès international Physiomar12 en Espagne, mais ne font pas l'objet d'une publication.

LIMITES ET AVANTAGES

La méthode de conditionnement de géniteurs sans sédiment mériterait d'être généralisée car elle permet de maintenir un plus faible niveau de développement bactérien. Combiné aux élevages en flux ouvert, qui limitent également les proliférations bactériennes tout au long de la période d'élevage grâce au renouvellement d'eau permanent, elle devrait garantir un environnement plus sain et plus stable. Finalement, la sélection d'un antibiotique basé sur la flore bactérienne présente dans les gonades quelques jours avant la ponte permettrait non seulement de réaliser des traitements courts sur les stades larvaires précoces, mais pourrait aussi être utilisée comme traitement préventif avant la mise en élevage.

L'absence du sédiment permettrait de limiter les pertes de nourriture lors du conditionnement. En effet, celui-ci agit comme un filtre dans le milieu d'élevage, l'eau chargée en microalgues s'insinuant dans les interstices et réduisant grandement la disponibilité en nourriture. Ainsi, afin d'obtenir un environnement présentant une même quantité de nourriture disponible, estimée par la concentration de microalgues en sortie de bac, il a été nécessaire d'apporter 20 % de plus de microalgues aux géniteurs conditionnés avec sédiment.

Bien que les résultats du chapitre 1 n'aient été confirmés que sur une période courte de 15 jours d'élevage larvaire en environnement statique, ceux-ci restent néanmoins encourageants. Il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires afin de vérifier l'influence du mode de conditionnement des géniteurs se poursuit jusqu'au terme des élevages larvaires. Le conditionnement et la réalisation des élevages qui en découlent nécessitent une production d'algues importante et requièrent l'utilisation d'infrastructures spécifiques sur une longue période de temps. Un partenariat avec une éclosérie commerciale serait souhaitable afin de corroborer notre méthode sur toute la période de développement larvaire dans un contexte commercial.

LA SENSIBILITÉ DES LARVES AUX CONDITIONS D'ÉLEVAGE

DES BESOINS DIFFÉRENTS SELON L'ESPÈCE CULTIVÉE

Les larves de pectinidés sont reconnues pour être, de manière générale, difficiles à élever en milieu contrôlé (Helm *et al.*, 2006; Robert et Gerard, 1999). La technique en flux ouvert utilisée chez les ostréidés avec les bassins en forme de flûte (Gonzalez-Araya *et al.*, 2012a) aurait pu être une solution aux mortalités récurrentes. Suite aux échecs enregistrés lors des tests préliminaires avec ce système, il est clair que la maîtrise de la flore bactérienne des larves élevées en milieu contrôlé ne peut pas être la seule solution à l'amélioration des performances larvaires en flux ouvert. Pour des espèces aussi sensibles que les pectinidés la lutte contre un agent stressant, quelle que soit l'origine, aura certainement un coût énergétique majeur pour les larves, ce qui n'est peut-être pas le cas pour des espèces plus résistantes (ostréidés, mytilidés). Il semble que la tolérance des larves de bivalves aux variations du milieu différerait d'une espèce à l'autre (Calabrese et Davis, 1970). Ceci pourrait être relié aux niches écologiques occupées par ces espèces. Par exemple, les ostréidés vivent en zones intertidales caractérisées par un environnement variable et doivent lutter contre des variations de température et de salinité de grandes amplitudes ainsi que des conditions hydrodynamiques très turbulentes. En revanche, des

espèces vivant plus en profondeur comme la coquille Saint-Jacques ne subissent pas de conditions environnementales aussi variables lorsqu'elles atteignent leur site de recrutement. Des différences dans le rythme d'alimentation et de digestion des adultes ont déjà été mises en évidence entre pectinidés et ostréidés (Mathers, 1976). Ces résultats nous amènent à suggérer que la diversité des comportements des adultes en lien avec leur physiologie se retrouve également au niveau larvaire et pourrait expliquer, au moins en partie, les variations interspécifiques observées. Pour assurer le succès des écloséries de pectinidés, il est donc nécessaire d'étudier toutes les sources potentielles de stress dans les élevages en flux ouvert afin de garantir aux larves un milieu favorable. En conditions optimisées, les larves auraient suffisamment d'énergie pour lutter contre l'apparition sporadique de conditions stressantes, comme une contamination bactérienne opportuniste par exemple. Lorsque les larves de pectinidés doivent lutter contre un stress environnemental et une contamination bactérienne, comme nous l'avons observé en flûte de 5 L ou dans le chapitre 2 (conditions de bullage), cela nécessite une grande quantité d'énergie qui génère des mortalités massives. Beaucoup de travaux se sont penchés sur l'optimisation du régime alimentaire des larves de pectinidés et notamment chez notre espèce cible, *P. maximus* (Marty *et al.*, 1992, Delaunay *et al.*, 1993, Robert *et al.*, 1994b, Soudant *et al.*, 1998a, Soudant *et al.*, 1998b, Gagné *et al.*, 2010). Ces études ont permis de définir un régime a priori adapté au développement de cette espèce. Toutefois, il est nécessaire que les larves se développent dans un environnement optimal afin qu'elles soient en mesure d'assimiler cette nourriture. Nos résultats suggèrent qu'en conditions trop turbulentes (bullage), l'alimentation n'est pas possible. Concernant les paramètres physico-chimiques, il existe de nombreux travaux sur l'impact de la température, de la salinité et du pH sur le développement larvaire et/ou la métamorphose (Andersen *et al.*, 2011). Mais, en flux ouvert l'influence des paramètres purement physiques tels que l'hydrodynamisme et la turbulence à l'intérieur des enceintes jouent un rôle qui a été peu étudié à ce jour chez les larves de bivalves. Par exemple, il est très difficile pour un organisme de se défendre contre une contamination bactérienne, pouvant provenir de l'alimentation par exemple, si il est déjà affaibli par des conditions d'élevage inadéquates. La production axénique de

microalgues est difficilement réalisable pour des élevages larvaires intensifs. Ainsi, il y aura toujours une quantité de bactéries pouvant être introduite dans les systèmes d'élevage par la nourriture, et donc une potentielle source de contamination externe supplémentaire pouvant être exacerbée par de mauvaises conditions d'élevage. C'est pourquoi les travaux de cette thèse ont cherché à déterminer l'impact des paramètres d'élevage en flux ouvert sur la physiologie larvaire. Les flûtes de 5 L utilisées par Gonzales-Araya *et al.*, 2012a sont caractérisées par un rapport surface sur volume (S/V) élevé (0.585), un renouvellement d'eau important (un bac par heure) et la présence de bullage permettant l'homogénéisation de la nourriture dans la colonne d'eau. Dans les chapitres 2 et 3 nous nous sommes intéressés à chacun des paramètres suspectés d'être responsable des fortes mortalités des larves de *P. maximus*.

LE BULLAGE : PLUS DOMMAGEABLE QUE PROFITABLE

Le bullage est un paramètre principalement utilisé dans les élevages en séquentiel afin d'homogénéiser le milieu et de favoriser la rencontre entre les larves et leur nourriture (Utting et Spencer, 1991). Mais on peut se demander jusqu'à quel point la présence de bullage est nécessaire ? Le chapitre 2 démontre clairement que pour notre modèle d'étude, le bullage a un effet négatif sur le développement larvaire. Ces résultats obtenus en eau stagnante prouvent que des turbulences inférieures ou équivalentes à celles retrouvées dans les flûtes de 5 L empêchent les larves de s'alimenter correctement, provoquant un retard de croissance puis la mort rapide des individus. L'analyse de la variation du métabolisme énergétique face à ce stress physique montre que celui-ci est accéléré en présence de bullage, ce qui se traduit par des besoins énergétiques accrus. Physiologiquement, cela pourrait suggérer que les larves sont contraintes de nager en permanence pour compenser la perturbation de ce système turbulent (Gregg et Bergersen, 1980). Allouant leur énergie à la nage et réduisant drastiquement leur alimentation, elles sont donc vouées à mourir d'épuisement. De plus, Gregg et Bergersen (1980) suggèrent que de telles turbulences favoriseraient les chocs entre individus ce qui amplifierait l'effet négatif du bullage sur la

survie larvaire. Pourtant, de fortes turbulences sont souvent utilisées pour favoriser le développement larvaire de certaines espèces de bivalves, particulièrement au moment de la fixation. C'est le cas chez plusieurs espèces comme : *Potamocorbula amurensis* (Crimaldi *et al.*, 2002), *Mytilus edulis* (Pernet *et al.*, 2003) et *Ilyanassa obsoleta* (Fuchs *et al.*, 2004). L'avantage que trouvent ces espèces à être élevées en présence de bullage est présenté comme une adaptation permettant aux larves de se disperser et de se fixer dans des milieux côtiers très dynamiques (Fulchs *et al.*, 2002). Ces observations rejoignent l'hypothèse citée précédemment d'une sensibilité accrue chez les pectinidés en lien avec les caractéristiques de leur milieu naturel. Les effets mécaniques des turbulences créées par le bullage sur le développement larvaire se retrouvent également lors de son application en flux ouvert. En effet, le chapitre 3 suggère que l'application d'un bullage dans des systèmes en flux ouvert entraîne les mêmes phénomènes physiologiques qu'en séquentiel, provoquant rapidement la mort des larves.

DE NOUVEAUX PARAMÈTRES POUR LE FLUX OUVERT

Le flux d'eau

Dans le chapitre 3 nous avons testé deux effets mécaniques différents liés, d'une part, au renouvellement d'eau en continu et d'autre part, au bullage. La présence d'un flux d'eau crée nécessairement du mouvement dans une enceinte d'élevage, mais grâce à ces résultats nous pouvons constater que les larves présentaient de bons taux de survie (entre $75,7 \pm 5,4 \%$ et $21,0 \pm 8,5 \%$) et de compétence à la métamorphose (entre $29,2 \pm 0,8 \%$ et $5,8 \pm 2,6 \%$). Les flux d'eau utilisés provoquent un écoulement peu turbulent de la masse d'eau et non un mouvement turbulent comme le bullage. De plus, l'observation visuelle du comportement larvaire a permis de constater qu'il était facile de distinguer d'une part, les mouvements passifs horizontaux sous l'effet d'entraînement par le flux et d'autre part, les mouvements verticaux de nage active. Dans un tel environnement, les larves ne s'entrechoquent pas et sont capables de garder leur comportement naturel à l'inverse des

conditions où un bullage est appliqué. Les deux intensités de flux utilisées (12,5 et 25 litres par heure) présentent les mêmes résultats en termes de performances larvaires, mais également du point de vue physiologique. Grâce à l'étude de l'activité de la citrate synthase nous pouvons constater que le métabolisme énergétique des larves ne varie pas avec l'intensité du flux d'eau. Il n'y a pas de dépense énergétique supplémentaire déployée pour lutter contre ce courant peu turbulent à l'inverse de ce qui a pu être observé en présence de bullage (forte turbulence). Les taux de survie enregistrés pour toutes les conditions en flux ouvert présentées dans ce chapitre sont hétérogènes. La survie larvaire en fin d'élevage en enceintes rectangulaires avec un renouvellement de $12,5 \text{ L h}^{-1}$ varie de $75,7 \pm 5,4 \%$ à $21,0 \pm 8,5 \%$ selon les deux lots étudiés. L'échantillonnage fréquent (et donc un tamisage fréquent) des larves pour les analyses biochimiques ainsi que la qualité différentielle entre les lots de larves-D, peuvent être mis en avant pour expliquer ces différences.

Forme de l'enceinte et hydrodynamisme

L'hydrodynamisme à l'intérieur des enceintes utilisées en aquaculture est un élément crucial permettant d'optimiser les conditions d'élevage. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'influence de la géométrie des bacs et à l'intensité du renouvellement d'eau chez les poissons (Cripps et Poxton, 1993, Timmons *et al.*, 1998, Oca *et al.*, 2004, Masaló Llorà, 2008). Ces animaux ont besoin d'une circulation d'eau suffisante pour garantir un niveau de nage approprié au maintien de leur santé. Ils sont également très sensibles aux teneurs en oxygène de l'eau. Un brassage fort et homogène de la colonne d'eau leur garantit donc des conditions optimales de développement. Ces préoccupations sont très différentes de celles liées à l'élevage de larves de bivalves et beaucoup moins d'informations sont disponibles sur l'influence de l'hydrodynamisme sur le développement larvaire de ce groupe taxonomique, la raison principale étant que ces élevages sont encore majoritairement réalisés en eau stagnante. De manière générale en aquaculture, des bacs circulaires sont préférés à des bacs rectangulaires, car ils confèrent une meilleure homogénéisation du milieu grâce à l'absence de zones mortes et ils possèdent une forte

capacité autonettoyante (Masaló Llorà, 2008). Nos travaux ont démontré que les larves de coquille Saint-Jacques présentaient de meilleurs taux de compétence dans des enceintes rectangulaires, ce qui irait à l'encontre des observations faites en piscicultures. Malheureusement les expériences menées dans les chapitres 2 et 3 ne présentent pas de caractérisation précise de l'hydrodynamisme à l'intérieur de chacune des enceintes étudiées. Les turbulences ainsi que la vitesse et l'orientation du flux auraient pu être déterminées grâce à la mesure de la vitesse de déplacement des particules dans la colonne d'eau (Masaló Llorà, 2008) à l'aide de la vélocimétrie par image de particules (PIV en anglais ; Oca *et al.* (2004)) ou de la vélocimétrie Doppler ultrasonore (ADV en anglais ; Fuchs et DiBacco (2011)). Les résultats de Oca *et al.* (2004), proposent une représentation des flux dans une enceinte d'élevage rectangulaire avec une arrivée d'eau située au fond du bac tangentielle à une paroi. Bien que les dimensions de l'enceinte utilisée dans cette étude soient différentes de celles de notre enceinte, la forme (rectangulaire) et la situation de l'entrée d'eau sont similaires (Figure 30).

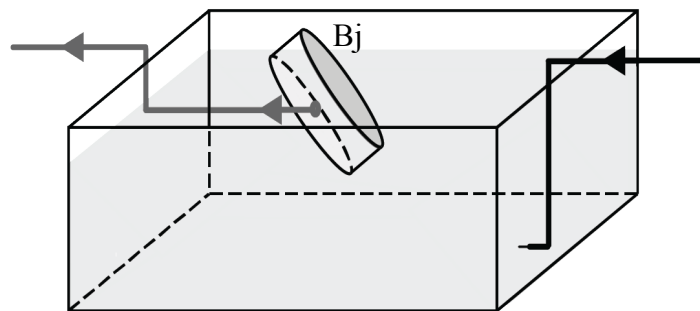


Figure 30 : Représentation schématique des enceintes rectangulaires à fond plat utilisées dans le chapitre 3. **Bj** représente le filtre banjo retenant les larves dans l'enceinte. La flèche noire correspond à l'entrée d'eau et la flèche grise au flux d'eau sortant

Cela signifie que la représentation de la vitesse du flux illustré par la Figure 31 pourrait s'apparenter à l'hydrodynamisme présent dans notre enceinte. Dans cette figure, on constate que le courant est circulaire et qu'il se rapproche des mouvements d'eau

observable en enceintes circulaires. Cela est dû à la présence d'une entrée d'eau unique et en profondeur, et pourrait ainsi expliquer pourquoi la survie larvaire était similaire dans les enceintes circulaires et rectangulaires (chapitre 3). On observe néanmoins des zones où le courant est moins fort au niveau du centre (gyre) et au niveau des angles de l'enceinte. Ces zones pourraient être favorables aux larves de pectinidés qui, à partir du stade véligère, nagent vers la surface à l'aide de leur vélum (Cragg, 1980), mais alternent spontanément entre des épisodes de nage et d'arrêt leur permettant de descendre vers le fond. Avec une configuration circulaire, seule la zone médiane, correspondant au centre de la gyre, serait présente, ne laissant que trop peu de zones de quiétude aux larves. Cette hypothèse pourrait expliquer les différences de compétence à la métamorphose observées en fin d'élevage entre les enceintes circulaires et rectangulaires, suggérant un développement larvaire plus lent en enceintes circulaires.

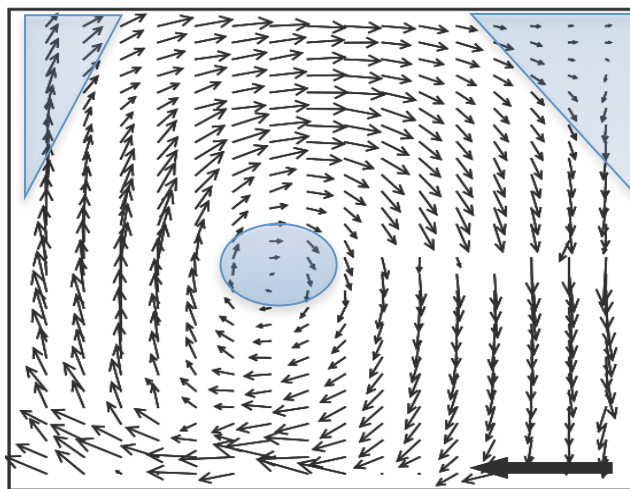


Figure 31 : Représentation de la vélocité d'un flux d'eau entrant latéralement et placé au fond d'une enceinte rectangulaire. Les zones bleues représentent les zones de moindre intensité. (Modifié de Oca *et al.* (2004))

L'importance d'un fond plat

Helm *et al.* (2006) suggèrent de travailler en termes de nombre de larves par unité de surface plutôt qu'en nombre de larves par unité de volume chez les pectinidés à affinité froide. En plus d'un faible hydrodynamisme, la disponibilité de surfaces planes devient une notion à prendre en considération dans le choix d'enceintes destinées à l'élevage larvaire de pectinidés en flux ouvert. Les enceintes circulaires et rectangulaires utilisées dans notre étude présentent des surfaces planes de 2 000 cm² et 2 400 cm² respectivement. Le fond des flûtes de 5 L possède quant à lui une surface de 63 cm². Pour des mêmes densités larvaires utilisées dans ces travaux (10 larves ml⁻¹) cela reviendrait à travailler à 175 larves cm⁻² en enceintes circulaires, 208 larves cm⁻² en enceintes rectangulaires et 793 larves cm⁻² en flûtes. Ces valeurs sont toutes inférieures aux 1 000 larves cm⁻² préconisées par Helm *et al.* (2006), mais travailler à des densités d'élevage proches de 700 larves cm⁻² apparaît clairement problématique. L'utilisation de bacs à fond conique ne permet pas aux larves de se déposer sur le fond sans s'agglutiner les unes aux autres et les forcer par conséquent à nager continuellement. Cela pourrait se traduire par une utilisation excessive d'énergie et des taux de mortalité plus élevés exacerbés par une propagation rapide des bactéries liée à la présence d'individus moribonds. Comparés aux enceintes circulaires de 35 L (S/V = 0,099), aux enceintes rectangulaires de 50 L (S/V = 0,196) et aux flûtes (S/V = 0,585), ces bacs de 3500 L décrits par Magnesen *et al.* (2006) présentent le plus faible rapport S/V, avec seulement 0,020. Afin d'améliorer les performances larvaires, ces derniers ont été contraints d'augmenter drastiquement les volumes d'élevage, de travailler avec des densités larvaires faibles (autour de 1 larve ml⁻¹) et d'appliquer un renouvellement d'eau très faible (un renouvellement par jour), pour finalement obtenir des taux de survie autour de 22 %. Le volume d'élevage semble influencer la survie larvaire chez *P. maximus* car d'autres auteurs ont démontré que des élevages en bacs de 4700 L présentaient de meilleurs résultats qu'en 500 L (Andersen *et al.*, 2000). Bien que ces paramètres semblent relativement moins limitant pour le bon développement des larves, la taille des enceintes et le peu de juvéniles produits rendent cette technique peu optimale. Nous pensons qu'avec

les caractéristiques des enceintes rectangulaires utilisées dans le présent travail il serait possible d'optimiser les rendements de production tout en travaillant à échelle humaine.

LIMITES ET AVANTAGES

Ainsi, même si il reste des améliorations à apporter au système d'élevage décrit dans nos travaux, l'utilisation des enceintes à fond plat, sans bullage, mais avec un taux de renouvellement d'eau garantissant une homogénéisation suffisante de la nourriture semble être une piste d'intérêt. Le faible taux de renouvellement utilisé par le système norvégien (Andersen *et al.*, 2011) permet de limiter la perte de microalgues ce qui présente un avantage certain au niveau commercial. Un meilleur compromis entre flux d'eau et coût de production des microalgues. Pour cela d'autres travaux portant sur les densités larvaires et la calibration plus fixe du flux d'eau restent à explorer en lien avec les améliorations proposées dans cette thèse.

SYNTHÈSE

Grâce à l'étude et à la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la lutte contre le stress des larves en flux ouvert, ce projet de doctorat propose des améliorations à effectuer à différents niveaux du cycle global d'obtention de pédivéligères en milieu contrôlé (Figure 32).

Parmi les principales recommandations issues de ces travaux, nous proposons de retirer le sédiment lors du conditionnement des géniteurs de pectinidés afin d'optimiser la qualité sanitaire des gamètes produits. Les élevages réalisés avec des antibiotiques ciblés par antibiogrammes n'ont pas présentés de variations au niveau des performances en fin d'élevage larvaire malgré une différence statistique après seulement 10 jours d'élevage. Ces résultats nous forcent à rester prudents sur nos conclusions. Il faut également rappeler que l'utilisation du chloramphénicol dans les écloséries commerciales est désormais interdite. Dans cette thèse nous l'avons utilisé comme antibiotique de référence afin de faire le lien

avec les résultats présentés dans la littérature. Nous suggérons que des traitements antibiotiques courts (48 h), ciblés par antibiogrammes, et appliqués uniquement aux stades précoces de développement peuvent être néanmoins utilisés afin de bloquer la contamination bactérienne résiduelle. Cette étape peut être réalisée lors d'élevage en séquentiel, mais également avant des élevages en flux ouvert. Il est également important de préciser que l'utilisation de ces molécules chimiques doit se faire selon la réglementation en vigueur dans le pays concerné.

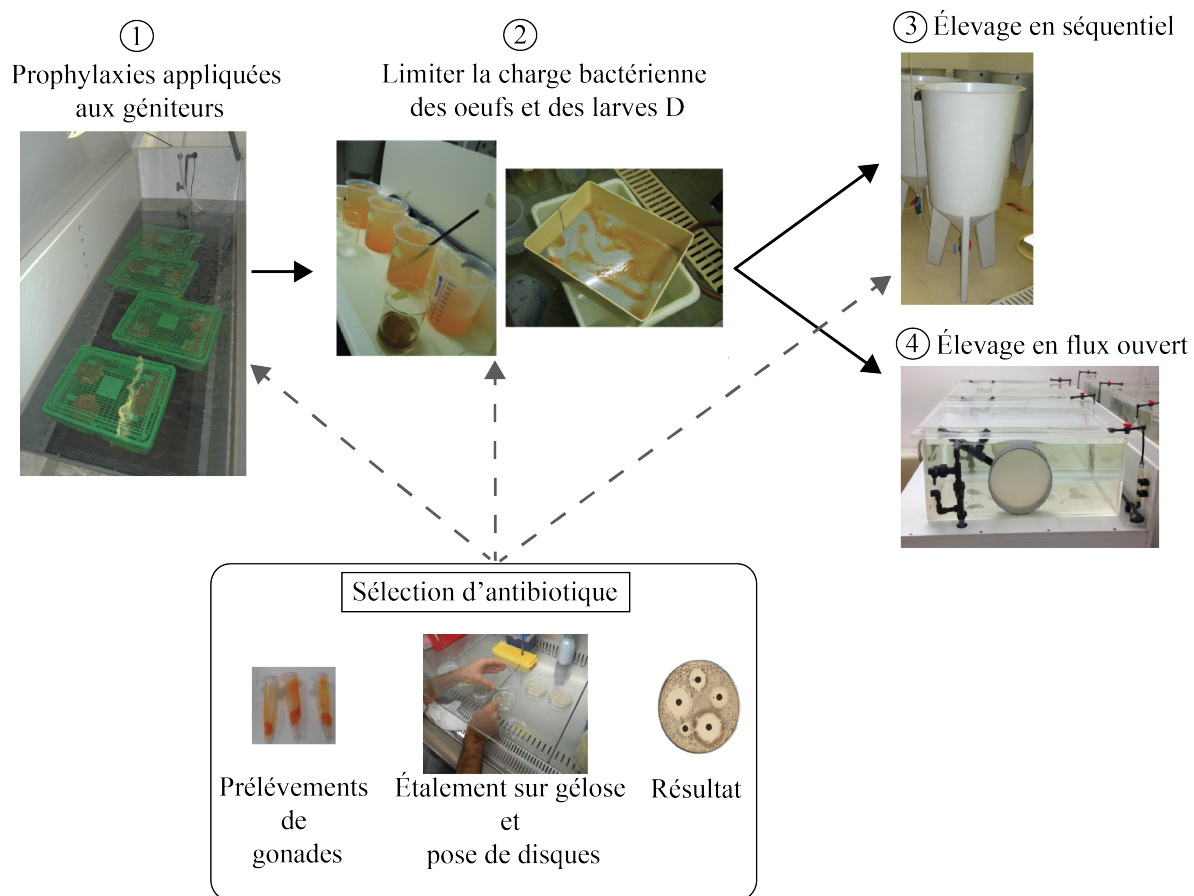


Figure 32 : Schéma bilan présentant les améliorations proposées afin de pallier aux mortalités massives des larves de pectinidés

Enfin, des enceintes rectangulaires à fond plat semblent être une bonne alternative à l'utilisation des flutes de 5 L développées pour les ostréidés. D'une manière générale un bullage important est à proscrire des élevages réalisés à petite échelle, mais l'homogénéisation du milieu peut néanmoins être compensée par un flux d'eau adéquat.

PERSPECTIVES

DES OUTILS PRÉDICTIFS DE LA QUALITÉ DES LARVES POUR LES PROFESSIONNELS

La variabilité des résultats illustrés dans le chapitre 3 et le chapitre 4, reflétant l'hétérogénéité des lots utilisés, démontre comment la qualité intrinsèque des larves agit directement sur les performances d'élevage. Parfois, il n'est pas nécessaire d'utiliser de grandes quantités de produits chimiques pour élever des larves avec succès. Au-delà d'un système d'élevage performant, il est nécessaire de développer des outils prédictifs pouvant permettre aux professionnels de déterminer rapidement la qualité sanitaire et physiologique d'un élevage et lutter ainsi contre les mortalités massives.

Détermination de la qualité sanitaire

L'utilisation des antibiogrammes, la quantification et qualification de la flore bactérienne sont des outils simples et rapides qui peuvent être utilisés en ce sens (Riquelme *et al.*, 1996, Gibson *et al.*, 1998, Prado *et al.*, 2013). En effet, la détermination du meilleur antibiotique à utiliser ne prend que six jours et peut être réalisée avant les élevages. Les suivis de bactéries pathogènes, comme le genre *Vibrio*, sont réalisables grâce à l'utilisation de gélose au Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) permettant de faire pousser sélectivement ces bactéries en seulement deux jours (Azandégbé *et al.*, 2010). Des analyses régulières de la flore bactérienne totale sur gélose à base de « marine agar » permettraient également de suivre l'apparition de proliférations massives. Les traitements antibiotiques

pourraient alors devenir ponctuels plutôt que préventifs et appliqués uniquement lors de l'apparition de *Vibrio*. Dans ce genre de suivi il est préférable d'analyser directement les larves plutôt que l'eau d'élevage, car la détection de pic de bactéries dans l'eau ne sera détectable qu'après la contamination des larves (Wright *et al.*, 1996). En effet, les bactéries se développent préférentiellement sur et dans les larves, qui les relâcheront par la suite dans le milieu, via leur fèces par exemple (Elston et Leibovitz, 1980). Il est toujours nécessaire d'analyser l'eau utilisée pour les renouvellements, afin de vérifier la fonctionnalité des outils de désinfection. Les microalgues doivent elles aussi être suivies sur une base régulière. En effet, un suivi bactériologique, mais également visuel des cultures afin de vérifier d'éventuelles contaminations par des microorganismes, est nécessaire. Présentement, la production stérile de microalgues dans des infrastructures commerciales destinées à l'élevage intensif de larves de bivalves n'est pas envisageable. Il arrive parfois que des ciliés ou d'autres protozoaires contaminent les cultures d'algues en gros volumes. Les larves sont très sensibles à l'intrusion de ces microorganismes qui sont des compétiteurs pour la nourriture. En présence de ces microorganismes, les larves cessent de s'alimenter et l'ajout d'antibiotiques ne serait pas une solution.

Ces recommandations nécessitent l'allocation de temps et de personnel pour réaliser les suivis, mais pourraient permettre la production de juvéniles en limitant l'utilisation excessive d'antibiotiques dans les écloseries travaillant en élevage séquentiel. Le suivi de la qualité de l'eau neuve et de la nourriture est également réalisable pour les élevages en flux ouvert même si l'impact de la dégradation de ces paramètres a des conséquences moins dramatiques qu'en séquentiel. Nous avons vu préalablement que le contrôle de la qualité sanitaire des premiers stades larvaires est également applicable lors d'élevage en flux ouvert afin de s'assurer de la faible contamination des lots et d'administrer un traitement court par balnéation avant la poursuite de l'élevage si nécessaire.

Détermination de la qualité physiologique

La principale réserve énergétique des pectinidés est comme chez la grande majorité des bivalves les lipides (Gallager *et al.*, 1986). L'importance du contenu lipidique et notamment le pourcentage d'AGPI est largement soulignée dans la littérature (Dorange et Le Pennec, 1989, Delaunay *et al.*, 1992, Utting et Millican, 1997, Pernet *et al.*, 2007). Les différentes classes de lipides comprennent des lipides de réserve comme les triglycérides, et des lipides de structure membranaire, comme les phospholipides et les stérols. Une méthode simple de dosage des triglycérides par fluorescence a été validée dernièrement sur les larves d'huîtres, *Crassostrea gigas*. En colorant les triglycérides, il est possible d'estimer le pourcentage de recouvrement dans les larves par analyses d'image microscopique et d'obtenir un indice d'accumulation des triglycérides. Grâce à une calibration réalisée préalablement il est facile d'obtenir une estimation de la concentration en triglycérides en quelques heures seulement. Ces travaux ont démontré une relation linéaire directe chez l'huître entre cette méthode de coloration et les dosages par chromatographie (Ben Kheder *et al.*, 2010a, Ben Kheder *et al.*, 2010b, Ben Kheder *et al.*, 2010c). Des travaux récents réalisés sur le pétoncle géant *Placopecten magellanicus* suggèrent qu'une larve doit accumuler plus de 20 ng de triglycérides au jour 20 pour assurer la métamorphose (Pernet *et al.*, 2003a, Pernet *et al.*, 2006). Il est nécessaire aujourd'hui de pouvoir proposer aux professionnels des outils permettant de déterminer si les larves répondent à ce critère, sans passer par des analyses biochimiques fastidieuses et coûteuses. Cette méthode a été validée avec succès sur les larves *P. magellanicus* grâce à un partenariat avec une éclosérie commerciale québécoise, les Fermes Marines de Québec Inc. (voir Annexe III). Couplé au suivi sanitaire, cet outil pourrait permettre de suivre en temps réel les élevages et d'agir avant que les impacts de carence et/ou de contamination ne soient irréversibles, que ce soit dans un système en flux ouvert ou en séquentiel.

LES AGENTS BIOLOGIQUES DE CONTRÔLE BACTÉRIEN AU SECOURS DE L'ENVIRONNEMENT

L'utilisation d'agents biologiques dans la lutte contre les proliférations bactériennes associées aux élevages larvaires de pectinidés est une bonne alternative à l'utilisation d'agents chimiques. Nous développerons dans cette section deux agents prometteurs : la marennine et les probiotiques.

La marennine

La marennine est un pigment bleu produit par la diatomée *Haslea ostrearia*. Elle est responsable du verdissement des huîtres de claires que l'on peut trouver dans le sud-est de la France. Ce pigment a pu être isolé et produit en grande quantité par Gastineau *et al.* (2014). Ces derniers suggèrent qu'il pourrait être utilisé à titre d'agent de prophylaxie naturel en éclosion grâce à son action antibactérienne. Des études sont en cours de réalisation sur des élevages larvaires de moules et de pétoncles géants afin de valider cette hypothèse et son intégration possible dans les techniques d'élevage en flux ouvert.

Les probiotiques

Les recherches sur les probiotiques se sont développées dans le contexte actuel de productions aquacoles respectueuses de l'environnement (Gatesoupe, 1999, Verschuere *et al.*, 2000). Les probiotiques sont des bactéries qui sont viables dans le système digestif des animaux et qui, par leur présence, améliorent la santé de leur hôte. Leur application dans les élevages de bivalves à haute valeur commerciale a rapidement présenté un grand intérêt dans la lutte contre les infections de bactéries opportunistes en éclosion (Riquelme *et al.*, 1997, Gibson *et al.*, 1998, Riquelme *et al.*, 2000, Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008, Kesarcodi-Watson *et al.*, 2012). L'intrusion de bactéries provenant de l'environnement et de la nourriture peut faire varier rapidement la flore microbienne des bivalves. Les

probiotiques peuvent être ajoutés directement dans le milieu d'élevage ou avec la nourriture. Chez les larves de bivalves, la première solution est la plus fréquemment utilisée. De récentes études réalisées sur des larves de *P. maximus* ont démontré que les souches de *Phaeobacter gallaeciensis*, *Alteromonas macleodi* et *Neptunomonas* sp. semblent nettement améliorer les performances larvaires en eau stagnante (Genard *et al.*, 2014, Kesarcodi-Watson *et al.*, *in press*). Ainsi ces agents biologiques de contrôle de la flore bactérienne peuvent être utilisés dans la lutte contre l'utilisation massive d'antibiotiques dans les élevages en séquentiel. On pourrait également penser que la mise en présence de ces souches bactériennes avec les premiers stades larvaires de *P. maximus* pourrait, par la suite, faciliter l'élevage de cette espèce en flux ouvert. On peut également penser que des traitements courts de deux jours, réalisés en circuit fermé, pourraient permettre le maintien de cette flore bénéfique tout au long de l'élevage larvaire.

LA RECIRCULATION : UNE NOUVELLE GESTION DES SYSTÈMES EN FLUX OUVERT

Nous avons évoqué à plusieurs reprises les compromis auxquels les professionnels doivent faire face pour une utilisation du flux ouvert, en l'état actuel des connaissances. En effet, un renouvellement d'eau important nécessite l'utilisation de grandes quantités d'eau et de microalgues ce qui entraîne des coûts de productions supplémentaires. Ils doivent donc étudier si les gains réalisés en termes de rendements de production de juvéniles sont à minima équivalents aux investissements effectués. Depuis plus de 20 ans, l'élevage en eau recirculée est utilisé dans les piscicultures (Masser *et al.*, 1992, Van Rijn, 1996). Depuis quelques années l'adaptation de cette méthode d'élevage se développe chez les bivalves (Jones *et al.*, 2005, Martins *et al.*, 2010, Garcia et Kamermans, *in press*) et notamment chez les pectinidés que ce soit pour les stades larvaires ou post-larvaires (Christophersen *et al.*, 2006, Merino *et al.*, 2009, Magnesen et Jacobsen, 2012). Ce dispositif est adaptable sur des systèmes en flux ouvert et nécessite l'installation d'un filtre biologique, avec des bactéries autotrophes nitrifiantes et des bactéries anaérobies permettant de gérer la présence de

déchets azotés dans l'eau sortant des enceintes d'élevage (Figure 33). L'utilisation de filtres (tamis) en amont du filtre biologique peut aider à réduire l'introduction trop importante de déchets dans celui-ci. À sa sortie, un filtre UV est nécessaire afin d'inactiver les bactéries et virus avant la redistribution de l'eau. Il est également essentiel d'installer des dispositifs de désaturation permettant d'éliminer le gaz carbonique dans l'eau et la teneur en oxygène dissous peut être ajustée au besoin par injection en amont des enceintes. Cette méthode est souvent utilisée afin de réduire la consommation d'eau et d'énergie, mais elle permet également de contrôler les émissions de déchets (Merino *et al.*, 2009). Elle nécessite un suivi rigoureux des paramètres physico-chimiques de l'eau (température, salinité, oxygène, ammoniacque), mais la présence du biofiltre pourrait permettre l'établissement d'une flore bactérienne stable qui limiterait l'apparition de bactéries pathogènes opportunistes dans l'eau d'élevage (Attramadal *et al.*, 2012, Rurangwa et Verdegem, *in press*). Ainsi cette technique pourrait être développée une fois tous les paramètres d'élevage larvaire en flux ouvert calibrés.

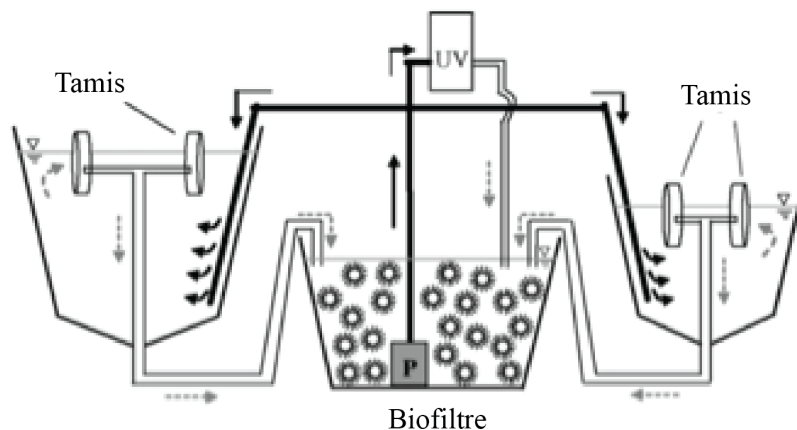


Figure 33 : Schéma d'un système en recirculation utilisé pour les larves d'*A. purpuratus* présentant le biofiltre, la pompe de recirculation (P) et le filtre UV. Les flèches noires représentent le flux d'eau entrant dans le système et les flèches en pointillés le flux d'eau se dirigeant vers le biofiltre (Modifié de Merino *et al.* (2009)).

PAS DE PROGRÈS TECHNOLOGIQUE SANS RECHERCHE FONDAMENTALE

L'optimisation des pratiques d'élevage de pectinidés est certes nécessaire, mais l'amélioration des rendements de production de juvéniles de qualité ne peut se faire sans un appui scientifique. En effet, il reste indispensable d'étendre nos connaissances des mécanismes associés aux problèmes de mortalité. La compréhension de la réponse immunitaire des bivalves face aux pathogènes, le développement des connaissances concernant les principes moléculaires mis en place, ainsi que la détermination de la fonction et l'expression des gènes associés à ces mécanismes se développent grâce à l'apparition de nouveaux outils (Bassim *et al.*, 2014). L'obtention de ces informations pourrait répondre aux interrogations concernant la sensibilité accrue des pectinidés par rapport aux autres groupes de mollusques. Pauletto *et al.* (2014) ont tenté d'identifier les gènes impliqués dans la réponse immunitaire sur des hémocytes et des peptides antimicrobiens produits par des adultes de *P. maximus* en présence de *Vibrio anguillarum*. Comme chez tous les invertébrés, la défense contre les pathogènes chez les mollusques bivalves dépend entièrement du système immunitaire inné. Il est constitué de processus cellulaire et humoral (*i.e.* en lien direct avec l'hémolymphe) qui nécessite la reconnaissance préalable d'un corps étranger. L'immunité humorale est constituée des peptides antimicrobiens, des lysozymes, d'enzymes antioxydantes et de protéines HSP (pour heat shock protein). Tous ces effecteurs sont engagés dans la détection du « non-soi », dans l'activation des cellules immunitaires, dans les mécanismes phagocytaires et dans la production de composés antimicrobiens permettant l'élimination des corps étrangers. L'immunité cellulaire est, quant à elle, composée principalement d'hémocytes circulants aux propriétés phagocytaires et cytotoxiques (Song *et al.*, 2010, Ellis *et al.*, 2011). Dans leur étude, Pauletto *et al.* (2014), ont identifié des séquences du transcriptome codant pour plusieurs HSP, pour des enzymes antioxydantes, mais une seule et unique séquence a été décelée pour les peptides antimicrobiens. Ces auteurs précisent que les espèces considérées très tolérantes aux infections microbiennes, comme *Mytilus galloprovincialis*, possèdent souvent une multiplicité de gènes codants pour différents effecteurs immunitaires. Le cas

de l'unique gène codant pour un peptide antimicrobien, décrit dans cette étude pourrait avoir un lien avec la sensibilité de ces espèces aux pathogènes.

Nos travaux ainsi que ma thèse, s'insèrent dans le projet européen ReProSEED (Research to improve Production of SEED) qui allie recherche fondamentale et appliquée dans le but d'améliorer la production artificielle de naissain. Cette thèse est un exemple renforçant la nécessité de ne pas dissocier ces deux approches même si le but final est de fournir des avancées technologiques dans le domaine de la production artificielle de naissains.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akinbowale, O. L., Peng, H. et Barton, M. D., 2006. "Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia." Journal of Applied Microbiology **100**(5): 1103-1113.

Andersen, S., Burnell, G. et Bergh, O., 2000. "Flow-through systems for culturing great scallop larvae." Aquaculture International **8**: 249-257.

Andersen, S., Christophersen, G. et Magnesen, T., 2011. "Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster." Canadian Journal of Zoology **89**(7): 579-598.

Andersen, S., Christophersen, G. et Magnesen, T., 2012. "Implications of larval diet concentration on post-larval yield in a production scale flow-through system for scallops (*Pecten maximus* ; Lamarck) in Norway." Aquaculture International **21**(2): 435-452.

Andersen, S. et Ringvold, H., 2000. "Seasonal differences in effect of broodstock diet on spawning success in the great scallop." Aquaculture International **8**(2): 259-265.

Anderson, M., Gorley, R. et Clarke, K., 2008. "PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods." Plymouth: Primer-E; 214 pp.

Anderson, M. J., 2001. "A new method for non-parametric multivariate analysis of variance." Austral Ecology **26**(1): 32-46.

Anderson, R. S., Paynter, K. T. et Bureson, E. M., 1992. "Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*." The Biological Bulletin **183**(3): 476-481.

Anonymous, 1994. "Commision regulation (EC). No 2701/94 (1994)." The European Union.

Antoine, L., 1979. "La croissance de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L) et ses variations en mer Celtique et en Manche." Brest, France, Université de Bretagne Occidentale. Ph.D. 140 pp.

Attramadal, K. J. K., Salvesen, I., Xue, R., Oie, G., Storseth, T. R., Vadstein, O. et Olsen, Y., 2012. "Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae." Aquacultural Engineering **46**: 27-39.

Avendaño, M. (1993). "Données sur la biologie de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), mollusque bivalve du Chili. Brest, France, Université de Bretagne Occidentale. Ph.D. 159 pp

Avendaño, M. et Cantilláñez, M., 1996. "Efectos de la pesca clandestina, sobre *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en el banco de La Rinconada, II Region." Ciencias Tec. Marinas **19**(1): 57-65.

Avendaño-Herrera, R., Dekovic, M. et Riquelme, C., 2001. "Establishment of beneficial bacteria in the digestive tract and gonads of adult *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in mass culture." Revista de biología marina y oceanografía **36**: 31-41.

Azandégbé, A., Garnier, M., Andrieux-Loyer, F., Kérouel, R., Philippon, X. et Nicolas, J.-L., 2010. "Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France." Diseases of Aquatic Organisms **91**(3): 213-221.

Barret, J. et Devauchelle, N., 1997. "Contrôle de la gamétogénèse chez la CSJ : température et photopériode." The natural and controlled reproduction of cultivated bivalves in France. Symposium Report IFREMER-Nantes/France, November 14-15, 1995: 127-135.

Bassim, S., Genard, B., Gauthier-Clerc, S., Moraga, D. et Tremblay, R., 2014. "Ontogeny of bivalve immunity: assessing the potential of next-generation sequencing techniques." Reviews in Aquaculture **6**: 63-71.

Ben Kheder, R., Moal, J. et Robert, R., 2010a. "Impact of temperature on larval development and evolution of physiological indices in *Crassostrea gigas*." Aquaculture **309**: 286-289.

Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J. et Robert, R., 2010b. "Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices: Part B: Effects of temporary food deprivation." Aquaculture **308**(3-4): 174-182.

Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J. et Robert, R., 2010c. "Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects." Aquaculture **305**(1-4): 165-173.

Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. et de Vargas, C., 2013. "On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and

the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta)." Journal of Applied Phycology **25**: 1763-1776.

Beninger, P. G. et Decottignies, P., 2005. "What makes diatoms attractive for suspensivores? The organic casing and associated organic molecules of *Coscinodiscus perforatus* are quality cues for the bivalve *Pecten maximus*." Journal of Plankton Research **27**(1): 11-17.

Beninger, P. G., Dwiono, S. A. P. et Pennek, M., 1994. "Early development of the gill and implications for feeding in *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae)." Marine Biology **119**(3): 405-412.

Beninger, P. G., Le Pennek, G. et Le Pennek, M., 2003. "Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L." Biological Bulletin **205**(1): 83-92.

Bergh, Ø. et Strand, Ø., 2001. "Great scallop, *Pecten maximus*, research and culture strategies in Norway: a review." Aquaculture International **9**(4): 305-317.

Berntsson, K. M., Jonsson, P. R., Wängberg, S. A. et Carlsson, A. S., 1997. "Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*." Aquaculture **154**(2): 139-153.

Boucher, J. et Dao, J., 1989. "Chapitre B9: Repeuplement et forçage du recrutement de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*)." L'Homme et les Ressources Halieutiques. Essai sur l'Usage d'une Ressource Commune Renouvelable. Ed. Ifremer. Plouzané: 313-359.

Bourne, N. F., 2000. "The potential for scallop culture - the next millenium." Aquaculture International **8**(2-3): 113-122.

Brand, A. R., 2006. "Chapter 12: Scallop ecology: Distributions and behaviour." *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. S. E. Shumway et J. G. Parsons, Elsevier. **35**: 651-744.

Brokordt, K.B., Nunez, G.A. Gaymer, C.F. 2011. "Improving escape responses of hatchery-reared scallops *Argopecten purpuratus*." Marine Biology **158**: 1311-1318.

Buestel, D., 1979. "The exploitation of the *Patinopecten yessoensis* J. shell in Japan - Application opportunities of the Japanese development model to the French *Pecten maximus* L. species." Journées d'étude "Aquaculture extensive et repeuplement". CNEXO, Actes de Colloques N° :12, 15-32.

Buestel, D., Cochard, J.-C., Dao, J.-C. et Gerard, A., 1982. "Production artificielle de naissain de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.). Premiers résultats en rade de Brest." Vie Marine - Annales de la Fondation océanographique Ricard **4**: 24-28.

Cabello, F. C., 2006. "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment." Environmental Microbiology **8**(7): 1137-1144.

Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G. et Sorgeloos, P., 1999. "The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **123**(1): 97-103.

Calabrese, A. et Davis, H. C., 1970. "Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs." Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen **20**: 553-564.

Campa-Córdova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., Cortès-Jacinto, E., Caceres-Martínez, C.J., 2006. "Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*." Aquaculture **260**, 145-150.

Campa-Córdova, A. I., Luna-González, A., Zarain-Herzberg, M. et Caceres-Martínez, C. J., 2005. "Prophylactic use of antibiotics in larval culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835)." Journal of Shellfish Research **24**(4): 923-930.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. et Pruzzo, C., 2002. "Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves." Microscopy Research and Technique **57**(6): 469-476.

Carmichael, R.H., Walton, W., Clark, H., 2012. "Bivalve-enhanced nitrogen removal from coastal estuaries". Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **69**, 1131-1149.

Casse, N. (1995). "Eléments d'embryologie de *Pecten maximus* (mollusque, bivalve). Brest, France, Université de Bretagne Occidentale. Ph.D. 170 pp.

Chauvaud, L., Thouzeau, G. et Grall, J., 1996. "Experimental collection of great scallop postlarvae and other benthic species in the Bay of Brest: settlement patterns in relation to spatio-temporal variability of environmental factors." Aquaculture International **4**(3): 263-288.

Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G. et Banat, I. M., 2003. "Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean." Aquaculture **219**(1–4): 83-97.

Childress, J. J. et Somero, G. N., 1979. "Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts." Marine Biology **52**(3): 273-283.

Christophersen, G., Torkildsen, L. et 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**(3): 271-282.

Cochard, J. C. et Devauchelle, N., 1993. "Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L.): evidence for the existence of separate stocks." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **169**(1): 41-56.

Cochard, J. C. et Gérard, A. (1987). "Production artificielle de naissain de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) en rade de Brest : analyse des facteurs affectant la croissance larvaire". Sixth International Pectinid Workshop. Menai Bridge U. K. 7 pp.

Comely, C. A., 1972. "Larval culture of the scallop *Pecten Maximus* (L)." Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer **34**(3): 365-378.

Cordero, O. X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T. et Polz, M. F., 2012. "Ecological populations of bacteria act as socially cohesive Units of antibiotic production and resistance." Science **337**(6099): 1228-1231.

Cosper, E., Dennison, W., Carpenter, E., Bricelj, V., Mitchell, J., Kuenstner, S., Colflesh, D. et Dewey, M., 1987. "Recurrent and persistent brown tide blooms perturb coastal marine ecosystem." Estuaries **10**(4): 284-290.

Couturier, C., 1990. "Scallop aquaculture in Canada: fact or fantasy." World Aquaculture **21**(2): 55-62.

Couturier, C., Dabinett, P. et Lanteigne, M., 1995. "Scallop culture in Atlantic Canada." Cold-water aquaculture in Atlantic Canada. A. D. Boghen. Moncton, The Canadian institute for research on regional development: 297-340.

Cragg, S. M., 1980. "Swimming behavior of the larvae of *Pecten maximus* (l) (bivalvia)." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **60**(3): 551-564.

Cragg, S. M., 2006. "Chapter 2: Development, physiology, behaviour and ecology of scallop larvae." *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. S. E. Shumway et J. G. Parsons, Elsevier. **35**: 45-122.

Cragg, S. M. et Crisp, D. J., 1991. "The biology of scallop larvae." *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. S. E. Shumway. Amsterdam, Elsevier: 75-132.

Crimaldi, J. P., Thompson, J. K., Rosman, J. H., Lowe, R. J. et Koseff, J. R., 2002. "Hydrodynamics of Larval Settlement: The Influence of turbulent stress events at potential recruitment sites." Limnology and Oceanography **47**(4): 1137-1151.

Cripps, S. J. et Poxton, M. G., 1993. "A method for the quantification and optimization of hydrodynamics in culture tanks." Aquaculture International **1**(1): 55-71.

Dahlhoff, E. P., 2004. "Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies." Annual Review of Physiology **66**: 183-207.

Dao, J.-C., Fleury, P.-G. et Barret, J., 1999. "Chapter 29: Scallop Sea Bed Culture in Europe." Stock enhancement and sea ranching. B. R. Howell, E. Moksness et T. Svasand, Blackwell Science: 423-436.

Dao, J. C., Barret, J., Carval, J.-P., Connan, J.-P., Corre, C., Devauchelle, N., Fleury, P. G., Laurent, P., Mazuret, M., Miner, P., Mingant, C., Muzellec, M.-L. et Robert, R. (1995a). "La production aquacole de coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) et le soutien scientifique à l'opération pilote". 3e Rencontres Scientifiques Internationales du contrat de baie de la rade de Brest. Brest.

Dao, J. C., Barret, J., Devauchelle, N., Fleury, P. G. et Robert, R., 1995b. "Rearing of scallops (*Pecten maximus*) in France, from hatchery to intermediate culture, results of a 10 years programme (1983-1993)." In: Proceedings of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture, 121-134 "Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species". Gajardo, G. et Coutteau, P. (eds), Impresora Creces, Santiago, Chile.

Davenport, J. C., Black, K., Burnell, G., Cross, T., Culloty, S., Ekaratne, S., Furness, B., Mulcahy, M. et Thetmeyer, H., 2009. "Aquaculture: the ecological issues." John Wiley & Sons. 89 pp.

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. et Samain, J. F., 1992. "Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **163**(2): 209-219.

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. et Samain, J. F., 1993. "The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **173**(2): 163-179.

Devauchelle, N. et Mingant, C., 1991. "Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture." Aquatic Living Resources **4**(1): 41-51.

Dictionnaire Vidal. *La base de donnée en ligne des prescripteurs libéraux, 2014* [En ligne]. <http://www.vidal.fr/substances/1371/erythromycine/> (Page consultée le 26 septembre 2014).

Dorange, G. et Le Pennec, M., 1989. "Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc." *Marine Biology* **103**(3): 339-348.

Duinker, A., Saout, C. et Paulet, Y. M., 2000. "Effect of photoperiod on conditioning of the great scallop." *Aquaculture International* **7**(6): 449-457.

Ellis, R. P., Parry, H., Spicer, J. I., Hutchinson, T. H., Pipe, R. K. et Widdicombe, S., 2011. "Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation." *Fish & Shellfish Immunology* **30**(6): 1209-1222.

Elston, R. et Leibovitz, L., 1980. "Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**(6): 964-978.

Essid, N., Mahmoudi, E., Boufahja, F., Dellali, M., Beyrem, H. et Aissa, P., 2007. "Impact of mussel pseudo-feces on heterotrophic bacteria densities in the mussel farm sector of the Bizerte Lagoon (Tunisia)." *Revue des Sciences de l'Eau* **20**(4): 383-392.

FAO, 2009. "Patinopecten yessoensis. In Cultured aquatic species fact sheets." Rome, Food and agriculture organization of the United Nations. ftp://ftp.fao.org/fi/document/aquaculture/culturedspecies/file/en/en_yessoscallop.htm

FAO, 2014. "The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges." Rome, Food and agriculture organization of the United Nations. 233 pp.

Folch, J., Lees, M. et Sloane-Stanley, G., 1957. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues." *Journal of Biological Chemistry* **226**(1): 497-509.

Fuchs, H. L. et DiBacco, C., 2011. "Mussel larval responses to turbulence are unaltered by larval age or light conditions." *Limnology & Oceanography: Fluids & Environments* **1**: 120-134.

Fuchs, H. L., Mullineaux, L. S. et Solow, A. R., 2004. "Sinking behavior of gastropod larvae (*Ilyanassa obsoleta*) in turbulence." *Limnology and Oceanography* **49**(6): 1937-1948.

Furones, M. D., 2001. "Sampling for antimicrobial sensitivity testing: a practical consideration." *Aquaculture* **196**(3-4): 303-309.

- Gagné, R., Tremblay, R., Pernet, F., Miner, P., Samain, J.-F. et Olivier, F., 2010. "Lipid requirements of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval and post-larval development in relation to addition of *Rhodomonas salina* in diet." *Aquaculture* **309**: 212-221.
- Gallager, S. M., Mann, R. et Sasaki, G. C., 1986. "Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae." *Aquaculture* **56**(2): 81-103.
- Garcia, A. B. et Kamermans, P., 2013. "Optimization of blue mussel (*Mytilus edulis*) seed culture using recirculation aquaculture systems." *Aquaculture Research* (1-10).
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F. S., Arsad, S., Jaouen, P. et Babin, M., 2014. "Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex." *Marine Drugs* **12**(6): 3161-3189.
- Gatesoupe, F. J., 1999. "The use of probiotics in aquaculture." *Aquaculture* **180**: 147-165.
- Genard, B., Laroucher, O., Nicolas, J. L., Miner, P., Beaudin, M.-L. et Tremblay, R., 2014. "Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* (X34) after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*." *Aquatic Living Resources* **27**: 27-34.
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F. et Tremblay, R., 2013. "Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in pacific oyster larvae." *PLoS ONE* **8**(5): e64534.
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D. et Tremblay, R., 2011. "Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*)." *Aquatic Living Resources* **24**: 247-260.
- Gendron, L., Tremblay, R., Belvin, S., Genard, B., Motnikar, S., Côté, J. 2013. "Condition, survival and growth in situ of hatchery-reared stage IV lobster (*Homarus americanus*) fed Artemia and lipid-rich wild zooplankton." *Aquaculture* **416**, 380–389.
- Gérard, A., Salaun, M. et Tritar, S., 1989. "Critères de compétence des larves à la métamorphose chez *Pecten maximus*." *Haliotis* **19**: 373-380.
- Gibson, L. F., Woodworth, J. et George, A. M., 1998. "Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*." *Aquaculture* **169**(1-2): 111-120.

Gifford, S., Dunstan, R.H., O'Connor, W., Koller, C.E., MacFarlane, G.R., 2007. "Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments." Trends in Biotechnology **25**, 60-65.

Glencross et Smith, 2001. "Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*." Aquaculture Nutrition **7**(2): 101-112.

Glencross, B. D., 2009. "Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species." Reviews in Aquaculture **1**(2): 71-124.

Goldberg, R., Pereira, J. et Clark, P., 2000. "Strategies for enhancement of natural bay scallop, *Argopecten irradians irradians*, populations; A case study in the Niantic River estuary, Connecticut, USA." Aquaculture International **8**(2): 139-158.

Gonzalez-Araya, R., Mingant, C., Petton, B. et Robert, R., 2012a. "Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development." Aquaculture **364**: 272-280.

Gonzalez-Araya, R., Lebrun, L., Quéré, C. et Robert, R., 2012b. "The selection of an ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B)." Aquaculture **362**: 55-66.

Gregg, R. E. et Bergersen, E. P., 1980. "*Mysis relicta*: effects of turbidity and turbulence on short-term survival." Transactions of the American Fisheries Society **109**(2): 207-212.

Gren, I.-M., Lindahl, O., Lindqvist, M., 2009. "Values of mussel farming for combating eutrophication: An application to the Baltic Sea." Ecological Engineering **35**, 935-945.

Gruffydd, L. D. et Beaumont, A. R., 1970. "Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia)." Helgoland Marine Research **20**(1): 486-497.

Gruffydd, L. D. et Beaumont, A. R., 1972. "A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory." Marine Biology **15**(4): 350-355.

Guévelou, E., Huvet, A., Galindo-Sánchez, C. E., Milan, M., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Quéré, C., Boudry, P. et Corporeau, C., 2013. "Sex-Specific Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*." Biology of Reproduction **89**(4): 101-115.

Hall, J. M., Parrish, C. C. et Thompson, R. J., 2002. "Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold." The Biological Bulletin **202**(3): 201-203.

Hanekamp, J. C., Frapporti, G. et Olieman, K., 2003. "Chloramphenicol, food safety and precautionary thinking in Europe." Environmental Liability **11**(6): 209-219.

Hardy, D., 1991. "Scallop farming." Great Britain, Blackwell Scientific Publication Ltd. 237 pp.

Heasman, M. P., O'Connor, W. A. et Frazer, A. W., 1996. "Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus*, Reeve." Aquaculture **143**(1): 75-90.

Helm, M. M., Bourne, N. et Lovatelli, A., 2004. "Hatchery culture of bivalves: A practical manual." Rome, FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. FAO.

Helm, M. M., Bourne, N. et Lovatelli, A., 2006. "Écloserie de bivalves: manuel pratique." Food & Agriculture Organisation. 184 pp.

Helm, M. M. et Spencer, B. E., 1972. "The importance of the rate of aeration in hatchery cultures of the larvae of *Ostrea edulis* L." Journal du Conseil **34**(2): 244-255.

Higgins, C.B., Stephenson, K., Brown, B.L., 2011. "Nutrient Bioassimilation Capacity of Aquacultured Oysters: Quantification of an Ecosystem Service." Journal of Environemental Quality **40**, 271-277.

Holbach, M., Robert, R., Boudry, P., Petton, B., Archambault, P. et Tremblay, R., 2015. "Scallop larval survival from erythromycin treated broodstock after conditioning without sediment." Aquaculture **437**, 312-317.

Holbach, M., Miner, P., Boudry, P., Robert, R., Tremblay, R., soumis. "Aeration is a source of stress for great scallop (*Pecten maximus*) larvae." Aquaculture.

Holland, D. L. et Spencer, B. E., 1973. "Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **53**(2): 287-298.

Horvath, T. G. et Crane, L., 2010. "Hydrodynamic forces affect larval zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) mortality in a laboratory setting." Aquatic Invasions **5**(4): 379-385.

Howard, R. W. et Stanley, D. W., 1999. "The tie that binds: eicosanoids in invertebrate biology." Annals of the Entomological Society of America **92**(6): 880-890.

Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H. et Else, P. L., 2005. "Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease." Biological Reviews **80**(1): 155-169.

Jacq, E., Moal, J., Samain, J.-F., Corre, S., Daniel, J., Nicolas, J.-L., Cochard, J.-C. et Fera, P. (1992). "Écologie bactérienne dans les bacs d'élevage larvaire de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*)". Les Mollusques Marins. Biologie et Aquaculture. Ifremer, Actes de Colloques N°14, 5-20.

Jones, J.W., Mair, R.A., Neves, R.J., 2005. "Factors Affecting Survival and Growth of Juvenile Freshwater Mussels Cultured in Recirculating Aquaculture Systems." North American Journal of Aquaculture **67**: 210-220.

Jorquera, M. A., Silva, F. R. et Riquelme, C. E., 2001. "Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)." Aquaculture International **9**(4): 285-303.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R. et Karunasagar, I., 1994. "Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection." Aquaculture **128**(3-4): 203-209.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. et Gibson, L., 2008. "Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes." Aquaculture **274**(1): 1-14.

Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., Asmani, K. et Robert, R., *sous presse*. "Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*." Aquaculture Research.

Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L. et Robert, R., 2012. "Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*)." Aquaculture **344-349**: 29-34.

Kosaka, Y. et Ito, H., 2006. "Chapter 22 : Japan." Developments in Aquaculture and Fisheries Science. S. Sandra E. et P. Jay G., Elsevier. **35**: 1093-1141.

La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A. et Maugeri, T. L., 2004. "Benthic microbial indicators of fish farm impact in a coastal area of the Tyrrhenian Sea." Aquaculture **230**(1-4): 153-167.

Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. et Nicolas, J.-L., 2006. "Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32." Microbes and Infection **8**(12): 2715-2724.

Lacoste, A., Malham, S. K., Gélébart, F., Cueff, A. et Poulet, S. A., 2002. "Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*." Developmental & Comparative Immunology **26**(1): 1-9.

Lambert, C. et Nicolas, J.-L., 1998. "Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*." Journal of Invertebrate Pathology **71**(1): 53-63.

Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V. et Corre, S., 1998. "*Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae." International Journal of Systematic Bacteriology **48**(2): 481-487.

Le Pennec, M., Dorange, G., Beninger, P., Donval, A. et Widowati, I., 1992. "Trophic relationships gonad-intestinal loop in *Pecten maximus*." Société Française de Malacologie **13**: 57-70.

Le Pennec, M., Guguen, F., Cochard, J. C., Paulet, Y. M. et Dorange, G., 1990. "Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, bivalve) et les performances des larves en élevage." Haliotis **10**: 101-113.

Le Pennec, M., Paugam, A. et Le Pennec, G., 2003. "The pelagic life of the pectinid *Pecten maximus*--a review." Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer **60**(2): 211-233.

Le Pennec, M. et Prieur, D., 1977. "Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins." Aquaculture **12**(1): 15-30.

Lepage, G. et Roy, C. C., 1984. "Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification." Journal of Lipid Research **25**(12): 1391-1396.

Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. P. et Toranzo, A. E., 1987. "Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain." Aquaculture **65**(1): 15-29.

Loosanoff, V. L. et Davis, H. C., 1963. "Rearing of Bivalve Mollusks." *Advances in marine biology*. F. S. Russell, Academic Press. **Volume 1**: 1-136.

Lubet, P. E. et Mathieu, M., 1999. "Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves." L'Année Biologique **38**(1): 27-50.

Lucas, J. S. et Southgate, P. C., 2012. "Aquaculture: Farming aquatic animals and plants." John Wiley & Sons. 629 pp.

Luna-González, A., Maeda-Martínez, A. N., Sainz, J. C. et Ascencio-Valle, F., 2002. "Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain." Diseases of Aquatic Organisms **49**(3): 221-226.

Lupin, H., 2009. "Human health aspects of drug and chemical use in aquaculture." The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. B. B. Rogers C. Zaragoza CIHEAM: 95-103.

MacDonald, B. A., Monica Bricelj, V. et Shumway, S. E., 2006. "Chapter 7 Physiology: Energy acquisition and utilisation." Developments in Aquaculture and Fisheries Science. S. Sandra E. et P. Jay G., Elsevier. **Volume 35**: 417-492.

MacGladdery, S. E., Bower, S. M. et Getchell, R. G., 2006. "Chapter 11 : Diseases and parasites of scallops." Developments in Aquaculture and Fisheries Science. S. Sandra E. et P. Jay G., Elsevier. **Volume 35**: 595-650.

MacKenzie, C. L. (1979). "Biological and fisheries data on sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin)." N. F. C. Sandy Hook Laboratory, National Marine Fisheries Service. **19**: 34 p.

Magnesen, T., Bergh, O. et Christophersen, G., 2006. "Yields of great scallop, *Pecten maximus*, larvae in a commercial flow through rearing system in Norway." Aquaculture International **14**: 377-394.

Magnesen, T. et Jacobsen, A., 2012. "Effect of water recirculation on seawater quality and production of scallop (*Pecten maximus*) larvae." Aquacultural Engineering **47**: 1-6.

Mallet, A. L. et Carver, C. E., 2009. "The effect of photoperiod on the reproductive development of the northern bay scallop, *Argopecten irradians irradians*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **374**(2): 128-133.

Mann, R., 1979. "Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures." Journal of Marine Biology Association of the U.K **59**: 95-110.

Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d'Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. "New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability." Aquacultural Engineering **43**: 83-93.

Martinez, G., Aguilera, C. et Mettifogo, L., 2000. "Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock." Aquaculture **183**(1-2): 149-159.

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. et Samain, J. F., 1992. "Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **163**(2): 221-234.

Masaló Llorà, I., 2008. "Hydrodynamic characterisation of aquaculture tanks and design criteria for improving self-cleaning properties". Departament d'enginyeria agroalimentaria i biotecnologia. Castelldefels, Universitat Politècnica de Catalunya. Ph.D. 198 pp.

Mason, J., 1958. "The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L.), in Manx waters." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **37**(3): 653-671.

Masser, M. P., Rakocy, J. et Losordo, T. M., 1992. "Recirculating aquaculture tank production systems." Management of recirculating systems. SRAC Publication **452**.

Mathers, N. F., 1976. "The effects of tidal currents on the rhythm of feeding and digestion in *Pecten maximus* L." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **24**(3): 271-283.

Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d'Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. "New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability." Aquacultural Engineering **43**, 83-93.

Mayr-Harting, A., Hedges, A. J. et Berkeley, R. C. W., 1972. "Methods for studying bacteriocins." Methods in microbiology **7**(A): 315-422.

McKindsey, C.W., Landry, T., O'Beirn, F.X., Davies, I.M., 2007. "Bivalve aquaculture and exotic species: a review of ecological considerations and management issues." Journal of Shellfish Research **26**(2): 281-294.

McKindsey, C. W., Archambault, P., Callier, M. D. et Olivier, F., 2011. "Influence of suspended and off-bottom mussel culture on the sea bottom and benthic habitats: a review." Canadian Journal of Zoology **89**(7): 622-646.

Merino, G., Uribe, E., Soria, G. et von Brand, E., 2009. "A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems." Aquacultural Engineering **40**(2): 95-103.

Meyer, E., Green, A. J., Moore, M. et Manahan, D. T., 2007. "Food availability and physiological state of sea urchin larvae (*Strongylocentrotus purpuratus*)." Marine Biology **152**(1): 179-191.

Miranda, C. D., Rojas, R., Abarca, A. et Hurtado, L., 2013. "Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)." Aquaculture Research **45**(1): 16-30.

Moeser, G. M., Leba, H. et Carrington, E., 2006. "Seasonal influence of wave action on thread production in *Mytilus edulis*." Journal of Experimental Biology **209**(5): 881-890.

- Moran, A. L. et Manahan, D. T., 2003. "Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*." The Biological Bulletin **204**(3): 270-277.
- Moran, A. L. et Manahan, D. T., 2004. "Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **306**(1): 17-36.
- Muller-Feuga, A. et Querellou, J., 1973. "L'exploitation de la coquille Saint-Jacques au Japon." Rapport Scientifiques et techniques du CNEXO **14**: 86 pp.
- Myrand, B., Chevarie, L. et Tremblay, R., 2012. "Benthic spat collection of softshell clams (*Mya arenaria* Linnaeus, 1758) using mats." Journal of Shellfish Research **31**(1): 39-48.
- Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. et Sorgeloos, P., 2003. "Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most?" Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **134**(4): 599-613.
- Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. et Ansquer, D., 1996. "Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture." Diseases of Aquatic Organisms **27**: 67-76.
- Norman, M., Román, G. et Strand, O., 2006. "Scallops : Biology, Ecology and aquaculture. Chapter 20 European aquaculture." Developments in Aquaculture and Fisheries Science. E. S. Sandra et G. J. Parsons, Elsevier. **35**: 1059-1066.
- Nose, T., 1985. "Recent advances in aquaculture in Japan." GeoJournal **10**(3): 261-276.
- Oca, J., Masaló, I. et Reig, L., 2004. "Comparative analysis of flow patterns in aquaculture rectangular tanks with different water inlet characteristics." Aquacultural Engineering **31**: 221-236.
- Parrish, C. C., 1987. "Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by iatroscan flame ionization detection." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **44**(4): 722-731.
- Parrish, C. C., Whiticar, M. et Puvanendran, V., 2007. "Is ω 6 docosapentaenoic acid an essential fatty acid during early ontogeny in marine fauna?" Limnology and Oceanography **52**(1): 476-479.
- Parsons, G. J. et Robinson, S. M. C., 2006. "Chapter 16: Sea scallop aquaculture in the Northwest Atlantic." Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture. S. E. Shumway et G. J. Parsons, Elsevier. **35**: 907-944.

- Paulet, Y. M. et Boucher, J., 1991. "Is reproduction mainly regulated by temperature photoperiod in *Pecten maximus*." Reproduction and Development **19**(1): 61-70.
- Pauletto, M., Milan, M., Moreira, R., Novoa, B., Figueras, A., Babbucci, M., Patarnello, T. et Bargelloni, L., 2014. "Deep transcriptome sequencing of *Pecten maximus* hemocytes: A genomic resource for bivalve immunology." Fish & Shellfish Immunology **37**(1): 154-165.
- Pernet, F., Bricelj, V. M. et Parrish, C. C., 2005. "Effect of varying dietary levels of ω 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **327**(2): 115-133.
- Pernet, F., Pelletier, C. J. et Milley, J., 2006. "Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves." Journal of Chromatography A **1137**(2): 127-137.
- Pernet, F. et Tremblay, R., 2004. "Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **310**(1): 73-86.
- Pernet, F., Tremblay, R. et Bourget, E., 2003a. "Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: Larval growth, competency and settlement." Journal of Shellfish Research **22**(2): 377-388.
- Pernet, F., Tremblay, R. et Bourget, E., 2003b. "Settlement success, spatial pattern and behavior of mussel larvae *Mytilus* spp. in experimental 'downwelling' systems of varying velocity and turbulence." Marine Ecology Progress Series **260**: 125-140.
- Pernet, F., Tremblay, R., Bourget, E. et Roussy, M. (2007). "Optimisation de la diète et de la fixation des larves de pétoncle géant, *Placopecten magellanicus* - Phase 1. MAPAQ." Rapport de recherche-développement n° 156: 19.
- Petton B., Le Souchu, P., Mingant, C., Robert R., 2009. "Small volume flow-through containers for bivalve larval rearing." Aquaculture Europe AE2009, 14-17 August 2009, Trondheim (Norway). Book of Abstracts, 491-492 (affiche).
- Philipp, E. E. R., Schmidt, M., Gsottbauer, C., Sanger, A. M. et Abele, D., 2008. "Size-and age-dependent changes in adductor muscle swimming physiology of the scallop *Aequipecten opercularis*." Journal of Experimental Biology **211**(15): 2492-2501.
- Pillay, T. V. R. et Kutty, M. N., 2005. "Aquaculture: principles and practices." Blackwell publishing. 624 pp.

Prado, S., Dubert, J., da Costa, F., Martínez-Patiño, D. et Barja, J. L., 2013. "Vibrios in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney)." Journal of Fish Diseases **37**(3): 209-217.

Priol, E. (1930). "La coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*), résumé de nos connaissances pratiques sur ce mollusque". The scallop (*Pecten maximus*), summarizes on our knowledge on this mollusc, ISTPM. 3: 143-173.

Pruzzo, C., Gallo, G. et Canesi, L., 2005. "Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components." Environmental Microbiology **7**(6): 761-772.

R Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

Richardson, N., Ruesink, J., Naeem, S., Hacker, S., Tallis, H., Dumbauld, B. et Wisehart, L., 2008. "Bacterial abundance and aerobic microbial activity across natural and oyster aquaculture habitats during summer conditions in a northeastern Pacific estuary." Hydrobiologia **596**(1): 269-278.

Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Lepiver, D., Pouvreau, S., Hamon, M. et Robert, R., 2008. "A flow-through rearing system for ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae." Aquaculture **282**(1-4): 54-60.

Riquelme, C., Araya, R. et Escribano, R., 2000. "Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop." Aquaculture **181**(1-2): 25-36.

Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. et Candia, M., 1997. "Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)." Aquaculture **154**(1): 17-26.

Riquelme, C., Chavez, P., Morales, Y. et Hayashida, G., 1994. "Evidence of a parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)." Biological Research **27**: 129-134.

Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. et Ishida, Y., 1996. "Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios." Journal of Shellfish Research **15**: 369-374.

Riquelme, C., Hayashida, G., Vergara, N., Vasquez, A., Morales, Y. et Chavez, P., 1995. "Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile." Aquaculture **138**: 49-60.

Robert, R., Chretiennot-Dinnet, M.-J., Kaas, V., Martin-Jezequel, V., Moal, J., Le Coz, J. R., Nicolas, J.-L., Bernard, E., Connan, J.-P., Le Dean, L., Leroy, B. et Quere, C. (2004). "Amélioration des productions phytoplanctoniques en écloséries de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage., Ifremer: 144 pp.

Robert, R. et Gerard, A., 1999. "Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France." Aquatic Living Resources **12**(2): 121-130.

Robert, R., Miner, P., Mazuret, M. et Connan, J.-P., 1994a. "Écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspective." Equinoxe **49**: 20-33.

Robert, R., Miner, P. et Nicolas, J. L., 1996. "Mortality control of scallop larvae in the hatchery." Aquaculture International **4**(4): 305-313.

Robert, R., Moal, J., Campillo, M.-J. et Daniel, J.-Y., 1994b. "The food value of starch rich flagellates for *Pecten maximus* (Linné) larvae. Preliminary results." Haliotis **23**: 169-171.

Robert, R., Nicolas, J.-L. et Conan, R., 1998. "Effects of erythromycin and oxolinic acid on *Pecten maximus* larval development." Haliotis **27**: 21-28.

Robert, R., Nicolas, L., Moisan, C. et Barbier, G., 1999. "Morphological and biochemical characterizations of the great scallop *Pecten maximus* metamorphosis." Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie **322**(10): 847-853.

Robert, R. et Trintignac, P., 1997. "Microalgues et nutrition larvaire en écloserie de mollusques." Microalgae and Larval Feeding in Mollusc Hatchery **26**: 1-13.

Ruiz-Ponte, C., Cilia, V., Lambert, C. et Nicolas, J. L., 1998. "*Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*." International Journal of Systematic Bacteriology **48**(2): 537-542.

Ruiz-Ponte, C., Samain, J. F., Sánchez, J. L. et Nicolas, J. L., 1999. "The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae." Marine Biotechnology **1**(1): 52-59.

Rurangwa, E. et Verdegem, M. C. J., 2014. "Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management." Reviews in Aquaculture **5**: 1-14.

Sainz, J. C., Maeda-Martínez, A. N. et Ascencio, F., 1998. "Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842)." Microbial Ecology **35**(2): 188-192.

Sainz-Hernández, J. C. et Maeda-Martínez, A. N., 2005. "Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study." Aquaculture Research **36**(16): 1611-1618.

Samain, J. F., Dégremon, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J. L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T. et Boudry, P., 2007. "Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes." Aquaculture **268**: 227-243.

Sandaa, R.-A., Brunvold, L., Magnesen, T. et Bergh, Y., 2008. "Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten maximus* hatchery." Aquaculture **276**: 14-21.

Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.-M. et Samain, J.-F., 1999. "An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France)." Aquaculture **172**: 301-314.

Sapkota, A., Sapkota, A. R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P. et Lawrence, R., 2008. "Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities." Environment International **34**(8): 1215-1226.

Sarkis, S., Helm, M. et Hohn, C., 2006. "Larval rearing of calico scallops, *Argopecten gibbus*, in a flow-through system." Aquaculture International **14**(6): 527-538.

Sastry, A. N., 1963. "Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning." Biological Bulletin **125**(1): 146-153.

Somero, G. N., 2002. "Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living." Integrative and Comparative Biology **42**(4): 780-789.

Song, L., Wang, L., Qiu, L. et Zhang, H., 2010. "Bivalve Immunity." *Invertebrate Immunity*. K. Söderhäll, Springer US. **708**, 3: 44-65.

Soudant, P., Le Coz, J.-R., Marty, Y., Moal, J., Robert, R. et Samain, J.-F., 1998a. "Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae." Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology **119**(2): 451-457.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. et Samain, J. F., 1998b. "Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus*

(L.)." Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology **121**(3): 279-288.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J. R. et Samain, J. F., 1996a. "Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process." Aquaculture **143**: 361-378.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. et Samain, J. F., 1996b. "Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **205**: 149-163.

Team, R. C. (2014). "R: A Language and Environment for Statistical Computing." from <http://www.R-project.org>.

Timmons, M. B., Summerfelt, S. T. et Vinci, B. J., 1998. "Review of circular tank technology and management." Aquacultural Engineering **18**(1): 51-69.

Torkildsen, L., Coyne, R., Samuelsen, O. B., Magnesen, T. et Bergh, Ø., 2002. "Treatment of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents; searching for an alternative to chloramphenicol." Aquaculture International **10**(5): 399-409.

Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Magnesen, T. et Bergh, Ø., 2005. "Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival." Aquaculture International **13**(6): 575-592.

Torkildsen, L. et Magnesen, T., 2004. "Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) – Survival in different rearing systems." Aquaculture International **12**(4): 489-507.

Torkildsen, L., Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T. et Bergh, O., 2000. "Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae." Aquaculture **185**: 1-12.

Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, F., Quéré, C., Moal, J., Muzellec, M.-L., Mazuret, M. et Samain, J.-F., 2007. "Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*." Aquaculture **262**: 410-418.

Uriarte, I., Farías, A. et Castilla, J. C., 2001. "Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*." Aquacultural Engineering **25**(3): 139-147.

Utting, S. D. et Millican, P. F., 1997. "Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability." Aquaculture **155**: 45-54.

Utting, S. D. et Millican, P. F., 1998. "The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review." Aquaculture **165**: 167-178.

Utting, S. D. et Spencer, B. E. (1991). "The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles". Laboratory leaflet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 68: 31.

Van Rijn, s., 1996. "The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture - a review." Aquaculture **139**(3): 181-201.

Velasco, L. A. et Barros, J., 2007. "Potential for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*." Aquaculture **272**: 767-773.

Veniot, Bricelj et Beninger, 2003. "Ontogenetic changes in gill morphology and potential significance for food acquisition in the scallop *Placopecten magellanicus*." Marine Biology **142**(1): 123-131.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. et Verstraete, W., 2000. "Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture." Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**(4): 655-671.

Walne, P. R., 1966. "Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L." Fishery Investigations. Series II **25**(4): 53pp.

Whyte, J. N. C., Bourne, N. et Hodgson, C. A., 1987. "Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **113**(2): 113-124.

Widman, J. C., 2001. "Manual for hatchery culture of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*." National Marine Fisheries Service, Connecticut Sea Grant College Program. 50 pp.

Widowati, L., Cochard, J.-C., Dorange, G. et Le Pennec, M., 1992. "Étude expérimentale de la maturation ovocytaire chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia)." Experimental study of oocytic maturation in *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). Ifremer, Actes de colloques, N°13, 47-56.

Willingham, E. M., Sander, J. E., Thayer, S. G. et Wilson, J. L., 1996. "Investigation of bacterial resistance to hatchery disinfectants." Avian Diseases **40**(3): 510-515.

Wright, A. C., Hill, R. T., Johnson, J. A., Roshman, M. C., Colwell, R. R. et Morris, J. G., 1996. "Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay." Applied and Environmental Microbiology **62**(2): 717-724.

