



**MISE AU POINT D'UNE METHODE
STANDARDISEE DE STRESS
CHEZ *CRASSOSTREA GIGAS***

Yves-Marie GLEMAREC, Joël HAURE et Jean-Pierre BAUD

**CONTRAT : IFREMER/SECTION CONCHYLICOLE
RE-CENTRE OUEST
Année 1997**



Juin/Décembre 1997

REMERCIEMENTS

Cette étude a été partiellement financée par un contrat entre l'IFREMER et la Section Régionale Conchylicole Ré Centre Ouest pour l'année 1997.

Les auteurs tiennent à remercier :

L'unité IFREMER de pathologie du laboratoire génétique, aquaculture (GAP) de Ronces les Bains.

Messieurs Max Nourry, Hubert Palvadeau et Christian Penisson de la station IFREMER de Bouin pour les participations à la réalisation de cette étude.

Les écloveurs et capteurs professionnels du littoral Atlantique pour leur accueil et la fourniture de naissain nécessaire à la mise au point du stress thermique standard.

Madame Françoise Launay de la station IFREMER de Bouin pour la frappe et la mise en page de ce rapport.

RÉSUMÉ

Cette étude a pour objectif de mettre au point un test standardisé de choc thermique applicable sur le naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*, facile à mettre en œuvre, rapide et de faible coût. Ce test doit permettre d'envisager à terme un transfert de cette technique à la profession ostréicole.

Dans un premier temps, un modèle a été validé afin de prendre en compte le poids moyen, vis à vis du temps d'application du choc thermique en eau douce à 45°C appliqué aux huîtres pour obtenir 50% de mortalité. Il permet de dresser une table de correspondance poids des juvéniles, temps d'application du stress pour une gamme de 10 à 500mg.

La méthodologie retenue pour le stress standard peut être résumée ainsi :

- Tamisage d'une population de jeunes huîtres en trois classes de taille,
- pour une classe de taille, dénombrement de 3 sous lots de 200 individus et stockage du naissain à 13°C pendant 5 jours afin de réguler thermiquement le métabolisme,
- stress thermique effectué sur chaque sous lot à 45°C en eau douce en utilisant le temps de contact défini par l'abaque calculé par le modèle.
- stockage pendant 5 jours à 13°C et dénombrement final de la survie.

Dans un deuxième temps des lots d'origines diverses ont été soumis à la technique standardisée du choc thermique et ont donné les résultats suivants :

- Mise en évidence d'une plus grande variabilité de réponse en terme de pourcentage de mortalité, pour les huîtres d'écloserie par rapport aux huîtres de captage naturel,
- mise en évidence d'une fragilité plus élevée des populations à croissance rapide par rapport aux juvéniles à croissance lente provenant des écloséries,
- variabilité importante des lots à croissance moyenne provenant des écloséries.

Ces premiers résultats ne sont que des tendances qu'il faudra infirmer ou confirmer en multipliant les acquisitions de données à partir des chocs thermiques standards appliqués au naissain de *Crassostrea gigas*.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, stress, choc thermique, mortalité.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I – MISE AU POINT D'UN STRESS STANDARD DU NAISSAIN DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	1
I - A - Introduction	2
I - B - Matériels et méthodes	2
1 – Matériel biologique et conditions d'élevage	2
2 – Méthode générale	3
3 – Hyperthermie en exondation forcée	4
4 – Choc thermique en eau douce	6
5 – Traitement statistique des résultats	6
I - C - Resultats	6
1.- Hyperthermie en exondation forcée	6
2.- Choc thermique en eau douce	8
2.- 1 Mise au point d'un protocole standard	8
2.- 1a La détermination de la température de stress	8
2.- 1b La détermination du nombre et de l'effectif des réplicats	9
2.- 1c Influence du comptage quotidien	10
2.- 1d Suivi de la cinétique de mortalité	10
2.- 1e Description du protocole standard	13
2.- 2 Obtention des données du modèle	13
2.- 3 Etablissement du modèle	18
2.- 3a Influence du poids moyen individuel	18
2.- 3b Influence du temps d'application du stress	20
2.- 3c Description du modèle	21
2.- 3d Courbe de mortalité à 50%	21
2.- 3e Limites hautes et basses autour de 50% de mortalité	23
2.- 3f Récapitulatif de la standardisation du stress	23
I - D - Discussion	25
II – APPLICATION DU STRESS STANDARD A DIFFÉRENTES POPULATIONS DE NAISSAIN DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	27
II - A – Introduction	27
II – B - Matériels et méthodes	27
1 – Prélèvement de l'échantillon	27
2 – Stress à 45°C au bain-marie d'eau douce	28
3 – Suivi de la mortalité	28
II – C - Matériels et méthodes	29
1 – Description des populations	29
2 – Mortalités provoquées par le stress	32
3 – Populations ayant subi des mortalités avant le stress	34
4 – Stress différents sur une même population	35
5 – Suivi de la cinétique d'apparition des mortalités	39
II – D - Discussion	40
CONCLUSION	43
BIBLIOGRAPHIE	44

INTRODUCTION

L'influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la mortalité du naissain de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a fait l'objet d'études préalables (Chiffolleau 1995, Glemarec, 1996) qui ont révélé que la température d'élevage et dans une moindre mesure l'exondation pouvaient avoir une importance sur le déroulement de l'élevage, elles n'ont pas cependant démontré de relation directe entre ces facteurs et la mortalité ou la survie ultérieure du naissain.

D'une manière générale chez les mollusques filtreurs, la quasi-absence de manifestation du comportement traduisant un déséquilibre physiologique d'origine environnementale, nutritionnelle ou pathologique rend difficile la possibilité de prévoir des mortalités souvent brutales et importantes (Baud *et al*, 1997).

Ce travail est donc réalisé dans le cadre de la mise au point d'outils d'appréciation de la rusticité et de la réaction du naissain aux perturbations environnementales, notamment en période estivale, qui peuvent être d'ordre physique (variation de température, turbidité...) chimique (variations de salinité, de saturation en oxygène...) ou biologique (présence de pathogènes, de compétiteurs...).

Pour que cet outil reste simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'analyses complexes, et compte tenu de l'absence de troubles comportementaux visibles chez le naissain d'huître creuse, le critère de réaction aux troubles environnementaux étudié ici est la mort des individus caractérisée par l'ouverture des valves.

Des travaux antérieurs (Glemarec, 1996) ont tenté de standardiser la réaction du naissain à des conditions extrêmes entraînant des mortalités (anoxie, hyposalinité, hyperthermie et hypothermie en exondation forcée, choc thermique en eau douce). Les principaux résultats obtenus mettaient en évidence des problèmes de reproductibilité.

A partir de ces conclusions, cette étude se propose de sélectionner une de ces techniques de stress, puis d'établir un protocole de stress standard qui permette d'obtenir une méthode simple, peu coûteuse, reproductible et robuste, d'appréciation de la rusticité du naissain. L'obtention d'un tel outil standard pourrait ouvrir la voie vers des méthodes de diagnostic de l'état de santé du naissain lors de différentes phases d'élevage ou après différents stress environnementaux, mais aussi vers une caractérisation de populations de naissain présentant une forte rusticité au stress en vue d'une sélection.

Dans un deuxième temps, après la description de la réaction à ce stress en terme de mortalité d'une population de naissain, le protocole établi est testé sur différents échantillons. Cette série d'expérimentations vise à réaliser une première estimation de la reproductibilité et de la robustesse de la technique et également à relativiser la réaction de la population de référence ayant servi à la mise au point de la technique.

I – MISE AU POINT D'UN STRESS STANDARD DU NAISSAIN DE *CRASSOSTREA GIGAS*

I - A - INTRODUCTION

Le but de cette mise au point est d'obtenir une réponse à des conditions de stress standardisées, en terme de mortalité, de naissain de *Crassostrea gigas* de 4mm (T2) à 20mm (T12), qui est la gamme de taille correspondant à la phase de prégrossissement en nurserie, mais aussi à celle de la récolte du naissain naturel.

Cette démarche a été expérimentée sur une population unique de naissain, ce qui a permis de s'affranchir d'une variabilité de réponse inter-origine. Outre la caractérisation des conditions précises dans lesquelles le stress est réalisé, la reproductibilité des résultats et leur robustesse ont été optimisées à des fins de standardisation.

Après les premières expérimentations réalisées en 1996 (Glemarec, 1996), deux types de stress ont été retenus. Ils ont tous les deux en commun la particularité de tester la réaction du naissain à une variation de température selon deux types :

- une hyperthermie en exondation forcée,
- un choc thermique en eau douce.

I - B - MATERIELS ET METHODES

1 – Matériel biologique et conditions d'élevage

Les expérimentations ont été réalisées sur un lot de naissain de *Crassostrea gigas* provenant d'une éclosure, la SODABO de Bouin. Le lot initial, au 5 juin 1997, était d'une taille de 3-4mm (T2) et d'un poids moyen de $7,6 \pm 0,4$ mg (n = 3).

Le contrôle de la croissance de ce lot de T2 (3-4mm) à T12 (>20mm) est permis par la maîtrise de la température d'élevage. Trois régimes thermiques différents sont appliqués selon les performances de croissance désirées.

Pour les périodes de faible croissance (proches de 0,1mg/jour/individu), le naissain est placé dans des bacs cylindriques de 80l munis d'un système d'air-lift permettant le maintien d'un niveau suffisant en O₂.

Ces enceintes sont placées dans une chambre froide à 5°C (figure 1). Le naissain est nourri à raison de $2 \cdot 10^9$ cell/jour/bac avec une culture de *Skeletonema costatum*.

Un système ouvert composé d'un bac dans lequel la température de l'eau de mer est stabilisée à 14/15°C par échange avec de l'eau de forage, puis refroidie par un groupe froid jusqu'à 13°C (figure 2) permet d'obtenir un taux de croissance de l'ordre de 1mg/jour/individu. L'apport phytoplanctonique est assuré par le renouvellement de l'eau de mer.

Lorsque la chronologie des expérimentations demande une croissance plus élevée (de l'ordre de 10mg/jour/individu), le naissain est placé dans des raceways alimentés par de l'eau de mer enrichie et à température ordinaire variant de 15°C à 28°C au cours de la période de l'étude (juin/septembre).

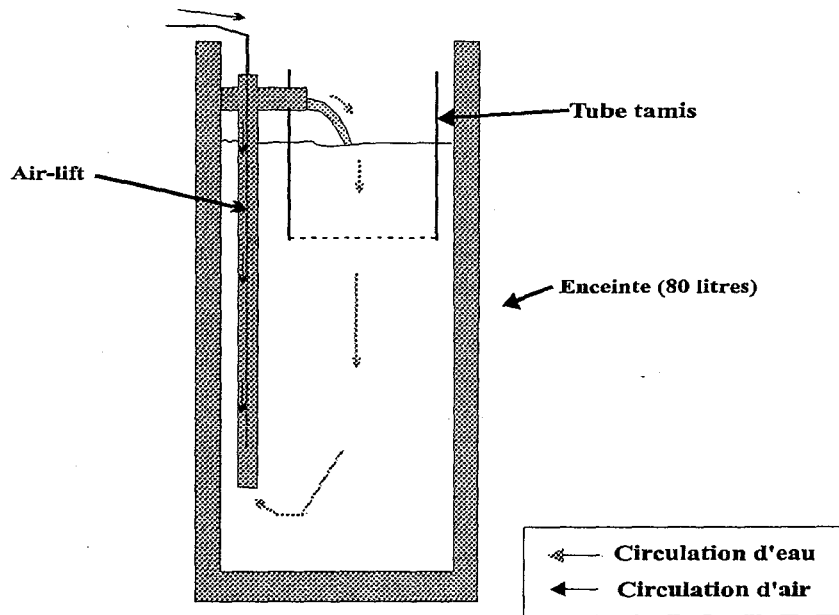


Fig 1. Système d'air-lift en circuit fermé utilisé pour les phases d'élevage en chambre froide à 5°C.

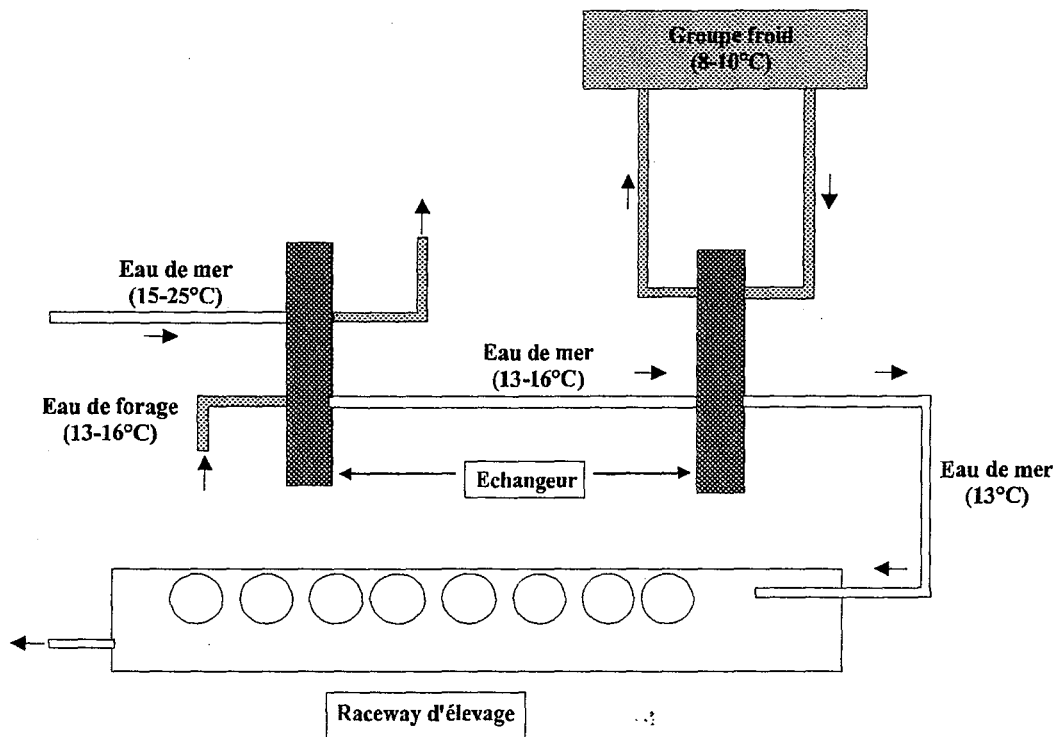


Fig 2. Système en circuit ouvert permettant de stabiliser puis refroidir la température de l'eau jusqu'à 13°C par échange avec de l'eau de forage puis de l'eau transitant par un groupe froid.

2 – Méthode générale

Chacune des expérimentations de stress suit le même protocole :

Le lot principal est tamisé en 3 classes Tn1, Tn2, Tn3, à l'aide d'une gamme de tamis allant de T2 à T12. Le nombre d'individus nécessaire à l'expérimentation est prélevé dans la classe de taille intermédiaire contenant la majorité des individus (Tn2).

Cette fraction est placée en période de "stabilisation" à 13°C pendant 5 jours. Au 6^{ème} jour, le stress est effectué, et le naissain est replacé immédiatement à 13°C. Le dénombrement de la mortalité, qui se traduit par l'ouverture des valves, est ensuite réalisé quotidiennement (figure3).

Chaque fonction est caractérisée par :

n, le tamis sur lequel elle est retenue.

t, la moyenne d'un individu, calculé à partir d'un échantillon de 50 individus.

p, le poids moyen d'un individu, calculé à partir de la pesée de l'ensemble de la fraction.

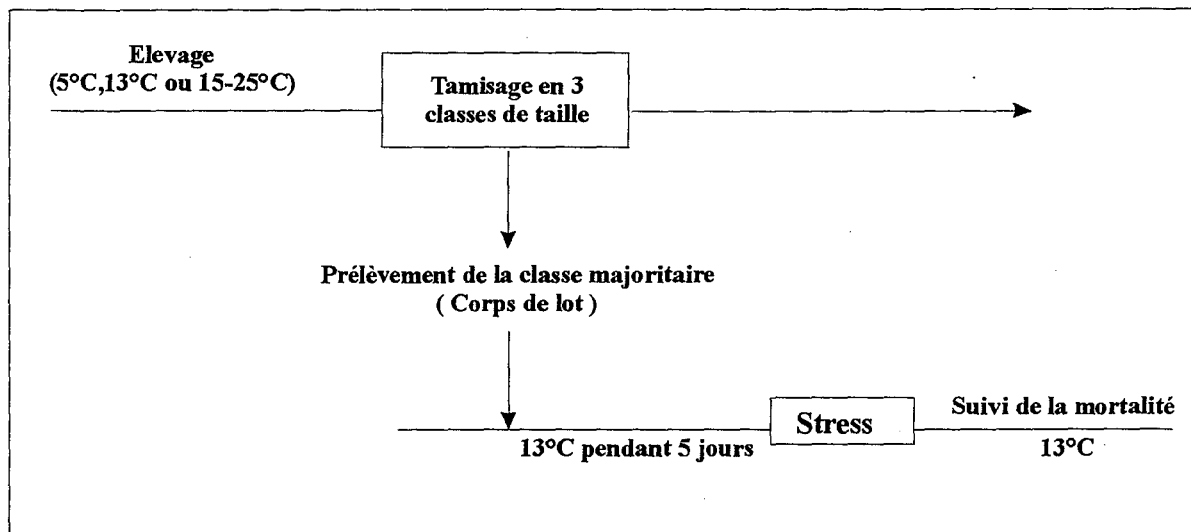


Fig. 3. Déroulement général des expérimentations de stress effectuées sur le naissain de *Crassostrea gigas*.

3 – Hyperthermie en exondation forcée

Chaque fraction après la période de 5 jours à 13°C est placée dans une étuve dont la température est stabilisée 2 heures durant à 35°C. Pour les stress en atmosphère "sèche" (hygrométrie = 25%), le naissain est placé dans un fond de boîte de Petri, et pour les stress en atmosphère "humide" (hygrométrie = 85%) il est placé dans une enceinte étanche dans laquelle la saturation est augmentée par pulvérisation d'eau douce à 35°C, (figure 4).

A la sortie de l'étuve, le naissain est laissé à l'air pendant 15 minutes avant d'être immergé à une température constante de 13°C durant tout le suivi des mortalités.

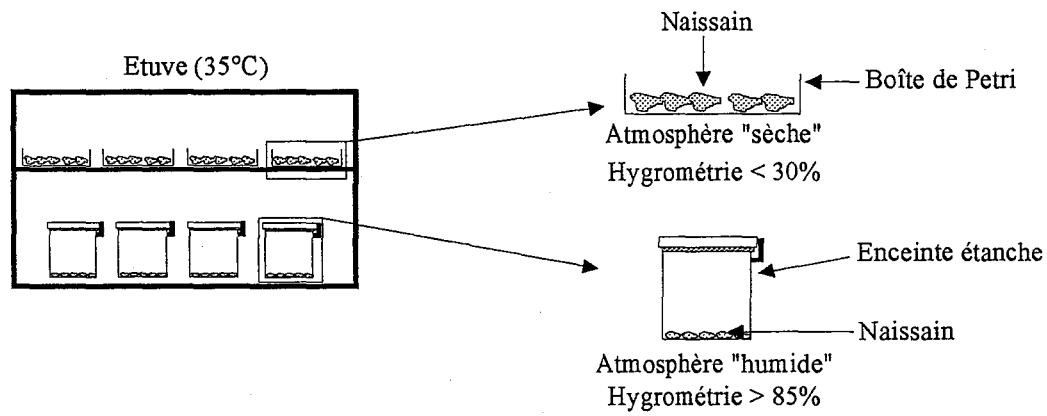


Fig. 4. Schéma descriptif des conditions de stress d'hyperthermie en exondation forcée . Conditions de température et d'hygrométrie contrôlées.

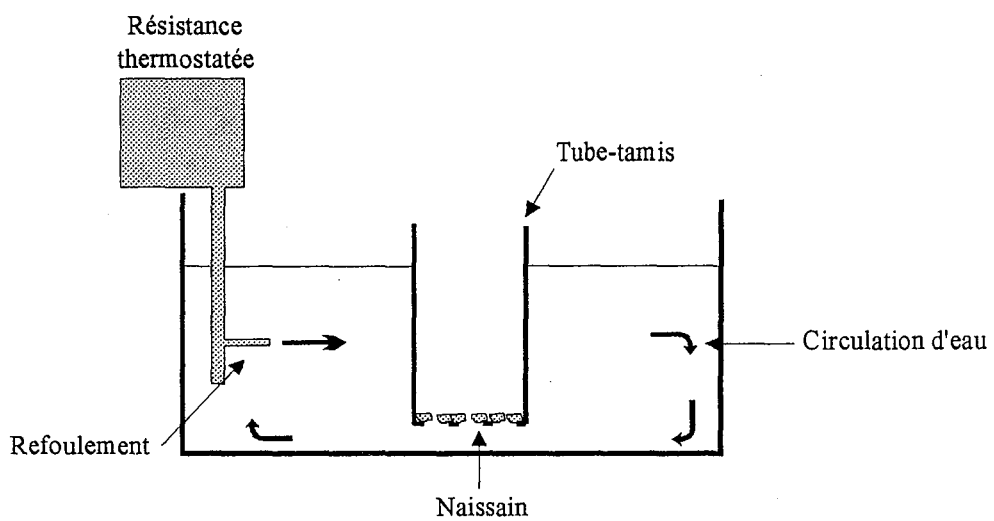


Fig. 5. Schéma du dispositif utilisé pour le stress thermique en eau douce appliqué au naissain d'huître creuse.

4 – Choc thermique en eau douce

La fraction prélevée est placée pendant une période de 5 jours à 13°C dans un tube tamis de 315mm de diamètre.

Au 6^{ème} jour, le nombre d'individus nécessaires à l'expérimentation est compté et placé dans un tube tamis de 200mm de diamètre après pesée.

Le choc thermique est alors réalisé dans un bac de 40litres où de l'eau douce est chauffée et maintenue à température constante par une résistance. La température est contrôlée à $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. L'homogénéité de la température dans ce bain-marie est assurée par la mise en circulation de l'eau à l'aide d'une pompe, (figure 5).

Le stress consiste en l'immersion du tube tamis contenant le naissain dans le bain-marie pendant un temps prédéfini et mesuré à $\pm 0,5$ seconde par un chronomètre. Ensuite le tube tamis est immergé de nouveau à 13°C immédiatement après le stress.

5 – Traitement statistique des résultats

Les intervalles de confiance sont donnés au risque de 5% et sont calculés selon la formule :

$$\text{I.C.95\%} = t(n-1) \times \sigma / \sqrt{n}$$

n est le nombre de données,

t est la valeur du test de Student,

σ est l'écart type de la série de données.

I - C - RESULTATS

1.- Hyperthermie en exondation forcée

Les expérimentations font suite à des résultats antérieurs (Glemarec, 1996) qui ont montré une efficacité de ce type de stress, mais une reproductibilité mal maîtrisée.

Le but, ici, est donc de préciser les conditions (temps de stress, régime hygrométrique) avec lesquelles on peut obtenir des résultats reproductibles pour une mortalité proche de 50%.

Dans une première série d'expérimentations, trois valeurs d'exondation ont été testées (8h, 24h, 32h) ainsi que deux régimes hygrométriques ("sec" = 25% et "humidité" = 85%).

La cinétique d'apparition des mortalités (figures 6a, 6b) montre une différence de comportement après un stress à sec et un stress en atmosphère humide. Pour une même durée d'exondation (32h), la mortalité obtenue 24h après la remise à l'eau est de 57% pour l'exondation à sec alors qu'elle est de 96% pour l'exondation en atmosphère humide. Les mortalités maximales, identiques pour les deux régimes (98% et 100%), sont atteintes également avec un décalage dans le temps (136h et 64h).

Les mortalités maximales atteintes suite aux deux types de stress apparaissent différentes selon le temps d'application (figure 6c). En effet, alors que pour les deux niveaux d'hygrométrie, les stress de 24h et 32h provoquent des mortalités proches de 100%, les stress de 8h sont suivis de mortalités égales à 79% en atmosphère sèche et de 0% en atmosphère humide.

La deuxième série d'expérimentation, réalisée uniquement en atmosphère humide, a pour but de mesurer l'effet de la durée d'exondation de manière plus précise avec le test de 9 durées différentes variant de 8 à 24 heures avec un pas de 2 heures. Les mortalités cumulées,

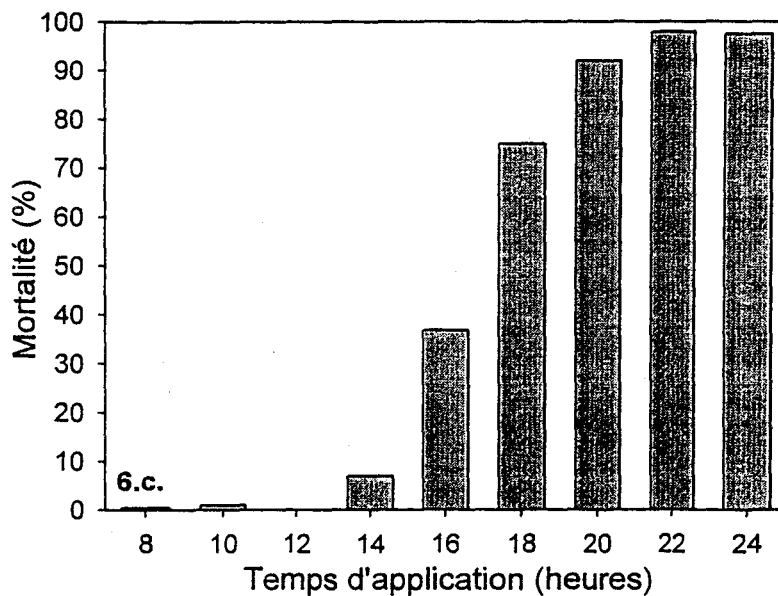
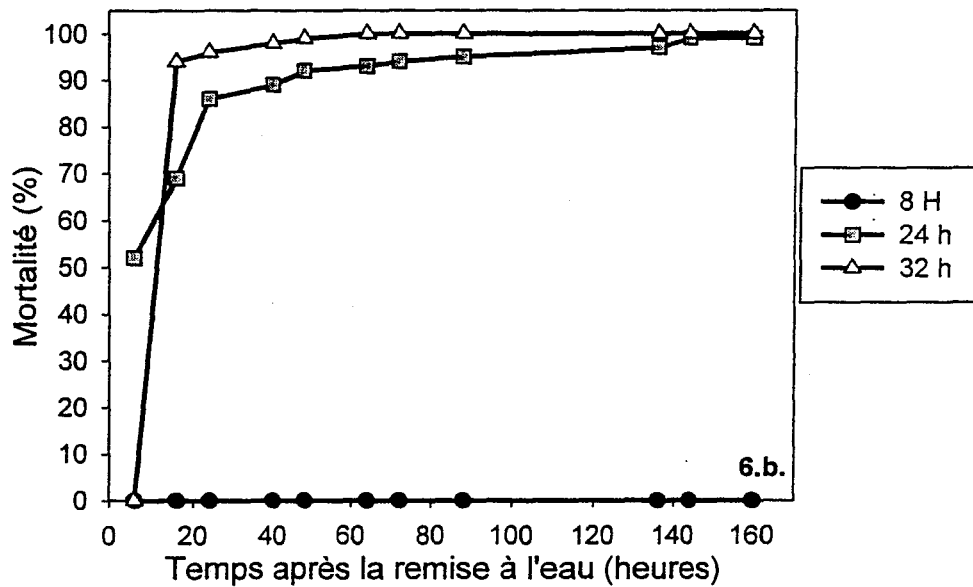
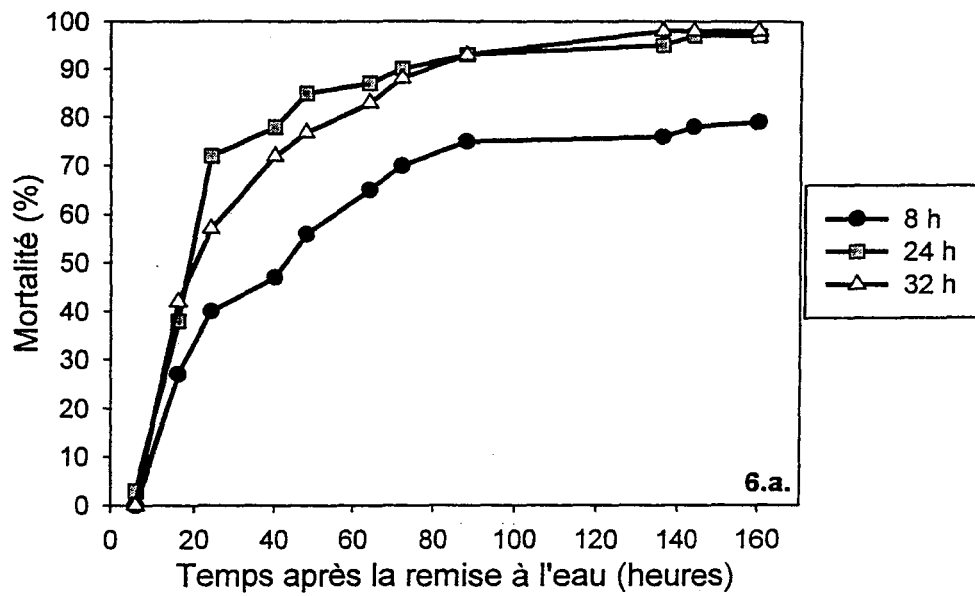


Figure 6. Mortalité (%) dénombrée après un stress en étuve à 35°C, en atmosphère sèche (6.a.), en atmosphère humide (6.b.), en atmosphère humide pendant une durée variable (6.c.).

En revanche, une exondation de plus de 22h provoque 100% de mortalité. La reproductibilité des résultats de mortalité autour de 50% est testée dans une troisième série de stress où 4 temps d'exondation sont appliqués (16, 17, 18, et 19h) avec 4 réplicats de 100 individus. 160h après la remise à l'eau les mortalités cumulées sont de $74,25 \pm 15,5\%$ pour 16 heures d'exondation, $83,5 \pm 12,32\%$ pour 17 heures, $97,25 \pm 6,79\%$ pour 18 heures et $99,75 \pm 0,8\%$ pour 19 heures ($n = 4$).

2.- Choc thermique en eau douce

2-1. Mise au point d'un protocole standard

2.1.a. Détermination de la température de stress

D'après les résultats précédents obtenus avec ce type de stress (Glemarec, 1996), il semble que la mortalité exprimée soit dépendante du couple température de stress/temps d'application du stress. Les températures testées variaient de 50°C à 60°C et les temps d'application de 10 à 40 secondes pour du naissain de 30 mm (T12-T14). Le naissain testé ici étant de plus petite taille (à partir de 4mm (T2)), il est nécessaire de rechercher une température de stress pour laquelle les temps d'application ne seront pas trop courts afin de permettre une bonne discrimination des résultats.

Une série de stress a été réalisée, à partir de différentes températures ($40,45$ et 50°C) pendant différents temps (de 30sec à 480sec). Le tableau 1 montre les taux de mortalité obtenus 7 jours après le stress.

Tableau 1 : Taux de mortalité obtenus 7 jours après un stress en eau douce selon la température ($^{\circ}\text{C}$) et le temps d'application (secondes) pour du naissain de 4mm (T2).

Température ($^{\circ}\text{C}$)	Temps d'application (secondes)							
	30	60	90	120	180	240	360	480
40				2%		4%	9%	9%
45		65%		88%	91%	91%		
50	67%	95%	100%	100%				

Le taux maximal de mortalité obtenu à 40°C est de 9% et correspond à un stress de 480 secondes (8 minutes). A cette température, pour un stress de 120 secondes, le taux de mortalité après 7 jours est de 2% alors qu'il est de 88% à 45°C et de 100% à 50°C . On retrouve ici l'effet combiné du temps d'application (dont l'accroissement augmente la mortalité pour une même température), et de l'intensité du choc thermique (dont le niveau d'application provoque une plus forte mortalité pour des temps identiques).

2.1.b. Détermination du nombre et de l'effectif des réplicats

La validation de cette technique de stress permettant l'appréciation de la rusticité d'une population de naissain est liée à la mesure de sa reproductibilité et de sa robustesse. Il est nécessaire de déterminer l'effort minimal d'échantillonnage de la population testée qu'il faut réaliser pour obtenir un résultat reproductible. La précision de ce résultat permettra de mesurer la robustesse du test.

Une série de stress où varie l'effectif des échantillons (100, 200 et 300 individus) est réalisée sur 4 réplicats. Ces 12 échantillons d'une même population de naissain de 4mm (T2) subissent un même stress à 45°C pendant 90 secondes. Les mortalités (%) relevées pour chacun des échantillons 9 jours après le stress sont données dans le tableau 2. On obtient une moyenne de mortalité de $64,00 \pm 8,71\%$ pour les 4 réplicats de 100 individus et deux moyennes identiques, $81,25 \pm 2,72\%$ et $81,25\% \pm 6,98\%$, pour les réplicats de 200 et 300 individus.

Tableau 2 : Mortalité (%), Moyenne, Ecart-type et Intervalle de confiance à 95% (pour n = 4) 9 jours après un stress à 45°C pendant 90 secondes.

Effectifs des réplicats	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	Réplicat 4	Moyenne	Ecart-type	Int. Conf. 95% (n = 4)
100	70	61	58	67	64	5,48	8,71
200	83,50	80,50	79,5	81,5	81,25	1,71	2,72
300	82,33	86,67	79,67	76,33	81,25	4,99	6,98

Le coefficient de variation (C.V (%)) défini par $C.V. (\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$, où σ est l'écart type et \bar{x} la moyenne, est un indicateur de la reproductibilité des résultats.

Si on considère 2 réplicats, on peut déterminer un coefficient de variation pour ces 2 résultats. Sur l'ensemble des 4 réplicats possédant le même effectif, il existe 6 combinaisons de 2 réplicats parmi les 4. De la même manière il existe 4 combinaisons possibles de 3 réplicats et on peut obtenir la moyenne des coefficients de variation pour 3 réplicats parmi les 4. (figure 7a, 7b).

Les coefficients de variation moyens sont équivalents, pour un même effectif d'échantillon, que l'on considère 2 ou 3 réplicats : respectivement $7,74 \pm 4,21$ et $8,46 \pm 2,41$ pour 100 individus, $1,88 \pm 1,06$ et $2,03 \pm 0,97$ pour 200 individus, $4,89 \pm 2,57$ et $5,24 \pm 2,27$ pour 300 individus (n = 6 pour 2 réplicats, n = 4 pour 3 réplicats).

Un test de comparaison de Student-Newman-Keuls sur les 6 combinaisons de 2 réplicats donne une différence significative entre les coefficients de variation pour 100 et 200 individus ($P < 0,05$). En revanche, la différence est non significative entre les coefficients de variation obtenus pour 200 et 300 individus ($P > 0,05$).

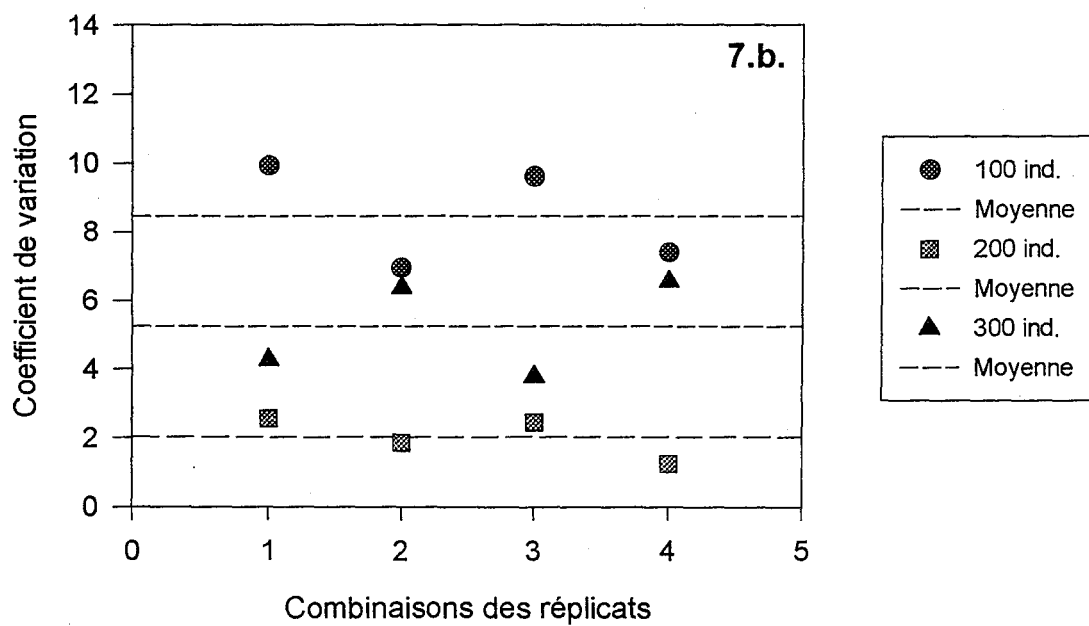
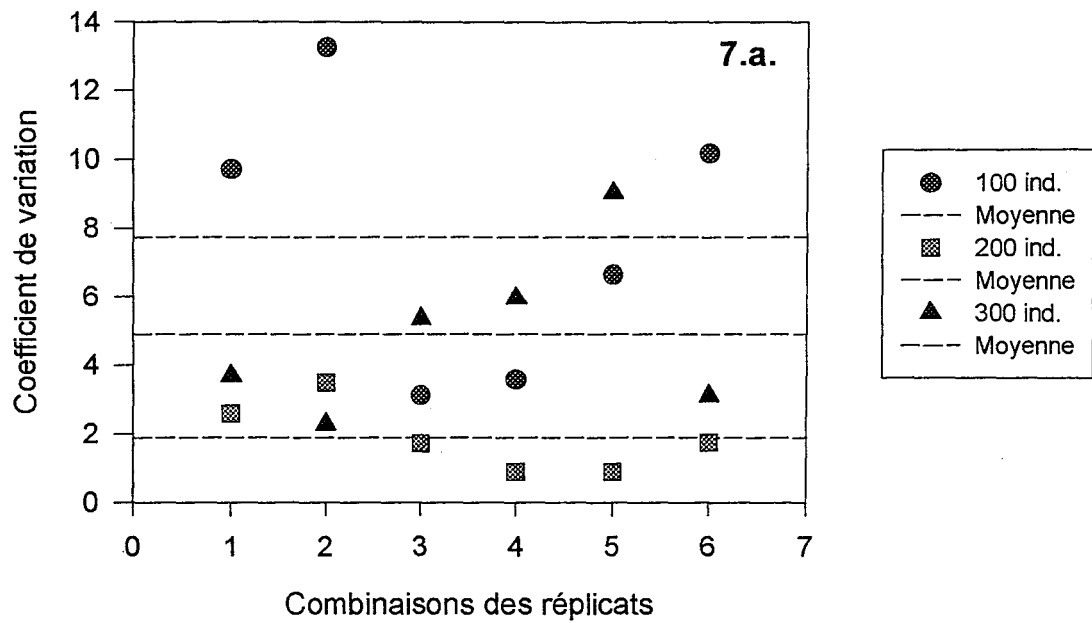


Figure 7: Evolution du coefficient de variation selon l'effectif de 4 réplicats, par combinaison de 2 réplicats (7.a.), par combinaison de 3 réplicats (7.b.).

2.1.c. Influence du comptage quotidien

Après le stress, la remise à l'eau est immédiate, et le dénombrement de la mortalité est quotidien. Après ce dénombrement, les individus morts (ouverture permanente des valves) sont prélevés. Lors d'une série de stress de naissain de 4mm (T2) à 45°C pendant différents temps, 2 réplicats sont soumis à un dénombrement quotidien et deux autres ne sont examinés qu'après 9 jours (Tableau 3).

Tableau 3 : Mortalités (%) observées après un stress à 45°C pendant différents temps selon le type de comptage. Les intervalles de confiance sont donnés pour 95% avec n = 4. Une analyse de variance ne montre pas de différences significatives (P > 0,05) entre les deux types de comptage pour chacun des stress appliqués.

		Stress			
		45°C/90sec	45°C/120sec	45°C/150sec	45°C/180sec
Comptage quotidien (% de mortalité cumulée à 9 jours)	R1	73	87	99	95
	R2	82	87	94	95
	Moy	77,5	87	96,5	95
Comptage unique de mortalité cumulée à 9 jours	R1	68	85	96	94
	R2	74	90	97	98
	Moy	71	87,5	96,5	96
Moyenne globale		71,24 ± 8,32	87,25 ± 3,13	96,5 ± 3,29	95,5 ± 2,13

2.1.d. Suivi de la cinétique de mortalité

Le dénombrement quotidien des mortalités après le stress permet de décrire une cinétique de leur apparition (figures 8a, 8b).

Le pourcentage de mortalité cumulé dans le temps décrit une courbe de type sigmoïde que l'on peut diviser en trois phases. La première est une période pendant laquelle peu de mortalités apparaissent. On atteint 20% de la mortalité totale pendant le 4^{ème} jour pour un stress de 90 secondes et pendant le 3^{ème} jour pour les stress de 120 et 150 secondes. Ensuite, les mortalités sont importantes pendant une deuxième période qui dure 2 à 3 jours. 80% de la mortalité totale est exprimée pendant le 6^{ème} jour pour le stress de 90 et 120 secondes et pendant le 5^{ème} jour pour un stress de 150 secondes.

Après cet épisode de fortes mortalités, on atteint une "phase plateau" où la mortalité cumulée tend vers un maximum.

Une analyse de variance des mortalités cumulées dans le temps donne une différence non significative (P > 0,05) entre les comptages des 8^{ème} et 9^{ème} jours, c'est à dire qu'au 9^{ème} jour, même s'il reste une mortalité résiduelle elle n'influe plus significativement sur le résultat de mortalité observé depuis le stress.

Le pourcentage quotidien de mortalité (figure 8b) évolue dans le temps selon une courbe de type Gaussien. Une régression non linéaire des résultats observés par une équation du type :

$$\text{Pourcentage mortalité} = a \cdot \exp \left[-0,5 \left(\frac{T - T_a}{b} \right)^2 \right]$$

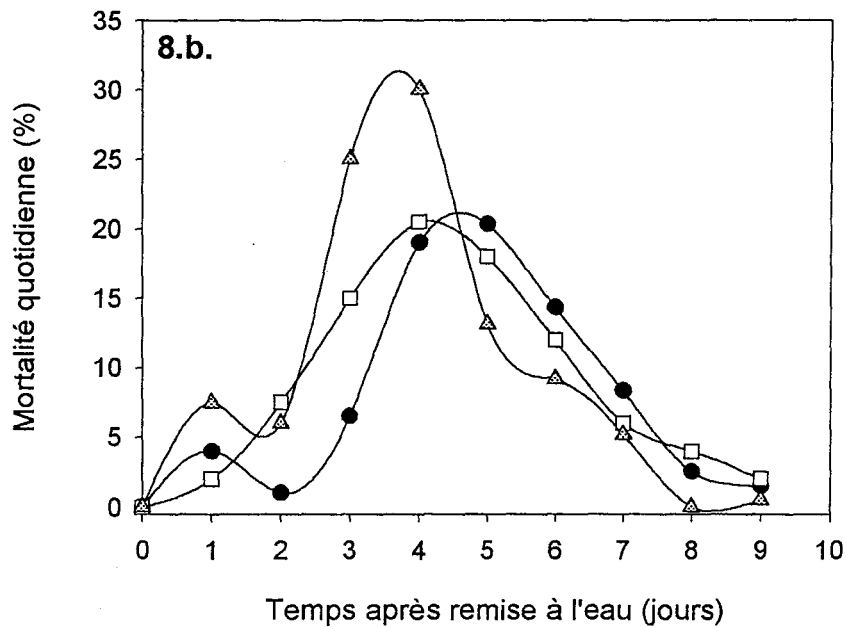
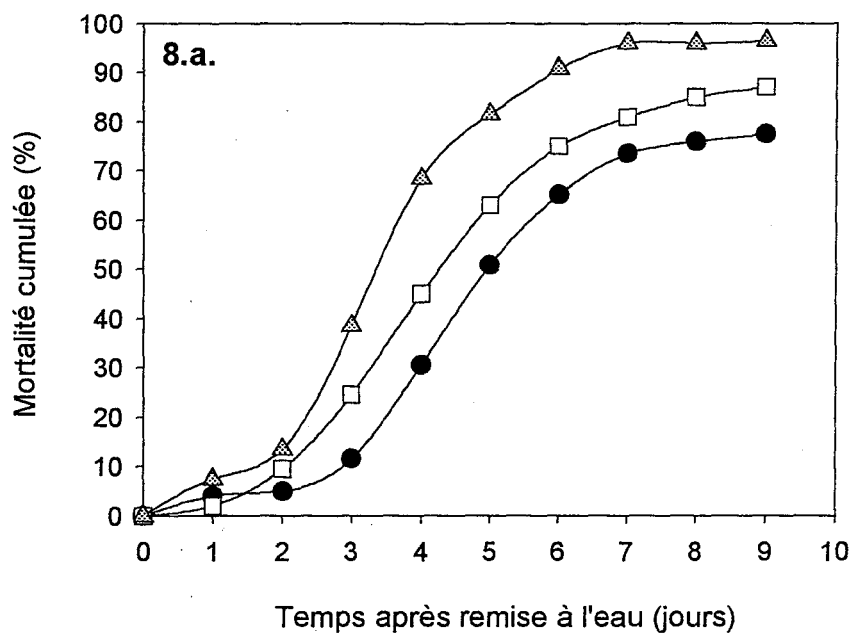


Fig. 8. Cinétique d'apparition de la mortalité (%) après un stress à 45°C pendant différents temps. Mortalité cumulée dans le temps (8.a.), mortalité quotidienne (8.b.). Durée de stress : (○) 90 sec, (□) 120sec., (△) 150 sec..

donne des coefficients de régression (r^2) de 0,95 pour le stress de 90 secondes, 0,98 pour le stress de 120 secondes et de 0,90 pour le stress de 150 secondes. D'après l'équation, quand $T = T_a$ on a pourcentage mortalité = a, qui est le pourcentage maximal de mortalité journalière. Pour cette série de stress, on obtient un maximum de mortalité de 20,82% à 4,92 jours pour le stress de 90 secondes, 20,08% à 4,35 jours pour celui de 120 secondes et 28,62% à 3,77 jours pour le stress de 150 secondes.

2.1.e. Description du protocole standard

La conjugaison des paramètres déterminés lors des expérimentations précédentes permet de définir un protocole standard de stress du naissain.

La température de stress qui semble la plus adaptée est 45°C, ce qui représente un choc thermique de 32°C puisque le naissain est à 13°C avant le stress. En effet, à 40°C, même avec de longs temps d'application (8 minutes) on n'atteint que de faibles taux de mortalités (9%), alors qu'à 50°C la mortalité est de 67%. C'est donc à 45°C que l'on a la meilleure discrimination des mortalités provoquées pour une gamme de temps d'application n'excédant pas 5 minutes (300 secondes).

L'échantillonnage de 3 réplicats de 200 individus semble être l'effort minimal nécessaire à l'obtention de résultats robustes. En effet, les échantillons de 100 individus, présentent un coefficient de variation significativement plus élevé et l'expérimentation effectuée à partir de 4 réplicats ne permet pas de le diminuer.

L'absence d'impact du comptage quotidien sur le résultat final des mortalités permet de suivre la cinétique de leur apparition, mais aussi de réaliser des prélèvements d'individus dont la chair est encore présente et non déliquescence.

Le suivi de la cinétique d'apparition des mortalités permet de déterminer que la mortalité résiduelle qui est déclarée après le 9^{ème} jour n'influe pas de manière significative sur le résultat final.

Les stress qui seront réalisés en vue de modéliser la réaction du naissain de ces chocs thermiques en eau douce répondent donc aux caractéristiques suivantes :

Température : 45°C

Echantillon : 3 X 200 individus de taille homogène

Dénombrement de la mortalité : Quotidien pendant 9 jours ou unique au 9^{ème} jour

2-2. Obtention des données du modèle

Une série d'expérimentation selon le protocole établi a été conduite afin de déterminer la réaction de cette population de naissain à ce type de stress. L'ensemble de ces expériences a abouti à l'obtention des 210 points caractérisés par :

n : la maille de tamis sur laquelle le naissain est retenu

t (mm) : la taille moyenne individuelle dans l'échantillon

P (mg) : le poids moyen individuel dans l'échantillon

T (sec) : la durée du stress à 45°C, appliquée à l'échantillon

M (%) : le pourcentage de mortalité dénombré 9 jours après le stress

Le tableau 4 récapitule les 16 expérimentations réalisées. La taille varie de 4,30 à 21,78 ± 0,19mm ce qui correspond à des tamis allant de T2 à T12 et à des poids s'échelonnant de 12,25 à 863,64 ± 19,33mg (n = 15).

Tableau 4 : Taille (mm), Poids (mg) et durée de stress (sec) pour les 16 expérimentations; (les intervalles de confiance sont données pour n=15).

Tamis	Taille moyenne (mm)	Poids moyen (mg)	Durée appliquées (sec.)
T2	4.30	12.25	60,120,180,240
T2	4.57	14.35	90,120,150,180
T2	4.78	16.15	90
T4	6.56	37.00	90,120,150
T4	7.06 ± 0.09	45 ± 1.46	60,90,120,150,180
T4	7.01 ± 0.12	44.16 ± 1.84	60,90,120,150,180
T6	7.18	47.00	90,120,150
T6	7.7 ± 0.1	56.46 ± 1.91	60,90,120,150,180
T6	7.82 ± 0.07	58.64 ± 1.41	60,90,120,150,180
T8	12.84 ± 0.06	215.85 ± 2.49	60,90,120,150,180
T8	13.2 ± 0.07	232.15 ± 3.01	60,90,120,150,180
T8	13.06 ± 0.07	225.59 ± 3.29	60,90,120,150,180
T8	11.34 ± 0.13	155.88 ± 4.69	60,90,120,150,180
T10	16.46 ± 0.17	414.6 ± 10.79	60,120,180,240,300
T10	16.98 ± 0.09	449.47 ± 6.41	60,120,180,240,300
T12	21.78 ± 0.19	863.64 ± 19.33	60,120,180,240,300

Les durées de stress appliquées sont modulées selon le poids moyen individuel. Pour des poids inférieurs à 400mg la durée maximale testée est de 180 secondes, et elle est de 300 secondes pour les poids supérieurs.

Pour une expérimentation et par durée d'application du stress, on a 3 réplicats de 200 individus. Ainsi, 70 stress ont été testés 3 fois. L'étude de la variabilité dans ces triplets de résultats peut amener à une estimation de la sensibilité de la technique de stress. Les coefficients de variation calculés sur ces 3 réplicats sont répartis de 0% à 173,2% (figure 9). D'après leur répartition, 3 valeurs sont supérieures à 50%. Elles sont de 141,42% et 2 fois 173,21%. Ces valeurs correspondent à des triplets de taux de mortalité de (0; 0,5; 0,5), (6; 3; 0) et (0; 0; 3) pour lesquels la moyenne est faible et accroît le coefficient de variation.

47,14% des coefficients de variation sont inférieurs à 10%, et 20% sont compris entre 10 et 20%. La moyenne des 70 coefficients est de $20,92 \pm 3,30\%$ si on élimine les 3 valeurs supérieures à 50%

L'obtention des données s'est déroulée pendant 14 semaines (3 juin / 5 septembre). La maîtrise de la croissance de la population de naissain étudiée a été réalisée par le contrôle de la température d'élevage avec 3 régimes thermiques (5°C, 13°C, 20°C). Chacune des fractions de la population utilisée pour une série de stress possède un historique d'élevage particulier. La reproductibilité de la technique de stress peut être caractérisée par les résultats de mortalités obtenus sur des échantillons dont le poids et la taille sont du même ordre et dont les variations des températures d'élevage sont similaires (figure 10, tableau 5).

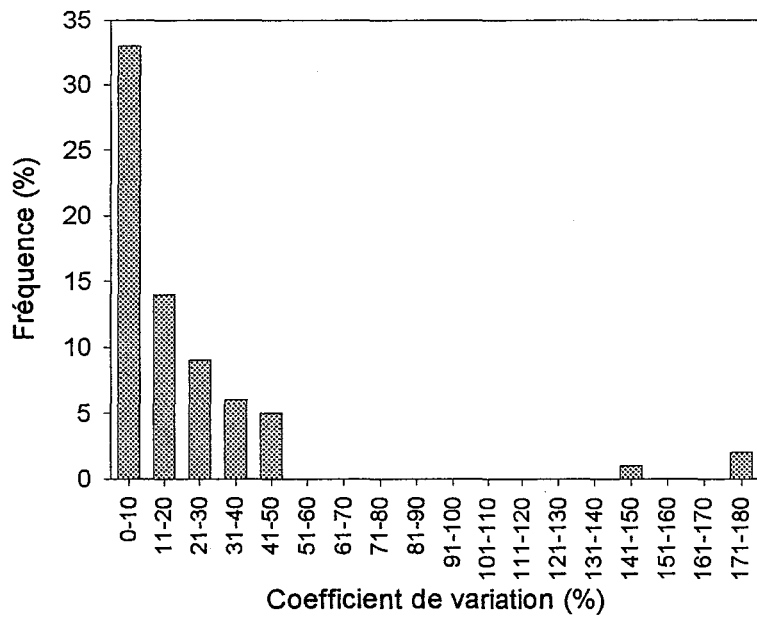


Fig. 9. Répartition des coefficients de variation des 70 triplets de réplicats ayant subi un stress en eau douce à 45°C.

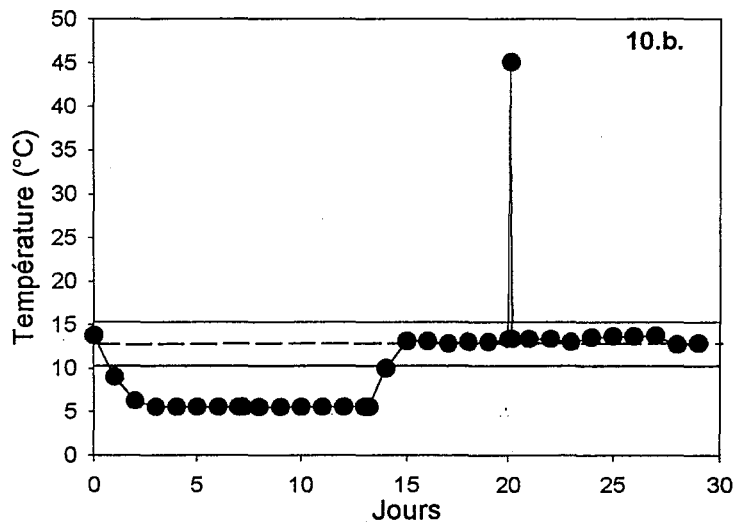
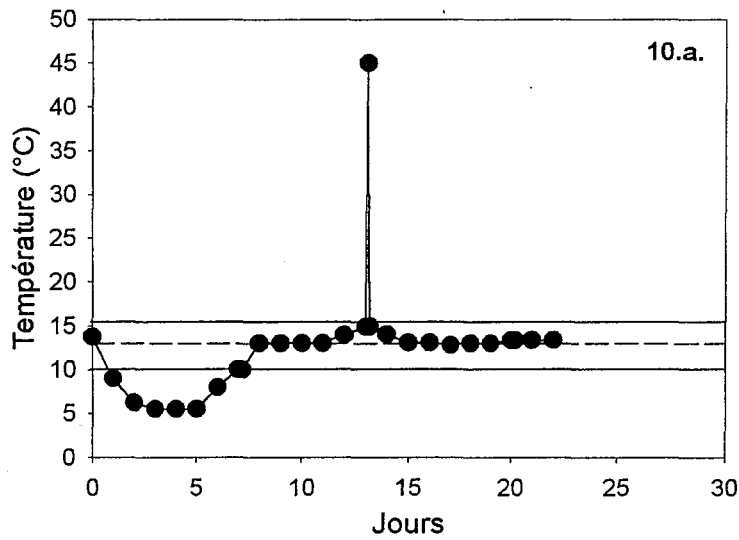


Fig. 10. Evolution de la température d'élevage pour deux échantillons de la population. Échantillon 1: T2 / 12.25mg (10.a.). Échantillon 2: T2 / 14.35mg (10.b.).

Les deux séries de stress comparées ici ont été réalisées sur des fractions de population retenues sur un tamis dont la taille est de 2mm (T2) et ont respectivement une taille moyenne de 4,30mm et 4,57mm et un poids de 12,25mg et 14,35mg.

Le 1^{er} échantillon est prélevé après 3 jours d'élevage à 5°C, et le 2^{ème} après 11 jours à la même température.

Tableau 5 : Mortalités (%) dénombrées 9 jours après un stress à 45°C en eau douce pendant différents temps (sec) sur deux fractions distinctes de la population.

	Durée du stress (secondes)				
	60	90	120	150	180
Série 1	65%		88%		91%
Série 2		74,25%	87,25%	96,5%	95,5%

Les résultats de mortalités pour un stress de 120 secondes sont proches pour les deux séries (respectivement. 88% et 87,25%). Le stress de 90 secondes, intermédiaire entre les stress de 60 et 120 secondes de la 1^{ère} série, provoque 74,25% de mortalités contre 65% et 88%. Pour la 2^{ème} série une mortalité maximale de 96,25% est atteinte avec le stress de 150 secondes, alors qu'elle est de 91% à 180 secondes pour la 1^{ère} série.

En comparant les mortalités obtenues après un même stress sur des échantillons de taille et poids similaires, mais ayant connu des variations de température différentes au cours de l'élevage, la robustesse de la technique et sa capacité à caractériser une population de naissain peuvent être approchées.

La figure 11 représente les profils de variation des températures d'élevage pour 3 échantillons de naissain retenus sur un tamis de 6mm de vide de maille (T6), dont les tailles moyennes respectives sont de 7,18mm; 7,7mm; et 7,82mm et des poids moyens de 47,00mg, 56,46 ± 1,91mg et 58,64 ± 1,41mg (n = 3).

Les trois échantillons ont une première phase d'élevage identique avec une période de 26 jours à 5°C suivie de 7 jours à 20°C. La 1^{ère} fraction est prélevée le jour suivant cette période de croissance. Les deux autres échantillons ont subi respectivement 10 et 17 jours supplémentaires à 5°C.

Les mortalités provoquées par un stress de 120 secondes à 45°C en eau douce pour ces trois fractions sont de 59,33 ± 23,77%; 72,67 ± 27,25% et 76 ± 7,56% (n = 3).

Un stress de 150 secondes sur ces trois même prélèvements entraîne des mortalités de 32,67 ± 37,56%; 88,33 ± 6,37% et 35,17 ± 10,34% (n = 3).

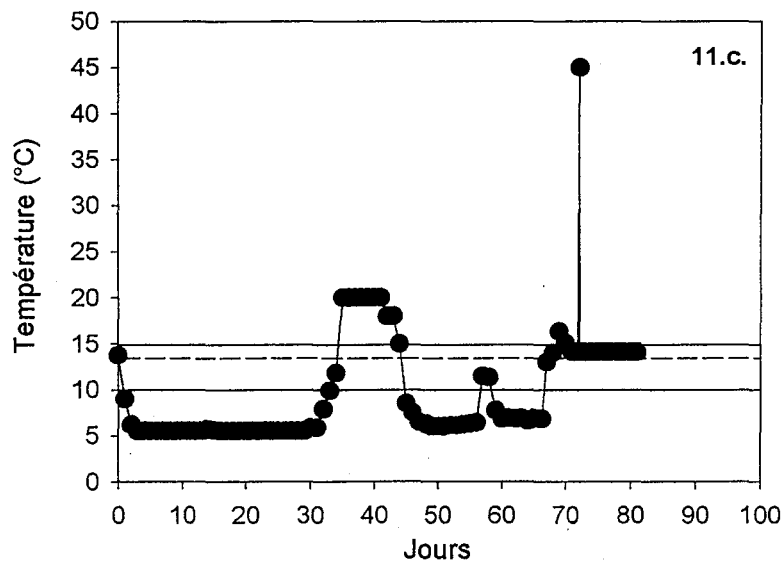
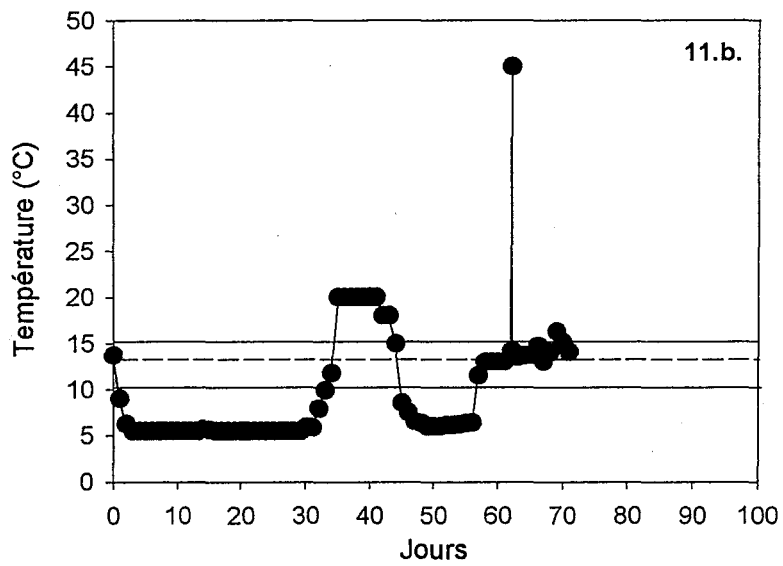
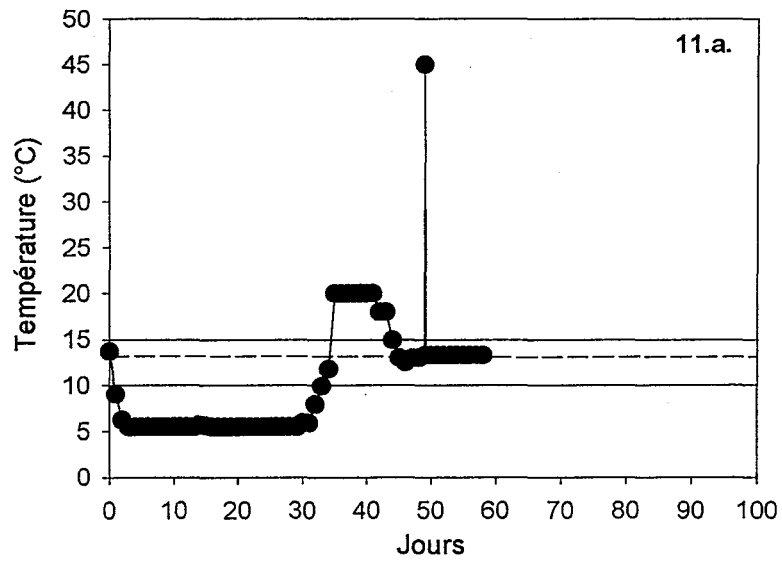


Fig. 11. Evolution de la température d'élevage pour 3 échantillons stressés à 45°C en eau douce. Echantillon 1: T6 / 47.00mg (11.a.). Echantillon 2: T6 / 56.46mg (11.b.) Echantillon 3: T6 / 58.64mg(11.c.).

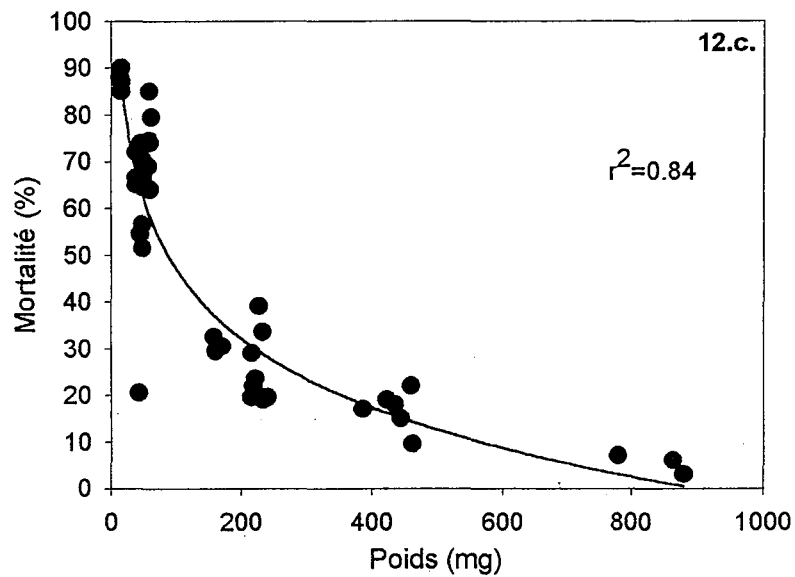
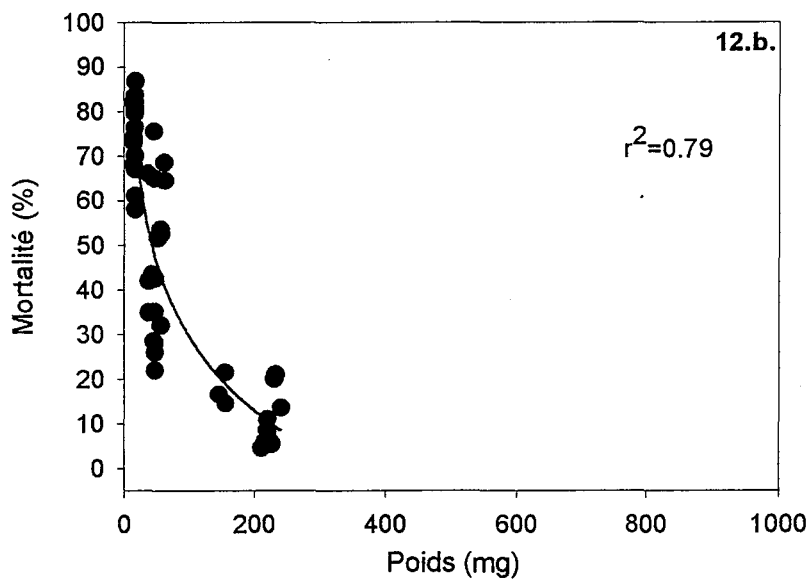
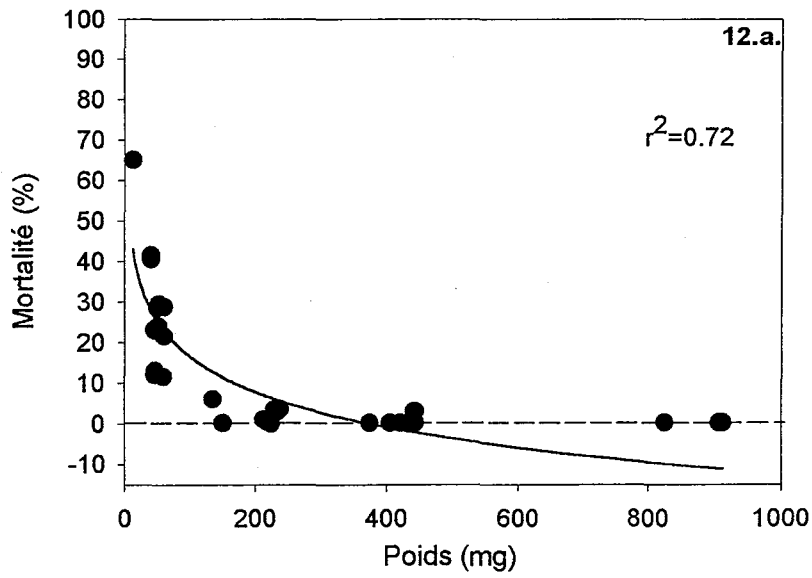


Fig. 12. Mortalité (%) en fonction du poids (mg) exprimée 9 jours après un stress de 60 secondes (12.a.), de 90 secondes (12.b.) et de 120 secondes (12.c.). Régressions de type logarithmique et coefficients de détermination.

2.3.b. Influence du temps d'application du stress

De la même manière que pour la représentation de l'influence du poids, la comparaison des données pour lesquelles le poids (P) est similaire permet de caractériser l'influence des temps d'application (T) du stress sur la mortalité (M).

Parmi les 210 données, 30 ont un poids moyen individuel (P) compris entre 220mg et 240mg. Ces 30 échantillons sont retenus sur un tamis dont la maille est de 8mm (T8) et ont une taille comprise entre 12,94mm et 13,34mm.

L'augmentation du temps d'application du stress provoque une augmentation de la mortalité (figure 13). En effet, pour un stress de 90sec, la mortalité moyenne est de $12 \pm 7,22\%$ (n = 6); elle est de $27,10 \pm 10,84\%$ (n = 5) pour 120sec, de $50,20 \pm 3,58\%$ (n = 5) pour 150sec et de $57,57 \pm 10,11\%$ (n = 7) pour 180sec.

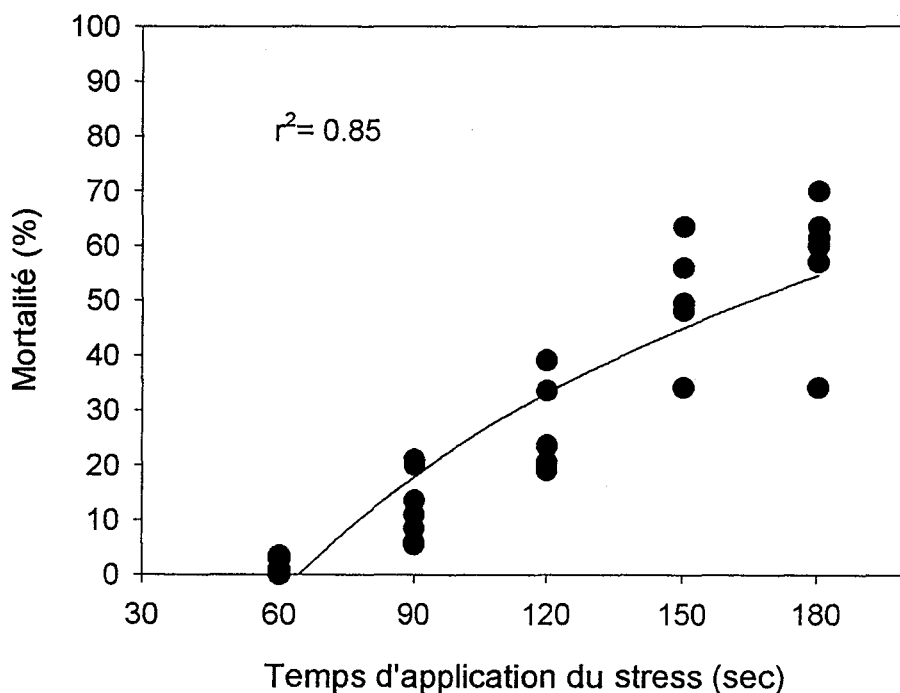
Une régression non linéaire exprimée par une fonction logarithmique du type:

$M = a' \ln(T) + b'$ donne un coefficient de détermination de 0,85.

D'après cette équation, $M = 100\%$ pour $T_{100\%} = \exp[(100-b')/a']$, c'est à dire $T_{100\%} = 418\text{sec}$. (6mn 58sec).

De la même manière la durée de stress qui conduit à 50% de mortalité est:

$T_{50} = \exp[(50-b')/a'] = 163\text{sec}$ (2mn 43sec).



ig. 13. Mortalité (%) en fonction du temps d'application du stress (sec) pour du naissain e taille T8 et de poids compris entre 220 et 240 mg. Régression de type logarithmique et oefficient de détermination.

2.3.c. Description du modèle

La représentation de la mortalité du naissain après un stress à 45°C en eau douce en fonction du poids moyen individuel et de la durée d'application du stress est un graphique en trois dimensions (figure 14a). Le cumul des effets du poids (P) et du temps d'application (T), se traduit par la répartition des plus fortes mortalités (M) quand le poids est faible et la durée longue et des plus faibles quand le poids est important et la durée courte.

Ainsi, on retrouve des mortalités nulles ($M = 0\%$) pour une durée $T = 60\text{sec}$ et pour des poids moyens individuels allant de $P = 150,3\text{mg}$ à $P = 913,5\text{mg}$ (plus fort poids testé).

Les plus fortes mortalités ($M > 95\%$) sont constatées après le stress de naissain de $P = 14,35\text{mg}$ pendant des durées de $T = 150\text{sec}$ et $T = 180\text{sec}$ (plus long temps testé pour cette gamme de poids).

Pour les poids les plus élevés (800-900mg), la mortalité maximale atteinte est de 29,5% pour le temps d'application le plus long ($T = 300\text{sec}$).

Pour les poids les plus faibles (10-20mg), la durée de stress la plus courte testée est $T = 60\text{sec}$ et provoque 65% de mortalités.

La mortalité exprimée globalement au cours de l'expérimentation (210 données) est répartie de la façon suivante : 35,85% de mortalité sont situées entre 0 et 30%, 37,26% entre 30 et 70% et 26,89% entre 70 et 100%.

La courbe $M = a \ln P + b \ln T$ s'ajuste aux 210 données avec un coefficient de détermination (r^2) de 0,73, un r^2 ajusté de 0,722 et une valeur du test de Fisher de 561 (figure 14b).

Ces données statistiques sont obtenues pour $a = -19,2513$ et $b = 28,4744$.

L'équation rend compte d'un effet annulé du poids et du temps d'application sans interaction. Le coefficient a, négatif, exprime la décroissance de la mortalité quand le poids augmente, tandis que b, positif, traduit l'augmentation de la mortalité liée à l'allongement de la durée du stress.

D'après l'équation, pour $T = 60\text{sec}$, on obtient $M = 0\%$ pour un poids $P_0 = 153\text{mg}$. Cette durée de stress ne provoque plus de mortalités pour des valeurs supérieures à P_0 . Parmi les valeurs observées, pour $T = 60\text{sec}$, le plus faible poids pour lequel on obtient $M = 0\%$ est $P_0 = 150,3\text{mg}$.

Pour la limite basse en poids ($P = 12,25\text{mg}$) des données observées, l'équation donne des temps d'application pour lesquels on a 0% et 100% de mortalité.

Les 100% de mortalité sont atteints à partir de $T = 182\text{sec}$, ce qui est à rapprocher des 91% obtenus avec $T = 180\text{sec}$ lors des expérimentations. La durée la plus courte testée pour ce poids est $T = 60\text{sec}$ et provoque 65% de mortalité. L'équation donne une mortalité nulle pour des stress inférieurs à $T = 5,4\text{sec}$, et un taux de mortalité de 45% pour $T = 60\text{sec}$.

2.3.d. Courbe de mortalité à 50%

En fixant le taux de mortalité, on ramène l'équation du modèle à une relation avec une seule variable. Cette relation entre le temps d'application (T) et le poids moyen individuel (P) pour un taux de mortalité fixe ($M = 50\%$) est de la forme :

$$T = \exp [(50 - a \ln P) / b]$$

La courbe de type exponentiel (figure 15) permet donc de déterminer le temps d'application (T_{50}) à appliquer à un échantillon de naissain de poids moyen individuel connu pour obtenir 50% de mortalité. Les valeurs de T_{50} pour les poids extrêmes utilisés lors de l'expérimentation sont de 27,4sec pour 10mg et 575sec (9min 35sec) pour 900mg.

D'après la courbe, le temps maximal utilisé lors de l'obtention des données ($T = 300\text{sec}$) provoque 50% de mortalité sur du naissain dont le poids est $P = 340\text{mg}$.

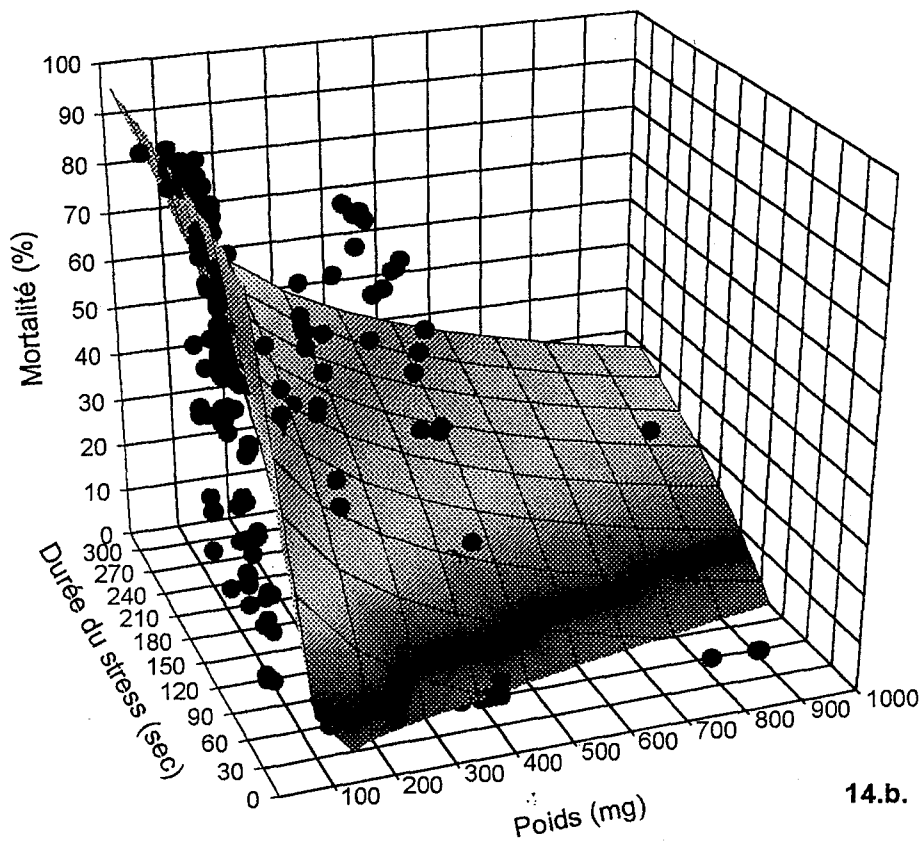
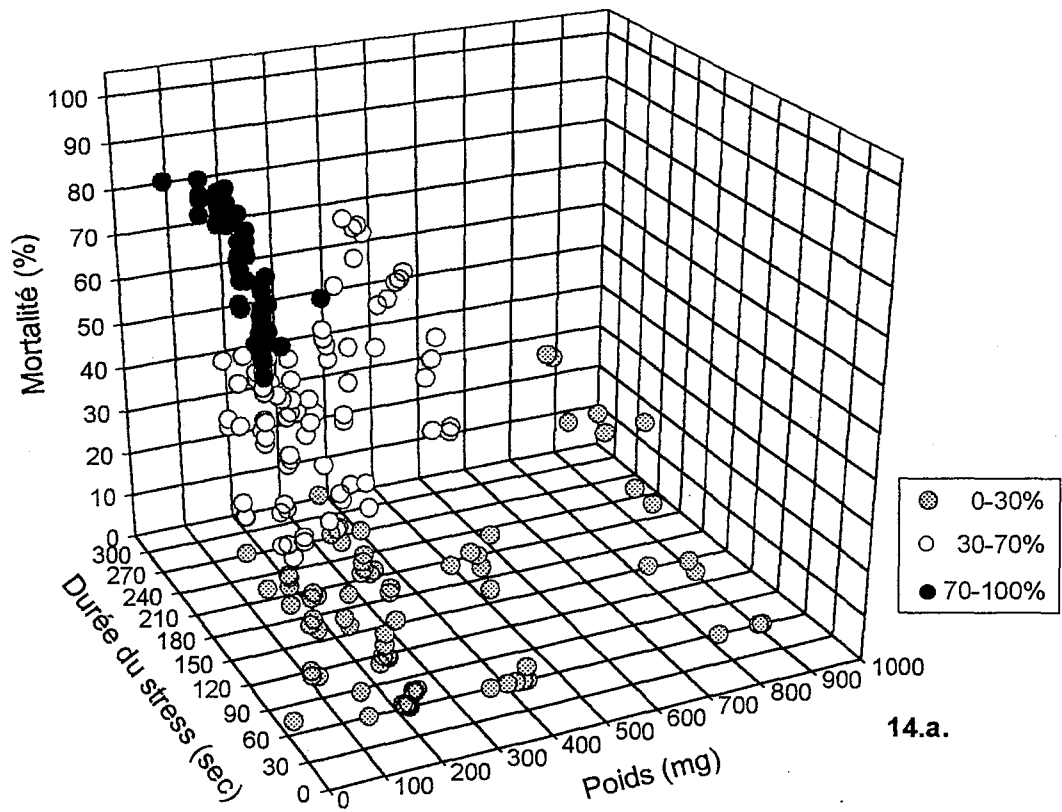


Fig. 14. Représentation de la mortalité (%) en fonction du poids (mg) et du temps d'application du stress (sec) et répartition selon l'intensité de la mortalité (14.a.). Modèle 3D du type $Mortalité (\%) = a \cdot \ln(Poids(mg)) + b \cdot \ln(Temps \text{ d'application (sec)})$ (14.b.).

2.3.e. Limites hautes et basses autour de 50% de mortalité

Les paramètres a et b de l'équation du modèle sont donnés pour un coefficient de détermination de 0,73 avec un intervalle de confiance à 95%.

On a donc $a_{\min} < a < a_{\max}$ et $b_{\min} < b < b_{\max}$.

Pour un poids fixe (P) et pour obtenir 50% de mortalité, la durée du stress à appliquer se trouve donc dans un intervalle $[T_{\min}, T_{\max}]$ ou :

$$T_{\min} (\text{sec}) = \exp [(50 - a_{\min} \ln P) / b_{\min}]$$

et $T_{\max} (\text{sec}) = \exp [(50 - a_{\max} \ln P) / b_{\max}]$

Cet intervalle de temps peut être exprimé en intervalle de mortalité autour de 50% en calculant :

$$M_{\min} = a \ln P + b \ln T_{\min} (\%)$$

et $M_{\max} = a \ln P + b \ln T_{\max} (\%)$

M_{\min} et M_{\max} sont des limites hautes et basses autour de 50%, conséquences de l'incertitude sur les paramètres du modèle. Cet intervalle est systématique autour de 50% et peut être caractérisé par la distance :

$$d = \frac{M_{\max} - M_{\min}}{2} (\%) \text{ pour un poids } (P) \text{ fixe}$$

La figure 16 représente l'évolution de la distance (d) autour de 50% de mortalité en fonction du poids du naissain testé (P).

La distance augmente de façon importante pour les faibles poids puisqu'on a $d = 10\%$ pour $P = 10\text{mg}$ et $d = 15\%$ pour $P = 60\text{mg}$. Ensuite la distance croît plus faiblement pour atteindre $d = 22,8\%$ quand $P = 900\text{mg}$.

D'après le modèle, pour un poids $P = 350\text{mg}$, une durée de stress de $T = 300\text{sec}$ (5min) provoque $M = 50\%$ de mortalité (figure 15). Pour ce poids (P), la distance définie par l'incertitude sur les paramètres du modèle est $d = 20\%$, (figure 16), c'est à dire que pour ce poids moyen individuel, l'application d'un stress de 300sec provoque un taux de mortalité compris entre 30% et 70%.

2.3.f. Récapitulatif de la standardisation du stress

La réaction, en termes de mortalité, de la population de naissain testée, à un stress en eau douce à 45°C, peut être récapitulée selon la grandeur de la maille du tamis sur lequel il est retenu (T_n), la taille moyenne de l'échantillon (mm) et le poids moyen individuel de l'échantillon (mg).

Le tableau 6 donne les durées de stress à appliquer pour obtenir 50% de mortalité et les limites hautes et basses dans lesquelles la mortalité est conforme au modèle.

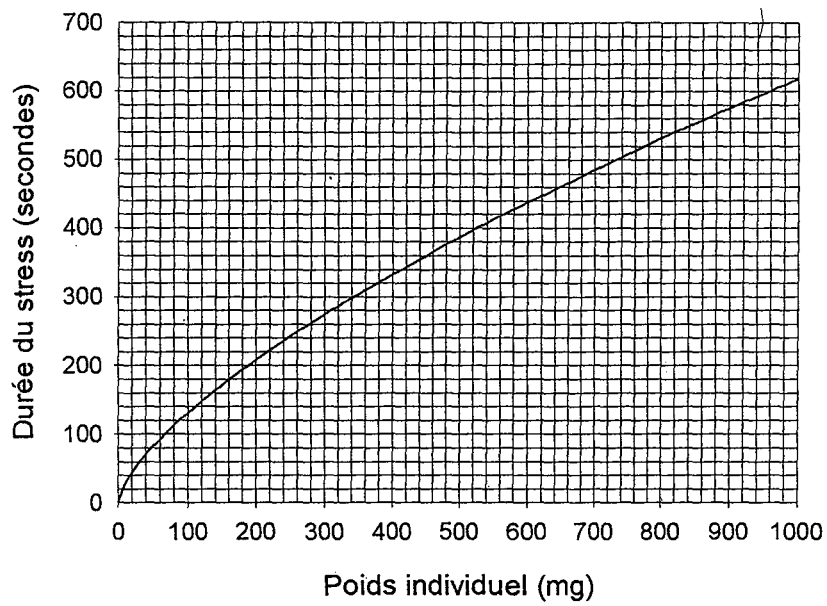


Fig. 15. Durée du stress (secondes) à appliquer en fonction du poids individuel (mg) à 45°C en eau douce pour obtenir 50% de mortalité.

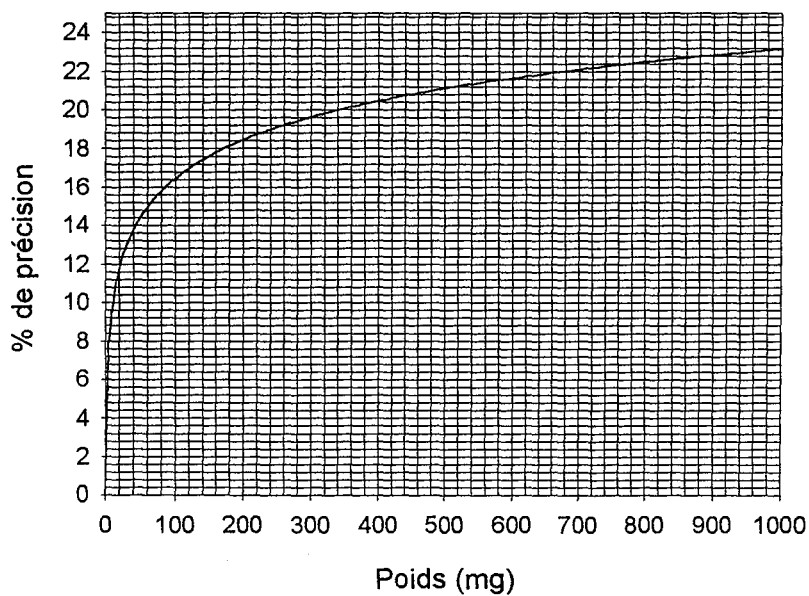


Fig. 16. Précision (%) avec laquelle les 50% de mortalité sont obtenus en fonction des poids individuels (mg).

Tableau 6: Récapitulatif des temps d'application du stress (sec) à 45°C en eau douce selon le poids (mg), la taille (mm) et le tamis du naissain testé. Limites (%) dans lesquelles la mortalité obtenue est conforme au modèle.

Tamis	Taille	Poids	Durée su stress	Limite basse	Limite haute
T2	4-5mm	10mg	30sec.	40%	60%
		15mg	40sec.	39%	61%
		20mg	45sec.	38%	62%
T4	5-7mm	25mg	50sec.	37%	63%
		30mg	60sec.	37%	63%
		35mg	65sec. (1min 5 sec)	36%	64%
		40mg	70sec. (1min 10sec)	36%	64%
		45mg	75sec. (1min 15sec)	36%	64%
		50mg	80sec. (1min 20sec)	35%	65%
T6	7-10mm	60mg	90sec. (1min 30sec)	35%	65%
		70mg	100sec. (1min 40sec)	34%	66%
		80mg	110sec. (1min 50sec)	34%	66%
		90mg	120sec. (2min)	34%	66%
		100mg	130sec. (2min 10sec)	33%	67%
		110mg	140sec. (2min 20sec)	33%	67%
		120mg	150sec. (2min 30sec)	33%	67%
T8	10-14mm	140mg	160sec. (2min 40sec)	32%	68%
		160mg	180sec. (3min)	32%	68%
		180mg	190sec. (3min 10sec)	32%	68%
		200mg	210sec. (3min 30sec)	31%	69%
		220mg	220sec. (3min 40sec)	31%	69%
		240mg	230sec. (3min 50sec)	31%	69%
		260mg	250sec. (4min 10sec)	30%	70%
		280mg	260sec. 4min 20sec)	30%	70%
		300mg	270sec. (4min 30sec)	30%	70%
T10	14-19mm	350mg	300sec. (5min)	30%	70%
		400mg	330sec. (5min 30sec)	29%	71%
		450mg	360sec. (6min)	29%	71%
		500mg	390sec. (6min 30sec)	29%	71%
		550mg	410sec. (6min 50sec)	28%	72%
		600mg	440sec. (7min 20sec)	28%	72%
T12	>19mm	650mg	460sec. (7min 40sec)	28%	72%
		700mg	480sec. (8min)	28%	72%
		750mg	510sec. (8min 30sec)	27%	73%
		800mg	530sec. (8min 50sec)	27%	73%
		850mg	550sec. (9min 10sec)	27%	73%
		900mg	570sec. (9min 30sec)	27%	73%

I - D - DISCUSSION

Le stress standard dont les conditions d'application sont recherchées est un outil permettant de caractériser la rusticité d'une population de naissain. Afin de s'affranchir de l'incidence de l'origine génétique du naissain sur sa réaction, la mise au point des conditions d'application du stress a été réalisée sur une population unique.

La description de la réaction au stress du naissain pour des tailles variant de T2 à T12 (4-20mm, 10-900mg) s'est étendue sur une période de 3 mois (juin/septembre). La maîtrise de la croissance de la population étudiée a été possible par le contrôle de la température d'élevage.

L'hyperthermie en exondation forcée est un type de stress qui se rapproche des conditions naturelles estivales avec une exposition à de fortes températures des parcs. Ici, les temps d'application sont élevés afin de provoquer des mortalités dans le naissain étudié. En atmosphère sèche, ce type de stress est efficace puisque après 8 heures d'exondation à 35°C, le naissain exprime 80% de mortalité. Malgré tout, dans ces conditions d'expérimentation, la déshydratation est très importante et l'ouverture des valves semble intervenir après un temps de latence (2 à 3 jours). Ce phénomène est peut être dû à un collage des valves causé par la déshydratation. Ceci rendant difficile l'interprétation des mortalités qui surviennent, le protocole de stress a été modifié afin de maintenir le naissain en atmosphère humide (hygrométrie >85%) pendant l'exondation, en le plaçant dans une enceinte étanche. Ce stress permet, par la variation du temps d'exondation (de 12 à 22 heures), d'obtenir des mortalités s'échelonnant de 0 à 100%. La réplication de l'échantillon permet d'évaluer la reproductibilité des résultats. Après 16 heures d'exondation à 35°C, la mortalité moyenne 160 heures après la remise à l'eau est de 74,25%. L'intervalle de confiance à 95% autour de cette moyenne est de 15,5%. Lors d'une expérimentation précédente dans les mêmes conditions (16 heures d'exondation à 35°C), la mortalité après 160 heures est de 38%. La reproductibilité des résultats semble difficile à obtenir à la fois lors d'une même expérimentation et entre deux stress successifs, ce qui compromet la possibilité d'établir un modèle de réponse au stress du naissain.

De plus, les besoins techniques nécessaires à la réalisation de ce type de stress (enceinte à 35°C en permanence pendant au moins 12 heures) n'est pas favorable à une diffusion ultérieure de cette méthode.

Le deuxième type de stress testé ici, le choc thermique en eau douce, est en revanche simple à mettre en œuvre. En effet, il nécessite seulement un bac équipé d'une résistance et d'un système permettant la circulation de l'eau douce pour homogénéiser la température. De plus, la durée du stress est courte, puisqu'elle est de 9min 30sec à 45°C pour du naissain de 900mg (T12).

L'ensemble des expérimentations menées sur la population de naissain testée a abouti à la mise au point d'un protocole standard. La première phase consiste en un tamisage de la population qui permet de la répartir en trois classes de taille. Chaque classe est caractérisée par la dimension de la maille du tamis sur lequel elle est retenue, sa taille (mm) et son poids moyen individuel (mg). C'est selon le poids que la réaction au stress est définie. En effet, il constitue une variable continue qui permet de distinguer des comportements différents entre deux fractions de population retenues par un même tamis.

Après le tamisage, le naissain destiné à subir le stress est placé pendant 5 jours à 13°C en circuit ouvert. Cette période de stabilisation de la température a pour but de replacer le naissain dans un état de croissance standard avant de réaliser le stress, puisque pour des raisons de synchronisation entre l'élevage et les expérimentations, il peut être prélevé à 5°C, 13°C ou entre 15° et 28°C. La possibilité technique d'obtenir, par échange avec l'eau salée souterraine, une température d'eau de mer comprise entre 13°C et 15°C a conduit au choix

d'une température de stabilisation à 13°C. Le faible refroidissement de l'eau nécessaire à l'obtention de cette température est réalisé par échange thermique avec de l'eau douce refroidie. Cette durée de stabilisation est fixée à 5 jours et ne doit pas être trop longue pour que l'outil d'appréciation de l'état de rusticité/fragilité du naissain, que constitue le stress, soit le plus bref possible. La durée de suivi de la mortalité après le stress étant de 9 jours, l'ensemble du diagnostic s'étend donc sur 14 jours. Cependant cette période de stabilisation doit être, aussi, suffisamment importante pour permettre d'uniformiser le niveau physiologique des fractions de naissains ayant des historiques d'élevage différents, avant le stress.

La température de stress à 45°C, qui représente un choc thermique de 32°C, semble la plus appropriée (en comparaison de 40 et 50°C). Elle permet de provoquer des mortalités différentes avec des temps d'application de 60 à 300 secondes, pour les tailles de naissain utilisées ici (de T2 à T12).

L'échantillonnage de 3 x 200 individus est l'effort minimal permettant d'obtenir les résultats les plus robustes puisqu'il améliore les résultats obtenus avec deux réplicats. Ce nombre de répétitions est aussi performant que le test de quatre réplicats, la variabilité des résultats ainsi obtenue est plus faible qu'avec 100 individus et équivalente à l'essai de 300 individus.

La répétition de ce protocole de stress standard sur 16 fractions différentes de la population de naissain étudiée a permis d'obtenir une variation des mortalités (M) consécutifs à un choc thermique à 45°C pour des poids (P) variant de 10 à 900mg et des temps d'application (T) s'échelonnant de 60 à 300secondes.

L'allure de la réaction du naissain à ce stress montre que pour des poids supérieurs à 450-500mg (T10) la mortalité provoquée par le temps d'application le plus long (300sec.) n'excède pas 50%. Pour cette gamme de poids, la température de 45°C, semble moins bien adaptée si on considère que la durée du stress ne doit pas être trop importante (<10min.) L'abaissement de cette durée, par l'application de chocs thermiques plus importants nécessite une nouvelle série d'expérimentations pour déterminer la relation entre M, P et T pour ces poids de naissain supérieurs.

L'ajustement de la réaction globale de cette population à une relation du type : $M = a \ln P + b \ln T$, est caractérisé par un coefficient de détermination (r^2) de 0,73, et reflète la baisse de mortalité quand le poids augmente (a négatif) et la hausse de mortalité provoquée par l'allongement du temps d'application (b positif). Cette relation permet de définir le temps (T) nécessaire, à 45°C en bain-marie d'eau douce, pour provoquer 50% de mortalité après 9 jours sur du naissain de poids moyen individuel (P) connu.

La mise au point du protocole standard de stress et l'interprétation de la réaction du naissain en termes de mortalités, est réalisée ici sur une unique population. Ainsi se pose le problème de sa représentativité par rapport à d'autres populations de naissain ceci fait l'objet d'une deuxième phase d'expérimentations consistant en l'application du stress standard à différentes populations de naissain.

II – APPLICATION DU STRESS STANDARD A DIFFÉRENTES POPULATIONS DE NAISSAIN DE *CRASSOSTREA GIGAS*

II - A – INTRODUCTION

La mise au point d'un protocole de stress standard vise à obtenir un outil d'appréciation de la rusticité d'une population de naissain par la mesure de sa réaction au stress en terme de mortalité.

Dans cette deuxième phase des expérimentations, le but est de tester l'outil obtenu sur différentes populations de naissain dont l'historique est le mieux possible caractérisé (site de reproduction (écloserie/captage naturel), déroulement de la croissance en nurserie, épisodes de mortalités...).

Cette première utilisation du stress standard constitue une tentative d'évaluation de sa robustesse et de sa représentativité vis à vis de l'ensemble des populations de naissain, en tant qu'outil de diagnostic de leur état de santé.

II – B - MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les expérimentations sur les différentes populations du naissain se sont déroulées du 15 septembre au 20 novembre 1997. Pour chacune d'entre elles, le protocole appliqué est le suivant :

- Jo : Prélèvement de l'échantillon
- Jo - J1 : mise à l'eau de l'échantillon à 13°C
- J5 : stress
- J6 - J14 : Suivi de la mortalité.

1 – Prélèvement de l'échantillon

La technique de stress à 45°C en bain-marie d'eau douce s'applique à des échantillons de poids homogènes. Il est donc nécessaire de discriminer plusieurs classes dans une population afin de rendre compte de sa réaction globale au stress. Pour chaque population, un tamisage du naissain permet de dissocier trois classes de taille dans lesquelles le poids des individus est homogène.

Ces trois classes sont donc différenciées par leurs performances de croissance. Les fractions d'individus de poids le plus élevé sont nommées C_R (Croissance rapide), la classe de poids intermédiaire est notée C_M (Croissance moyenne) et celle des individus de poids plus faibles C_L (Croissance lente).

Dans cette répartition, les trois classes ne représentent pas des parts identiques de la population. En effet, en nombre d'individus, C_M est la classe majoritaire et C_R et C_L sont

minoritaires et similaires. En moyenne, la répartition, en pourcentage de la population totale est la suivante : $C_R = 15\%$, $C_M = 70\%$, $C_L = 15\%$ (Baud J.P., 1989).

Pour certaines populations testées, selon la période d'élevage à laquelle est réalisé le prélèvement, les trois classes ne se différencient pas lors du tamisage et on peut obtenir des répartitions du type $C_R (15\%) - C_M (33\%)$, $C_M (85\%) - C_L (15\%)$ ou $C_M (100\%)$ quand la population est homogène.

Les échantillons sont placés dans des tubes tamis dans un raceway alimenté par de l'eau de mer stabilisée à 13°C , au plus 24 heures après le prélèvement sur site, pendant une durée de 5 jours.

2 – Stress à 45°C au bain-marie d'eau douce

Après 5 jours à 13°C , 4 fractions de 200 individus sont prélevées dans chaque classe de la population. Une d'entre elles est conservée à 13°C et constitue un témoin sans stress. Pour les 3 autres fractions, le poids moyen individuel (mg) est calculé par la pesée globale des 200 individus et la taille moyenne individuelle (mm) est obtenue par la mesure de 10 individus.

Le temps d'application du stress nécessaire pour provoquer 50% de mortalité après 9 jours est déterminé par lecture de la courbe obtenue par modélisation (figure 15) qui donne la relation entre le temps d'application (T) et le poids moyen individuel (P). Les trois réplicats de 200 individus sont replacés à 13°C immédiatement après le stress à 45°C .

3 – Suivi de la mortalité

Pendant les 9 jours suivant le stress, la mortalité est dénombrée quotidiennement sur les trois réplicats de chaque classe de la population. La mortalité sur la fraction témoin est relevée au 9^{ème} jour.

Pour chaque classe on a :

M_q , le pourcentage de mortalité quotidien, moyenne des pourcentages dénombrés sur les trois réplicats de 200 individus pour un jour.

M_t , le pourcentage de mortalité total, moyenne des pourcentages de mortalités des trois réplicats cumulés au cours des 9 jours suivant le stress.

La mortalité caractérisant la population est la moyenne pondérée des pourcentages de mortalité totaux des différentes classes. La pondération tient compte de la représentativité de chaque classe, en nombre d'individus, dans la population. Pour une population répartie de trois classes (C_R , C_M , C_L), la mortalité est :

$$M = 0,15 \times M_t (C_R) + 0,70 \times M_t (C_M) + 0,15 \times M_t (C_L)$$

Quand la population n'est représentée que par deux classes de taille, on a :

$$M = 0,15 \times M_t (C_R \text{ ou } C_L) + 0,85 \times M_t (C_M)$$

Et, quand la seule classe est C_M , on a

$$M = M_t (C_M)$$

En fin d'expérimentation, chaque population peut donc être décrite par M (mortalité moyenne provoquée par le stress sur les différentes classes) et par P (le poids moyen de la population, moyenne pondérée des poids individuels de chaque classe).

La connaissance de P permet de définir les limites haute et basse dans lesquelles on obtient 50% de mortalité d'après le modèle (cf. chap. I.2.3.c, figure 16).

L'intervalle [Mmin - Mmax] autour de 50% permet de positionner la population testée par rapport au modèle dans une des trois catégories suivantes :

Sup : $M > M_{max}$. La mortalité provoquée par le stress est supérieure à celle du modèle.

Moy : $M_{min} < M < M_{max}$. La mortalité provoquée par le stress est similaire à celle du modèle.

Inf : $M < M_{min}$. La mortalité provoquée par le stress est inférieure à celle du modèle.

II – C - MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 – Description des populations

Le stress à 45°C en eau douce a été appliqué à 16 populations différentes de naissain. Les caractéristiques biométriques (taille, poids) sont incluses dans les limites du modèle de stress standard. Le vide de maille des tamis sur lequel le naissain est retenu varie de 2mm à 12mm (T2 à T12), la taille varie de 4,43mm à 19,79mm et le poids de 17,7mg à 764,8mg (tableau 7). 11 populations (1 à 11) de naissain sont issues d'écloseries et 5 (12 à 16) de captage naturel. Trois des origines (1, 2 et 7) ont subi des mortalités avant le stress à des niveaux différents en intensité et dans le temps. Pour les origines 1 et 2 l'épisode de mortalité était en cours au moment du prélèvement.

Pour la population 3, la classe C_M (T2) stressée le 23 septembre est issue de la même ponte que le reste de la population mais est parvenu à cette taille un mois plus tard.

Les deux classes C_M (T4) de l'origine 8 ont été placées en élevage à 19°C pendant 16 jours, l'une en eau de forage (81,7mg) ,et l'autre en eau de mer (48,7mg). L'autre classe C_M (T2) a elle subi le stress dès le prélèvement.

Deux prélèvements ont été effectués dans la population 11. Le premier a été utilisé pour le stress du 13 octobre. Après le deuxième, réalisé le 20 octobre, la classe C_R a été séparée en deux parties. L'une a été placée pendant 10 jours à 5°C (C_{R1}) et l'autre à 13°C (C_{R2}). Un deuxième stress a donc été appliqué le 03 novembre sur ces deux classes C_R et la classe C_M du deuxième prélèvement.

Tableau 7: Description des prélèvements réalisés dans les populations soumises à un stress à 45°C en eau douce. Chaque population est détaillée selon les fractions réparties après tamisage (C_R : croissance rapide, C_M : croissance moyenne, C_L : croissance lente). Pour les populations ayant été testées en 2 temps, les fractions de la 2^{ème} expérimentation apparaissent en gris.

Population	Date du stress	Classes	Tamis	Taille (mm)	Poids (mg)	Mortalités avant stress
1	23-sep	CM	T6	11.71	197.1	25% en cours
2	23-sep	CM	T6	9.47	138.9	5% en cours
3		CR	T8	15.13	318.4	
	22-sep	CM	T6	11.01	155.4	
		CL	T4	8.31	76.9	
	23-sep	CM	T2	-	23.7	
4		CR	T8	14.26	297	
	22-sep	CM	T4	7.82	55.1	
		CL	T2	-	17.7	
5		CR	T8	18.71	475.8	
	22-sep	CM	T6	11.9	206.1	
		CL	T4	10.06	140.4	
6	23-sep	CM	T2	4.43	38.3	
7	13-oct	CR	T8	11.46	318.4	20% anciennes 75% anciennes
		CM	T4	7.99	116.7	
8	13-oct	CM	T2	-	19.5	
	29-oct	CM	T4	5.8	81.7	
	29-oct	CM	T4	5.05	48.7	
9		CR	T6	9.55	121.7	
	21-oct	CM	T4	8.16	54.7	
		CL	T2	5.77	24.8	
10	27-oct	CR	T8	17.72	550.9	
		CM	T4	7.5	58.92	
11	13-oct	CR	T6	12.03	284.2	
		CM	T2	4.57	32.4	
		CR1	T8	13.78	371.9	
	03-nov	CR2	T8	13.94	387.7	
		CM	T4	5.94	58.7	
12		CR	T12	18.17	675.1	
	04-nov	CM	T8	14.79	333.7	
		CL	T6	11.32	159.9	
13		CR	T12	19.79	743.7	
	04-nov	CM	T8	15.16	330.3	
		CL	T6	10.48	142.4	
14		CR	T12	17.56	764.8	
	12-nov	CM	T8	13.17	420.7	
		CL	T6	11.43	249.5	
15	12-nov	CR	T6	11.25	153.7	
		CM	T4	7.62	70.1	
16	18-nov	CM	T12	19.41	618.22	
		CL	T8	13.11	202.87	

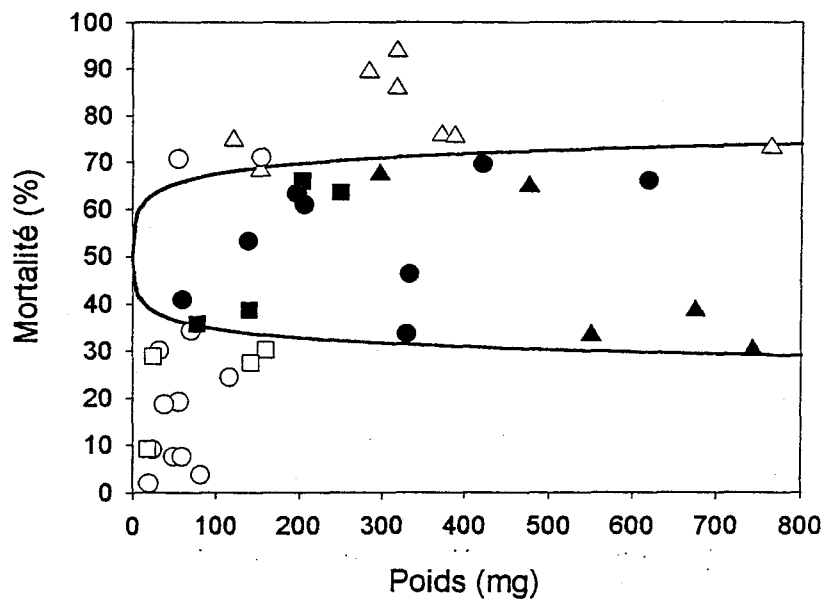


Fig. 17. Répartition de la mortalité (%) observée sur les 41 classes différentes CR (Δ), CM (\square) et CL (\circ) et précision autour de 50% de mortalité (—). Positionnement vis-à-vis du modèle dans les catégories "Sup", "Moy" et "Inf". "Sup" et "Inf" (\square), "Moy" (\blacksquare).

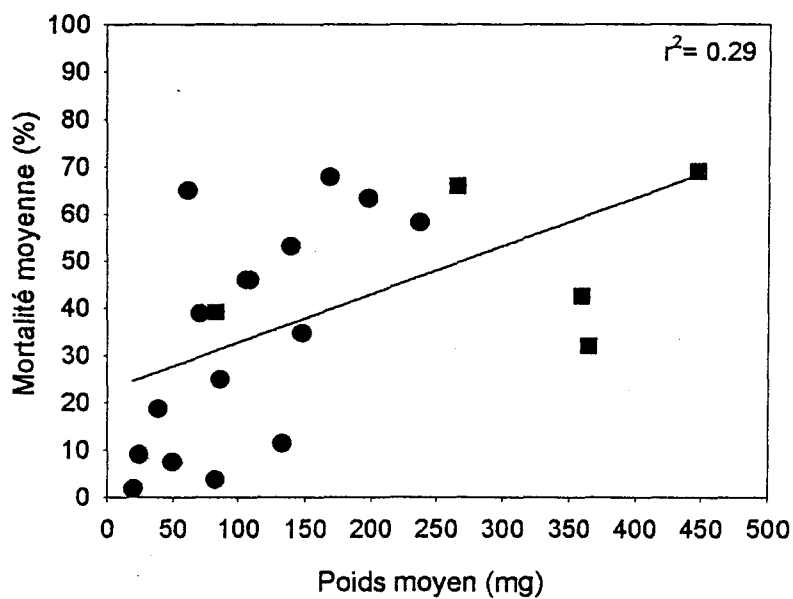


Fig. 18. Mortalité moyenne (%) de chaque population selon son poids moyen (mg). Régression linéaire et coefficient de détermination. (\circ) : Naissain d'écloserie. (\square) : Naissain de captage naturel.

2- Mortalités provoquées par le stress

L'application du stress standard provoquant 50% de mortalité aux différentes populations testées a abouti à l'obtention de mortalités variant de 1,83% à 93,61% (tableau 8).

Parmi les 41 échantillons testés, 10 expriment une mortalité supérieure à celle attendue par le modèle (24%), 17 une mortalité incluse dans les limites de validité du modèle (41%) et 14 une mortalité inférieure (35%) (figure 17).

La moyenne globale de mortalité des 41 échantillons est de 46,35%. Pour les différentes classes C_R , C_M et C_L les moyennes sont respectivement de 66,82%; 36,55% et 33,40%, ce qui traduit que pour 10 populations sur 12 pour lesquelles on a au moins deux de ces classes, les mortalités sont arrangées de la façon suivante :

$$\text{Mortalité } (C_R) > \text{Mortalité } (C_M) > \text{Mortalité } (C_L)$$

Parmi les 10 échantillons positionnés dans la catégorie "Sup", on retrouve 8 C_R et 2 C_M , tandis que les 14 échantillons de la catégorie "Inf" sont 11 C_M et 3 C_L . La catégorie "Moy" regroupe 5 C_R , 8 C_M et 4 C_L .

Dans les populations, l'écart entre les mortalités des différentes classes (C_R , C_M et C_L) est variable (tableau 9). Il est par exemple de 0% entre C_M et C_L dans la population 16, et de 69,28% entre C_R et C_M pour la population 7. En moyenne, les écarts sont plus faibles pour les populations de naissain de captage naturel que pour les populations de naissain d'écloserie quelles que soient les classes considérées (tableau 9).

Tableau 9 : Moyenne des écarts de mortalités entre les différentes classes (C_R , C_M et C_L) pour les populations de naissain d'écloserie, de naissain de captage naturel et pour l'ensemble des populations. Le nombre de populations concernées parmi les 16 est donné entre parenthèses.

	Ecloserie	Captage naturel	Toutes populations
$C_R - C_M$	32,13% (n = 7)	12,14% (n = 4)	12,99% (n = 11)
$C_M - C_L$	27,46% (n = 4)	6,92 % (n = 4)	17,19% (n = 8)
$C_R - C_L$	45,03% (n = 4)	6,7% (n = 3)	28,6% (n = 7)

La mortalité moyenne pour une population (moyenne pondérée des mortalités de chaque classe) et sa position par rapport au modèle déterminée grâce au poids moyen pondéré est donnée dans le tableau 10. Sur les 16 populations, la mortalité moyenne varie de 1,83% à 69,15%. Parmi les 11 populations de naissain d'écloserie, 4 (4, 6, 8, 10) ont une mortalité inférieure à celle du modèle. Les 7 autres expriment une mortalité conforme au modèle. On ne retrouve pas de population montrant une mortalité supérieure au modèle.

La moyenne de mortalité pour ces 11 populations est de 39,82%.

Les populations de naissain de captage naturel (12 à 16) ont toutes un comportement conforme au modèle. La moyenne de mortalité pour ces 5 populations est de 49,83%. La régression linéaire de la mortalité moyenne des populations par leur poids est caractérisée par un coefficient de détermination faible ($r^2 = 0,29$) (figure 18).

Tableau 8 : Mortalité (%) obtenue 9 jours après un stress à 45°C en eau douce pour chaque classe (CR, CM, CL) des 16 populations testées. La position par rapport au modèle de la mortalité est définie par l'intervalle (limite basse (%) – limite haute (%)). Pour les populations ayant été testées en 2 temps, les fractions de la deuxième expérimentation apparaissent en gris.

Population	Classes	Poids (mg)	Limite basse (%)	Limite haute (%)	Mortalité (%)	Position
1	CM	197.1	32	68	63.33	Moy
2	CM	138.9	33	67	53.17	Moy
3	CR	318.4	30	70	85.67	Sup
	CM	155.4	32	68	71.00	Sup
	CL	76.9	34	66	35.67	Moy
	CM	23.7	38	62	9.00	Inf
4	CR	297	30	70	67.33	Moy
	CM	55.1	35	65	19.17	Inf
	CL	17.7	38	62	9.17	Inf
5	CR	475.8	29	71	64.78	Moy
	CM	206.1	31	69	61.00	Moy
	CL	140.4	33	67	38.67	Moy
6	CM	38.3	36	64	18.67	Inf
7	CR	318.4	30	70	93.61	Su
	CM	116.7	33	67	24.33	Inf
8	CM	19.5	38	62	1.83	Inf
	CM	81.7	34	66	3.67	Inf
	CM	48.7	36	64	7.50	Inf
9	CR	121.7	33	67	74.67	Sup
	CM	54.7	35	65	70.67	Sup
	CL	24.8	37	63	28.83	Inf
10	CR	550.9	39	71	33.33	Moy
	CM	58.92	35	65	7.50	Inf
11	CR	284.2	31	69	89.17	Sup
	CM	32.4	37	63	30.00	Inf
	CR1	371.9	30	70	75.67	Sup
	CR2	387.7	30	70	75.50	Sup
	CM	58.7	32	68	40.83	Moy
12	CR	675.1	28	72	38.50	Moy
	CM	333.7	30	70	46.17	Moy
	CL	159.9	32	68	30.33	Inf
13	CR	743.7	28	72	30.11	Moy
	CM	330.3	30	70	33.50	Moy
	CL	142.4	33	67	27.50	Inf
14	CR	764.8	28	72	73.00	Sup
	CM	420.7	29	71	69.50	Moy
	CL	249.5	31	69	63.67	Moy
15	CR	153.7	32	68	68.17	Sup
	CM	70.1	35	65	34.17	Inf
16	CM	618.22	28	72	66.00	Moy
	CL	202.87	32	68	66.00	Moy

Tableau 10 : Mortalité moyenne (%) pondérée de chaque population. La position par rapport au modèle est définie par l'intervalle (limite basse (%) – limite haute (%)). Pour les populations ayant été testées en 2 temps, les sous populations de la 2^{ème} expérimentation apparaissent en gris.

Population	Poids (mg)	Limite basse (%)	Limite haute (%)	Mortalité (%)	Position
1	197.1	32	68	63.33	Moy
2	138.9	33	67	53.17	Moy
3	168.8	32	68	67.90	Moy
	23.7	38	62	9.00	Inf
4	85.75	34	66	24.89	Inf
5	236.69	31	69	58.22	Moy
6	38.3	36	64	18.67	Inf
7	146.95	33	67	34.72	Moy
8	19.5	38	62	1.83	Inf
	81.7	34	66	3.67	Inf
	48.7	36	64	7.50	Inf
9	60.27	35	65	64.99	Moy
10	132.72	33	67	11.38	Inf
11	70.12	35	65	38.88	Moy
	105.7	33	67	46.06	Moy
	108.08	33	67	46.03	Moy
12	358.84	30	70	42.64	Moy
13	364.1	30	70	32.09	Moy
14	446.64	29	71	69.15	Moy
15	82.64	34	66	39.27	Moy
16	265.17	31	69	66.00	Moy

3 – Populations ayant subi des mortalités avant le stress

A – Population 1 et 2

Pour ces deux populations, le prélèvement des échantillons a été réalisé au cours d'un épisode de mortalité sur le site d'élevage. Après 5 jours à 13°C, la mortalité a été estimée à 25% pour la population 1 et à 5% pour la population 2. Le stress a été réalisé sur 3 x 200 individus de chaque population après élimination du naissain mort. 9 jours après le stress, les mortalités observées sont respectivement de 63,33% et 53,17% pour ces deux populations. Pendant ces 9 jours, les lots témoins ont exprimé 4% de mortalité pour la population 1 et 0% pour la population 2.

B – Population 7

Le prélèvement de cette population est intervenu après un important épisode de mortalité sur site. Les mortalités estimées sont différentes selon la phase de croissance, puisqu'elles sont de 20% pour la classe C_R et de 75% pour la classe C_M . 9 jours après le stress de 3 x 200 individus de chaque classe, les mortalités obtenues sont de 93,61% pour C_R et de 24,33% pour C_M , ce qui donne une mortalité moyenne de 34,72% pour la population qui entre dans la catégorie "Moy" du naissain qui réagit au stress conformément au modèle.

Les témoins de chaque classe expriment, au 9^{ème} jour après le stress, 0% et 4% de mortalité pour les classes C_R et C_M .

4 – Stress différents sur une même population

A – Population 3

Pour le traitement de cette population, le prélèvement sur site a été réalisé dans deux fractions différentes. Dans la première, sur le site depuis un mois, trois classes de taille sont différenciées en T8, T6 et T4 avec des poids moyens respectifs de 318,4mg; 155,4mg et 76,9mg. La deuxième fraction est issue de la même population de départ, mais est mise en élevage un mois plus tard. Elle est homogène en taille (T2) et dans le prélèvement réalisé le poids moyen est de 123,7mg.

Après 9 jours, le stress provoque 85,67% de mortalité sur la classe C_R de la 1^{ère} fraction, 71,00% sur la classe C_M et 35,67% sur la classe C_L . la moyenne pondérée de ces mortalités est de 67,90% ce qui place cette fraction dans la catégorie "Moy".

Le stress, sur la deuxième fraction, après 9 jours, provoque une mortalité de 9,00% ce qui est inférieure à la mortalité attendue par le modèle et place cette sous-population dans la catégorie "Inf".

B – Population 8

Cette population de taille homogène (T2) est séparée en 3 parties après le prélèvement sur site. La première est placée à 13°C pendant 5 jours, période de stabilisation thermique avant stress. La deuxième est mise en élevage pendant 10 jours à 19°C dans un circuit ouvert alimenté par de l'eau de forage additionnée de 2.10^6 cell/jour/individu de *Skeletonema costatum*. La troisième est placée dans des conditions équivalentes, mais en eau de mer. Après 10 jours, un prélèvement de 3 x 200 individus, réalisé dans la classe majoritaire et de croissance moyenne de ces deux parties de la population, est placé à 13°C pendant 5 jours avant le stress, (figure 19).

9 jours après le stress les mortalités exprimées par ces trois sous-populations sont de 1,83% pour la partie 1, de 3,67% pour la fraction élevée en eau de forage pendant 10 jours et de 3,50% pour celle élevée en eau de mer.

Ces résultats de mortalité après les stress les placent toutes les trois dans la catégorie "Inf".

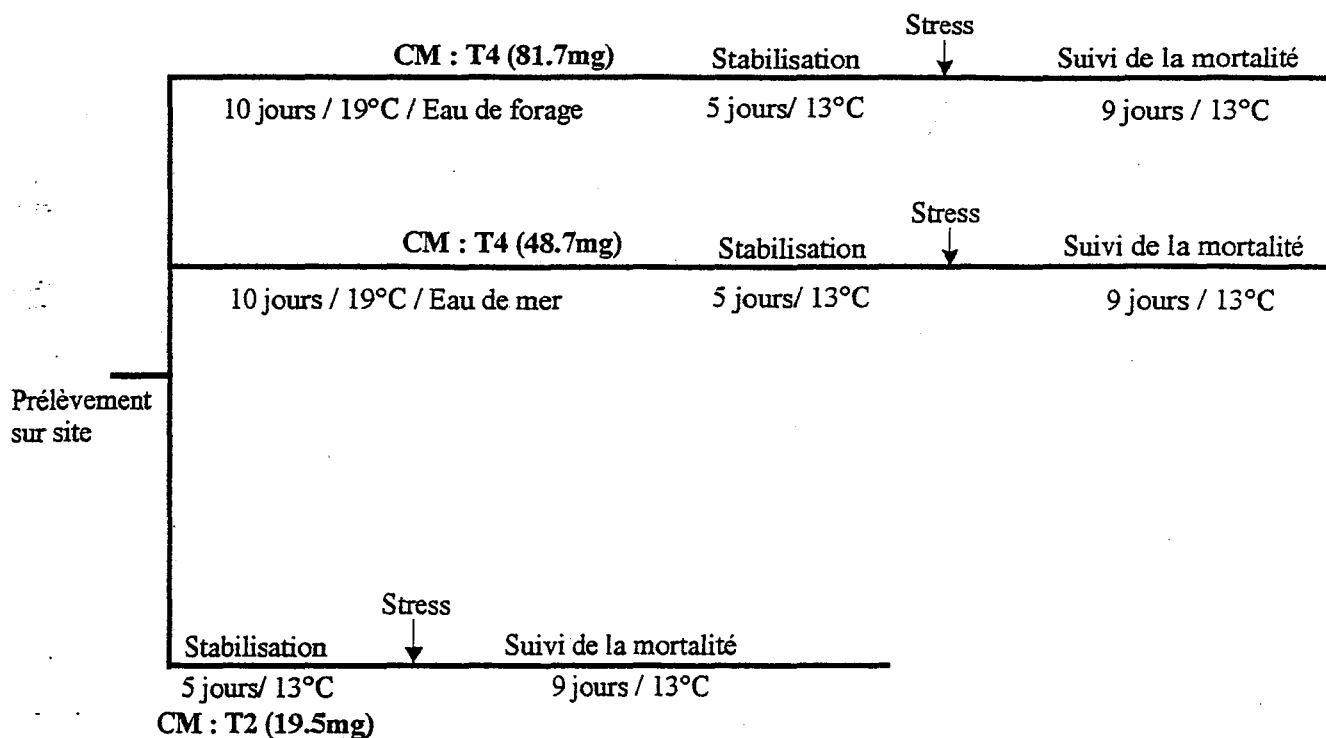


Fig 19. Régimes thermiques appliqués aux différentes fractions de la population 8 ayant subi un stress.

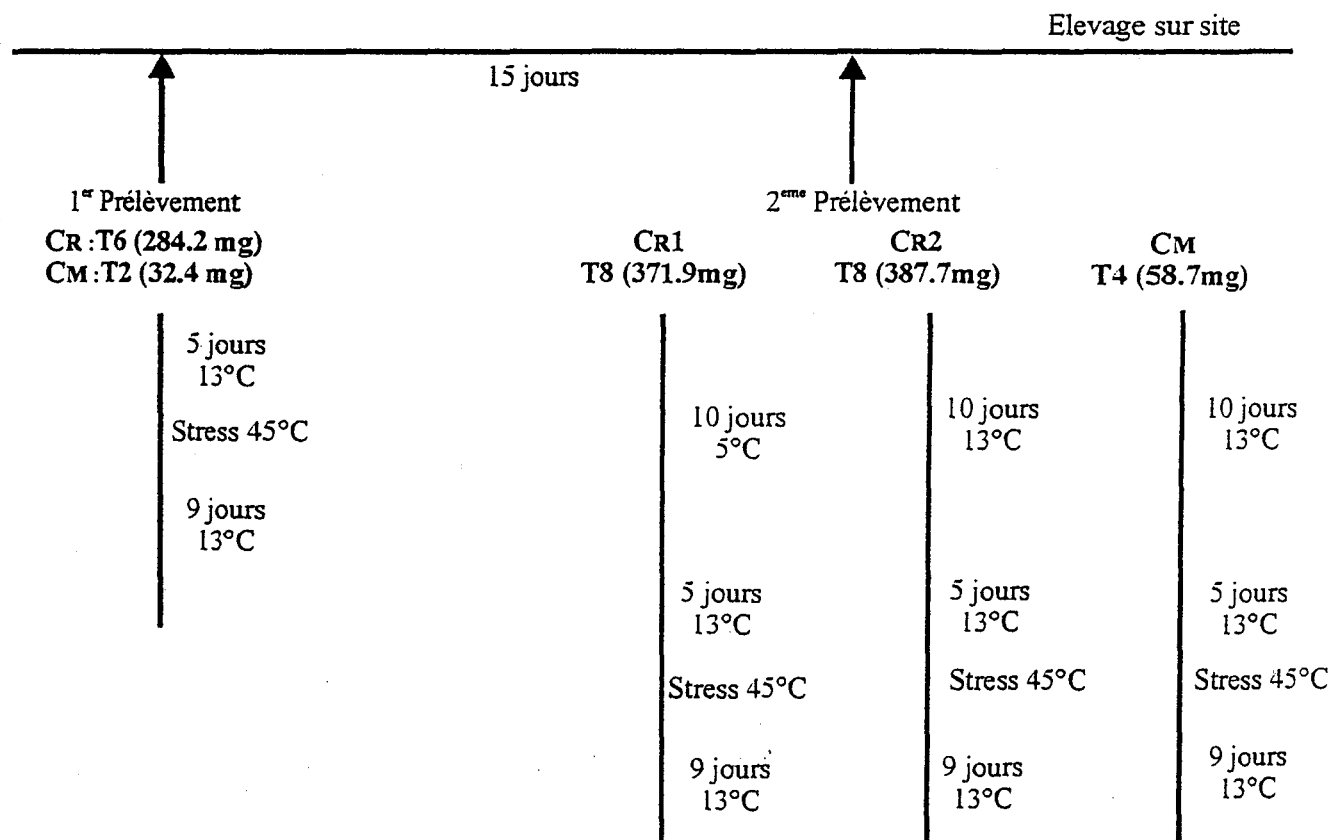


Fig 20. Régimes thermiques appliqués aux différentes fractions de la population 11 ayant subi un stress.

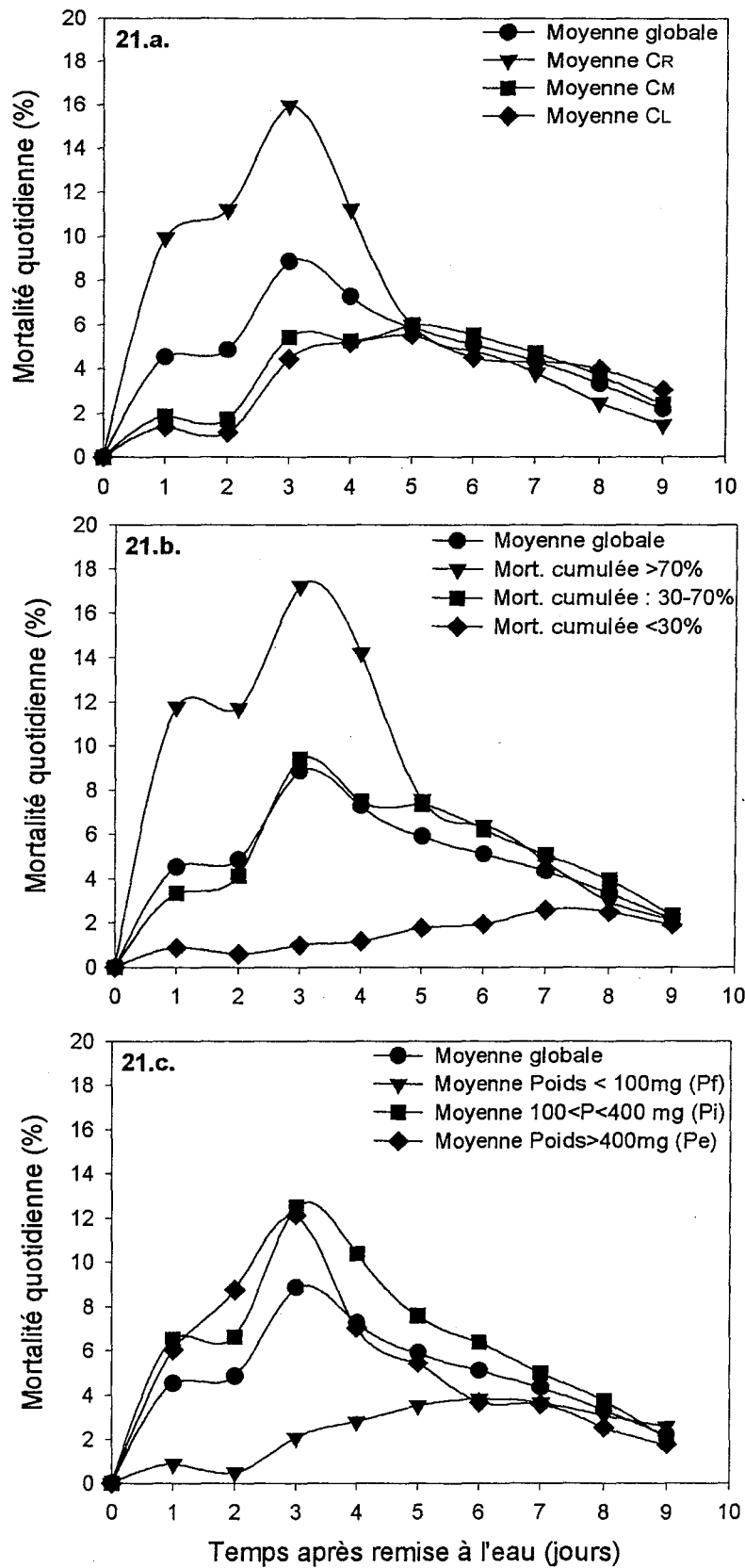


Fig.21. Mortalité quotidienne moyenne pendant les 9 jours suivant le stress pour toutes les fractions de population (moyenne globale), pour les fractions CR, CM et CL (21.a.), pour les fractions dont la mortalité cumulée après 9 jours est inférieure à 30 %, comprise entre 30 et 70 %, ou supérieure à 70 % (21.b.), pour les fractions dont le poids est inférieur à 100 mg (Pf : poids faibles), est compris entre 100 et 400 mg (Pi : Poids intermédiaire) ou supérieur à 400 mg (Pe : Poids élevés) (21.c.).

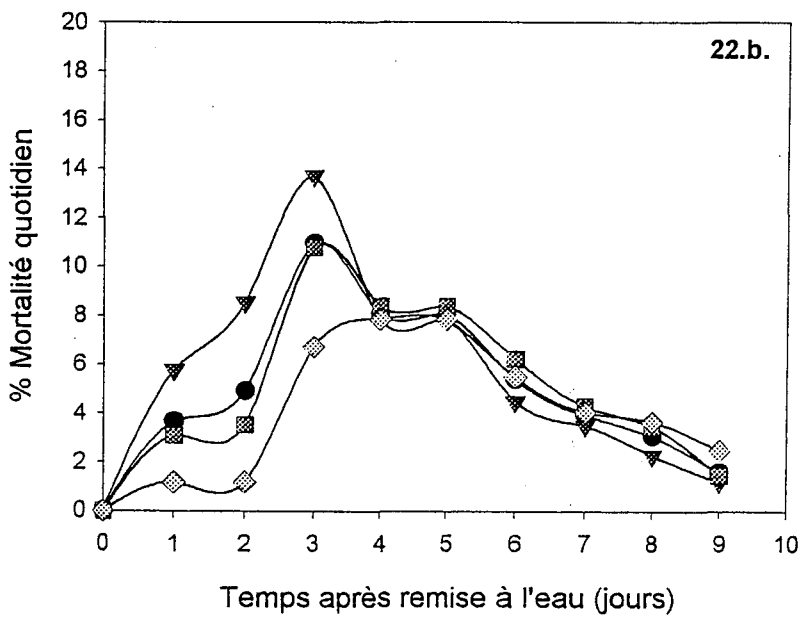
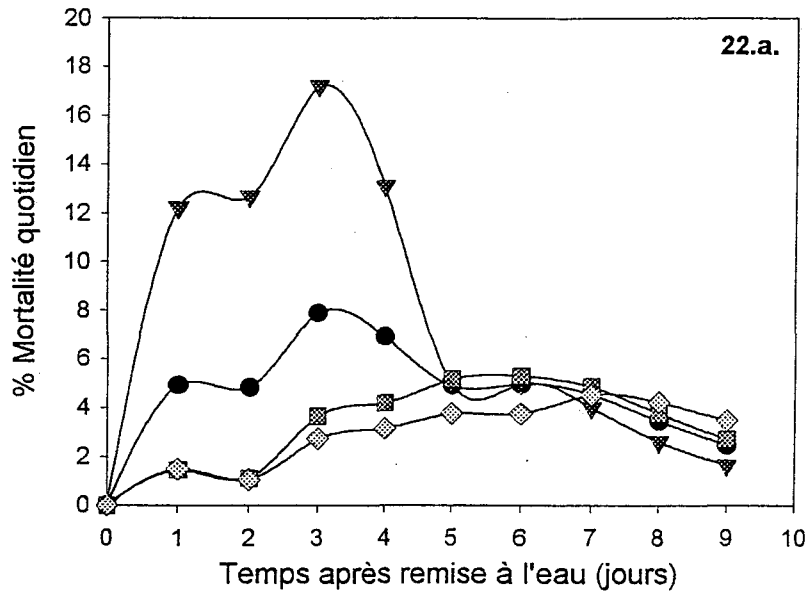


Fig 22. Mortalité quotidienne (%) observée pendant les 9 jours suivant le stress pour du naissain d'écloserie (22.a.) et du naissain de captage naturel (22.b.).
Moyenne globale (○), moyenne CR (▽), moyenne CM (□) et moyenne CL (◇).

C – Population 11

Deux prélèvements sur site ont été effectués avec 15 jours d'intervalle (figure 20). Dans chaque prélèvement, un tamisage a permis de dissocier deux classes, C_R et C_M . La classe C_R du deuxième prélèvement a été scindée en deux parties placées pendant 10 jours à 8°C et à 13°C avant la période de stabilisation à 13°C pendant 5 jours.

Les mortalités provoquées par le stress sont similaires pour les classes C_{R1} et C_{R2} du deuxième prélèvement (respectivement 75,67% et 75,50%), résultat plus faible que pour la classe C_R du premier prélèvement (89,17%).

En revanche, la classe C_M du deuxième prélèvement exprime une mortalité plus forte que la classe équivalente du 1^{er} prélèvement (respectivement 40,83% et 30,00%).

Les moyennes de mortalité sont dans la catégorie "Moy" des résultats conformes au modèle avec 38,88% pour $C_R - C_M$ du 1^{er} prélèvement; 46,06% pour $C_R - C_M$ et 46,03% pour $C_{R2} - C_M$ du 2^{ème} prélèvement.

5 – Suivi de la cinétique d'apparition des mortalités

Le dénombrement quotidien des mortalités après le stress permet de caractériser leur cinétique d'apparition. La moyenne globale de pourcentage de mortalité quotidien est obtenue à partir des valeurs observées chaque jour (de J_0 à J_9) sur les 41 fractions de population testées (13 C_R , 21 C_M et 7 C_L) (figure 21).

La mortalité cumulée moyenne est de 46,32% répartie sur les 9 jours de suivi. Les mortalités quotidiennes suivent une courbe de type Gaussien et présentent un maximum à J_3 avec une mortalité de 8,86% (19% de la mortalité totale). 50% de la mortalité totale sont exprimés entre J_3 et J_4 . De J_4 à J_9 , le pourcentage de mortalité quotidien décroît régulièrement jusqu'à 2,18%.

La comparaison des cinétiques d'apparition des mortalités pour les différentes classes de population (C_R , C_M et C_L) (figure 21a), révèle des comportements particuliers avant J_5 . Après ces 5 jours de remise à l'eau consécutifs au stress, l'ensemble des fractions de population exprime des mortalités quotidiennes équivalentes.

En moyenne, la classe C_R (13 populations différentes) présente un pic de mortalité accentué à J_3 avec 15,95% de mortalité (26% de la mortalité totale). A J_5 , pour cette classe, 81% de la mortalité totale est exprimée.

Les classes C_M (21 populations différentes) et C_L (7 populations différentes) présentent des cinétiques similaires. La mortalité quotidienne est observée à J_5 avec respectivement 5,97% et 5,51% ce qui représente 16,4% et 16,5% de la mortalité totale. A J_5 , avant la décroissance régulière des mortalités quotidiennes, 55% et 53% de la mortalité totale est exprimée.

La relation entre l'intensité de la réponse au stress après 9 jours et sa précocité peut être caractérisée par la comparaison des comportements de populations qui ont exprimé une mortalité totale importante (> 70%), moyenne (30-70%) ou faible (<30%) (figure 21b). Les populations à forte mortalité (11) présentent un pic de mortalité à J_3 d'une intensité de 17,24% (22% de la mortalité totale), tandis que celles qui expriment une mortalité moyenne (21) réagissent au stress d'une façon, similaire à la moyenne de l'ensemble des populations (pic à J_3 avec 9,39% de mortalité). Les populations les moins sensibles au stress (9) ont une cinétique de mortalité régulière (de 0% à 2,58%) pendant les 9 jours de suivi avec un maximum au 7^{ème} jour.

55% de la mortalité totale sont exprimés à J₃ pour les populations à forte mortalité, à J₅ pour les populations au comportement moyen (30-70%) et à J₆ pour les populations peu sensibles au stress.

L'adaptation de la durée du stress selon le poids du naissain testé que détermine le modèle doit permettre de s'affranchir de l'influence du poids sur la réaction au stress.

La comparaison de l'apparition des mortalités pour des populations de poids différents peut être révélatrice du degré d'indépendance obtenu. La figure 21c montre les cinétiques d'apparition des mortalités pour les classes dont le poids est inférieur à 100mg (n = 12), celles dont le poids est compris entre 100 et 400mg (n = 19) et celles dont le poids est supérieur à 400mg (n = 7).

Ces trois catégories sont notées P_F (poids faibles), P_I (poids intermédiaires), P_E (poids élevés). P_E et P_I présentent un pic à J₃ d'une intensité comparable (respectivement 12,14% et 12,50%) et supérieure à la moyenne globale (8,86%). Pour P_F, la cinétique est plus régulière et toujours inférieure à la moyenne. Le maximum de mortalité quotidienne est exprimé à J₆ avec 3,82%.

Les mortalités cumulées après 9 jours sont de 22,88% pour P_F, 60,80% pour P_I et 50,94% pour P_E. 50% de ces mortalités totales sont exprimées à J₆ pour P_F, à J₄ pour P_I et dès J₃ pour P_E.

Parmi les 16 populations, 11 sont issues d'écloseries (1 à 11) et 5 sont issues de captage naturel (12 à 16). Les figures 22a et b décrivent les cinétiques de mortalité des classes C_R, C_M et C_L pour chacun de ces deux types de naissain (notés Ech et Nat.).

Les différentes classes montrent un comportement différent avant J₅ pour le naissain d'écloserie et avant J₄ pour le naissain de captage naturel.

Pour le naissain d'écloserie C_MEcl et C_LEcl. ont une cinétique similaire avec un maximum de 5,28% à J₆ pour C_MEcl. et de 4,51% à J₇ pour C_LEcl. Leurs mortalités quotidiennes sont inférieures à la moyenne jusqu'à J₅.

La classe C_REcl. exprime une forte mortalité précoce avec un maximum de 17,2% à J₃ (contre 7,88% pour la moyenne).

A J₃, pic de mortalité de la moyenne, l'écart entre C_REcl. et C_LEcl. est de 14,47%.

Le naissain de captage naturel présente un écart entre C_RNat. et C_LNat. qui se situe de part et d'autre de C_MNat, ce dernier exprimant une mortalité proche de la moyenne.

Les mortalités totales exprimées par Moy.Ecl. et Moy. Nat. sont respectivement de 44,78% et 49,65%.

II - D - DISCUSSION

La technique de stress mise au point, et appliquée pour provoquer 50% de mortalité, a permis d'obtenir, parmi 41 échantillons, des résultats de mortalité s'échelonnant de 1,83% à 93,61%.

Quand on considère les performances de croissance de chaque échantillon avant le stress, croissance rapide (Cr), moyenne (Cm) ou lente (Cl), on constate une tendance à la corrélation positive entre vitesse de croissance et fragilité. En effet, pour la majeure partie des populations testées (10/12), on note que la mortalité exprimée par la classe Cr est supérieure à celle de Cm, elle-même plus importante que celle de Cl.

Le classement des échantillons dans trois catégories, "Sup", Moy" et "Inf" selon leur comportement vis à vis de la population de référence, permet de montrer que sur les 10 échantillons classés "Sup" (Mortalité supérieure à la limite du modèle). 8 sont des prélèvements Cr (Croissance rapide) et que, sur les 14 échantillons classés "Inf" (Mortalité inférieure à la limite basse du modèle), on ne retrouve que des prélèvements Cm ou Cl (Croissance moyenne ou lente). Ces constatations abondent dans le sens d'une plus grande fragilité du naissain en phase de croissance rapide.

La pondération de la mortalité des différentes classes (Cr, Cm ou Cl) permet de donner une moyenne pour la population qui tient compte de la répartition des individus en nombre (pour 100 individus, 15 sont Cr, 70 Cm et 15 Cl). Parmi ces mortalités moyennes pondérées pour les 16 populations étudiées, on retrouve 12 populations classées "Moy" (Mortalité comprise entre les limites hautes et basses du modèle), et 4 populations classées "Inf". La pondération gomme la fragilité exprimée par les classes "Cr" puisqu'on ne retrouve pas de population classée "Sup". Malgré tout, il est possible d'envisager que dans les conditions naturelles les fractions de population qui ont la croissance la plus forte sont aussi celles qui présentent le moins de résistance au stress, et qui peuvent déclencher un épisode de mortalité s'étendant à l'ensemble de la population.

L'absence de population dans la catégorie "Sup" (Mortalité supérieure à la limite haute du modèle), parmi les 16 étudiées, pourrait être expliquée par deux phénomènes. La classification des populations dans les trois catégories "Sup", "Moy" et "Inf" se fait par rapport à une unique population de référence qui exprime peut être une certaine fragilité vis à vis du stress. Cette fragilité qui surévalue la mortalité provoquée par le stress, rend alors difficile la caractérisation de populations moins résistantes.

La deuxième cause de la répartition de ces populations (12 "Moy" et 4 "Inf") peut être due au degré de précision du modèle. En effet, les limites basses et hautes sont, pour la majeure partie des poids moyens individuels (P), de 30% et 70%.

Seules les populations qui expriment une mortalité située en dehors de cet intervalle (30% - 70%) peuvent être définies comme ayant un comportement différent de celui de la population de référence.

Cet intervalle est inhérent à la variabilité des résultats de mortalités entre les réplicats lors de la mise au point de stress. Cette variabilité étant minimisée par l'échantillonnage de 3 x 200 individus, et par l'établissement d'un protocole de stress précis, on peut émettre l'hypothèse qu'elle soit d'ordre physiologique dans une même population.

L'établissement du modèle de réaction au stress à 45°C en bain-marie d'eau douce a consisté à adopter la durée du temps d'application (T) selon le poids moyen individuel (P) pour obtenir 50% de mortalité. Les expérimentations menées sur les 16 populations différentes peuvent être un témoin du degré d'indépendance vis à vis du poids atteint grâce au modèle. La faible corrélation entre la mortalité provoquée par le stress (M) et le poids individuel (P), avec un coefficient de détermination (r^2) de 0,29, est révélatrice de l'affranchissement de l'influence du poids. Ceci est encore vrai quand on examine la cinétique de mortalité pour des populations dont le poids est différent (Pe : Poids élevé > 400mg, Pi = Poids intermédiaire compris entre 100 et 400mg et Pf : Poids faibles inférieurs à 100mg). En effet, les cinétiques de mortalités de Pi et Pe sont similaires avec un pic de mortalité à J3 et on remarque que les mortalités cumulées sont plus importantes pour les poids intermédiaires (Pi) que pour les poids élevés (Pe).

Lors de la mise au point de la technique, l'influence du régime thermique précédent le stress a été à l'origine de l'intégration dans le protocole d'une période de stabilisation de 5 jours à 13°C. Quelques résultats obtenus lors des expérimentations sur les 16 populations différentes permettent de donner des éléments d'évaluation de l'influence de l'historique thermique (et donc de sa croissance) sur la réaction au stress. En effet, dans la population 3, la fraction testée après un mois de blocage de la croissance exprime une mortalité sensiblement plus faible que le reste de la population (respectivement 9,0% et 67,9%).

Pour la population 8, les deux fractions de la population placées à 19°C en eau de mer ou en eau de forage pendant 10 jours expriment une mortalité après un stress similaire à celle relevée sur la fraction stressée initialement.

Dans la population 11, les deux fractions Cr1 et Cr2 réagissent de façon identique au stress après avoir été placées, pendant 10 jours, respectivement à 5°C et 13°C. L'influence de

l'historique thermique semble donc ne pas être négligeable quand le régime de température est modifié pendant des périodes assez longues (1 mois) qui peuvent entraîner des modifications de vitesse de croissance. En revanche, quand le naissain est élevé pendant quelques jours (10 jours) dans des conditions différentes (5°C ou 19°C), ce qui était le cas lors de l'établissement du modèle, la réaction au stress ne semble pas varier.

Parmi les 16 populations qui ont servi à tester la technique de stress, 11 appartiennent à la catégorie, naissain issu d'écloserie et 5 au naissain de captage naturel. En moyenne les populations de captage naturel expriment une mortalité plus élevée (49,83%) que celles d'écloserie (39,82%) mais expriment toutes une mortalité comprise entre les limites basses et hautes du modèle (catégorie "Moy").

Quand on examine le comportement des différentes classes (Cr, Cm ou Cl) dans une même population, les fractions des populations de captage naturel semblent réagir au stress de façon plus homogène que celles de naissain d'écloserie. En effet, l'écart entre les mortalités exprimées par les classes Cr (Croissance rapide) et Cl (Croissance lente), est de 45,03% en moyenne pour les populations issues d'écloserie alors qu'il n'est que de 6,7% en moyenne pour les populations naturelles.

Cette homogénéité des résultats peut être due à la technique de prélèvement. En effet, le captage sur collecteur est réalisé tout au long de la période de ponte dans le milieu naturel. La population testée ici contient donc du naissain issu de pontes successives. Lors du tamisage, dans la classe Cm (Croissance moyenne) par exemple, il est possible d'avoir du naissain de la classe Cl (Croissance lente) d'une 1^{ère} ponte, de la classe Cm (Croissance moyenne) d'une 2^{ème} ponte et de la classe Cr (Croissance rapide) d'une ponte plus récente. Ce mélange d'états physiologiques liés à la croissance n'existe pas pour le naissain d'écloserie où on distingue une différence de comportement entre le classe Cr notamment et les autres.

Le suivi de la cinétique d'apparition des mortalités pendant les 9 jours consécutifs au stress permet de décrire un comportement général des populations de naissain testées. Après une première déclaration de mortalité le 1^{er} jour, le deuxième jour s'accompagne d'un ralentissement de l'apparition de mortalité. Le 3^{ème} jour la mortalité maximale se déclare puis décroît ensuite du 4^{ème} au 9^{ème} jour. Ce profil étant probablement le reflet de perturbations physiologiques ou pathologiques du naissain, la technique de stress mise au point ici pourrait être un outil pour la compréhension du phénomène de réaction au stress du naissain.

En effet, des travaux concernant les hémocytes de *Crassostrea virginica* montrent que la synthèse de protéines de stress (notamment SP70) est variable selon l'intensité du choc thermique mais aussi selon sa durée (Tirard C.T., 1995).

Le profil général de la cinétique de mortalité peut être détaillé selon les classes Cr, Cm ou Cl ou selon le taux de mortalité total cumulé (inférieur à 30%, compris entre 30 et 70% ou supérieur à 70%). Ces observations permettent de noter une relation entre l'intensité et la précocité de la réponse. En effet, 50% de mortalité totale est exprimée au 3^{ème} jour pour les échantillons Cr (Croissance rapide) et pour ceux qui présentent plus de 70% de mortalité. Ces 50% de mortalité totale ne sont atteints qu'au 5^{ème} jour pour les classes Cm (Croissance moyenne) et Cl (Croissance lente) et pour les fractions de population exprimant une mortalité totale comprise entre 30% et 70%. Pour les échantillons dont la mortalité cumulée est inférieure à 30%, 50% de cette mortalité observée est seulement au 6^{ème} jour. De la même manière que pour le profil de cinétique, la cause de cette possible relation entre l'intensité et la précocité de la réponse au stress est probablement due à des caractéristiques physiologiques ou à des niveaux de sensibilité à un pathogène différent d'une population à l'autre.

CONCLUSION

Ce travail a pour but de participer à la mise au point d'un outil d'appréciation de l'état de santé du naissain chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Le choc thermique en eau douce et au bain-marie, choisi comme stress environnemental permet de caractériser un degré de rusticité du naissain à des conditions extrêmes par un calcul de la survie des différents lots testés. L'évaluation de la reproductibilité de cette technique peu coûteuse et simple à mettre en œuvre s'est traduite par l'établissement d'un protocole standard de stress. Ce protocole est caractérisé par une période de stabilisation du naissain avant le stress, par l'intensité du choc thermique, la méthode d'échantillonnage qui permet l'évaluation de la robustesse de la technique, et la définition de la méthode de suivi des mortalités consécutives au stress.

L'application de ce protocole standard a permis d'obtenir un modèle de la réaction d'une population de naissain pour des tailles variant de 4mm (T2) à 20mm (T12). Ce modèle permet de définir le temps d'application du stress nécessaire pour provoquer 50% de mortalité sur le naissain selon le poids moyen individuel (mg) de la population testée.

La dernière phase de ce travail a consisté à tester cette technique de stress sur des populations différentes par leur origine (naissain d'écloserie, naissain de captage naturel), ou leur site de production. L'application de la technique pour provoquer 50% de mortalité a permis d'obtenir des réactions de ces populations variant de 2% à 90% de mortalité, ce qui montrerait la sensibilité élevée de cette technique. La distinction, dans ces populations, de classes définies par leur « potentiel de croissance » (rapide, moyen ou lent), permet de noter une tendance à la plus grande fragilité à ce stress des classes dites à croissance rapide. Le suivi de la cinétique d'apparition des mortalités après le stress semble dégager un profil type de réaction du naissain. Dans la mesure où ce profil s'avérerait caractéristique de l'ensemble du naissain de *Crassostrea gigas*, la technique de stress thermique pourrait être un outil utile à la compréhension de variations physiologiques, biologiques ou à l'apparition de phénomènes pathologiques consécutifs au stress.

Cependant, la validation de cette technique passe par plusieurs voies d'approfondissement

- La multiplication des expérimentations sur des populations aux caractéristiques différentes (origines génétiques ou géographiques, conditions d'élevage, phases de croissance au moment du stress).

- L'adaptation de l'intensité du choc thermique au naissain de plus grosse taille (>1g) pour prendre en compte certaines populations issues du captage naturel lors du relevage des collecteurs dans le milieu naturel ou du naissain en fin d'élevage en nurserie.

Ainsi, cette technique simple et peu coûteuse (bain-marie d'eau douce à 45°C), et qui donne un diagnostic rapide (14 jours), après validation, pourrait trouver son utilité dans plusieurs domaines.

En effet, elle pourrait participer pour les professionnels à l'estimation du niveau de rusticité des lots de naissain, avant la vente ou la mise à l'eau.

Il pourrait également s'appliquer dans le domaine de la recherche pour d'une part tenter de mieux comprendre les causes de l'expression de la mortalité par choc thermique chez certains individus et d'autre part, de fournir un outil de sélection de souches d'huîtres creuses plus tolérantes aux chocs thermiques qui peuvent être conséquents en période estivale dans les secteurs de production sur estran.

BIBLIOGRAPHIE

Baud J.P., (1991). Utilisation des eaux salées souterraines en baie de Bourgneuf pour le prégrossissement intensif de mollusques filtreurs en nourricerie. Mémoire présenté le 20 décembre 1991 pour obtenir le diplôme de recherche universitaire de l'Université des Sciences de Nantes, 65p.

Baud J.P., P.G Fleury et J Mazurié (1997). Outils d'appréciation de l'état de santé chez les bivalves. Communication orale et écrite, 5p. Journées du comité de programme RA/DRV, 26 et 27 juin à Erdeven.

Chiffolleau Y. (1995). Déterminisme de la mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition d'élevage intensif. IFREMER, rapport de la DRV, 60p.

Glemarec Y.M. (1996). Influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la mortalité de *Crassostrea gigas*. Rapport de stage DESS, LBBM/UFR Sciences de la vie, Université de Caen/IFREMER Bouin. 43p.

Kay R. (1996). Stress in juveniles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) induced by exposure to air at high temperature. Report of Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Laboratory Conwy. N. Wales.12p.

Levinton J.S. and H.H. Lassen (1978). Experimental mortality studies and adaptation at the lap locus in *Mytilus edulis*. Marine organisms : genetics, ecology and evolution. Plenum Press, N.Y., U.S.A.: 229-254p.

Tirard C.T. (1995). Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. Fish and Shellfish Immunology, 5: 9-25p.