

**UNIVERSITE DE RENNES1**  
**U.F.R. - S.V.E.**  
Campus de Beaulieu  
Avenue du Général Leclerc  
35 042 RENNES Cedex

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE**  
**AGRONOMIQUE DE RENNES**  
Sciences Animales  
65, rue de St-Brieux  
35042 RENNES Cedex

---

## **MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

### **DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (DEA)**

**DEA 910076 : BIOLOGIE ET PRODUCTIONS ANIMALES**  
**OPTION BIOLOGIE AQUACOLE**  
**ANNEE UNIVERSITAIRE 2003-2004**

## **ECOPHYSIOLOGIE DE L'HUITRE CREUSE**

***Crassostrea gigas* (THUNBERG) :**

### **ANALYSE BIOENERGETIQUE DE LA GAMETOGENESE** **SOUS TROIS CONDITIONS TROPHIQUES DISTINCTES**

**de M. BOURLES Yves**

***Soutenu le 31 août 2004 (Université de Rennes1)***

**Organisme d'accueil : IFREMER (2 laboratoires)**

**CREMA**  
**Centre de Recherche sur les**  
**Ecosystèmes Marins et Aquacoles**  
Pl. du Séminaire, B.P. 5  
35137 L'HOUMEAU

**Station expérimentale d'Argenton**  
**DRV/RA/LPI Brest**  
Presqu'île du Vivier

**LANDUNVEZ**

**Maîtres de stage : ALUNNO-BRUSCIA Marianne (CREMA),**  
**POUVREAU Stéphane (Station Expérimentale d'Argenton).**

## Résumé

L'élevage de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, occupe une place prépondérante dans les productions aquacoles françaises avec un chiffre d'affaire de 220 millions d'euros en 2000. Depuis une quarantaine d'années, mais de plus en plus récurrents depuis 20 ans, des phénomènes de mortalités massives affectent périodiquement les cheptels d'huîtres creuses sur le littoral français en période estivale. Afin de comprendre ces phénomènes et tenter d'y remédier, l'IFREMER a mis en place un programme pluridisciplinaire centré sur l'étude des mortalités estivales d'huîtres creuses : MOREST.

L'étude présentée ici fait partie des approches expérimentales 2004 de ce programme et vise à analyser sur du naissain d'huître creuse, et en conditions contrôlées, les relations entre gamétogenèse, statut bioénergétique et mortalités des huîtres. Pour cela, une population d'huîtres ( $n = 2550$ ) âgée de 7 mois en début d'expérience (avril) a été soumise à trois conditionnements différents : une condition nutritive pauvre (CN0) permettant juste le maintien de l'intégrité de l'organisme, une condition nutritive faible (CN1) permettant une croissance modérée et une gamétogenèse faible et une condition nutritive riche (CN3) favorisant la croissance et surtout la gamétogenèse. Ces trois lots ont été suivis d'avril à juillet en écophysiologie, bioénergétique, biométrie et histologie. Il ressort que plus la nourriture est importante (condition CN3), plus le naissain investit dans sa gamétogenèse au printemps, plus son bilan énergétique devient négatif en été et s'effondre au moment de l'émission des gamètes, et plus les mortalités sont importantes ( $> 51\%$  en CN3). Cette situation défavorable est très atténuée en condition CN1 et inexistante en condition CN0. Trois phases critiques de la reproduction chez le naissain sont clairement identifiées : (1) en période de gamétogenèse active pendant laquelle l'huître consacre toute son énergie à la gamétogenèse ; (2) au maximum de la gamétogenèse, phase pendant laquelle le bilan énergétique devient négatif, et (3) au moment de l'émission des gamètes pendant lequel l'huître s'arrête de consommer mais augmente son métabolisme respiratoire de façon accrue. Ce travail confirme les résultats antérieurs et apporte de nouveaux éléments utiles à la compréhension des relations entre gamétogenèse et mortalités estivales.

**Mots clés :** *Crassostrea gigas*, naissain, mortalité estivale, gamétogenèse, bilan énergétique.

## Abstract

The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is a major cultivated shellfish resource in France, which represented a turnover of 220 millions € in 2000. Mass mortalities among this commercially important bivalve species are known in France since about 40 years, but have become a recurring obstacle for growers of oysters and a threaten for commercial production along the French Atlantic coast in the last 20 years. Since 2000, IFREMER is carrying out a multidisciplinary program, MOREST, to understand the problem of summer mortality, and possibly to solve it.

As part of the MOREST program, the present study focuses on the relationship between gametogenesis, metabolism and mortality of 7-month, i.e. juvenile, *C. gigas*. In April 2004, a total of 2250 oysters were separated in 3 groups and fed 3 different food concentrations: a poor food level (CN0) which fairly enabled positive growth; a low food level (CN1) which allowed a moderate growth and a weak gametogenesis; a high food level (CN3) which promoted both somatic and gonadic growth. From April to July 2004, data about oyster ecophysiology, metabolism, histology and biometry were collected on these 3 groups at a regular basis. Results show that the higher the food level is (CN3), the more juvenile oysters invest in gonad development, the more their metabolic balance ("scope for growth") becomes depressed before falling down drastically, and the more the oysters die-off. At CN3, mortality rates reach up to 51 %. At low and poor food levels, gonad development of oysters is slightly positive (CN1) or almost null (CN0), whereas their scope for growth is fairly null and mortality does not exceed 4 and 9 %, respectively for CN0 and CN1. Three major stages during gametogenesis may be critical for juvenile oysters: (1) a phase of active gametogenesis when juveniles allocate most of their energy to gonad development; (2) when gametogenesis reaches a maximum, while the energetic budget of oysters becomes negative; (3) a final phase which coincides with gamete emission when oyster food consumption stops, but their respiratory demand increase sharply. This study confirms previous results obtained on adult oysters, and provides new insights for understanding the relationship between reproduction and summer mortality.

**Keywords:** *Crassostrea gigas*, spat, summer mortalities, gametogenesis, energy budget.

# REMERCIEMENTS

Ce stage d'initiation à la recherche s'est déroulé au sein de l'IFREMER, au Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Marins et Aquacoles (CREMA, UMR IFREMER/CNRS) de l'Houmeau (17) puis à la Station Expérimentale d'Argenton du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés marins (DRV/RA/LPI) de Brest (29). Il s'est révélé être une formidable expérience scientifique de part le dynamisme et l'enthousiasme de nombreuses personnes que je tiens à remercier sincèrement :

- ∞ M. Saligaut Christian, responsable de la formation du DEA « Biologie et Productions Animales » (option Biologie Aquacole), qui a eu confiance en ma candidature et m'a permis de réaliser cette formation à l'Université de Rennes I.
- ∞ M. Samain Jean-François et M. Nicolas Jean-Louis, respectivement correspondant d'IFREMER pour le DEA BPA et responsable du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés marins du centre de Brest qui m'ont permis d'effectuer mon stage de DEA au sein d'IFREMER.
- ∞ Marianne Alunno-Bruscia et Stéphane Pouvreau, mes deux responsables scientifiques, du CREMA et de la station Expérimentale d'Argenton, qui ont su me concocter un stage de DEA rempli d'expériences, scientifiques et humaines (la seconde donnant un sens à la première). Un grand merci pour votre soutien permanent, votre disponibilité dans les moments les plus délicats, votre dynamisme contagieux et votre passion pour la vie et la biologie marine qui m'ont tant apporté pendant ces neuf mois. Nos missions, scientifiques et aquatiques, ont été d'une grande richesse.
- ∞ Le personnel du CREMA et de l'IFREMER (Brest, La-Trinité-sur-mer, Arcachon) pour leur accueil et leur enthousiasme, leur discussions passionnantes et leur bons conseils, leur sympathie et leur aide de tous les instants.
- ∞ Enfin, les amis (Titi, Tétel, Martin, Rahma, la familia, ...) de tous les jours qui ont rempli ces neuf mois (et tant d'autres) de vie et de joie. Merci aussi pour votre patience et votre fidélité que je solliciterai peut-être encore ces trois prochaines années. Dans tous les cas, rendez-vous rapidement au bord, sur, ou sous la mer pour continuer l'aventure.

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>iv</b>
<b>GLOSSAIRE ET ABBREVIATIONS .....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>3</b>
1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET PLAN EXPÉRIMENTAL .....	3
1.1. <i>Matériel biologique et salle d'élevage</i> .....	3
1.2. <i>Plan expérimental</i> .....	3
2. SUIVI DES PARAMÈTRES HYDROLOGIQUES .....	4
3. SUIVI DE LA CROISSANCE ET DE LA GAMÉTOGÈNESE.....	7
3.1. <i>Calendrier d'échantillonnage</i> .....	7
3.2. <i>Variables liées à la croissance somatique</i> .....	7
3.3. <i>Estimation du développement de la gonade</i> .....	8
4. SUIVI DE L'ÉCOPHYSIOLOGIE ET DU BILAN ÉNERGÉTIQUE.....	8
4.1. <i>Principe</i> .....	8
4.2. <i>Mesures de la consommation et de la respiration</i> .....	10
4.3. <i>Récolte des bio-dépôts et mesure de l'efficacité d'absorption (AE, %)</i> .....	10
4.4. <i>Calcul du potentiel de croissance ou « Scope For Growth »</i> .....	12
5. ARCHIVAGE ET TRAITEMENT DES DONNÉES.....	12
<b>RESULTATS .....</b>	<b>13</b>
1. SUIVI DU MILIEU HYDROLOGIQUE DES BACS D'ÉLEVAGE .....	13
1.1. <i>Salinité et température</i> .....	13
1.2. <i>Environnement trophique</i> .....	14
1.3. <i>Concentration en oxygène</i> .....	14
2. SUIVI DE LA CROISSANCE ET DE LA GAMÉTOGÈNESE.....	15
2.1. <i>Suivi de la mortalité</i> .....	15

2.2. <i>Suivi de la croissance</i> .....	16
2.3. <i>Suivi de la gamétogenèse</i> .....	18
3. SUIVI DES FONCTIONS ÉCOPHYSIOLOGIQUES.....	19
3.1. <i>Consommation individuelle des huîtres</i> .....	19
3.2. <i>Respiration individuelle des huîtres</i> .....	20
3.3. <i>Efficacité d'absorption</i> .....	21
4. SUIVI DU BILAN ÉNERGÉTIQUE.....	22
5. EVALUATION DU COÛT DE LA GAMÉTOGENÈSE.....	23
5.1. <i>Respiration individuelle au cours des différentes phases de la gamétogenèse</i> .....	23
5.2. <i>Sollicitation de la branchie par la respiration individuelle</i> .....	24
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>25</b>
1. ANALYSE ET CRITIQUE DE LA MÉTHODOLOGIE.....	25
1.1. <i>Aspects zootechniques</i> .....	25
1.2. <i>Cohérence des conditions</i> .....	26
1.3. <i>Intérêt des trois conditions expérimentales mises en place</i> .....	26
1.4. <i>Calcul en écophysiologie</i> .....	26
1.5. <i>Mortalité différentielle entre les conditions expérimentales</i> .....	27
2. ECOPHYSIOLOGIE DE <i>C. GIGAS</i> .....	28
3. NAISSAIN ET GAMÉTOGENÈSE.....	29
4. LES CAUSES POTENTIELLES DES MORTALITÉS ESTIVALES.....	29
4.1. <i>Mortalités estivales en période de gamétogenèse active : le rôle des hémocytes ?</i> .....	29
4.2. <i>Mortalités estivales en fin de gamétogenèse : l'effondrement du bilan énergétique ?</i> .....	30
4.3. <i>Mortalités estivales et émission des gamètes</i> .....	31
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>vi</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>ix</b>

# Liste des Figures

<u>Figure 1</u> :	Schéma de la salle expérimentale .....	4
<u>Figure 2</u> :	Cycles saisonniers moyens de température et de photopériode à Marennes Oléron.....	4
<u>Figure 3</u> :	Automate <i>MAREL-Argenton</i> .....	5
<u>Figure 4</u> :	Présentation des quatre groupes de tissus, isolés après dissection.....	5
<u>Figure 5</u> :	Relevés des concentrations en chl <i>a</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) d'un bac expérimental et de son témoin .....	7
<u>Figure 6</u> :	Relevés des concentrations en oxygène dissous ( $\text{mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ ) d'un bac expérimental et de son témoin .....	7
<u>Figure 7</u> :	Dispositif de séparation des pseudo fèces et des fèces .....	8
<u>Figure 8</u> :	Variations temporelles de la température et de la salinité au cours de la gamétogenèse.....	9
<u>Figure 9</u> :	Evolution des concentrations en chl <i>a</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) des trois conditions nutritives .....	9
<u>Figure 10</u> :	Evolution des concentrations en oxygène dissous ( $\text{mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ ) des trois conditions nutritives et d'un bac témoin.....	10
<u>Figure 11</u> :	Evolution des mortalités instantanée et cumulée pour chaque condition nutritive.....	10
<u>Figure 12</u> :	Evolution de la masse totale individuelle des huîtres pour chaque condition nutritive .....	10
<u>Figure 13</u> :	Evolution de la masse de chair humide des huîtres pour chaque condition nutritive .....	11
<u>Figure 14</u> :	Evolution de l'Indice de condition Afnor pour chaque condition nutritive .....	11
<u>Figure 15</u> :	Evolution du pourcentage d'occupation de la gonade dans la masse viscérale, pour chaque condition nutritive.....	11
<u>Figure 16</u> :	Evolution de la masse estimée de gonade pour chaque condition nutritive.....	12
<u>Figure 17</u> :	Evolution de la consommation individuelle ( $10^6\text{cell}\cdot\text{h}^{-1}$ ) des huîtres, pour chaque condition nutritive .....	12
<u>Figure 18</u> :	Evolution de la respiration individuelle ( $\text{mg O}_2\cdot\text{h}^{-1}$ ) des huîtres, pour chaque condition nutritive .....	12
<u>Figure 19</u> :	Evolution de l'efficacité d'absorption des huîtres pour chaque condition nutritive .....	13
<u>Figure 20</u> :	Evolution du potentiel de croissance (SFG) des huîtres pour chaque condition nutritive.....	13
<u>Figure 21</u> :	Evolution de la respiration individuelle entre trois phases de la maturation sexuelle.....	14
<u>Figure 22</u> :	Evolution du rapport de la respiration individuelle sur la masse de branchie .....	14
<u>Figure 23</u> :	Evolution de la concentration en chl <i>a</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) des trois bacs témoins .....	15
<u>Figure 24</u> :	Evolution de la croissance en chair et de l'indice Afnor des populations d'huîtres CN3 et de la zone ostréicole de Fort Espagnol (Morbihan) .....	16
<u>Figure 25</u> :	Résultat d'une infection expérimentale réalisée sur trois lots d'huîtres présentant un bilan énergétique décroissant.....	19

## Glossaire & Abréviations

- Fitness : Qui qualifie la capacité d'un individu à assurer une descendance viable et féconde ; relatif à la capacité d'un individu d'une population, à maintenir ses gènes au sein de cette population.
- Germen : Ensemble des cellules reproductrices (ou Gamètes) d'un être vivant, par opposition au reste de l'organisme (ou Soma).
- Soma : Ensemble des cellules non-reproductrices d'un organisme.
- Hypertrophie : (Méd.) Augmentation de volume, de cellules ou d'un organe, avec ou sans altération anatomique. Par extension : développement excessif, anormal.
- Pléthorique : Abondant, surchargé, excessif.

- MAREL = Automate de mesure des paramètres hydrobiologiques de l'eau, à la Station Expérimentale d'Argenton.
- CN0 / 1 / 3 = Condition Nutritive très faible (CN0), faible (CN1) et forte (CN3).
- MCHS ..... = Masse de Chair Sèche.
- AE ..... = Efficacité d'absorption (Absorption Efficiency).
- R..... = Respiration individuelle.
- C..... = Consommation individuelle.
- SFG..... = Potentiel de croissance (Scope For Growth).

# INTRODUCTION

L'ostréiculture en France n'a cessé de se développer au cours du 20<sup>ème</sup> siècle malgré plusieurs épizooties qui ont décimé, dans les années 70, successivement les deux espèces cultivées : l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné), puis l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Lamarck). Face à ces deux épizooties, l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) a été importé du Japon et son élevage s'est rapidement développé pour atteindre 150 000 t/an au milieu des années 90. Actuellement, la production se situe autour de 128 000 t/an (Anonyme, 2004) et concerne 4 500 entreprises pour un chiffre d'affaires dépassant les 200 millions d'euros (Anonyme, 2003). Par contre, la production d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, reste toujours très minoritaire, avec un tonnage de 1 300 t/an, ce qui maintient l'ostréiculture française en situation de monoculture et l'expose au risque potentiel d'une nouvelle épizootie.

Or, des phénomènes de mortalités massives, connus depuis une quarantaine d'années, sont observés de plus en plus fréquemment chez cette espèce depuis 20 ans. Ces phénomènes apparaissent le plus souvent pendant l'été, en pleine période de gamétogenèse et à des températures élevées. Beaucoup d'auteurs relient ces phénomènes de mortalités au processus de la reproduction, aussi bien chez le naissain lors de sa première maturation sexuelle que chez les huîtres adultes (e.g. Soletchnik *et al.*, 1997; Goulletquer *et al.*, 1998; Pouvreau *et al.*, 2002). Les hypothèses avancées font souvent appel à un déséquilibre d'ordre énergétique : les températures élevées en été favorisent une augmentation du métabolisme basal des individus alors que (1) l'énergie acquise par des animaux en pleine gamétogenèse est allouée prioritairement au compartiment germinale (Lucas, 1992) et que (2), à cette période, les réserves énergétiques sont au plus bas (e.g. Li *et al.*, 2000 ; Berthelin *et al.*, 2000). Il est donc proposé qu'un affaiblissement énergétique des huîtres pendant la gamétogenèse les rende moins résistantes aux différents stress du milieu (thermiques, trophiques, pathologiques et liés à la pollution).

Des phénomènes de mortalités estivales ont également été rapportés pour l'huître creuse (*C. gigas*) aux Etats-Unis (e.g. Perdue *et al.*, 1981 ; Cheney *et al.*, 2000 ; Shamseldin *et al.*, 1997), de même que pour l'huître américaine *C. virginica* (e.g. Friedman *et al.*, 1998) et la moule bleue d'élevage (*Mytilus edulis*) au Canada (e.g. Emmett, 1984 ; Mallet *et al.*, 1990 ; Myrand & Gaudreault, 1995 ; Tremblay *et al.*, 1998). Les facteurs, hydrologiques et/ou biologiques, susceptibles d'expliquer ces mortalités estivales semblent être multiples, et leur influence respective, voire leurs effets combinés, peuvent être variables selon les sites. Parmi les principaux facteurs évoqués, figurent le statut reproducteur des individus (Perdue *et al.*, 1981 ; Myrand *et al.*, 2000 ; Pouvreau *et al.*, 2002, 2003), les températures élevées (e.g. Soletchnik *et al.*, 1997 ; Shamseldin *et al.*, 1997 ; Friedman *et al.*,

1998), des dessalures fréquentes (Calvo *et al.*, 1999), des phénomènes d'hypoxie (Mazouni *et al.*, 1996), des déficits trophiques (Tremblay *et al.*, 1998) ainsi que la présence de pathogènes (Friedman & Hedrick, 1991 ; Bower *et al.*, 1994 ; Chu *et al.*, 1996).

C'est dans ce contexte que l'IFREMER a lancé en 2000 le programme pluridisciplinaire de recherche MOREST (MORTalités ESTivales) pour comprendre, prédire et remédier à ces phénomènes de mortalités estivales touchant *C. gigas* en France. Les résultats de MOREST obtenus jusqu'alors tendent à confirmer l'existence d'un modèle multifactoriel d'interactions entre l'environnement, l'état physiologique de l'huître, son origine génétique et la virulence de pathogènes opportunistes. Sur les deux premiers aspects, il a été montré en conditions expérimentales (Pouvreau *et al.*, 2002) qu'un environnement trophique riche au printemps pendant la gamétogenèse favorise l'hypertrophie de la gonade et que sur un plan bioénergétique, cette hypertrophie se traduit par un déséquilibre entre les voies d'acquisition de l'énergie (baisse de l'efficacité d'absorption) et les voies de dépenses métaboliques (augmentation de la respiration). Ce déséquilibre se mesure par un potentiel de croissance ou « Scope For Growth » (SFG), décroissant avec la gamétogenèse, voire négatif au maximum de la maturation sexuelle. Cet état de déficit énergétique serait alors un terrain favorable à l'apparition des mortalités estivales.

Dans le cadre de MOREST, les résultats expérimentaux acquis à la Station Expérimentale d'Argenton jusqu'en 2003 concernaient aussi bien des populations d'huîtres à base génétique large (Pouvreau *et al.*, 2002) que des familles issues de sélection génétique (Coquard, 2003), et toujours des individus âgés de plus d'un an, c'est-à-dire ayant déjà subi une saison de reproduction. Or, il est reconnu que les mortalités estivales touchent en premier lieu le naissain dans sa première année de maturation (*e.g.* Maurer & Borel, 1986 ; Soletchnik *et al.*, 1997). Par conséquent, cette année, l'objectif de la présente étude est de confirmer et d'affiner ces résultats sur du naissain, *i.e.* sur une population d'huîtres âgées de moins d'un an en début de maturation. Plus précisément, ce travail vise à étudier, sur une population homogène d'huîtres juvéniles en début de suivi, les différences physiologiques induites par trois conditions trophiques distinctes au cours d'un cycle de gamétogenèse (*i.e.* de la multiplication germinale à l'émission des gamètes) : (1) un niveau de nourriture très faible pour lequel la croissance et le développement de la gonade seront minimaux voire nuls; (2) un niveau de nourriture faible permettant la croissance et un développement modéré à normal de la gonade (eaux océaniques côtières ou baie oligotrophe), et (3) un niveau de nourriture élevé favorisant l'hypertrophie de la gonade (eaux côtières estuariennes ou baie eutrophe).

# MATERIELS & METHODES

## 1. Matériel biologique et plan expérimental

### 1.1. Matériel biologique et salle d'élevage

Les huîtres utilisées dans cette étude sont issues du captage naturel de naissain du mois d'août 2003, dans le bassin d'Arcachon (« Grattis d'Arcachon »). En mars 2004, ce naissain âgé de 7 mois a ensuite été entreposé sur des parcs ostréicoles en rivière d'Auray (Morbihan). En avril 2004, cette population a été partagée en plusieurs sous-populations destinées à différentes expérimentations du programme 2004 de MOREST. Une sous-population d'environ 2 500 huîtres a été transférée le 6 avril 2004 à la Station Expérimentale d'Argenton pour la réalisation de cette étude. Après une semaine de quarantaine, trois lots homogènes de 816 animaux chacun ont été constitués. Chaque lot, destiné à un conditionnement expérimental différent, a ensuite été placé dans un bac (cf. ci-dessous). L'ensemble des bacs d'élevage sont vidés et lavés à l'eau douce trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi). Une inspection visuelle est réalisée sur tous les animaux, qui sont également rincés et re-mélangés. Le nombre d'individus morts par bac d'élevage est relevé et permet d'établir un suivi de mortalité sur toute la période de l'étude.

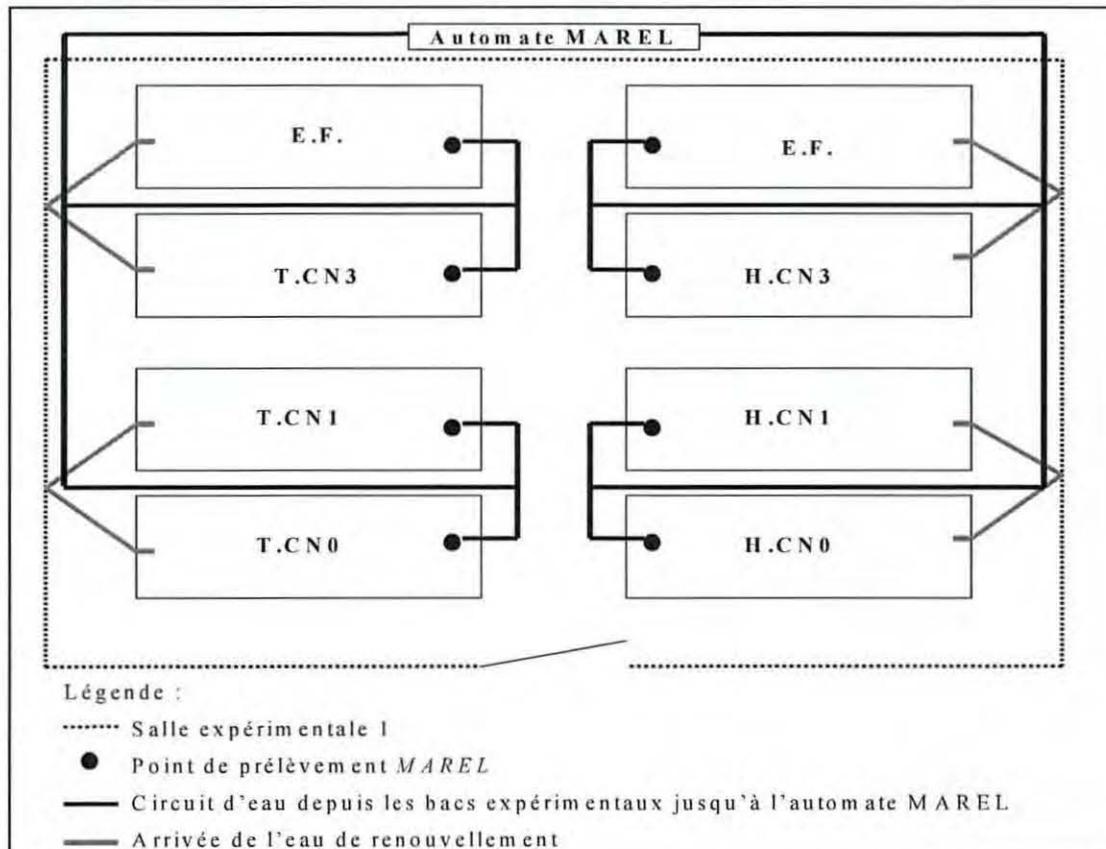
### 1.2. Plan expérimental

Le plan expérimental repose principalement sur le contrôle du niveau de richesse trophique. Trois conditions nutritives sont pratiquées, avec une niveau de nourriture très pauvre (CN0), faible (CN1) et élevé (CN3). La nourriture est exclusivement composée de micro-algues, produites par la salle de production phytoplanctonique de la Station Expérimentale d'Argenton. Quel que soit le niveau de nourriture, cette nourriture se compose d'un mélange pluri-spécifique de micro-algues, constitué à part égale (exprimée en masse) d'*Isochrysis* aff. *galbana* ou clone *T iso*, de *Chaetoceros calcitrans* et de *Skeletonema costatum*. Elle est ajoutée à de l'eau de mer pompée dans un vivier situé devant la station et qui est pré-filtrée sur un filtre de 20  $\mu\text{m}$ , puis filtrée jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  afin d'éviter tout apport non désiré de matière en suspension.

La condition nutritive CN0 correspond à un apport quotidien d'algues de 2 % de matière sèche d'algues par matière sèche de chair d'huître. Dans le cadre de notre expérience, 816 animaux de 0,1 g de chair sèche nourris en condition CN0 reçoivent :  $816 \times 0,1 \times 0,02$ , soit 1,63 g de mélange algal sec distribué sur 24 heures, équivalant à un débit d'environ  $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  d'algues vivantes selon les variations de concentration journalière du mélange algal produit. La condition CN0 représente un milieu très pauvre en phytoplancton (concentration  $< 2 \mu\text{g chl } a \cdot \text{l}^{-1}$ ), susceptible de limiter au minimum, voire d'inhiber la croissance et le développement de la gonade. La condition nutritive CN1 correspond à un apport de 4 % de matière sèche d'algues par rapport à celle de l'huître. Un développement plus ou moins modéré de la gonade y est attendu. Enfin, la condition nutritive CN3 représente un apport de 12 % de matière sèche d'algues par rapport à celle de l'huître. Ceci correspondant à un apport journalier en phytoplancton trois fois supérieur à celui de la condition CN1 et à un environnement phytoplanctonique autour des

huîtres supérieur à  $10 \mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$ . CN3 se rapporte à un environnement marin eutrophe (Menesguen, 2001 ; Daniel & Le Goff, 2002), caractérisé par des blooms phytoplanctoniques printaniers forts et/ou des apports soutenus de matière organique, de plus en plus fréquents dans certaines baies et estuaires où les huîtres sont élevées.

Chacune de ces 3 conditions nutritives a été réalisée en duplicata, chaque bac d'élevage ayant son témoin, c'est-à-dire un bac sans huîtres sous les mêmes conditions expérimentales. Les 2 bacs expérimentaux d'une même condition nutritive sont disposés en vis-à-vis afin que la distance de circulation pour la prise de mesure par l'automate MAREL-Argenton soit la même entre le bac témoin et son homologue contenant les huîtres (Fig. 1). Les 2 bacs restants servent de témoin sans algues afin d'avoir un suivi rigoureux de l'eau d'entrée.



**Figure 1 : Schéma de la disposition des bacs expérimentaux reliés à l'automate MAREL.**

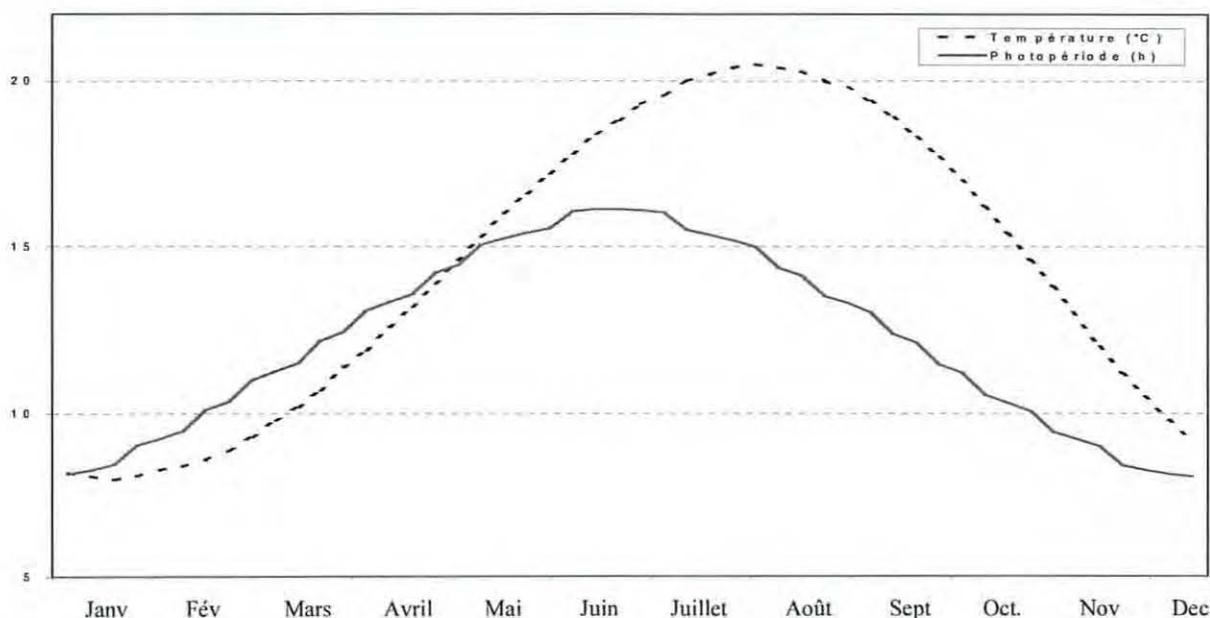
Légende (suite) : - E.F. .... = bac témoin d'eau de mer filtrée,  
 - T.CN0 / 1 / 3 = bac expérimental témoin de la condition nutritive CN0 / 1 / 3,  
 - H.CN0 / 1 / 3 = bac expérimental d'huîtres en condition nutritive CN0 / 1 / 3.

## 2. Suivi des paramètres hydrologiques

### 2.1. Liste des paramètres hydrologiques mesurés

L'ensemble des paramètres hydrologiques, *i.e.* turbidité, salinité, température, photopériode, oxygène dissous, turbidité, volume d'élevage et renouvellement d'eau, sont constants entre les 3 conditions nutritives. Pour ce qui est de la turbidité et de la salinité, la filtration de l'eau de mer du vivier garantit une turbidité extrêmement faible tout au long de l'année autour de 1 NTU. La salinité n'est pas régulée et reste soumise aux

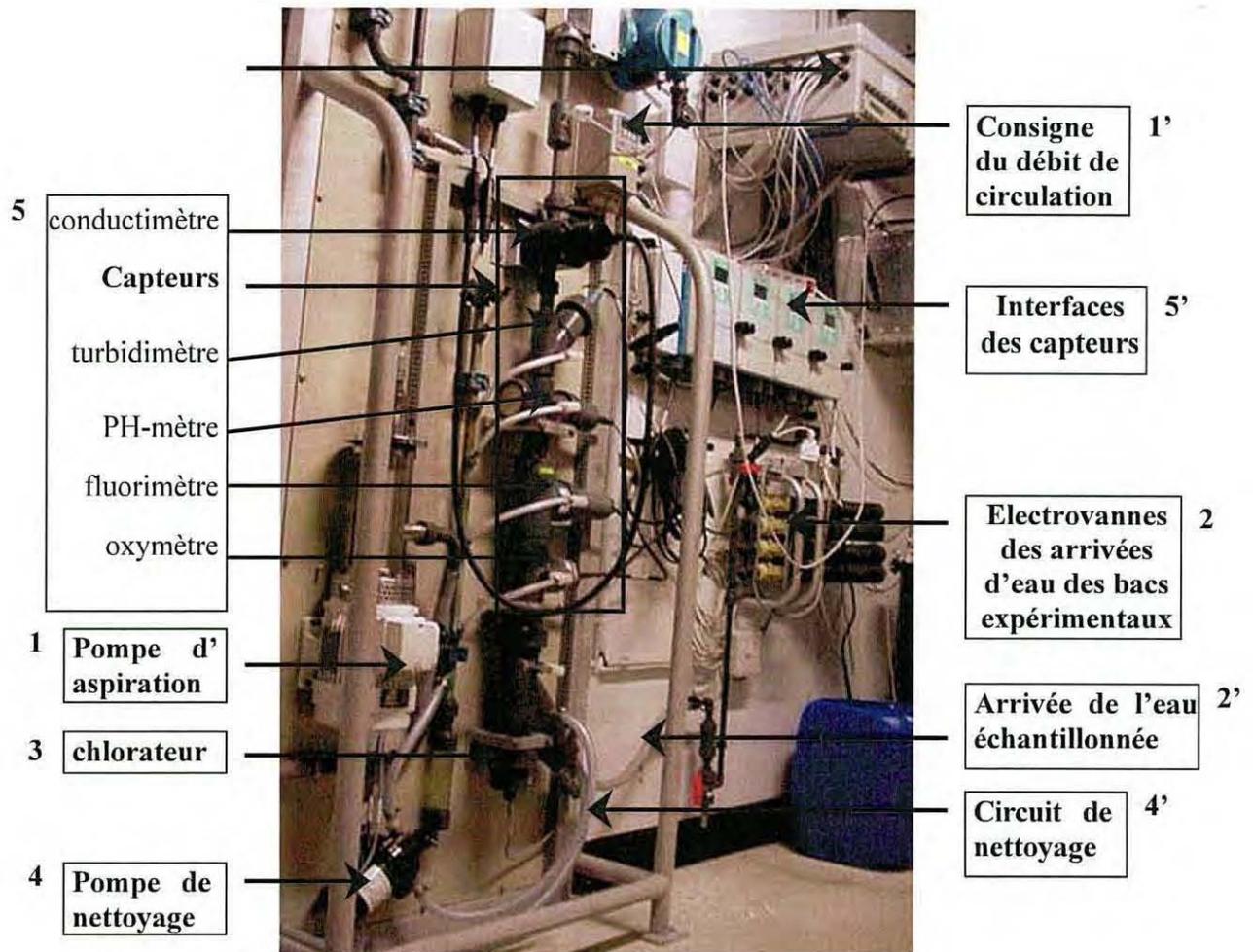
fluctuations naturelles du vivier. Néanmoins, ces fluctuations sont très modérées et la salinité reste stable autour de 35 ‰. Concernant la température et la photopériode, le protocole expérimental suivi dans le cadre de MOREST nous a conduit à suivre le cycle saisonnier de photopériode et de température du bassin Marennes Oléron, où les phénomènes de mortalité estivale sont très importants. Ce cycle correspond aux profils moyens de photopériode et de température relevés dans ce bassin au cours des vingt dernières années (Fig. 2). La photopériode et la température dans les bacs expérimentaux ont été ajustées deux fois par semaine sur ce cycle saisonnier. Le volume des bacs et leur renouvellement ont été appliqués selon les normes d'élevage pratiquées en routine à la station d'Argenton : le volume utile et le débit de renouvellement de l'eau d'élevage sont respectivement de  $2,75 \text{ l.g}^{-1}$  et  $0,58 \text{ l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de masse de chair sèche d'huîtres. L'eau d'élevage est ainsi renouvelée en 4 h 44, soit approximativement 5 fois par jour. Néanmoins, compte tenu des caractéristiques zootechniques des bacs d'élevage, les valeurs de volume utile et de renouvellement horaire ne peuvent pas passer en dessous des seuils minima respectifs de 230 l et  $50 \text{ l.h}^{-1}$ . Enfin, la concentration en oxygène dissous dans l'eau est proche de la saturation et varie entre 7 et  $9 \text{ mg.l}^{-1}$ . Elle dépend principalement des variations naturelles du vivier d'Argenton et de la pression atmosphérique. En outre, le renouvellement et le brassage de l'eau permettent de garantir une oxygénation d'entrée identique entre les bacs d'élevage.



**Figure 2:** Cycles saisonniers moyens (20 dernières années) de température et de photopériode à Marennes Oléron (source IFREMER, Laboratoire Conchylicole Poitou-Charentes, base Razlec). Axe des ordonnées : température en °C et durée d'éclairage en heure.

## 2.2. Principe d'enregistrement des paramètres hydrologiques à l'aide de MAREL

A l'exception du volume d'élevage et du renouvellement d'eau, les paramètres hydrologiques sont enregistrés par le système automatisé MAREL-Argenton (Fig. 3, {p.6}). Le fonctionnement de ce système permet le suivi horaire des paramètres hydrologiques clés, *i.e.* température (°C), salinité (‰), oxygène dissous ( $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}$ ), fluorescence (FFU), pH et turbidité (NTU), dans chacun des bacs d'élevage, (Fagon, 2002). Les données sont



**Figure 3 :** Automate MAREL-ARGENTON (ou station automatique d'acquisition de paramètres hydrobiologiques - numéros dans l'ordre chronologique des étapes pour l'acquisition d'une série de mesure).

enregistrées et envoyées toutes les heures sur un serveur, et consultables sur le réseau IFREMER d'où elles sont extraites. Pour chaque bac, la prise de mesures et d'analyses de l'eau se fait toutes les 20 minutes, soit une scrutation des bacs toutes les 2 h 40. Le protocole d'analyse et de mesures se déroule comme suit, avec  $t$ , le temps exprimé en minutes : (1) pour  $0 < t \leq 15$  min : prélèvement de l'eau du bac, chloration et nettoyage des chambres et des têtes des capteurs ; (2) pour  $16 \leq t \leq 19$  min : rinçage des chambres et têtes des capteurs ; (3) pour  $19 < t \leq 20$  min : acquisition, traitement et transfert des données. Les deux mesures extrêmes sont éliminées et les trois restantes sont moyennées avant d'être envoyées au serveur. L'ensemble de ces mesures nous permet de surveiller l'état général des élevages et le bon respect des conditions expérimentales.

L'échantillonnage des bacs se fait dans l'ordre croissant des conditions nutritives, de CN0 à CN3, puis dans les 2 bacs témoins d'eau de mer filtrée (EF1 et EF2). L'ordre de passage des 8 bacs expérimentaux dans l'automate de mesure est donc le suivant: HCN0, TCN0, HCN1, TCN1, HCN3, TCN3, EF1, EF2 (Fig. 1).

### 3. Suivi de la croissance et de la gamétogenèse

#### *3.1. Calendrier d'échantillonnage*

Après un état des lieux en début d'expérience, un suivi mensuel de la croissance des huîtres est réalisé par prélèvement et biométrie destructrice au cours de l'expérimentation. Le pas de prélèvement est ajusté en fonction du développement gonadique, *i.e.* de 1 mois au début du suivi à 15 jours en fin de maturation, et jusqu'à la ponte déclenchée par un choc thermique le 22 juillet. La biométrie proprement dite des huîtres a été réalisée aux dates suivantes : les 13 avril (début d'expérience), 22 avril, 19 mai et 16 juin (suivi de la maturation et de la croissance des huîtres), 30 juin et 16 juillet (investissement final dans la maturation des gamètes avant la ponte), 27 juillet (biométrie post-ponte). Quatre dates d'échantillonnage pour estimer le développement de la gonade ont été retenues afin de couvrir la période active de gamétogenèse : les 14 mai (début de maturation), 30 juin et 16 juillet (maximum du développement de la gonade), et 27 juillet (post-ponte).

#### *3.2. Variables liées à la croissance somatique*

Les analyses de biométrie se font sur des échantillons de 16 individus pour chaque condition nutritive. Chaque huître est mesurée (axe dorso-ventral) à l'aide d'un pied à coulisse avec une précision de 1 mm, puis pesée avec une précision de 0,01 g à l'aide d'une balance *Mettler* PC440. Ensuite, l'individu est ouvert et les tissus mous sont détachés de la coquille, puis pesés après égouttage. Ces tissus sont finement disséqués afin d'isoler (Fig. 4) et peser chaque organe, ou ensemble d'organes : manteau et palpes labiaux, branchies, muscle adducteur et masse viscérale comprenant de façon imbriquée la gonade, les tissus de réserve, le cœur, la glande digestive, l'estomac et le tractus digestif. La pesée de ces organes est exprimée en masses humides. Les organes sont ensuite cumulés par condition (soit 16 groupes de tissus par condition), et desséchés à l'étuve à 60°C pendant 48h, puis pesés avec une précision de 0,0001 g à l'aide d'une balance *sartorius* CP225D afin d'obtenir le pourcentage de matière sèche par groupe d'organe. Ce pourcentage permet d'estimer la masse sèche par organe à partir de la masse humide et de calculer la masse de chair sèche par individu et par condition (PCHS).



**Figure 4 :** Présentation des quatre principaux organes ou groupe d'organes de l'huître, isolés après dissection. Dans l'ordre, de gauche à droite : muscle, branchies, manteau + palpes (tissus de réserves), et glande digestive.

### 3.3. Estimation du développement de la gonade

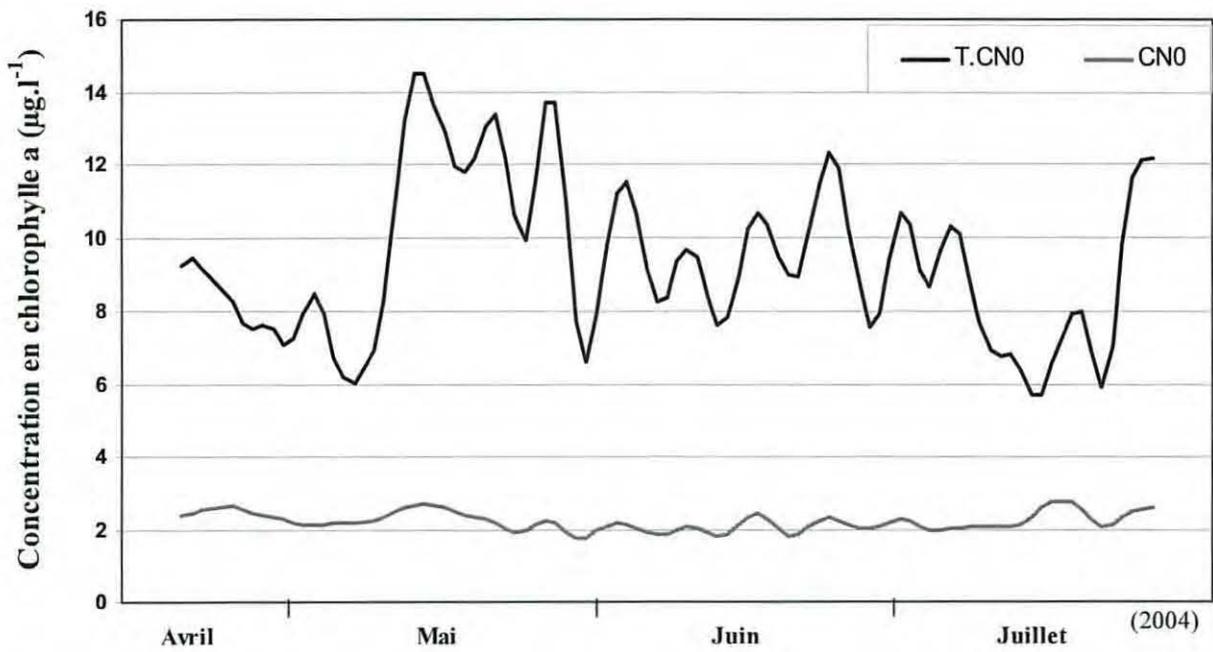
Chez les bivalves tels que les ostréidés, la gonade est un organe qui se développe de façon diffuse au sein de la masse viscérale. Les cellules germinales apparaissent dans un tissu vésiculeux de réserve tout autour d'une glande digestive acineuse. Le seul moyen, à l'heure actuelle, pour suivre précisément le développement de la gonade chez cette espèce réside dans une méthode d'histologie quantitative sur coupes sériées. La méthodologie utilisée pour cette approche a été mise au point sur l'huître creuse par Veaux (2001). Nous avons appliqué cette méthode sur 5 individus de chaque condition expérimentale, aux 4 dates d'échantillonnage.

La préparation en histologie (détaillée en Annexe 1) suit le protocole classique suivant : (1) dissection et isolement de la masse viscérale, (2) fixation des tissus dans la solution de Davidson, (3) inclusion dans la paraffine, (4) réalisation de 3 coupes fines de 5  $\mu\text{m}$  à 3 niveaux de la masse viscérale, (5) coloration à l'hématoxyline et éosine afin de marquer préférentiellement le tissu gonadique. Ensuite, sur chaque coupe histologique, l'estimation du volume de la gonade par rapport aux autres tissus de la masse viscérale (glande digestive et tissu conjonctif) est réalisée par analyse d'image à l'aide du logiciel IMAQ VISION BUILDER® développé par *National Instruments*©. Il permet de quantifier l'aire des tissus gonadiques, digestifs et conjonctifs, et ainsi d'apprécier le pourcentage d'occupation de la gonade dans la masse viscérale (technique détaillée en Annexe 2). Par extrapolation (principe de stéréologie, Versteby, 1993) et à partir de la masse de la masse viscérale, il devient possible d'estimer les masses respectives de la gonade, de la glande digestive et des autres tissus de la masse viscérale. Ces résultats quantitatifs fournissent une estimation plus objective du développement de la gamétogenèse que les méthodes classiques d'histologie qualitative (évaluations des stades de maturation selon les critères semi-ordinaux de Kennedy & Battle, 1964).

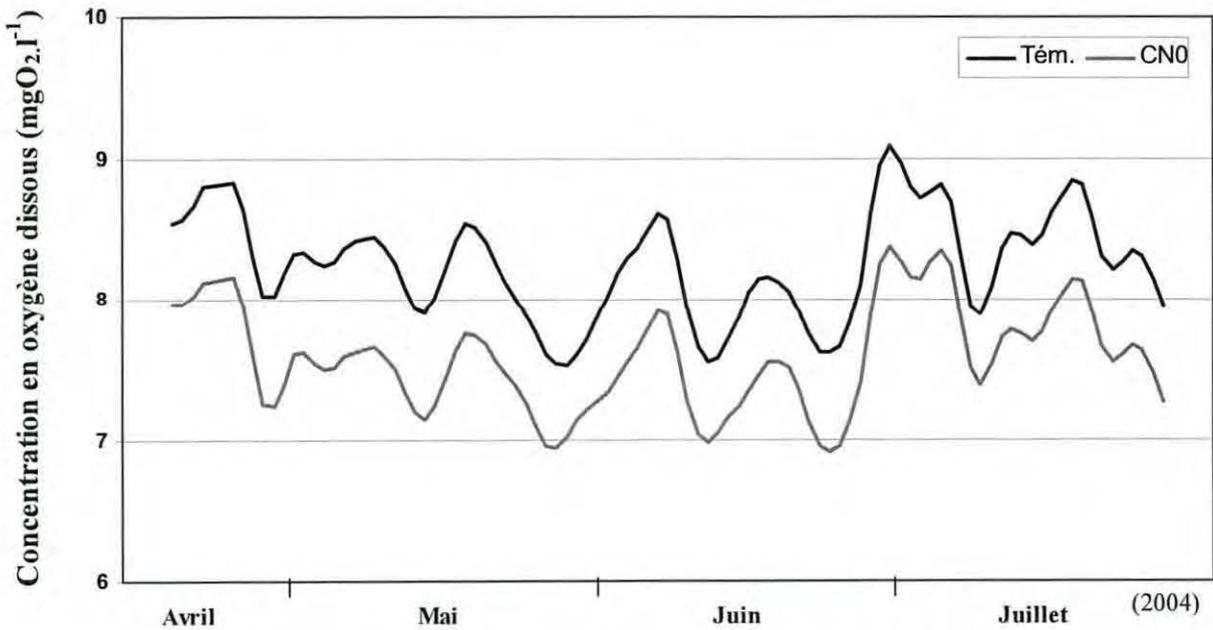
## 4. Suivi de l'écophysiologie et du bilan énergétique

### 4.1. Principe

La bioénergétique consiste en la mesure des échanges et des transformations de matières et d'énergie entre les êtres vivants et leur environnement (Lucas, 1992). Ces transferts concernent ce que l'animal prélève dans son milieu, ce qu'il rejette après digestion et ce qu'il dépense pour son métabolisme. Le bilan entre les gains et pertes d'un organisme peut être mesurer par le calcul du potentiel de croissance (ou « Scope For Growth », **SFG**, Bayne et Newell, 1983). Ce bilan de la matière assimilée est une estimation (non destructive) du statut énergétique d'un animal. Il est directement fonction du milieu environnemental, notamment du niveau trophique, mais aussi de la température et de la concentration en oxygène ainsi que des fenêtres physiologiques dans lesquelles l'animal étudié se trouve (*i.e.* étape de la gamétogenèse, mise en réserve, croissance somatique, *etc.*). Il est calculé par la combinaison linéaire de trois fonctions écophysiologiques clés : (1) la consommation de nourriture, notée **C**, (2) la bio-déposition, *i.e.* production de pseudo-fèces (**PF**) et de fèces (**F**) correspondant aux rejets de matière produits par un animal lors de l'ingestion et de l'absorption, et enfin (3) la respiration (**R**), reflet de son activité générale et des pertes qui en découlent. Chez les mollusques bivalves, l'excrétion dissoute (**U**) est négligée d'un point de vue bioénergétique (Bayne et Newell, 1983).



**Figure 5 :** Relevés des concentrations en chlorophylle  $a$  ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) d'un bac expérimental (CN0) et de son bac témoin (TCN0).



**Figure 6 :** Relevés des concentrations en oxygène dissous ( $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}$ ) d'un bac expérimental (CN0) et de son bac témoin (Tém.) -courbes lissées deux fois par pas de 3- .

Par conséquent, le SFG se calcule comme suit :  $SFG = C - (PF + F + R)$  (I)

Après déduction des pseudo-fèces de la consommation si elles sont présentes, le mode de calcul du SFG peut s'exprimer en intégrant l'efficacité d'absorption (AE) à la consommation, au lieu de faire intervenir la production de fèces difficile à quantifier en écophysologie populationnelle. Le potentiel de croissance se calcule alors ainsi :

$$SFG = (C \times AE) - R \quad (II)$$

#### 4.2. Mesures de la consommation et de la respiration

Le calcul de la consommation et de la respiration se fait sur l'ensemble de la population en élevage, à partir des relevés obtenus en continu par l'automate *MAREL-Argenton* (Fig. 5 et 6, {p.9}). Les différences de concentrations phytoplanctoniques entre les bacs expérimentaux contenant les lots d'huîtres ( $C_H$ , cell.l<sup>-1</sup>) et leur bac témoin ( $C_T$ , cell.l<sup>-1</sup>) permettent de calculer directement la consommation moyenne individuelle d'algues (C, en cell.h<sup>-1</sup>) des huîtres, en y intégrant le débit de renouvellement D (l.h<sup>-1</sup>) et le nombre d'individus (n), selon l'équation suivante :

$$C = [(C_T - C_H) \times D] / n \quad (III)$$

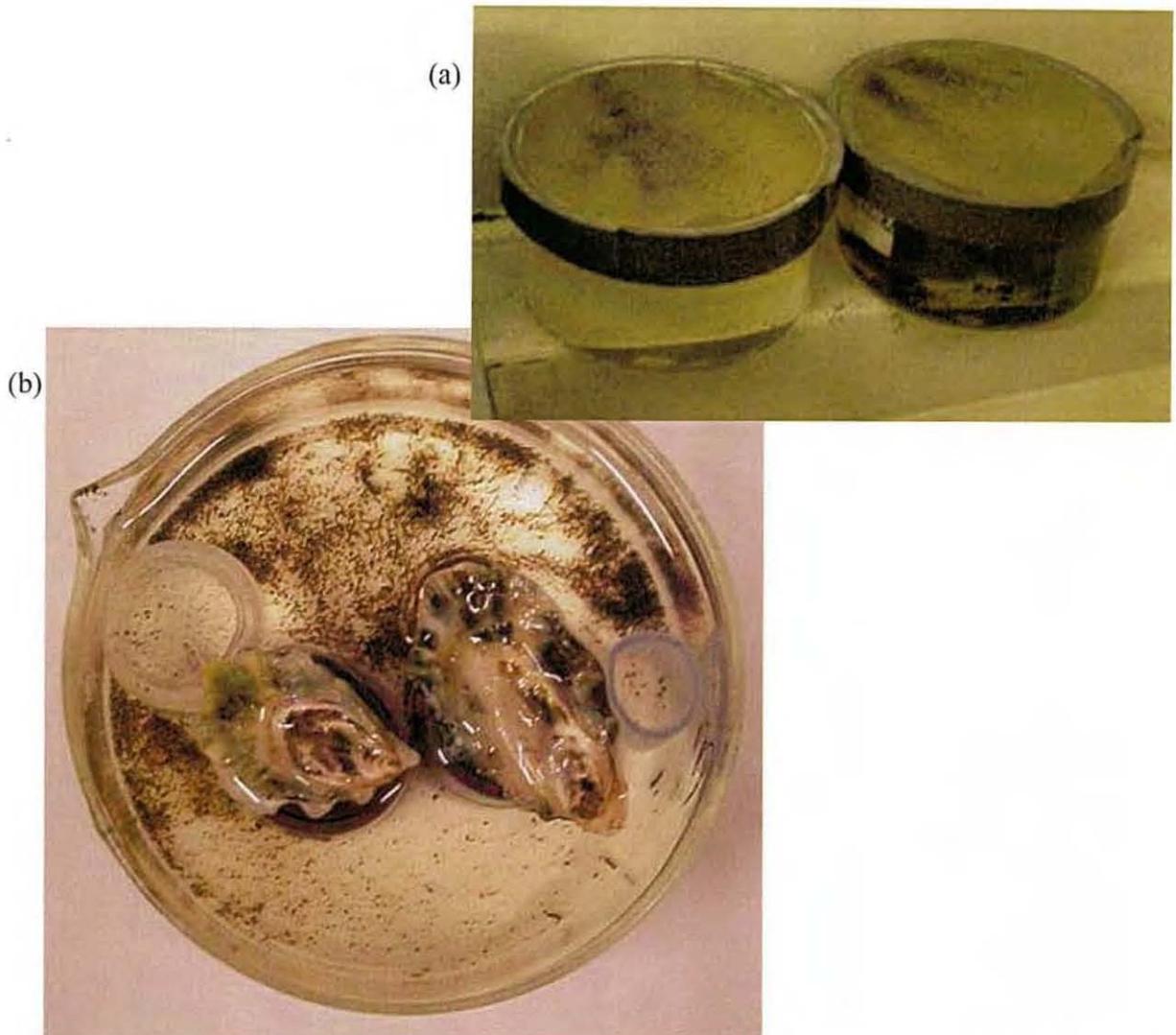
Le principe est le même pour l'estimation de la respiration. Dans ce cas-ci, le témoin d'oxygène ne correspond pas au bac témoin de la condition nutritive considérée, mais au bac témoin présentant la concentration algale la plus proche du bac étudié. Ainsi, le bac CN3 a pour témoin d'oxygène dissous le bac témoin CN1 (fluorescence de l'ordre de 5 à 8 FFU tout au long de l'expérimentation). CN1 et CN0 ont tous deux le même témoin d'oxygène dissous par le bac témoin d'eau de mer filtrée (pour ces trois bacs, FFU <0,5). La différence d'oxygène (en mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>) entre le bac expérimental ( $O_H$ ) et son témoin ( $O_T$ ) représente directement la respiration (en mg O<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>) de la population d'huîtres en élevage. Le calcul de la respiration individuelle moyenne repose sur l'équation suivante :

$$R = [(O_T - O_H) \times D] / n \quad (IV)$$

#### 4.3. Récolte des bio-dépôts et mesure de l'efficacité d'absorption (AE, %)

Chez les mollusques bivalves, les particules retenues non ingérées sont prises en charge dans des agrégats muqueux, rejetées sous forme de pseudo fèces (PF). Ces pseudo fèces contiennent des particules inorganiques indigestes, mais aussi de la matière organique en excès. Dans le milieu naturel, ils peuvent être très abondants et varient selon la qualité et la quantité de la matière en suspension filtrée, le poids de l'animal, la température, etc... (Pouvreau, 1999). Dans nos conditions expérimentales, les huîtres vivent dans un milieu où la matière en suspension est essentiellement constituée de matière organique (apport d'un mélange algale dans une eau filtrée à 1 µm). Il est vraisemblable que la production de PF soit négligeable. Néanmoins, la condition CN3 pourrait favoriser une faible production de PF. C'est pourquoi, un dispositif d'isolement de deux huîtres, où pseudo fèces et fèces peuvent être récoltés séparément, a été mis au point (Fig. 7, {p.11}).

Une fois les particules ingérées, la digestion s'effectue et une partie de la matière est absorbée tandis que l'autre partie du bol alimentaire non absorbé est rejeté sous forme de fèces (F). Une aliquote des bio-dépôts produits dans chaque bac expérimental sur 24 h est récoltée afin de mesurer l'efficacité d'absorption (AE, %) des trois populations d'huîtres. Ces bio-dépôts sont d'abord centrifugés à 2500 t.min<sup>-1</sup> pendant 10 minutes. Chaque culot est ensuite rincé par du formiate d'ammonium, et re-centrifugé à 2500 t.min<sup>-1</sup> pendant



**Figure 7** : Dispositif de séparation des pseudo fèces et des fèces : (a) installation dans le bac d'élevage, (b) récolte des fèces (en haut) et des pseudo fèces (en bas) après 24h de conditionnement.

10 minutes afin d'extraire les sels présents dans les échantillons. En parallèle, un volume de 700 ml du mélange algal subit le même protocole. Ensuite, les culots de bio-dépôts et d'algues sont desséchés 24h à 60°C, pesés une première fois pour l'obtention de la matière sèche (MS) puis brûlés 4h à 450°C pour mesurer la masse de cendre (MC). Le pourcentage de matière organique (OC, %) est alors calculé par la formule suivante:

$$OC = (MS - MC) / MS \quad (V)$$

L'efficacité d'absorption (AE, %), *i.e.* la fraction du bol alimentaire qui est absorbée, est alors obtenue selon l'équation de Conover (1966) par le rapport du % de matière organique de chaque échantillon sur le % de matière organique des algues apportées, en considérant la matière minérale comme un traceur :

$$AE = (OC_{\text{algue}} - OC_{\text{fèces}}) / ((1 - OC_{\text{fèces}}) \times OC_{\text{algue}}) \quad (VI)$$

#### 4.4. Calcul du potentiel de croissance ou « Scope For Growth »

Pour calculer le SFG, il est nécessaire au préalable de convertir la consommation et la respiration en une même unité. L'unité standard retenue pour cette étude est le Joule, J. La conversion énergétique des algues filtrées et de l'oxygène respiré se fait selon les coefficients du tableau 1. L'efficacité d'absorption n'étant obtenue que six fois par condition sur la durée d'expérimentation, une extrapolation linéaire a été réalisée afin de disposer des valeurs d'AE sur le même pas de temps temporel que les fonctions C et R. Sur ces bases, un potentiel de croissance peut être calculé toutes les 2 h 40 pour chaque condition, selon l'équation II vue au § 4.1 :  $SFG = (C \times AE) - R$  (VII)

Le potentiel de croissance par heure et par individu ( $J.h^{-1}.ind^{-1}$ ) est alors disponible sur l'ensemble de la gamétogenèse active, et permet ainsi d'apprécier l'état énergétique des animaux au cours de leur cycle de reproduction et en fonction des conditions nutritives.

**Tableau 1 : Coefficients de conversion énergétique utilisés pour cette étude.**

Paramètres	Facteurs de conversion	Références
<i>Skeletonema costatum</i>	15,2 J.mg PS <sup>-1</sup>	Valeur extrapolée
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	12,7 J.mg PS <sup>-1</sup>	Whyte (1987)
<i>Tisochrysis</i> aff. <i>Galbana</i>	19,8 J.mg PS <sup>-1</sup>	Whyte (1987)
O <sub>2</sub> respiré	13,8 J.mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	Winberg (1960)
Chair de <i>C. gigas</i>	20,2 J.mg PCHS <sup>-1</sup>	Héral et Deslous-Paoli (1983)

#### 5. Archivage et traitement des données

L'ensemble des données est archivé sous Microsoft Excel v.97 sous forme de base de données (variable en colonne, 1 observation par ligne) permettant le calcul automatique des moyennes et écart types par la fonction « Tableau croisé dynamique », et ce pour l'ensemble des variables présentées précédemment. Pour la plupart des données, il a été possible de calculer un intervalle de confiance (IC) selon les formules appropriées pour les petits ou grands échantillons (Scherrer, 1984).

Les résultats obtenus dans cette étude ont été traités d'un point de vue statistique par Xlstat® v.6.1.8. La distribution normale des données est vérifiée par le test de Jarque-Bera et l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, ces deux tests étant réalisés avec un seuil de significativité de 0,05. Les données présentées au chapitre « Résultats » ont été testées soit par une analyse de variance (ANOVA, test de Fisher) soit par le test de Kruskal-Wallis (comparaison de k échantillons indépendants) quand l'ANOVA n'est pas possible, à un seuil de significativité de 0,05.

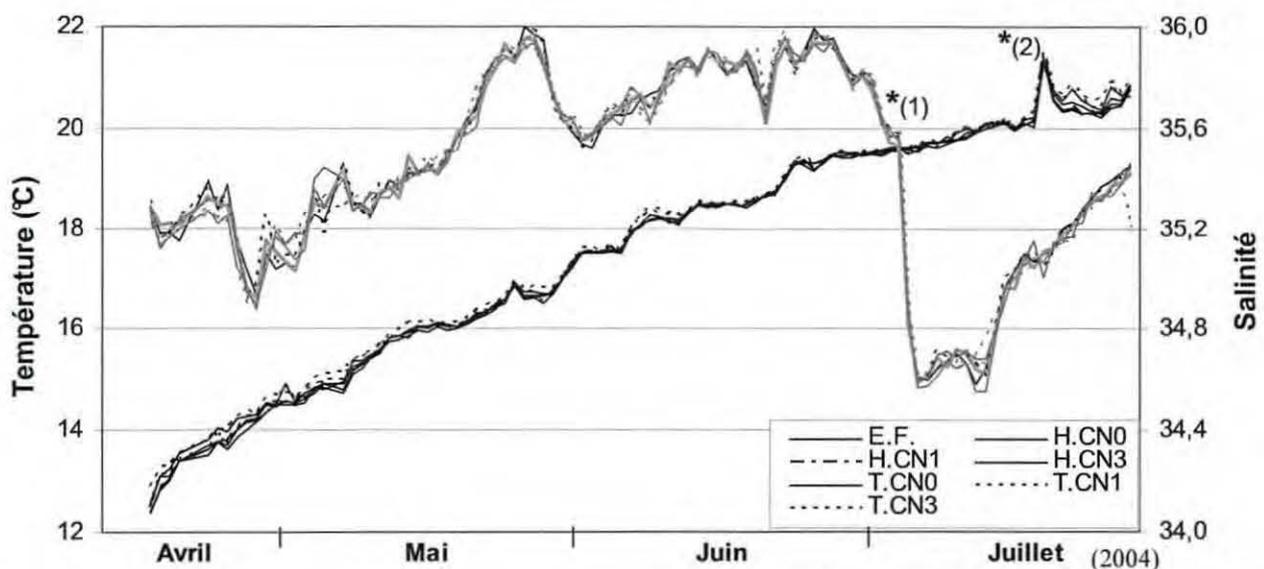
# RESULTATS

## 1. Suivi du milieu hydrologique des bacs d'élevage

Le milieu hydrologique est contrôlé en entrée de bac pour la concentration en phytoplancton (teneur en chlorophylle *a*), la turbidité et la température. Certains paramètres, comme la concentration en oxygène et la salinité, ne sont pas contrôlés, mais leurs variations temporelles, qui reflètent les variations de l'eau de mer du vivier d'Argenton, sont supposées faibles. Au sein d'un bac, l'activité biologique des huîtres va modifier l'ensemble de ces paramètres. Or, comme les conditions environnementales peuvent influencer significativement sur la physiologie de l'animal, il nous a semblé essentiel de présenter le suivi hydrologique des bacs d'élevage qui a débuté le 19 avril 2004.

### 1.1. Salinité et température

La salinité est une variable hydrologique indépendante des conditions expérimentales testées. Ses variations au cours de l'étude (Fig. 8 : de 35 ‰ à 36 ‰ entre avril et juin, puis une chute brutale à 34,5 ‰ suite à de fortes précipitations) sont dues aux variations du vivier et notamment au coefficient de marée et à la pluviométrie. La température montre clairement le respect du protocole expérimentale, *i.e.* simulation d'un cycle thermique saisonnier moyen. Elle augmente progressivement de 12,3 °C le 19 avril à 20,4°C à la fin juillet. Le choc thermique du 22 juillet, bien que modéré (augmentation de 1,7°C) a permis de déclencher l'émission des gamètes chez les huîtres matures. Ces deux paramètres sont identiques entre les bacs d'élevage.



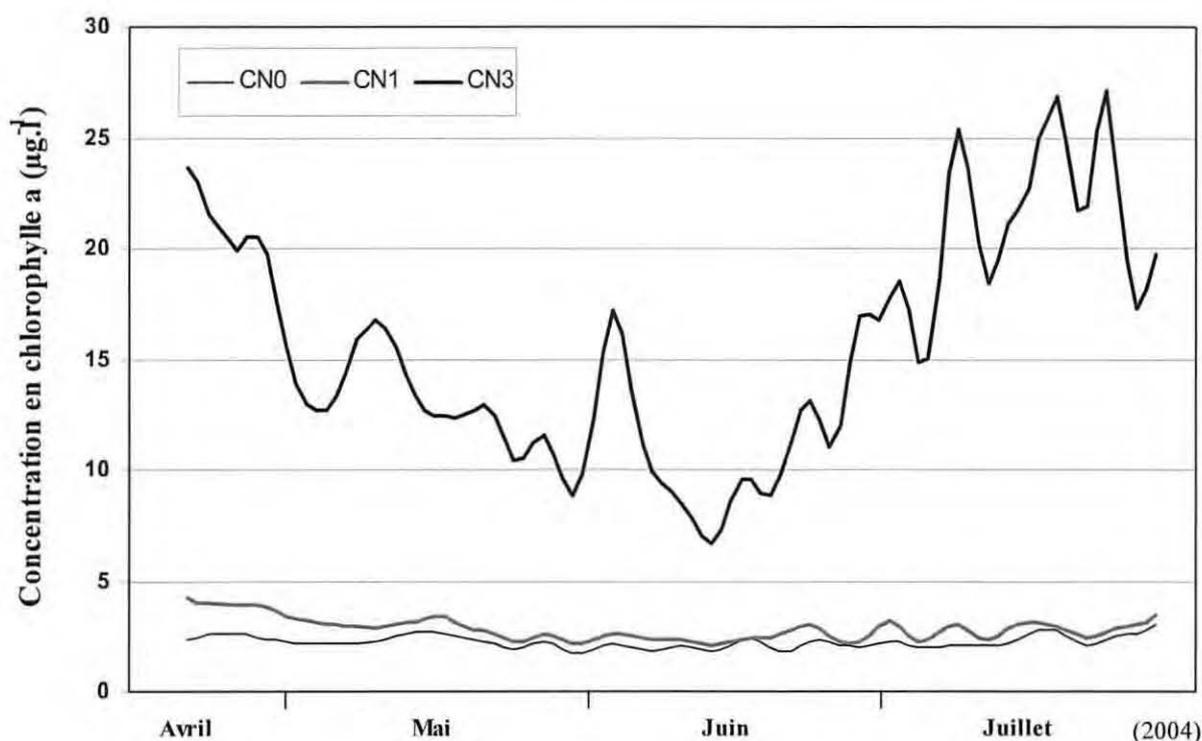
**Figure 8 :** Variations temporelles de la température (courbe foncée) et de la salinité (courbe claire) au cours de la gamétogenèse.

\* (1) : dessalure par forte précipitation (70 mm d'eau sur 24h).

\* (2) : choc thermique pour déclencher l'émission des gamètes.

### 1.2. Environnement trophique

Les concentrations en chlorophylle *a* des deux conditions expérimentales CN0 et CN1 restent très proches et toujours inférieures à  $5,0 \mu\text{g chl a.l}^{-1}$  pendant les 4 mois d'étude (Fig. 9). Sur l'ensemble du suivi, les teneurs moyennes en chlorophylle *a* sont de  $2,2 \mu\text{g chl a.l}^{-1}$  ( $\pm 0,3 \text{ EC}$ ) pour CN0 et de  $2,8 \mu\text{g chl a.l}^{-1}$  ( $\pm 0,5 \text{ EC}$ ) pour CN1. L'apport journalier d'algues, pourtant deux fois plus élevé en CN1 qu'en CN0, ne permet pas d'obtenir des concentrations phytoplanctoniques réellement différentes entre les 2 conditions. Par contre, les teneurs en chlorophylle *a* pour la condition CN3 sont de trois à dix fois supérieures aux deux conditions précédentes. Elles varient de  $7,0$  à  $27,0 \mu\text{g chl a.l}^{-1}$ , pour une moyenne de  $15,4 \mu\text{g chl a.l}^{-1}$  ( $\pm 5,2 \text{ EC}$ ). Ces très fortes concentrations sont représentatives d'un milieu trophique très riche.



**Figure 9 :** Evolution des concentrations en chlorophylle *a* ( $\mu\text{g chl a.l}^{-1}$ ) des trois conditions nutritives (bacs avec huîtres) - courbes lissées deux fois par pas de 3-.

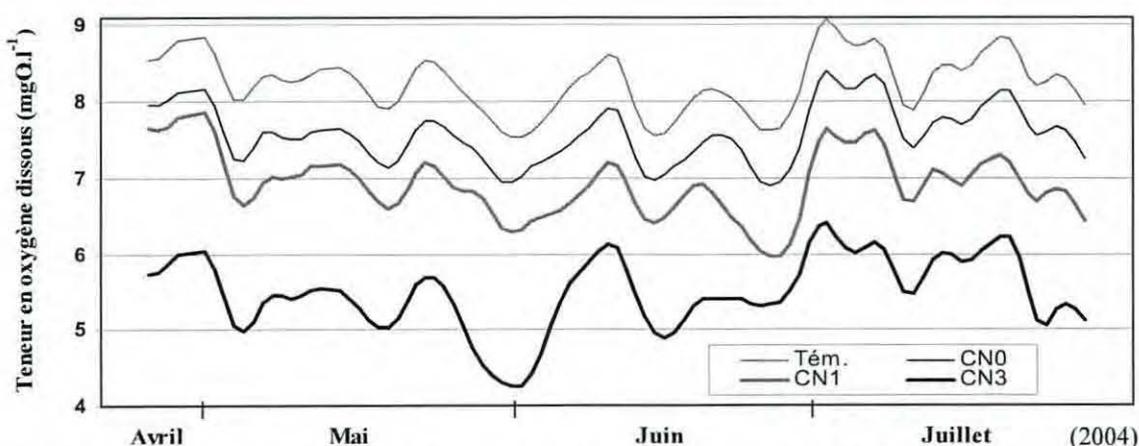
### 1.3. Concentration en oxygène

Au cours de l'expérimentation, il est apparu que les niveaux d'oxygénation des trois bacs témoins restaient rigoureusement identiques, ce qui confirme à la fois la répétitivité entre bac mais aussi le bon fonctionnement de l'automate MAREL. Les courbes de chaque témoin se superposant parfaitement, un seul témoin d'oxygène est donné sur la figure 10 {p.15}. Les concentrations en oxygène dissous oscillent de 4 (pour CN3) à  $9 \text{ mg O}_2.\text{l}^{-1}$  (témoin et CN0). Ces concentrations diffèrent significativement entre les trois conditions ainsi qu'avec le bac témoin (ANOVA :  $F= 770.424$ ,  $\text{ddl}=3$ ,  $p<0.0001$  ; Tableau 2). Les niveaux de concentration en oxygène dissous dans les bacs sont d'autant plus faibles que l'apport nutritif est élevé (Fig. 10).

Au cours du temps les variations principales de la concentration en oxygène se répètent sur chaque courbe. Elles sont dues aux variations naturelles d'oxygène dissous de l'eau de mer (ensoleillement du vivier, coefficient de marées, passage de dépression).

**Tableau 2 :** Comparaison des concentrations en oxygène ( $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}$ ) entre les 3 bacs expérimentaux et le témoin (moyenne d'avril à juillet 2004).

Bac expérimentaux	Témoin	CN0	CN1	CN3
Moyenne	8,24	7,57	6,90	5,48
Ecart type	0,37	0,37	0,42	0,49
Regroupement (test de Tukey)	A	B	C	D

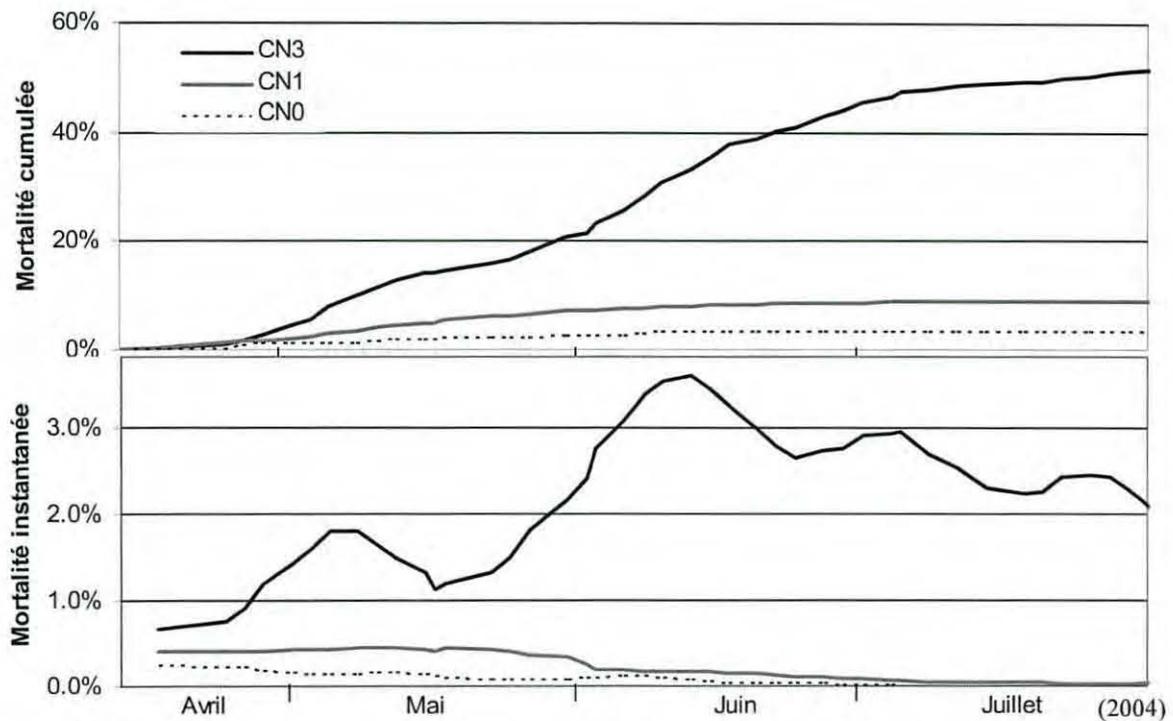


**Figure 10 :** Evolution des concentrations en oxygène dissous ( $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}$ ) des trois conditions nutritives et d'un bac témoin. Les courbes de chaque témoin se superposant parfaitement, un seul témoin d'oxygène est représenté - courbes lissées deux fois par pas de 3 - .

## 2. Suivi de la croissance et de la gamétogénèse

### 2.1. Suivi de la mortalité

Quinze jours après le démarrage de l'expérience, une différence de mortalité a rapidement été constatée entre les trois conditions expérimentales (Fig. 11, {p.16}). Les deux conditions nutritives les plus faibles, CN0 et CN1, n'ont connu qu'une mortalité résiduelle (mortalité instantanée inférieure à 0,5 %) tout au long de la gamétogénèse pour atteindre respectivement 3,6 % et 9,1 % de mortalité cumulée début août. La condition nutritive la plus élevée, CN3, a souffert d'une mortalité importante dès le début de l'expérimentation pour atteindre son maximum au mois de juin (mortalité instantanée supérieure à 3 %). Ce phénomène de mortalité ralentit en juillet pour finalement atteindre 51 % de mortalité cumulée au début du mois d'août.

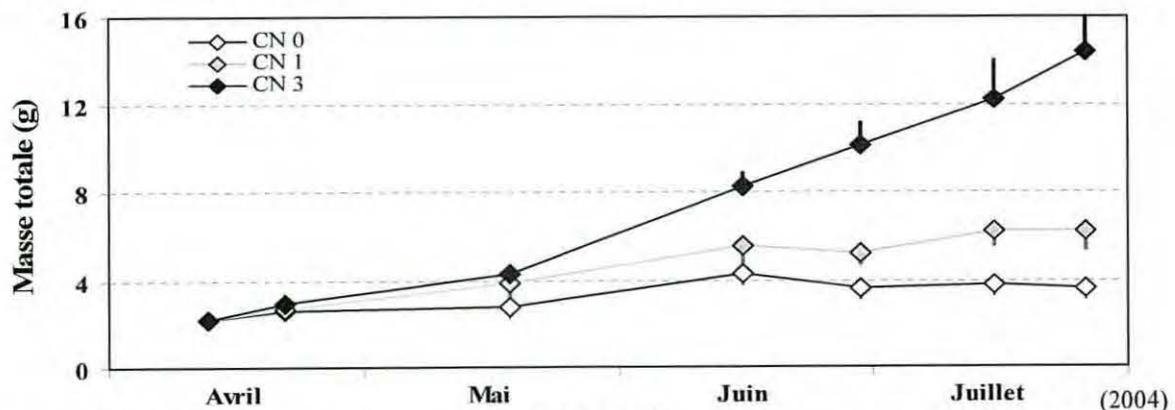


**Figure 11 :** Mortalités instantanée et cumulée (%) des huîtres pour chaque condition nutritive.

## 2.2. *Suivi de la croissance*

### a) Masse totale des huîtres

Pour chacune des conditions nutritives, la masse totale individuelle des huîtres augmente d'avril à juillet 2004, et est d'autant plus élevée que le niveau trophique est élevé (Fig. 12). La masse totale initiale est identique entre les trois conditions expérimentales, les huîtres étant issues d'une même population d'origine. Le 19 mai, les moyennes de masse totale des huîtres en CN0, CN1 et CN3 sont respectivement de 2,8 g (+/- 1,1 EC), 3,9 g (+/- 1,3 EC) et 4,3 g (+/- 0,69 EC). Les masses totales des huîtres en CN1 et CN3 ne présentent pas de différence significative (ANOVA,  $F = 1,129$ ,  $P = 0,27$ ). A partir du 16 juin, les masses totales des trois lots d'huîtres deviennent significativement différentes entre elles (ANOVA,  $F = 104,951$ ,  $ddl = 2$ ,  $P < 0,0001$ ) et ces différences augmentent tout au long du suivi.



**Figure 12 :** Evolution de la masse totale individuelle des huîtres pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).

Le tableau 3 présente les résultats des comparaisons deux à deux sur les données des échantillons du 16 juin et du 27 juillet.

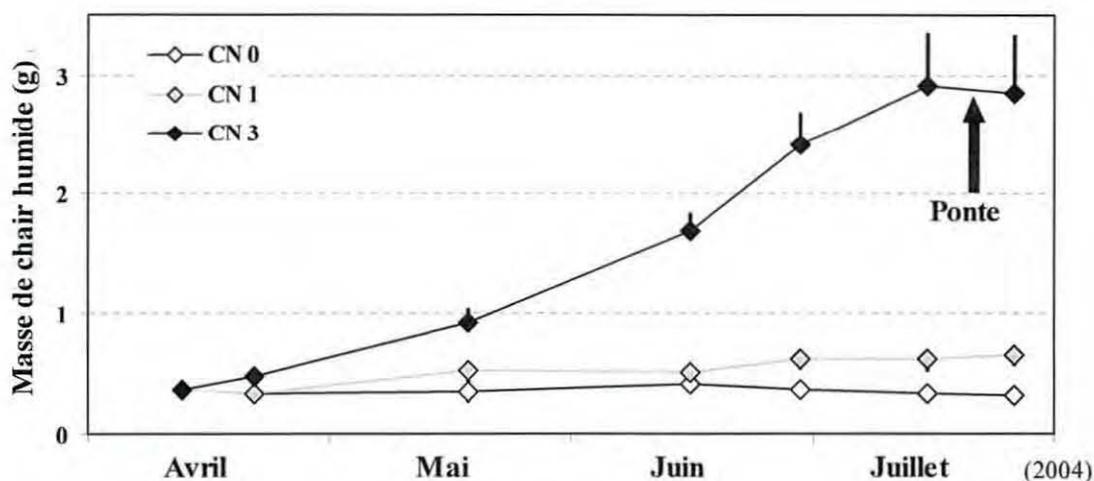
**Tableau 3** : Tests de comparaisons multiples (Fisher-LSD) des différences entre les conditions nutritives.

Modalités	F (16 juin)	P	F (27 juillet)	P
CN0 ~ CN1	3,012	0,004	3,35	0,001
CN1 ~ CN3	6,44	< 0,0001	10,53	< 0,0001
CN3 ~ CN0	9,45	< 0,0001	13,88	< 0,0001

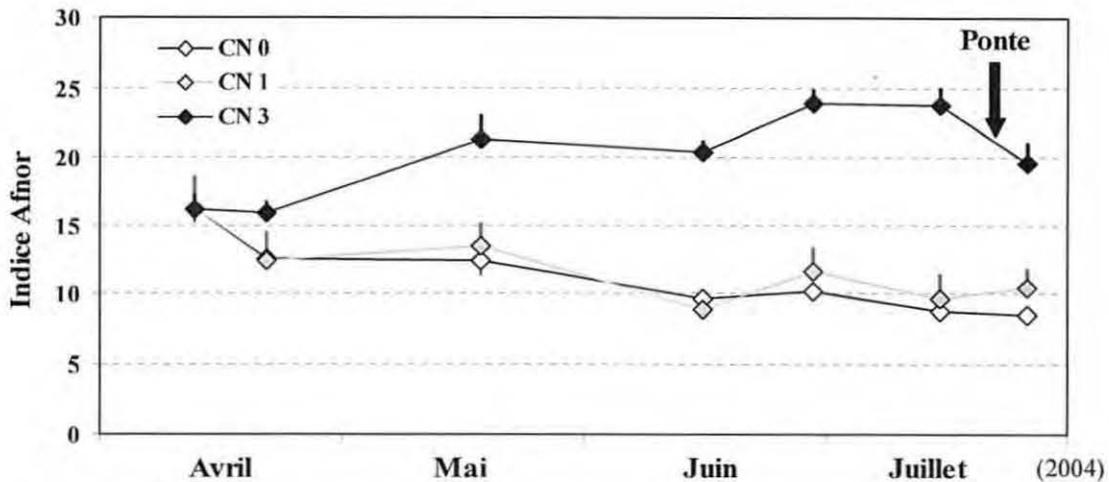
Le 27 juillet, les masses totales des huîtres en CN0, CN1 et CN3 sont respectivement de 3,4 g (+/- 1,6 EC), 6,7 g (+/- 3,7 EC) et 14,4 g (+/- 3,7 EC). La différence de masse totale entre les huîtres de la condition CN0 et celle de la condition CN1 est devenue moins importante que la différence de masse observée entre les huîtres de CN1 et celle de CN3, et *a fortiori* entre les huîtres de CN0 et celles de CN3.

### b) Biomasse de chair humide

L'évolution des masses de chair humide (Fig. 13) corrobore les observations faites sur les masses totales (Fig. 12), les différences entre conditions expérimentales étant encore plus marquée ici. Dès le mois de mai, les masses de chair humide des trois conditions CN0, CN1 et CN3, respectivement de 0,35 g (+/- 0,16 EC), 0,52 g (+/- 0,17 EC) et de 0,91 g (+/- 0,22 EC), sont significativement différentes (ANOVA : F = 36,119, ddl=2, P < 0,0001). La ponte déclenchée le 22 juillet n'affecte que les huîtres de la condition CN3 et se traduit par une diminution des variables étudiées entre le 16 et le 27 juillet (Fig.13 & 14).



**Figure 13** : Evolution de la masse de chair humide des huîtres pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).



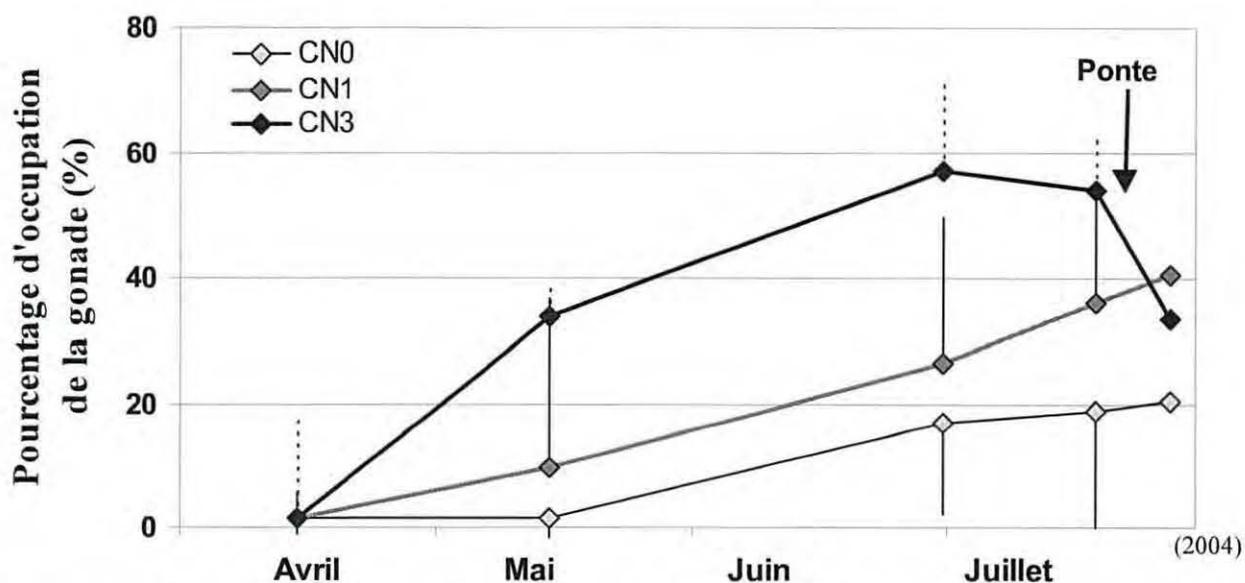
**Figure 14** : Evolution de l'Indice de condition Afnor pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).

### c) Evolution de l'Indice Afnor

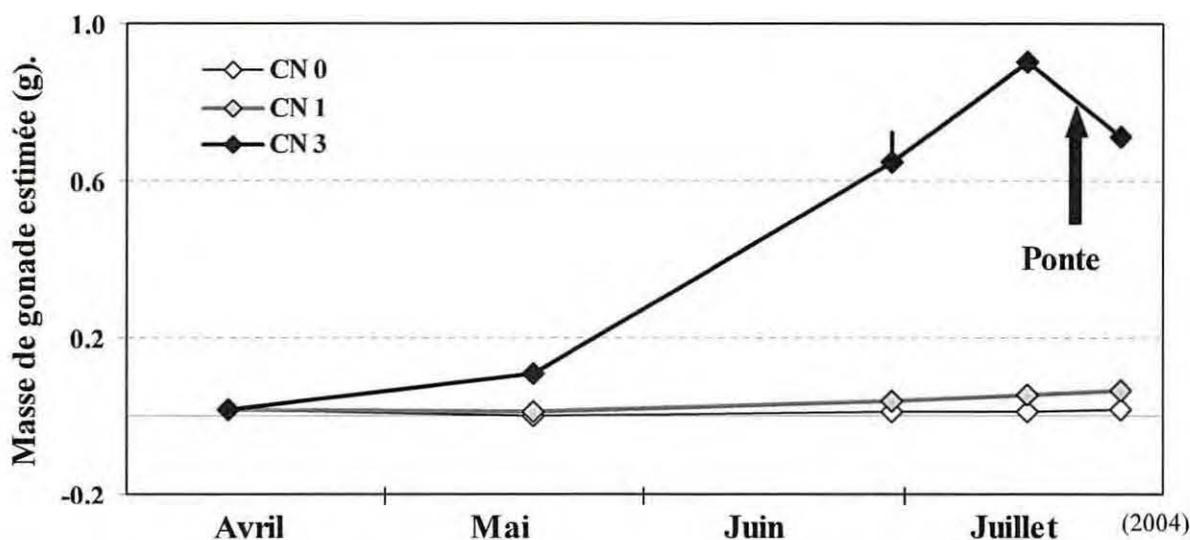
L'évolution des indices de qualité Afnor est présentée sur la figure 14. D'une façon générale, les indices Afnor des huîtres en CN0 et CN1 sont significativement peu différents entre eux (test de Kruskal-Wallis :  $H = 5,1$ ,  $P = 0,024$ ) mais significativement très différents de l'indice Afnor des huîtres en CN3 (test de Kruskal-Wallis :  $H = 226,1$ ,  $P < 0,0001$ ). Les indices Afnor des huîtres en CN0 et CN1 diminuent de manière significative au cours du suivi : entre le 13 avril et le 16 juillet, les valeurs passent de 16,2 (+/- 2,4 EC) à 8,7 (+/- 1,4 EC) pour CN0 (ANOVA :  $F = 156,357$ ,  $ddl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ) et 10,2 (+/- 2,3 EC) pour CN1 (ANOVA :  $F = 68,519$ ,  $ddl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ). Par contre, l'Indice Afnor des huîtres en CN3 augmente significativement jusqu'à la ponte pour atteindre une valeur de 24,6 (+/- 3,1 EC) le 16 juillet (ANOVA :  $F = 92,426$ ,  $ddl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ).

### 2.3. Suivi de la gamétogenèse

Le pourcentage d'occupation de la gonade est une variable estimée au cours de la gamétogenèse (Fig. 15 {p.19}), de même que la masse humide la gonade (Fig. 16 {p.19}). L'effort consacré à la gamétogenèse chez les huîtres des conditions nutritives CN0 et CN1 est très faible et aucune émission de gamète n'est observée lors du choc thermique en juillet. Le 27 juillet, la masse de gonade estimée atteint respectivement 0,014 g (+/- 0,008 EC) et 0,063 (+/- 0,026 EC) pour les huîtres en condition CN0 et CN1. Ces valeurs sont significativement différentes (ANOVA :  $F = 64,217$ ,  $ddl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ). La masse de gonade estimée pour les huîtres de la condition CN3, avant l'émission des gamètes, est de 0,71 g (+/- 0,39 EC), soit plus de dix fois supérieure à celle des huîtres en CN1. L'émission des gamètes chez ces huîtres se visualise par une baisse importante du pourcentage d'occupation de la gonade (Fig.15), et donc par une chute de sa masse (Fig. 16).



**Figure 15 :** Evolution du pourcentage d'occupation de la gonade dans la masse viscérale, pour les trois conditions nutritives (moyenne +/- écart type).



**Figure 16 :** Evolution de la masse estimée de gonade pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).

### 3. Suivi des fonctions écophysiologiques

#### 3.1. Consommation individuelle des huîtres

Les consommations individuelles moyennes des huîtres en CN0 et CN1 restent relativement stables d'avril à juillet 2004, autour de  $2 \cdot 10^6$  cell. $\cdot$ h<sup>-1</sup> pour CN0 et  $6 \cdot 10^6$  cell. $\cdot$ h<sup>-1</sup> pour CN1 (Fig. 17, Tableau 4 {p.20}). En revanche, la consommation individuelle moyenne des huîtres de CN3 augmente à chaque mois, et a

presque quadruplé entre avril et juillet 2004 (Fig. 17, Tableau 4). Les moyennes de l'ensemble des consommations individuelles mensuelles, de l'ordre de  $2 \cdot 10^6$ ,  $6 \cdot 10^6$  et  $40 \cdot 10^6$  cell.h<sup>-1</sup>, respectivement pour les huîtres des conditions CN0, CN1 et CN3, reflètent les différences croissantes de prise de nourriture entre les trois conditions expérimentales. L'émission des gamètes, déclenchée par le choc thermique du 22 juillet, provoque une brusque diminution de la consommation individuelle chez les huîtres de CN3, mais cette consommation retrouve son niveau précédent en 48 heures (Fig. 17).

Tableau 4 : Consommations individuelles moyennes ( $10^6$  cell.h<sup>-1</sup>) par mois pour chaque condition nutritive.

Mois	CN0	CN1	CN3
Avril	1,78 (+/- 0,49 EC)	5,90 (+/- 0,61 EC)	17,81 (+/- 3,32 EC)
Mai	2,47 (+/- 1,22 EC)	6,41 (+/- 1,93 EC)	22,94 (+/- 3,46 EC)
Juin	2,37 (+/- 0,68 EC)	6,28 (+/- 2,20 EC)	41,14 (+/- 9,15 EC)
Juillet	2,08 (+/- 1,22 EC)	6,24 (+/- 2,11 EC)	64,51 (+/- 13,26 EC)

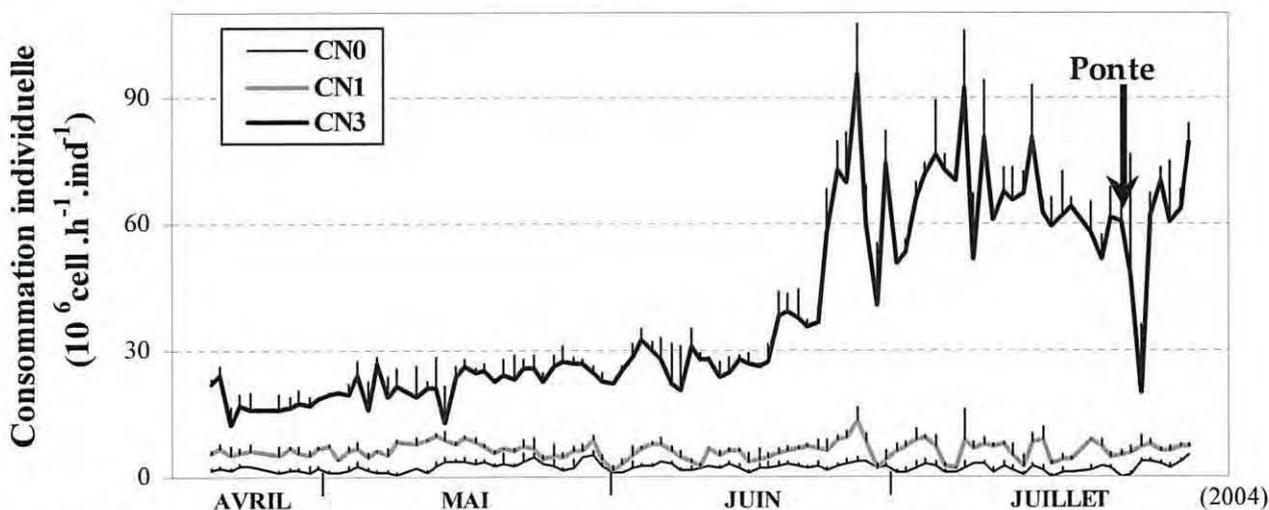


Figure 17 : Evolution de la consommation individuelle ( $10^6$ cell.h<sup>-1</sup>) des huîtres pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).

### 3.2. Respiration individuelle des huîtres

La respiration individuelle des huîtres, pour chaque condition nutritive, évolue dans le temps de façon similaire à la consommation individuelle (Fig. 18 {21}), avec une augmentation permanente de la respiration individuelle pour les huîtres en CN3 alors que la respiration individuelle des huîtres en CN0 et CN1 reste stationnaire (Fig. 18). Les moyennes mensuelles de respiration individuelle (Tableau 5 {21}) confirment la stabilité de cette fonction écophysiologicals chez les huîtres des conditions CN0 et CN1 tandis que pour les huîtres en CN3, cette variable augmente progressivement au cours de la gamétogenèse.

L'émission des gamètes du 22 juillet, chez les huîtres matures de la condition nutritive CN3, s'accompagne d'une augmentation très rapide de la respiration individuelle, de l'ordre de  $0.7$  mg O<sub>2</sub> . h<sup>-1</sup> pendant 48 heures (Fig. 18).

Tableau 5 : Respirations individuelles moyennes ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) par mois pour chaque condition nutritive

Mois	CN0	CN1	CN3
Avril	0,06 (+/- 0,01 EC)	0,09 (+/- 0,02 EC)	0,26 (+/- 0,07 EC)
Mai	0,06 (+/- 0,01 EC)	0,12 (+/- 0,02 EC)	0,33 (+/- 0,12 EC)
Juin	0,06 (+/- 0,01 EC)	0,14 (+/- 0,02 EC)	0,47 (+/- 0,14 EC)
Juillet	0,06 (+/- 0,01 EC)	0,15 (+/- 0,03 EC)	1,05 (+/- 0,25 EC)

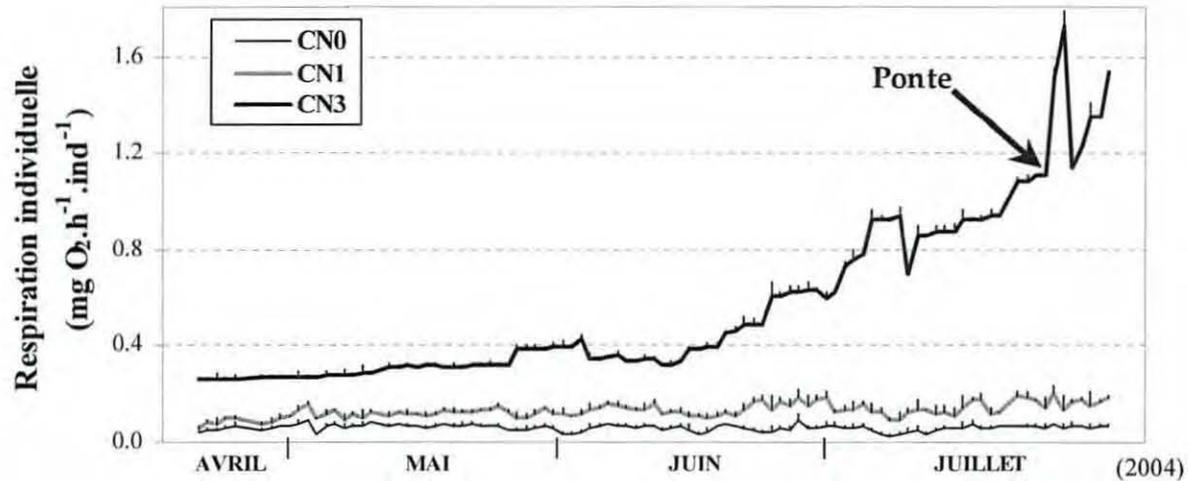


Figure 18 : Evolution de la respiration individuelle ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) des huîtres pour chaque condition nutritive (moyenne +/- écart type).

### 3.3. Efficacité d'absorption

La production de pseudo fécès des huîtres en condition nutritive CN3 s'est révélée négligeable tout au long de l'étude (inférieure à 10% des bio-dépôts, cf. Fig. 7, (b)). Les efficacités d'absorption de chaque lot d'huîtres en élevage sont mesurées six fois au cours de l'étude. L'efficacité d'absorption décroît progressivement au cours de la gamétogenèse, et ce d'autant plus vite que la condition nutritive est élevée (Fig. 19). Cette décroissance temporelle est linéaire pour chaque condition nutritive (modèles de régression linéaire significatifs). Ainsi entre avril et juillet, l'efficacité d'absorption décroît de 77 % à 68 % pour les huîtres en CN0, de 76 % à 62 % en CN1, et de 62 % à 46 % en CN3.

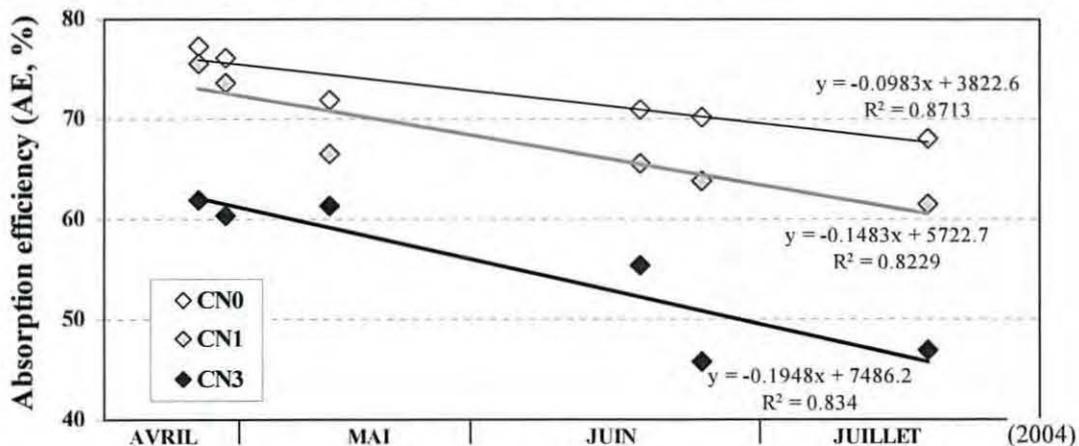
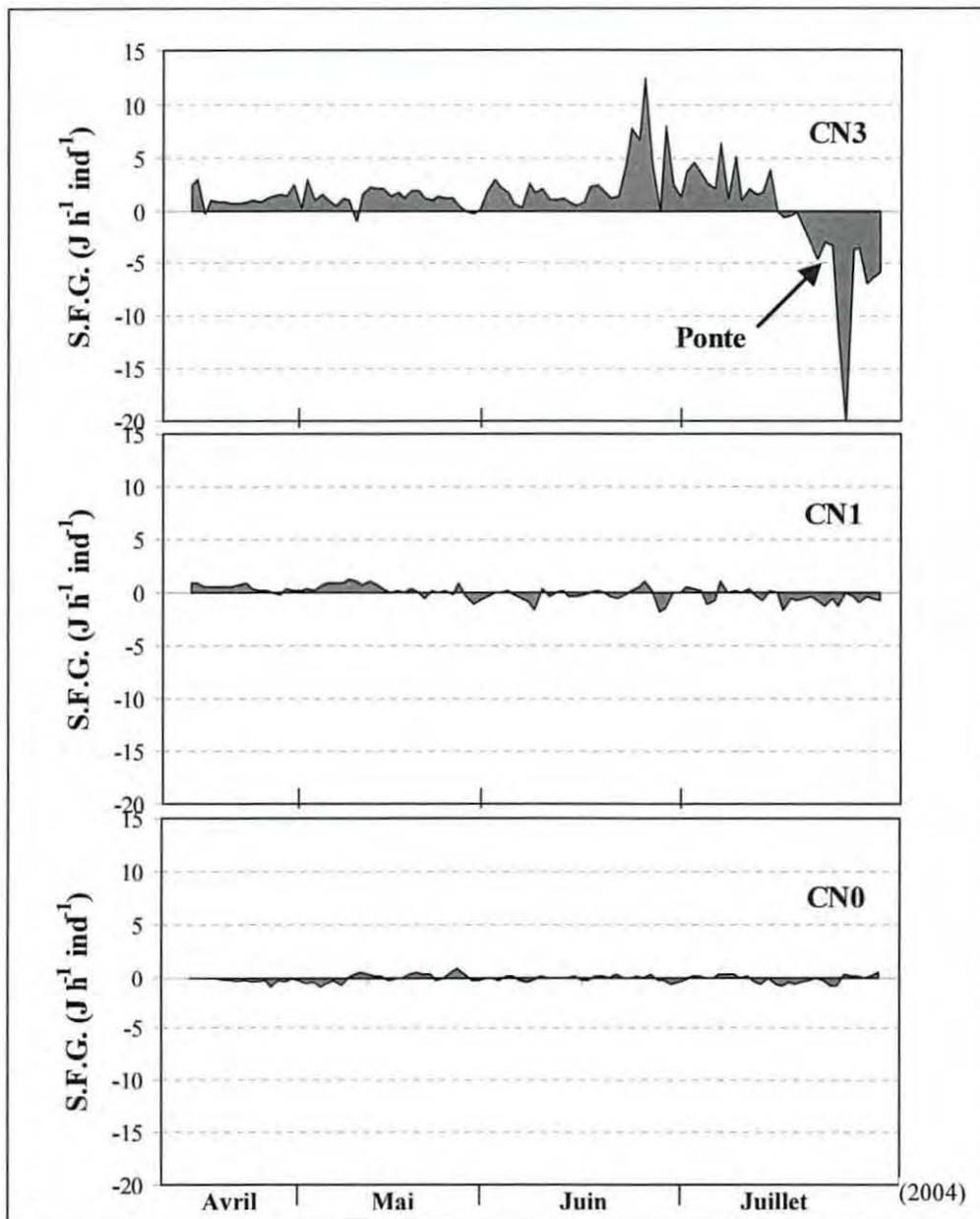


Figure 19 : Evolution de l'efficacité d'absorption des huîtres pour chaque condition nutritive.

#### 4. Suivi du bilan énergétique : le potentiel de croissance des huîtres (SFG)

Les données des fonctions écophysiological permettent d'obtenir, sur une base horaire, un potentiel de croissance (ou « Scope For Growth, SFG ») individuel pour chaque population d'huîtres placée dans les trois conditions nutritives expérimentales. Les potentiels de croissance obtenus pour chaque condition nutritive sont représentés sur la figure 20.



**Figure 20 :** Evolution du potentiel de croissance (SFG) des huîtres ( $J.h^{-1}.ind^{-1}$ ) pour chaque condition nutritive.

En accord avec les données de consommation individuelle et de respiration individuelle, le potentiel de croissance des huîtres des conditions nutritives CN0 et CN1 est quasiment nul d'avril à juillet. En revanche, le SFG des huîtres en CN3 est nettement positif jusqu'à la pleine maturation de la gonade ; il

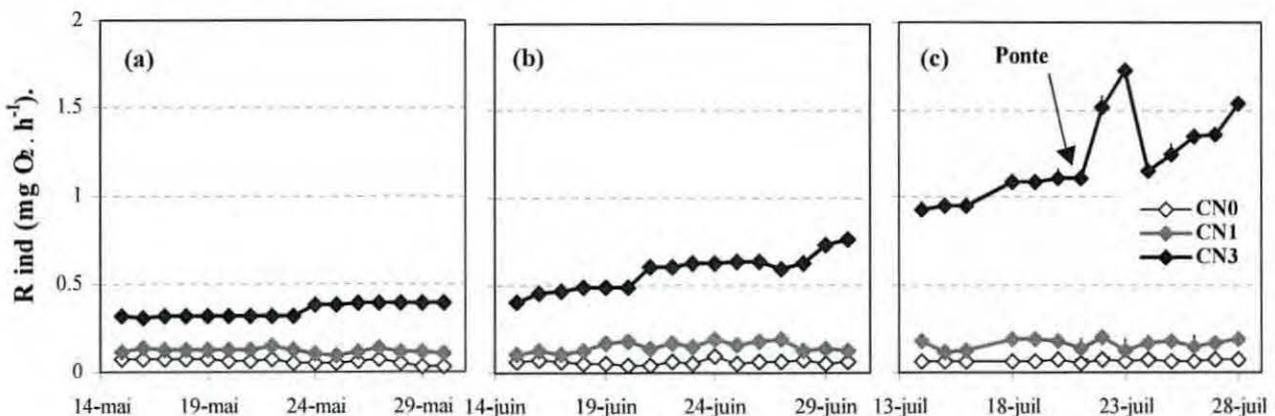
devient négatif à partir du 14 juillet et décroît jusqu'aux dernières mesures réalisées. La ponte (déclenchée le 22 juillet) entraîne un effondrement du SFG, correspondant à la baisse de la consommation individuelle conjointement avec la forte augmentation de la respiration individuelle. Jusqu'à cette date, le SFG moyen des huîtres en CN3 est de  $1,97 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $\pm 2,01 \text{ EC}$ ), puis il devient fortement négatif sur la fin de la période :  $-6,12 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $\pm 5,02 \text{ EC}$ ). Les potentiels de croissance moyens des huîtres en condition nutritive CN0 et CN1 sont respectivement de  $-0,13 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $\pm 0,33 \text{ EC}$ ) et de  $0,01 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $\pm 0,65 \text{ EC}$ ). Il ressort donc que le SFG des huîtres de la condition nutritive CN3 est clairement le plus élevé pendant la phase de maturation des gamètes, mais paradoxalement, il s'effondre brutalement en fin de maturation sexuelle pour devenir fortement négatif (Fig. 20). Les SFG de CN0 et CN1 restent faibles tout au long de la période de maturation et ne marquent pas de forte décroissance en fin de maturation sexuelle.

## 5. Evaluation du coût de la gamétogenèse

Il ressort des paragraphes précédents que la gamétogenèse exacerbée des huîtres en condition nutritive riche les entraîne progressivement dans une situation énergétique déficitaire en juillet. Le présent paragraphe vise à détailler plus précisément cette situation paradoxale.

### 5.1. Respiration individuelle au cours des différentes phases de la gamétogenèse

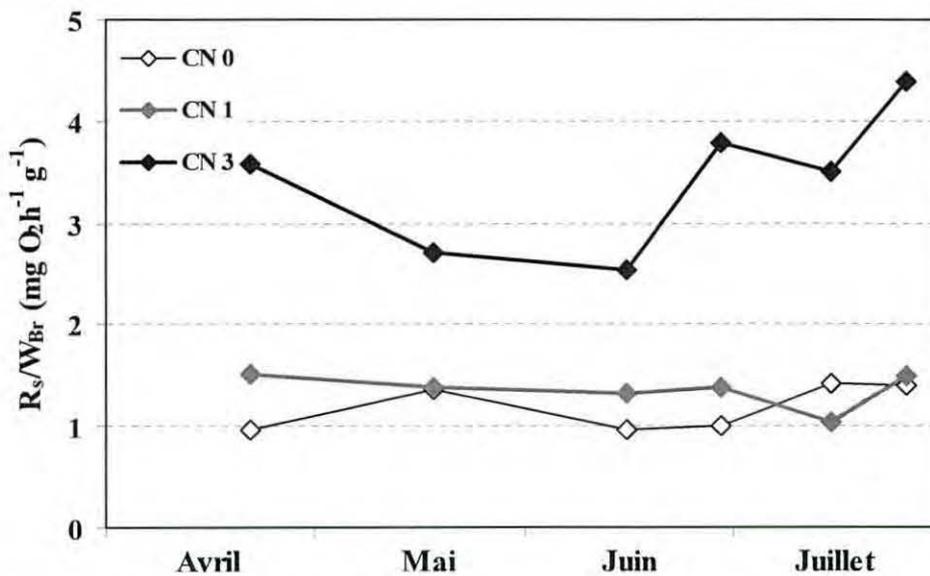
La figure 21 présente la respiration individuelle des huîtres de chaque condition nutritive à trois phases de la maturation sexuelle: (a) au début, *i.e.* du 30 avril au 15 mai ; (b) au milieu, *i.e.* du 15 juin au 30 juin, et (c) au maximum de la gamétogenèse et au moment de l'émission des gamètes, *i.e.* du 14 juillet au 28 juillet. Le schéma et montre clairement que la respiration individuelle est extrêmement stable en CN0 (Fig. 21(a)), qu'une très légère augmentation apparaît en CN1 en relation avec la très légère maturation observée (Fig. 21(b)), et que pour CN3, plus la maturation sexuelle avance, plus l'augmentation de la respiration individuelle est importante (Fig. 21(c)). En outre pour CN3, au sommet de la maturation sexuelle, l'émission des gamètes engendre un coût supplémentaire avec une augmentation de plus de 33 % de la respiration, et ce pendant les 48 h suivant cette émission.



**Figure 21 :** Evolution de la respiration individuelle (a) au début, puis (b) au milieu de la maturation sexuelle, et (c) au moment de l'émission des gamètes, pour chaque condition nutritive (moyenne  $\pm$  EC ; échelle des abscisses identique et commune aux trois graphiques).

## 5.2. Sollicitation de la branchie par la respiration individuelle

Les huîtres en condition CN3 présentent un développement exacerbé de la gonade (paragraphe 2.3.), et en parallèle une respiration extrêmement élevée. On est en droit de se demander si l'augmentation de la gonade en fonction du système respiratoire, *i.e.* de la masse des branchies, se fait de façon isométrique. La figure 22 répond à cette question en rapportant la respiration individuelle à 1 gramme de branchie sèche pour chaque condition trophique. Les valeurs de ce rapport sont 1,37, 1,39 et 2,71 en mai et 1,41, 1,49 et 4,40 en juin, respectivement pour les huîtres des conditions nutritives CN0, CN1 et CN3. Les branchies des huîtres en CN0 et CN1 ne sollicitent pas davantage leurs branchies en fin de maturation sexuelle, alors que les branchies des huîtres en CN3, déjà deux fois plus sollicitées en mai, le sont trois fois plus en juillet.



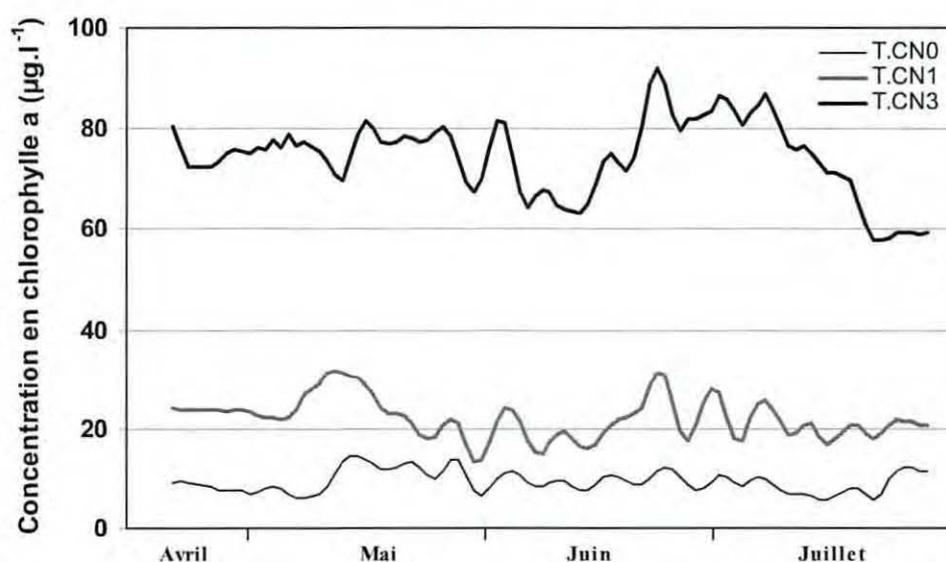
**Figure 22 :** Evolution du rapport de la respiration individuelle sur la masse de la branchie au cours de la maturation sexuelle, pour chaque condition nutritive.

# DISCUSSION

## 1. Analyse et critique de la méthodologie

### 1.1. Aspects zootechniques

Les contraintes zootechniques (*i.e.* caractéristiques techniques de la salle de physiologie) ne permettent pas de descendre au dessous de 230 l pour le volume d'élevage et de 50 l.h<sup>-1</sup> pour le débit de renouvellement (cf. § 2.1 du chapitre Matériels & Méthodes). Or, à partir du 6 juillet, les biomasses d'huîtres en élevage ont fortement diminué suite à un échantillonnage destiné à des tests d'infection bactérienne (cf. § 4.1. ci-dessous). Les seuils minima de zootechnie ont alors été franchis. Les conditions expérimentales ont cependant pu être maintenues, mais de façon moins rigoureuse. Le biais le plus probable vient de la distribution des algues, définie à partir des masses de chair sèche (MCHS) des huîtres. Pour les conditions nutritives CN0 et CN1, les masses de chair sèche sont restées trop basses tout au long de l'étude (maximum de 0,053 g et de 0,102 g MCHS, respectivement pour CN0 et CN1) pour permettre un apport journalier d'algues strictement proportionnel à celles-ci. L'expérimentation s'est déroulée en simulant une MCHS minimale de 0,15 g. Malgré cette approximation, trois niveaux trophiques graduels ont bien été mis en place dans les bacs témoins (Fig. 23), avec une moyenne d'environ 10 µg chl *a*.l<sup>-1</sup> pour la condition nutritive CN0, 22 µg chl *a*.l<sup>-1</sup> pour CN1 et 75 µg chl *a*.l<sup>-1</sup> pour CN3.



**Figure 23** : Evolution de la concentration en chlorophylle *a* (µg chl *a*.l<sup>-1</sup>) des bacs témoins de chaque condition nutritive.

En outre, les bacs d'élevage suivis par le système *MAREL-Argenton* sont au nombre de huit. Il n'a donc pas été possible de dupliquer le nombre de conditions nutritives afin de vérifier la répétabilité des mesures relevées pour chaque condition. La constance entre tous les bacs de certains paramètres hydrologiques comme la température ou la salinité, ainsi que la logique des mesures de chlorophylle *a* et d'oxygène dissous témoignent néanmoins d'une zootechnie rigoureuse et de l'absence d'effet bac.

## 1.2. Cohérence des conditions

### a) Comparaison des conditions expérimentales à des conditions de milieux naturels

Les conditions de nutrition appliquées au cours de l'expérimentation ont permis de « reproduire » un milieu trophique pauvre (CN0/CN1: 0-5  $\mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$ ) et un milieu riche (CN3 : 15-20  $\mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$ ). Les valeurs obtenues de la concentration en chlorophylle *a* simulent typiquement un milieu océanique côtier (cf. CN0 et CN1) et une baie moyennement eutrophe (cf. CN3 ; Menesguen, 2001). En prenant l'exemple de la conchyliculture en Normandie (Ropert *et al.*, 2003), nos deux conditions se « rapprochent » respectivement de la côte ouest (Saint Germain) pour le milieu « pauvre » et de la baie des Veys pour le site « riche ». Les valeurs printanières du bloom phytoplanctonique sont effectivement de 1 à 5  $\mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$  à Saint Germain contre 15 à 20  $\mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$  en baie des Veys (Daniel & Le Goff, 2002). Dans nos conditions nutritives pauvre (CN0) et faible (CN1), le milieu oligotrophe des huîtres en élevage illustre bien leur capacité à épurer leur environnement de la quantité modérée (CN1) à très modérée (CN0) de nourriture apportée. Ce résultat rejoint les observations *in situ* faites par Deslous-Paoli *et al.* (2001) dans le bassin de Thau.

### b) Comparaison des croissances obtenues avec des croissances suivies *in situ*

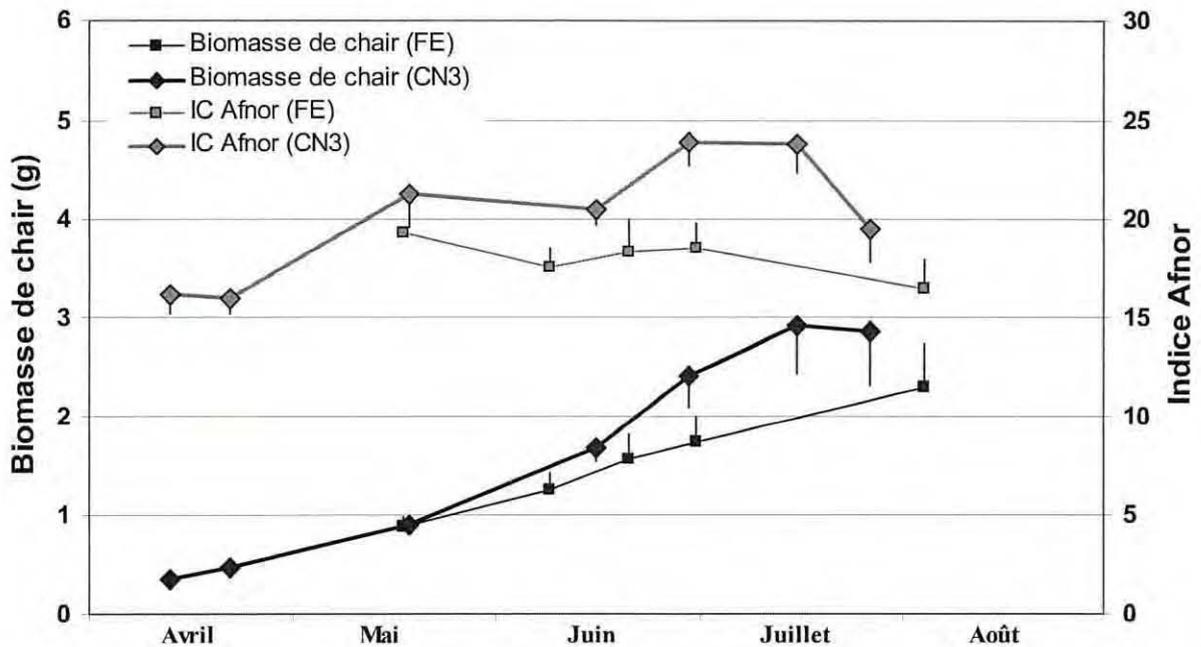
En parallèle de notre expérimentation, une sous-population de même origine que celle de cette étude a été placée en élevage sur les parcs ostréicoles de la zone de Fort-Espagnol en rivière d'Auray (Morbihan). Le suivi *in situ* de cette sous-population a été réalisé par le Laboratoire Conchylicole de Bretagne (LCB, Ifremer) avec envoi des échantillons à la Station Expérimentale d'Argenton pour les analyses de biométrie et d'histologie. La figure 24 {p.27} présente l'évolution de la croissance en chair et de l'indice Afnor de cette sous-population. Les valeurs obtenues se situent juste entre les valeurs des conditions CN1 et CN3, ce qui montre que les normes zootechniques appliquées en condition expérimentale contrôlée permettent de se « rapprocher » de façon satisfaisante des conditions de terrain.

## 1.3. Intérêt des trois conditions expérimentales mises en place

Il existe une forte différence au niveau des fonctions écophysologiques mesurées (*i.e.* respiration, consommation et efficacité d'absorption) entre la condition trophique la plus riche (CN3) et les deux conditions trophiques les plus pauvres (CN0 et CN1). Par contre, les différences entre ces deux conditions sont peu importantes. En rapprochant ce constat de l'état hydrobiologique des trois conditions d'élevage, il semble que le choix trophique CN1 n'ait pas été le meilleur intermédiaire pour obtenir une croissance supérieure à celle du naissain de la condition trophique CN0, ainsi qu'un développement modéré mais significatif de la gonade du naissain stocké (*i.e.* jusqu'à la ponte).

## 1.4. Calcul en écophysologie

Les travaux sur l'écophysologie des bivalves nécessitent classiquement un suivi minutieux des paramètres hydrobiologiques, et sont réalisés pour la plupart sur des enceintes individuelles, où seul un



**Figure 24** : Evolution de la croissance en chair et de l'indice Afnor des populations d'huîtres CN3 et de la zone ostréicole de *Fort Espagnol* (Morbihan) de même origine que celle de notre étude (moyenne +/- IC).

animal (ou un nombre restreint d'animaux) peut être étudié, et toujours sur une période de quelques heures à une semaine au maximum (Riisgard, 2001). Ces enceintes individuelles, qui existent également à la Station Expérimentale d'Argenton, sont nécessaires à la compréhension de l'écophysiologie des organismes marins. Mais une approche « populationnelle » du type *MAREL-Argenton* est susceptible d'appréhender, de façon plus cohérente, la réponse des animaux à leur milieu. Le travail présenté ici s'avère, à notre connaissance, pionnier dans le domaine de l'écophysiologie « populationnelle ».

Le calcul du potentiel de croissance, ou Scope For Growth (SFG), est possible en écophysiologie populationnelle grâce à la mesure de l'efficacité d'absorption. Cette mesure s'effectue à travers la récolte des bio-dépôts où plusieurs biais peuvent apparaître. La production de pseudo fèces a été estimée négligeable dans cette étude. Cependant, une séparation plus fine des fèces (F) et pseudo fèces (PF) serait idéale pour chiffrer précisément la production de PF au niveau des bacs d'élevage.

### 1.5. Mortalité différentielle entre les conditions expérimentales

Les trois lots d'huîtres servant à notre étude étaient initialement les mêmes. Le nombre important d'huîtres a permis d'apprécier la gamétogenèse de ces animaux au sein de toute une population. Cependant, le lot d'huîtres de la condition nutritive CN3 a vu la moitié de sa population mourir pendant la gamétogenèse active, avant la fin de la maturation et du déclenchement de l'émission des gamètes.

La population restant alors en place peut ne plus être représentative de la population originelle (*i.e.* perte de diversité génétique) comme le sont les deux lots des conditions CN0 et CN1. Les mortalités observées pendant notre étude sont tout à fait comparables à celles relevées *in situ* et différencient de la même façon des zones riches ou pauvres en éléments nutritifs (e.g., Maurer & Comps, 1986 ; Ropert *et al.*, 2003).

## 2. Ecophysiologie de *C. gigas*

En ce qui concerne l'activité de filtration du naissain, les résultats montrent clairement que la consommation individuelle ( $C$ ,  $\text{cell.h}^{-1}$ ) des huîtres est proportionnelle à l'apport journalier d'algues et donc à la concentration phytoplanctonique de chaque condition trophique. En avril, les huîtres de la condition CN0 consomment en moyenne  $2.10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  (*i.e.*  $4,2 \cdot 10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ MCHS}$ ), contre  $6.10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  (*i.e.*  $6,8 \cdot 10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ MCHS}$ ) en condition CN1 et  $18.10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  (*i.e.*  $12,1 \cdot 10^6 \text{ cell.h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ MCHS}$ ) en condition CN3. Ces résultats extrêmement logiques sont conformes aux ordres de grandeur donnés dans la littérature (e.g. Le Gall & Raillard, 1988 ; Utting & Spencer, 1991, Utting & Millican, 1997). En outre, les différences de concentration phytoplanctonique dans les trois bacs expérimentaux montrent clairement que les huîtres adaptent leur débit de pompage (ou débit de filtration,  $CR$ ,  $\text{l.h}^{-1}$ ) à la concentration phytoplanctonique en épurant complètement le milieu en CN0 et CN1 et de façon plus atténuée en CN3.

En ce qui concerne l'efficacité d'absorption (AE, %), les valeurs trouvées dans notre étude sont en complète conformité avec les valeurs de la littérature, dans le cas d'un régime phytoplanctonique pur, et correspondent relativement bien au modèle proposé pour les bivalves marins reliant l'efficacité d'absorption avec le contenu en organique du bol alimentaire (cf. synthèse par Pouvreau, 1999). En outre, notre étude montre aussi que l'AE diminue au fur et à mesure de la gamétogenèse. Ce résultat ne fait que confirmer sur le naissain les résultats trouvés antérieurement sur les adultes (Soletchnik *et al.*, 1997; Pouvreau *et al.*, 2002 ; Coquard 2003). Une explication à ce phénomène paradoxal avait été avancée: l'huître consomme plus en période estivale, le temps de transit intestinal s'en trouve accéléré et en conséquence, l'efficacité d'absorption diminue (Bayne *et al.*, 1987). Si cette hypothèse pourrait valable pour la condition CN3, elle ne l'est pas pour les conditions CN1 et CN0, qui malgré une consommation constante, présentent une réduction de l'efficacité d'absorption en période estivale. A notre avis, ce résultat important reste pour l'instant sans explication.

Enfin, pour ce qui concerne la respiration ( $R$   $\text{mg O}_2.\text{h}^{-1}$ ), les valeurs trouvées dans notre étude varient de  $0,06 \text{ mg O}_2.\text{h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $0,60 \text{ mg O}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ MCHS}$ ) en condition CN0 à  $1,05 \text{ mg O}_2.\text{h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$  ( $1,64 \text{ mg O}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ MCHS}$ ) en condition CN3 au maximum de la gamétogenèse. Pour les conditions CN0 et CN1, ces valeurs sont en complète conformité avec le modèle de respiration (« routine metabolic rate ») vs température ( $T^\circ\text{C}$ ) proposé par Bernard (1983) pour *C. gigas*, à savoir  $\ln(R) = 0,076 + 0,195 \ln(T)$ . Les valeurs obtenues en CN3 sont plus fortes que celle prédites par ce modèle. Exception faite de l'action dynamique spécifique due à la nutrition (extra-chaleur, Lucas, 1992), cette différence réside dans le développement accru de la gonade chez les huîtres en CN3, biosynthèse qui entraîne une consommation d' $\text{O}_2$  supplémentaire (« overhead of growth and reproduction », Kooijman, 2000,

p.114 & p.136 ; « maturity maintenance », Van der Veer *et al.*, 2001). En outre, ces résultats rejoignent ceux de Soletchnik *et al.* (1997) et Pouvreau *et al.* (2002) obtenues sur des huîtres en pleine gamétogenèse.

### 3. Naissain et gamétogenèse

A l'exception des différents travaux de Maurer & Borel (1986), de Dinamani (1987) et d'O'beim *et al.* (1995), il existe à notre connaissance peu d'études sur la gamétogenèse des huîtres lors leur première année d'existence (*i.e.* stade naissain) et sur leur plasticité en fonction des conditions environnementales de l'année. Il ressort de nos travaux que cette première gamétogenèse semble extrêmement dépendante des conditions phytoplanctoniques du printemps comme l'a écrit Maurer & Borel (1986) en démontrant une forte variabilité inter-annuelle, avec des années où la gamétogenèse est restreinte et le fraie inexistant opposées à des années où le cycle de gamétogenèse peut être complet. Par contre, nos résultats divergent de ceux de Maurer & Borel (1986) dans le sens où notre étude met clairement en évidence que la concentration phytoplanctonique printanière influe directement sur la maturation du naissain, ce qui ne correspond pas aux observations faites par ces auteurs sur site. Enfin, nos résultats rejoignent complètement ceux obtenus sur des huîtres de 18 mois et qui montrent la très forte plasticité de la gamétogenèse de *C. gigas* aux conditions environnementales et notamment aux conditions trophiques, en augmentant la production de gamètes dans les milieux riches (*e.g.* Imai *et al.*, 1965 ; Mori, 1979 ; Pouvreau *et al.*, 2002 ; Enriquez, 2004).

### 4. Les causes potentielles des mortalités estivales

Cette étude apporte plusieurs éléments utiles à la compréhension des phénomènes de mortalité estivale de naissain. Plus précisément, il en ressort trois conditions différentes entraînant des mortalités ou favorisant un état énergétique moindre. Par ordre chronologique, ces conditions sont les suivantes :

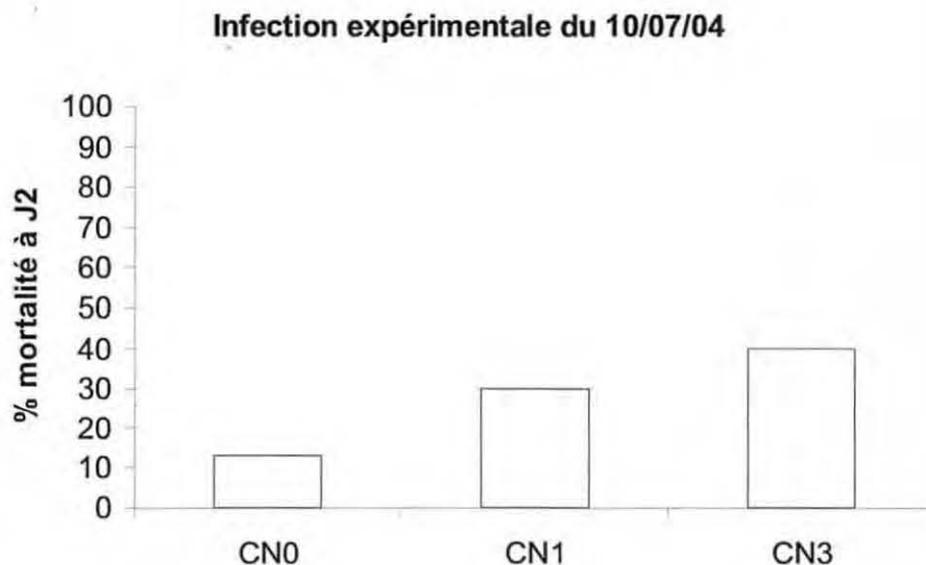
- mortalités massives lors de gamétogenèse active de forte intensité (CN3, mois de juin) ;
- affaiblissement estivale en fin de gamétogenèse (CN3>CN1>CN0, mois de juillet) ;
- coût énergétique de l'émission des gamètes (CN3, fin juillet).

#### 4.1. Mortalités estivales en période de gamétogenèse active : le rôle des hémocytes ?

Un évènement de mortalité massif a touché au mois de juin les huîtres de la condition CN3 en pleine période de gamétogenèse active. En effet, c'est pendant cette période (15 mai-15 juin) que les huîtres en condition CN3 réalisent plus de 50 % de leur biomasse gonadique. Dans les huîtres moribondes retirées des bacs, une souche de vibrio pathogène a été identifiée (*a priori* *Vibrio aestuarianus*, JL Nicolas & M. Garnier, 2004, LPI/Ifremer-Brest, *Comm. pers.*, en attente de confirmation par méthode moléculaire). Le système immunitaire des bivalves, et notamment celui des huîtres, est encore mal connu (*e.g.* Auffret, 1988). Mais il semble que le rôle des hémocytes soit double : à la fois acteurs des mécanismes de défense anti-bactérien et acteurs dans la digestion et le transport des nutriments nécessaires aux biosynthèses (Cheng, 1996). En pleine période de gamétogenèse accrue par des conditions phytoplanctoniques pléthoriques, on est en droit de formuler l'hypothèse selon laquelle les hémocytes focaliseraient leur action sur la construction gonadique au détriment des mécanismes de leur défense immunitaire, laissant le champ libre à tout pathogène opportuniste (Delaporte *et al.*, 2004).

#### 4.2. Mortalités estivales en fin de gamétogenèse : l'effondrement du bilan énergétique ?

A partir de la fin juin, et principalement dans la condition nutritive la plus élevée, le bilan énergétique décroît progressivement, puis devient négatif à partir du 15 juillet pour s'écrouler ensuite à des valeurs voisines de  $-7 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ , voire plus faibles encore au moment de l'émission des gamètes. En apportant beaucoup plus de détails temporels, les résultats 2004 confirment les résultats des travaux antérieurs de Soletchnik *et al.* (1997); Pouvreau *et al.* (2002), Coquard (2003) et Enriquez (2004). Ces travaux montraient effectivement, sur des populations de 18 mois d'origines génétiques variées, l'effondrement estivale du bilan énergétique d'huîtres nourries abondamment au printemps et présentant une gamétogenèses exacerbée en été. L'effondrement de ce bilan est dû à l'action conjointe en été de la diminution de l'efficacité d'absorption et de l'augmentation du métabolisme respiratoire. Néanmoins, l'effondrement du bilan énergétique n'est pas synonyme de mortalité massive. Dans notre étude de 2004, aucun évènement majeur de mortalité n'a fait suite à cet effondrement. Une infection expérimentale par balnéation avec une souche de vibrio pathogène (*Vibrio lentus*, F. Le Roux, 2004, LGP/Ifremer La Tremblade, *Comm. pers*), réalisée sur un échantillon de nos trois lots d'huîtres en juillet, au moment où le bilan énergétique commence à s'effondrer, montre très clairement la sensibilité des huîtres en relation avec leur statut énergétique du moment (Fig. 25). Les huîtres en condition CN3, *i.e.* présentant un SFG de plus en plus négatif à cette période, sont les plus sensibles à cette infection.



**Figure 25 :** Résultat d'une infection expérimentale réalisée en juillet 2004 par balnéation avec une souche de *vibrio lentus* sur trois lots d'huîtres présentant un bilan énergétique de plus en plus bas dans le sens CN0>CN1>CN3 (F. Le roux, 2004, comm. pers. Ifremer La Tremblade).

En d'autres termes, il semble que pour qu'une mortalité s'exprime, il faut au moins le croisement de deux facteurs : le statut physiologique de l'animal et la présence d'un pathogène opportuniste.

### *4.3. Mortalités estivales et émission des gamètes*

A notre connaissance, il n'existe aucune étude sur l'analyse du bilan énergétique au moment de l'émission des gamètes. Les résultats présentés, ici et obtenus sur une population au moment de l'émission des gamètes, sont très riches d'enseignement. Ils permettent de fournir une première évaluation du coût énergétique que peut consacrer une huître lors de l'émission des gamètes. Il apparaît en premier lieu que l'animal cesse de s'alimenter pendant et après la ponte (pendant environ 48 h) et qu'en parallèle sa respiration augmente de plus de 30 %. Ceci a pour conséquence une forte baisse du SFG de plus de  $15 \text{ J.h}^{-1}$ . Si ces résultats apportent des éléments nouveaux dans la connaissance de l'écophysiologie de la reproduction, ils permettent aussi d'évaluer en terme énergétique le coût de la ponte, et montrent que ce phénomène ne fait qu'accroître la détresse physiologique des huîtres à cette période de l'année. Sous différents aspects, la reproduction depuis l'activation de la gamétogenèse à l'émission des gamètes apparaît comme le talon d'Achille chez cette espèce.

## CONCLUSION

Cette étude a clairement démontré l'importance première du niveau trophique d'une part sur le développement de la gonade de naissain d'huîtres lors de leur première maturation sexuelle, et d'autre part sur un phénomène de mortalité massive apparaissant pendant la phase active de la gamétogenèse chez du naissain d'huîtres conditionné en environnement eutrophe (CN3, 15-20  $\mu\text{g chl } a.l^{-1}$ ), seul à avoir réalisé une maturation complète (*i.e.* jusqu'à l'émission des gamètes). Le naissain d'huîtres conditionné dans un milieu moins riche (CN0 et CN1, 1-5  $\mu\text{g chl } a.l^{-1}$ ) ne connaît pas ou peu de croissance et de développement de la gonade. En revanche, ces individus, bien que moins nourris que les précédents, ne subissent aucune mortalité massive au cours de leur gamétogenèse. Des différents constats faits dans nos travaux, la sensibilité aux phénomènes de mortalité estivale ne semble pas d'abord due au simple bilan énergétique, mais plutôt à l'évolution de ce dernier. Mieux vaut un faible potentiel de croissance constant au cours de la gamétogenèse qu'un potentiel de croissance élevé mais qui est amené à s'effondrer en fin de maturation sexuelle. Paradoxalement, d'un point de vue dynamique de population, la population d'huîtres qui assure sa survie au détriment de sa reproduction a une fitness inférieure à celle d'une population au cycle de gamétogenèse complet et qui subira de fortes mortalités estivales.

Dans le cadre de MOREST, nos travaux expérimentaux renforçant les observations *in situ* de Ropert *et al.* (2003), il semblerait intéressant d'envisager une stratégie de sauvegarde des cheptels en élevage en fonction de l'environnement trophique dans lequel ils se trouvent. Ainsi, pendant la phase active de la gamétogenèse, un déplacement des élevages en zone eutrophe vers des zones ostréicoles oligotrophes pourrait prévenir des phénomènes de mortalités estivales en diminuant l'effort de reproduction réalisé par le naissain d'huîtres et exacerbé par un niveau trophique élevé. Cependant, l'évolution des eaux côtières françaises, de plus en plus riche en éléments nutritifs d'origines anthropiques (*e.g.* nitrate, phosphate, matière organique) risque d'accentuer les phénomènes de mortalités massives de l'huître creuse, tant en importance qu'en nombre de sites nouvellement touchés.

Enfin, d'un point de vue fondamentale, même si les facteurs déclenchant et aggravant les mortalités estivales commencent à être bien cernés, les relations environnement / individu qui y sont rattachées restent à comprendre et à interpréter pour tenter de remédier ou du moins de prédire ces phénomènes de mortalité. Dans cet objectif, un travail de synthèse des nombreuses données existantes va être réalisé par l'IFREMER, avec un complément de nouvelles expérimentations, pour aboutir à un modèle générique de croissance, de reproduction et de survie de l'huître creuse *C. gigas*. Ces travaux vont faire l'objet d'une thèse de doctorat qui débutera à l'automne 2004.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonyme, 2003.** Données économiques maritimes françaises. Ifremer Brest. Service Economique Maritime (SEM).
- Anonyme, 2004.** Statistiques de la F.A.O. en ligne, le 3 juin 2004. <http://apps.fao.org/default.jsp>
- Auffret, M., 1988.** Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish. Soc. Spe. Publ.* **18**, 169-177.
- Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., 1987.** Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **111**, 1-22.
- Bayne, B.L., Newell, R.C., 1983.** Physiological energetics of marine molluscs. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca*, Vol. 4, Academic Press, London, pp. 407-515.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000.** Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Bioch. Phys. Part B*, **125**, 359-369.
- Bernard, F.R., 1983.** Physiology and the Mariculture of some northeastern Pacific Bivalve Molluscs. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* **63**, 24 pp.
- Bower, S.M., Hervio, D., McGladdery, S.E., 1994.** Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *Ices Council Meeting Papers, ICES-CM-1994/F:30*, 5pp.
- Calvo, L.M.R., Luckenbach, J., Allen, S., Burreson, E.M., 1999.** Comparative field study of *C.gigas* and *C.virginica* in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* **18**, 465-473.
- Cheney, D.P., MacDonlad, B.F., Elston, R., 2000.** Summer mortality of Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* : initial findings on multiple environmental stressors in puget sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.* **19**, 353-359.
- Cheng, T., 1996.** Hemocytes: Forms and functions in "The eastern oyster *Crassostrea virginica*" (eds R.I.E Newel, V.S. Kennedy and A.F. Eble) Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland pp 299-334.
- Chu, F.L.E., 1996.** Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oyster. *J. Shellfish Res.*, **15**, 57-66.
- Chu, F.L.E., Volety, A.K., Constantin, G., 1996.** Comparaison of *C. gigas* and *C. virginica*: effect of temperature and salinity on susceptibility to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* **15**, 375-380.
- Coquard, E., 2003.** Etude des différences de gamétogenèse, d'écophysiologie et de bioénergétique de deux lignées génétiques d'huître creuse : implication dans le phénomène des mortalités estivales. Rapport de Diplôme Universitaire, Univ. Brest. 71 pp.
- Conover, J., 1966.** Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **11**, 338-345.
- Daniel, A., Le Goff, R., 2002.** Evaluation de l'état d'eutrophisation des eaux côtières et estuariennes de Basse-Normandie. Ifremer RST/DEL 0202. 64 pp.
- Daniel, A., 2002.** Etude de définition d'un Réseau Hydrologique Littoral en Normandie. Rapport IFREMER RST.DEL/0210/PB, France.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F., 2004.** Seasonal variation and effect of food availability on biochemical composition and immune responses of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *In prep.*
- Deslous-Paoli, J.-M., Mazouni, N., Gentien, P., Courties, C., Vaquer, A., Daniélou, M.-M., Troussellier, J.-M., 2001.** Use of plankton by suspended filter feeders cultured in the Thau lagoon (France). In: IFREMER (Ed.), *Aquaculture, environment and marine phytoplankton*, Brest, 76-88.
- Dinamani, P., 1987.** Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* **64**, 65-67.

- Emmett, B.T., Baden, R.L., 1984.** The relationship between summer mortality in cultured blue mussels *Mytilus edulis* and the annual cycling of energy storage products. *J. Shellfish Res.* **4** (1), 93-101.
- Enriquez, M., 2004.** Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Th. Univ. Brest Occ., 187 pp.
- Fagon, N., 2002.** Mesures automatisées en écophysiologie marine. Dossier de présentation du thème de projet DPTP. 37pp.
- Friedman, C.S., Hedrick, R.P., 1991.** Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J. Invertebr. Pathol.* **57** (1), 109-120.
- Friedman, C.S., Shamseldin, A., Pillai, M., Olin, P.G., Cherr, G.N., Jackson, S.A., Rifkin, E., Uhlinger, K.R., Clegg, J.S., 1997.** Summer mortality and the stress response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* **16**, 335-349.
- Friedman, C.S., Cherr, G.N., Clegg, J.S., Hamdoun, A.H., Jacobsen, J.L., Jackson, S.A., Uhlinger, K.R., 1998.** Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oyster, *C. gigas* and *C. virginica*. *J. Shellfish Res.* **17** (4), 137-151.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le moine, O., Razet D., Geairon, P., Faury, N., Taillade, S., 1998.** Summer mortality of the Pacific cupped oyster *C. gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Ices Statutory Meeting, Pop. Biol. Mariculture Committee CM 1998 /CC: 14*, 20pp.
- Héral, M., Deslous-Paoli, J.M., 1983.** Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta* **6** (2), 193-199.
- Imai, Takeo; Numachi, Ken-ichi; Oizumi, Juichi; Sato, Shigeru, 1965.** Studies on the Mass Mortality of the Oyster in Matsushima Bay II. Search for the Cause of Mass Mortality and the Possibility to Prevent it by Transplantation Experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute. Shiogama*, **25**, 27-38.
- Kennedy, A.V., Battle, H.I., 1964.** Cyclic changes in the gonad of the american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* **42**, 305-321.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000.** Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge University Press, Cambridge. 366 pp.
- Le Gall, J.L., Raillard, O., 1988.** Influence de la température sur la physiologie de l'huître *Crassostrea gigas*. *Océanis* **14**, 603-608.
- Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000.** Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fish. Sci.* **66**, 502-508.
- Lucas, A., 1992.** Bioénergétique des animaux aquatiques. *Editions Masson*. 179pp.
- Mallet, A.L., Carver, C.E.A., Freeman, K.R., 1990.** Summer mortality of the blue mussel in eastern Canada: Spatial, temporal, stock and age variation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **67** (1), 35-41.
- Maurer, D., Borel, M., 1986.** Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* **15**, 125-134.
- Maurer, D., Comps, M., 1986.** Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *Pathology in Marine Aquaculture* **9**, 66-78.
- Mazouni, N., Gaertner, J.C., Deslous-Paoli, J.-M., Landrein, S., Geringer d'Oedenberg, M., 1996.** Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish-farming lagoon (Thau, France). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **205**, 91-113.
- Menesguen, A., 2001.** L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la commission Européenne, DG/ENV/B1, 59 pp.
- Mori, K., 1979.** Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* **53**, 361-369.

- Myrand, B., Gaudreault, J., 1995.** Summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) in the Magdalen Islands (southern Gulf of St Lawrence, Canada). *J. Shellfish Res.* **14** (2), 193-207.
- Myrand, B., Guderley, H., Himmelman, J.H., 2000.** Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalene Islands, Southern Gulf of St. Lawrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **197**, 193-207.
- O'Beirn, F.X., Walker, R.L., Heffernan, P.B., 1995.** Gametogenic Development of Juvenile Oysters and their Contribution to the Prolonged Spawning Season in Georgia's Coastal Waters. *Aquaculture* **95**, Book of Abstracts.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981.** Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *C. gigas* in the Washington state. *J. Shellfish Res.* **1**, 9-16.
- Pouvreau, S., Pierre, S., Enriquez, M., Le Souchu, P., Connan, J.P., Le Roy, B., Mingant, C., 2002.** Analyse bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition contrôlée : Implication dans le syndrome des mortalités estivales. Rapport Intermédiaire de contrat, MOREST. Ifremer Brest, DRV/RA/LPI. 56 pp.
- Pouvreau, S., 1999.** Étude et modélisation des mécanismes impliqués dans la croissance de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera*, au sein de l'écosystème conchylicole du lagon de l'atoll de Takapoto (Polynésie française). Thèse de Doctorat de l'ENSA, spécialité Halieutique et Aquaculture, Rennes (France), 250 pp.
- Ropert, M., Hugonnet, V., Le Gagneur, E., Simonne, C., Kopp, J., 2003.** Contributions du LCN au défi MOREST en 2002. DRV/RA/RST/LCN/2003-11, 63 pp.
- Riisgard, H.U., 2001.** On measurement of filtration rates in bivalves – the stony road to reliable data: review and interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **211**, 275-291.
- Robert, R., Gérard, A., (1999)** Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *C. gigas* and the scallop *P. maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* **12** (2), 121-130.
- Scherrer, B., 1984.** Biostatistiques. Gaëtan Morin éd., 850 pp.
- Shamseldin, A.A., Clegg, J.S., Friedman, C.S., Cherr, G.N., Pillai, M.C., 1997.** Induced thermotolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* **16** (2), 487-491.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., 1997.** Écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *C. gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour.* **10**, 177-185.
- Tremblay, R., Myrand, B., Sevigny, J.M., Blier, P., Guderley, H., 1998.** Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* L. to summer mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **221**, 27-58.
- Utting, S.D., Millican, P.F., 1997.** Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* **155**, 45-54.
- Utting, S.D., Spencer, B.E., 1991.** The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Pub. Ministry Agri. Fish. Food, Lab. Leaflet 68, 31 pp.
- Van der Veer, H.K., Kooijman, S.A.L.M., Van der Meer, J., 2001.** Intra- and interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets. *J. Sea Research* **45**, 303-320.
- Veaux, F., 2001.** Étude de l'effort de reproduction de l'huître creuse *C. gigas*, par stéréologie: mise au point de la méthode d'analyse d'image et application à l'étude du cycle de reproduction de *C. gigas* dans l'étang de Thau. Rapport de stage de fin d'études de technicien supérieur. Intechmer, Cherbourg, France. 39pp.
- Versteby, J., 1993.** Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using verticals sections. *Anat. Rec.* **235**, 325-334.

# ANNEXES

<i>Annexe 1</i> .....	<i>x</i>
<i>Annexe 2</i> .....	<i>xiv</i>

## Méthodes d'histologie et de stéréologie

[telles que décrites par Coquard (2003) et appliquées en routine à la Station Expérimentale d'Argenton]

### 1. *Dissection et Fixation des tissus*

Lors de chaque prélèvement, on réalise d'abord un suivi biométrique des individus en mesurant la longueur (axe dorso-ventral) de la coquille, puis en pesant la coquille et la chair totale. Après dissection de la chair, la masse viscérale est placée dans un pilulier contenant un liquide fixateur couramment utilisé pour les tissus d'invertébrés marins : le Davidson (Anonyme, 1983). Ce liquide permet de préserver l'intégrité des tissus, en le protégeant des attaques bactériennes, en empêchant l'autolyse de certains constituants sous l'effet d'enzymes cellulaires, et en conservant l'organisation tridimensionnelle des structures. Le Davidson va aussi préparer les tissus aux traitements ultérieurs: inclusion et coloration, (Martoja & Martoja-Pierson, 1967) .

La solution de Davidson est réalisée en ajoutant successivement: 400ml de Glycérol, 800ml de Formaldéhyde, 1200 ml d'alcool à 95° et 1200 ml d'eau de mer filtrée. Un dixième d'acide acétique est ajouté juste avant la fixation.

Les échantillons sont maintenus dans le Davidson durant 48h, à une température de 4 à 8 C° environ. Au-delà, pour être conservés, les échantillons doivent être placés dans un bain de Davidson dépourvu d'acide acétique.

### 2. *Préparation à l'inclusion*

La préparation à l'inclusion consiste à traiter les tissus dans un ordre déterminé par différents solvants, de manière à y faire pénétrer la paraffine qui maintiendra la structure des éléments au moment de la coupe. Ainsi, les tissus fixés sont d'abord déshydratés par une série de bains d'éthanol de concentration croissante, puis par un solvant intermédiaire, l'histosol (fournisseur CML), miscible à la paraffine et à l'éthanol ; les tissus sont ensuite plongés dans deux bains successifs de paraffine liquide.

Après avoir sorti les masses viscérales de la fixation en Davidson, on réalise deux coupes sériées transverses dans chaque masse viscérale afin d'obtenir 3 parties égales (Fig. I, {p.xii}). Les 3 morceaux d'une même masse viscérale sont alors déposés dans une histosette d'inclusion (Méga cassettes 28x40x12 mm, catalogue CML 2001) et le tout est placé dans le panier de l'automate CITADEL 2000 de Shandon durant 1 cycle (*cf.* détail du cycle et composition des bains ci-contre).

### 3. Inclusion

Chaque partie de la masse viscérale retirée de l'histosette est ensuite déposée sur son plan de coupe dans un godet à paraffine, que l'on remplit à l'aide d'un distributeur à paraffine (WAX DISPENSER d'Electrothermal) . On dépose alors au sommet du godet, un couvercle d'histosette sur lequel ont été préalablement noté le numéro de l'huître et le numéro de la coupe.

Chaque godet contenant une partie de la masse viscérale séjourne environ une heure à l'étuve afin d'éliminer les bulles d'air. Les godets sont ensuite réfrigérés, et les blocs démoulés.

### 4. Réalisation des coupes

Le bloc de paraffine contenant la section de masse viscérale est alors dégrossi au scalpel, de manière à enlever l'excès de paraffine autour de l'échantillon. Il est placé sur le porte objet du microtome (LEICA RM 2155, automatique), et orienté de sorte que le bloc soit parallèle au tranchant du rasoir. L'inclinaison de la lame du rasoir est déterminée après différents essais, le meilleur angle étant celui qui donne les coupes les moins écrasées ; il est généralement proche de 5 µm.

Une série de coupes de 5 µm est réalisée de manière à obtenir sur une lame plusieurs coupes successives de la partie médiane de chaque section de masse viscérale.

Les coupes sont placées dans quelques gouttes d'eau distillée sur une lame auto-adhérente, préalablement chauffée à 30° (sur une plaque chauffante SLIDE DRYING BENCH d'Electrothermal) afin de faciliter leur étalement . Les lames y sont ensuite maintenues pour amorcer le séchage, qui se finalise ensuite à température ambiante, pendant 48h.

### 5. Coloration et montage

La coloration retenue pour analyser les coupes histologiques est une coloration standard sur les gonades de bivalves, elle permet un contraste important des différents tissus, il s'agit de la coloration de type Hématoxyline-éosine Y. Les lames obtenues sont déposées dans l'automate de coloration (SLIDE STAINER HMS 70 de Micron) qui plonge les lames dans des bains successifs, préparant puis finalisant la coloration à l' Hématoxyline-éosine Y (*cf.* détail du cycle ci-contre). A cet effet, un programme a été mis au point et enregistré dans l'appareil.

Après séchage, on colle une lamelle sur chaque lame à l'aide d'une résine d'inclusion (Eukitt de chez Kindler GmbH & CO) qui polymérise à température ambiante, et ceci afin de préserver les coupes.

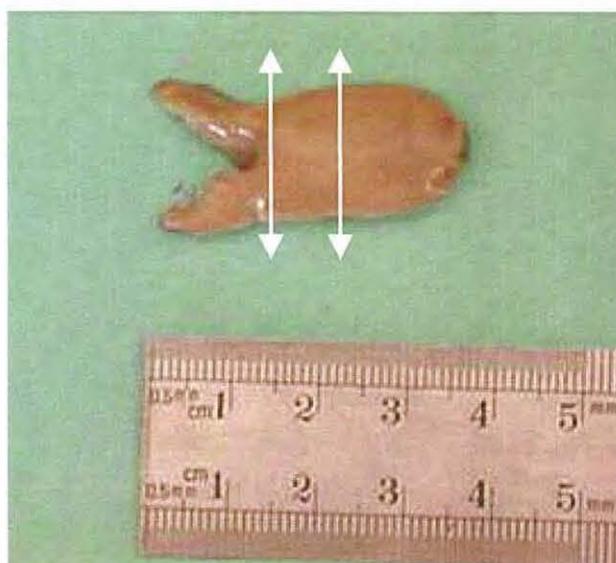


Figure I : Plans de coupe dans la masse viscérale de l'huître creuse.

*Détail du cycle et composition des bains de l'automate d'inclusion CITADEL 2000 de Shandon.*

Réactifs	Durée du bain
Ethanol 75°	1 heure
Ethanol 95°	2 heures
Ethanol 95°	2 heures
Ethanol 100°	2 heures
Ethanol 100°	2 heures
Ethanol 100°	1 heure
Histosol	1 heure
Histosol	2 heures
Paraffine liquide (60°)	2 heures
Paraffine liquide (60°)	2 heures

*Détail du cycle de coloration.*

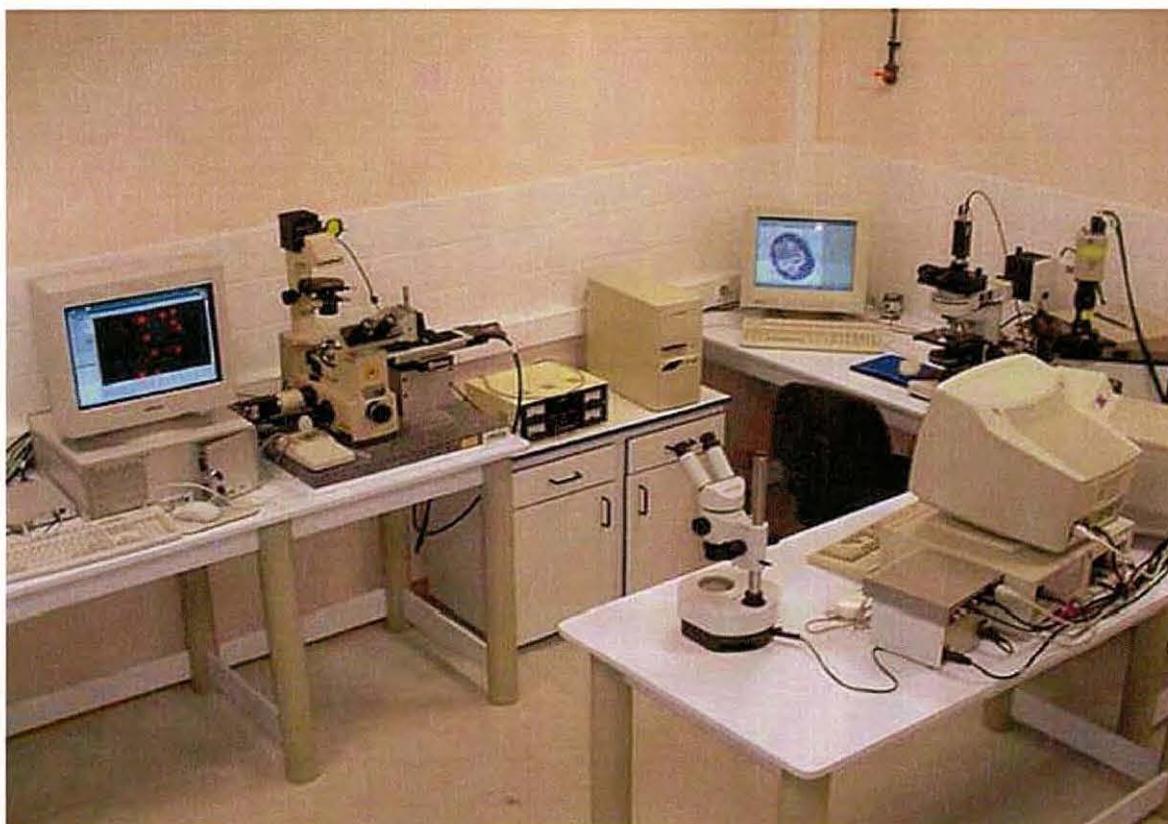
<b>Réactifs</b>	<b>Durée du bain</b>
Histosol	5 minutes
Histosol	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Ethanol 95°	5 minutes
Ethanol 70°	5 minutes
Eau distillée	5 minutes
Hématoxyline	8 minutes
Eau courante	5 minutes
Eau distillée	5 minutes
Ethanol 95°	3 minutes
Eosine	3 minutes
Eau courante	5 minutes
Eau distillée	5 minutes
Ethanol 100°	2 minutes
Histosol	5 minutes
Histosol	5 minutes

## L'analyse d'images

[telle que décrite par BOURLES (2003), et appliquée en routine à la Station Expérimentale d'Argenton]

### *1. Matériels*

La prise d'images est réalisée avec le logiciel WINIMAGER®. Le traitement des images obtenues est fait avec logiciel IMAQ VISION BUILDER®, National Instrument software©. Les mesures servant à déterminer l'effort de reproduction et la composition ovocytaire de la gonade, sont effectuées avec l'aide d'un crayon informatique utilisé sur un support spécial. Elles sont ainsi plus précises et rapides qu'à la souris. Tous les équipements nécessaires au traitement des images sont regroupés dans un laboratoire destiné à cette fin (Fig.II).



**Figure II : Laboratoire d'analyse d'image à l'IFREMER Argenton.**

### *2. Effort de reproduction*

Il est déterminé en calculant le rapport entre la surface totale de l'individu et de celle de sa gonade. Les lames histologiques sont scannées (Fig. III) avec un scanner HP Scanjet 7400C équipé d'un lecteur de diapositives (permet d'améliorer la qualité de l'image avec un grossissement x2).



**Figure III : coupe histologique scannée (mâle à pleine maturité)**

Les mesures consistent alors à retracer le contour de la coupe et de la gonade. L'aire de la gonade n'est pas entièrement pris en compte. On joue sur la coloration des ovocytes (par seuillage) pour ne sélectionner que le contenu ovocytaire de la gonade. Cette opération est très subjective. Elle est une probable source de variations d'un manipulateur à l'autre. Il a fallu me "calibrer" sur le travail déjà réalisé par Martha Enriquez pour garder la même erreur systématique sur ce qui doit être pris en compte.

Les étapes de l'estimation de la surface de la gonade, mises au point par Veaux (2001), ont subies quelques modifications et *sont* désormais les suivantes :

- *Etape 1 : extraction de couleur sur l'image initiale afin de la passer en niveau de gris pour la suite du traitement.*
- *Etape 2 : isolement de la gonade quand celle-ci n'est pas suffisant distincte.*
- *Etape 3 : seuillage en sélectionnant uniquement les pixels appartenant à la gonade. C'est la partie la plus subjective de la procédure.*
- *Etape 4 : élimination des artefacts en appliquant un filtre spécial (suppression des particules les plus petites = des pixels isolés).*
- *Etape 5 : calcul automatique de l'aire par un outil permettant d'obtenir le pourcentage de l'aire de l'objet sélectionné (ici la gonade) par rapport à l'aire totale de l'image.*
- *Etape 6 : transfert automatique des données sur une nouvelle feuille Excel.*

La surface est exprimée en pixels, ce qui n'a pas d'importance car le résultat est un pourcentage ou taux d'occupation ovocytaire (surface occupée par les ovocytes / surface totale de la coupe).