

BIOLOGIE MARINE. — *Nouvelle méthode pour étudier la nutrition de jeunes larves de Crassostrea gigas (Thunberg) en milieu naturel. Premières données expérimentales.* Note de **Edouard His, René Robert et Marie-Josèphe Chrétiennot-Dinet**, présentée par Jean-Marie Pérès.

La présente Note décrit une nouvelle technique d'isolement d'Algues unicellulaires susceptibles de jouer un rôle dans la nutrition des larves de Bivalves. Les résultats obtenus sont comparés à ceux provenant d'élevages expérimentaux en milieu contrôlé. La technique permet l'isolement de souches effectivement ingérées par les larves. La qualité nutritionnelle de l'une d'entre elles, obtenue en culture monospécifique, est mise en évidence.

MARINE BIOLOGY. — New method for studying feeding of young larvae of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in natural surroundings. First experimental data.

This paper describes a new technique for isolating unicellular algae which are thought to play a role in the feeding of bivalve larvae. The results are compared with the data obtained from experimental cultures of bivalve larvae under controlled conditions. Effectively ingested algal strains can be isolated by this technique. The food value of one strain obtained as monospecific culture is demonstrated.

Les facteurs trophiques jouent un rôle fondamental dans le développement des larves de Bivalves et il existe de nombreuses données sur les exigences nutritionnelles des véligères en milieu expérimental, présentées dans différentes synthèses ([1] à [5]). Les Algues unicellulaires destinées aux élevages des Bivalves sont en nombre relativement restreint (une vingtaine environ), la plupart des souches ayant été isolées de l'eau de mer en zone conchylicole (Grande-Bretagne, États-Unis, Japon), sans que l'on sache si elles sont réellement utilisées par les véligères du milieu naturel. En fait, il n'existe pas, à notre connaissance, d'observations sur les espèces ingérées et assimilées par ces dernières dans les centres reproducteurs ostréicoles.

Une première approche de ce problème a été tentée sur les jeunes véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon, par la mise au point d'une nouvelle technique.

TECHNIQUES. — Les larves de *C. gigas* apparaissent dans le milieu naturel au cours des premières 24 h qui suivent le frai et les fécondations. Elles sont appelées larves D, mesurent de 60 à 70 μm de hauteur et sont susceptibles de s'alimenter dès le 1^{er} jour [6]. Cette étude s'intéresse aux véligères non umbonnées dont la taille n'excède pas 105 μm , car elles présentent un intérêt particulier dû à leurs exigences nutritionnelles quant à la qualité et à la taille des organismes captés [2].

1. *Récolte et isolement des véligères.* — Les larves sont pêchées à l'aide de filets de vide de maille de 72 μm lorsqu'un frai de plusieurs dizaines de milliers de véligères par mètre cube est observé. Le plancton et les larves ainsi recueillis sont ramenés au laboratoire dans 100 ml d'eau de mer. Les manipulations se font à l'aide de matériel stérile : (i) suppression des éléments les plus volumineux du zooplancton et du seston par passage de l'échantillon à travers un tamis en acier inoxydable de 100 μm de vide de maille; (ii) sélection des larves D et élimination totale du phytoplancton par rincages successifs sur une maille de 40 μm avec récupération des larves à la pipette d'Ependorf entre chaque lavage et remise en suspension dans de l'eau de mer stérile; (iii) récupération finale des larves D dans 250 ml d'eau de mer stérile pour comptage afin d'obtenir plusieurs lots de 10 000 véligères.

2. *Broyage des larves et ensemencements.* — Chaque lot, récupéré à nouveau sur tamis, est déversé dans un potter de Thomas où il est broyé. Le broyat, mis en suspension dans 20 ml d'eau de mer stérile, est filtré sur membrane Nuclepore calibrée à 8 μm . Le filtrat obtenu sert à ensemercer des tubes de culture contenant 6 ml d'eau de mer autoclavée et 5 ml de milieu d'Erd-Schreiber enrichi en métasilicate de sodium pour permettre l'éventuelle croissance de Diatomées [7]. Neuf tubes sont utilisés pour chaque lot : trois reçoivent 1 ml de filtrat, trois autres 0,5 ml et les derniers 0,1 ml. Les tubes sont ensuite placés en salle de culture sous éclairage constant à la température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Lorsqu'une croissance algale est constatée, les repiquages sont effectués dans des erlenmeyers de 200 ml contenant le milieu d'Erd-Schreiber métasilicaté.

Les cultures unialgales sont obtenues par les techniques bactériologiques de dilution sur milieu gélosé en boîte de Pétri ([8], [9]) et nécessitent parfois des milieux spécifiques.



3. *Valeur nutritive des souches algales : méthode des croissances comparées.* — Les croissances comparées de larves en élevage soumises à différents régimes alimentaires permettent de tester la qualité nutritionnelle des souches algales utilisées.

Les véligères sont formées 24 h après les fécondations, les gamètes étant obtenus par stimulation thermique de géniteurs « maturés » au laboratoire. Elles sont alors réparties à raison de 8 000 par litre dans des béciers stériles contenant 2 l d'eau de mer filtrée sur 0,2 μm et maintenus à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. L'eau est renouvelée au bout de 24 et 48 h, puis tous les 2 jours; à cette occasion, on procède aux observations sur les mortalités et les anomalies larvaires (comptage sur 200 individus par élevage). La croissance est étudiée à 1,5 μm près, sur clichés pris en microphotographie. Les différents types d'élevages sont effectués en double exemplaire, la hauteur moyenne des larves étant calculée avec intervalle de confiance au seuil de 95%. La nécessité d'une nourriture plurialgale pour la nutrition des véligères étant démontrée par de nombreux travaux ([7], [10], [11], [12]), les larves témoins reçoivent quotidiennement 50 cellules d'*Isochrysis aff. galbana* et 50 cellules de *Chaetoceros calcitrans* par microlitre d'élevage. Dans les mêmes conditions 50 cellules de *C. calcitrans* sont fournies aux élevages expérimentaux. Les observations sont poursuivies pendant 10 jours, ce qui permet une bonne comparaison des croissances, la plupart des véligères ayant alors atteint le stade umboné dans les élevages témoins.

RÉSULTATS. — 1. *Isolements.* — 3 algues ont été isolées du tractus digestif des véligères de *C. gigas* au cours de la saison de reproduction de 1983 dans le bassin d'Arcachon. Une Diatomée appartenant au genre *Navicula*, mais non encore obtenue en culture monospécifique, est conservée sur milieu d'Erd-Schreiber métasilicaté. Deux Chlorophycées, *Nannochloris atomus* Butcher et *Chlamydomonas bullosa* Butcher ont été obtenues en culture monospécifique. La première est cultivée sur milieu de Walne [11], sa taille est de 2 à 3 μm et des concentrations atteignant 10^8 cellules par millilitre sont régulièrement obtenues en ballon de 6 l.

La seconde se développe sur milieu de Sueoka [14] avec de l'extrait de terre, l'eau de mer remplaçant l'eau distillée. Les cellules ont des tailles variables (5 à 12 μm), les concentrations s'élèvent en culture à $5 \cdot 10^6$ cellules par millilitre en ballon de 6 l.

Fournies individuellement à des véligères de *C. gigas* âgées de 24 h, on constate par examen du tractus digestif au microscope à épifluorescence [6] qu'elles sont ingérées et digérées par les larves.

Afin de tester la valeur de la méthode utilisée, un élevage a été nourri à l'aide d'*I. aff. galbana*, un autre à l'aide de *C. calcitrans*. Le 4^e jour, les larves ont été broyées selon la technique précédemment décrite, les filtrats respectifs servant à ensemercer des tubes contenant du milieu d'Erd-Schreiber métasilicaté. Après 1 semaine, la présence respective de chaque Algue a été constatée dans chaque série de tubes, confirmant la valeur de la méthode utilisée.

2. *Valeur alimentaire de Nannochloris atomus.* — Des véligères âgées de 24 h, ne présentant pas d'anomalie au niveau de la coquille ou du velum, sont réparties dans quatre béciers de 2 l : les deux premiers (témoins) sont alimentés à l'aide d'*I. aff. galbana* et de *C. calcitrans* (élevages tests). La croissance larvaire est plus importante dans les élevages qui ont reçu l'Algue testée : hauteur moyenne de $66,19 \pm 0,57 \mu\text{m}$ contre $62,18 \pm 0,60 \mu\text{m}$ au bout de 48 h. Cette différence persiste jusqu'au 6^e jour ($83,16 \pm 1,70 \mu\text{m}$ contre $79,25 \pm 1,92 \mu\text{m}$), puis elle s'atténue, et en fin d'observation les hauteurs moyennes des véligères sont très voisines ($99,18 \pm 1,10 \mu\text{m}$ et $97,84 \pm 3,84 \mu\text{m}$). Dans tous les cas, en fin d'expérience, les mortalités restent inférieures ou égales à 0,5%.

DISCUSSION. — L'utilisation en routine pour les élevages de mollusques d'un nombre limité d'Algues-fourrage ne tient pas compte des exigences nutritionnelles réelles des différentes espèces. Des connaissances précises ont été acquises en ce qui concerne la nutrition des Bivalves adultes par l'étude des contenus stomacaux [15]. Cette technique

est difficilement applicable aux larves, compte tenu de leur faible taille. Par contre, la méthode proposée permet une approche du régime alimentaire naturel des végétaux (malgré les limites inhérentes aux techniques des cultures d'Algues) en rendant possible l'isolement d'espèces effectivement prélevées et ingérées par les végétaux dans le milieu naturel. Elle ouvre un large champ d'investigations pour de nombreuses espèces de Mollusques, Bivalves ou Gastéropodes, et peut être étendue à toutes les zones géographiques où ceux-ci se reproduisent naturellement, et dont le régime alimentaire est susceptible de varier selon l'environnement. Elle doit déboucher sur l'obtention de souches issues du milieu naturel probablement mieux adaptées aux besoins alimentaires des espèces locales mises en élevage soit à des fins expérimentales (systématique, physiologie, molysmologie), soit en vue de la production de juvéniles en éclosion.

CONCLUSIONS. — La technique proposée s'avère donc efficace puisque les premières tentatives se sont révélées fructueuses, tant en ce qui concerne l'isolement d'espèces autochtones d'une zone conchylicole, que leur valeur nutritive. En effet, la croissance des jeunes larves obtenues avec *Nannochloris atomus* est tout à fait comparable à celle observée avec *Isochrysis aff. glabana*, espèce considérée comme excellente pour les végétaux de *Crassostera virginica* [13], en présence de *Chaetoceros calcitrans*. Les résultats obtenus justifient la poursuite des observations prévues pendant plusieurs saisons consécutives dans le bassin d'Arcachon.

Remise le 7 janvier 1984.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. UKELES, *Proc. 1st Intern. Conf. aquaculture nutrition*, octobre 1975, Sea Grant College Program at the University of Delaware, 1977, p. 127-162.
- [2] R. UKELES, in *Algae biomass production and use*, G. SHELEF et C. J. SOEDER éd., Elsevier, Amsterdam, 1980, p. 287-306.
- [3] G. PERSOONE et C. CLAUS, in *Algae biomass production and use*, G. SHELEF et G. J. SOEDER éd., Elsevier, Amsterdam, 1980, p. 265-285.
- [4] A. LUCAS, *Oceanis*, 8, (5), 1982, p. 363-388.
- [5] A. LUCAS, *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 108, (3), p. 423-429.
- [6] A. LUCAS et C. RANGEL, *Aquaculture*, 30, 1983, p. 369-374.
- [7] M. M. HELM et P. F. MILLICAN, *Aquaculture*, 11, 1977, p. 1-12.
- [8] M. R. DROOP, in *Methods in microbiology*, 3B, J. R. NORRIS et D. W. RIBBONS éd., Academic Press, New York, 1969, p. 269-313.
- [9] R. R. GUILLARD, in *Handbook of phycological methods*, J. R. STEIN éd., Cambridge Univ. Press., Londres, 1973, p. 69-85.
- [10] P. R. WALNE, *Fishery Invest.*, Londres, 24, série II, 1965, p. 1-43.
- [11] P. R. WALNE, *Fishery Invest.*, Londres, 26, série II, 1970, p. 1-62.
- [12] H. C. DAVIS et R. R. GUILLARD, *Fish. Bull. natl. mar. Fish. serv.*, U.S., 136, 1958, p. 293-304.
- [13] J. W. EWART et C. E. EPIFANIO, *Aquaculture*, 22, 1981, p. 297-300.
- [14] N. SUEOKA, *Proc. natl. Acad. Sc.*, 46, 1960, p. 83-91.
- [15] G. PAULMIER, *Rev. Trav. Off. Pêches marit.*, 36, 1972, p. 375-506.

E. H. et R. R. : IFREMER, 63, boulevard Deganne, 33120 Arcachon;

M.-J. C.-D. : C.N.R.S., Centre de Recherche en Écologie
marine et Aquaculture de l'Houmeau,
Case n° 5, 17137 Nieul-sur-mer.