

**L'UNITE D'ECOPHYSIOLOGIE ET DE MOLYSMOLOGIE LARVAIRE  
DES BIVALVES D'INTERET COMMERCIAL  
DU LABORATOIRE I.S.T.P.M. D'ARCACHON**

par René ROBERT, Edouard HIS et Danièle MAURER \*

*Résumé*

L'écloserie expérimentale d'Arcachon et les techniques qui y sont employées sont décrites : prise et traitement de l'eau de mer, culture du phytoplancton, conditionnement des géniteurs, déclenchement des émissions et élevages larvaires. Cette unité expérimentale a été mise en place pour rechercher les causes des échecs répétés de la reproduction naturelle dans le bassin d'Arcachon. Elle a permis de tester la qualité des géniteurs de la baie, ainsi que la qualité de l'eau prélevée en différents points et à différentes dates. De même la toxicité de divers micropolluants susceptibles de contaminer le milieu a été étudiée. Les observations portent, au cours des élevages larvaires, sur : les pourcentages d'œufs fécondés et de larves D formées, les taux de mortalité et de larves anormales, la taille des larves avec établissement des courbes de croissance. Les perspectives qu'offre une unité de reproduction en milieu contrôlé de ce type, au niveau de la recherche appliquée, sont importantes.

*Abstract*

An experimental hatchery for bivalves and the different techniques used in Arcachon are described : sea water treatment, phytoplankton culture, conditioning of oysters for spawning and larval culture. This experimental unit has been organised to study the reasons why natural reproduction is disturbed in the bay. The quality of the oysters and the sea water was analysed in order to ascertain their capacity to acquire normal oyster development. Also, the influence of different micropolluants which may disturb the environment were studied. Observations during larval stage at various concentrations of chemicals include : percentages of fertilized eggs ; percentages of D larvae formed ; percentages of normal and surviving larvae, larval growth, establishing growth curves at different concentrations of each product. The possibilities of introducing applied biology of these hatchery techniques of bivalve larvae are considered to be very great.

---

\* I.S.T.P.M., 63, boulevard Déganne, 33130 Arcachon.

### **Introduction.**

La base de toute aquaculture moderne est l'obtention de juvéniles qui seront mis en élevage. En ce qui concerne l'ostréiculture proprement dite, le problème a été résolu au siècle dernier par la mise au point du chaulage des tuiles par MICHELET ; cette invention, qui s'étendit progressivement aux différents centres ostréicoles français, donnait à l'ostréiculture un essort particulier. LUCAS (1970) considère que la *conchyliculture expérimentale*, élevage de mollusques établi sur des bases scientifiques et dépourvu de préoccupations commerciales, « a retrouvé un rôle capital comme à l'époque de MICHELET avec la réalisation du cycle complet de développement chez de nombreuses espèces » (écloseries). Ainsi LOOSANOFF et DAVIS aux États-Unis, IMAI au Japon et ultérieurement WALNE en Grande-Bretagne mettaient au point les techniques de captage tant pour les huîtres creuses que pour les plates, techniques qui furent rapidement reprises sur le plan industriel par les écloseries de type industriel et étendues à de nombreux mollusques d'intérêt commercial.

Les premières tentatives fructueuses de reproduction de l'huître en milieu contrôlé datent du début du xx<sup>e</sup> siècle ; elles étaient motivées par le déclin progressif de l'industrie conchylicole aux États-Unis, par la réduction progressive du captage naturel et la mauvaise qualité du naissain (LOOSANOFF, 1969). Outre les applications pratiques dans la production de juvéniles de façon régulière, cet auteur et son équipe dégagent très rapidement l'intérêt de ces techniques sur le plan de la biologie expérimentale :

- détermination des limites de tolérance des larves aux différents facteurs de milieu ;
- études de l'action de différents micropolluants sur les véligères (Molysmologie) ;
- études génétiques et possibilités de sélection de variétés intéressantes sur le plan commercial (rapidité de croissance, qualité de mollusque, résistance aux maladies) ;
- recherches à caractère systématique basées sur les études de morphologie larvaire.

Comparativement, l'école française est d'un développement récent. Il s'agit essentiellement des travaux de LUCAS à Brest (1966), de LUBET à Caen et de leurs collaborateurs et de LE BORGNE à Barfleur (écloserie de type industriel), de FLASSCH au Centre océanologique de Bretagne.

L'unité de reproduction artificielle que nous décrivons ici a été mise en place à la suite des échecs répétés de la reproduction naturelle dans le bassin d'Arcachon. Elle a pour but de tenter d'en expliquer les raisons ; par ailleurs les techniques mises au point sont mises à profit pour rechercher les limites de tolérance des véligères de mollusques d'intérêt commercial vis-à-vis d'éventuels micropolluants.

## **I - Description de l'unité de reproduction des lamellibranches en milieu contrôlé.**

DRINNAN *et al.* (1967), LUCAS (1976), LE BORGNE (1977) présentent les différentes installations d'une écloserie de mollusques (fig. 1) ; qu'il s'agisse d'une unité de type industriel ou expérimental, l'organisation générale est la même, avec cependant des adaptations au but recherché. Notre unité de reproduction s'inspire des installations de LUCAS *et al.* (1976) ; comme ces derniers nous ne disposons pas en effet de l'eau de mer courante.

### **1. Prise de l'eau de mer et traitements.**

Le choix du site d'une écloserie est fondamental ; LUCAS (1975) rappelle les principaux critères de ce choix : L'eau de mer doit être de bonne qualité de façon constante toute l'année ; LOOSANOFF (1969) précise que des essais préliminaires, à faible échelle, doivent être tentés avant toute installation définitive. Il ne doit exister aucune menace de pollutions industrielles, agricoles ou domestiques. L'écloserie doit se trouver à l'écart des zones de cultures conchylicoles de façon à éviter toute contamination en cas d'épizootie. LUCAS souligne toutefois que ces différentes prescriptions sont rarement respectées.

Nos installations ne disposent pas de l'eau de mer courante ; pour tester la qualité de l'eau du bassin d'Arcachon, il nous est nécessaire de prélever l'eau en différents points et à différentes heures de la marée. L'eau est prélevée par bateau, à l'aide de bonbonnes plastiques

de 20 l, puis stockée dans des cuves de volume variant de 600 à 1 000 l. Ces cuves en matière plastique ont été préalablement « amarinnées » par rinçages successifs à l'eau de mer pendant plusieurs mois (POUVREAU, 1977). Par ailleurs, de l'eau de mer prise à 5 milles au large du cap Ferret (donc dépourvue de toute trace d'éventuels micropolluants) est utilisée pour les tests de molysmologie. En éclosérie de type commercial, l'eau subit différentes filtrations grossières (filtrations sur sable) avant d'être entraînée par pompage à travers des cartouches de type industriel (porosité de 1  $\mu\text{m}$  au maximum), puis stérilisé aux ultra-violet.

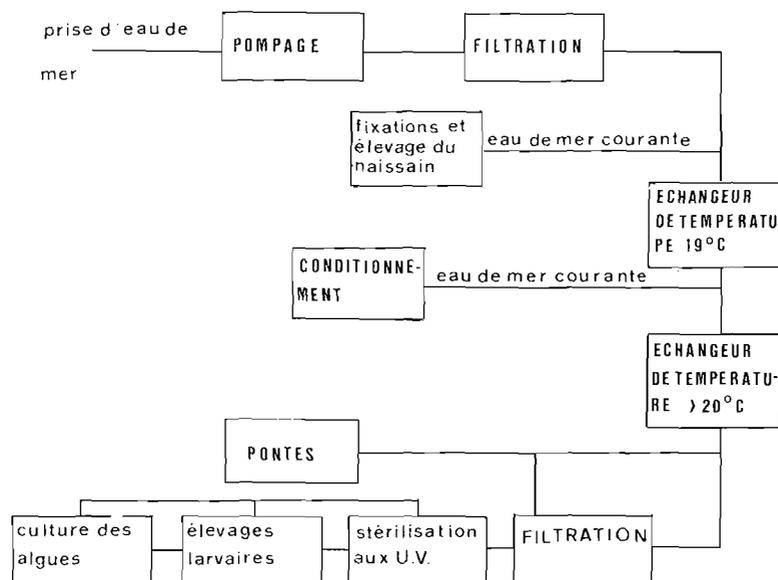


FIG. 1. — Schéma de l'installation générale d'une éclosérie.

Dans notre éclosérie (fig. 2) l'eau de mer, stockée dans la salle d'algues 24 heures à l'avance, de façon à obtenir l'équilibre thermique avec les élevages, est entraînée par une pompe auto-amorçante à travers des filtres de type industriel (porosité 5, puis 0,2  $\mu\text{m}$ ) ; elle est utilisée telle quelle pour les cultures d'algues destinées à la nutrition des géniteurs. En ce qui concerne les pontes, les élevages larvaires et la culture du phytoplancton pour les larves, l'eau est de plus filtrée sur membranes Sartorius de porosité 0,2  $\mu\text{m}$  ; l'efficacité de la filtration est vérifiée au compteur de particules. Qu'il s'agisse d'élevages expérimentaux ou de production de masse, les matériaux métalliques autre que l'acier inoxydable doivent être proscrits des installations (toxicité des différents métaux lourds, plomb, cuivre en particulier).

Comme LUCAS *et al.* (1976), nous ne stérilisons pas l'eau de mer aux rayons ultra-violet. Quant aux géniteurs mis en conditionnement, ils ne reçoivent qu'une eau de mer grossièrement filtrée, enrichie ou non en cultures d'algues.

## 2. La culture du phytoplancton.

Différentes souches d'algues monocellulaires sont cultivées pour alimenter les géniteurs en conditionnement et pour nourrir les larves. Dans les deux cas il s'agit de cultures monospécifiques réalisées en eau de mer filtrée, enrichie en sels minéraux et vitaminée. Dans les écloséries elles sont effectuées en eau de mer en bacs de grand volume (plusieurs centaines de litres) pour les géniteurs et en volume plus restreint pour les larves.

### Production de nourriture pour les géniteurs.

Nous la réalisons dans des boudins et des cubiteners en matière plastique de 30 à 60 l, en eau de mer filtrée, puis enrichie en sels nutritifs et en vitamines ; les cultures sont brassées par bullage d'air à l'aide de compresseurs utilisés en aquariologie, et éclairées artificiellement.

Deux souches sont cultivées en routine, à cause de leur croissance rapide et de leur qualité nutritive (volume cellulaire important) : l'algue verte monocellulaire *Tetraselmis suecica* et la diatomée centrique en chaîne *Skeletonoma costatum*.

#### Production de nourriture pour les larves.

Elle a lieu dans une pièce dont la température est maintenue à  $20 \pm 1^\circ \text{C}$  par un climatiseur thermostaté (fig. 3). Travaillant principalement sur les végétaux de *C. gigas*, nous cultivons les algues unicellulaires préconisées par HELM et MILLICAN (1977) : *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis* (*Platymonas*) *suecica* ; la production en « bloom » est effectuée en ballon de 6 l contenant 4 l de milieu de Conway. Les cultures sont réalisées en eau de mer filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$ , enrichie en sels nutritifs, autoclavée à  $120^\circ \text{C}$  pendant 20 minutes, puis vitaminée après refroidissement. Elles sont maintenues en permanence sous éclairage constant ; une insufflation d'air stérile (filtre sur cartouche de porosité  $0,2 \mu\text{m}$ ) permet le brassage des cultures dans les ballons : la croissance algale est stimulée.

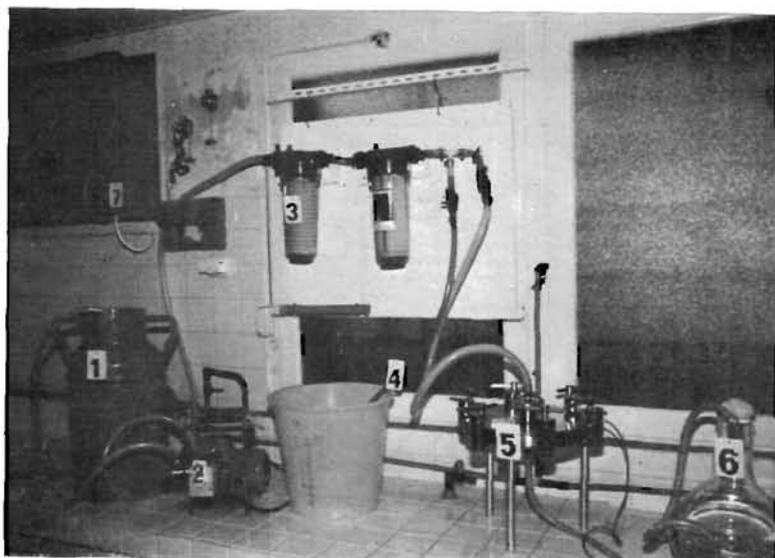


FIG. 2. — Le traitement de l'eau de mer dans l'écloserie expérimentale d'Arcachon. (1) l'eau de mer est amenée à température ambiante par stockage en bonbonnes de 20 l ; elle est entraînée par une pompe en acier inoxydable (2) vers des cartouches filtrantes de type industriel (3), elle est utilisée directement (4) pour les cultures d'algues destinées aux géniteurs, l'eau subit une filtration plus poussée sur dispositif Sartorius (5) à membrane de porosité  $0,2 \mu\text{m}$ , elle est destinée aux pontes, aux élevages larvaires et à la préparation des milieux de culture pour la nutrition des larves (6) ; un climatiseur (7) permet de stabiliser la température de la pièce.

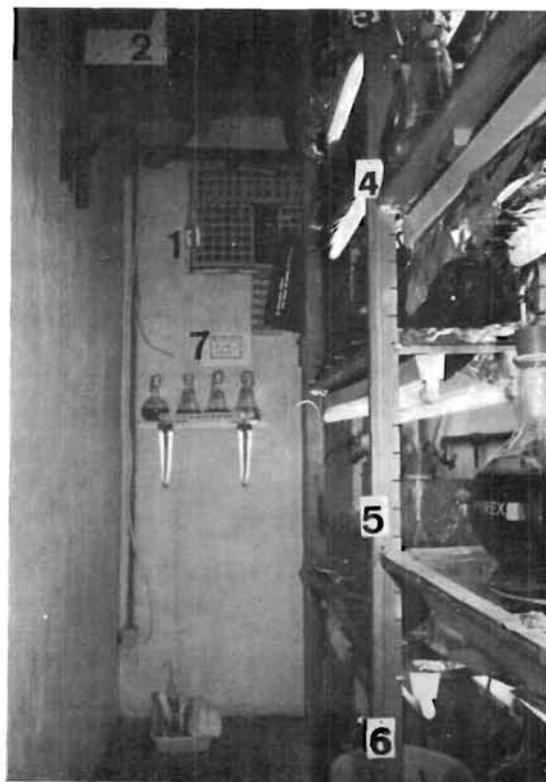


FIG. 3. — Vue générale de la salle d'algues. (1) climatiseur thermostaté ; (2) compresseur d'aération, qui pulse de l'air après filtration sur cartouche de porosité  $0,2 \mu\text{m}$ , dans les cultures en ballon ; (3 à 5) les erlenmeyers de 200 cc et de 2 l et les ballons de 6 l ; (6) stockage de nourriture destinée aux géniteurs ; (7) « régénération » des souches à plus basse température, et sous faible éclairage.

L'entretien des souches est réalisé en erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml de milieu de ERDSCHREIBER (l'extrait de terre remplace les vitamines) ; l'inoculum de départ est de 20 ml (fig. 4). Au bout d'une semaine nous ensemençons avec les précédents, des erlenmeyers de 2 l contenant 1 l de milieu de Conway (WALNE, 1970). Puis de la même façon ces derniers servent d'inoculum pour les ballons de six litres. En général les cultures sont utilisables pour les larves au bout de dix à douze jours (fig. 5).

Enfin les souches sont « régénérées » dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml de ERDSCHREIBER, maintenus à basse température ( $15^\circ \text{C}$ ) sous faible éclairage. Ceci permet de

conserver des souches bien vigoureuses qui servent tous les mois à relancer les cultures. La densité cellulaire est mesurée à l'aide d'une cellule hématimétrique de Malassez (*T. suecica* et *S. costatum*) ou d'un compteur de particules, utilisé pour les numérations sanguines (*I. galbana* et *C. calcitrans*). Précisons enfin que toute la verrerie est soigneusement lavée et rincée, puis stérilisée au four Pasteur avant usage ; la qualité de la nourriture, en particulier la « propreté des cultures », conditionne la réussite des élevages ; si celles-ci sont contaminées par des bactéries pathogènes les élevages sont très rapidement décimés.

### 3. Le conditionnement des géniteurs.

Cherchant à débarrasser les huîtres américaines d'organismes encroûtants en les maintenant en eau de mer courante à température élevée, LOOSANOFF (1945) obtient une maturation sexuelle en dehors de la saison de reproduction : c'est le conditionnement. Par ailleurs, il constate que le maintien de sujets mûrs en eau de mer refroidie permet de différer les pontes ; il est possible d'obtenir des gamètes mûrs toute l'année. Cette technique a été étendue à de nombreux mollusques d'intérêt commercial.

Le conditionnement est obtenu avant la saison normale de reproduction, en prélevant dans le milieu naturel les géniteurs qui sont placés en eau de mer courante, dont la température est progressivement amenée à 20° C. Si l'eau de mer utilisée est trop pauvre en éléments nutritifs, on réalise un apport complémentaire de nourriture à l'aide de cultures de phytoplancton. La durée du conditionnement, qui est généralement d'un mois, peut être raccourcie chez les huîtres par élévation de la température au-dessus de 20° C ; ainsi des gamètes mûrs ont pu être obtenus en sept jours à 25° C chez *Crassostrea virginica* (LOOSANOFF et DAVIS, 1950).

Pour ce qui nous concerne, le conditionnement est réalisé selon la technique de GÉRARD (1978) en circuits fermés (fig. 6). Nous choisissons des huîtres de poids moyen (50 à 60 g) parmi un lot d'individus dont l'index de condition est supérieur à 80 (richesse en réserves glycogénées, favorisant la production de gamètes abondants et de bonne qualité). Quinze sujets sont placés par bacs contenant 30 l d'eau de mer. Celle-ci est filtrée par gravité sur un filtre biologique (couches superposées de gravier, sable grossier, sable fin, mousse plastique) et ramenée à la partie supérieure du filtre par bullage (air-filt) où elle est pompée vers les bacs de conditionnement ; des tuyaux de trop plein ramènent l'excès d'eau des bacs vers le filtre. L'eau des bacs est aérée en permanence (enrichissement en oxygène dissous et maintien en suspension de la nourriture lors des apports journaliers). Elle est amenée progressivement de la température ambiante du bassin d'Arcachon à  $20 \pm 1^\circ$  C à l'aide de résistances chauffantes thermostatées. De deux à trois bacs de conditionnement de 30 litres sont reliés à un filtre biologique. Les pontes différées en fin de saison de reproduction sont obtenues en maintenant des sujets mûrs à la température de  $15 \pm 1^\circ$  C à l'aide d'un groupe refroidisseur interposé entre la pompe et les bacs, les résistances chauffantes étant supprimées.

Chaque lot de géniteurs reçoit quotidiennement de 5 à 10 litres de cultures monospécifiques de *T. suecica* à la concentration moyenne de  $1.10^6$  cellules par millilitre ou de *S. costatum* à la concentration moyenne de  $2.7.10^6$  cellules/ml. Par ailleurs les excès de production d'algues destinées aux élevages larvaires sont déversés dans les bacs de conditionnement. Nous avons pu ainsi maturer *C. gigas* de mars à octobre inclus. Avant chaque expérience d'élevage larvaire, le degré de maturité du lot est estimé par stimulation thermique chez deux à trois sujets. En cas de réponse positive, les expériences sont commencées dans les jours qui suivent.

### 4. Déclenchement des émissions et fécondations.

Déclenchement des émissions.

Pour augmenter les chances de réussite des élevages larvaires, il vaut mieux utiliser des gamètes émis par les géniteurs, les prélèvements par scarification de sujets sacrifiés, bien que moins fastidieux, pouvant donner lieu à l'utilisation de produits sexuels imparfaitement mûrs ; il n'existe en effet à l'heure actuelle aucun critère anatomique ou histologique permettant d'évaluer la pleine maturité des gamètes.

Les géniteurs prélevés dans les bacs de conditionnement sont soigneusement lavés et débarrassés de tous les épibiontes. Ils sont placés dans des bacs en matière plastique fraîchement



FIG. 4. — Le repiquage et la mise en culture d'une algue monospécifique destinée à l'alimentation des larves. 20 cc d'inoculum sont prélevés stérilement près de la flamme d'un bec bunsen dans un erlenmeyer (1) contenant 200 cc de milieu de Erdschreiber, qui avait été mis en culture huit jours avant; ils servent à ensemercer le nouvel erlenmeyer (2) qui sera utilisé la semaine suivante. Le reste de (1) permet d'ensemencer stérilement l'erlenmeyer (3), qui contient 1 l de milieu de Conway. Un erlenmeyer identique, dont la culture est âgée de huit jours (4), sert à ensemercer le ballon de six litres (5) qui sera utilisable au bout de 12 jours.

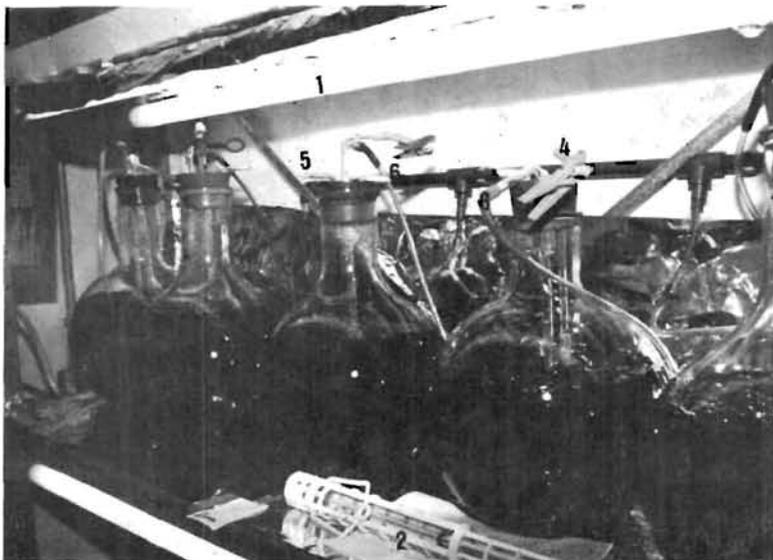


FIG. 5. — La culture des algues en ballon (détail de 5. fig. 4). (1) Les cultures sont maintenues sous éclairage permanent par deux tubes fluorescents, dont la lumière est réfléchiée par des feuilles d'aluminium fixées sur les deux faces des étagères, (2) la température de la salle est fréquemment vérifiée; (3) de l'air filtré à 0,2  $\mu$ m est pulsé dans les cultures; à travers du coton cardé stérile, il assure un brassage constant; (4) un tube de caoutchouc, fermé par du coton stérile, permet de fixer stérilement un tube à prélèvement; (5) et (6) sont les tubes de verre fermés par du coton cardé stérile qui permettent l'évacuation de l'air pulsé dans les cultures.

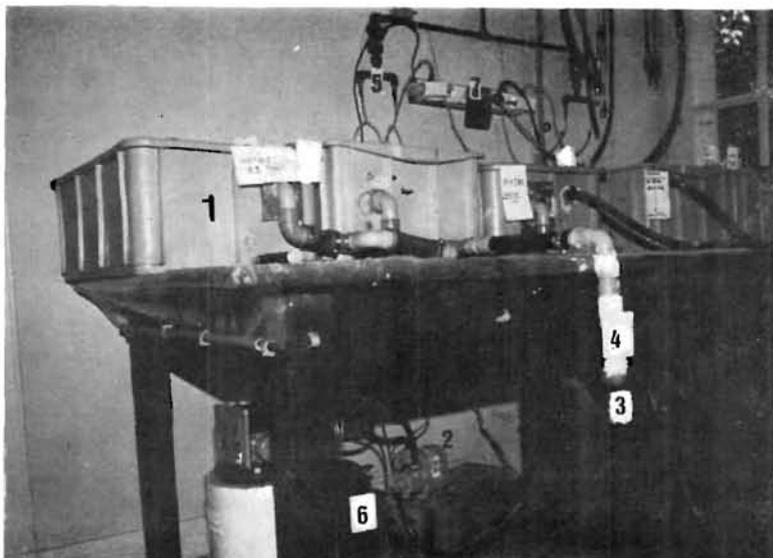


FIG. 6. — Le conditionnement des générateurs. Quinze générateurs sont immergés dans des bacs de 30 l (1) dont la température est maintenue à  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ ; une pompe (2) puise l'eau de mer du filtre biologique (3) et l'envoie dans les bacs (1); chaque unité comprend un filtre et de deux à trois bacs de conditionnement; le trop-plein des bacs est renvoyé (4) par gravité dans le filtre biologique. L'eau de mer qui a traversé le filtre est remontée à la surface par bullage dans un tube vertical (air-lift); de même l'eau des bacs est aérée en permanence (5) par arrivée de l'air comprimé. Les pontes peuvent être différées chez les sujets mûrs, en supprimant les résistances chauffantes et en intercalant entre filtre et pompe un groupe réfrigérant (6) qui permet le maintien de la température des bacs à  $15^\circ \text{C}$ ; (7) chronorupteur qui arrête le fonctionnement de la pompe, lorsque la nourriture est apportée dans les bacs par une pompe péristaltique.

ébulliantés, contenant quinze litres d'eau de mer, filtrée sur membrane de porosité  $0,2 \mu\text{m}$ , portée à la température de  $28^\circ\text{C}$  par une résistance chauffante thermostatée. Au bout d'une demi-heure, ils sont transférés dans un bac identique, mais à la température de  $15^\circ\text{C}$  (30 mn). Les chocs thermiques créés par ces passages successifs déclenchent fréquemment les émissions, dès le second passage à  $28^\circ\text{C}$ .

Précisons que les différents transferts à une demi-heure d'intervalle sont précédés du renouvellement de l'eau filtrée, afin d'éliminer fèces et débris de coquille. Les mâles fraient généralement les premiers; ce qui stimule la ponte (présence de substances excitatrices émises avec les gamètes). Les émissions peuvent aussi être déclenchées par l'addition d'une suspension de produits génitiaux de sujets qui ont été sacrifiés (stimulation chimique, qui renforce l'action des chocs thermiques). En ce qui concerne la moule l'amplitude thermique est similaire (passages de  $11$  à  $25^\circ\text{C}$ ) (LUCAS *et al.*, 1976).

Quand les lamelibranches commencent à émettre leurs produits, ils sont isolés dans des béchers stériles contenant de l'eau de mer fraîchement filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$ ; quand le frai se poursuit avec intensité, ils sont de nouveau transférés dans un bécher dont seuls les produits sont utilisés pour les expériences. En effet, lors des tests de molysmologie, les études portent entre autres sur les taux de fécondation, en présence de divers micropolluants; il est donc nécessaire d'éliminer tous les ovocytes qui auraient pu être fécondés dans les bacs de stimulation.

#### Traitement des gamètes. Fécondations.

Les ovocytes en fin d'émission sont passés à travers un tamis en acier inoxydable de porosité  $100 \mu\text{m}$  qui retient les débris de coquille et les saletés (pseudofèces et fèces) puis récupérés sur un tamis de  $32 \mu\text{m}$ ; ils sont soigneusement lavés à l'eau de mer stérile et déversés dans une éprouvette stérile graduée contenant un litre d'eau de mer filtrée (fig. 7). La colonne d'eau est homogénéisée et l'on prélève quatre fois  $0,1 \text{ cc}$  à la pipette d'Ependhorf pour comptage au microscope.



FIG. 7. — Le comptage des œufs avant les fécondations et la mise en élevage. Les œufs sont tamisés à travers le tamis (1) de porosité  $100 \mu\text{m}$  (élimination des débris) et retenus sur le tamis (2) de porosité  $32 \mu\text{m}$ ; ils sont lavés à l'eau de mer filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  (3) puis déversés dans une éprouvette contenant un litre d'eau de mer filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  (4) pour prélèvement à la pipette d'Ependhorf et comptage au microscope.



FIG. 8. — Les élevages sont menés soit en récipients en matière plastique amarinée (1), soit en bocaux de  $2 \text{ l}$  (3), stérilisés avant usage; ils sont effectués à la température de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  chez *C. gigas* dans une étuve de bactériologie (à droite) ou dans un réfrigérateur transformé en étuve (à gauche), à l'aide d'un dispositif Incutrol (2). La température est contrôlée à l'aide d'un thermographe enregistreur.

Les ovocytes sont ensuite répartis à raison de 30 000 par litre dans les récipients d'élevage ; ils sont fécondés à l'aide d'une suspension dense de sperme fraîchement émis (1,5 cc par litre d'élevage, prélevés à la pipette stérile). Les fécondations sont effectuées à température ambiante (20° C), dans la demi-heure qui suit l'émission des produits.

### 5. Les élevages larvaires.

Au bout d'une heure ils sont placés en enceinte thermostatée (fig. 8) : soit une étuve de bactériologie, soit un réfrigérateur muni d'un système incutrol qui permet de stabiliser la température à la valeur choisie.

Les volumes utilisés.

Nous avons mené certains des élevages dans des récipients en matière plastique « amarinée » de 30 l et de 10 l (expériences de captage sur les géniteurs du bassin d'Arcachon). En ce qui concerne les expériences de molysmologie, il est nécessaire de conduire simultanément jusqu'à 36 élevages (essais d'eau de mer de différentes provenances, prélevées à différentes dates ; recherche de différents micropolluants à différentes concentrations). Nous avons utilisé de faibles volumes : il s'agit de bocaux de verre alimentaire de deux litres munis d'un couvercle, stérilisés au four Pasteur avant utilisation. Le développement complet de la vie larvaire chez les huîtres creuses ou plates et même le captage ont pu être obtenus à titre expérimental dans ces faibles volumes (fig. 9).

Mise en élevage des larves.

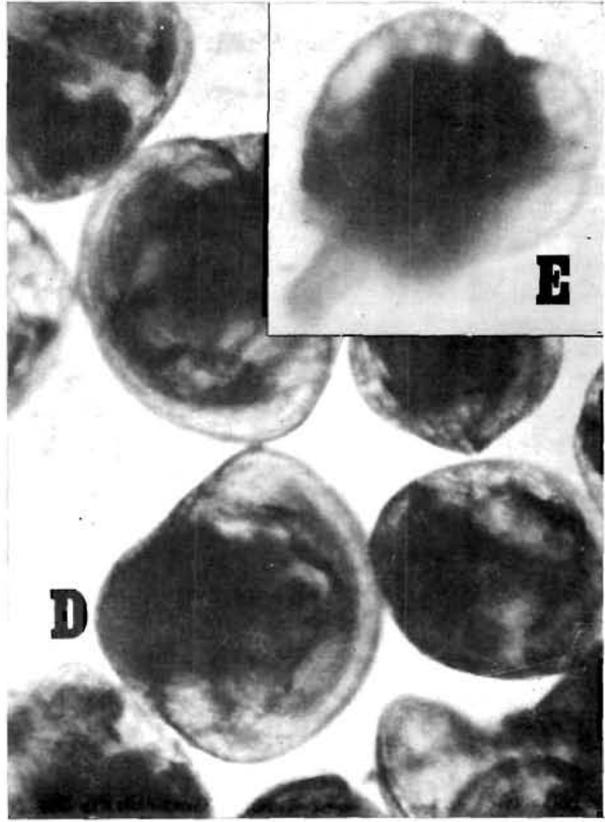
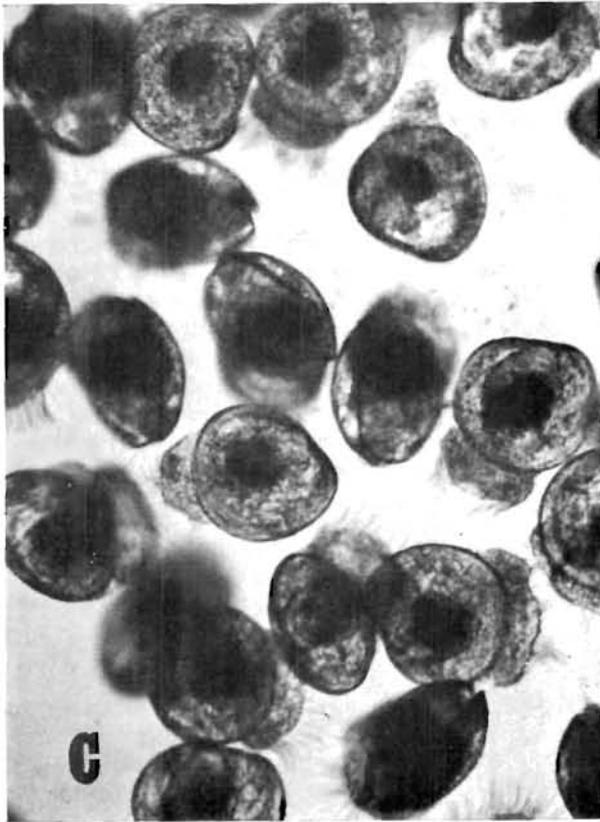
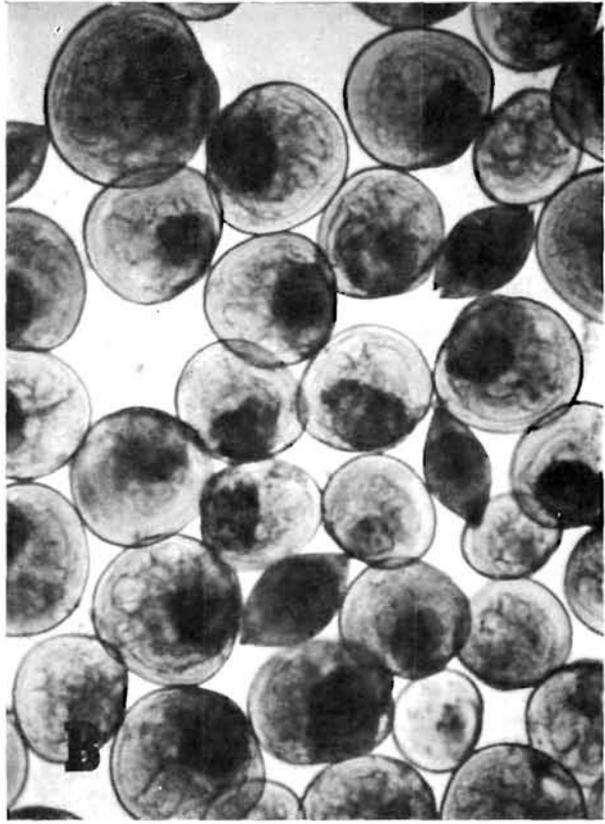
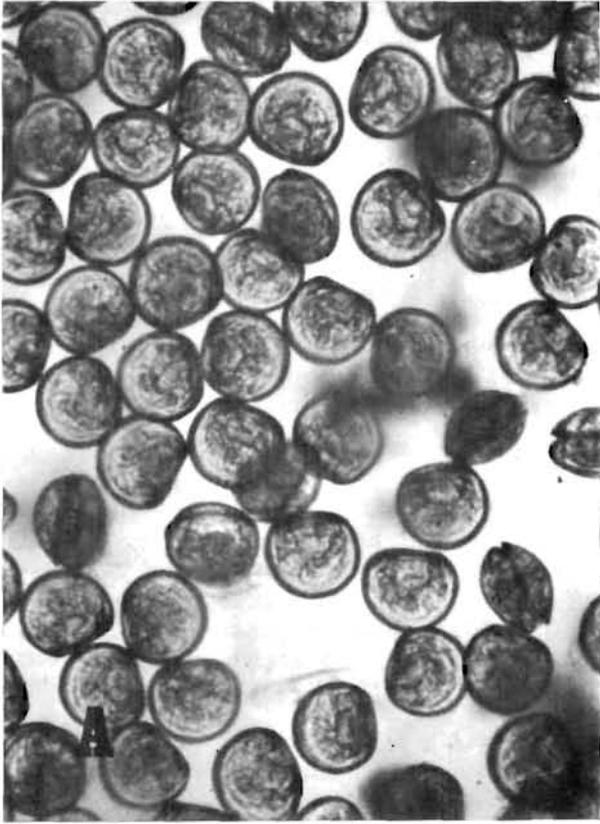
Vingt-quatre heures après les fécondations, les jeunes véligères de *C. gigas* sont formées, il faut deux jours chez les moules. Les larves sont à nouveau tamisées. Les véligères, récupérées sur le tamis 32  $\mu\text{m}$ , sont rincées à l'aide d'une pissette fraîchement ébouillantée contenant de l'eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ , puis replacées dans une éprouvette de 1 l d'eau de mer pour un nouveau comptage et réparties à raison de 8 000 par litre d'élevage.

Un prélèvement à la pipette Pasteur stérile est effectué avant répartition pour examen sur lame creuse stérile au microscope ; nous observons le comportement larvaire, dénombrons les mortalités et les larves anormales. Un cliché photographique permet ultérieurement les études de croissance. Le changement d'eau des élevages a lieu ensuite tous les deux jours. Lorsque la taille des larves augmente, la porosité des tamis est augmentée progressivement. Toutefois, contrairement à la pratique utilisée en éclosion industrielle (élimination des véligères poussant mal), nous conservons la totalité de la population larvaire, afin d'établir les courbes de croissance : de même nous ne diminuons pas la densité des élevages. Nous n'utilisons pas non plus d'aération : l'expérience prouve que celle-ci n'est pas nécessaire en faibles volumes : elle peut même avoir une action néfaste (HELM et SPENCER, 1972).

L'alimentation des véligères.

L'élevage des larves de lamellibranches d'intérêt commercial a fait des progrès très rapides lorsque le problème de la nutrition des véligères a été résolu. De nombreux travaux sont encore consacrés à cette question. Une bonne alimentation, permettant une croissance rapide de véligères vigoureuses, conditionne le succès des élevages. Les souches d'algues monocellulaires utilisées ont été choisies en fonction de critères précis : il faut que les cellules soient suffisamment ténues pour être ingérées par les véligères (taille inférieure à 10  $\mu\text{m}$ ) ; qu'elles possèdent une valeur alimentaire convenable et ne soient pas toxiques et qu'elles soient faciles à cultiver : la production de nourriture constitue une des charges les plus importantes des éclosions.

FIG. 9. — (A) larves de *C. gigas* âgées de 4 jours (hauteur moyenne : 95  $\mu\text{m}$ ) ; (B) larves de *M. galloprovincialis* âgées de 10 jours (190  $\mu\text{m}$ ) ; (C) larves d'*Ostrea edulis* 24 h après leur mise en élevage (160  $\mu\text{m}$ ) ; (D) larves « œillées » d'*O. edulis* (300  $\mu\text{m}$ ) ; (E) pédivéligère d'*O. edulis* (305  $\mu\text{m}$ ).



Nos élevages sont conduits selon les données de HELM et MILLICAN (1977). Dès l'âge de 24 heures, les véligères sont alimentées. La nourriture est prélevée le plus stérilement possible à l'aide d'un tube à prélèvement fixe sur une sortie du bouchon des ballons de culture ; après chaque utilisation le tube est vidangé et lavé à l'alcool absolu. Les algues sont ajoutées dans chaque élevage à l'aide d'une pipette stérile, près de la flamme d'un bec bunsen.

Jusqu'à la taille de 120  $\mu\text{m}$  nous apportons quotidiennement 50 cellules d'*I. galbana* et 50 cellules de *C. calcitrans* par micro-litre d'élevage. Au-delà de cette taille, le mélange de 33 cellules d'*I. galbana*, de 33 cellules de *C. calcitrans* et de 3,3 cellules de *Tetraselmis suecica* par micro-litre d'élevage, lui est substitué. Ces valeurs tiennent compte des volumes cellulaires respectifs des trois algues. Le volume global de nourriture apportée quotidiennement dépend de la densité cellulaire des cultures ; celle-ci doit donc être mesurée quotidiennement. Nous n'utilisons que des cultures en phase stationnaire (concentration cellulaire la plus élevée par rapport au volume de l'apport).

Le captage.

Le but de nos expérimentations n'est pas d'atteindre le stade de fixation ; nos observations sur la croissance larvaire sont généralement arrêtées le douzième jour. Néanmoins, le captage a été obtenu à différentes reprises chez *C. gigas*, *O. edulis* et *M. galloprovincialis*, que se soit en bacs de 20 litres ou en bocaux de deux litres (fig. 9 E).

Les premières larves « œillées » — c'est-à-dire présentant la tâche oculaire indicatrice du stade de fixation — apparaissent vers le seizième jour, chez *C. gigas* ; quand elles représentent 30 % de la population, nous plaçons au fond des récipients un collecteur en matière plastique noire, de surface finement rugueuse. Puis les élevages sont placés sous éclairage constant : les pédivéligères fuient la lumière, ce qui favorise leur fixation sur le collecteur. Les disques plastiques sont remplacés toutes les 24 heures. Nous avons pu fréquemment dénombrer de deux à trois cents naissains sur les collecteurs de 85 mm de diamètre. Nous ne disposons pas des installations nécessaires à la croissance du naissain (« nurserie ») ; celui-ci a été placé dans les bacs de conditionnement où sa croissance a été satisfaisante.

Il, faut en effet signaler que les écloséries de type industriel doivent amener leur production (naissain « un à un », fixé sur brisure de coquille) à une taille suffisante pour permettre le passage dans le milieu naturel ; le naissain est placé dans des bacs d'élevage, en eau de mer courante enrichie ou non par du phytoplancton cultivé : ce sont les « nourriceries » ou « nurseries ».

## II - Vocation de l'éclosérie expérimentale d'Arcachon.

Le captage a été obtenu chez *C. gigas*, *O. edulis* et *M. galloprovincialis*. Toutefois les travaux ont essentiellement porté sur les causes des mortalités larvaires de *C. gigas* dans le bassin d'Arcachon. Les géniteurs sont tout à fait susceptibles de donner des larves viables, qui ont pu être amenées au captage ; il en est de même des huitres d'Aytré (Charente-Maritime) ; par contre les *C. gigas* des Hauts-de-Seudre ont donné de mauvais résultats, ce qui peut mettre en doute leur qualité de reproducteurs. Nous avons pu montrer également que l'eau du bassin d'Arcachon, prélevée à différentes périodes de l'année 1981, y compris en été, et à différents points, permettait elle aussi une évolution larvaire normale. Par ailleurs des expériences de molysmologie ont été conduites ; elles consistent à mettre en évidence la toxicité de différents micropolluants sur les larves de *C. gigas* et de *M. galloprovincialis*.

### I. Particularité des techniques mises au point.

Les observations portent sur les points suivants : les pourcentages d'œufs fécondés, les taux de mortalités et d'anomalies larvaires.

Les pourcentages d'œufs fécondés.

Les fécondations sont réalisées en présence du produit testé : certains auteurs au contraire ne font agir le micropolluant que deux heures après les fécondations. Or une simple exposition des ovules de *C. gigas* dans une solution de 50  $\mu\text{g/l}$  d'acétate de tributylétain (composant de certaines peintures antisalissures) inhibe la segmentation de 95 % d'entre eux après fécondation

en eau de mer non traitée (His et al., 1980). Un micropolluant peut avoir une action directe sur les gamètes. De même le seuil de sensibilité des larves formées en présence d'un micropolluant est plus bas que celui des larves D formées en son absence.

Vingt-quatre heures après les fécondations, nous dénombrons les pourcentages d'œufs fécondés, d'œufs segmentés et les pourcentages de larves D obtenues sur un échantillon de 200 par élevage. Généralement en ce qui concerne les élevages témoins, nous obtenons 90 % et plus de larves D normales. En dessous de la valeur de 80 % les expériences ne sont pas poursuivies.

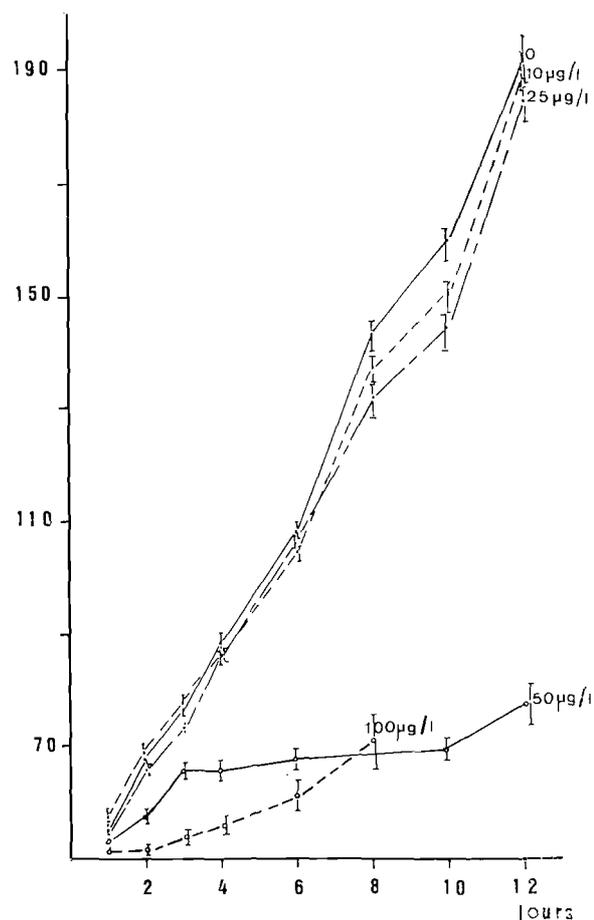
Les taux de mortalités et d'anomalies larvaires.

De la même façon à chaque changement d'eau, nous comptons, sur matériel vivant (200 individus par élevage), les pourcentages de mortalités. Sauf à de fortes concentrations, une mortalité, liée à l'action d'un facteur chimique (micropolluant), est lente et progressive. A l'inverse, une mortalité brutale (50 % en 24 heures puis totale) traduit l'action d'agents pathogènes : dans ce cas le test de toxicité n'est pas significatif : l'expérience doit être arrêtée.

Nous notons également les pourcentages de larves anormales, que ce soit : sur le plan du comportement (nage en toupie, mobilité excessive même quand les végétaux sont perturbés mécaniquement) et de la prise en charge de nourriture (faible coloration du tractus digestif comparativement aux témoins) ; ou sur le plan morphologique : larves D présentant une charnière concave, échancrures à la commissure des valves, vélum boursoufflé, présentant des « verrues » fortement ciliées (LE PENNEC et LE ROUX, 1979). Dans certains cas (action du chlorure de cuivre, par exemple), nous avons noté une nécrose progressive de la masse viscérale qui tend à s'amasser en boule et à se détacher même de la coquille larvaire à l'intérieur de laquelle elle tourne sur elle-même.

hauteur moyenne en  $\mu\text{m}$

L'établissement des courbes de croissance.



Aux plus faibles concentrations, les substances toxiques peuvent ne pas avoir d'action sur les taux de survie ou sur les pourcentages d'anomalies larvaires ; par contre elles peuvent retarder sensiblement croissance et évolution. Dans le milieu naturel, la durée de la vie pélagique est augmentée ; il en résulte une plus grande sensibilité aux conditions adverses de milieu et une diminution des chances d'obtenir un captage abondant. C'est la raison pour laquelle nous avons considéré l'influence des différents éléments testés sur la croissance des larves et porté à douze jours la durée de nos observations, soit plus de la moitié de la période écoulée entre pontes et fixations, chez *Crassostrea gigas*.

A chaque changement d'eau des élevages, nous photographions sous le microscope cinquante larves par élevage. Les mensurations (hauteur de la dissoconque : plus grande dimension du sommet de l'umbo au bord ventral) sont réalisées à  $1,5 \mu\text{m}$  près par mesure à la loupe binoculaire téreoscopique sur clichés photographiques. Nous établissons les courbes de croissance des différents élevages et recherchons l'influence des produits testés sur la vitesse de pousse des larves (fig. 10).

FIG. 10. — Action du sulfate de cuivre sur la croissance des larves de *Crassostrea gigas*, aux concentrations de 0 (témoin), 10, 25, 50 et 100  $\mu\text{g/l}$  (température  $24^\circ\text{C}$ , salinité 32 ‰).

## 2. Présentation de quelques résultats acquis.

Outre les données obtenues sur les causes de mortalités larvaires dans le bassin d'Arcachon (défaut de développement des éléments utilisables par les jeunes véligères pour leur alimentation), nous avons pu démontrer dès 1980 (HIS et ROBERT) le danger que représentaient certaines peintures antisalissures pour les zones conchylicoles à vocation de centre de captage et préciser que des teneurs de l'eau de mer aussi faibles que  $1 \mu\text{g/l}$  empêchaient la formation de larves D normales (ROBERT et HIS, 1981). De même nous avons montré que le chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) perturbe totalement le développement embryonnaire des *Crassostrea gigas* dès la concentration de  $50 \mu\text{g/l}$  et diminue sensiblement leur croissance dès la valeur de  $10 \mu\text{g/l}$ .

Enfin nous avons montré que le sulfate de cuivre, utilisé par les ostréiculteurs pour détruire les organismes encroûtants sur les parcs ostréicoles, est toxique pour les œufs et les larves D de *Crassostrea gigas*; son action se fait sentir sur l'embryogénèse au-dessus de  $25 \mu\text{g/l}$  et sur la croissance des larves D, dès la valeur de  $100 \mu\text{g/l}$ . Ainsi le traitement au sulfate de cuivre en zone conchylicole constitue un danger pour la reproduction naturelle, particulièrement dans une baie comme dans le bassin d'Arcachon dont les caractéristiques hydrauliques font que le renouvellement des masses d'eau et par suite l'élimination d'un éventuel micropolluant se font mal. Ces considérations doivent amener les ostréiculteurs à rechercher d'autres solutions aux problèmes posés par les salissures (action par voie mécanique (HIS et ROBERT, 1981 (1982))).

Nous avons constaté que l'action d'un micropolluant sur les larves d'huîtres est progressive : les différentes étapes suivantes peuvent être dégagées. Tout d'abord les larves D âgées de vingt-quatre heures, formées en milieu non pollué, sont moins sensibles à l'action des substances toxiques que les larves formées en milieu pollué. Les résultats obtenus avec celles-ci sont donc moins significatifs.

À de faibles concentrations, l'action d'un micropolluant se traduit par un ralentissement de la croissance. Sur le plan pratique, il y a augmentation de la durée de la vie pélagique des larves et diminution des chances de captage. Par ailleurs de nombreux auteurs ont noté la fragilisation des véligères vis-à-vis des différents facteurs de milieu (phénomène de synergie).

Des concentrations moyennes en élément toxique provoquent un déséquilibre des populations larvaires sur le plan de la répartition des tailles : on observe à la fois des véligères poussant normalement et des véligères dont la croissance est freinée ou même inhibée, sans qu'il y ait pour autant mortalité. Ce déséquilibre va s'accroissant avec le temps.

De fortes concentrations de micropolluant provoquent dès les premiers jours un arrêt total de la croissance des véligères, s'accompagnant de mortalités progressives. De plus, des anomalies de comportement apparaissent ainsi que des anomalies morphologiques se manifestant au niveau de la masse viscérale (vélum) et de la coquille.

À des concentrations de plus en plus fortes les pourcentages d'anomalies augmentent ; les véligères incomplètement formées et les trochophores aberrantes deviennent de plus en plus fréquentes. Les mortalités larvaires se manifestent dès les premiers jours. Enfin, des concentrations extrêmes entraînent le blocage de la formation des véligères, le blocage de la segmentation et même celui de la fécondation des ovocytes.

## Conclusion.

« L'usage des larves de bivalves marins comme organismes de référence en molysmologie se justifie à la fois pour des raisons méthodologiques et plus concrètement pour des raisons d'intérêt économique » (LUCAS et LE ROUX, 1979). Cette unité expérimentale, axée sur l'écophysiologie larvaire, à proximité d'une zone conchylicole à vocation de centre de captage, soumise à des problèmes au niveau de la reproduction, se justifie pleinement. Nos installations, quoique de faible taille, nous ont permis d'aborder, de façon concrète, les problèmes à résoudre pour le maintien de l'ostréiculture à Arcachon, centre traditionnel de captage et d'élevage des huîtres.

Les perspectives qu'elles nous offrent au niveau de la recherche appliquée sont importantes : que ce soit pour déterminer les limites de nuisance de différentes substances auxquelles les zones conchylicoles peuvent être exposées ; ou que ce soit pour étudier leurs actions de synergie avec les facteurs de milieu. Enfin la poursuite de nos recherches doit nous permettre l'étude des différentes fonctions physiologiques des larves, sous des conditions expérimentales de milieu.

Manuscrit remis le 31 août 1982.

#### BIBLIOGRAPHIE

- CALABRESE (H.) et DAVIS (H.C.), 1970. — Tolerance and requirements of embryos and larvae of bivalve mollusc. — *Helgoländer wiss. Meeresunters.*, **20** : 553-564.
- DRINNAN (R.E.) et PARKINSON (J.P.), 1967. — Progress in Canadian hatchery development. — *Canadian Fish Culturist*, **39** : 3-15.
- FLASSCH (J.-P.), KOIKE (Y.), L'HERROUX (M.) et AVELINE (C.), 1974. — Production artificielle de naissain de mollusques. *Ostrea edulis*, *Haliotis tuberculata*. — *Inf. Techn. Inst. Invest. Pesqu. Barcelonne*, **14** : 71-80.
- GÉRARD (A.), 1978. — Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). — Thèse 3<sup>e</sup> cycle, 23 septembre 1978, Fac. Sci. Brest, 147 p.
- HELM (M.M.) et SPENCER (B.E.), 1972. — The importance of the rate of aeration in hatchery cultures of the larvae of *Ostrea edulis* L. — *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **34** : 244-255.
- HELM (M.M.) et MILLICAN (P.F.), 1977. — Experiments in the hatchery rearing of Pacific Oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). — *Aquaculture.*, **11** : 1-12.
- HIS (E.) et ROBERT (R.), 1980. — Action d'un sel organo-métallique, l'acétate de tributyle-étain sur les œufs et les larves D de *Crassostrea gigas* (Thunberg). — C.I.E.M., C.M. 1980/F : 27, 10 p.
- HIS (E.) et ROBERT (R.), 1981. — Effects of Copper Chloride on the eggs and D larvae of *Crassostrea gigas* (Thunberg). Preliminary results. — C.I.E.M., C.M. 1981/F : 43, 13 p.
- HIS (E.) et ROBERT (R.), 1981 (1982). — Les dangers de traitement par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des œufs et les jeunes larves de *Crassostrea gigas*. — *Revue Trav. Inst. Pêches marit.*, **45** (2) : 117-125.
- LE BORGNE (Y.), 1977. — L'écloserie-nurserie de la SATMAR et les possibilités actuelles de production de naissain de mollusques bivalves. — *Actes et Colloques, C.N.E.X.O.*, **4** : 353-360.
- LE PENNEC (M.) et LE ROUX (S.), 1979. — Effets d'un pétrole brut sur la formation de la coquille de *Mytilus edulis* (L.) (Mytilidae, Bivalvia). — *Rev. int. Océanogr. Méd.*, **55** : 49-55.
- LOOSANOFF (V.L.), 1945. — Precocious gonad development in Oysters induced in midwinter by high temperature. — *Science*, **102** : 124-125.
- LOOSANOFF (V.L.), 1969. — Development of shellfish culture techniques. — Proc. Conference on Artificial Propagation of commercially valuable Shellfish, Oysters, 22 et 23 octobre 1969, College of Marine studies, University of Delaware, Newark, 40 p.
- LOOSANOFF (V.L.) et DAVIS (H.C.), 1950. — Conditioning *V. merceneria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. — *Biol. Bull.*, **98** : 60-65.
- LOOSANOFF (V.L.) et DAVIS (H.C.), 1963. — Rearing of bivalve mollusks. — *Advances in Marine Biology*, **1** : 1-136.
- LUCAS (A.), 1970. — Conchyliculture expérimentale. — *Publ. C.N.E.X.O., Série biologique*, n° 70-01, avril 1970, 74 p.
- LUCAS (A.), 1975. — Les écloséries de Mollusques bivalves. — *Haliotis*, **5** : 13-33.
- LUCAS (A.), 1976. — Remarques méthodologiques sur l'emploi des larves de moules comme tests biologiques. — *Haliotis*, **5** : 126-131.
- LUCAS (A.) et LE ROUX (S.), 1979. — Les embryons et larves de bivalves organismes-tests vis-à-vis de la toxicité des hydrocarbures. — C.I.E.M., C.M. 1979/E : 4 p.
- LUCAS (A.), LE PENNEC (M.), PRIEUR (D.) et LEROUX (S.), 1976. — Elevages expérimentaux de larves de Mollusques marins. — Laboratoire de Zoologie, Aquaculture et Pollutions marines. — Faculté des Sciences, Brest, 25 p.
- POUVREAU (B.), 1977. — L'huître plate, *Ostrea edulis* L. Maturité sexuelle contrôlée, élevage larvaire, croissance et mortalité, variabilité génétique, Thèse Doc. 3<sup>e</sup> cycle, Caen. — 1977 : 1-115.
- ROBERT (R.) et HIS (E.), 1981. — Action de l'acétate de tributyle-étain sur les œufs et les larves D de deux mollusques d'intérêt commercial : *Crassostrea gigas* (Thunberg) et *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). — C.I.E.M., C.M. 1981/F : 42, 16 p.
- WALNE (P.R.), 1956. — Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L. in the laboratory. — *Fish. Invest.*, Londres, **20** (9) : 23 p.
- WALNE (P.R.), 1979. — Culture of bivalve mollusca, 50 years experience at Conway. — London : Fishing News Books, 189 p.