

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE – BREST

École Doctorale des Sciences de la Mer

**THESE**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE (UBO)

Discipline : Océanologie Biologique

**« Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas*  
(Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche  
d'indices de qualité »**

Préparée au Département « Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins », Laboratoire  
de Physiologie des Invertébrés Marins / Station Expérimentale d'Argenton, Ifremer

Présentée et soutenue publiquement par

**Rym BEN KHEDER, épouse DHAOUI**

Le 5 décembre 2007, devant le jury ci-dessous :

<b>Mme Nejla BEJAOUI</b>	<i>Maître de conférences, Université 7 novembre à Carthage – Tunis, Examineur</i>
<b>M. Jaques CLAVIER</b>	<i>Professeur, LEMAR UMR 6539, IUEM-UBO, Examineur</i>
<b>M. Amor EL ABED</b>	<i>Professeur, Université Tunis El Mana – Tunis, Examineur</i>
<b>M. Marcel LE PENNEC</b>	<i>Professeur, Université de Polynésie française, Examineur</i>
<b>M. Michel MATHIEU</b>	<i>Professeur, UMR 100, Université de Caen, Rapporteur</i>
<b>M. René ROBERT</b>	<i>Directeur de recherche Ifremer, Station d'Argenton, Directeur de thèse</i>
<b>M. Philippe SOUDANT</b>	<i>Chargé de recherche CNRS, LEMAR UMR 6539, IUEM-UBO, Examineur</i>
<b>M. Réjean TREMBLAY</b>	<i>Professeur, Université du Québec à Rimouski-Québec, Rapporteur</i>



## Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

En premier lieu mes remerciements s'adressent à Mr. René ROBERT qui m'a accueilli dans le laboratoire de Physiologie des Invertébrés à la Station Expérimentale d'Argenton et qui a dirigé cette thèse. Sa disponibilité, sa pugnacité, ses nombreux conseils ainsi que son soutien indéfectible ont joué un rôle déterminant dans l'aboutissement de ce travail. Je suis aujourd'hui heureuse de lui exprimer ma profonde gratitude.

Je voudrais aussi remercier le Professeur Marcel LE PENNEC qui m'a accueillie à l'Université de Bretagne Occidentale et dirigée vers l'équipe Ifremer d'Argenton et m'a permis ainsi de vivre une expérience scientifique et humaine unique.

Je ne saurais oublier le Professeur Amor EL ABED qui a défendu mon dossier et qui a su toujours m'écouter, me soutenir et me prodiguer ses précieux conseils. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

C'est un grand honneur pour moi d'adresser mes vifs remerciements aux rapporteurs de cette thèse, Mr. Réjean TREMBLAY et Mr. Michel MATHIEU, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury, Mme Nejla BEJAOUI, Mr. Jacques CLAVIER et Mr. Philippe SOUDANT, qui ont accepté de juger ce travail. J'adresse une attention particulière à Nejla BEJAOUI pour m'avoir épaulée lors de mes séjours en Tunisie. Son appui a été précieux lors de mes baisses de moral. Ses recommandations m'ont permis de faire face à un contexte de travail particulièrement difficile.

Je voudrais également exprimer ma profonde gratitude au Ministère Tunisien de l'Education Supérieure, de la Recherche et de la Technologie, et à l'Ambassade de France à Tunis pour leur appui financier ainsi qu'au Centre Régional des œuvres Universitaires et Scolaires de Rennes pour son assistance administrative sans lesquels mes séjours en France auraient été compromis.

La gestion de la partie expérimentale de cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe de choc sans laquelle cette thèse n'aurait pas vu le jour. Mes plus chaleureux remerciements s'adressent alors à tous les techniciens de la station. Un grand merci à Christian de m'avoir initié à l'art des élevages larvaires, pour son aide précieuse et la patience dont il a fait preuve.

Merci à Isabelle, Luc et Jean-Paul qui ont nourri quotidiennement des millions de larves. Merci à Pierrick pour son aide dans la mise en place des installations nécessaires à mes expériences. Un grand merci collectif pour votre bonne humeur, pour la sympathie que vous m'avez témoignée et surtout parce que le travail avec vous est tout simplement un plaisir.

Un grand merci à Stéphane pour ses conseils et suggestions, c'est un bonheur de t'écouter expliquer la science.

Une pensée à Marc, Marianne et Bruno pour leur écoute, leurs remarques et suggestions.

Un grand merci à Jean René LE COZ et à Claudie QUERE qui m'ont beaucoup aidée pour la réalisation de mes analyses biochimiques. Je les remercie chaleureusement pour leurs précieux conseils ainsi que toute l'équipe du laboratoire pour leur sympathie.

Merci également à Mrs André Ogor et Eric Dabas (LASAA) pour leur aide en microscopie et acquisition d'images.

Une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café ou un repas pendant ces années : Benji alias gringo, Sophie (ma stagiaire), Mehdi, Anne, Ricardo, Yves, et à tous les autres qui étaient de passage à Argenton et avec qui j'ai pu passer des moments agréables.

Je ne voudrais pas oublier aussi tout ceux que j'ai rencontré ici à Brest et qui sont devenus de chers amis : merci à Mikaël et à Jérôme de m'avoir fait découvrir la Bretagne, merci à Steph et Maria pour les barbeuk jusqu'à l'aube et les douces nuits d'été à admirer les étoiles, une pensée pour Natacha, une autre pour Anne-Nathalie et Fateh pour nos fous rires et les moments de délires, etc.

Je ne pourrais clore ces remerciements sans adresser le plus grand merci à ma famille qui a toujours cru en moi :

A ma maman chérie pour son amour, sa douceur, son soutien et ses encouragements

A mon père adorable pour m'avoir soutenu tant sur le plan moral que financier

A mon petit frère Jo

A ma bien aimée belle-famille qui m'a toujours soutenue moralement et une pensée particulière à ma belle-sœur Aïda

Enfin, la mention la plus spéciale revient à mon mari qui a été tout simplement génial en m'encourageant à poursuivre cette thèse si loin de lui.

C'est à lui que je dédie cette thèse !



<b>3. Mise au point d'un indice histochimique pour l'évaluation des réserves lipidiques des larves de <i>C. gigas</i></b>	<b>43</b>
3.1. Cadre expérimental	43
3.2. Révélation des réserves lipidiques chez les larves de <i>C. gigas</i>	44
3.2.1. Révélation à l'Oil Red O	44
3.2.2. Révélation au Nile Red	46
3.2.2.1. Répartition des réserves lipidiques au cours du développement larvaire	46
3.2.2.2. Définition d'un indice lipidique global	47
3.3. Influence des facteurs environnementaux sur l'expression de l'indice lipidique global	49
3.3.1. Impact de la température d'élevage	49
3.3.1.1. Consommation larvaire	49
3.3.1.2. Expression de l'indice lipidique global	50
3.3.2. Impact du régime nutritionnel	52
3.3.2.1. Consommation larvaire	52
3.3.2.2. Performances d'élevage larvaire	53
3.3.2.3. Expression de l'indice lipidique global	55
3.3.3. Impact de la quantité de nourriture	56
3.3.3.1. Consommation larvaire	56
3.3.3.2. Expression de l'indice lipidique global	57
3.4. Discussion	58
<b>4. Influence de la température sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de <i>C. gigas</i></b>	<b>67</b>
4.1. Cadre expérimental	67
4.1.1. Elevages larvaires	67
4.1.2. Analyses biochimiques	67
4.1.3. Analyses statistiques	68
4.2. Performances d'élevage larvaire	68
4.3. Indice de condition larvaire	70
4.4. Indice biochimique structurel	72
4.5. Discussion	74
<b>5. Influence de la nourriture sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de <i>C. gigas</i></b>	<b>79</b>
5.1. Cadre expérimental	79
5.1.1. Elevages larvaires	79
5.1.2. Analyses biochimiques	79
5.1.3. Analyses statistiques	80
5.2. Performances d'élevage larvaire	80
5.3. Indice de condition larvaire	82
5.4. Indice biochimique structurel	84
5.5. Discussion	86
<b>6. Influence du jeûne sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de <i>C. gigas</i></b>	<b>91</b>
6.1. Cadre expérimental	91
6.2. Influence d'un jeûne au cours de la métamorphose	91
6.2.1. Performances d'élevage larvaire	91
6.2.2. Indice lipidique global	92

6.2.3. Indice de condition larvaire	93
6.3. Influence de deux périodes de jeûne appliquées au milieu du cycle larvaire	95
6.3.1. Performances d'élevage larvaire	95
6.3.2. Indice lipidique global	97
6.4. Influence de jeûnes couvrant différentes périodes de la vie larvaire	98
6.4.1. Expérimentation I	98
6.4.1.1. Performances d'élevage larvaire	98
6.4.1.2. Indice lipidique global	101
6.4.2. Expérimentation II	103
6.4.2.1. Performances d'élevage larvaire	103
6.4.2.2. Indice de condition larvaire	105
6.4.2.3. Indice lipidique global	108
6.4.2.4. Indice biochimique structurel	111
6.5. Discussion et conclusion	114
7. Influence combinée des techniques de production larvaire et phytoplanctonique sur les performances et la qualité physiologique des élevages de <i>C. gigas</i>	121
7.1. Cadre expérimental	121
7.1.1. Les microalgues	121
7.1.2. Les essais biologiques	122
7.2. Composition biochimique des microalgues	123
7.2.1. Poids sec	123
7.2.2. Composition biochimique proximale	123
7.2.3. Composition en acides gras et en stérols	125
7.2.4. Composition en stérols	128
7.3. Traduction biologique sur les élevages larvaires	129
7.3.1. Influence d'une alimentation monospécifique : <i>Isochrysis affinis galbana</i>	129
7.3.1.1. Expérimentation I	129
7.3.1.1.1. Performances d'élevage larvaire	129
7.3.1.1.2. Indice de condition larvaire	131
7.3.1.1.3. Indice biochimique structurel	131
7.3.1.1.4. Indice lipidique global	132
7.3.1.2. Expérimentation II	133
7.3.1.2.1. Performance d'élevage larvaire	133
7.3.1.2.2. Indice lipidique global	135
7.3.2. Influence d'une alimentation monospécifique : <i>Chaetoceros gracilis</i>	136
7.3.2.1. Expérimentation I	136
7.3.2.1.1. Performances d'élevage larvaire	136
7.3.2.1.2. Indice lipidique global	138
7.3.2.1.3. Indice biochimique structurel	140
7.3.2.2. Expérimentation II	142
7.3.2.2.1. Performances d'élevage larvaire	142
7.3.2.2.2. Indice lipidique global	144
7.3.2.2.3. Indice biochimique structurel	145
7.3.3. Influence d'une alimentation bispécifique : <i>Isochrysis affinis galbana</i> et <i>Chaetoceros gracilis</i>	148
7.3.3.1. Performances d'élevage larvaire	148
7.3.3.1.2. Indice lipidique global	150
7.3.3.1.3. Indice biochimique structurel	151
7.4. Discussion et conclusion	154

<b>8. Développement larvaire de <i>C. gigas</i> et évolution de deux indices de qualité en conditions standardisées</b>	<b>165</b>
8.1. Cadre expérimental	165
8.1.1. Élevages larvaires	165
8.1.2. Analyses biochimiques	165
8.1.3. Analyses statistiques	166
8.2. Fluctuations intra annuelles : élevages standardisés au cours de 2004	166
8.2.1. Performances d'élevage larvaire	166
8.2.2. Indice de condition larvaire	168
8.2.3. Indice biochimique structurel	171
8.3. Fluctuations inter annuelles : élevages de référence 2005 et 2006	173
8.3.1. Performances d'élevage larvaire	173
8.3.2. Indice de condition larvaire	174
8.3.3. Indice biochimique structurel	177
8.4. Discussion et conclusion	179
<b>9. Conclusion générale et perspectives</b>	<b>187</b>
9.1. Rappel de la problématique	187
9.2. Avancées biologiques et écophysiological	187
9.3. Les indices de qualité	191
<b>10. Références bibliographiques</b>	<b>197</b>
<b>11. Publications issues de ce travail</b>	<b>211</b>



## **Introduction générale**

**« La flotte étant venue débarquer à Rhodes, et les matelots ayant jeté dans l'eau des pots cassés et autres tessons, il s'y amassa avec le temps de la bourbe, et alors il s'y trouva des huîtres »**

**Aristote,**

**dans son Traité des Parties**



### **1. Introduction générale**

#### **1.1. Préambule : bref historique de l'ostréiculture dans le monde et en France**

D'après des découvertes archéologiques, on sait aujourd'hui que l'ostréiculture remonte chez les Romains, au moins au siècle d'Auguste. Ces derniers faisaient une grande consommation et un commerce luxuriant d'huîtres. Le fondateur de l'ostréiculture européenne n'est autre que le romain *Sergius orata* qui vivait un siècle avant notre ère. C'est le premier qui songea à créer des parcs ostréicoles ; il fit grossir dans des lagunes des huîtres provenant du littoral. Les romains parvinrent à fixer les huîtres sur des branches d'arbres, maîtrisant ainsi l'ensemble du cycle de vie de l'espèce. A partir du 18<sup>e</sup> siècle, la production augmenta prodigieusement. On ne connaissait alors que l'huître plate *Ostrea edulis* sur les côtes françaises. Dès 1850, on tenta de protéger les ressources par des interdictions de pêche temporaires puis par des autorisations spéciales pour exploiter le domaine public maritime. Ces réglementations étaient cependant très difficiles à faire accepter par les populations locales dont la survie dépendait de cette activité aquacole. La pénurie et la surexploitation des gisements naturels furent parmi les causes qui entraînèrent la naissance de l'ostréiculture moderne, grâce au biologiste Victor Coste, suite à divers essais de captage de l'huître indigène, *O. edulis*, base de tout élevage rationnel. Celui-ci étudia le captage et l'élevage du naissain et expérimenta les premiers parcs d'élevage à Arcachon puis en Baie de Saint-Brieuc (Locard, 1890).

L'ostréiculture française a connu officiellement son essor au milieu du siècle dernier. Celle-ci se trouve actuellement en situation de monoculture avec 110 000 tonnes d'huître creuse *Crassostrea gigas* contre 1 650 tonnes d'huître plate *O. edulis* (AGRESTE, 2003). Or, cette production d'huître repose essentiellement sur le captage naturel avec environ 80 % des apports en juvéniles assurés par le seul bassin d'Arcachon (Auby *et al.*, 2002). La production est donc encore étroitement liée aux conditions météorologiques et environnementales non contrôlées et aléatoires. Plus récemment, en 2000, alors que la production de naissain était estimée à trois milliards pour le seul bassin d'Arcachon, les écloséries françaises n'en fournissaient que 5 à 10 %. La production de naissain en éclosérie reste secondaire et intervient comme appoint lorsque le captage naturel est déficitaire. Cependant, de par les irrégularités de captage interannuelles constatées depuis 1998

dans le principal centre naisseur français et la demande croissante de nouveaux produits ostréicoles (triploïde par exemple), cette production contrôlée est appelée à augmenter (Auby *et al.*, 2002). Ainsi en 2002, 600 à 800 millions de naissain étaient pourvus par les écloseries françaises (Scheffer *et al.*, 2003) qui occupent depuis environ 25 % de l'approvisionnement en juvéniles d'huîtres. Ainsi, la production contrôlée et régulière de juvéniles de qualité devient une nécessité dans l'industrie conchylicole et un enjeu important d'un point de vue économique, mais aussi scientifique.

### **1.2. Contexte de l'étude et objectifs généraux**

Si un savoir-faire indiscutable existe dans la plupart des écloseries commerciales actuelles, de nombreuses questions biologiques restent en suspens et les professionnels doivent affronter divers problèmes pour obtenir des élevages larvaires performants. Ainsi, hors pathologie avérée, la croissance et la survie larvaire, ainsi que la métamorphose de *C. gigas* restent extrêmement variables en écloserie et leurs causes diverses (Robert et Gérard, 1999; Laing, 1995). Les performances relevées en écloseries commerciales sont fortement biaisées par une sélection systématique, tous les deux à trois jours, des larves à fort taux de croissance (Jones et Jones, 1983 ; Robert et Gérard, 1999). De plus, les techniques d'élevage sont trop variables d'une écloserie à une autre (température, nourriture, densité d'élevage.....) et le suivi des productions trop aléatoire pour qu'on puisse se baser sur cette seule source d'information. Ainsi, des rendements de métamorphose de 20 à 30 % sont rapportés au cours d'essais de télécaptage par Henderson (1983) et Roland *et al.* (1988), ceux-ci atteignant 88 à 85 % dans les travaux de Holliday *et al.* (1991). En outre, il n'existe actuellement aucun outil fiable prédictif de la santé d'un élevage larvaire. Les mesures de croissance et de mortalité sont utilisées en routine pour l'évaluer. Ces données fournissent des indications sur les stress environnementaux et nutritionnels subis par les animaux. Mais la réponse reste de type intégratif. Des indices de condition, prédictifs du développement larvaire et / ou du succès à la métamorphose manquent donc cruellement chez *C. gigas*. Pourtant leur intérêt pratique est indiscutable. Ils permettraient de déceler d'éventuelles perturbations avant qu'elles ne s'expriment par un arrêt de croissance et / ou la mort des individus. Mann (1988) définit la condition d'un animal comme étant sa capacité à résister à un stress environnemental physique, chimique ou biologique. En ce qui concerne ces indices de condition, les travaux de Gallager et Mann (1981), Gallager *et al.* (1986) et Castell et Mann (1994) montrent qu'un indice

lipidique global traduit en partie l'état physiologique des larves. Il semble être partiellement corrélé à la survie larvaire puisque de forts taux de survie sont liés à de forts taux lipidiques mais pas l'inverse : relation univoque (Gallager *et al.*, 1986). De plus, cet indice pourrait être utilisé comme indicateur prédictif de la métamorphose mais aucune donnée expérimentale ne vient étayer cette hypothèse. En effet, chez la coquille St Jacques *Pecten maximus*, Robert *et al.* (1999) ont signalé que la métamorphose est fortement corrélée à la teneur en lipides des pédivéligères. Leur recherche a démontré que, parmi les constituants biochimiques, seule la teneur lipidique relative est un phénomène explicatif de la métamorphose (coefficient de corrélation = 0,56). Les perspectives offertes par ces différents résultats sont intéressantes mais la validation de cet indice lipidique reste à être opérée chez *C. gigas*. En effet, les travaux réalisés sur l'indice lipidique global ont été basés sur une échelle semi quantitative (ordinaire) et l'établissement de corrélations significatives en est affecté. De plus, une très grande hétérogénéité des résultats, en partie liée à des conditions d'élevage non optimisées (régime monospécifique), ne permettent que de dégager des tendances fortes : indices 0 et 1 liés à des taux de métamorphose < 10 % et indices 2 et 3 à des taux compris entre 10 et 90 %.

Dans le présent travail, nous nous proposons d'étudier cet indice par coloration spécifique des lipides et de traiter les résultats par analyse d'images. Nous tenterons de quantifier les lipides de réserve apparaissant sous forme de gouttelettes colorées dans les larves et de préciser leur évolution au cours du développement larvaire. Un indice lipidique global sera alors déterminé comme étant le rapport de la surface de l'image occupée par les lipides à la surface totale de la larve. Une relation sera recherchée entre cet indice et la totalité ou une partie des descripteurs du développement larvaire. D'autre part, et afin d'estimer la qualité des larves, le développement larvaire de *Placopecten magellanicus* a été étudié en relation avec l'évolution du rapport triacylglycérols / stérols (Pernet *et al.*, 2003). Si les stérols constituent les lipides de structure nécessaires à la synthèse membranaire, les triacylglycérols (TAG), eux, forment les réserves énergétiques principales des larves d'huîtres (Whyte *et al.*, 1988). Ils sont préférentiellement catabolisés lors des périodes de jeûne (Gallager *et al.*, 1986). Aussi, la teneur en TAG est positivement corrélée au taux de croissance chez les larves de *C. gigas* (Waldock et Nascimento, 1989). Puisque la teneur en TAG est fonction de la taille des larves, on ne peut pas établir de corrélation directe entre le contenu en TAG en valeur absolue et l'état des larves. Ainsi, le contenu en TAG doit être exprimé relativement à un autre lipide dont la quantité soit hautement corrélée à la taille larvaire. Les phospholipides ont un rôle énergétique important durant les stades larvaires

précoces et les périodes de jeûne (Fraser, 1989; Delaunay *et al.*, 1992) rendant l'utilisation du rapport TAG / ST plus appropriée pour l'estimation de la qualité larvaire que le rapport TAG / PL (Pernet *et al.*, 2003). Une relation positive a été dégagée entre le taux de compétence (nombre de larves prêtes à la métamorphose) et le rapport TAG / ST mesuré au huitième jour après la fécondation. Paradoxalement, ce ratio est négativement corrélé au succès à la fixation suggérant que les larves ayant une bonne condition physiologique passent plus de temps dans la recherche de substrat adéquat pour se fixer contrairement aux larves en mauvais état, moins sélectives et qui se fixent dès qu'elles trouvent un support (Pernet *et al.*, 2003). Dans la présente étude, nous appliquerons cet indice chez les larves de *C. gigas*, d'une part, pour affiner notre approche biochimique en déterminant quel groupe de lipides est réellement impliqué dans la croissance, taux de survie et / ou métamorphose des mollusques et, d'autre part, pour valider notre indice lipidique global s'il s'avère que ces deux indices évoluent selon un même profil au cours du développement larvaire. Par rapport aux travaux antérieurs, les analyses seront affinées puisque nous utiliserons la chromatographie sur couche mince, Haute Performance HPTLC.

Par ailleurs, His et Maurer (1988) qui ont suivi l'évolution de la matière organique (MO) et du poids sec (PS) au cours du développement larvaire chez *C. gigas* ont noté une accumulation plus importante de ces paramètres à la fin de la vie pélagique. L'accumulation de la matière organique est, selon ces auteurs, une préparation à la période critique de la métamorphose. Cependant, aucune donnée expérimentale ne vient étayer ces affirmations. Il en est de même chez la moule *Mytilus edulis* (Lucas *et al.*, 1986) et le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1988) où le pourcentage relatif de matière organique ( $100 * MO / PS$ ) est considéré par ces derniers comme un bon indicateur de la compétence larvaire à la métamorphose. Ce même indice (appelé indice de condition larvaire) a été déterminé chez vingt et un lots de pédivélignes de *P. maximus* et une faible corrélation avec le taux de métamorphose a été dégagée (Robert *et al.*, 1999).

Cependant, chez *C. gigas* la métamorphose est beaucoup plus rapide (2-8 j vs 8-14 j chez la coquille St Jacques) et nous essayerons, dans la présente étude, de vérifier sa validité en tant qu'indicateur prédictif de la métamorphose chez l'huître creuse. Pour ce faire, les valeurs de cet indice de condition larvaire seront déterminées au cours des élevages larvaires et la corrélation avec le taux de métamorphose sera établie. S'ils s'avèrent valides, ces différents indices de qualité devraient constituer des outils pour une meilleure gestion des élevages en éclosier en permettant la prédiction du développement et des performances larvaires. Ces travaux vont permettre une

meilleure compréhension du rôle des lipides neutres sur le développement larvaire de *C. gigas*. Ils vont aussi apporter des connaissances sur l'impact des conditions du milieu (aspect nutritionnel, température, systèmes d'élevage / production phytoplanctonique) sur le déroulement de l'élevage larvaire, qui pourront être exploitées à des fins ostréicoles pour optimiser le développement de l'huître creuse. Tous ces éléments seront favorables à une amélioration de la production ostréicole.

### **1.3. Plan de la thèse**

Les études présentées dans le présent mémoire se sont ainsi centrées sur la recherche d'indices de qualité prédictifs de développement larvaire chez les larves de *C. gigas*. Il nous a paru judicieux de valider et de mettre en place des indices en relation directe avec la teneur lipidique vue l'importance de ce composé biochimique dans l'état physiologique des animaux.

Les résultats apportés dans cette thèse peuvent être regroupés en six chapitres :

- **Le premier chapitre** porte sur la mise au point d'un indice histochimique, par étude colorimétrique, pour l'évaluation des réserves lipidiques et leur évolution au cours du développement larvaire chez *C. gigas*. Trois facteurs ont été abordés : qualité du régime nutritionnel, quantité de microalgues apportées et température d'élevage
- **Le deuxième chapitre** porte sur les performances et qualités physiologiques des élevages larvaires de *C. gigas* en fonction de la température.
- **Le troisième chapitre** présente l'influence de la quantité de nourriture sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de *C. gigas*.
- **Le quatrième chapitre** présente l'influence du jeûne sur les performances d'élevage larvaire et la gestion des réserves lipidiques.
- **Le cinquième chapitre** traite de l'effet combiné de la technique d'élevage (séquentiel et flux ouvert) et de la production phytoplanctonique (en batch et en continu) sur les performances d'élevage larvaire et la gestion des réserves lipidiques.
- **Le sixième chapitre** porte sur la mise au point d'indices de qualité (matière organique / poids sec et triacylglycérols / stérols) et leur limite de variation dans des conditions d'élevage constantes dites standardisées. Pour cette partie, les paramètres d'élevage depuis la fécondation jusqu'à la métamorphose ont été fixés. Sur la base de cette norme

standardisée établie, les descripteurs de développement larvaire (survie, croissance, compétence et taux de métamorphose) ont été déterminés. En parallèle, des indices de qualité ont été appliqués et comparés entre élevages. La puissance de corrélation reliant ces indices et les descripteurs d'élevage larvaire a été abordée.

### **1.4. Données biologique sur la larve de l'huître creuse *Crassostrea gigas***

#### **1.4.1. Systématique et répartition**

L'huître creuse ou l'huître du Pacifique ou l'huître japonaise *Crassostrea gigas* occupe la position systématique suivante :

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Ordre : Eulamellibranches

Famille : Ostreides

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gigas*

Originaire du Japon, *C. gigas* a été introduite avec succès dans de nombreuses régions du monde (littoral occidental des Etats-Unis d'Amérique dans les années 20 et en France en 1966) pour remplacer les stocks des huîtres indigènes épuisés par la surexploitation ou les maladies, ou pour créer une industrie inexistante auparavant. Elle est présente dans la mer de l'URSS, au Japon, en Corée, les côtes pacifiques d'Amérique du Nord de l'Alaska à la Californie.

De part sa croissance rapide et sa grande tolérance aux conditions environnementales, notamment aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de quantité de nourriture, l'huître creuse du Pacifique est devenue majoritairement cultivée dans plusieurs régions du monde. En effet, les ostréidés forment la famille la plus produite dans le monde avec près de 4.6 millions de tonnes en 2005 (FAO, 2008). Selon la même source, sur les neuf espèces qui assurent 85 % de la production mondiale; l'huître creuse japonaise, *C. gigas*, représente un tiers de la production conchylicole.

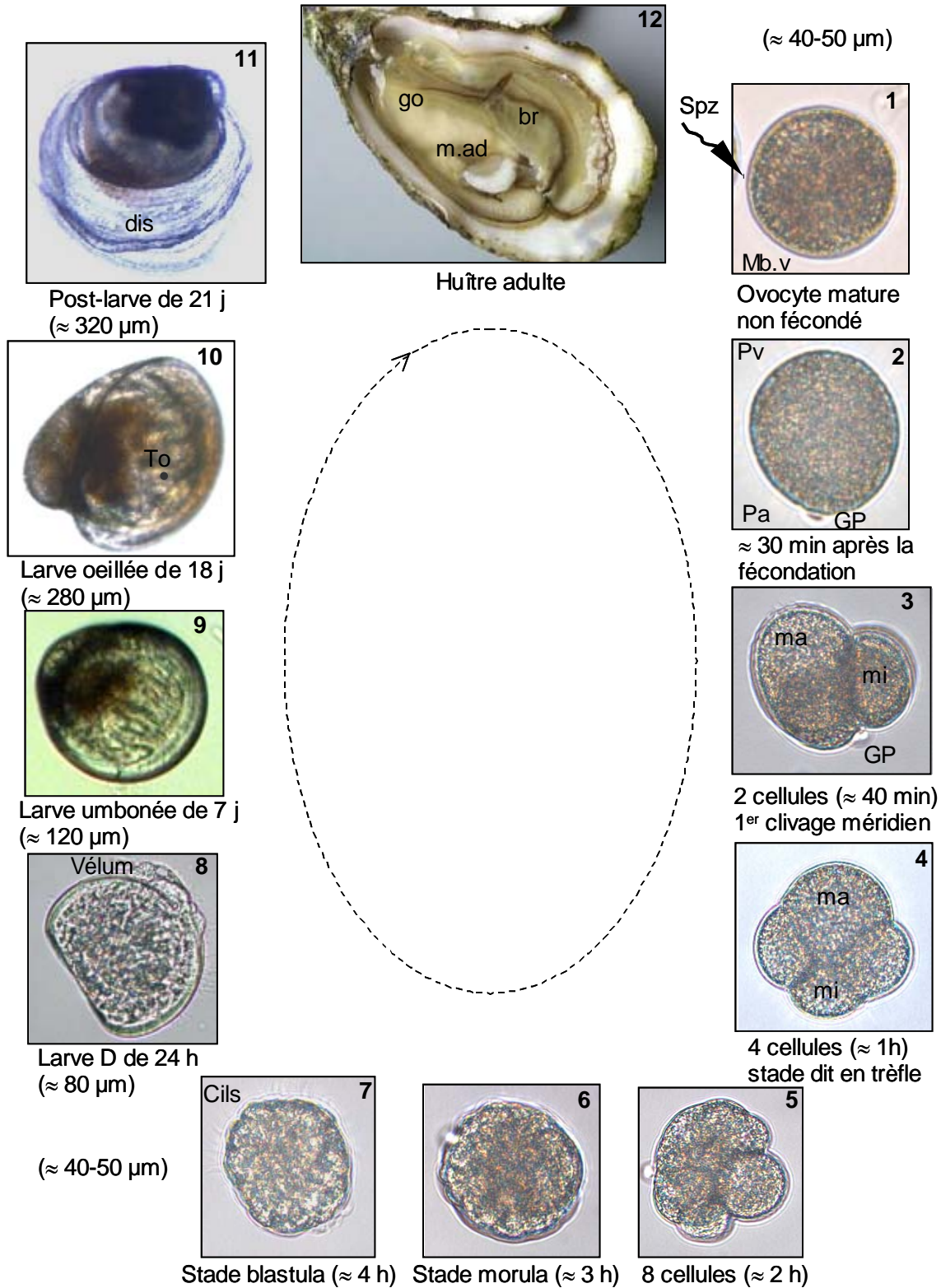


### **1.4.2. Cycle biologique**

Les huîtres sont des organismes hermaphrodites alternatifs protandres : l'huître est généralement mâle au début de son activité sexuelle puis elle alterne à chaque période de reproduction entre mâle et femelle.

Les gonades sont situées au niveau de la masse viscérale, entre le manteau et la glande digestive. La gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales, pour arriver à maturité sexuelle au cours de l'été, période au cours de laquelle ont lieu les émissions gamétiques lorsque la température de l'eau est supérieure au seuil de 18°C (Mann 1989). Les gamètes sont alors émis dans l'eau où a lieu la fécondation.

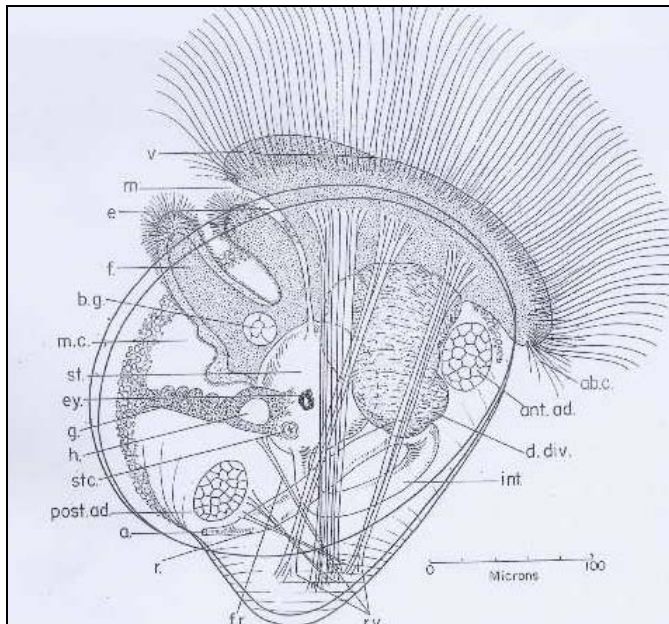
L'œuf hétérolécite fécondé subit des divisions successives conduisant à l'obtention d'une blastula (photo 8, figure 1) puis une gastrula à l'issue de laquelle apparaît le premier stade larvaire, la trochophore. C'est une larve ciliée ayant une forme caractéristique de toupie. Au bout de 24h, la larve développe un velum et secrète sa première coquille (prodissoconque I). Elle a une forme de D majuscule d'où son appellation larve « D » (photo 8, figure 1). Vers le 8<sup>e</sup> jour après la fécondation, cette véligère devient umbonée du fait de l'acquisition d'un crochet, ou umbo, au niveau de la charnière (photo 9, figure 1). A ce stade, la coquille est beaucoup plus calcifiée et est appelée prodissoconque II. Vers le 18<sup>e</sup> jour, une tache oculaire, improprement appelée œil apparaît au niveau de la première ébauche branchiale. La larve est dite oeillée et est compétente ou apte à la métamorphose (photo 10, figure 1). Elle entre alors dans une phase d'exploration du sédiment, grâce à son pied, lui permettant la reptation. Son pied est doté d'une fonction sensitive (sélection du support de fixation) et une fonction glandulaire (sécrétion du ciment de fixation). Les larves peuvent se fixer sur plusieurs types de surfaces, mais préfèrent les coquilles de mollusques et les matières qui contiennent des substances crayeuses. Après la fixation, la pédiveligère subit la métamorphose, phénomène complexe au cours duquel les différents tissus et organes se réorganisent pour donner une huître juvénile appelée naissain ou post-larve (photo 11, figure 1).



**Figure 1** : cycle de développement larvaire de *C. gigas* à 24 °C. br : branchies ; dis : dissoconque ; go : tissu gonadique ; GP : globule polaire ; ma : macromère ; m.ad : muscle adducteur ; Mb. v : membrane vitelline ; mi : micromère ; Pa : pôle animal ; Pv : pôle végétatif ; Spz : spermatozoïde ; To : tâche ocellaire. Photos R. Ben Kheder.

### 1.4.3. Anatomie

La Prodissoconque I est le premier stade larvaire, caractérisé par une forme en D majuscule d'où son appellation. Elle présente une charnière droite, deux valves et un velum (v), circulaire organe spécifique des larves de bivalves (figure 2). Cette sorte de voile ciliée (ab.c) peut être saillante entre les deux valves et présente une triple fonction : la respiration, la nage tout en maintenant la larve dans la colonne d'eau et la collecte du phytoplancton nécessaire à l'alimentation. Cette dernière débute en effet quelques heures après la formation de la prodissoconque I (Lucas et Rangel, 1983). Le système digestif, déjà complet dès ce stade, est très proche de celui de l'adulte. Il comporte un œsophage (e), un estomac (st) où se forment postérieurement le sac du stylet cristallin et le bouclier gastrique et un intestin en boucle (int., figure 2). La structure de l'appareil digestif se maintient sans évolution jusqu'à la fin de la vie pélagique. C'est au cours de la métamorphose que la larve subit de profondes modifications anatomiques. Le vélum et le pied (f) disparaissent, les palpes labiaux se forment, les branchies (g) se développent et la coquille définitive est secrétée, la dissoconque. Ce stade postlarvaire est appelé stade plantigrade.



**Figure 2 : anatomie interne de la larve pédivéligère du genre *Crassostrea* (d'après Galtsoff, 1964).** a. anus, ab.c. bande ciliaire, v. velum, ant.ad. muscle adducteur antérieur, b.g. glande byssale, d.div. diverticule digestif, e. oesophage, ey. oeil, f. pied, f.r. muscles rétracteurs du pied, g. branchie rudimentaire, h. coeur, int. intestin, m. bouche, m.c. cavité palléale, post.ad. muscle adducteur postérieur, r. rectum, r.v. muscles rétracteurs du velum, st. estomac, stc. statocystes.

### **1.4.4. Nutrition larvaire**

Les bivalves sont des filtreurs qui se nourrissent essentiellement de phytoplancton. L'alimentation commence dès le stade de larve D. Chez les véligères, l'extrémité du vélum est munie de deux bandes ciliaires dont le battement va provoquer l'acheminement des particules nutritives vers la bouche pour être soit ingérées soit rejetées au-dessus du palpe labial ou du pied. Les particules alimentaires sont capturées grâce à un mécanisme muco-ciliaire.

Chez les juvéniles et les adultes, les branchies sont bien développées et assurent un double rôle : la nutrition et la respiration. Les branchies sont recouvertes de cils qui en se contractant induisent un courant d'eau qui rentre du côté ventral et ressort du côté dorsal de la coquille. Ainsi, l'eau passe à travers les lamelles et les particules alimentaires sont capturées par les cirres et sont dirigées vers les gouttières ventrales ou les sillons dorsaux. Le sens de ce transport est influencé par le type de filaments. Les huîtres ont deux types différents de filaments et donc un transport bidirectionnel des particules: les filaments ordinaires qui entraînent les particules vers les gouttières et les filaments principaux qui les entraînent vers les sillons. Ces battements ciliaires font avancer un mucus plus au moins visqueux où se sont fixées les particules. Le mucus et les particules sont acheminés vers les sillons dorsaux pour être ingérés d'une part, et vers les gouttières ventrales pour être rejetés avant ingestion, d'autre part, et rejoignent ensuite les palpes labiaux où se poursuit le tri. Le rôle des palpes labiaux est de diriger la nourriture vers la bouche. Les particules transportées et accumulées sur le bord des palpes sont rejetées à partir de la cavité du manteau sous forme de pseudo fèces, et celles dirigées vers les gouttières orales sont ingérées. Le tri des particules se fait en fonction de leurs propriétés biochimiques, de leur taille et de leur forme. La nourriture retenue est ingérée puis passe dans le système digestif. Les aliments passent dans l'intestin pour être digérés et assimilés. Les éléments non digérés finissent leur trajet dans le rectum, puis sont évacués sous forme d'excréments ou fèces.

### **1.4.5. Rôle énergétique des lipides chez les bivalves**

Le succès du développement des larves est influencé par la condition physiologique de celles-ci qui dépend à son tour de l'acquisition d'une énergie suffisante pour palier aux besoins requis, de l'embryogenèse à la métamorphose. Les principaux constituants des œufs d'invertébrés marins sont, par ordre d'importance quantitative, les protéines, les lipides et les glucides (Holland, 1988). Chez *Ostrea edulis*, la principale forme de stockage de l'énergie est le glycogène et ce pendant plusieurs mois après la métamorphose (Holland et Hannant, 1984). Rodriguez *et al.* (1990) soulignent, quant à eux, l'importance énergétique des protéines. En revanche, ce sont les lipides qui constituent la source d'énergie la plus importante chez la majorité des larves des invertébrés marins benthiques (Holland, 1988). Chez *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica*, 69 et 81 % des lipides ovocytaires, principalement les triacylglycérols, sont consommés lors du développement des œufs (Gallager *et al.*, 1986). Les lipides constituent une source d'énergie importante non seulement pour le développement précoce des bivalves mais aussi pendant le développement larvaire et post-larvaire (Holland et Spencer, 1983; Whyte *et al.*, 1988). Chez *Crassostrea gigas*, le succès de la métamorphose dépend de la taille initiale de l'ovocyte (teneur en lipides) et de la capacité des larves à stocker les lipides (Bochenek *et al.*, 2001). La réorganisation tissulaire qu'imposent les modifications morphologiques lors de la métamorphose étant très consommatrice d'énergie, le succès de recrutement dépend donc de l'accumulation de réserves énergétiques endogènes afin de soutenir cette étape (Pernet *et al.*, 2003). Ainsi, si les larves compétentes n'ont pas accumulé suffisamment d'énergie au cours de leur développement, la phase de fixation-métamorphose risque d'être compromise. Ceci est d'autant plus important que, lors de cette période, la capacité d'alimentation des larves est réduite voire nulle. Ceci témoigne de l'importance des lipides chez les bivalves particulièrement au cours des deux phases les plus critiques du développement, à cause de l'incapacité des larves à s'alimenter : l'embryogenèse avant la formation du vélum (Gallager et Mann, 1986; Gallager *et al.*, 1986; Pernet *et al.*, 2003; Moran et Manahan 2004) et la métamorphose au cours de la transition entre le vélum et les branchies (Holland et Spencer, 1983; Gabbott, 1986; Holland, 1988; Gallager et Mann, 1986; Gallager *et al.*, 1986; Labarta *et al.*, 1999; Pernet *et al.*, 2003).

Dans cette étude, nous allons nous focaliser sur les deux classes les plus importantes des lipides : les triacylglycérols et les stérols.

### *1.4.5.1. Les triacylglycérols (TAG) : lipides de réserve*

Les lipides constituent une source majeure d'énergie métabolique et un matériel essentiel pour la formation des cellules et des tissus membranaires. Les TAG ou graisses neutres représentent avec 90 % la plus grande partie des lipides. Une molécule de TAG est composée d'une molécule de glycérine et de trois molécules d'acides gras. Sur le plan physique, les TAG sont complètement apolaires, insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants les plus polaires comme l'acétone. Agitées dans l'eau, ils forment des émulsions très instables qui se transforment en système biphasique. Biologiquement, ils constituent des réservoirs énergétiques puisque la plupart des eucaryotes stockent ces lipides neutres dans des inclusions huileuses du cytosol. Cette réserve énergétique offre des avantages par rapport aux glucides. Leur catabolisme par oxydation s'accompagne d'une production d'énergie deux fois plus grande. Ils sont neutres et très hydrophobes, leur stockage se fait sous une forme physique compacte et sans eau. En revanche, le glycogène est une source rapide de glucose épuisable en une journée, tandis que les acylglycérols sont une réserve à long terme de quelques mois. Les TAG constituent aussi un isolant thermique très efficace chez les animaux à sang chaud des régions polaires, particulièrement chez les animaux hibernants.

Chez les larves, les TAG et leurs produits de dégradation sont les principales ressources d'énergie pour les cellules et constituent l'énergie primaire de réserve (Holland, 1988 ; Gallagher et Mann, 1986; Gallagher *et al.*, 1986; Delaunay *et al.*, 1992). Chez *Placopecten magellanicus*, le développement larvaire est significativement amélioré lorsque les microalgues sont enrichies en TAG (Pernet *et al.*, 2003). La teneur en TAG chez les larves reste faible au cours des phases précoces du développement jusqu'au stade où les larves sont capables de s'alimenter. Le stockage de ce composé ne peut avoir lieu que lorsque l'énergie exogène puisée dépasse la demande métabolique de la larve. En revanche, si l'énergie exogène est insuffisante pour le maintien du métabolisme de base, les TAG endogènes seront catabolisés (Fraser *et al.*, 1988).

Chez *Ostrea edulis*, c'est au cours de la métamorphose que les TAG constituent la principale source d'énergie (Holland 1988; Gallager *et al.*, 1986) confirmant l'incapacité des larves à s'alimenter au cours de cette étape. Il a été observé que chez le hareng le taux d'accumulation des TAG est notablement réduit au cours de la métamorphose mais que celui-ci augmente considérablement une fois que cette phase est achevée (Fraser *et al.*, 1988). Le rôle de ce composé biochimique s'avère également capital lors des conditions défavorables du milieu. En effet, lors d'un stress environnemental, les larves, souvent incapables de satisfaire leurs besoins en énergie à partir de sources exogènes, doivent cataboliser leurs réserves énergétiques endogènes, constituées majoritairement de TAG, afin de maintenir leur métabolisme basal (Fraser, 1989). Selon ce dernier, la quantité de TAG dont disposent les larves est corrélée avec l'état physiologique de celles-ci et est directement affectée par la disponibilité en nourriture et le stress environnemental qui augmente l'activité métabolique et réduit par conséquent l'ingestion des aliments.

### 1.4.5.2. Les stérols (ST) : lipides de structure

Le plus représentatif est le cholestérol qui est très rare dans le règne végétal et dans les bactéries, hormis les mycoplasmes. Le cholestérol peut être synthétisé par l'organisme ou le plus souvent apporté dans les aliments d'origine animale. C'est une substance importante de l'organisme puisque c'est un composant essentiel des membranes cellulaires et constitue un précurseur de molécules biologiques comme les acides biliaires, hormones stéroïdes et vitamines. Les stérols sont donc des composés chimiques très stables, leur rôle dans les membranes cellulaires est essentiellement structural et non métabolique. En général, les mollusques contiennent un mélange très complexe de stérols (Teshima *et al.*, 1988). Chez le bivalve *Macra chinensis*, il a été démontré qu'au niveau de ses organes et tissus, les stérols dominants sont le cholestérol, le 24-methylcholesta-5, le 22-dienol, le 24-methylenecholesterol, le cholesta-5,22E-dienol et le 24-methylcholest-5-enol (Teshima *et al.*, 1988). Chez ce bivalve, comme chez *Placopecten magellanicus* (Napolitano *et al.*, 1993), la distribution des stérols semble être uniforme dans l'ensemble des tissus et organes examinés, suggérant que l'assimilation des stérols alimentaires ne se fait pas d'une manière préférentielle. Cette distribution uniforme semble être une caractéristique commune chez les bivalves et nécessaire pour un fonctionnement cellulaire

## Introduction générale

---

normal. Chez ces organismes, la capacité de synthétiser les stérols *de novo* est généralement faible voire absente et varie selon les espèces. Par exemple, l'huître américaine *C. virginica* est incapable de synthétiser les stérols (Holden et Patterson, 1991) contrairement aux naissains de *C. gigas* (Knauer *et al.*, 1998). Si la capacité à bio synthétiser les stérols est différente selon les espèces et est généralement controversée souvent au sein de la même espèce, la nécessité de l'apport de ce composé biochimique dans le régime alimentaire des bivalves semble faire l'unanimité. La variabilité qualitative et quantitative de la composition des stérols dans les microalgues utilisées en éclosion a une conséquence sur la composition des phytostérols chez les larves et les naissains (Langdon et Waldock, 1981; Marty *et al.*, 1992; Delaunay *et al.*, 1993; Napolitano *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1996; Delaporte *et al.*, 2003) et par conséquent sur les performances larvaires en terme de survie et croissance.



## **Matériels et méthodes**



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Techniques d'écloserie

Tous les conditionnements de géniteurs ainsi que l'ensemble des élevages larvaires ont été réalisés à l'écloserie expérimentale IFREMER d'Argenton, située dans le Nord-Ouest du Finistère (Bretagne, France : figure 3).



Figure 3 : la station expérimentale d'Argenton à la pleine mer.

#### 2.1.1. Culture des microalgues

Les géniteurs, larves et post-larves ont été alimentés à partir de microalgues cultivées par l'écloserie d'Argenton qui maintient trente deux espèces, dont huit sont produites régulièrement. A l'exception de *Chaetoceros* sp "minus" dite souche d'Argenton, récemment isolée et en cours de détermination, les algues sont originaires soit de la Culture Collection of Algae and Protozoa CCAP (Grande Bretagne) soit de la Collection of University of Texas UTEX (Etats-Unis). Elles sont cultivées selon la méthode dite des volumes croissants (Helm *et al.*, 1989). Toutes les cultures sont réalisées avec de l'eau de mer de salinité 35 ‰, filtrée à 1 µm, stérilisée aux ultraviolets ou à l'autoclave. Le milieu de Conway est utilisé comme source de sels nutritifs (Walne, 1980), avec un supplément de silicates pour les diatomées. Les souches sont repiquées régulièrement et conservées axéniquement dans les erlenmeyers, sous éclairage continu et maintenues à une température de  $22 \pm 2$  °C. Les pré cultures (figure 4a) et les cultures en grands volumes (figure 4b) sont agitées avec de l'air supplémenté avec du CO<sub>2</sub>

(1 %). Le pH, la température, le débit de CO<sub>2</sub> et la concentration cellulaire sont contrôlés quotidiennement. Les microalgues destinées aux larves sont prélevées en phase de croissance exponentielle (Robert *et al.*, 2004).



Figure 4 a : ballons de 2 et 5 L.



Figure 4 b: cylindres de 300 L.

### 2.1.2. Conditionnement des géniteurs

Des géniteurs âgés de deux ans, en provenance du bassin d'Arcachon où ils ont été capturés naturellement (Arcachon 2002, 2003 et 2004), ont été placés en poche à l'Aber Benoît (Bretagne nord) de 2004 à 2006. Tous les deux mois, de nouveaux lots (une soixantaine d'individus) provenant de l'Aber Benoît ont été mis en conditionnement à l'écloserie d'Argenton. Les adultes ont été débarrassés de leurs épibiontes, pesés puis placés dans des bacs de 800 L en circuit ouvert. Le conditionnement a été réalisé suivant la technique de routine utilisée à Argenton. Il dure ainsi 45 jours à 19 °C avec un apport nutritionnel quotidien équivalent à 6 % du poids sec moyen des bivalves (poids sec d'algues/poids sec de la chair) rapporté au poids sec d'*Isochrysis affinis galbana* (t. Iso = T, souche CCAP 928/14), *Chaetoceros gracilis* (Cg, souche UTEX LB 2385) et *Skeletonema marinoi* (S, souche CCAP 1088/3).



Figure 5 : bac de maturation pour le conditionnement des géniteurs de *C. gigas*.

### 2.1.3. Émission des gamètes et incubation

A l'issue de cette période, une trentaine d'individus est prélevée pour scarification. Afin de minimiser les effets génétiques, trois mâles et six femelles ont été sélectionnés. Le sexe de chaque animal ainsi que la qualité des gamètes ont été déterminés par observation microscopique d'une microponction de la gonade. Les individus sont sélectionnés selon des critères de motilité pour les spermatozoïdes et de morphologie pour les ovocytes (arrondis ou piriformes et vésicules germinales visibles). Les gamètes ont été obtenus par scarification des gonades mâles d'abord puis des femelles, les spermatozoïdes se conservant mieux que les ovocytes. Les huîtres sont rincées à l'eau de mer filtrée et les gonades dilacérées soigneusement avec un scalpel en évitant de percer la glande digestive. Un tamis de 60  $\mu\text{m}$  de maille a été utilisé afin de retenir les débris ; seuls les spermatozoïdes passent et sont alors récupérés dans un bécher de 2 L. Par ailleurs, les ovocytes ont été filtrés sur un tamis de 60  $\mu\text{m}$  de maille et retenus sur un tamis de 20  $\mu\text{m}$ , afin d'éliminer tous les fragments et les ovocytes éclatés. Les ovocytes de chaque femelle, placés dans un bécher de 5 L, ont été dénombrés grâce à une série de prélèvements de 50  $\mu\text{l}$  et observation sous loupe binoculaire. Après comptage, la fécondation a été effectuée par adjonction de 20 à 50 ml de suspension dense de sperme ( $\approx$  50 spermatozoïdes par ovocyte), provenant du mélange des spermatozoïdes des

meilleurs mâles sélectionnés. Les gamètes des deux sexes sont alors mis en contact pendant une heure durant laquelle une homogénéisation est effectuée tous les quarts d'heure.

Au bout de deux heures et après suivi du bon déroulement de la fécondation (apparition du premier globule polaire et des premiers stades de division), les embryons sont mis à incuber dans des bacs cylindro-coniques de 150 L à raison de 40 embryons. ml<sup>-1</sup>. L'eau de mer, filtrée à 1 µm, est thermo régulée à 24 ± 1°C et brassée par un léger bullage émanant du bas du cône et évitant ainsi la sédimentation des oeufs.

### 2.1.4. Élevages larvaires

Au terme de 48 heures d'incubation, les larves D sont récupérées sur un tamis de 45 µm de maille par vidange des bacs et remises en suspension dans des éprouvettes. Chaque lot est homogénéisé au moyen d'un agitateur adapté à l'éprouvette (tige munie d'une rondelle perforée en PVC) et 50 ou 100 µl de suspension sont déposés sur une lame de comptage et observés au microscope. Les taux de larves D sont déterminés et les larves sont alors redistribuées dans des bacs cylindro-coniques de 30, 150 ou 450 L, en fonction de l'objectif de l'expérimentation.

Les élevages sont conduits à une température de 24 ± 1°C, à salinité ambiante (34 ppm) et, le plus souvent, à la densité de 5 larves ml<sup>-1</sup>. L'eau de mer est renouvelée tous les deux jours et est filtrée, au final, à 1 µm (filtres cartouche Nexis et Claris installées en cascades de 5 µm et 1 µm). Aucune adjonction d'antibiotique n'a été effectuée. Un léger bullage (0,5 L min<sup>-1</sup>) partant du bas du cône a été opéré tout le long de l'élevage dans le but de brasser les larves et les algues dans la colonne d'eau. Le régime nutritionnel standard est constitué d'un mélange bispécifique composé d'*Isochrysis affinis galbana* et de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (TCp) distribué quotidiennement en fonction du besoin larvaire.

Deux types d'élevage ont été conduits:

- des **élevages standardisés** pour la détermination des limites de variation des indices dans des conditions zootechniques fixes,
- des **élevages non standardisés** pour l'étude de l'incidence d'un ou de plusieurs paramètres d'élevage sur l'expression de ces indices. Les paramètres choisis sont : la température, la nourriture (aspect qualitatif et quantitatif), le jeûne, la technique d'élevage (flux ouvert/séquentiel), la technique de production phytoplanctonique (phytoplancton produit en batch/en continu).

### *2.1.4.1. Élevages standardisés*

En 2004, six élevages larvaires ont été réalisés en système clos (séquentiel), selon des conditions zootechniques similaires (tableau 3), dans le but de déterminer l'évolution des indices physiologiques [matière organique / poids sec (MO/PS) et triacylglycérols / stérols (TAG/ST)] au cours du développement larvaire de *C. gigas*. Dans chacune des expérimentations, les larves sont distribuées, à raison de 5 larves ml<sup>-1</sup>, dans deux bacs de 150 L, considérés comme des témoins de référence et destinés au suivi du développement larvaire (croissance et survie), du fait de la constance de la densité larvaire tout au long du cycle. Deux autres bacs de 450 L, ont servi aux prélèvements biochimiques (TAG/ST et MO/PS) nécessitant un grand nombre de larves ainsi qu'à l'étude de la métamorphose. Des prélèvements pour la croissance y ont été effectués aussi aux septième, quatorzième jours et en fin du développement afin de valider les données de croissance relevées dans les bacs de 150L.

### *2.1.4.2. Élevages non standardisés*

Afin de vérifier la pertinence des indices choisis, différentes expérimentations, où variaient un ou plusieurs paramètres d'élevage, ont été réalisées en 2005 et 2006.

#### *2.1.4.2.1. Incidence de la température*

L'influence de la température d'élevage sur les performances larvaires et l'évolution des indices physiologiques (MO/PS, aire lipidique totale et TAG/ST) a été recherchée chez les larves de *C. gigas*, élevées en flux ouvert. Les individus étaient distribués, à la densité de 30 larves ml<sup>-1</sup>, dans quatre bacs de 150 L, à 18, 22, 28 et 32 °C. Ces températures ont été maintenues constantes tout le long de l'élevage grâce à des vannes thermiques automatiques. Au cours de l'expérimentation, le régime nutritionnel, composé d'un mélange bispécifique standard (TCp), est distribué continuellement aux larves de façon à obtenir un environnement nutritionnel stable autour de chaque larve (15 cellules µl<sup>-1</sup>).

### 2.1.4.2.2. Incidence de la qualité nutritionnelle : régimes trophiques mono et plurispécifiques

L'influence de chaque espèce de microalgues ainsi que leur assemblage deux à deux a été testée sur les performances d'élevage larvaire et la mise en place des réserves lipidiques. Les élevages ont été conduits en séquentiel, dans des bacs de 30 L, en triplicata et à raison de 5 larves ml<sup>-1</sup>. Les individus ont été alimentés sur la base de régimes monospécifiques composés de *Pavlova lutheri* : CCAP 931/1 (P), d'*Isochrysis affinis galbana* : CCAP 928/14 (T) et de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* : CCAP 1010/05 (Cp) et bispécifiques (PT, PCp, TCp). Une série de larves soumises à jeun pendant toute l'expérimentation et un autre lot alimenté sur le régime standard trispécifique PTCp ont été ajoutés.

### 2.1.4.2.3. Incidence de la charge phytoplanctonique : régime TCp

L'impact de la quantité de nourriture sur le développement larvaire, la métamorphose et l'évolution des indices physiologiques (MO/PS, aire lipidique totale et TAG/ST) a été recherché chez les larves de *C. gigas*, élevées en séquentiel. L'expérimentation s'est déroulée dans trois bacs de 150 L (témoins de référence) et trois bacs de 450 L (pour les prélèvements biochimiques, suivi de la compétence et des taux de métamorphose). Les paramètres d'élevage étaient similaires à ceux maintenus en conditions standardisées excepté l'alimentation des larves où trois niveaux de régimes trophiques étaient imposés aux larves (tableau 1).

Charge trophique	Nombre de cellules distribuées aux larves (cell $\mu\text{l}^{-1} \text{j}^{-1}$ )		
	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3
Faible	25	50	100
Moyenne (standard)	50	100	200
Forte	100	200	400

**Tableau 1 : concentrations phytoplanctoniques (en nombre de cellules  $\mu\text{l}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) administrées aux larves au cours de l'élevage.**



2.1.4.2.4. Incidence du jeûne sur la gestion des réserves lipidiques

L'influence du jeûne sur les performances d'élevage et la gestion des réserves lipidiques a été recherchée chez les larves de *C. gigas*, élevées en séquentiel. Pour ce faire, quatre séries expérimentales ont été conduites durant lesquelles des jeûnes d'une durée de quatre jours ont été appliqués aux élevages à différentes périodes de leur vie larvaire (tableau 2), au bout desquels les larves ont été ensuite réalimentées. Des témoins négatifs (non alimentés) et positifs (recevant la ration de référence TCp tout au long de l'élevage) ont été mis en place. Au total sept périodes ont été expérimentées en triplicata, dans des bacs de 30 L. En dehors des périodes de jeûne, les larves ont été alimentées avec *I. affinis galbana*, *C. calcitrans* forma *pumilum* 50/50 en équivalent volume, en fonction de leurs besoins quotidiens. La survie, la croissance, la compétence et le taux de métamorphose étaient estimés parallèlement à l'évolution des indices physiologiques (MO/PS et/ou aire lipidique totale et/ou TAG/ST).

Jours Conditions	2	3	4	5	6	8	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	18	19	20	21
Nourries (TCp)																				
Jeûne permanent																				
Jeûne J2J6																				
Jeûne J6J10																				
Jeûne J10J14																				
Jeûne J14J18																				
Jeûne J18JF																				

Tableau 2 : protocole expérimental du jeûne imposé à différentes périodes du cycle larvaire de *C. gigas*.

2.1.4.2.5. Incidence de la technique de production phytoplanctonique et larvaire

L'incidence combinée de la technique de culture phytoplanctonique (batch en ballon de 6 L ou cylindre de 300 L selon des méthodes classiques à Argenton vs continu en photobioréacteurs de 18 L (Bougaran *et al.*, 2003)) et de la technique d'élevage larvaire

(séquentiel vs flux ouvert) sur les performances d'élevage et les indices de condition a été recherchée chez les larves de *C. gigas*. Pour ce faire, cinq séries expérimentales, ayant trois objectifs, ont été conduites. Trois régimes alimentaires ont alors été testés.



Figure 6 : cultures en continu d'*Isochrysis affinis galbana* en photobioréacteurs de 18 L.

### 2.1.4.2.5.1. Incidence d'une alimentation monospécifique : *Isochrysis affinis galbana* (T)

Deux séries expérimentales ont été conduites. La première Gig0605 (ponte du 05 avril 2006) a porté sur l'influence d'*I. affinis galbana* (T) produit en batch en cylindres et en continu en photobioréacteurs de 18 L sur des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel et en flux ouvert. En ce qui concerne la production en continu et afin d'obtenir deux types potentiels de nourriture (culture jeune et culture âgée), deux taux de renouvellement ont été appliqués aux cultures : un renouvellement total journalier (100 %) et un renouvellement partiel (20 %). Un témoin négatif a été maintenu à jeun tandis que le témoin positif, conduit en séquentiel, a reçu la ration de référence TCp (*I. affinis galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*), produite en batch. Une panne électrique a entraîné l'arrêt des productions phytoplanctoniques en photobioréacteurs et cette première expérimentation n'a donc pu être conduite au delà du seizième jour d'élevage larvaire. Une deuxième expérimentation a donc été réalisée. Elle concernait une ponte du 10 mai 2006 (Gig0606) et comportait le même dispositif expérimental.

### 2.1.4.2.5.2. Incidence d'une alimentation monospécifique : *Chaetoceros gracilis* (C)

Deux expérimentations ont été conduites : Gig0610 (ponte du 16 octobre 2006) et Gig0611 (ponte du 15 novembre 2006). Cependant, en raison de la relative grande taille de cette microalgue ( $80 \mu\text{m}^3$ ) et donc une difficile ingestion par des jeunes larves D, les animaux ont été nourris sur un régime standard TCp en 450 L la première semaine, au cours de laquelle, *C. gracilis* a été substituée par une diatomée de petite taille (*C. calcitrans* forma *pumilum*,  $40 \mu\text{m}^3$ , taille équivalente à celle de *t. Iso*). Au-delà, les larves ont été réparties en 30 ou 150 L et n'ont reçu alors que la seule *C. gracilis*. Là encore des témoins négatif (non alimenté) et positif (recevant la ration de référence TCp tout au long de l'élevage) ont été utilisés. Un deuxième témoin positif recevant dès le début de l'élevage la seule *C. gracilis* en batch (cylindre) a été mis en place.

### 2.1.4.2.5.3. Incidence d'une alimentation bispécifique (TC)

Le troisième objectif portait sur l'influence d'une alimentation bispécifique (TC) produite en batch en cylindre et en continu en photobioréacteurs de 18 L sur des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel et en flux ouvert. Pour cela, un élevage a été effectué le 11 septembre 2006 (Gig0609). Un témoin négatif a été maintenu à jeun durant toute la période d'élevage tandis que le témoin positif conduit en séquentiel a reçu la ration de référence, TCp (*I affinis galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*) produite en batch.

Dans chacune des expérimentations, les larves ont été élevées à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , à la densité de 5 individus  $\text{ml}^{-1}$ , selon deux techniques d'élevage :

° le séquentiel, avec changement d'eau tous les deux jours et nourriture apportée une fois par jour à raison de 50 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$  d'eau d'élevage la première semaine et 100 cellules ultérieurement.

° en flux ouvert, avec nettoyage des structures d'élevage une fois par semaine, où eau et nourriture ont été apportées en continu afin de maintenir en permanence un environnement nutritionnel de 30-40 cellules autour de chaque larve.

Afin de favoriser le brassage dans la colonne d'eau, un débit d'air a été maintenu à  $0,1 \text{ L min}^{-1}$ . Aucun ajout d'antibiotique n'a été effectué. Les élevages ont été conduits en duplicata en bacs cylindro-coniques de 30 et 150 L, ce dernier autorisant un suivi biochimique. Des

## Matériels et méthodes

prélèvements de larves ont été opérés, tous les deux jours, pour l'acquisition de la longueur en analyse d'images, de la mortalité par dénombrement des larves translucides au projecteur de profil et de leur qualité à travers leur réserve lipidique au moyen d'un indice colorimétrique ou une fois par semaine pour leur état physiologique à travers la détermination du ratio triacylglycérols / stérols.

Élevages	Date de la ponte	Objectifs de l'expérimentation
Gig0404	24/03/2004	Évolution des indices de condition au cours du développement larvaire de <i>Crassostrea gigas</i> en <b>conditions standardisées</b> (séquentiel)
Gig0405	26/04/2004	
Gig0406	26/05/2004	
Gig0408	12/08/2004	
Gig0408	28/08/2004	
Gig0409	25/08/2004	
Gig0503	14/03/2005	
Gig0606	12/05/2006	
Gig0504	11/04/2005	Influence de la <b>ration alimentaire</b> : fort, moyen et bas régime (séquentiel)
Gig0505	09/05/2005	Influence de la <b>température</b> d'élevage : 18, 22, 28 et 32 °C (flux ouvert)
Gig0505 (bis)	09/05/2005	Influence du <b>régime nutritionnel</b> sur les performances d'élevage larvaire et la gestion des réserves lipidiques (séquentiel)
Gig0504 (bis)	11/04/2005	Influence du <b>jeûne</b> sur le développement larvaire, la métamorphose et la gestion des réserves lipidiques (séquentiel)
Gig0508	12/09/2005	
Gig0510	19/10/2005	
Gig0608	20/06/2006	
Gig0605	05/04/2006	Effet combiné de la technique d'élevage larvaire et de la production phytoplanctonique : <b>régime monospécifique de type Haptophycée</b>
Gig0606 (bis)	12/05/2006	
Gig0610	16/10/2006	Effet combiné de la technique d'élevage larvaire et de la production phytoplanctonique : <b>régime monospécifique de type Diatomophycée</b>
Gig0611	15/11/2006	
Gig0609	11/09/2006	Effet combiné de la technique d'élevage larvaire et de la production phytoplanctonique: <b>régime bispécifique</b>

Tableau 3 : récapitulatif des différentes expérimentations conduites de 2004 à 2006.

### 2.2. Descripteurs d'élevages larvaires : performances larvaires

#### 2.2.1. Développement larvaire : croissance et survie

À chaque renouvellement d'eau, les larves sont récupérées par vidange et remises en suspension dans une éprouvette de 1 ou 2 L suivant leur abondance (figure 7). Après homogénéisation, trois aliquotes de 100  $\mu$ l sont prélevés afin d'avoir une estimation moyenne du nombre des larves vivantes et mortes à l'aide d'un projecteur de profil Nikon ou sous une loupe binoculaire. Par ailleurs, 200 à 300 larves sont régulièrement échantillonnées tous les deux jours et fixées avec une goutte de formol à 5 % dans une microplaque cellulaire, de 24 puits, pour la détermination de la croissance larvaire au cours du temps. Pour chaque puits, la totalité de la population est photographiée à l'aide du logiciel Win Imager sous microscope inversé (Olympus, type IMT-2), en évitant toutefois le recouvrement photographique. Les photographies réalisées sont traitées en analyse d'images par le logiciel Imaq Vision Builder version 6.0 permettant la détermination de la longueur de chaque objet. L'ensemble des données est reporté dans un fichier Excel.

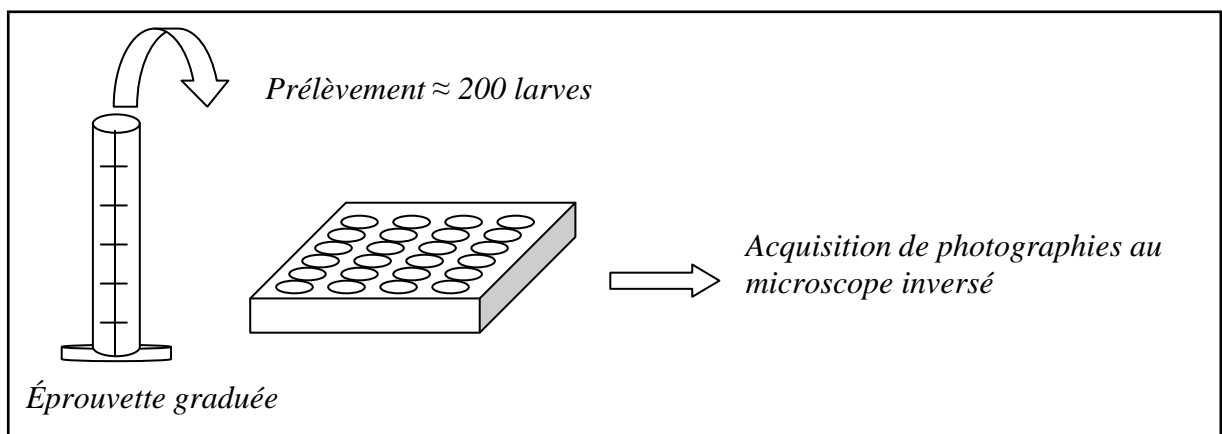
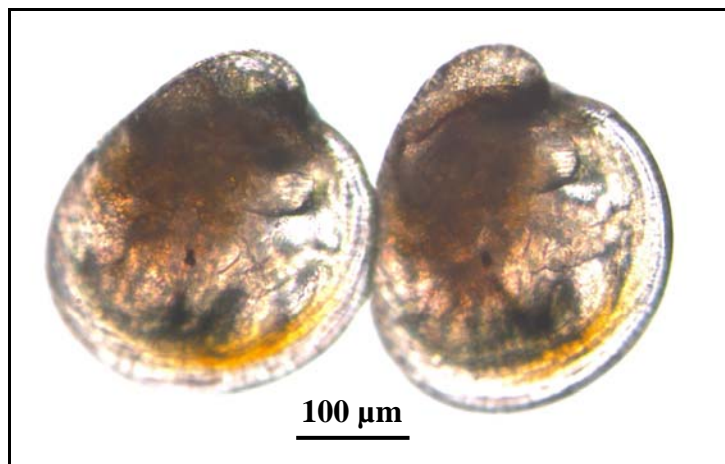


Figure 7 : prélèvement des larves et stockage dans des microplaques cellulaires de 24 puits pour la détermination de la croissance.

#### 2.2.2. Taux de compétence

Vers la fin de la vie larvaire, pour une taille avoisinant 240-250  $\mu$ m, apparaît chez *C. gigas* une paire d'yeux au milieu des valves (Marteil *et al.*, 1989), formant une tache pigmentée de 14  $\mu$ m de diamètre (Jones et Jones, 1988 ; Holiday *et al.*, 1991), située

dorsalement par rapport aux insertions des muscles adducteurs (Wilson, 1981). Simultanément, les larves prennent une teinte rouille (Marteil *et al.*, 1989). Ces caractères phénotypiques annoncent la fin de la vie pélagique et prédisent l'imminence de la métamorphose. A ce stade, vers le 16-18<sup>e</sup> jour dans nos conditions expérimentales, les larves sont dites pédivéligères "oeillées" (figure 8) et sont considérées comme compétentes c'est à dire aptes à se fixer et à se métamorphoser. Le taux de compétence correspond alors au nombre de larves oeillées par rapport au nombre total des larves présentes. Si les larves n'atteignent pas ce stade, le taux de fixation sera faible, sinon nul dans les jours qui suivent.



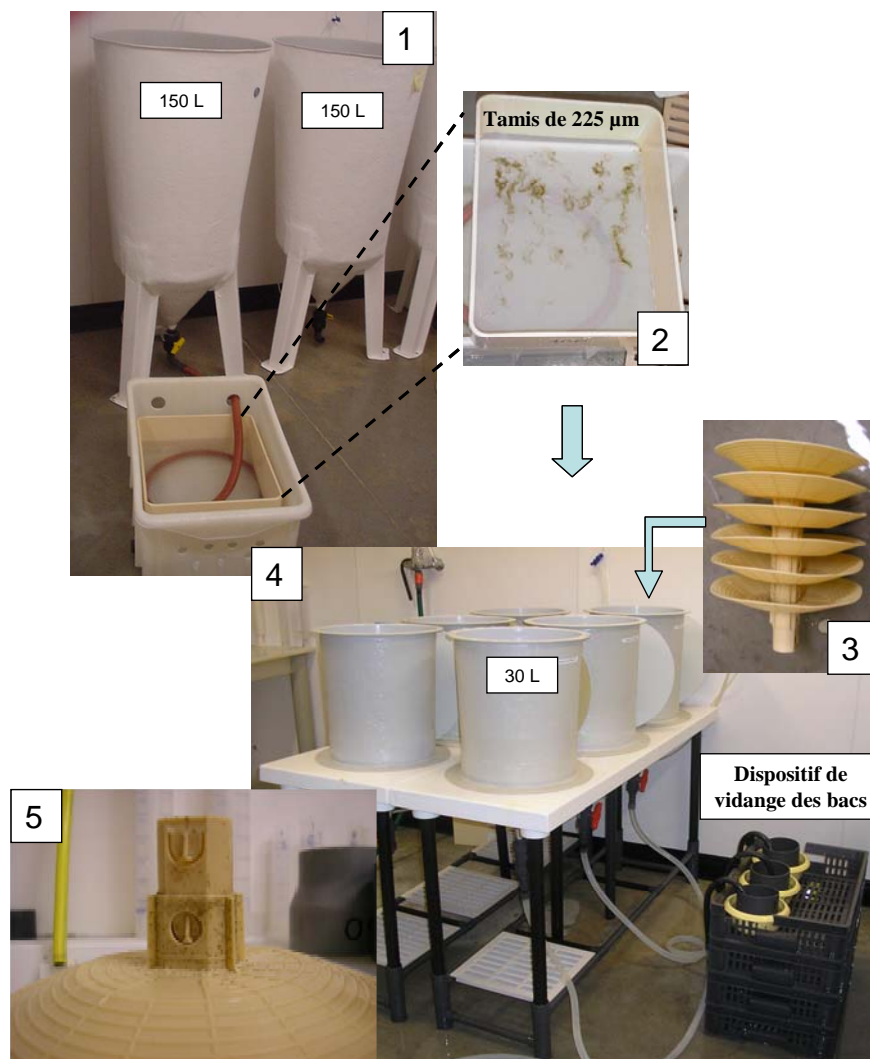
**Figure 8:** larves oeillées de 18 jours ; To : tache ocellaire.

### 2.2.3. Taux de métamorphose

Si environ la moitié de la population est constituée de pédivéligères oeillées, un tamisage sélectif est opéré moyennant un tamis de maille carrée de 225  $\mu\text{m}$  retenant ainsi les larves de longueur supérieure ou égale à 320  $\mu\text{m}$  (figure 9). Celles-ci sont remises en suspension, à raison de deux pédivéligères  $\text{ml}^{-1}$ , dans des bacs de 30 L dans lesquels des coupelles en plastique de 15 cm de diamètre sont introduites (figure 9). Les conditions d'élevage sont similaires à celles maintenues pour le développement larvaire. Au bout de cinq jours, le taux de métamorphose est calculé indirectement par estimation du nombre de larves restantes. Parallèlement, des essais d'induction de la métamorphose par l'épinéphrine ont été effectués. Cette substance est supposée la déclencher directement sans fixation préalable (Coon *et al.*, 1986 ; Beiras et Widdows, 1995) et permet donc de déterminer le taux de métamorphose par comptage direct des post larves. Pour cela, une solution mère est préalablement préparée en mélangeant 0,2 g d'épinéphrine dans un litre d'eau distillée et 0,4

## Matériels et méthodes

ml d'acide chlorhydrique concentré (32-33 %). La dilution de 100 ml de la solution mère dans 900 ml d'eau de mer filtrée est effectuée dans trois béciers de 5 L. Les larves sont aussitôt remises en suspension, à raison de deux pédivéligères  $\text{ml}^{-1}$  (10 000 larves par bécier). Après homogénéisation douce et temps de contact de 6 à 8 heures (impérativement dans l'obscurité pour éviter l'oxydation de l'épinéphrine), l'élevage est complété à 5 L. La température de l'eau est maintenue à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  et les béciers sont couverts avec du papier aluminium afin d'éviter toute évaporation. L'eau de mer est changée tous les deux jours. Au bout de cinq jours, les larves métamorphosées sont dénombrées. Néanmoins, la confrontation des résultats des deux méthodes a montré des taux de métamorphose différents. En effet, la méthode du comptage direct des post larves s'est révélée de moindre efficacité en raison de la fixation des individus au fond et sur les parois des béciers malgré l'application de l'épinéphrine, biaisant ainsi le résultat. De ce fait, seuls les résultats de l'estimation indirecte (méthode classique et couramment utilisée dans les écloséries) seront présentés dans cette étude.



**Figure 9:** récupération de larves oeillées sur un tamis de 225  $\mu\text{m}$  (1 et 2) et redistribution dans des bacs de 30 L (4), après ajout de collecteurs (3 : coupelles en plastique). A l'issue de cinq jours, le taux de métamorphose est estimé par comptage indirect du nombre de larves restantes. Le naissain peut être fixé sur les parois des bacs mais se trouve préférentiellement sur les coupelles (5).

## 2.3. Indices de qualité larvaire

### 2.3.1. Indice lipidique global

#### 2.3.1.1. Colorimétrie : mise en évidence des réserves lipidiques

Afin de mettre en évidence les réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas*, une série de tests de coloration lipo-spécifique a été réalisée, dans un premier temps, avec l'Oil Red O, (Sigma, C.I. 26125 - Gallager et Mann, 1981, 1986). Différents solvants vecteurs, temps de coloration et état préalable des larves ont été testés. Pour chaque solvant, une quantité de 0,85 g d'ORO a été dissoute dans 100 ml. La solution est portée à 60 °C, filtrée sur papier filtre plat Whatman (150 mm de diamètre). Les différents essais sont récapitulés dans le tableau 4.

Solvants	État préalable des larves	Opérations réalisées	Durée (min)
Éthylène Glycol (EG)	Fraîches	Culot de larves + 1ml ORO / EG	2, 5, 15, 30, 60 et 120
	Formolées Trempées dans l'EG Narcotisées (MgCl <sub>2</sub> à 8,5 %)	Retirer le surnageant à la pipette après sédimentation des larves et rinçage (x 3) avec 1 ml d'Éthylène Glycol	30 (x 3)
Diméthyl Sulfoxyde (DMSO)	Fraîches	Culot de larves + 1ml ORO / DMSO	2, 5, 15, 30, 60 et 120
	Formolées Trempées dans l'EG Narcotisées (MgCl <sub>2</sub> à 8,5 %)	Retirer le surnageant à la pipette après sédimentation des larves et rinçage (x 3) avec 1 ml d'Éthylène Glycol	30 (x 3)
Acétone	Fraîches	1 ml de suspension larvaire + 5 ml d'acétone + 2 ml ORO / Acétone	30
	Congelées dans de l'eau de mer filtrée	Enlever le surnageant, rinçage avec 10 ml d'eau de mer filtrée (x 4)	20 (x4)

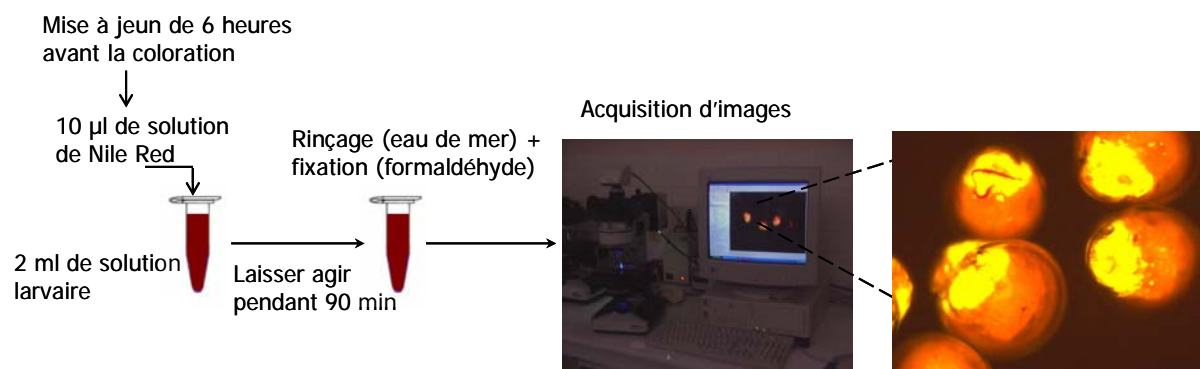
**Tableau 4:** récapitulation des essais de coloration spécifique des lipides sur des larves de *C. gigas* effectués à l'Oil Red O.

Étant donné l'échec de ces différentes techniques de coloration (absence totale de coloration ou excessive : toute la larve), une méthode fluorimétrique a été mise en place en utilisant le Nile Red ou Rouge du Nil (Sigma, Nile Blue A Oxazone) avec l'acétone comme solvant vecteur (250 µg ml<sup>-1</sup>). Il s'agit d'un colorant spécifique des lipides neutres (Greenspan



## Matériels et méthodes

et Fowler, 1985) qui fluorescent en jaune or après excitation. Le protocole utilisé a été initialement développé par Castell et Mann (1994) sur des larves de *C. virginica*. Avant coloration, les larves sont mises à jeun, pendant au moins six heures afin de minimiser les interférences avec les lipides provenant des algues non digérées (figure 10). Elles sont ensuite transférées dans des tubes Eppendorf contenant 2 ml d'eau de mer filtrée auxquels on ajoute 10 µl de solution de Nile Red. Après homogénéisation, le mélange est mis au repos pendant 90 min, période au bout de laquelle, un rinçage à l'eau de mer filtrée et une fixation au formaldéhyde pendant 5 min ont été effectués. Les larves sont observées sous microscope droit à épi fluorescence (Laborlux Leica), équipé d'une lampe à vapeur de mercure HBO 50 W / AC et d'un block de filtres I3 pour illuminateur PLOEMOPAK (filtre d'excitation à bande passante 450-490 nm). L'objectif utilisé est un Leica NPL 10/0.25. Les photographies sont acquises par une caméra couleur (Leica DFC320) dans les quatre heures suivant la coloration afin d'éviter toute dégradation de la fluorescence.

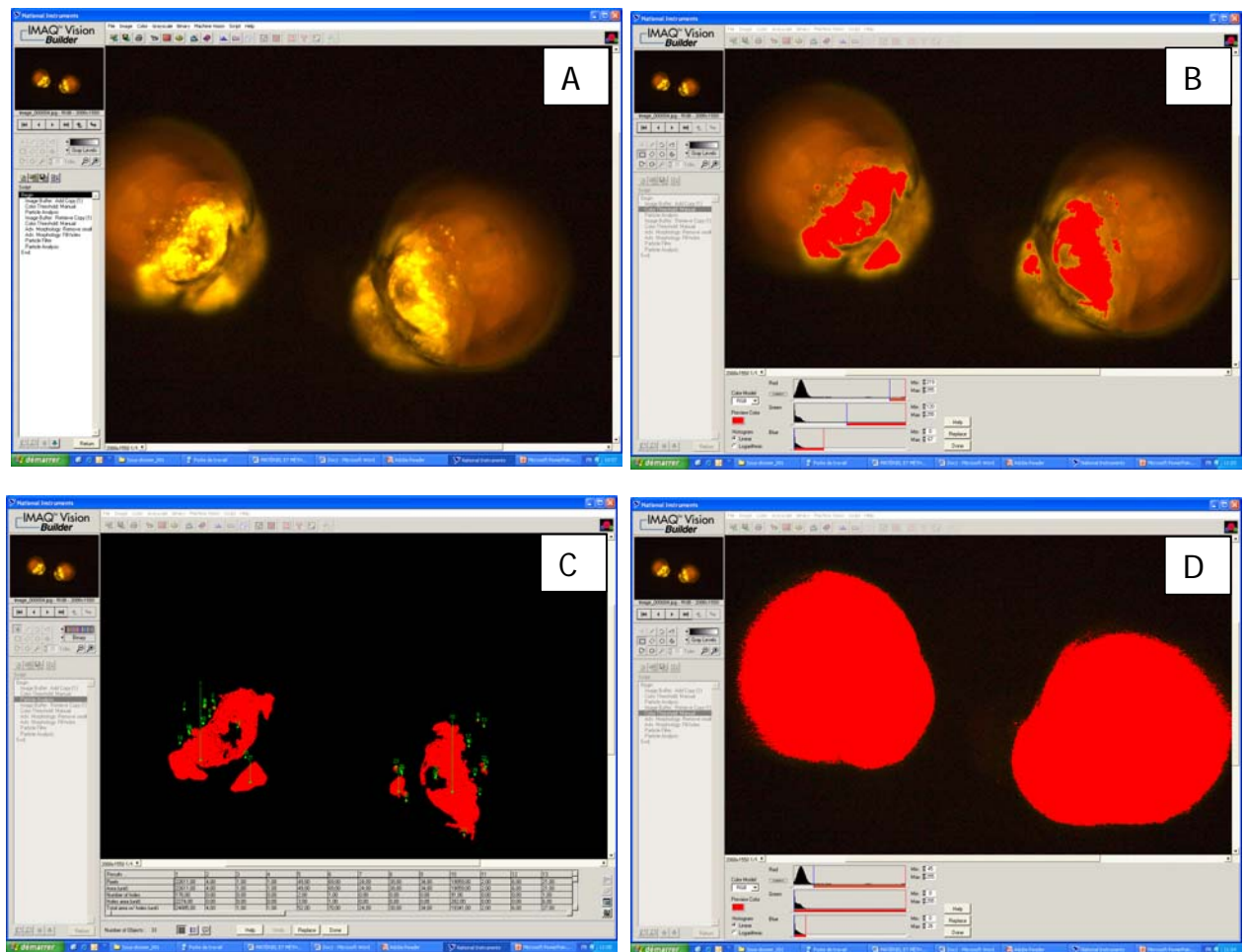


**Figure 10 : protocole de coloration lipo spécifique par le Nile Red.**

Dans l'optique de vérifier la spécificité de ce colorant vis-à-vis des lipides, des essais colorimétriques préliminaires ont été opérés sur larves nourries, larves mises à jeun pendant cinq jours et larves ayant subi une extraction lipidique au Folch (chloroforme / méthanol (2 : 1)). Parallèlement et afin de valider certains aspects du protocole, des essais ont été appliqués concernant le temps de coloration (30 min, 60 min et 90 min), la nécessité du jeûne avant la coloration, la conservation des échantillons pour une analyse ultérieure (dans de l'eau de mer et dans du formiate d'ammonium).

### 2.3.1.2. Analyse d'images

Les photographies acquises sont ensuite traitées en analyse d'images par le logiciel Imaq Vision Builder version 6, doté d'une fonction de traitement par lots. Au final, un rapport de la surface de l'image occupée par les lipides à la surface totale de la larve est déterminé (figure 11).



**Figure 11 : les différentes étapes de l'analyse d'images avec le logiciel IMAQ Vision Builder (National Instrument).** A : ouverture du fichier contenant les photographies prises par la caméra couleur Leica, B : ajustement des niveaux de gris correspondant à la surface lipidique mise en évidence par le Rouge du Nil, C : calcul automatique des aires lipidiques sélectionnées en pixels, D : ajustement des niveaux de gris correspondant à la surface totale de la larve et détermination de cette aire en pixels.

### 2.3.2. Indice de condition larvaire : matière organique relative (MO/PS)

Un échantillonnage a été effectué tous les deux jours en récupérant un nombre déterminé de larves N (tableau 5) sur un tamis de 40 µm. Afin de confirmer les résultats obtenus, un deuxième prélèvement est effectué à chaque fois. Les échantillons, réalisés ainsi en duplicata, ont été rincés avec une solution isotonique aqueuse de formiate d'ammonium (32 g l<sup>-1</sup>). Après transfert dans des tubes à hémolyse, le surnageant d'eau de mer a été retiré à la pipette après sédimentation des larves. Les échantillons ont été conservés à - 20 °C jusqu'à utilisation. Juste avant les pesées, les larves ont été remises en suspension dans 10 ml de formiate d'ammonium et centrifugées pendant 10 minutes à 2000 tours min<sup>-1</sup>. Le surnageant a été soigneusement aspiré en préservant le culot. L'opération est répétée trois fois. Chaque culot a été placé dans une coupelle en aluminium, préalablement brûlée dans un four à 460 °C pendant 4 heures, tarée (P1) sur une microbalance (Sartorius, type CP225 D) précise au 10 µg (0,01 mg à 1 g) près et stockée dans un dessiccateur jusqu'à utilisation. La série d'échantillons a été ensuite placée dans une étuve à 65 °C pendant 48 heures avant d'être pesée (P2). Le poids sec (PS) par larve a été déterminé selon la formule suivante :

$$PS = (P2 - P1) / N.$$

La matière sèche a été ensuite brûlée dans un four à 460 °C pendant 4 h, la matière minérale (MM) restante pesée et la matière organique calculée par différence. Le poids organique (PO) par larve est calculé comme suit :

$$PO = (PS - MM) / N.$$

Jours après fécondation	2	5	8	9	12	14	16	19
Nombre de larves prélevées	2 millions	500 000	100 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000

Tableau 5 : nombre de larves prélevées pour la détermination de la biomasse larvaire.

### 2.3.3. Indice biochimique structurel (triacylglycérols / stérols : TAG/ST)

Le même protocole adopté pour la détermination de la biomasse larvaire a été réalisé dans le cadre de la détermination des teneurs des triacylglycérols et des stérols. Un échantillonnage a été effectué tous les deux jours par prélèvement d'un nombre déterminé de larves (tableau 6). Ces dernières sont collectées sur un filtre GF/C préalablement brûlé à 450

## Matériels et méthodes

---

°C et transférées dans des tubes de 6 ml remplis de liquide de Folch (chloroforme / méthanol (2 : 1)). Les échantillons ont été conservés à - 20 °C jusqu'à utilisation.

Jours après fécondation	2	5	8	9	12	14	16	19
Nombre de larves prélevées	200 000	200 000	100 000	50 000	50 000	50 000	50 000	50 000

**Tableau 6 : nombre de larves prélevées pour la détermination des teneurs des triacylglycérols (TAG) et des stérols (ST).**

Juste avant analyse, tous les échantillons ont été exposés à l'ultrason et centrifugés pendant 10 min à 1200 tours min<sup>-1</sup>. Certains échantillons ont nécessité une concentration préalable. Pour ce faire, 1 ml de solution a été prélevé à partir de l'échantillon à concentrer et laissé sécher au contact d'une source d'azote pour éviter l'oxydation des lipides. Les tubes ont été ensuite complétés avec un volume précis de liquide de Folch, selon la concentration désirée.

L'utilisation d'un standard est nécessaire afin de quantifier les classes de lipides des échantillons. Le mélange de standard utilisé est composé de :

- Triglycérides : 80,2 mg d'huile de menhaden / 5ml de Folch
- Stérols : 25 mg de Cholestérol / 5ml de Folch
- Alcools : 4,68 mg de 18 :1 OH 95 % / 5ml de Folch
- Esters de stérol: 42,3 mg de cholesteryl ester dans 5ml de Folch
- Acides gras libres : 2 mg de 18 :1 dans 5ml de Folch

Le standard conservé au congélateur dans des tubes de 100 µl a été dilué 15 fois dans du liquide de Folch au moment du dosage.

La plaque de silice (10 x 20 cm) a été nettoyée par un mélange hexane-diéthyl éther (1 : 1) et séchée sur une plaque chauffante pendant une demi-heure à 120 °C pour activer la silice. Cette procédure permet d'éliminer toute trace d'humidité susceptible de fausser la chromatographie. Parallèlement, les deux cuves à développement ont été mises à saturation. Pour cela, après préparation extemporanée, 30 ml d'un mélange hexane-diéthyl éther-acide acétique (20 : 5 : 0,5) ont été versés dans la première cuve et 30 ml d'un deuxième mélange hexane-diéthyl éther (98 : 3) dans la seconde. Dans chaque cuve, un papier buvard a été placé

afin de saturer la cuve en vapeur de solvant. Les deux mélanges constituent la phase mobile, alors que la silice de la plaque est la phase stationnaire.

Les échantillons à analyser ont été déposés sur la plaque de verre sous forme de spray au moyen d'un échantillonneur CAMAG (TLC Sampler 4). La plaque a été ensuite placée successivement dans les deux cuves, côté verre contre la paroi, afin de faire migrer les classes lipidiques en fonction de leur polarité. La première cuve permet de faire migrer rapidement les composés les plus apolaires tels que les esters de stérols mélangés aux cires, les glycérides éthers, les triglycérides puis de décrocher les composés plus polaires tels que les acides gras libres, les stérols ou les alcools. La deuxième cuve permet essentiellement de mieux séparer, grâce à l'hexane, les esters de stérols et les cires ayant migré simultanément dans la première cuve du fait de leur proche polarité. La plaque a été ensuite trempée, après séchage, dans un bain révélateur composé de sulfate de cuivre 3 % et d'acide ortho-phosphorique 8 % et chauffée à 160 °C pendant 20 min. Pour chaque échantillon, des taches noires de densité et de surface différentes, correspondant aux différentes classes lipidiques, ont été révélées. La lecture a été enfin réalisée à l'aide du scanner (CAMAG, TLC Scanner 3) à une densité optique de 380 nm.

Connaissant les distances de migration et les quantités de chaque classe du standard, les classes figurant dans l'échantillon ont été identifiées et quantifiées. Les aires et les intensités des taches apparues ont été intégrées grâce au logiciel «Wincats». Les résultats obtenus, sous forme de pourcentage de surface, ont été transférés vers un fichier Excel.

## **2.4. Composition biochimique des microalgues**

### **2.4.1. Détermination du poids sec**

Un volume de 50 ml de microalgues a été centrifugé à 3 000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 min. Le culot a été repris dans une solution de formiate d'ammonium (35 ‰) et centrifugé à nouveau avant d'être transféré dans une nacelle tarée. Après séchage à l'étuve (100 °C, 24h), le poids sec a été obtenu par une nouvelle pesée. Toutes les pesées ont été effectuées avec une microbalance Sartorius, type CP225 D, précise au 10 µg.

### 2.4.2. Analyse des protéines, lipides et glucides

Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1958). Ils ont été ensuite récupérés dans des nacelles en téflon préalablement tarées et pesées, après évaporation du dichlorométhane à l'étuve à 40 °C sur microbalance électronique Mettler type M3. Les glucides totaux ont été dosés selon la méthode colorimétrique de Dubois *et al.* (1956) tandis que les protéines totales ont été déterminées par la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951).

### 2.4.3. Analyse des acides gras et des stérols

L'analyse des lipides a été effectuée selon le schéma ci-dessous. L'extrait lipidique a été séparé en ses constituants neutre, polaire et glycolipides. Les acides gras et les stérols ont été analysés dans chacune de ces fractions.

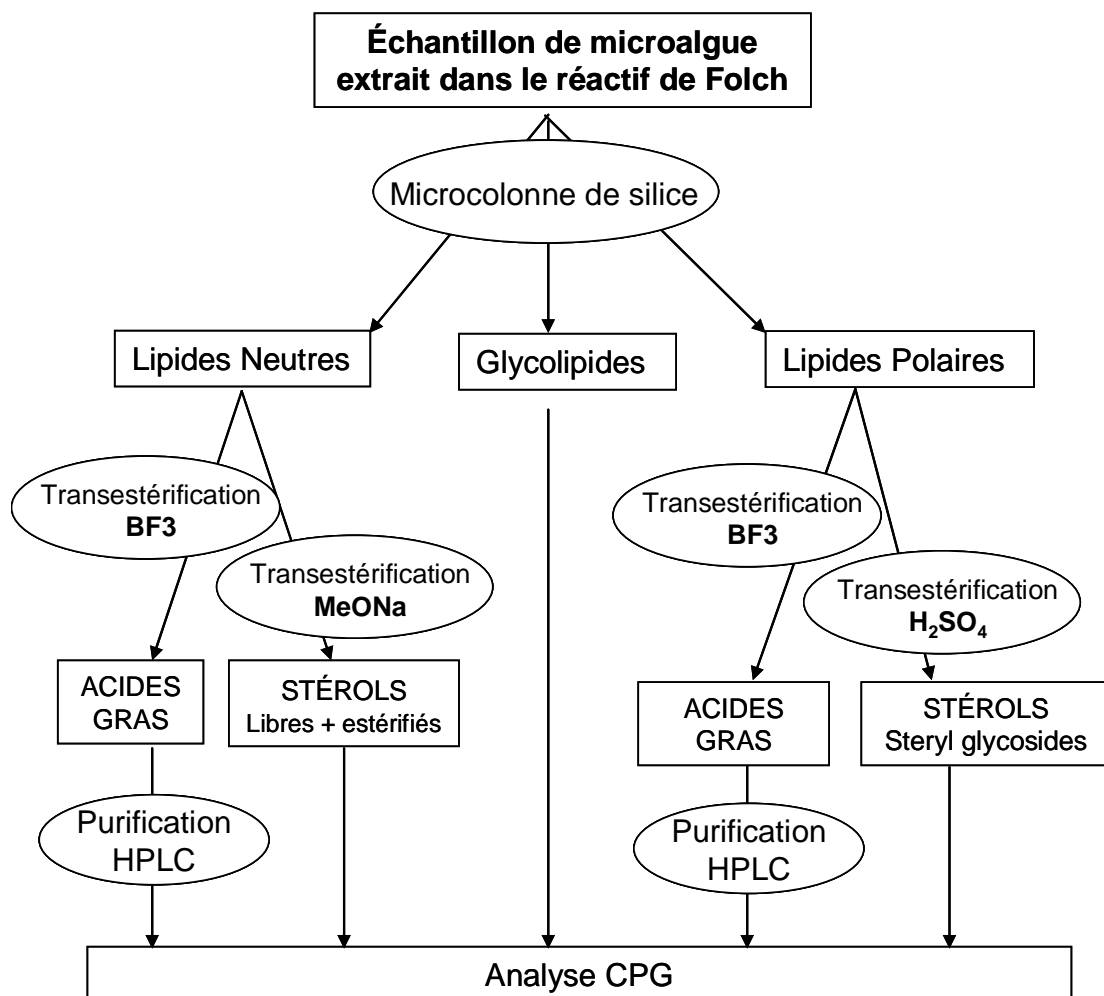


Figure 12 : schéma général d'analyse des lipides dans les microalgues.

Les microalgues (200 à 300 millions de cellules selon l'espèce) ont été collectées sur un filtre Whatman GFF (0,8  $\mu\text{m}$ ) préalablement brûlé à 450 °C. Celui-ci était ensuite immergé dans 6 ml de réactif de Folch (Chloroforme / Méthanol 2 : 1) et conservé au congélateur à - 20 °C pour analyse ultérieure.

La séparation lipidique a été effectuée sur une micro colonne de silice dans une pipette Pasteur. Tout le matériel utilisé (silice, laine de verre, pipette, etc.) était préalablement brûlé à 450 °C afin d'éliminer toute trace de matière organique. Une partie de l'échantillon (2 ml) a été évaporée à sec, reprise trois fois dans 500  $\mu\text{l}$  de Chloroforme / Méthanol (98 : 2) et déposée en tête de colonne. Les lipides neutres ont été élués par 10 ml de mélange Chloroforme / Méthanol (98 : 2) et les polaires par 15 ml de MeOH. La fraction glycolipidique a été extraite par 10 ml d'acétone. Dans chacune des fractions ont été ajoutés 2,3  $\mu\text{g}$  de C23 : 0 à 0,23  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , comme étalon interne des acides gras et 2,3  $\mu\text{g}$  de cholestane comme étalon interne des stérols. Les fractions récupérées ont été scindées en deux parties pour l'analyse des acides gras et des stérols. Pour chacune des fractions, une transestérification a été réalisée afin de transformer les lipides complexes (triglycérides, phospholipides, esters de stérols, cires, steryl glycosides, etc.) en stérols libres et esters méthyliques d'acides gras. Différents types de transestérification ont été appliqués pour prendre en compte la stabilité chimique des liaisons impliquées dans les différents lipides complexes et conserver l'intégrité des molécules à analyser.

**Concernant les acides gras**, une transestérification acide au  $\text{BF}_3$  à 100 °C a été réalisée au niveau des lipides neutres et polaires. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) étant ensuite solubilisés dans de l'hexane (Marty, 1986). Une purification en HPLC a été effectuée sur l'échantillon transestérifié afin d'éliminer l'insaponifiable pouvant perturber l'analyse. Celle-ci a été effectuée en chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur une colonne DB wax (SGE) de 30 m sous gaz vecteur hydrogène avec un gradient de température de 60 à 250 °C. Cette méthode permet de séparer 80 acides gras. L'injection se fait automatiquement par la méthode "on column" et la détection par FID. Les acides gras ont été calculés par rapport à l'étalon interne (C23).

**Pour les stérols**, une transestérification basique au méthoxyde de Sodium ( $\text{MeONa}$ ) à froid a été opérée dans les lipides neutres, le  $\text{BF}_3$  détruisant certains phytostérols, particulièrement le 24 méthylène cholestérol. Dans les lipides polaires, il est nécessaire de faire une transméthylation acide plus douce à l'acide sulfurique à 50 °C de façon à casser la liaison stérol-sucre des steryl glycosides. Dans ces deux protocoles, les stérols libres ainsi obtenus ont

été solubilisés dans de l'hexane. L'analyse a été réalisée en CPG sur une colonne Restek RTX65 de 15 m sous gaz vecteur hydrogène avec un gradient de température de 60 à 280 °C. Cette méthode permet de séparer 15 phytostérols. Ceux-ci ont été déterminés par spectrométrie de masse et identifiés par leur temps de rétention. L'injection se fait automatiquement par la méthode « on column » et la détection par FID. Les stérols ont été calculés par rapport à l'étalon interne (cholestane).

### Nomenclature

**Les acides gras** sont nommés en utilisant le nombre de carbones, le nombre de doubles liaisons et l'emplacement de la première double liaison comptée à partir du méthyle terminal. Ainsi, le 22 : 6 (n-3) est un acide gras à 22 carbones avec 6 doubles liaisons, la première étant à 3 carbones du méthyle terminal. On distingue dans les insaturés plusieurs acides gras essentiels pour la croissance et la reproduction des mollusques :

22 : 6 (n-3) = DHA, acide docosahexanoïque

20 : 5 (n-3) = EPA, acide eicosapentanoïque

20 : 4 (n-6) = ARA, acide arachidonique.

De plus, a été rajouté pour cette étude, l'isofucostérol qui se différencie du fucostérol par un temps de rétention différent mais qui présente un spectre de masse identique avec le fragment caractéristique à 314 correspondant à un réarrangement de Mac Lafferty sur la double liaison en C24. Le fucostérol est identifié par le temps de rétention de celui du commerce (sigma F5389).



*Mise au point d'un indice histochimique pour  
l'évaluation des réserves lipidiques des larves de C. gigas*



### 3. Mise au point d'un indice histochimique pour l'évaluation des réserves lipidiques des larves de *C. gigas*

#### 3.1. Cadre expérimental

Ce chapitre est consacré à la révélation des réserves lipidiques chez *C. gigas*, par coloration spécifique, et à leur évolution au cours du développement larvaire. La mise en évidence au moyen de lysochromes représente la plus simple et la plus efficace parmi les méthodes de détection des lipides. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux types de colorants différents : l'Oil Red O et le Nile Red, lysochromes couramment utilisés pour l'identification des gouttelettes de lipides neutres. La teinte propre du lysochrome utilisé est l'un des éléments du choix à faire lors de l'emploi à des fins histochimiques, l'intensité et la profondeur de la coloration obtenue conditionnant les qualités optiques des préparations (Gabe, 1968) et devenant particulièrement nécessaires notamment lors du traitement ultérieur des données par analyse d'images requérant un franc contraste entre les zones colorées et le reste des cellules. En effet, grâce à un traitement en analyse d'images et une lecture en épifluorescence, nous avons amélioré et quantifié l'indice physiologique global basé sur le rapport de la surface lipidique à la surface larvaire totale par la coloration spécifique des réserves lipidiques au Nile Red. La validation de cet indice a été réalisée au cours de trois types d'expérimentation mettant en jeu l'influence de deux facteurs de grande influence sur les performances larvaires qui sont la température et la nourriture (aspects qualitatif et quantitatif). L'impact de ces paramètres, thermique et nutritionnel, sur le développement larvaire, la métamorphose de *C. gigas* et l'évolution parallèle de cet indice lipidique a été étudié.

Pour ce faire, l'influence de quatre températures d'eau d'élevage (18, 22, 28 et 32 °C) sur la mise en réserve lipidique a été estimée (voir chapitre matériels et méthodes). Puis, l'impact du régime nutritionnel sur les performances larvaires et la mise en place des réserves ont été recherchés. Pour cela, des élevages, conduits en triplicata dans des bacs de 30 L, ont reçu des régimes monospécifiques (*P. lutheri* : P ; *I. affinis galbana* : T et *C. calcitrans* forma *pumilum* : Cp), bispécifique (PT, PCp, TCp) ou trispécifique PTCp. Au total, sept conditions nutritionnelles ont été testées, soit vingt-et-un élevages (voir chapitre matériels et méthodes). Enfin, la dernière expérimentation porte sur l'influence de la quantité de nourriture, demi ration (25-100 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ), ration de référence (50-200 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ) et double ration (100-400

cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Parallèlement, pour tous les élevages et toutes les conditions expérimentales, la consommation phytoplanctonique a été également étudiée dans le but d'établir une corrélation potentielle entre le niveau des réserves lipidiques et le taux d'ingestion des microalgues. Concernant la première série expérimentale (influence de différentes températures) qui, rappelons le, s'est déroulée en flux ouvert, un prélèvement est réalisé à l'entrée et sortie du bac, une fois par jour. La consommation est obtenue par différence entre les deux concentrations, en tenant compte du taux de renouvellement. Pour les deux autres séries expérimentales, conduites en séquentiel, un échantillon d'eau d'élevage est prélevé dans le bac, deux fois par jour, avant et après adjonction phytoplanctonique. La consommation larvaire est alors obtenue par différence. Les prélèvements se font dans des piluliers de 20 ml, plongés dans le bac, à travers un filtre de 40  $\mu\text{m}$  de maille, afin d'éviter l'intrusion des larves dans l'échantillon. Les prélèvements sont ensuite analysés au compteur de particule (Multisizer III), équipé d'un tube à orifice de 100  $\mu\text{m}$  d'ouverture, dénombrant les particules dans 500  $\mu\text{l}$  de suspension. L'ensemble des données est enfin transféré et traité sous Excel. Le nombre de larves vivantes étant estimé régulièrement, cette fonction est exprimée pour une larve et par jour.

### 3.2. Révélation des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas*

#### 3.2.1. Révélation à l'Oil Red O

Les résultats des essais de révélation, à l'Oil Red O (ORO), des réserves lipidiques selon différents protocoles (solvant, état préalable des larves et temps de contact) chez les larves de *C. gigas* sont consignés dans le tableau 8.

Solvants	Etat préalable des larves	Temps de réaction (min)	Observations
Éthylène Glycol (EG)	• Larves fraîches	2, 5, 15 et 30	Absence totale de coloration
	• Larves formolées	60 et 120	
	• Larves glycolées		
	• Larves immergées dans $\text{MgCl}_2$		

## Mise au point d'un indice histochimique

Diméthyl Sulfoxyde (DMSO)	• Larves fraîches	2 et 5	Coloration rougeâtre légèrement perceptible chez quelques individus
	• Larves formolées		
	• Larves glycolées	15, 30, 60 et	Coloration rougeâtre chez tous les individus, légèrement intensifiée avec l'imprégnation des larves au préalable avec du MgCl <sub>2</sub>
	• Larves immergées dans MgCl <sub>2</sub>	120	
Acétone	• Larves fraîches	2, 5, 15, 30	Coloration rouge intense sur l'ensemble de la larve, intensifiée avec l'imprégnation des larves au préalable avec du MgCl <sub>2</sub>
	• Larves formolées	60 et 120	
	• Larves glycolées		
	• Larves immergées dans MgCl <sub>2</sub>		

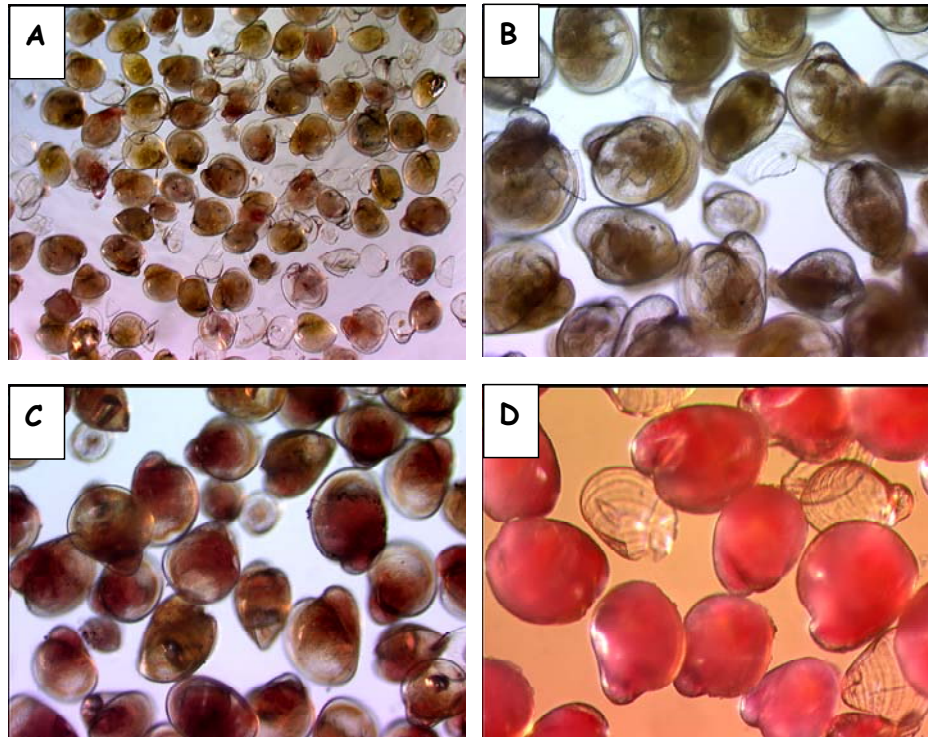
**Tableau 8 : résultats de la coloration des réserves lipidiques au moyen de l'Oil Red O (ORO) selon différents protocoles chez les larves de *C. gigas*.**

L'Oil Red O réagit différemment avec les lipides en fonction du solvant dans lequel il est dilué :

- L'éthylène glycol (EG) semble être un mauvais solvant. Aucune coloration n'a pu être détectée pour des temps de contact avec le produit allant de 2 à 30 minutes. Ce n'est qu'à partir de 60 minutes qu'une très légère teinte rougeâtre apparaît, à peine visible chez seulement quelques individus. L'imprégnation préalable des larves dans une solution de MgCl<sub>2</sub>, processus permettant le maintien des valves ouvertes et facilitant ainsi la pénétration du colorant, n'améliore pas les résultats.
- Lorsque le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est utilisé comme solvant, une légère coloration rougeâtre commence à être perceptible chez quelques individus à partir de 2 minutes de temps de contact avec le réactif. Pour un temps de réaction supérieur ou égal à 15 min, la coloration est effective chez tous les individus et est localisée au niveau de l'umbo et s'étend vers le bord dorsal de la larve.
- L'utilisation de l'acétone comme solvant provoque une coloration très intense après un temps de contact très réduit (2 min), mais non ciblée et répartie sur l'ensemble de la larve.

Dans les trois cas de figure, l'application de l'Oil Red O comme colorant spécifique des lipides s'est avérée désavantageuse. La faible sensibilité de ce colorant, et par conséquent, la médiocrité résultante des colorations (figure 13) rend impossible tout traitement des données

par analyse d'images et toute quantification lipidique. De ce fait, cette technique a été abandonnée et la révélation lipidique au Nile Red, comme alternative, envisagée.



**Figure 13 : détection des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas* exposées à l'Oil Red O.** A : larves oeillées de 19 j ; dissolvant employé : éthylène glycol, temps de contact : 120 min ; B : larves oeillées de 19 j ; dissolvant employé : éthylène glycol, temps de contact : 120 min ; imprégnation au préalable des larves avec du MgCl<sub>2</sub> ; C : larves de 14 j ; dissolvant employé : DMSO, temps de contact : 120 min ; D : larves de 21 j ; dissolvant employé : acétone, temps de contact : 30 min.

### 3.2.2. Révélation au Nile Red

#### 3.2.2.1. Répartition des réserves lipidiques au cours du développement larvaire

La mise en place des réserves lipidiques au cours du développement larvaire et postlarvaire de *C. gigas* est représentée dans la figure 14. La coloration lipo-spécifique a révélé, au deuxième jour, une abondance d'inclusions lipidiques dispersées dans tout le tissu (photo A). Ces gouttelettes lipidiques sont d'origine vitelline puisque la larve, encore au stade endotrophe, n'a pas ingéré de microalgues. Au septième jour, ces réserves prennent une forme plus compacte et se regroupent du côté de l'umbo, au niveau de la glande digestive et de l'estomac, formant ainsi une zone de réserves lipidiques néoformées. Ces nouvelles réserves sont majoritairement constituées suite à la digestion et à l'assimilation des microalgues

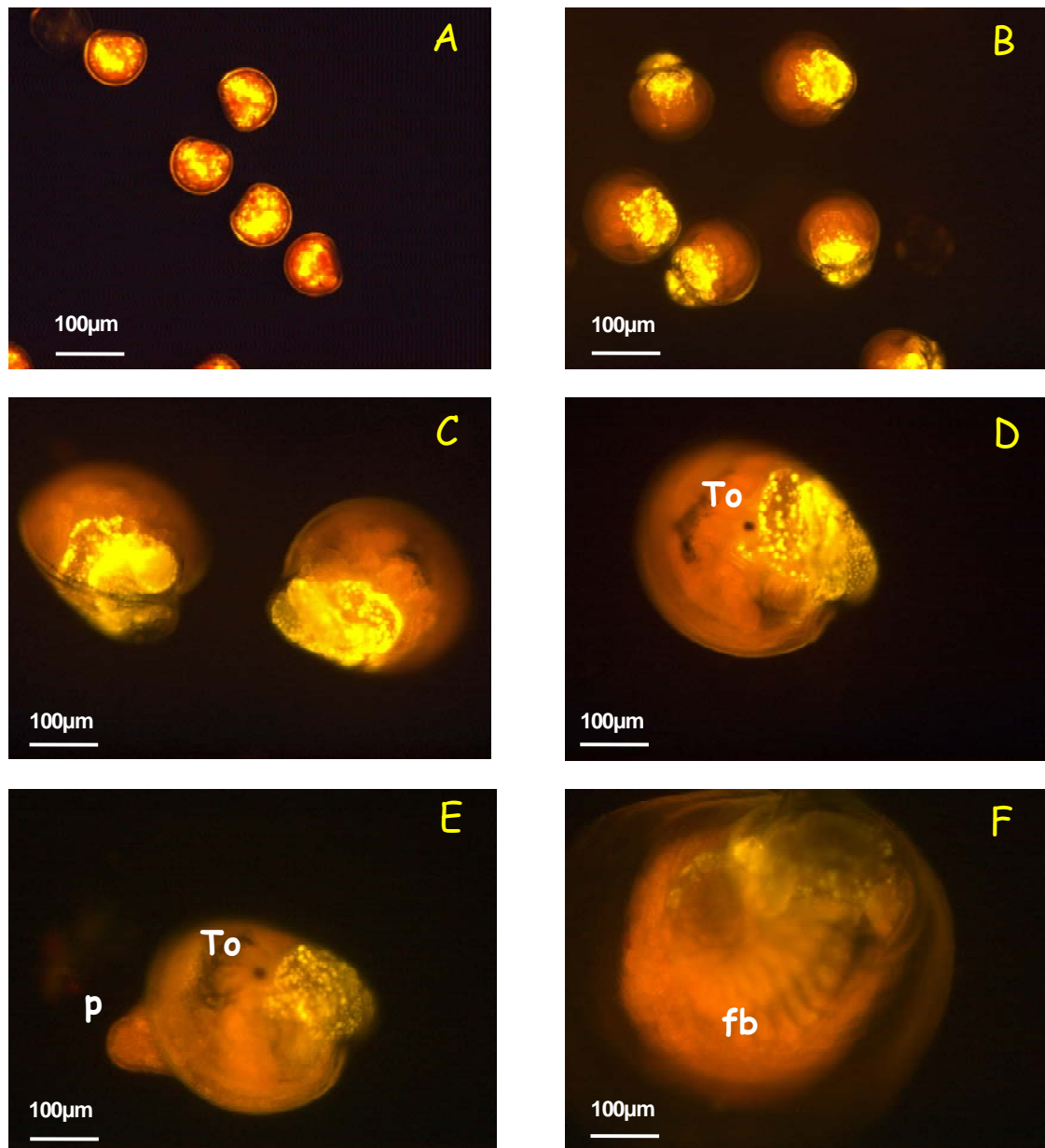
## Mise au point d'un indice histochimique

---

ingérées (photo B). Au douzième jour, les réserves lipidiques d'origine exogène, sont denses (photo C). Les photographies D et E, acquises au dix-huitième jour d'élevage, illustrent une larve oeillée, munie d'un pied, prête à se fixer ; les réserves lipidiques sont amoindries. Enfin, la photographie F représente une post larve de vingt cinq jours, très peu colorée, pauvre en lipides, probablement consommés au cours de la métamorphose.

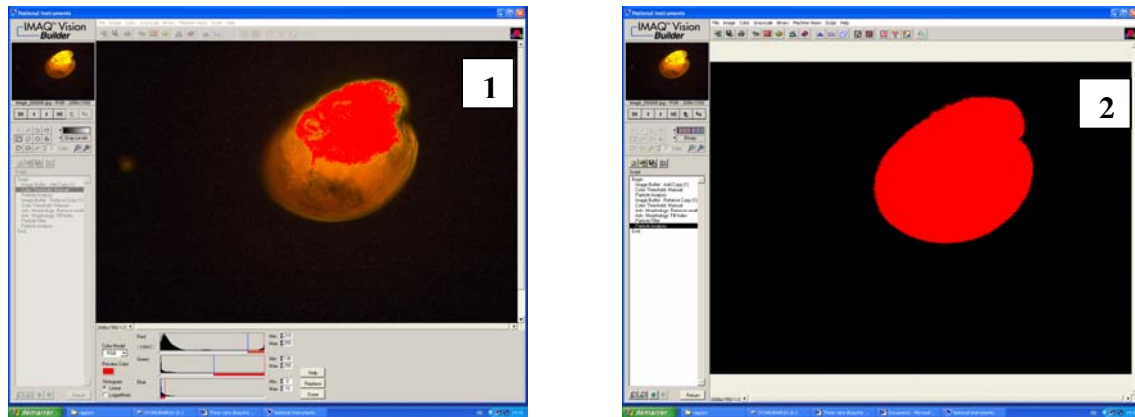
### *3.2.2.2. Définition d'un indice lipidique global*

Grâce à l'analyse des images acquises par le logiciel Imaq Vision Builder version 6, nous avons pu quantifier les réserves lipidiques au cours du développement larvaire et définir ainsi un indice qu'on a nommé indice lipidique global correspondant au rapport de l'aire lipidique, colorée en jaune, sur l'aire totale de la larve (figure 15).



**Figure 14 : évolution des réserves lipidiques au cours du développement larvaire et postlarvaire de *C. gigas* exposée au Nile Red.** fb : filaments branchiaux ; p : pied ; To : tache ocellaire. A : stade larve D ( $80 \pm 4 \mu\text{m}$ ) ; B : larves umbonées de 8 j ( $130 \pm 14 \mu\text{m}$ ) ; C : larve umbonée de 12 j ( $200 \pm 25 \mu\text{m}$ ) ; D : larve oeillée de 18 j ( $260 \pm 42 \mu\text{m}$ ) ; E : pédivéligère oeillée de 18 j ( $260 \pm 42 \mu\text{m}$ ) ; F : post larve de 25 j ( $500 \pm 50 \mu\text{m}$ ).





**Figure 15 : fenêtre de seuillage de la détection des couleurs par le logiciel Imaq Vision Builder.** 1. Sélection des niveaux de gris correspondant à la zone colorée en jaune ou l'aire lipidique (valeur en pixels). 2. Sélection des niveaux de gris correspondant à la surface totale de la larve (valeur en pixels).

### 3.3. Influence des facteurs environnementaux sur l'expression de l'indice lipidique global

#### 3.3.1. Impact de la température d'élevage

Les résultats des performances d'élevages larvaires en fonction des quatre régimes thermiques seront exposés dans le chapitre intitulé : « Performances et qualités physiologiques des élevages larvaires de *C. gigas* en fonction de la température. Dans ce volet, ne seront traitées que la consommation des microalgues par les larves et la gestion des réserves lipidiques en fonction de quatre températures différentes.

##### 3.3.1.1. Consommation larvaire

La consommation quotidienne en algues des larves du quatrième jour jusqu'au stade pédivéligère est rapportée dans la figure 16. Quelle que soit la température d'élevage, la consommation phytoplanctonique augmente progressivement au cours du développement larvaire et diminue de façon plus ou moins marquée, selon l'élevage, à l'approche de la métamorphose. A 18°C, les larves ingèrent une quantité moins importante de cellules phytoplanctoniques (2 150 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> au quatrième jour à 40 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en fin d'élevage). En revanche, à 28 et 32°C, des consommations algales similaires mais environ deux fois plus élevées sont relevées (5 000 à 80 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>).

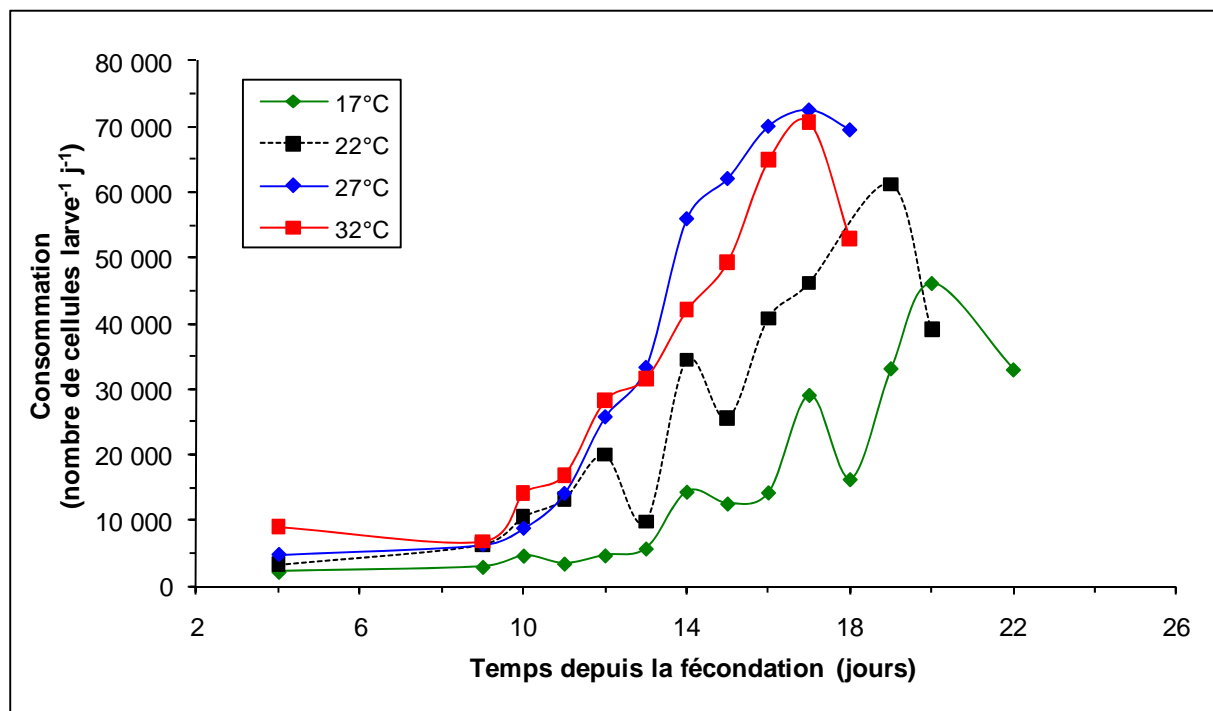


Figure 16 : consommation journalière chez les larves de *C. gigas* soumises à différentes températures d'élevage de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005).

### 3.3.1.2. Expression de l'indice lipidique global

L'évolution des réserves lipidiques en fonction de la température d'élevage est rapportée dans la figure 17. Les réserves lipidiques mesurées au deuxième jour sont de  $30 \pm 5$  %. Ensuite, et alors qu'à basse température, celles-ci restent stables, une diminution est notée au huitième jour, de façon très marquée à forte température (5 % : 32°C) et moindre mais significative à 22 et 28°C. A l'inverse, avec une surface lipidique d'environ 14 %, aucune différence n'est décelée à cette date, entre ces deux températures intermédiaires. Au quinzième jour, et avec une surface lipidique de 11 %, seule la forte température (32°C) se détache significativement des autres conditions, associées à des pourcentages compris entre 14 et 19 %. Au dix-huitième jour, des différences significatives sont décelées entre les quatre températures testées, avec des réserves lipidiques élevées (28 %) chez les larves conduites à basse température, celles-ci étant comprises entre 8 et 16 % pour les autres traitements (figure 17).

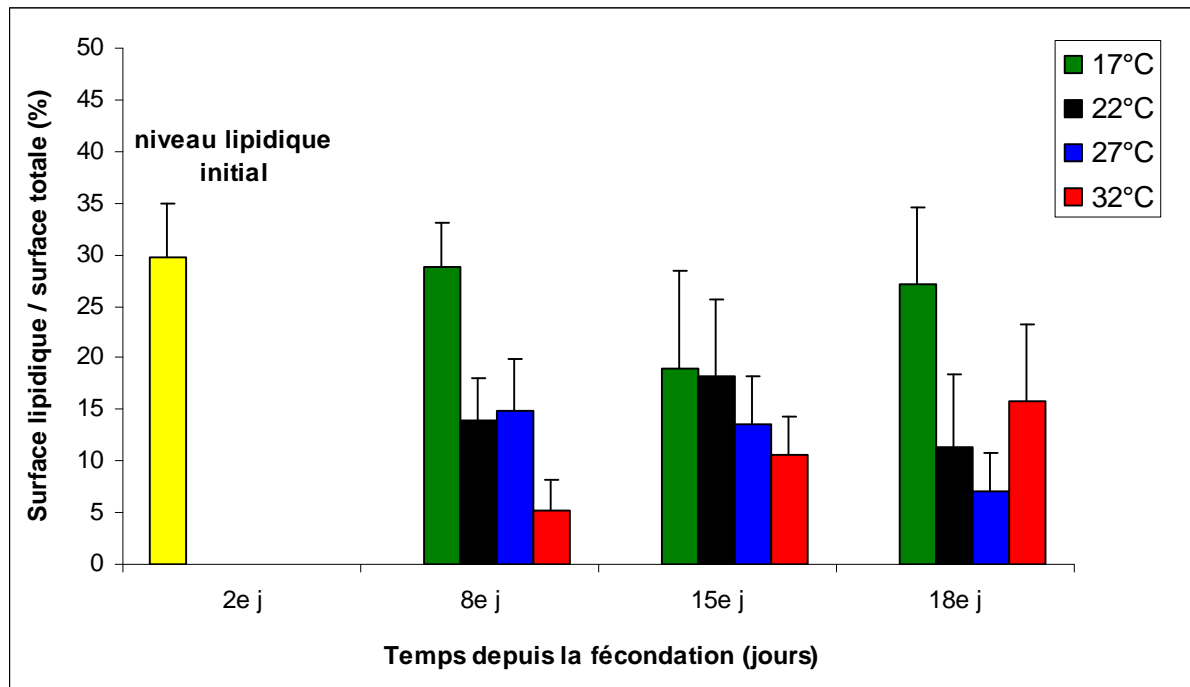


Figure 17 : évolution des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas* soumises à différentes températures d'élevage de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3). Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

La relation entre l'indice lipidique global et la taille des larves a été recherchée (figure 18). Il en ressort qu'il n'existe pas de relation entre ces deux paramètres et ce quelle que soit la température d'élevage, les coefficients de corrélation étant compris entre 0,21 et 0,51 exception faite de la température de 28°C où  $R^2 = 0,80$ . Cette absence de corrélation était confirmée par test t.

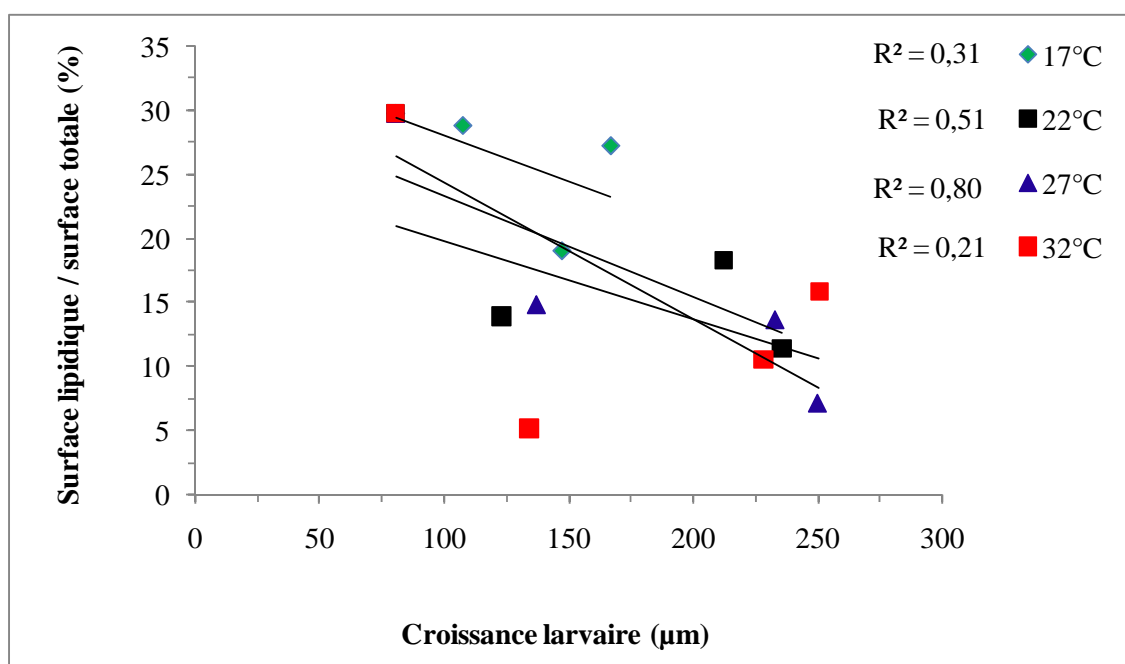


Figure 18 : relation entre indice lipidique global et taille des larves de *C. gigas*, soumises à différentes températures d'élevage de 18 à 32°C.

### 3.3.2. Impact du régime nutritionnel

Les résultats d'une partie de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans **Aquaculture, 305 (210), 165-183**

#### 3.3.2.1. Consommation larvaire

La consommation phytoplanctonique des larves de *C. gigas* est déterminée quotidiennement en fonction des sept régimes nutritionnels, du troisième jour jusqu'à la fin du développement larvaire (figure 19). La représentation graphique montre que les larves ingèrent préférentiellement la diatomée *C. calcitrans* forma *pumilum* (Cp). Les meilleures consommations sont effectivement obtenues lorsque celle-ci est apportée seule, suivies des différentes combinaisons dans lesquelles figure cette microalgue avec TCp = PCp = PTCp. La consommation de ces trois derniers régimes s'est révélée significativement similaire en fin d'élevage, au dix-huitième jour ( $p > 0,05$ ). Dès que cette microalgue est absente dans le régime (PT), le nombre de cellules ingérées baisse, notamment à partir du onzième jour, mais une compensation est cependant opérée puisqu'en fin d'élevage, aucune différence significative n'est révélée entre la consommation de ce mélange (PT) et les trois autres combinaisons à base de Cp. En revanche, la consommation phytoplanctonique la plus faible est enregistrée dans le cas des deux régimes monospécifiques, *I. aff. galbana* (T) ou *P. lutheri* (P). Elle est comprise entre 38 000 et 41 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> au dix-huitième jour, sans aucune différence significative entre les deux ( $p = 0,9992$ ) alors que celle-ci est environ trois fois supérieure pour le régime monospécifique à base de *C. calcitrans* forma *pumilum* (118 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>;  $p < 0,0001$ ).

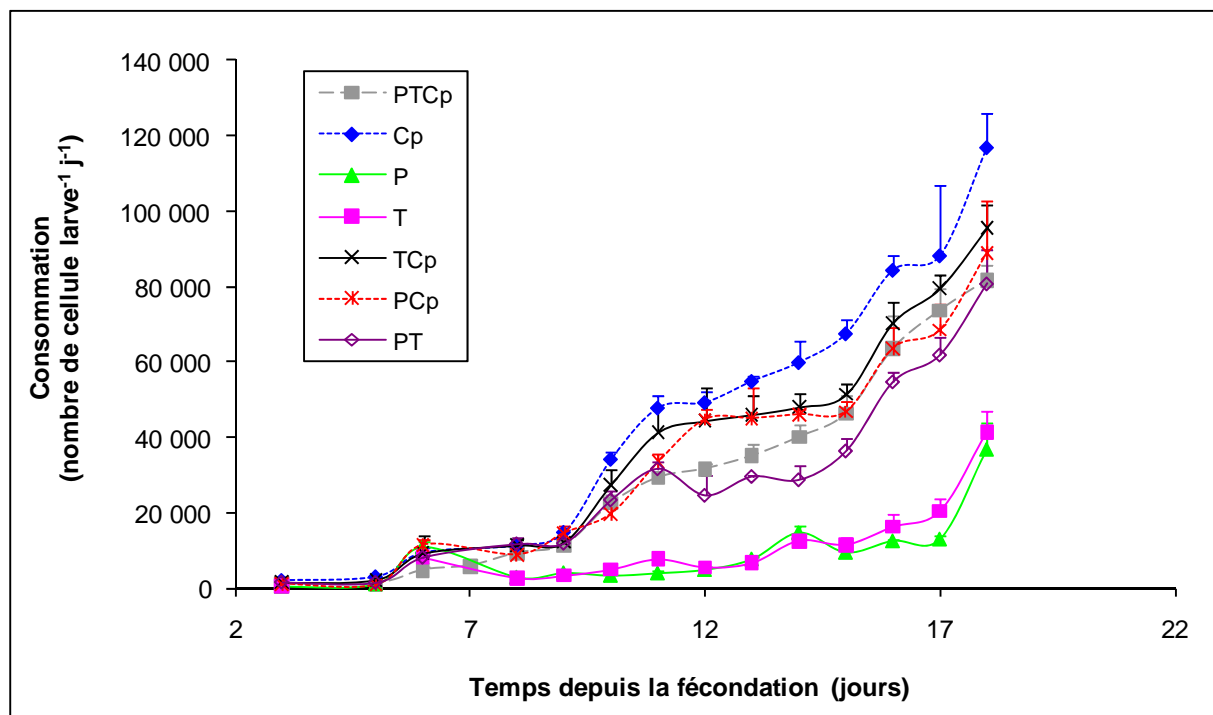


Figure 19 : consommation journalière chez les larves de *C. gigas* soumises à différents régimes nutritionnels (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3).

### 3.3.2.2. Performances d'élevage larvaire

Pour l'ensemble des élevages conduits sous régime monospécifique, seule la condition Cp a permis de bonnes performances larvaires (tableau 8). Avec un taux de croissance de  $13,6 \mu\text{m j}^{-1}$ , 80 % des larves sont compétentes au dix-huitième jour, engendrant 82 % de post larves. Excepté une moindre survie (85 %), ces performances sont similaires à celles du témoin, nourri sur un mélange trispécifique PTCp. En revanche, les conditions T et P ont généré de moins bons résultats ; avec  $9$  et  $6 \mu\text{m j}^{-1}$  respectivement les larves n'ont pas pu atteindre la compétence malgré des survies élevées en fin d'élevage (80 à 80 %). Il en est de même avec l'association PT qui présente néanmoins une bonne croissance ( $12 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et une bonne survie en fin d'élevage (88 %). Alimentées avec PCp, 28 % des larves ont été aptes à se métamorphoser au dix-huitième jour, donnant naissance à 58 % de post larves. Enfin, la meilleure association correspond à TCp ; avec un taux de croissance de  $15 \mu\text{m j}^{-1}$ , 86 % des larves sont compétentes dès le dix-huitième jour et 80 % de post larves sont obtenues.

Régimes	Fin d'élevage larvaire (j)	Taux de croissance ( $\mu\text{m j}^{-1}$ )	Survie en fin d'élevage larvaire (%)	Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
<b>Cp</b>	18	13,6 (1,9)	84,8 (8,5)	89,6 (5,3)	82,0 (0,8)
<b>T</b>	18	8,9 (3,5)	80,0 (11,8)	***	***
<b>P</b>	18	5,9 (2,9)	80,2 (9,9)	***	***
<b>TCp</b>	18	15,0 (1,9)	90,5 (0,9)	85,8 (8,2)	89,4 (4,9)
<b>PCp</b>	18	12,2 (2,9)	90,8 (2,8)	28,3 (8,4)	56,8 (6,9)
<b>PT</b>	18	11,5 (2,8)	88,3 (0,3)	***	***
<b>PTCp</b>	18	13,3 (2,8)	90,8 (5,2)	88,5 (5,6)	83,3 (5,3)

Tableau 8 : performances d'élevage larvaire (moyenne  $\pm$  écart-type) de *C. gigas* soumise à différents régimes nutritionnels (Gig0505, mai 2005).

La croissance larvaire est représentée dans la figure 20. Au second jour, une taille initiale de  $80,2 \pm 4,0 \mu\text{m}$  est enregistrée. Ensuite, les régimes Cp, TCp et PT conduisent à la meilleure croissance au septième jour d'expérience, avec une taille moyenne comprise entre 121 et 125  $\mu\text{m}$ . Tandis que les plus faibles longueurs sont notées pour les régimes monospécifiques P et T (environ 95  $\mu\text{m}$  : absence de différences significatives entre ces deux régimes,  $p = 0,688$ ), les écarts entre ces extrêmes sont significatifs ( $p < 0,0001$ ). Au quatorzième jour, les tailles sont comprises entre 142 et 244  $\mu\text{m}$  et trois entités de taille significativement différentes, P, T et le groupe incluant Cp comme composante du régime se dégagent clairement. Ces écarts inter et intragroupes se creusent au dix-huitième jour et les larves nourries avec TCp ont une taille significativement supérieure à celle des autres traitements ( $320 \pm 30 \mu\text{m}$  ;  $p < 0,0001$ ). Par ordre décroissant, les différents traitements se classent comme suit : Cp ( $299 \pm 32 \mu\text{m}$ ) = PTCp ( $293 \pm 43 \mu\text{m}$ ) > PCp ( $286 \pm 46 \mu\text{m}$ ) > PT ( $263 \pm 44 \mu\text{m}$ ) > T ( $223 \pm 56 \mu\text{m}$ ) > P ( $185 \pm 48 \mu\text{m}$ ).

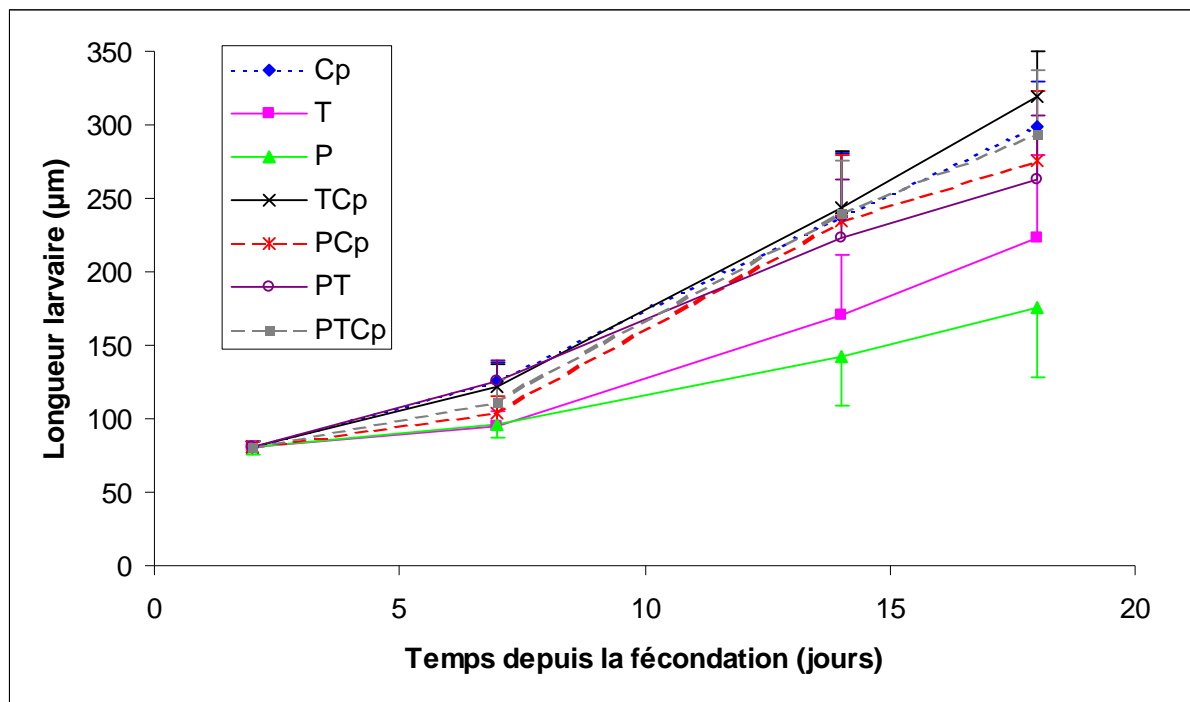


Figure 20 : croissance observée chez les larves de *C. gigas* soumises à différents régimes nutritionnels (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales représentent les écarts-types (n > 100).

### 3.3.2.3. Expression de l'indice lipidique global

L'évolution des réserves lipidiques en fonction du régime alimentaire est représentée dans la figure 21. Au deuxième jour d'élevage, les lipides représentent 30 % de la surface larvaire. Ces lipides neutres sont très rapidement catabolisés chez les larves recevant un régime monospécifique de type *P. lutheri* (P) ou *I. affinis galbana* (T). Il n'en reste que 4 % au huitième jour d'élevage. En revanche, et si pour le traitement P, ces réserves sont totalement mobilisées au quinzième jour (0,3 %), une récupération est observée pour le régime T (18 %). Les larves exposées aux régimes PCp et TCp montrent une stabilisation de leurs réserves pendant la première semaine (30 %) et ne les consomment qu'au cours de la deuxième semaine d'élevage (14 et 18 % respectivement). Pour les régimes PT et PTCp une dégradation plus progressive est notée au cours du temps. En effet, pendant la première semaine, une première baisse est observée (19 et 20 % respectivement) et une deuxième, plus marquée chez les larves nourries sur PT (5 %) est à nouveau enregistrée en cours de la deuxième semaine. Par contre, la consommation des réserves reste particulièrement faible avec le régime Cp ; les larves accumulent d'abord les lipides (33 %) et ne les catabolisent ensuite que très légèrement (28 %).

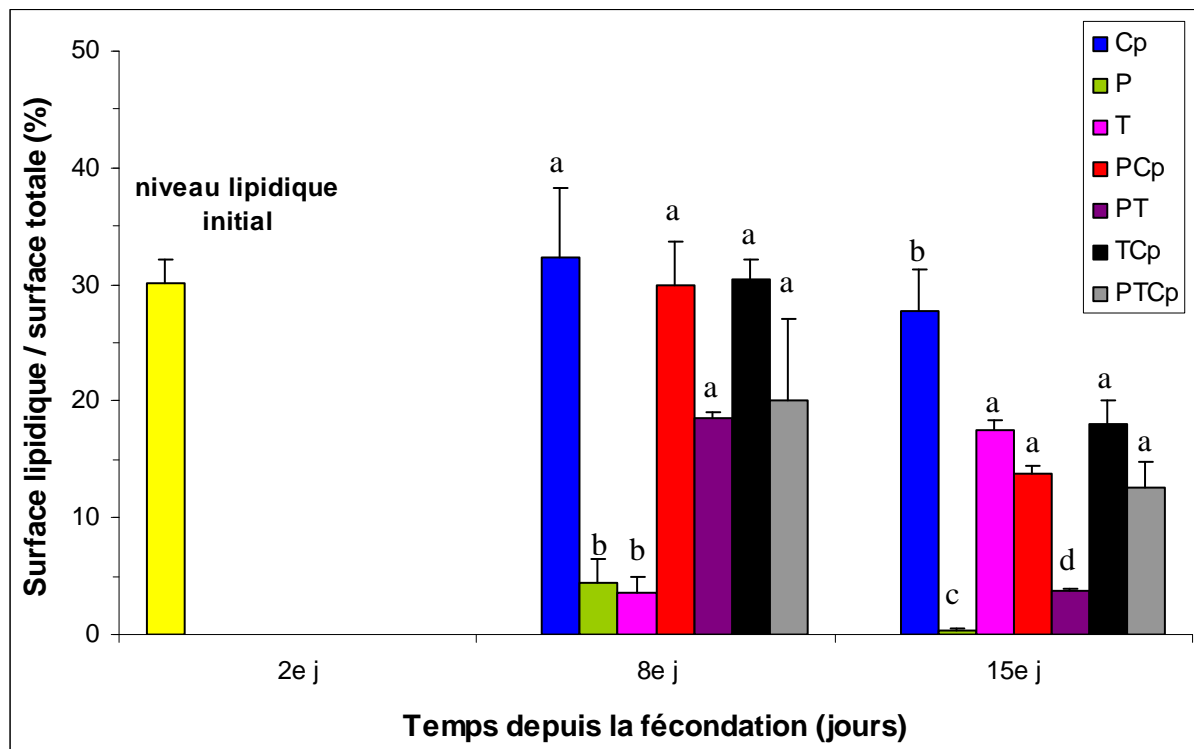


Figure 21 : évolution des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas* soumises à différents régimes nutritionnels (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3). Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 3.3.3. Impact de la quantité de nourriture

Les résultats des performances d'élevage larvaire relatifs à cette partie sont détaillés dans le chapitre : « Performances et qualité physiologique des élevages larvaires de *C. gigas* en fonction de la quantité de nourriture » et ne seront donc pas rappelés ici.

#### 3.3.3.1. Consommation larvaire

La consommation phytoplanctonique des larves de *C. gigas* est déterminée quotidiennement en fonction de trois rations phytoplanctoniques, du deuxième jour jusqu'à la fin du développement larvaire (figure 22). Malgré quelques fluctuations, la tendance globale est la même quel que soit le niveau trophique. La consommation augmente progressivement au cours du développement larvaire, de façon beaucoup plus marquée chez les larves suralimentées. Ainsi, chez ces dernières, le nombre de cellules ingérées pendant la première



semaine oscille entre 5 000 et 20 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Comparativement, seules 2 000 à 8 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> sont consommées par les individus sous-alimentés pendant le même laps de temps. Au quatorzième jour, une augmentation brusque est notée pour les trois lots, de façon encore plus marquée chez les individus recevant une double ration. En fin d'élevage larvaire, à l'approche de la métamorphose, une demi ration permet une consommation ne dépassant pas 54 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> alors qu'une double ration en autorise le double (103 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). Les larves modérément alimentées ingèrent une quantité intermédiaire, 88 000 cellules larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

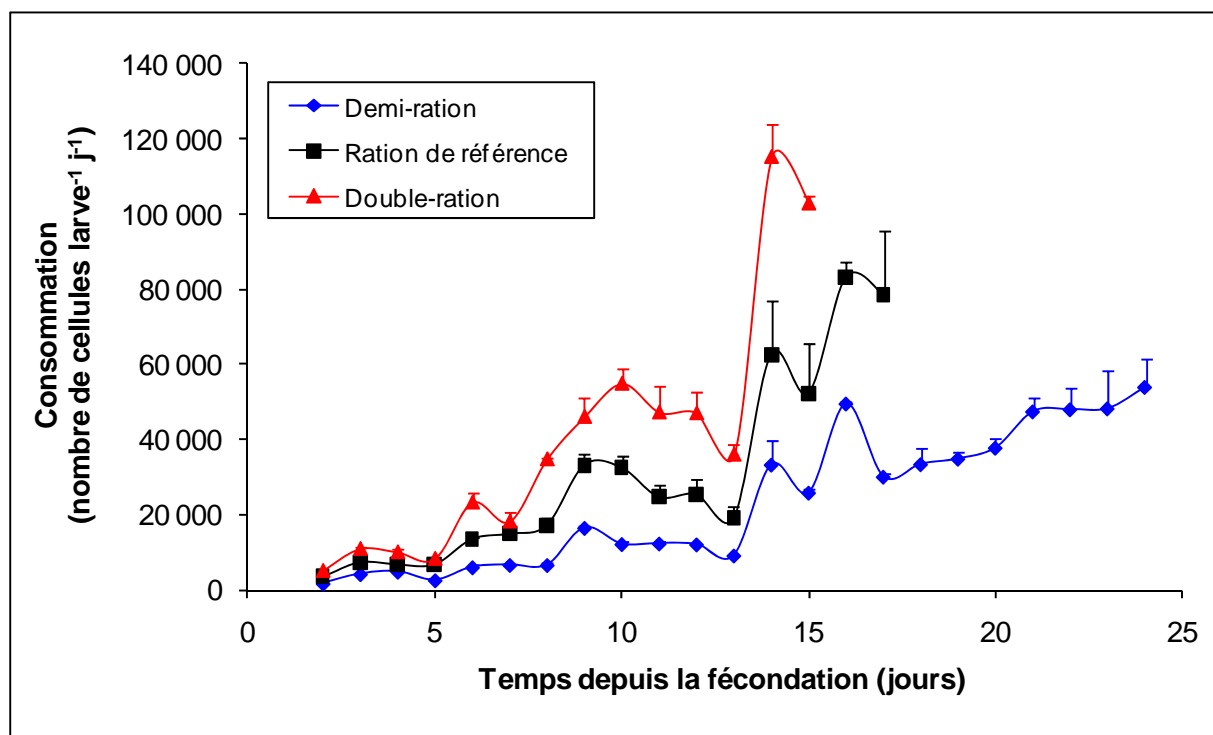
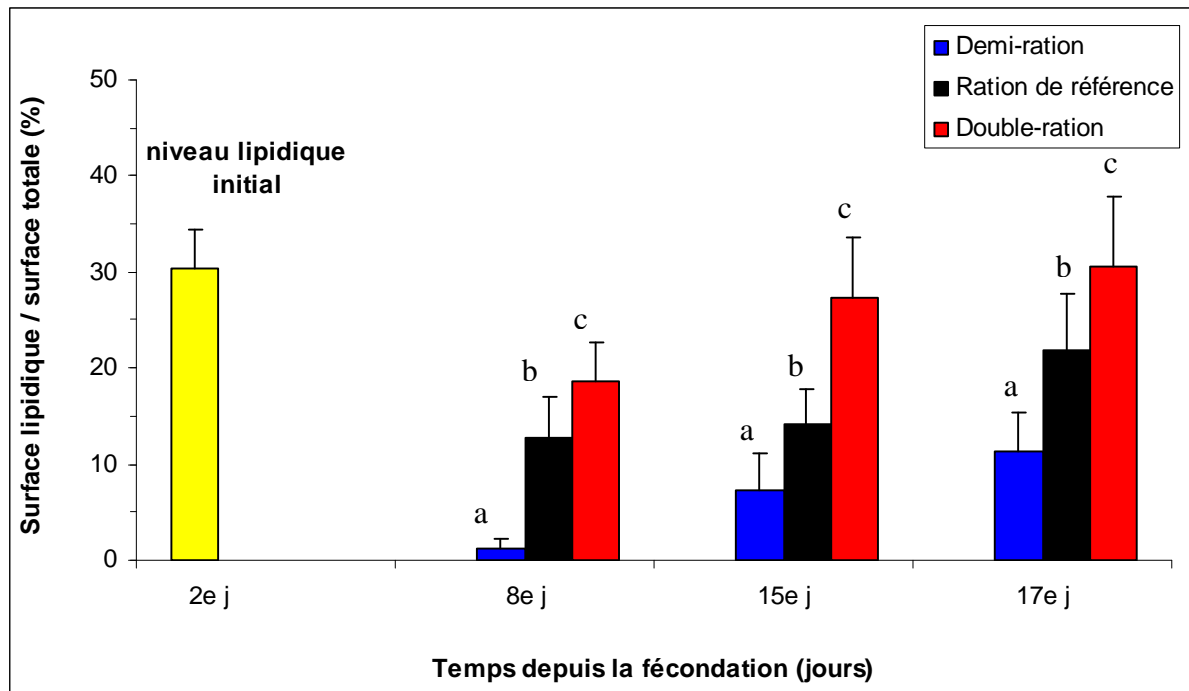


Figure 22 : consommation journalière chez les larves de *C. gigas* soumises à différents niveaux trophiques (Gig0504, avril 2005). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 2).

### 3.3.3.2. Expression de l'indice lipidique global

L'évolution des réserves lipidiques en fonction de la quantité de nourriture apportée aux larves est représentée dans la figure 23. Comme attendu, les résultats mettent en évidence une relation positive entre la quantité de nourriture reçue et le niveau des réserves accumulées. Ainsi pour une larve de deux jours, les lipides se répartissent, en moyenne, sur 30 % de sa surface. Puis, quelle que soit la teneur phytoplanctonique apportée, ces réserves sont

catabolisées au huitième jour, de façon très marquée chez les larves sous-alimentées (demi ration), puisque leur surface lipidique ne représente plus que 1,3 % vs 13 et 19 %, respectivement chez les larves moyennement et fortement nourries. En revanche, quelle que soit la ration, les larves vont accumuler ultérieurement des réserves (10 %, 20 – 30 %) en proportion relative à l'apport.



**Figure 23 : évolution des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas* soumises à différents niveaux trophiques (Gig0504, avril 2005).** Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3). Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 3.4. Discussion

L'utilisation de l'Oil Red O, comme révélateur de réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas*, s'est avérée inefficace. En effet, des résultats médiocres ont été obtenus, et ce quel que soit le protocole employé. Gallagher *et al.* (1986) ont, pourtant, fait état de cette technique, en choisissant le diméthyl sulfoxyde (DMSO) comme solvant, pour la quantification des lipides chez plusieurs larves de bivalves. Leurs résultats restent, cependant, semi quantitatifs puisqu'un indice visuel a été développé, allant de l'absence de coloration (0) à la coloration très intense (3). De plus, l'ORO présente certains inconvénients réduisant ainsi son efficacité comme par exemple, l'absence de précision sur la nature de la classe lipidique mise en

évidence (Greenspan *et al.*, 1985 ; Jackson, 1993) ou la perte des lipides par leur dissolution dans le solvant organique utilisé pour la préparation de la coloration à l'ORO (Greenspan et Fowler, 1985) ou encore la tendance qu'a l'ORO à précipiter hors de la solution de coloration une fois placée en contact avec un hydrogel aqueux donnant l'aspect granulaire aux dépôts (Mirejovsky *et al.*, 1991). En effet, la précipitation des cristaux d'ORO a été soulignée par Tremblay (1991) à l'intérieur de la larve, rendant ainsi difficile l'observation de l'échantillon. Compte tenu de ces difficultés, une autre technique a été adoptée, en utilisant le Nile Red, colorant fluorescent hydrophobique spécifique des lipides par excellence (Greenspan et Fowler, 1985). Par conséquent, l'utilisation de ce colorant comme technique histochimique de détection des lipides neutres dans les cellules et les sections de tissus a été répandue dans différents domaines. En biologie, son utilisation est simple, rapide et ne nécessite pas le sacrifice des animaux. En effet, les cellules restent vivantes après application du colorant. Les lipides neutre et polaire sont différenciellement colorés, permettant ainsi l'identification aisée des réserves énergétiques (triacylglycérols et cholestéryl esters) et des stérols, colorées en jaune contrairement aux phospholipides qui émettent une fluorescence rouge orange de faible intensité (Greenspan *et al.*, 1985 ; Brown *et al.*, 1992 ; Castell et Mann, 1994). Greenspan et Fowler (1985) précisent même que le Nile Red fluoresce en jaune or en présence des triacylglycérols, cholestérols et cholestéryl esters. Dans la présente étude, la mise en évidence des réserves lipidiques des larves de *C. gigas* a été opérée, selon le protocole de Castell et Mann (1994) initialement mis au point sur des larves de *C. virginica*. Appliquée également à des larves de *Placopecten magellanicus* (Jackson, 1993) la technique paraissait séduisante mais une automatisation des procédés s'avéraient nécessaires pour, d'une part, acquérir et traiter rapidement et de façon non subjective les images et, d'autre part, autoriser la mise en place d'expérimentations plus approfondies. Ainsi, la surface fluorescente a pu être quantifiée, grâce à l'analyse d'images, via un rapport de la surface colorée sur la surface totale de la larve (indice lipidique global). Contrairement aux analyses biochimiques classiques, la technique est simple, rapide à mettre en place et peu coûteuse en matériel biologique. Très sensible à la taille des larves, elle permet une bonne appréhension de l'évolution des réserves lipidiques et de leur gestion au cours du temps.

Ainsi, au cours de ce travail, l'incidence de la température ainsi que la nourriture (aspects quantitatif et qualitatif) a été clairement démontrée sur la mise en place des réserves lipidiques chez les véligères.

Concernant l'impact de la température d'élevage sur la gestion des réserves lipidiques, nous avons obtenu des teneurs lipidiques élevées à 18°C (19-29 %), malgré une consommation

algale relativement faible (40 000 cellules larve<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, en fin d'élevage). A l'inverse, à 32°C, le nombre de cellules ingérées est plus important (80 000 cellules larve<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, en fin d'élevage) alors que les teneurs lipidiques enregistrées sont plus faibles (5-16 %).

L'approche colorimétrique met en évidence l'absence de relation entre l'indice lipidique global et la taille des larves quelle que soit la température d'élevage. Cependant, le stockage lipidique s'avérait moins prononcé à forte température. Chez *C. virginica*, Gallager *et al.* (1986) signalent qu'à 30°C, les lipides ne sont que faiblement accumulés au niveau de la glande digestive contrairement à des larves élevées à 25°C. Ces mêmes auteurs rapportent qu'à 30°C, les larves, bien que compétentes, ne se sont pas métamorphosées et expliquent cette inaptitude par des réserves lipidiques déficientes. Des résultats contradictoires sont rapportés dans la présente étude puisqu'à 32°C, des réserves lipidiques moyennes (ILG  $\approx$  15 %) et un taux de métamorphose fort (91 %) ont été enregistrés. A forte température, les larves vont rapidement mobiliser leur stock lipidique pour couvrir leurs besoins énergétiques. En revanche, à basse température, le taux d'ingestion est ralenti mais le stockage est favorisé. Dans ce type d'expérimentation il est difficile de relier l'indice lipidique étudié aux performances larvaires car le facteur thermique exerce une influence capitale sur le métabolisme des lipides afin de permettre à ces organismes ectothermes de s'adapter aux changements de la température par la modification de la fluidité membranaire. Ces résultats confirment des travaux biochimiques et / ou enzymologiques précisant l'influence du facteur thermique sur le métabolisme lipidique chez les organismes marins. Ainsi, l'augmentation de la température d'élevage de 16 à 22°C, chez le bar, par exemple, diminue le contenu en lipides du muscle (Richard, 2006). Selon ce dernier, il semble que la  $\beta$ -oxydation soit plus accélérée à forte température. Par ailleurs, et chez les larves de la coquille *Argopecten purpuratus*, Farias *et al.* (2003) signalent une augmentation des teneurs en cholestérols et stéryl-esters à basse température. Il s'agit, comme chez tous les organismes ectothermes, d'un processus d'adaptation au froid par la préservation de la fluidité membranaire. Cette acclimatation thermique s'effectue via des changements dans la composition des phospholipides, des acides gras et du contenu en cholestérol (Hazel et Williams, 1990). Le cholestérol est une composante essentielle des membranes animales avec des multiples effets sur leurs propriétés physiques incluant la fluidité membranaire, l'épaisseur et la perméabilité (Crockett, 1998). Il stabilise les membranes en augmentant l'ordre des acides gras entourant ces molécules dans les phases fluides des membranes plus importantes lorsque la température augmente.

Pour ce qui est de l'impact de la qualité de l'alimentation, exprimée ici par le type de microalgue et/ou de mélange utilisé, nos résultats ont montré sans ambiguïté que l'apport de la

seule *C. calcitrans forma pumilum* (Cp) autorise un développement larvaire et des taux de compétence et de métamorphose notables, confirmant des résultats antérieurs chez la même espèce, où occasionnellement, des résultats équivalents voire supérieurs à un régime plurispécifique TCp (Millican et Helm, 1983 ; Nascimento, 1980). En effet, tous les mélanges incluant la diatomée *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* se sont caractérisés par un niveau de réserves élevées conjointement à un bon développement larvaire ( $> 12 \mu\text{m j}^{-1}$ , métamorphose  $> 55\%$ ). De plus, nos résultats sont en concordance avec ceux de Helm et Laing (1988), Utting et Spencer (1991) qui préconisent l'utilisation du mélange bispécifique TCp, pour l'obtention de performances optimales chez les larves de *C. gigas* et ce dès leur plus jeune âge (2<sup>e</sup> j). Il est également intéressant de noter que ce régime bispécifique TCp conduit aux mêmes performances de développement larvaire de l'huître creuse qu'un mélange trispécifique PTCp, comme déjà avancé par Rico-Villa *et al.* (2006). Par contre, les autres régimes monospécifiques à base de *P. lutheri* (P) et *I. aff. galbana* (T) ainsi que leur association (PT) n'autorisent pas l'obtention de larves compétentes à l'issue de 18 jours d'élevage. Au début de phase exotrophe (J8), on note chez les larves alimentées par l'une ou l'autre de ces deux microalgues un très faible indice lipidique global ( $< 5\%$ ) qui peut être expliqué par une faible ingestion de ces espèces. La médiocrité de la valeur alimentaire d'*I. aff. galbana* pour la croissance larvaire de *C. gigas* a été déjà signalée par Helm et Laing (1988) qui ont relevé une forte mortalité ( $> 60\%$ ) dès le treizième jour d'élevage chez les larves recevant ce régime. Il en est de même pour *P. lutheri*, dont l'inadéquation a été expliquée par l'absence d'ingestion par les larves et post-larves de *C. gigas* (Ponis *et al.*, 2003 ; Ponis *et al.*, 2006 a et b). Cet apport exclusif de *P. lutheri* s'est traduit, dans le cadre de cette étude, par une mise en réserve lipidique particulièrement faible ( $0,3\% < \text{IG} < 4\%$ ) et des performances larvaires médiocres ( $6 \mu\text{m j}^{-1}$  et absence de métamorphose). Ces deux flagellés ont une même teneur en lipides et l'apport quantitatif en acides gras polyinsaturés à longue chaîne est similaire (Langdon et Waldock, 1981, Delaunay *et al.*, 1993).

On note aussi que leur association à Cp permet d'augmenter fortement l'indice lipidique global des larves tout en restant inférieur à celui correspondant à l'apport exclusif de diatomée en fin d'élevage. Ces résultats confirment bien que les larves de *Crassostrea gigas* exercent une ingestion préférentielle de cette Diatomophycée par rapport aux deux autres Prymnesiophycées et ce malgré une taille similaire (Rico Villa *et al.*, 2006).

Dans les phases les plus avancées du développement larvaire, un indice lipidique global supérieur semble indiquer que l'algue *I. aff. galbana* serait mieux ingérée que *P. lutheri*. De plus, en association avec *I. aff. galbana* et *C. calcitrans forma pumilum*, *P. lutheri* affecte

négativement leur ingestion comme l'indique la baisse des réserves lipides enregistrée au 15<sup>e</sup> jour. Que ce soit seule ou en association l'apport nutritionnel de *Pavlova lutheri* est faible chez *Crassostrea gigas* et cette algue ne présente donc qu'un intérêt limité chez cette huître au niveau larvaire.

Compte tenu de ces résultats, l'importance des lipides dans les performances d'élevage (croissance et métamorphose) se dégage clairement. Powell *et al.* (2002) notent que des régimes riches en lipides et pauvres en protéines se sont avérés particulièrement efficaces pour la croissance larvaire de *C. gigas*. A l'opposé, en présence d'un faible apport lipidique, les larves sont incapables de stocker la quantité de lipides nécessaire à l'accomplissement de la métamorphose. Par conséquent, l'indice lipidique global serait intéressant dans la mesure où il permet de renseigner sur l'état des réserves lipidiques dès la première semaine. Si celles-ci sont faibles (< 4%), il est inutile de poursuivre l'élevage. En revanche, des teneurs lipidiques importantes ne garantissent pas le succès final d'un élevage puisqu'une consommation drastique des lipides peut avoir lieu, suite à un ou plusieurs facteurs (stress, faible apport phytoplanctonique, régime alimentaire non adéquat...), rendant ainsi les larves incapables de subvenir aux besoins de la métamorphose.

L'influence du niveau trophique sur la gestion des réserves lipidiques précise que l'ingestion algale ainsi que la mise en réserve des lipides neutres sont d'autant plus importantes que la concentration phytoplanctonique apportée est forte, jusqu'à une certaine limite qui n'est pas atteinte au cours de cette expérimentation.

Rappelons que les larves sous-alimentées ont montré de bas niveaux de réserves lipidiques ( $1\% < \text{ILG} < 10\%$ ) conjointement à une moindre croissance ( $9\ \mu\text{m j}^{-1}$ ), compétence et métamorphose (32 et 50 %, respectivement). A l'inverse, les larves suralimentées se caractérisent par une abondance de réserve lipidiques ( $15\% < \text{ILG} < 30\%$ ) concomitamment à de meilleures performances (croissance de  $18\ \mu\text{m j}^{-1}$  et taux de métamorphose de 80 %).

Il est à noter que pour des rapports lipidiques, significativement différents, relevés juste avant la métamorphose (22 et 31 % respectivement dans les cas de régimes modéré et fort), des taux de métamorphose proches sont obtenus (respectivement 84 et 86 %). Ceci veut dire qu'à partir d'un certain seuil (ici  $200\ \text{cellules}\ \mu\text{l}^{-1}$ ), l'effet de la ration algale apportée en fin d'élevage sur le développement postlarvaire devient faible voire nul. Pernet *et al.* (2004) ont démontré que chez *Mytilus edulis*, des apports d'*Isochrysis* sp. additionnés de microsphères lipidiques imprégnées de triacylglycérols, juste avant la métamorphose, entraînent une augmentation de la teneur en triacylglycérols chez les larves en fonction de la proportion de triacylglycérols ajoutée à la nourriture mais le succès de la fixation n'était pas affecté.

La relation entre l'indice lipidique global et les performances zootechniques n'est cependant pas absolue puisque par exemple la ration de référence générant un moindre stockage lipidique, comparativement à une double ration alimentaire, entraîne des même taux de survie et de métamorphose larvaires. Par ailleurs, cet indice ne prend pas en compte l'intensité de la coloration puisque seul le rapport de surface est considéré. Enfin, cet indice présente des limites en terme d'application puisqu'elle nécessite un appareillage particulièrement adapté. D'une part, un réglage microscopique fin et reproductible (filtres, grossissement, lumière, etc.) doit être mis en place. D'autre part, un réglage minutieux des paramètres de la caméra couleur (gain, exposition, saturation des couleurs, etc.) doit être fixé au préalable pour une acquisition uniforme d'images au cours de la même série expérimentale. La visualisation microscopique de la surface larvaire en trois dimensions semble être une alternative intéressante et mérite d'être signalée comme perspective. Ainsi, cette méthode permettrait la visualisation de l'ensemble de l'animal par balayage laser et une meilleure appréciation des réserves lipidiques pourrait en découler, alors qu'en microscopie classique, seul un plan de coupe de l'objet est analysé. Un nouvel indice lipidique global pourrait ainsi être mis au point comme étant le rapport d'un volume de l'image occupée par les lipides sur le volume total de l'individu.





**Influence de la température sur les performances et  
la qualité physiologique des élevages larvaires de *C.*  
*gigas***



## **4. Influence de la température sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de *C. gigas***

### **4.1. Cadre expérimental**

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une short note parue dans **Aquaculture**, **309 (2010), 286-289**.

#### **4.1.1. Elevages larvaires**

Après fécondation contrôlée de gamètes issus de trois mâles et six femelles, les larves qui en résultaient étaient élevées, en flux ouvert, à la densité de 30 larves ml<sup>-1</sup>, en bac cylindro-conique de 150 L, à 18, 22, 28 et 32°C. Ces températures ont été maintenues constantes tout au long de l'élevage grâce à des vannes automatiques de régulation thermique (voir matériels et méthodes détaillés). Les larves ont été nourries en continu par un mélange composé d'*Isochrysis affinis galbana* (T-ISO: souche CCAP 928/14) et *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (souche CCAP 1010/05) en égale quantité en équivalent volume. La quantité de nourriture fournie au cours de l'élevage dépend de l'accroissement de la biomasse mais une concentration phytoplanctonique de 1000 µm<sup>3</sup> µl<sup>-1</sup> (18 cellules µl<sup>-1</sup>) a été maintenue en continu par augmentation progressive de la ration quotidienne à l'entrée du système d'élevage.

#### **4.1.2. Analyses biochimiques**

L'évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) a été suivie tous les deux jours en récupérant un nombre déterminé de larves allant de 10 000 à 200 000, en fonction du stade larvaire. Le suivi des teneurs des triacylglycérols (TAG) et des stérols (ST) a été effectué tous les deux jours par prélèvement d'un nombre déterminé de larves allant de 25 000 à 100 000, selon leur âge (voir chapitre Matériels et méthodes détaillé).

### 4.1.3. Analyses statistiques

Les différences significatives entre les moyennes ont été détectées au seuil de significativité de 5 % par ANOVA et par test à posteriori de comparaison multiple de moyennes (test de Scheffé), après transformation préalable des résultats, exprimés en pourcentage, par la fonction [arcsin (racine xi/100)], grâce au logiciel Statview 5.

### 4.2. Performances d'élevage larvaire

Quelle que soit la température de l'élevage, les survies enregistrées en fin de développement larvaire sont élevées (> 90 % : tableau 9). La croissance est nettement affectée par la température d'élevage. A 18 et 22°C, les taux de croissance sont faibles et sont respectivement de 8 et 8,8  $\mu\text{m j}^{-1}$  (tableau 9). Ils sont plus importants à plus forte température 10,6  $\mu\text{m j}^{-1}$  à 28 et 32°C. Ceci implique que plus la température est élevée, plus le cycle larvaire est court (18 j à 32°C vs 23 j minimum à 18°C : tableau 9). A 18°C, le nombre de larves compétentes n'est que de 18 % au vingt troisième jour n'engendrant que 12 % de post larves (tableau 9). Aux plus fortes températures, le taux de compétence est compris entre 33 et 43 %. Le taux de métamorphose est également nettement favorisé à forte température. Ainsi, à 32°C, un taux de 91 % est enregistré vs 25 % à 22°C (tableau 9).

Température (°C)	Fin d'élevage (j)	Survie en fin d'élevage (%)	Taux de croissance ( $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ )	Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
18	23	92,0 (6,6)	8,1 (1,8)	18 (3)	12 (8)
22	21	91,0 (5,4)	8,8 (1,8)	38 (10)	25 (3)
28	18	93,6 (2,8)	10,6 (1,8)	33 (4)	58 (1)
32	18	92,4 (2,9)	10,5 (1,9)	43 (6)	91 (1)

Tableau 9 : performances (moyenne  $\pm$  écart-type) des élevages larvaires de *C. gigas* soumises à différentes températures de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005).

Pendant la première semaine, les larves évoluent lentement avec des taux de croissance compris entre 4,5 et 8,9  $\mu\text{m j}^{-1}$ , toute température confondue. A ce stade, les différences de taille sont peu marquées en fonction de la température de l'élevage. Ainsi, la longueur moyenne initiale d'une larve au second jour est de 80  $\mu\text{m}$  et de 113-125  $\mu\text{m}$  au septième jour, entre 22 et 32°C mais seulement de 103  $\mu\text{m}$  à 18°C (figure 24). Pendant la deuxième semaine, les taux de croissance augmentent à 22-32°C et sont compris entre 13,0 et 14,8  $\mu\text{m j}^{-1}$ , tandis qu'à 18°C, la croissance reste faible (5,3  $\mu\text{m j}^{-1}$ ). Les différences de taille en fonction de la température deviennent plus accentuées notamment entre la plus basse température (18°C), avec une longueur de 140  $\mu\text{m}$  relevée au quatorzième jour, et le reste des températures testées (204, 228 et 220  $\mu\text{m}$  respectivement à 22, 28 et 32°C). Avec seulement 229  $\mu\text{m}$  au vingt-troisième jour, à 18°C, les larves n'atteignent pas la taille minimale de fixation. A l'inverse, une longueur moyenne de 248  $\mu\text{m}$  est relevée au vingt-et-unième jour à 22°C et au dix-huitième jour à 28 et 32°C.

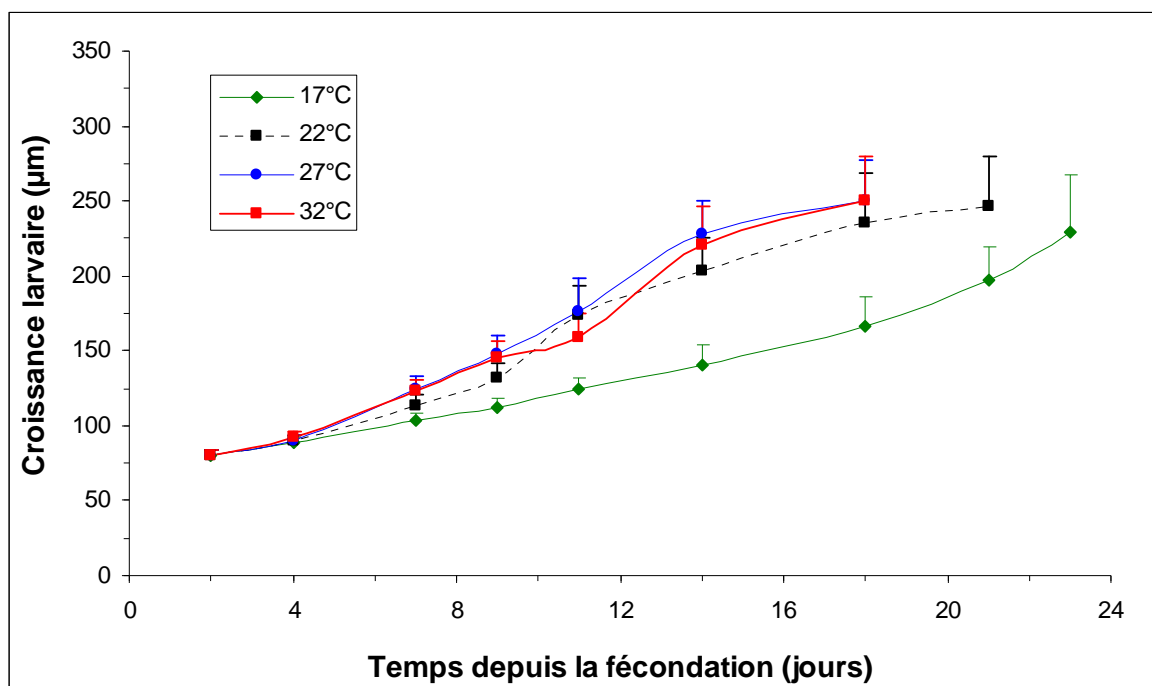


Figure 24 : croissance larvaire observée chez *C. gigas* soumise à différentes températures d'élevage de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales représentent les écarts-types ( $n > 100$ ).

### 4.3. Indice de condition larvaire

Le poids sec initial relevé au second jour est de  $189 \pm 28$  ng larve<sup>-1</sup> (figure 25). Au septième jour, des différences de poids sec en fonction de la température, notamment entre les deux conditions extrêmes 32 et 18°C sont relevées, avec des valeurs respectives de  $662 \pm 30$  et  $428 \pm 69$  ng larve<sup>-1</sup>. Ainsi, pendant la première semaine, des taux d'accroissement respectifs de 95 et 48 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> ont été notés. Au quatorzième jour, ces différences pondérales sont nettes : plus la température d'élevage est élevée, plus le poids sec enregistré est important. Ainsi, à 32°C, une valeur de  $2602 \pm 540$  ng larve<sup>-1</sup> est relevée tandis qu'à 18°C, le poids sec ne dépasse pas  $965 \pm 53$  ng larve<sup>-1</sup>.

A 22 et 28°C, les poids secs sont respectivement de  $1845 \pm 413$  et  $2189 \pm 510$  ng larve<sup>-1</sup>. Les taux d'accroissement entre le septième et quatorzième jour sont, de la plus faible température à la plus forte, de 88, 169, 225 et 288 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. En fin d'élevage larvaire, à 28 et 32°C (18<sup>e</sup> j), des poids secs respectifs de  $3000 \pm 53$  et  $3625 \pm 18$  ng larve<sup>-1</sup> sont relevés. A plus basse température, le développement larvaire est ralenti et le cycle pélagique est allongé. De ce fait, des valeurs importantes de poids sec sont enregistrées. Ainsi, à 18 et 22°C, les cycles larvaires sont de 23 et 21 jours respectivement et des valeurs respectives de  $4800 \pm 589$  et  $6500 \pm 8$  ng sont notées. Ces observations sont confirmées par la représentation graphique de l'évolution du poids sec au cours du temps, en fonction des températures (figure 25) qui montre que l'accumulation pondérale suit une loi de croissance exponentielle en fonction du temps ( $PS = ae^{bt}$ ) et que les vitesses (b) sont croissantes selon l'ordre : 18°C < 22°C < 28°C < 32°C. A forte température, les larves montrent un accroissement pondéral presque deux fois plus rapide que celui observé à 18°C.

Une même tendance générale est observée au cours de l'évolution de la matière organique (Figure 25). Des valeurs initiales de 46 ng larve<sup>-1</sup> sont enregistrées au second jour. A basses températures et jusqu'au quatorzième jour, des valeurs ne dépassant pas 250-260 ng larve<sup>-1</sup> sont notées vs 600 ng larve<sup>-1</sup> à 32°C. En fin d'élevage larvaire (23<sup>e</sup> j à 18°C et 21<sup>e</sup> j à 22°C), la matière organique atteint 540 et 650 ng larve<sup>-1</sup> respectivement. A plus forte température, des valeurs similaires sont atteintes dès le dix-huitième jour. La représentation graphique de l'évolution de la matière organique (figure 25) montre une accumulation pondérale obéissant également à une loi de croissance exponentielle en fonction du temps ( $MO = ae^{bt}$ ) et que la vitesse d'accumulation de la matière organique est supérieure à 32°C qu'à

18°C. Pour les deux températures intermédiaires (22 et 28°C), les vitesses sont voisines (0,126 et 0,129 respectivement).

A l'instar de l'expérimentation relative à l'incidence de la ration alimentaire, l'indice de condition MO/PS montre un schéma global similaire quelle que soit la température d'élevage, avec un effondrement des valeurs en fin du cycle larvaire. Ainsi, la valeur initiale de 24 % au second jour atteint 9 à 13 % en fin d'élevage (figure 26). Aucune différence significative n'a été détectée entre les rapports enregistrés à différentes températures ( $p > 0,05$ ).

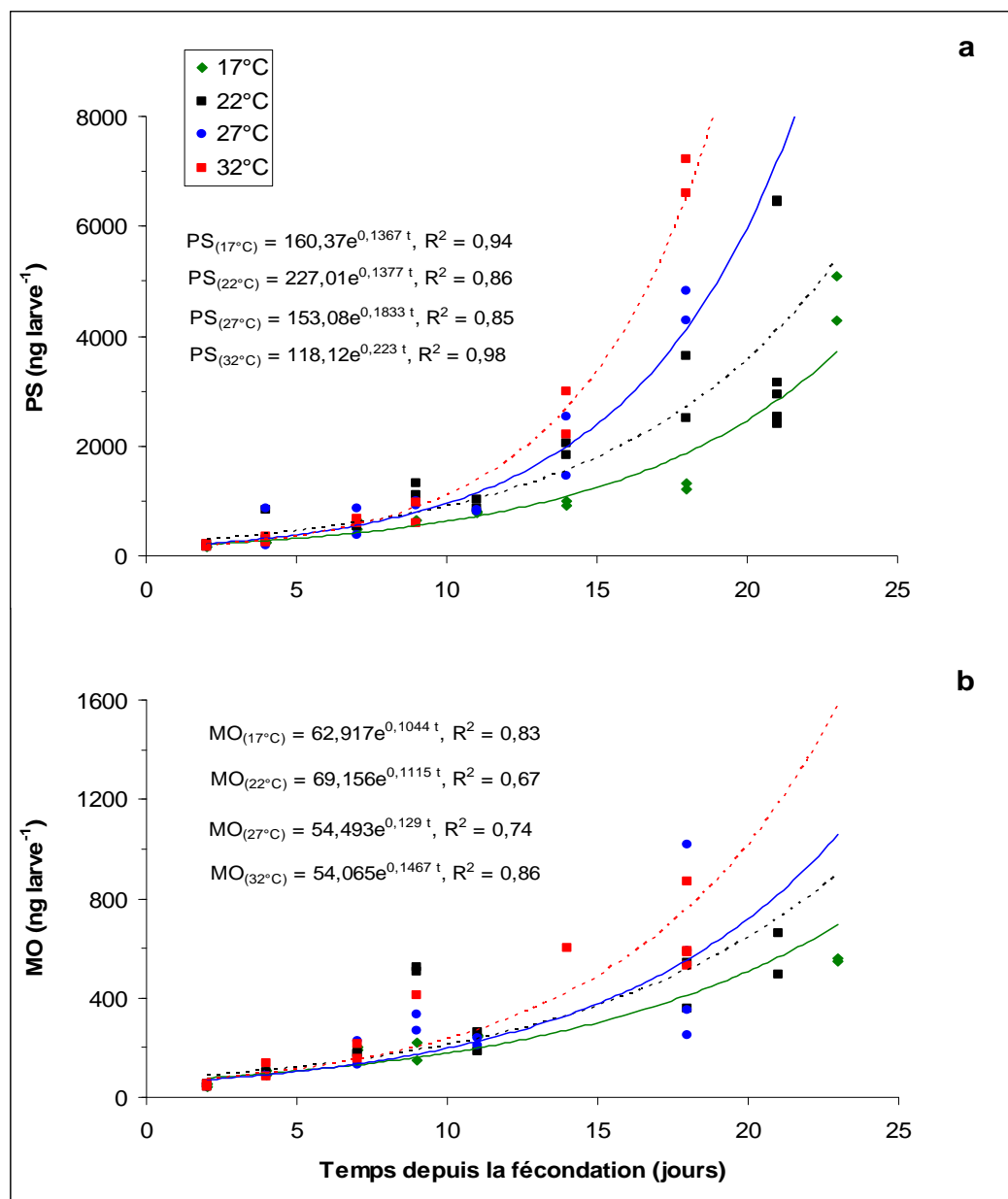


Figure 25 : évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) au cours du développement larvaire de *C. gigas*, soumise à quatre températures d'élevage de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005) (n=2).

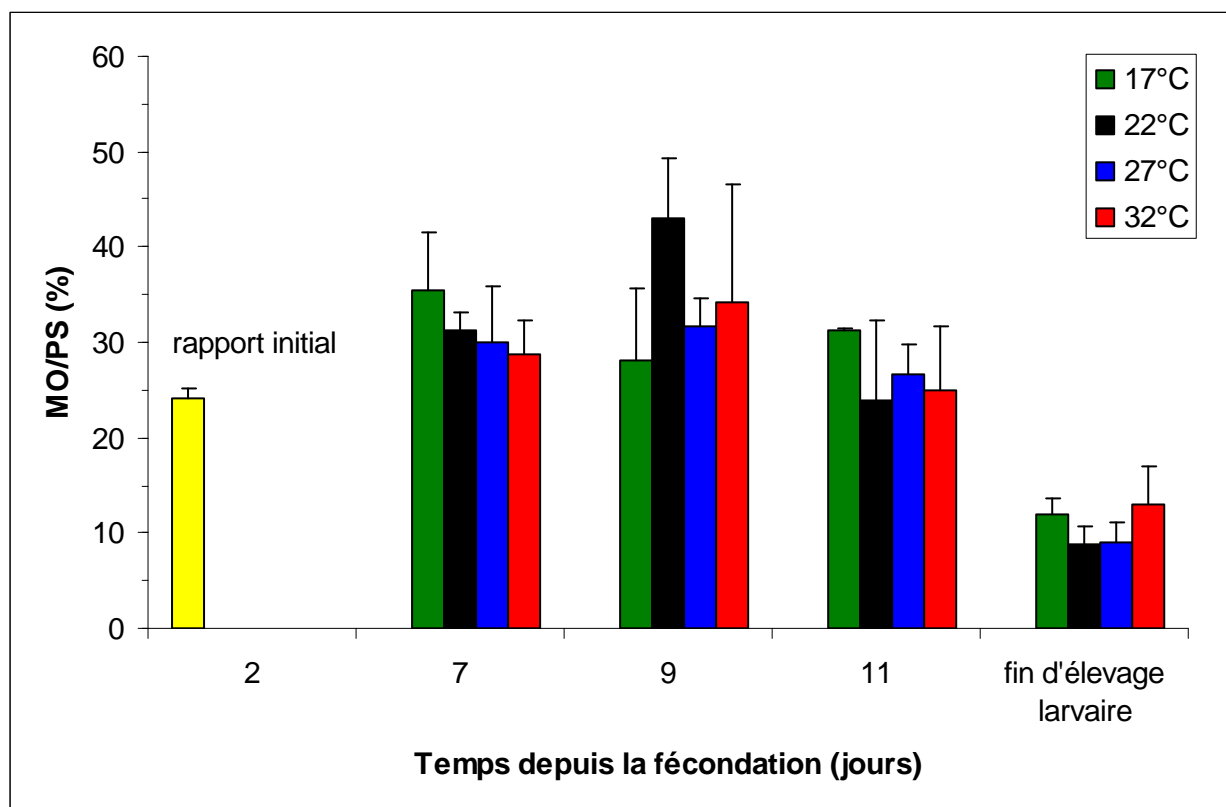


Figure 26 : évolution du rapport MO/PS (%) au cours du développement larvaire de *C. gigas*, soumise à différentes températures d'élevage de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales représentent les écart-types (n=2).

#### 4.4. Indice biochimique structurel

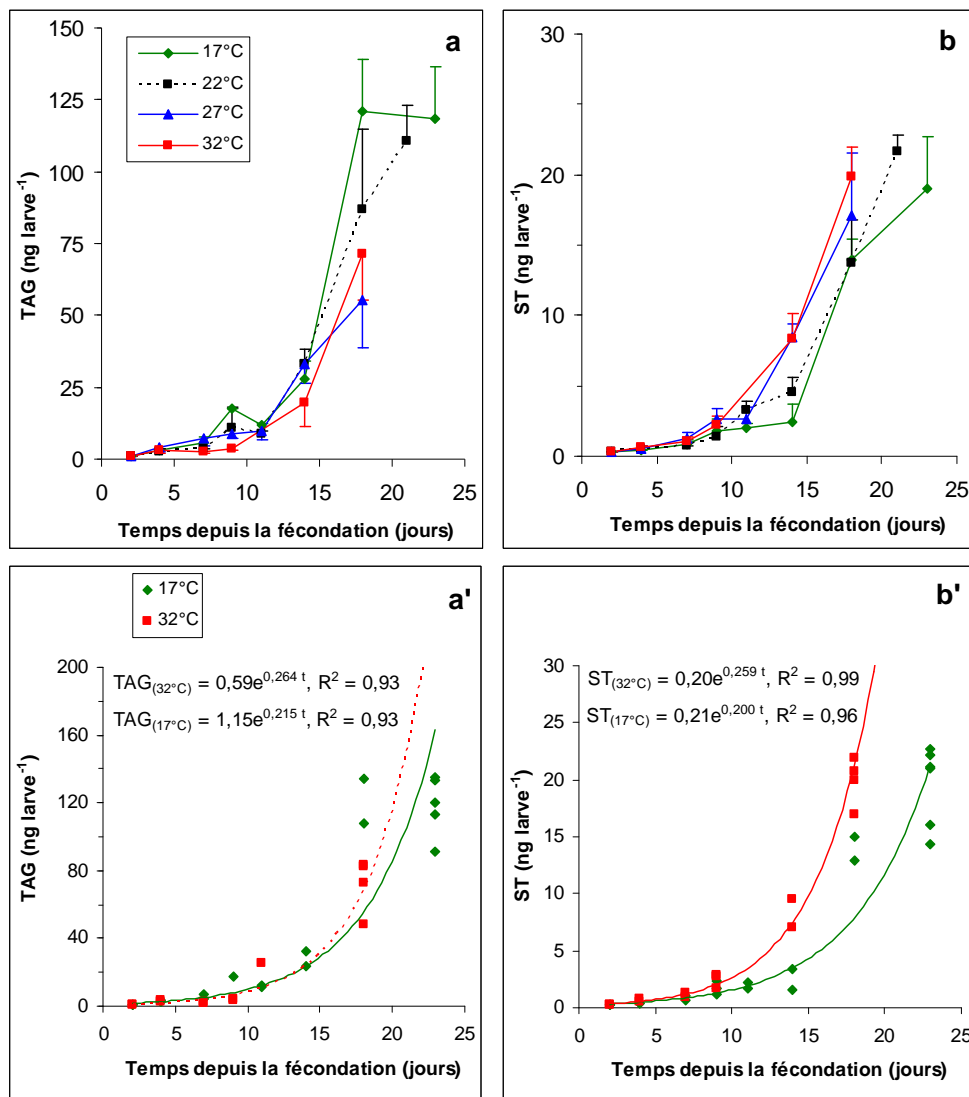
L'évolution des triacylglycérols montre que les basses températures entraînent un enrichissement des larves, en ce composé biochimique, en fin d'élevage (figure 27 a). Ainsi, à 18 et 22°C, des concentrations respectives de  $119 \pm 18$  et  $111 \pm 12$  ng larve<sup>-1</sup> sont enregistrées, en fin de développement larvaire (23<sup>e</sup> et 21<sup>e</sup> j), tandis qu'aux plus fortes températures (28 et 32°C), les valeurs finales (18<sup>e</sup> j) sont respectivement comprises entre  $55 \pm 18$  et  $81 \pm 16$  ng larve<sup>-1</sup>. Il est à noter qu'à 18°C, une augmentation brusque s'est effectuée entre les quatorzième ( $28 \pm 6$  ng larve<sup>-1</sup>) et dix-huitième jours ( $121 \pm 18$  ng larve<sup>-1</sup>) au cours de laquelle les valeurs ont presque quadruplé mais sont restées constantes jusqu'à la fin du développement larvaire.

L'évolution des stérols (figure 27 b) montre une tendance opposée, à savoir que des teneurs plus faibles,  $14 \pm 1$  et  $14 \pm 3$  ng larve<sup>-1</sup> sont notées respectivement à 18 et 22°C au dix-huitième jour vs  $18 \pm 4$  et  $20 \pm 2$  ng larve<sup>-1</sup> à 28 et 32°C. Cependant, à partir de cette date, un



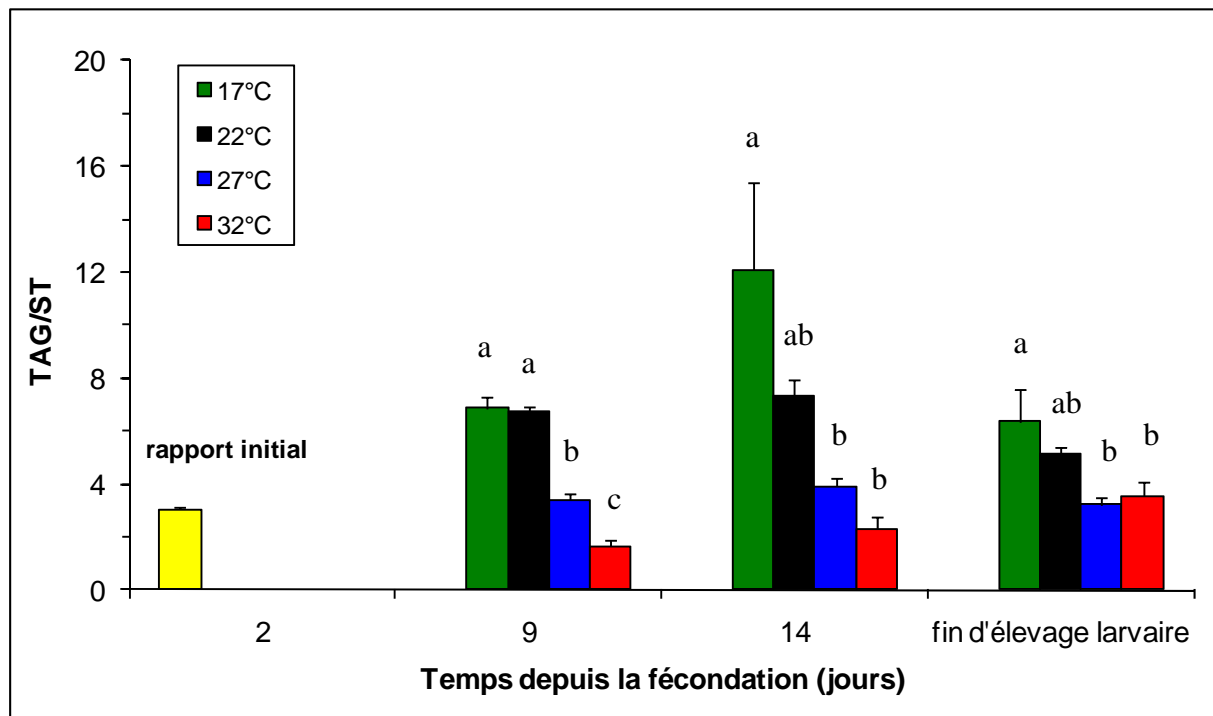
rajustement est opéré. En effet, aux basses températures, les quantités finales de stérols atteignent respectivement  $20 \pm 3$  et  $22 \pm 1$  ng larve<sup>-1</sup>.

Les figures (27 a' et b') résument l'évolution des triacylglycérols et des stérols en fonction des deux températures les plus extrêmes (18 et 32°C). Il en ressort que l'équation modélisant l'accumulation des triacylglycérols au cours du développement larvaire ne met pas en évidence cette tendance, en fin d'élevage, d'accumulation de ce composé à basse température. Ceci est probablement dû au tassement des valeurs à 18°C entre les dix-huitième ( $121 \pm 18$  ng larve<sup>-1</sup>) et vingt-troisième jours ( $119 \pm 18$  ng larve<sup>-1</sup>). Par contre, la disposition des larves élevées à 32°C à accumuler les lipides de structure (stérols), nécessaires à la construction de leurs membranes, se dégage nettement, contrairement aux individus élevés à basse température qui présentent des teneurs relativement plus faibles, sauf en fin de vie larvaire.



**Figure 27 :** évolution des triacylglycérols TAG (a et a') et des stérols ST (b et b') chez les larves de *C. gigas*, soumises à différentes températures de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 2).

L'évolution du rapport TAG/ST aux second, neuvième, quatorzième jours et en fin d'élevage larvaire (18-23° j), en fonction de la température est représentée dans la figure 28. Au début du cycle larvaire (2<sup>e</sup> j), le rapport affiche une valeur initiale de 3. Puis, et ce durant tout le développement, plus la température est basse, plus ce rapport est élevé. Ainsi, à 18°C, les valeurs sont comprises entre 6 et 8, avec un pic relevé au quatorzième jour (12). Il en est de même à 22°C, où les valeurs ne sont pas significativement différentes de celles enregistrées à 18°C ( $p > 0,05$ ). En revanche, à 28 et 32°C, le rapport ne dépasse pas la valeur de 4.



**Figure 28 :** évolution de l'indice biochimique structurel TAG/ST chez les larves de *C. gigas*, soumises à différentes températures de 18 à 32°C (Gig0505, mai 2005). Les barres verticales représentent les écart-types (n=2). Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 4.5. Discussion

Quelle que soit la température d'élevage, les survies relevées en fin de développement larvaire sont élevées (> 91 %) et aucun effet de ce paramètre sur la mortalité n'a été mis en évidence. Ceci témoigne de l'efficacité d'un système à flux ouvert. A l'inverse, l'influence de la température sur la croissance larvaire se dégage clairement. Cependant, la quantité de nourriture apportée n'était pas suffisante ( $15 \text{ cellules } \mu\text{l}^{-1}$ ) pour engendrer de forts taux de croissance ( $8-10,6 \mu\text{m j}^{-1}$ ). Des améliorations ont été apportées ultérieurement au système et il

a été démontré qu'une quantité de 30 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$  devrait être apportée continuellement aux larves pour un résultat optimisé (Rico-Villa, *com. pers.* 2008).

Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que la croissance larvaire chez les bivalves est d'autant plus importante et la vie larvaire d'autant plus courte que la température est élevée (Loosanoff et Davis, 1963 ; Marteil, 1989 ; Bayne 1983 ; Deksheniaks *et al.*, 1993). Ceci a été confirmé dans la présente étude, où à 32°C, des performances optimales ont été enregistrées pouvant s'expliquer par une assimilation supérieure des microalgues ingérées aux températures élevées (Loosanoff et Davis, 1963). A basse température une moindre ingestion pouvait expliquer de plus faibles taux de croissance ( $8 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et de métamorphose (12 %) à laquelle une moindre efficacité de la digestion n'était pas à exclure comme avancé chez la moule verte par Nair et Appukuttan (2003). Ces performances étant attendues, l'objectif était de les relier à l'évolution des deux indices MO/PS et TAG/ST.

L'étude de l'évolution du poids sec et de la matière organique en fonction des quatre températures montre une accumulation d'environ 1,5 fois plus importante à 32°C qu'à 18°C. Ceci traduit tout simplement une croissance larvaire plus rapide à forte température. En revanche, le rapport MO/PS, quant à lui, ne met pas en évidence des différences significatives en fonction du régime thermique imposé. Chez les larves de *M. edulis*, Lucas *et al.* (1986) ont rapporté qu'à 15°C, le rapport MO/PS présente des valeurs minimales plus faibles à 15°C qu'à 20°C. Dans la présente étude et à l'instar de l'expérimentation relative à l'impact de la quantité de nourriture, le rapport MO/PS est élevé et stable, jusqu'au onzième jour puis une chute brusque est enregistrée juste avant la métamorphose (9-13 %). Cette baisse de matière organique relative (MO/PS) est expliquée par une production minérale relativement plus importante que celle de la fraction organique, et par conséquent elle traduit une croissance coquillière plus rapide. Cette baisse pré métamorphique a été signalée par Dwiono *et al.* (1991) chez *P. maximus* dont le rapport MO/PS chute de 43 à 28 % du dix-huitième au vingt-huitième jour alors que la fixation des individus a été détectée à partir du vingt-troisième jour. Là encore, le rapport MO/PS n'est pas apte à traduire les écarts de performances réalisées. Il semble être un mauvais indicateur de qualité chez les larves de *C. gigas* du fait de la difficulté de la séparation de la chair et de la coquille. Cette méthode présente, donc, une surestimation de la matière organique car celle de la coquille est prise en compte. A ce propos, Walne et Millican (1988) ont démontré que, chez le naissain de *C. gigas*, la coquille renferme 3 à 5,2 % de matière organique et que vue l'importance en poids de celle-ci, cette fraction organique représente 35 à 59 % de la matière organique totale de l'animal. De plus, selon Rainer et Mann (1992), un indice de condition fiable doit comporter un numérateur sensible et fluctuant par rapport à un dénominateur stable et stationnaire. Or, chez *C. gigas*, aussi bien la matière

organique que le poids sec constituent deux paramètres fortement variables au cours du cycle larvaire.

Nos résultats démontrent par ailleurs, qu'à basse température, il y a une accumulation préférentielle des triacylglycérols, le groupe principal de lipides de réserve, tandis qu'à forte température, c'est l'accumulation des stérols, composés essentiels à la constitution et au fonctionnement des membranes cellulaires qui est favorisée. Etant donné que la capacité à synthétiser ou bio convertir les stérols est faible voire absente chez les bivalves (Soudant *et al.*, 1998), on ne peut que déduire qu'à forte température l'incorporation des stérols à partir des microalgues fournies est favorisée. A l'inverse, à basse température, le métabolisme larvaire est ralenti et un stockage d'énergie sous forme de triacylglycérols s'opère. Ceci a été corrélé chez certaines microalgues au stress engendré par les conditions de culture (Parrish et Wangersky, 1990 ; Pernet *et al.*, 2008). Nos résultats montrent par ailleurs que plus la température est élevée, plus les valeurs du rapport TAG/ST sont faibles (1-3 à 32°C et 6-12 à 18°C) et plus les élevages sont performants en terme de croissance, compétence et de métamorphose. Mais les survies restent toutefois comparables (91-94 %). Par conséquent, les meilleures performances sont associées à de faibles valeurs de TAG/ST. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Pernet *et al.* (2008) qui ont rapporté une corrélation positive entre ce ratio et la survie larvaire chez *P. magellanicus*. A l'instar de l'indice lipidique global, le rapport TAG/ST ne peut pas être relié aux performances larvaires dans ce type d'expérimentation puisque, comme on a vu dans le chapitre précédent, les bivalves ont la capacité d'introduire de plus ou moins grande quantité de cholestérol dans leurs membranes pour maintenir la fluidité membranaire en réponse aux changements thermiques (Pernet *et al.*, 2006b). En effet, la composition lipidique et en acides gras des membranes cellulaires est hautement sensible au régime thermique. Pour compenser l'effet thermique, les animaux ectothermes agissent sur la fluidité membranaire en modifiant la composition en lipides membranaires. Ce processus est connu sous le nom d'adaptation homéovisqueuse (Hazel, 1995). Cette étude nous a montré que cette théorie est fonctionnelle chez les bivalves dès le stade larvaire.

**Influence de la nourriture sur les performances et  
la qualité physiologique des élevages larvaires de *C.*  
*gigas* : aspects quantitatifs**



## **5. Influence de la nourriture sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de *C. gigas***

### **5.1. Cadre expérimental**

Les résultats de cette partie de l'étude ont fait l'objet d'une publication parue dans *Aquaculture*, **305** (2010, 165-183).

#### **5.1.1. Elevages larvaires**

L'influence de la quantité de nourriture sur les performances d'élevage larvaire et l'expression des indices de qualité (MO/PS et TAG/ST) tout au long du cycle pélagique chez les larves de *C. gigas* a été étudiée dans ce chapitre.

Ainsi, à 25°C, les larves ont été soumises à trois niveaux trophiques, ration de référence [50 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$  (semaine 1) puis 100 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$  (semaine 2) et 200 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$  (semaine 3)], demi ration (25-100 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ), et double ration (100-400 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ) d'un mélange bispécifique d'*Isochrysis affinis galbana* (T) et de *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* (CCAP 1010/05 (Cp)) distribuées 50/50 en équivalent volume.

L'expérimentation s'est déroulée en système séquentiel, à raison de 5 larves  $\text{ml}^{-1}$  dans trois bacs cylindro-coniques de 150 l, considérés comme des témoins de référence et destinés au suivi du développement larvaire (croissance et survie) du fait de la constance de la densité larvaire tout au long du cycle, et trois bacs cylindro-coniques de 450 l pour les prélèvements biochimiques (indices physiologiques) nécessitant un grand nombre de larves ainsi qu'à l'étude de la métamorphose. L'effet bac/volume (150 l / 450 l) avait été testé préalablement et aucune différence significative de performances larvaires n'était mise en évidence (Nicolas, 1999).

#### **5.1.2. Analyses biochimiques**

L'évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) a été suivie tous les deux jours en échantillonnant un nombre déterminé de larves allant de 10 000 à 200 000, en

fonction du stade larvaire. Le suivi des teneurs des triacylglycérols (TAG) et des stérols (ST) a été effectué tous les deux jours par prélèvement d'un nombre déterminé de larves allant de 25 000 à 100 000, selon leur âge (voir chapitre matériels et méthodes détaillé).

### **5.1.3. Analyses statistiques**

Les différences significatives entre les moyennes ont été détectées au seuil de significativité de 5 % par ANOVA et par test à posteriori de comparaison multiple de moyennes (test de Scheffé), après transformation préalable des résultats, exprimés en pourcentage, par la fonction [arcsin (racine xi/100)], grâce au logiciel Statview 5.

## **5.2. Performances d'élevage larvaire**

La croissance larvaire en fonction de trois régimes alimentaires est représentée dans la figure 29. La quantité de nourriture administrée présente une influence remarquable sur la croissance larvaire. Pendant la première semaine d'élevage, aucune différence significative de croissance n'est révélée. Ainsi, les larves mesurant initialement 88  $\mu\text{m}$  au deuxième jour atteignent une taille comprise entre 132 et 138  $\mu\text{m}$  au septième jour, tous régimes confondus. Au delà, la différence de taille est particulièrement marquée et les taux de croissance statistiquement différents selon le régime. Ainsi, au quatorzième jour, les larves plus faiblement alimentées ne mesurent que 192  $\mu\text{m}$  vs 281  $\mu\text{m}$  relevé chez les larves suralimentées. Les individus nourris selon la ration de référence présentent, au 18<sup>e</sup> j une longueur moyenne de 303  $\mu\text{m}$ . Ceux soumis à une double ration mesurent 309  $\mu\text{m}$  au 16<sup>e</sup> j et seulement 283  $\mu\text{m}$  au 25<sup>e</sup> j en présence d'une demi ration.

Les performances larvaires en fonction de trois régimes quantitativement différents sont représentées dans le tableau 10. La durée du cycle larvaire est significativement affectée par la quantité de nourriture administrée aux larves. Plus la concentration phytoplanctonique est importante plus le développement larvaire est rapide, conduisant à un cycle pélagique plus court (double dose : 16,5  $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$  pendant 16 j vs demi dose : 9  $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$  pendant 25 j ;  $p < 0,0001$ ). La ration de référence conduit à un développement intermédiaire (14  $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) et un cycle larvaire de dix huit jours. De même, la compétence est significativement plus importante chez les larves suralimentées (86 % vs 32 % chez les larves ayant reçu une demi ration ;  $p < 0,0001$ ). De plus, un retard de neuf jours est relevé pour ce critère lorsque seule une demi ration est apportée pour un taux de compétence trois fois moindre environ.



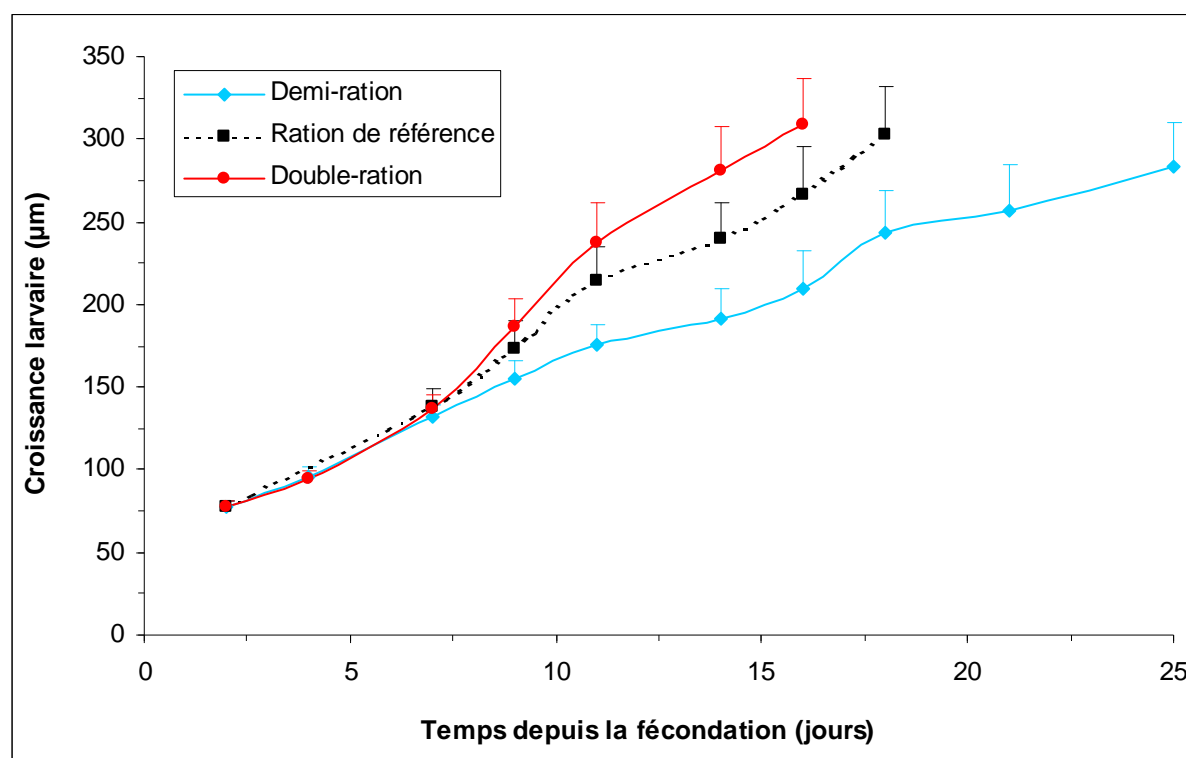


Figure 29 : croissance larvaire observée chez *C. gigas* soumise à trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005). Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n > 100$ ).

Par contre, alors que seulement 50 % post larves étaient dénombrés chez le lot recevant une demi ration, il n'y a pas de différences significatives entre la ration de référence et la double ration en terme de taux de métamorphose ( $\approx 80\%$  ;  $p = 0,1609$ ). Pour ces trois lots, la survie est élevée ( $> 86\%$ ).

Ration (cellules $\mu\text{l}^{-1} \text{j}^{-1}$ )	Fin d'élevage (jours)	Survie en fin d'élevage (%)	Taux de croissance ( $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ )	Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
Demi ration (25-100)	25	86 (5) <sup>a</sup>	9,0 (1,2) <sup>a</sup>	31,8 (1,3) <sup>a</sup>	49,8 (5,9) <sup>a</sup>
Ration de référence (50-200)	18	96 (2) <sup>b</sup>	14,1 (1,9) <sup>b</sup>	43,6 (4,6) <sup>b</sup>	83,5 (2,3) <sup>b</sup>
Double ration (100-400)	16	94 (2) <sup>ab</sup>	16,5 (1,9) <sup>c</sup>	86,2 (3,2) <sup>c</sup>	89,8 (9,9) <sup>b</sup>

Tableau 10 : performances (moyenne  $\pm$  écart-type) des élevages larvaires de *C. gigas* nourris selon trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005). Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 5.3. Indice de condition larvaire

Le poids sec des larves évolue progressivement pendant la première semaine (figure 30 a). Les teneurs passent d'environ 100 ng larve<sup>-1</sup> au second jour à 840-980 ng larve<sup>-1</sup> au septième jour, tous régimes confondus, sans déceler de différences significatives entre les trois rations apportées ( $p > 0,05$ ). A partir du neuvième jour, l'effet de la ration alimentaire devient plus marqué puisque les larves sous-alimentées présentent un poids sec de  $1214 \pm 28$  ng larve<sup>-1</sup>, significativement inférieur à celui noté chez les larves ayant reçu une ration de référence ( $p = 0,0453$ ). Ces dernières montrent, cependant, un poids sec non significativement différent de celui relevé chez les individus suralimentés ( $1828 \pm 45$  ng larve<sup>-1</sup>;  $p = 0,3408$ ). L'écart entre conditions ne se creuse réellement qu'à partir du quatorzième jour. Ainsi, à cette date, un faible apport en microalgues confère aux larves un poids sec moyen de  $2100 \pm 64$  ng larve<sup>-1</sup> tandis qu'une double ration permet l'obtention d'individus ayant un poids sec deux fois plus important ( $4899 \pm 332$  ng larve<sup>-1</sup>). Un apport modéré (ration de référence) est associé à des poids intermédiaires de  $3685 \pm 102$  ng larve<sup>-1</sup>. En fin de cycle planctonique, une larve fortement alimentée pèse en moyenne environ  $8630 \pm 820$  vs  $4668 \pm 45$  ng larve<sup>-1</sup> en cas de faible alimentation. Les individus nourris sur la ration de référence montrent un poids sec final intermédiaire ( $6000 \pm 506$  ng larve<sup>-1</sup>).

Quel que soit le régime, l'évolution du poids sec suit une croissance de type exponentiel en fonction du temps ( $PS = ae^{bt}$ ) avec des vitesses (b) croissantes selon l'ordre demi ration < ration de référence < double ration (figure 30 a). Soumises à un fort apport nutritionnel, les larves montrent un accroissement pondéral deux fois plus rapide que celui observé chez les larves sous alimentées.

Il en est de même pour la matière organique dont l'évolution montre des différences en fonction de la ration administrée dès la deuxième semaine. Le poids organique initial d'une larve D de deux jours passe de 32 ng à  $218 \pm 64$  ng larve<sup>-1</sup> chez les larves faiblement alimentées au quatorzième jour. Ce poids est environ 2,6 fois plus important chez les individus suralimentés ( $562 \pm 3$  ng larve<sup>-1</sup>;  $p = 0,0111$ ). Une ration modérée est associée à des poids de matière organique significativement inférieurs ( $p = 0,0418$ ;  $349 \pm 45$  ng larve<sup>-1</sup>). En fin d'élevage larvaire, un apport faible en microalgues est associé à une très faible valeur de matière organique ( $431 \pm 49$  ng larve<sup>-1</sup>) alors qu'une forte ration est reliée à un poids presque trois fois plus important ( $1202 \pm 359$  ng larve<sup>-1</sup>). La matière organique des larves ayant reçu

une ration moyenne se classe entre les deux catégories ( $638 \pm 55 \text{ ng larve}^{-1}$ ). La pente de l'équation modélisant l'accroissement de la matière organique montre, à l'instar de l'évolution du poids sec, que celle-ci croit environ deux fois plus rapidement chez les individus fortement alimentés

Le rapport MO/PS initial, noté chez les larves au second jour est de 32 % (figure 31). Chez les larves recevant la ration de référence, ce rapport subit une légère baisse au septième jour (25 %) puis se stabilise jusqu'au onzième jour (26 %). Au delà, une nouvelle baisse est relevée pour atteindre 9 % au quatorzième jour et 11 % en fin d'élevage larvaire (18<sup>e</sup> j). Il en est de même chez les larves sous-alimentées, et aucune différence significative avec la précédente condition n'est relevée, et ce durant toute l'expérimentation ( $p > 0,05$ ). Une seule différence est relevée dans cette évolution chez les larves suralimentées au septième jour ( $p = 0,0058$ ), où, contrairement aux deux autres régimes, le rapport MO/PS subit une augmentation notable avec une valeur de 40 %.

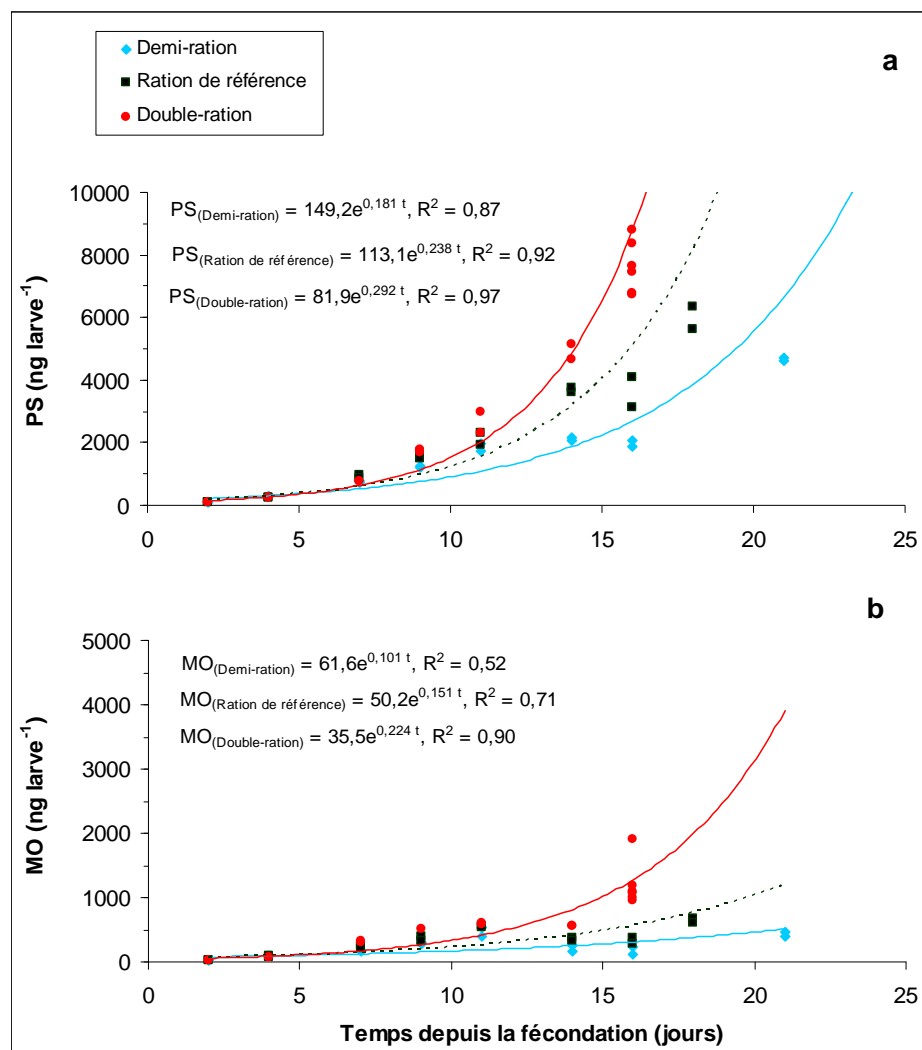


Figure 30 : évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) au cours du développement larvaire chez *C. gigas* soumise à trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005) ( $n = 2$ ).

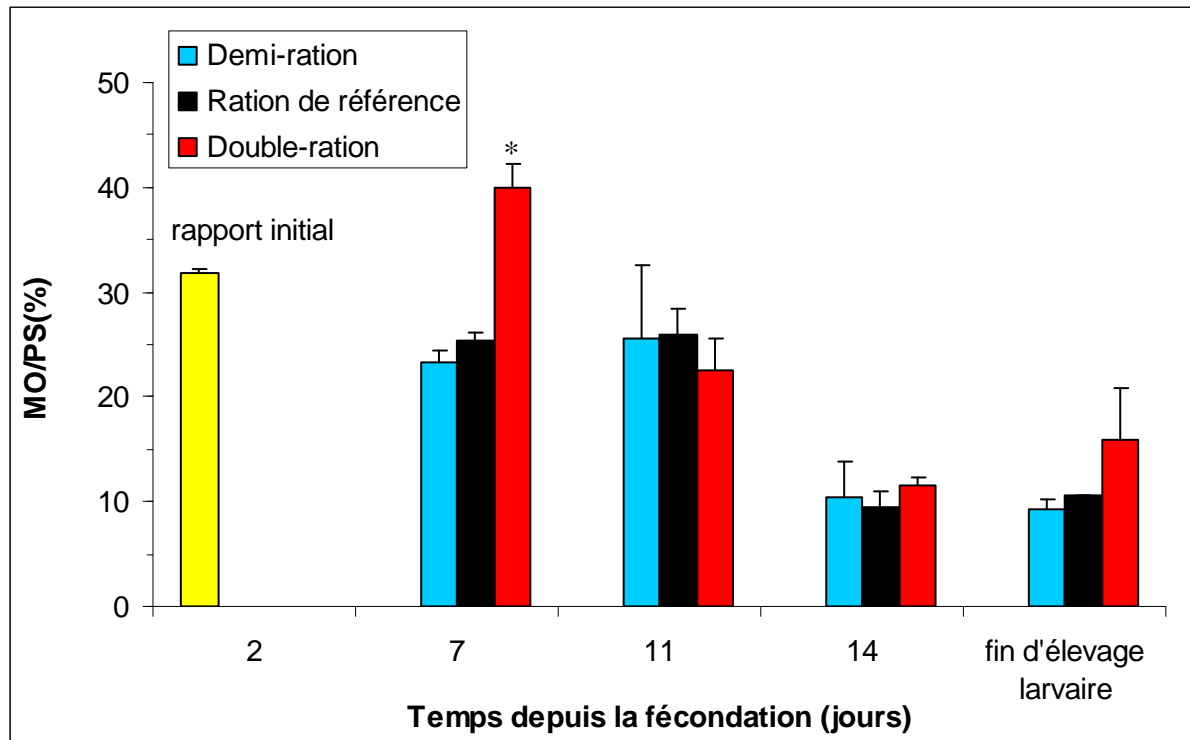


Figure 31 : évolution du rapport MO/PS (%) chez les larves de *C. gigas* soumises à trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005). Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 2). (\*) : indique une différence significative, au seuil de 5 %.

#### 5.4. Indice biochimique structurel

Dès la première semaine, l'accumulation des triacylglycérols et des stérols dans les larves est fortement dépendante de la quantité de nourriture apportée (figures 32 a et b). Chez les larves faiblement alimentées, les valeurs des triacylglycérols restent faibles et varient entre  $1,8 \pm 0,1$  ng larve<sup>-1</sup> au second jour à seulement  $28 \pm 8$  ng larve<sup>-1</sup> en fin d'élevage (25<sup>e</sup> j) vs des quantités finales de  $214 \pm 32$  ng larve<sup>-1</sup> (18<sup>e</sup> j) et  $238 \pm 81$  ng larve<sup>-1</sup> (16<sup>e</sup> j), respectivement pour les régimes moyen et fort. L'accumulation des triacylglycérols par larve suit une loi exponentielle en fonction du temps et des vitesses croissantes dans l'ordre demi ration < ration de référence < double ration (figure 32 a). Ainsi, les vitesses déduites des équations modélisant l'accroissement des triacylglycérols au cours du développement larvaire montrent que l'accumulation de ces lipides de réserve se fait 2,5 fois plus rapidement dans le cas d'un fort apport phytoplanctonique que dans le cas d'un faible apport.

Il en est de même pour les stérols bien que l'influence soit moins marquée (figure 32 b). Dans le cas d'une demi ration, les valeurs des stérols augmentent de  $0,4 \pm 0,0$  ng larve<sup>-1</sup> au deuxième jour à  $14,2 \pm 0,8$  ng larve<sup>-1</sup> en fin d'élevage vs  $26,5 \pm 3,9$  et  $29,4 \pm 1,4$  ng larve<sup>-1</sup> pour des larves plus abondamment nourries. L'accumulation des stérols par les larves au cours

de leur développement suit une loi exponentielle avec, là encore, des vitesses croissantes dépendant du régime administré, dans le même ordre que mentionné précédemment pour les triacylglycérols (figure 32 b).

Une relation positive entre niveau trophique et indice biochimique structurel TAG/ST se dégage (figure 33). Pour un faible apport phytoplanctonique, après une chute initiale de 5 à 2 du deuxième au septième jour, des valeurs basses et stables ( $\approx 2$ ) caractérisent ce rapport au cours du développement larvaire. Des valeurs relativement stables (5-6) sont associées au régime standard jusqu'au onzième jour. Elles baissent au quatorzième jour (3) et augmentent à nouveau (8) juste avant métamorphose. Enfin, une double ration phytoplanctonique est associée à des valeurs plus importantes. En effet, le rapport évolue peu jusqu'au onzième jour (8-9) puis diminue au quatorzième jour (6) et s'élève à nouveau en fin de développement larvaire (9).

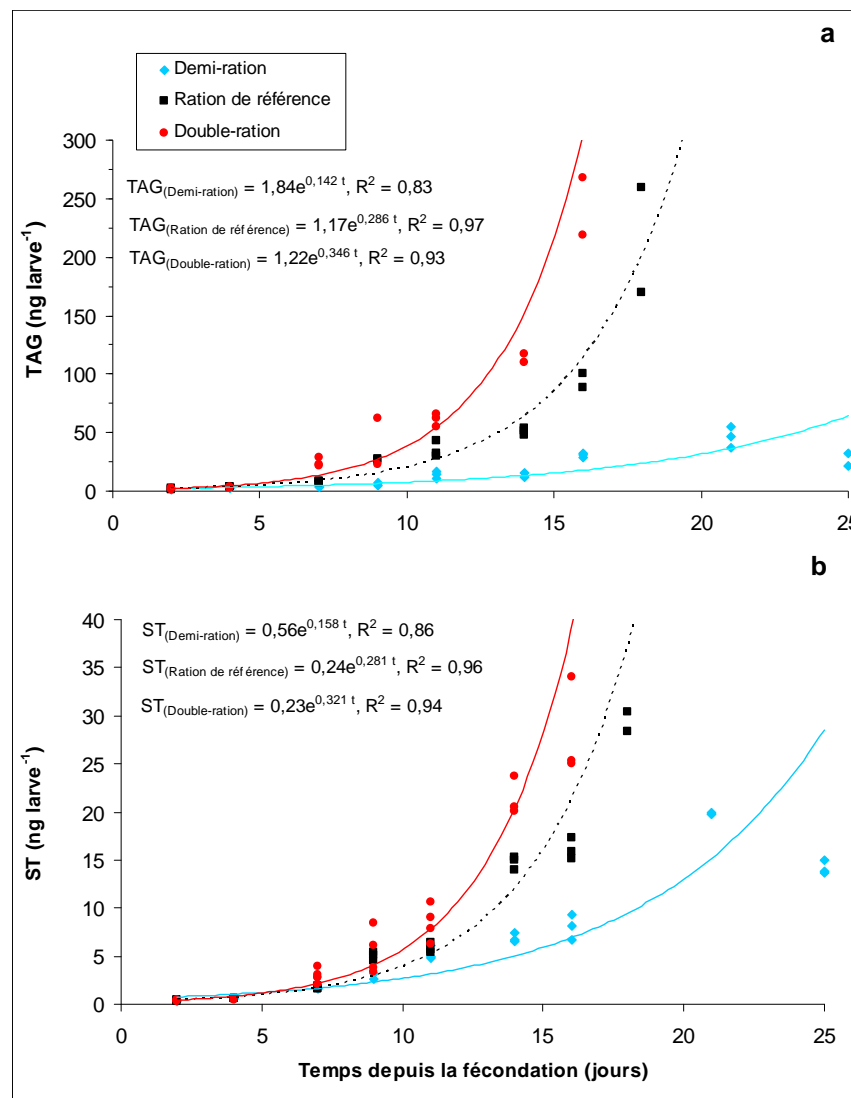


Figure 32 : évolution des triacylglycérols TAG (a) et des stérols ST (b) chez les larves de *C. gigas* soumises à trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005) (n = 2).

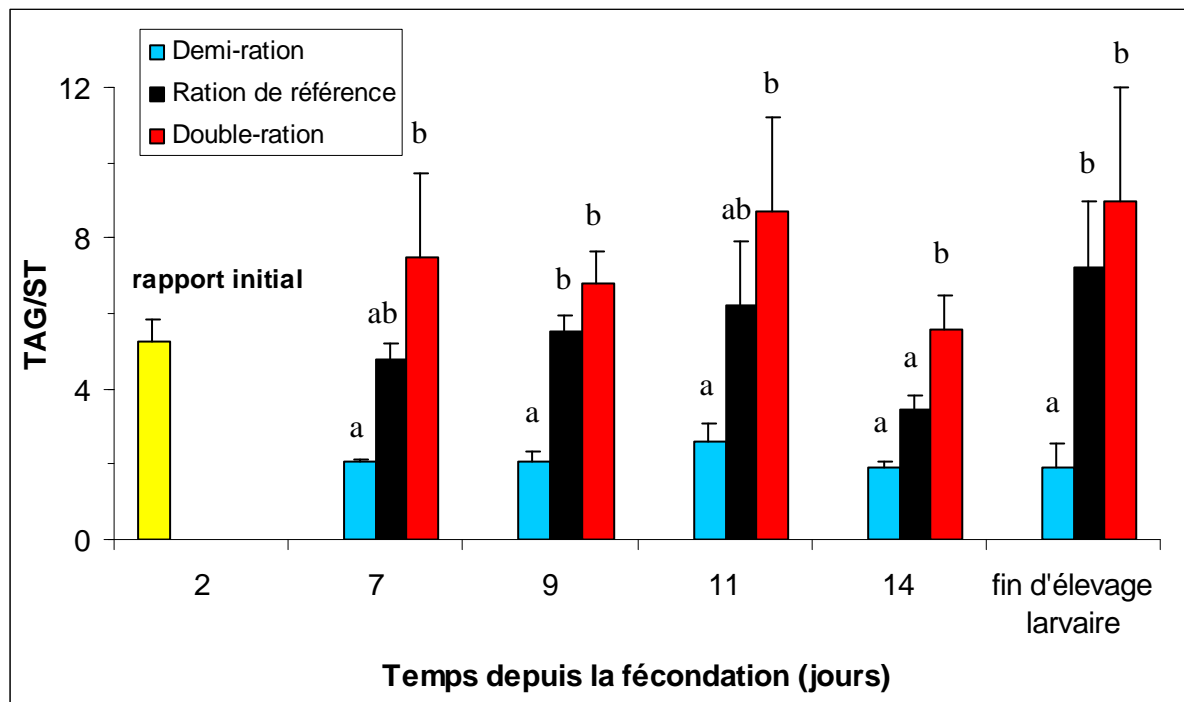


Figure 33 : évolution de l'indice biochimique structurel TAG/ST chez les larves de *C. gigas* soumises à trois régimes trophiques (Gig0504, avril 2005). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 2). Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

## 5.5. Discussion

L'évolution du rapport TAG/stérols tout au long du cycle pélagique chez les larves de *C. gigas* soumises à différents niveaux trophiques a été étudiée et nous avons également tenté de déterminer la pertinence de cet indice par rapport aux performances larvaires parallèlement acquises. Les TAG constituent les réserves énergétiques principales des larves d'huîtres (Whyte *et al.*, 1988) et sont préférentiellement catabolisés lors des périodes de jeûne (Gallager *et al.*, 1986). Aussi, la teneur des TAG est positivement corrélée au taux de croissance chez les larves de *C. gigas* (Waldock et Nascimento, 1989), chez *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1992) et chez *Placopecten magellanicus* (Pernet *et al.*, 2006a). Les stérols, parce qu'ils constituent des lipides de structure peu variables dans la masse pondérale ont été choisis comme référence pondérale afin de permettre la comparaison de larves de taille différente. Dans la structure membranaire leur concentration varie peu sauf en fonction de la température afin de permettre le maintien de la fluidité. Ils ont été préférés aux phospholipides qui sont plus sensibles au facteur nutritif du fait de leur rôle énergétique durant les stades larvaires précoces

et les périodes de jeûne (Fraser, 1989; Delaunay *et al.*, 1992) rendant l'utilisation du rapport TAG/PL moins appropriée pour l'estimation de la qualité larvaire. Nos résultats ont démontré que le ratio TAG/stérois chez les larves de *Crassostrea gigas* est étroitement dépendant de la ration alimentaire sur le plan quantitatif. Ainsi, cet indice varie au cours du développement larvaire de *C. gigas* de 2 à 5 lorsqu'elles sont faiblement alimentées et de 6 à 9 lorsqu'elles reçoivent une forte ration nutritionnelle. Ceci est en concordance avec les résultats de Farias *et al.* (2003) décrivant ce ratio comme étant sensible aux variations de la disponibilité en nourriture et renseignant sur l'état nutritionnel des individus plutôt que sur leur état physiologique. Cette corrélation peut être forte puisque Hakanson (1989) a montré qu'un rapport inférieur à 0,2 indique une carence alimentaire sévère chez les larves d'anchois *Engraulis mordax*, engendrant alors des effets négatifs irréversibles. Une telle limite n'a pas été enregistrée dans la présente étude chez les larves de *C. gigas* puisque même pour les plus faibles valeurs de ce rapport, les larves sous-alimentées ont pu, dans une moindre mesure, survivre, se développer et atteindre la métamorphose. Par ailleurs, selon Pernet *et al.* (2003), une relation positive est dégagée entre le rapport TAG / ST mesuré au huitième jour après la fécondation et le taux de compétence (nombre de larves prêtes à la métamorphose). Paradoxalement, et d'après les mêmes auteurs, ce ratio était négativement corrélé au succès à la fixation suggérant que les larves ayant une bonne condition physiologique passent plus de temps dans la recherche de substrat adéquat pour se fixer contrairement aux larves en mauvais état, moins sélectives et qui se fixent dès qu'elles trouvent un support. Il est à signaler que, dans la présente étude une baisse du rapport TAG/stérois est notée au 14<sup>e</sup> jour, quelle que soit la ration administrée. Cette décroissance vers la fin du cycle larvaire peut s'expliquer pour les conditions nutritionnelles standards et améliorées par le début de mobilisation des réserves accumulées, pour autoriser le processus métamorphique se mettant progressivement en place, accouplé à une baisse voire à un arrêt temporaire de l'ingestion. Cependant, ce schéma ne peut pas s'appliquer à la plus faible ration nutritionnelle, l'apparition des larves compétentes à la métamorphose n'apparaissant que 10 jours plus tard. Par ailleurs, il est à noter que le rapport TAG/ST rend compte d'une différence d'accumulation lipidique chez les larves intervenant à partir du septième jour d'élevage en fonction du régime apporté. Cette différence couplée à des écarts de croissance selon la ration, enregistrés à la même période, prouvent que l'influence de la nourriture ne se traduit, au niveau des réserves lipidiques, que cinq jours environ après la première prise de nourriture, bien que les larves soient capables d'ingérer les microalgues à partir du stade D (Lucas et Rangel, 1983). Ceci marque en effet la transition de la phase endogène, période au cours de laquelle les larves dépendent entièrement de leurs réserves initiales, à la phase exogène impliquant l'ingestion et l'assimilation des microalgues. De plus,

il est intéressant de signaler que l'effet de la ration algale apportée en fin d'élevage sur le taux de fixation devenait faible voire nul, et ce à partir d'un certain seuil (ici 200 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ).

Ainsi, Pernet *et al.* (2004) démontrent que des apports d'*Isochrysis* sp., complétés de microsphères lipidiques imprégnées de triacylglycérols, à des larves de *Mytilus edulis* juste avant la métamorphose, résultent en une augmentation de leur teneur en triacylglycérols dépendant de la proportion initiale de ce composé dans la nourriture mais sans bénéfice additionnel pour la fixation.

De plus, cet indice reposant sur l'évolution des lipides au cours du temps est correctement corrélé avec les performances zootechniques enregistrées ce qui confirme l'importance des lipides chez les jeunes stades des mollusques. Il a été signalé que les concentrations en PUFA et spécifiquement en n-3 sont très fortes chez les bivalves (Knauer et Southgate, 1999) et si parmi ceux-ci il est généralement admis l'importance du DHA et de l'EPA, leur besoin spécifique par les larves ou juvéniles des différentes espèces de mollusques n'est pas encore clairement établi (Volkman et Brown, 2006).

En revanche, pour ce qui est du deuxième indice MO/PS, nos résultats montrent que celui-ci est inapte à traduire les écarts de performances observées. En effet, et malgré une accumulation deux fois plus rapide de matières sèche et organique chez les larves abondamment nourries par rapport à celles sous-alimentées, les valeurs du rapport MO/PS ne sont pas significativement différentes. Si l'augmentation de ces composés au cours de la phase larvaire traduit tout simplement la croissance des animaux, optimisée en présence d'une forte ration phytoplanctonique, l'évolution irrégulière de ce rapport n'apporte aucune signification. Bien que valide chez les adultes (Walne et Mann, 1985; Bodoy *et al.*, 1986) celui-ci semble être un mauvais indicateur de qualité chez les larves de *C. gigas* probablement lié à une estimation erronée de la matière organique. En effet, cette méthode présente une surestimation de cette dernière en intégrant le poids organique de la coquille. Ainsi, Walne et Millican (1988) rapportent que, chez le naissain de *C. gigas*, la coquille renferme 3 à 5,2 % de matière organique et qu'au vu de son poids, cette fraction organique peut représenter 35 à 59 % de la matière organique totale de l'animal. De plus, selon Rainer et Mann (1992), un indice de condition fiable doit comporter un numérateur sensible et fluctuant par rapport à un dénominateur stable et stationnaire. Or, chez *C. gigas*, aussi bien la matière organique que le poids sec constituent deux paramètres fortement variables au cours du cycle larvaire. Les résultats de la présente étude démontrent donc clairement la non fiabilité de ce rapport quant à l'évaluation des performances larvaires de *C. gigas*.



**Influence du jeûne sur les performances et la qualité  
physiologique des élevages larvaires de *C. gigas***



## **6. Influence du jeûne sur les performances et la qualité physiologique des élevages larvaires de *C. gigas***

### **6.1. Cadre expérimental**

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication parue dans **Aquaculture 308 (2010), 184-182.**

L'influence du jeûne sur les performances d'élevage et la gestion des réserves lipidiques a été recherchée chez les larves de *C. gigas*, élevées en séquentiel. Pour ce faire quatre séries expérimentales ont été conduites, en système clos, durant lesquelles des durées de jeûne ont été appliquées aux larves à différentes périodes de leur vie. Dans un premier temps, deux expérimentations préliminaires ont été effectuées où la première (Gig0510) visait à vérifier l'influence de deux périodes de jeûne tardif intervenant juste avant (J15J19) et après (J19J21) le début de la métamorphose tandis que la seconde (Gig0508) s'intéressait à l'incidence d'un jeûne plus précoce (J6J10, J10J14). La troisième (Gig0504) et quatrième (Gig0608) expérimentations couvraient différentes périodes de jeûne de quatre jours J2J6, J6J10, J10J14, J14J18, J18J22. En dehors de ces périodes, les larves étaient alimentées par un mélange bispécifique TCp (*I. aff. galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*, 50/50 en équivalent volume). La survie, la croissance, la compétence et le taux de métamorphose étaient estimés parallèlement à l'évolution des indices physiologiques (MO / PS et / ou aire lipidique totale et / ou TAG / ST).

### **6.2. Influence d'un jeûne au cours de la métamorphose**

#### **6.2.1. Performances d'élevage larvaire**

L'influence d'un jeûne temporaire au cours de la métamorphose sur les performances d'élevage larvaire de *C. gigas* est rapportée dans le tableau 11.

Conditions	Durée de l'élevage larvaire (j)	Taux de croissance ( $\mu\text{m j}^{-1}$ )	Longueur finale ( $\mu\text{m}$ )	Survie en fin d'élevage (%)	Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
Témoin (TCp)	16	16,3 (1,8) <sup>a</sup>	309 (23) <sup>a</sup>	55,1 (5,3) <sup>a</sup>	82,1 (5,9) <sup>a</sup>	69,1 (4,2) <sup>a</sup>
Jeûne permanent	21 : arrêt	0,4 (0,2) <sup>b</sup>	86 (8) <sup>b</sup>	28,3 (0,6) <sup>b</sup>	***	***
J15J19	16	15,6 (1,9) <sup>c</sup>	299 (26) <sup>c</sup>	48,5 (3,2) <sup>a</sup>	82,8 (3,8) <sup>a</sup>	29,8 (4,0) <sup>b</sup>
J19J21	16	16,6 (1,8) <sup>d</sup>	313 (23) <sup>d</sup>	45,2 (3,2) <sup>a</sup>	84,9 (6,5) <sup>a</sup>	59,8 (1,8) <sup>a</sup>

**Tableau 11 : performances d'élevage larvaire de *C. gigas* (moyenne  $\pm$  écart-type) soumise à un jeûne permanent ou temporaire tardif de deux ou quatre jours.** Le témoin est nourri tout au long du cycle sur le régime TCp. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

L'apparition des mortalités est tardive chez l'élevage maintenu à jeun tout au long du cycle, 30 % de la population subsiste encore au vingt-et-unième jour. Cependant, avec un taux de croissance de  $0,4 \mu\text{m j}^{-1}$  et une taille moyenne de  $86 \mu\text{m}$  mesurée en fin d'élevage (21<sup>e</sup> j), aucune véritable croissance n'a été décelée chez ce lot (tableau 11). Chez les larves alimentées, les survies relevées en fin d'élevage sont comprises entre 46 et 55 %, et sont statistiquement non différentes ( $p > 0,05$ ). Les taux de croissance sont importants ( $15,6$ - $16,6 \mu\text{m j}^{-1}$ ), conduisant à une acquisition précoce de la compétence, dès le seizième jour, avec des taux compris entre 83 et 85 %. Aucune différence significative n'a été relevée au niveau des taux de compétence ( $p = 0,108$ ). Un jeûne provoqué la veille du processus de métamorphose (J15J19) n'affecte que faiblement la croissance larvaire mais a une incidence négative marquée sur le taux de fixation (30 %,  $p < 0,0001$ ) contrairement à un jeûne imposé plus tardivement (J19J21), mais seulement pendant deux jours (60 %,  $p = 0,0909$ ).

### 6.2.2. Indice lipidique global

Pour cette partie, l'étude colorimétrique a été effectuée pendant les deux premières semaines d'élevage afin de suivre l'évolution des réserves lipidiques chez les larves alimentées régulièrement. Des mesures ont été également opérées sur les larves mises à jeun en permanence pour déterminer la date à partir de laquelle les réserves endogènes sont complètement épuisées. Ainsi, au second jour, les lipides du vitellus occupent environ 20 % de la surface de la larve. Puis, chez les témoins nourris, ces réserves sont rapidement catabolisées

au cours de la première semaine (5,8-4,4 % respectivement aux sixième et huitième jours) mais, suite aux apports nutritionnels, des réserves lipidiques se reconstituent ultérieurement pour atteindre un taux de 18 % au treizième jour. Chez les larves maintenues à jeun en permanence, le taux lipidique est nul dès le cinquième jour et le restera indéfiniment jusqu'à l'arrêt de l'expérimentation (21<sup>e</sup> j).

### 6.2.3. Indice de condition larvaire

Le poids sec et la matière organique ont été suivis chez les larves régulièrement nourries depuis le second jour jusqu'à la fin de la vie larvaire (16<sup>e</sup> j). En parallèle, des prélèvements ont été effectués chez les larves soumises au jeûne permanent jusqu'au douzième jour, les analyses n'étant pas effectuées au-delà à cause des mortalités enregistrées (28 % au 21<sup>e</sup> j : tableau 11). Pour la condition J16J20, seules des mesures au seizième jour ont été opérées puisque avant la mise à jeun, les individus étaient soumis aux mêmes conditions que les témoins. Les résultats sont consignés dans le tableau 12.

Jours	Témoin (TCp)		Jeûne permanent		Jeûne (J15J19)	
	PS (ng larve <sup>-1</sup> )	MO (ng larve <sup>-1</sup> )	PS (ng larve <sup>-1</sup> )	MO (ng larve <sup>-1</sup> )	PS (ng larve <sup>-1</sup> )	MO (ng larve <sup>-1</sup> )
2	124 (4)	41 (2)	124 (4)	41 (2)	124 (4)	41 (2)
5	358 (9)	110 (8)	324 (12)	112 (6)		
8	885 (38)	235 (18)				
8			308 (116)	180 (84)		
9	1384 (218)	424 (121)				
12	3152 (65)	808 (20)	125 (4)	62 (3)		
16	8211 (840)	2220 (428)			4852 (330)	685 (15)

**Tableau 12 :** évolution du poids sec (moyenne ± écart-type) et de la matière organique (moyenne ± écart-type) chez les larves de *C. gigas* soumises à des jeûnes provoqués en fin d'élevage larvaire (n = 2). Le témoin est nourri tout au long de l'élevage.

Le poids sec initial d'une larve âgée de deux jours est en moyenne de 124 ng. Chez les larves régulièrement nourries, les valeurs augmentent progressivement pendant la première

semaine (885 ng au septième jour), puis l'accroissement devient de plus en plus marqué (8211 ng en fin d'élevage), conduisant à un taux global d'accroissement pondéral d'environ 588 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Chez les larves soumises à un jeûne permanent, le poids sec évolue pendant les cinq premiers jours comme chez les témoins où on enregistre au cinquième jour des valeurs voisines (324 vs 358 ng larve<sup>-1</sup>). Au delà de cette date et jusqu'au huitième jour, aucun accroissement n'est enregistré (308 ng larve<sup>-1</sup>), ce qui représente seulement 40 % du poids relevé chez les larves alimentées (885 ng larve<sup>-1</sup> au 8<sup>e</sup> j). Au douzième jour, les valeurs décroissent à un niveau équivalent à celui enregistré en début d'élevage (125 ng) et ne présentent qu'environ 4 % du poids des témoins (3152 ng larve<sup>-1</sup>). Pour la condition J15J19, les mesures effectuées au seizième jour montrent qu'un seul jour de jeûne est responsable d'un ralentissement marqué de la croissance pondérale puisqu'on enregistre un poids sec de 4852 ng larve<sup>-1</sup> vs 8211 ng larve<sup>-1</sup> chez les larves alimentées, ce qui représente presque la moitié.

La matière organique montre une évolution temporelle similaire à celle du poids sec. Ainsi, chez les témoins, l'accroissement est progressif pendant la première semaine où les teneurs passent de 41 ng larve<sup>-1</sup> au second jour à 110 ng larve<sup>-1</sup> au cinquième jour. Puis, l'accumulation organique devient de plus en plus importante jusqu'à atteindre 2220 ng larve<sup>-1</sup> en fin d'élevage larvaire (16<sup>e</sup> j), conduisant à un taux global d'accroissement de matière organique d'environ 156 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (tableau 12). Chez les larves soumises à un jeûne permanent, une augmentation similaire à celle des témoins est notée pendant les cinq premiers jours (112 ng larve<sup>-1</sup>), suivie d'une stabilisation jusqu'au huitième jour (180 ng larve<sup>-1</sup>), ce qui correspond à environ 82 % de la matière organique enregistrée chez les témoins (235 ng larve<sup>-1</sup> au 8<sup>e</sup> j). Au douzième jour, cette matière organique s'effondre pour atteindre 62 ng larve<sup>-1</sup>, ce qui représente seulement 8 % de la valeur relevée chez les témoins (808 ng larve<sup>-1</sup>). Pour la condition J15J19, les mesures opérées au seizième jour montrent qu'un tel stress est responsable d'une perte de 69 % de la matière organique (685 vs 2220 ng larve<sup>-1</sup> : tableau 12).

L'évolution du rapport MO/PS au cours du temps est représentée dans la figure 34. Chez les larves nourries en permanence, les valeurs sont stables jusqu'au huitième jour (30 %), puis une légère décroissance est notée à partir du douzième jour (26 %) qui se maintient jusqu'au seizième jour (28 %). Chez les larves à jeun pendant tout le cycle, les valeurs sont stables pendant les cinq premiers jours (33-35 %), puis une augmentation brusque est relevée au huitième jour (55 %). Cette dernière valeur se maintient jusqu'à la fin de l'expérimentation (50 % au douzième jour). Cette augmentation du rapport MO/PS est probablement due à la quasi-absence de la croissance coquillière (0,4 µm j<sup>-1</sup>: tableau 12). Pour le jeûne J15J19, la valeur enregistrée au seizième jour est de 15 % (vs 28 % chez les témoins : figure 34).

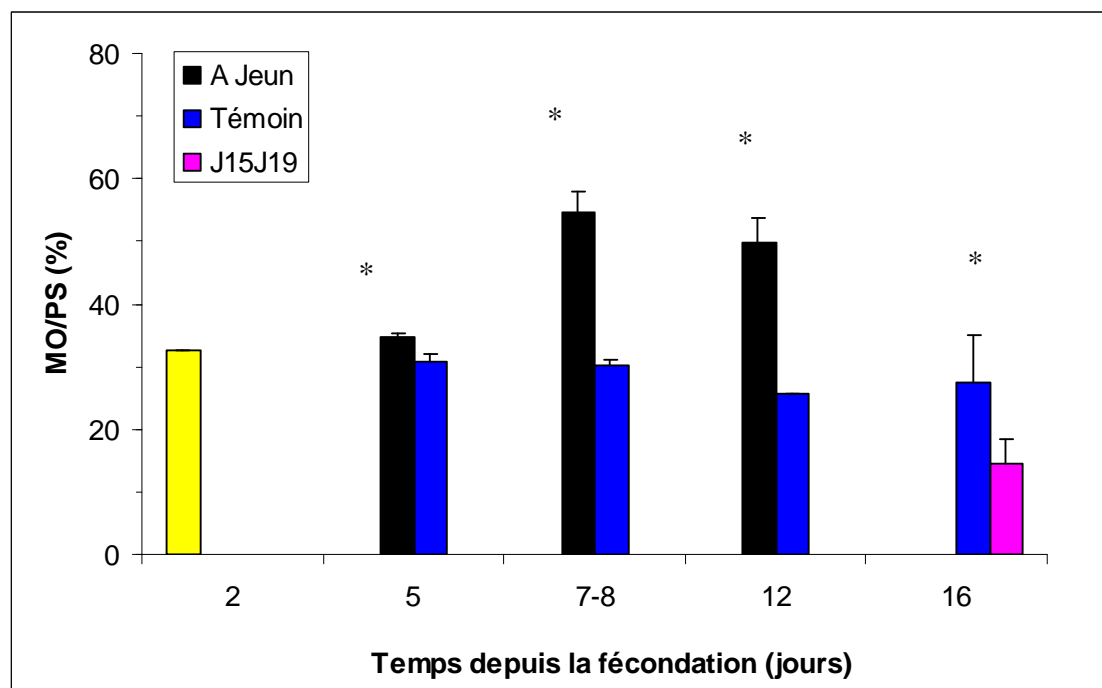


Figure 34 : évolution du rapport MO/PS au cours du développement larvaire de *C. gigas* soumise à un jeûne permanent ou temporaire (J15J19). Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n = 2$ ). (\*) : indique une différence significative, au seuil de 5 %.

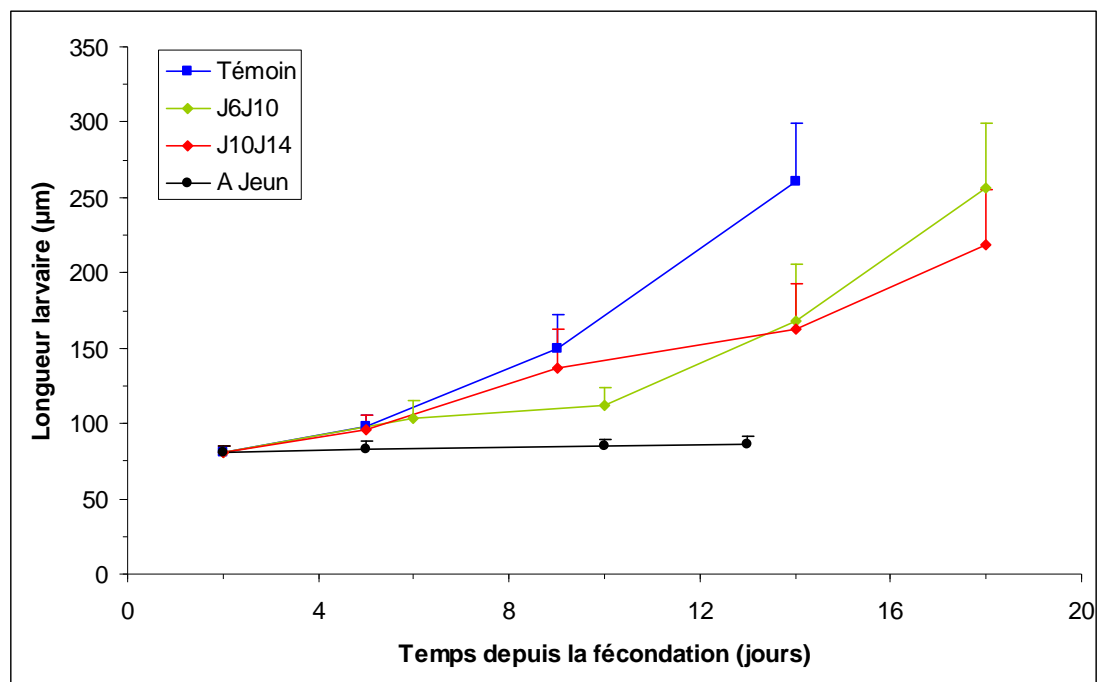
### 6.3. Influence de deux périodes de jeûne appliquées au milieu du cycle larvaire

#### 6.3.1. Performances d'élevage larvaire

L'influence d'un jeûne plus précoce sur les performances d'élevage larvaire est rapportée dans le tableau 13, tandis que la croissance larvaire est représentée en figure 35.

Conditions	Durée de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)			Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J9	J14	Fin d'élevage		
Témoin (TCp)	14	82,5 (3,5) <sup>a</sup>	62,5 (9,3) <sup>a</sup>	62,5 (9,3) <sup>a</sup>	51,3 (12,3) <sup>a</sup>	63,4 (3,3) <sup>a</sup>
Jeûne permanent	14	58,4 (4,8) <sup>b</sup>	8,6 (8,1) <sup>b</sup>			
J6J10	18	82,9 (3,8) <sup>a</sup>	62,8 (6,5) <sup>a</sup>	62,8 (6,5) <sup>a</sup>	36,1 (11,1) <sup>a</sup>	64,5 (9,5) <sup>a</sup>
J10J14	21	81,1 (3,8) <sup>a</sup>	88,8 (11,0) <sup>a</sup>	88,8 (10,9) <sup>f</sup>	48,8 (13,5) <sup>a</sup>	54,4 (2,9) <sup>a</sup>

Tableau 13 : performances d'élevage larvaire (moyenne  $\pm$  écart-type) chez *C. gigas* soumise à un jeûne permanent ou temporaire précoce de quatre jours (J6J10, J10J14). Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.



**Figure 35 : croissance larvaire de *C. gigas* soumise à un jeûne permanent (A Jeun) ou temporaire précoce de quatre jours (J6J10 et J10J14).** Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n > 100$ ).

L'élevage maintenu à jeun tout au long du cycle présente une mortalité conséquente dès le neuvième jour, affectant environ 40 % de la population (tableau 13). Avec seulement 8 % de larves vivantes, cette condition n'a pas pu être maintenue au delà du quatorzième jour (tableau 13). A l'opposé, les survies enregistrées en fin d'élevage chez les larves nourries en permanence ou ayant subi un jeûne temporaire sont élevées et similaires (63-64 %). Les larves nourries régulièrement étaient compétentes dès le quatorzième jour (52 %) engendrant 56 % de post larves. Le jeûne, n'ayant pas affecté les survies en fin d'élevage larvaire ( $p = 0,1089$ ) ni les taux de compétence ( $p = 0,3325$ ), a néanmoins provoqué un retard dans l'acquisition de la maturité. Ainsi, les larves mises à jeun du sixième au dixième jour (J6J10) n'étaient compétentes qu'au dix-huitième jour (38 %) et celles subissant un jeûne plus tardif (J10J14) n'étaient aptes à se métamorphoser qu'au vingt-et-unième jour, avec 49 % de larves oeillées. Cependant, les taux de métamorphose étaient similaires (54-65 %,  $p = 0,2628$ ) et comparables à ceux des témoins (63 % ;  $p = 0,9844$  et  $0,4145$  respectivement pour J6J10 et J10J14).

Avec un taux de croissance de  $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$ , un très faible développement est décelé chez les larves non alimentées (figure 35). Avec des valeurs de  $14$  et  $11,5 \mu\text{m j}^{-1}$  vs  $15 \mu\text{m j}^{-1}$  chez le témoin respectivement pour les conditions de jeûne temporaire J6J10 et J10J14, un moindre développement est relevé, avec un arrêt de croissance clairement identifié au moment de l'absence d'alimentation, exprimé par un pallier sur le graphe (figure 35).



### 6.3.2. Indice lipidique global

Au deuxième jour, les lipides du vitellus occupent 24 % de la surface de la larve (figure 36). Puis quelles que soient les conditions expérimentales, ces réserves sont consommées au cours de la première semaine (2 à 5 % au sixième jour) pour ne jamais se reconstituer chez les larves maintenues à jeun en permanence (non visible sur le graphe car le rapport lipidique est nul et se confond avec l'axe des abscisses). Chez les témoins, ces réserves occupent 16 % de la surface de la larve au quatorzième jour d'élevage. Une récupération rapide des réserves lipidiques est notée pour la condition de jeûne temporaire J6J10 puisque le rapport passe de 0,2 % à la fin de la période de jeûne à 14 % après quatre jours de réalimentation. Il en est de même, pour la condition J10J14 où à l'issue du traitement, une baisse de la surface lipidique (2 %) est relevée suivie d'une récupération (14 %) le vingt-et-unième jour.

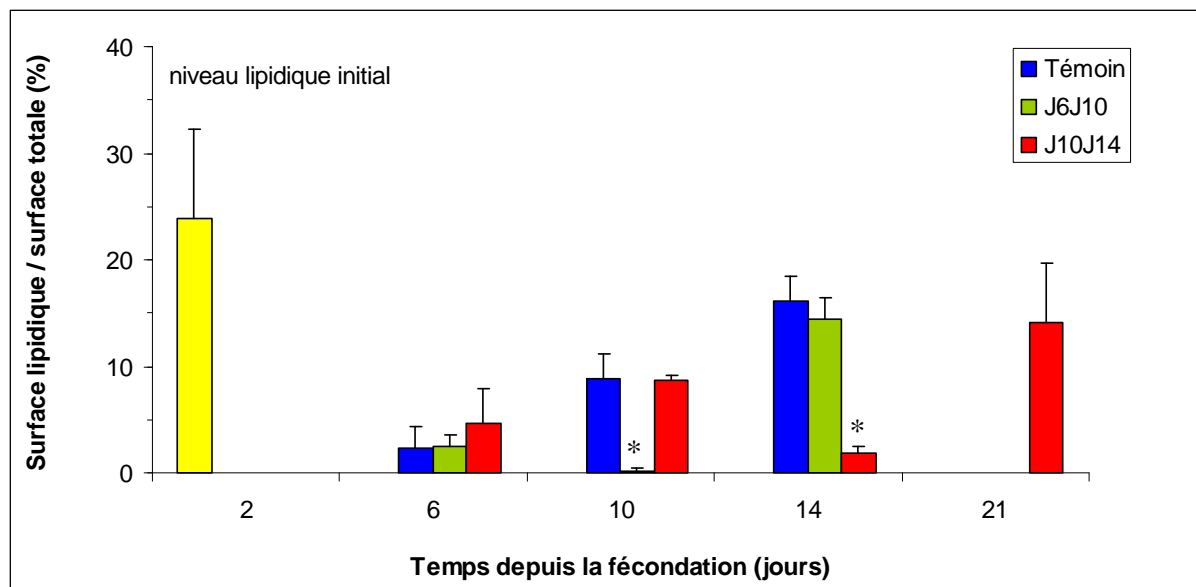


Figure 36 : évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire précoce de quatre jours (J6J10 et J10J14). Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3). (\*) : indique une différence significative, au seuil de 5 %.

## 6.4. Influence de jeûnes couvrant différentes périodes de la vie larvaire

### 6.4.1. Expérimentation I

#### 6.4.1.1. Performances d'élevage larvaire

L'influence d'un jeûne temporaire à différentes périodes de la vie larvaire sur les performances d'élevage larvaire est rapportée dans le tableau 14, tandis que la croissance larvaire est représentée dans la figure 38.

Conditions	Durée de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)			Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J8	J14	Fin d'élevage		
Témoin (TCp)	16	98,3 (3,6) <sup>ab</sup>	95,8 (6,1) <sup>ac</sup>	85,5 (12,9) <sup>ac</sup>	80,5 (10,9) <sup>a</sup>	84,0 (8,1) <sup>bd</sup>
Jeûne permanent	21	98,0 (4,1) <sup>ab</sup>	90,9 (8,5) <sup>ac</sup>	89,0 (10,2) <sup>a</sup>		
J2J6	16	98,5 (3,0) <sup>ab</sup>	85,2 (11,8) <sup>c</sup>	85,8 (5,2) <sup>ac</sup>	80,1 (13,4) <sup>a</sup>	92,9 (4,6) <sup>c</sup>
J6J10	21	98,2 (3,5) <sup>ab</sup>	58,5 (14,4) <sup>b</sup>	44,8 (9,5) <sup>b</sup>		
J10J14	21	98,6 (2,9) <sup>ab</sup>	64,1 (15,6) <sup>b</sup>	62,0 (8,8) <sup>bc</sup>	59,0 (8,2) <sup>b</sup>	63,1 (8,4) <sup>ad</sup>
J14J18	16	99,6 (1,8) <sup>b</sup>	96,2 (8,3) <sup>a</sup>	85,4 (8,4) <sup>a</sup>	61,6 (9,5) <sup>b</sup>	58,3 (8,4) <sup>a</sup>
J16J20	16	93,6 (5,9) <sup>a</sup>	88,0 (8,5) <sup>c</sup>	88,4 (8,8) <sup>ac</sup>	84,5 (8,3) <sup>a</sup>	80,9 (8,3) <sup>b</sup>

**Tableau 14 : performances d'élevage larvaire (moyenne ± écart-type) de *C. gigas* soumise à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique.** Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

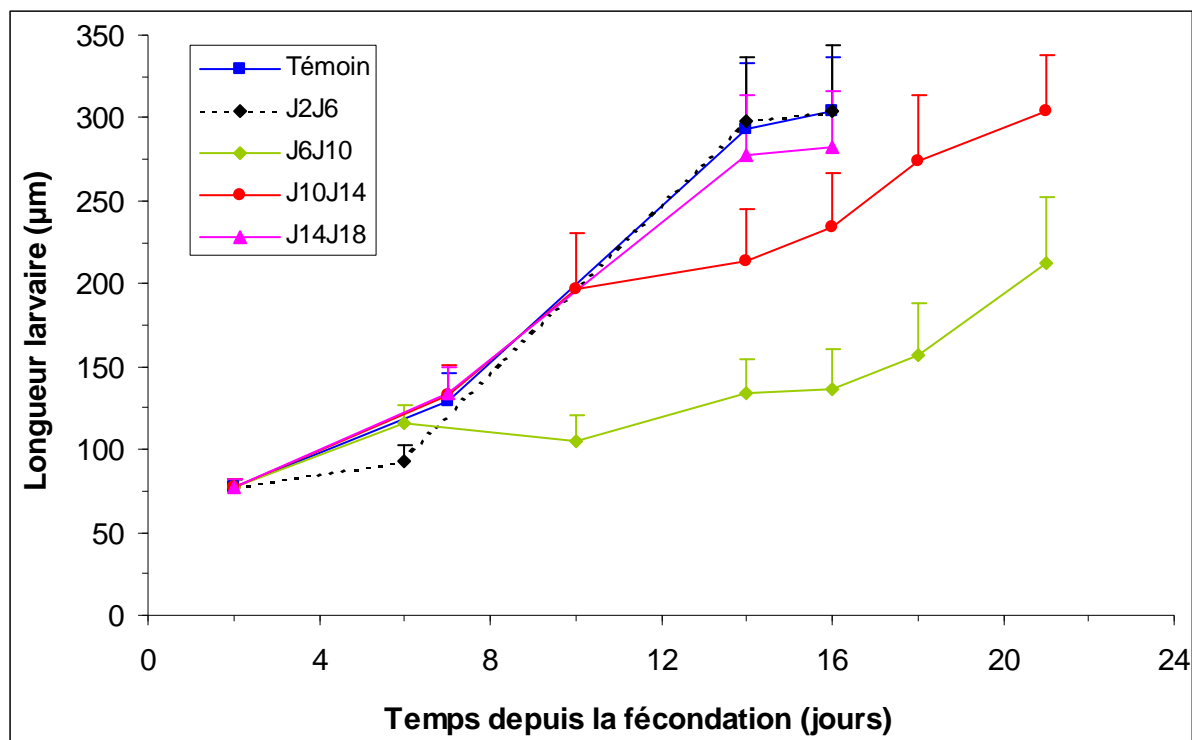


Figure 38 : croissance larvaire de *C. gigas* soumise à un jeûne temporaire à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n > 100$ ).

Conditions	Longueur finale ( $\mu\text{m}$ )	Taux de croissance global ( $\mu\text{m j}^{-1}$ )
Témoin (TCp)	$L_{16} = 304,8 (31,8)^a$	$16,2 (2,3)^a$
J2J6	$L_{16} = 303,8 (40,5)^a$	$16,2 (2,9)^a$
J6J10	$L_{21} = 212,6 (39,9)^c$	$8,1 (2,1)^b$
J10J14	$L_{21} = 303,5 (34,3)^a$	$11,9 (1,8)^c$
J14J18	$L_{16} = 282,2 (34,5)^b$	$14,6 (2,5)^d$

Tableau 15 : longueur (moyenne  $\pm$  écart-type) mesurée en fin d'élevage larvaire ( $\mu\text{m}$ ) et taux de croissance global (moyenne  $\pm$  écart-type) entre le deuxième jour et le jour précédant la métamorphose ( $\mu\text{m j}^{-1}$ ) chez *C. gigas* soumise à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique ( $n > 100$ ). Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

L'élevage des larves soumises à un jeûne permanent a été maintenu jusqu'au vingt-et-unième jour, avec un taux de survie de 80 %. La condition J10J14, quant à elle, est responsable d'une chute significative de la survie à l'issue du traitement (14<sup>e</sup> j), période au cours de

laquelle, seulement 64 % de larves ont persisté vs 96 % pour le témoin ( $p < 0,0001$ ). Cependant aussitôt nourries, le taux de survie reste stable jusqu'à la fin de l'expérimentation (62 %) et ne présente pas de différences significatives avec le témoin ( $p = 0,3214$ ). En revanche, le taux de survie des individus soumis au jeûne J6J10 continue à baisser, même après la réalimentation des larves et atteint seulement 45 % à la fin de l'expérimentation vs 86 % pour le témoin ( $p < 0,0001$ ). Pour les autres conditions, les survies sont comprises entre 86 et 85 % et ne présentent aucune différence significative avec le témoin ( $p > 0,05$  ; tableau 14).

Tous les traitements ont autorisé l'acquisition de la compétence entre les seizième et vingt-et-unième jours, sauf les larves privées de nourriture tout au long du cycle et celles subissant le jeûne J6J10. Les taux de compétence les plus faibles sont relevés pour les conditions J10J14 et J14J18 (59-62 %) alors que les plus élevés sont notés pour le témoin et les lots J2J6 et J16J20 (80-85 %).

Les taux de métamorphose sont globalement importants ( $> 58$  %). Le témoin a engendré 84 % de post larves. Ce taux est similaire à celui enregistré chez les lots J10J14 (63 % ;  $p = 0,1919$ ) et J16J20 (81 % ;  $p = 0,4356$ ). En revanche, les larves privées de nourriture au milieu de la période de métamorphose (J14J18) ont présenté un taux significativement inférieur à celui noté chez le témoin (58 % ;  $p = 0,0235$ ) alors que le jeûne imposé à l'issue de l'embryogenèse (J2J6) n'a généré aucune influence négative sur le pourcentage de post larves ; celui-ci est, au contraire, significativement supérieur à celui relevé chez le témoin (93 % ;  $p = 0,0001$ ).

Quelle que soit la période de jeûne, un ralentissement de la croissance est noté mais dès leur réalimentation, les larves reprennent leur développement et présentent trois cas de figure (figure 38, tableau 15). Lorsque le jeûne est maintenu aussitôt après l'embryogenèse (J2J6), une compensation rapide de la croissance s'opère. Avec un taux de croissance global similaire à celui noté chez les témoins (tableau 15 :  $16 \mu\text{m larve}^{-1} \text{j}^{-1}$  ;  $p = 0,9999$ ), les larves atteignent au seizième jour une longueur moyenne similaire ( $304 \mu\text{m}$  ;  $p = 0,9999$ ). Il est à noter que ces larves ont été alimentées pendant seulement dix jours (vs 14 jours pour les témoins). Lorsque ce jeûne est déclenché à l'issue de la première semaine d'élevage (J6J10), la reprise de développement qui s'en suit est faible. Le taux de croissance global étant environ 2,3 fois moindre que celui du témoin ( $8 \mu\text{m j}^{-1}$  vs  $16 \mu\text{m j}^{-1}$  ;  $p < 0,0001$ ) et la longueur moyenne mesurée au vingt-et-unième jour, soit après quinze jours d'alimentation, est de seulement  $213 \mu\text{m}$  vs  $305 \mu\text{m}$  pour le témoin ( $p < 0,0001$ ). Enfin, lorsque ce jeûne est opéré au cours de la deuxième semaine d'élevage (J10J14), les larves n'atteignent une taille finale similaire à celle du témoin qu'au bout de vingt-et-un jours ( $304 \mu\text{m}$  : figure 38 et tableau 15), soit après quinze jours d'alimentation (vs 14 j pour les témoins). Le taux de croissance global

enregistré pour cette condition est significativement inférieur à celui du témoin ( $12 \mu\text{m j}^{-1}$  ;  $p < 0,0001$ ). Lorsqu'un jeun tardif est opéré juste avant la fin de l'élevage larvaire (J14J18), un ralentissement de la croissance est noté entre le quatorzième et seizième jour (figure 38) mais celui-ci ne peut être imputé à cette absence d'alimentation, un même infléchissement étant relevé chez les témoins, juste avant la métamorphose. Cependant, avec un taux de croissance significativement inférieur à celui relevé chez le témoin ( $15 \mu\text{m j}^{-1}$  ;  $p = 0,0001$ ), les larves atteignent au seizième jour une longueur moyenne inférieure ( $282 \mu\text{m}$  ;  $p = 0,0005$ ).

### *6.4.1.2. Indice lipidique global*

Au deuxième jour, les lipides endogènes occupent 22 % de la surface de la larve. Puis, quel que soit le traitement expérimental, ces réserves sont consommées rapidement au cours de la première semaine (0 à 3 %), y compris chez les témoins, pour se reconstituer ultérieurement, sauf chez les larves soumises à un jeûne permanent (figure 39). Chez les témoins, ces réserves sont rapidement restaurées dès le dixième jour avec un retour au niveau initial (20 %), qui se maintient jusqu'au quatorzième jour. Au seizième jour, c'est à dire juste avant la métamorphose, le rapport lipidique double pour atteindre 42 %. Quand le jeûne est particulièrement précoce J2J6 et J6J10, la réponse physiologique est immédiate : les réserves sont intégralement consommées à l'issue du traitement mais rapidement reconstituées dès que les microalgues sont fournies. Ainsi, après quatre jours d'alimentation, les niveaux lipidiques respectifs de ces deux lots atteignent 16 et 20 % au dixième jour pour la condition J2J6 et quatorzième jour pour J6J10 (*vs* 20 % chez le témoin pendant ce même laps de temps). Leurs réserves lipidiques continuent, ainsi, à croître progressivement, jusqu'à la fin de l'expérimentation (16<sup>e</sup> j), pour atteindre respectivement 34 et 25 %. En revanche, un jeûne plus tardif (J10J14) provoque un comportement différent, puisque la consommation lipidique provoquée par l'absence de nourriture n'est que partielle. Ainsi, chez ces larves, le niveau lipidique baisse de 14 % au dixième jour à 6,4 % à l'issue du traitement (14<sup>e</sup> j). Cette diminution est suivie d'une reconstitution lipidique brusque au seizième jour (41 % ; niveau similaire à celui prélevé chez les témoins). Enfin, le jeûne appliqué vers la fin du développement larvaire (J14J18) ne s'est pas traduit par une perte lipidique mais par une stabilisation des valeurs autour de 21 %, ne représentant que la moitié du niveau lipidique des témoins (figure 39).

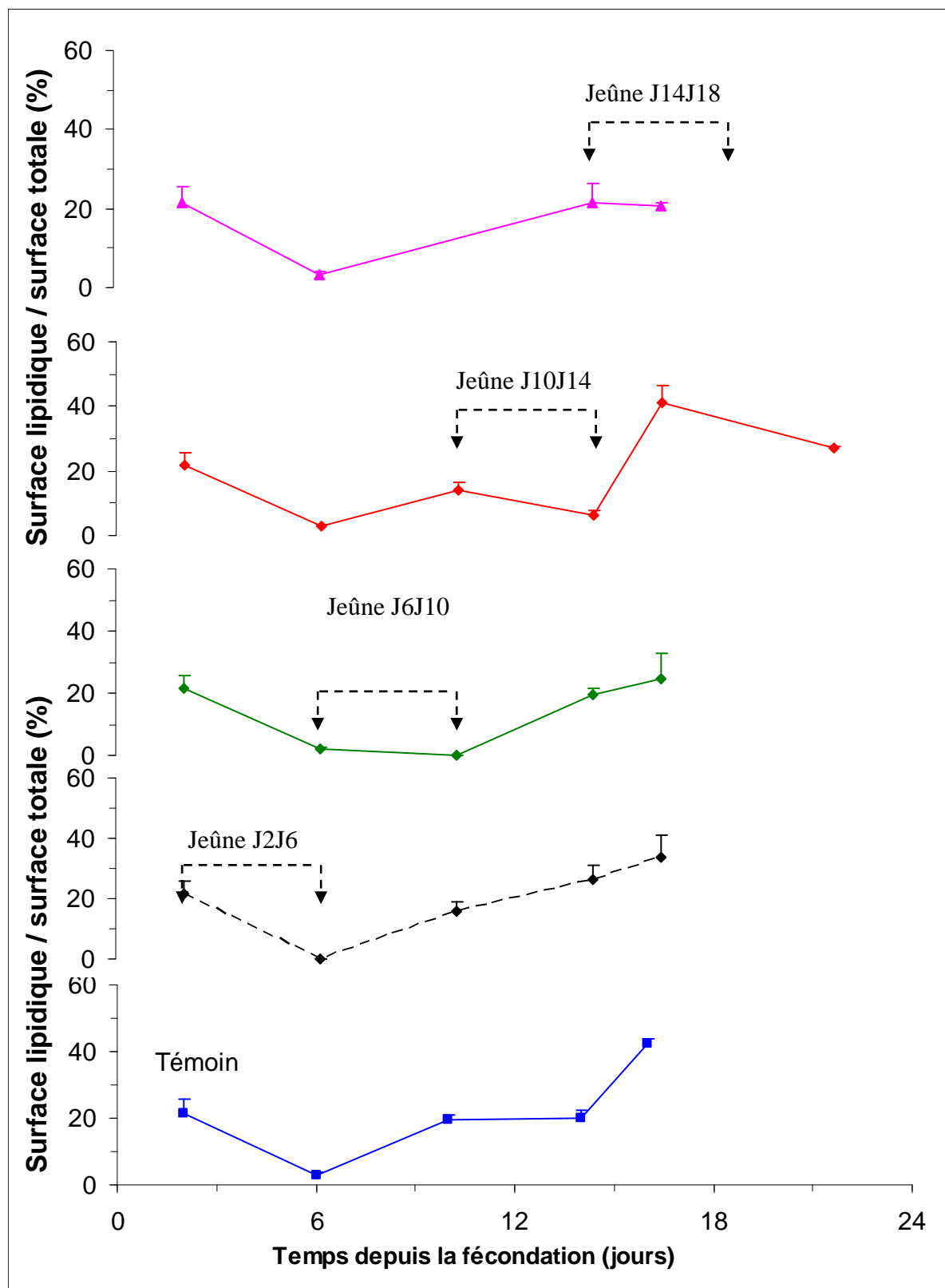


Figure 39 : évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 3). La flèche indique la période de mise à jeun.

## 6.4.2. Expérimentation II

### 6.4.2.1. Performances d'élevage larvaire

L'influence d'un jeûne permanent et temporaire à différentes périodes du cycle larvaire a été étudiée au cours d'une autre expérimentation selon les mêmes conditions. Les performances zootechniques sont consignées dans les tableaux 16 et 17. Excepté les larves maintenues à jeun en permanence fortement affectées (45 %), les survies notées en fin d'expérimentation sont élevées (89 à 86 %) et ne montrent pas de différences avec celle enregistrée chez le témoin ( $p > 0,05$ ). Il est remarquable de noter qu'en fin de deuxième semaine d'élevage 92% des larves non alimentées étaient encore vivantes (tableau 16).

A l'instar de l'expérimentation précédente, un retard dans l'acquisition de la compétence était noté selon la condition. Lorsque le jeûne était imposé en début de cycle (J2J6), l'acquisition de la compétence n'était observée qu'à partir du dix-huitième jour (35 %) mais au vingt-deuxième jour, un taux similaire à celui du témoin acquis au dix-huitième jour (85 % vs 86 % respectivement) était enregistré, ces deux conditions recevant au cours de ces périodes considérées une même quantité de nourriture cumulée pendant seize jours (tableau 17). Il en était de même pour la condition (J6J10) présentant cependant un moindre taux de compétence pour une durée similaire d'alimentation (38 %). Des jeûnes plus tardifs (J10J14 et J14J18) se traduisaient, quant à eux, par un décalage temporel plus important. Ainsi au vingt-deuxième jour, seules 14 et 21 % de larves compétentes étaient enregistrées et dans ces conditions leur préparation pour la métamorphose était différée. Cependant au vingt-cinquième jour, après avoir été nourries pendant dix-neuf jours cumulés, leur taux de compétence était élevé compris entre 68 et 82 %. Avec une métamorphose de l'ordre de 65 % aucun impact du jeûne en début ou cours d'élevage larvaire n'est enregistré, la différence relevée avec le témoin nourri étant non significative (89 %). Seul le jeûne imposé en fin d'élevage larvaire (J14J18) se traduisait par une moindre métamorphose qui atteignait cependant 56 % (tableau 17).

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)				
		J6	J14	J18	J22	J25
Témoin (TCp)	18	85,0 (8,5) <sup>a</sup>	89,8 (9,1) <sup>a</sup>	88,3 (12,1) <sup>a</sup>	---	---
Jeûne permanent	25	96,0 (3,5) <sup>a</sup>	91,8 (5,0) <sup>a</sup>	Nd	Nd	44,5 (8,8) <sup>b</sup>
J2J6	22	90,8 (5,1) <sup>a</sup>	93,8 (3,1) <sup>a</sup>	88,8 (5,8) <sup>a</sup>	86,3 (4,5) <sup>a</sup>	---
J6J10	22	91,8 (2,5) <sup>a</sup>	89,8 (4,9) <sup>a</sup>	91,0 (0,0) <sup>a</sup>	86,0 (5,8) <sup>a</sup>	---
J10J14	25	91,8 (4,0) <sup>a</sup>	91,0 (3,6) <sup>a</sup>	88,8 (8,8) <sup>a</sup>	88,8 (3,8) <sup>a</sup>	84,3 (4,8) <sup>a</sup>
J14J18	25	92,8 (2,1) <sup>a</sup>	90,3 (8,5) <sup>a</sup>	80,0 (4,6) <sup>a</sup>	86,3(9,0) <sup>a</sup>	86,3 (15,9) <sup>ab</sup>

**Tableau 16 : taux de survie (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 3) de *C. gigas* soumise à un jeûne permanent ou temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique.** Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %. Nd : non déterminé.

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Taux de compétence (%)			Taux de métamorphose (%)
		J18	J22	J25	
Témoin (TCp)	18	85,5 (6,4) <sup>b</sup>	---	---	89,0 (8,8) <sup>a</sup>
Jeûne permanent	25	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>d</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>d</sup>
J2J6	22	35,0 (4,6) <sup>c</sup>	84,5 (10,6) <sup>b</sup>	---	66,3 (10,1) <sup>ac</sup>
J6J10	22	3 (1) <sup>d</sup>	38,3 (4,5) <sup>c</sup>	---	65,3 (4,5) <sup>ab</sup>
J10J14	25	0 (0) <sup>a</sup>	21,0 (4,0) <sup>ac</sup>	81,5 (20,5) <sup>a</sup>	65,8 (1,5) <sup>ac</sup>
J14J18	25	0 (0) <sup>a</sup>	14,0 (9,5) <sup>a</sup>	68,0 (18,4) <sup>a</sup>	56,0 (6,0) <sup>bc</sup>

**Tableau 17 : taux de compétence et de métamorphose (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 3) de *C. gigas* soumise à un jeûne permanent ou temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique.** Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

La croissance larvaire est représentée dans la figure 39 alors que les longueurs finales et les taux de croissance globale sont consignés dans le tableau 18. Avec  $13 \mu\text{m j}^{-1}$ , les larves régulièrement alimentées présentent le taux de croissance le plus élevé (tableau 18). Les larves privées temporairement de nourriture montrent des taux de croissance significativement inférieurs ( $10 \mu\text{m j}^{-1}$  ;  $p < 0,0001$ ). Une croissance négligeable ( $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$ ) a été relevée chez les larves maintenues à jeun tout au long de l'expérience. Comme au cours de la première série



expérimentale, les mises à jeun temporaires s'accompagnent d'un arrêt brusque du développement, exprimé sur le graphe par un plateau, mais dès leur réalimentation la croissance reprend sans effet compensatoire (figure 39).

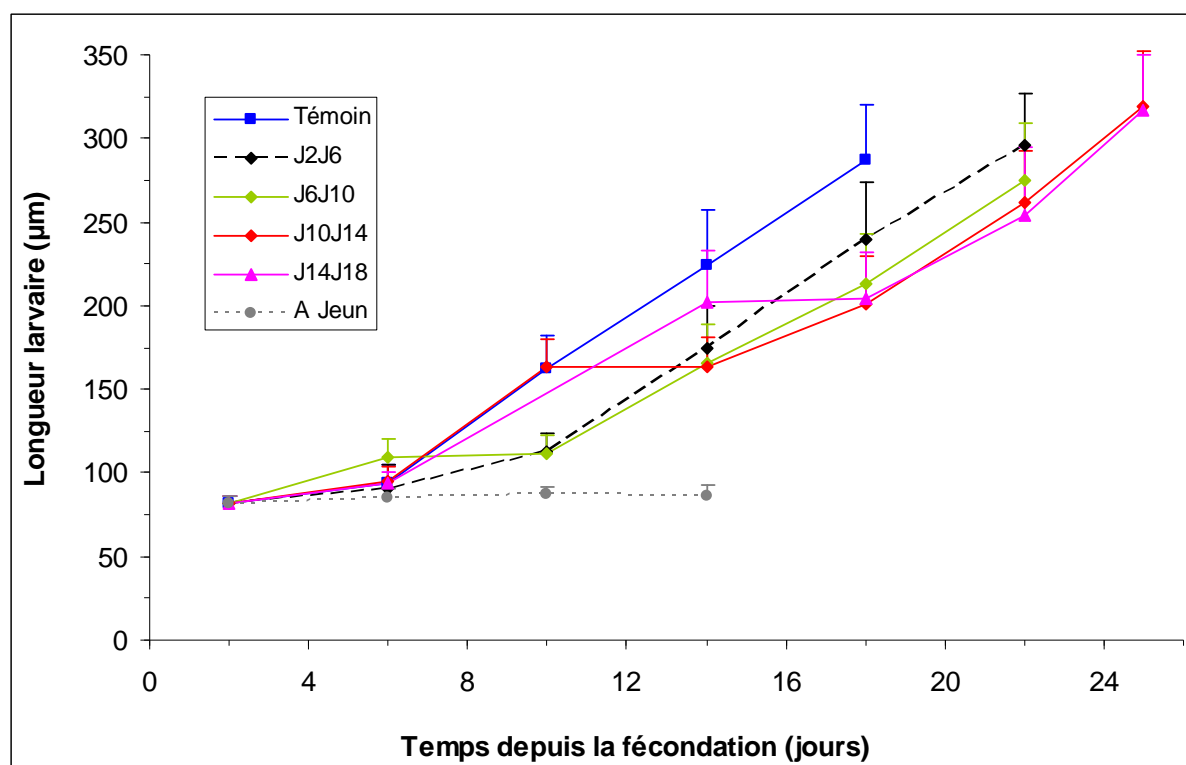


Figure 39 : croissance larvaire (moyenne  $\pm$  écart-type) de *C. gigas* soumise à un jeûne permanent (A Jeun) ou temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types.

Conditions	Longueur finale ( $\mu\text{m}$ )	Taux de croissance global ( $\mu\text{m j}^{-1}$ )
Témoin (TCp)	$L_{18} = 288,0 (32,8)^a$	$12,9 (2,0)^c$
Jeûne permanent	$L_{14} = 86,2 (6,5)^c$	$0,5 (0,3)^d$
J2J6	$L_{22} = 290,5 (32,6)^a$	$10,5 (1,6)^a$
J6J10	$L_{22} = 282,0 (39,9)^d$	$9,5 (1,9)^b$
J10J14	$L_{25} = 314,1 (45,9)^b$	$10,1 (2,0)^{ab}$
J14J18	$L_{25} = 318,2 (32,8)^b$	$10,2 (1,4)^{ab}$

Tableau 18 : longueur (moyenne  $\pm$  écart-type) mesurée en fin d'élevage larvaire ( $\mu\text{m}$ ) et taux de croissance global entre le deuxième jour et le jour précédent la métamorphose ( $\mu\text{m j}^{-1}$ ) chez *C. gigas* soumise à un jeûne permanent ou temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

## 6.4.2.2. Indices de condition larvaire

L'évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) au cours du développement larvaire est récapitulée dans le tableau 19.

Temps depuis la fécondation (j)	Témoin		J2J6		J6J10		J10J14		J14J18	
	PS	MO	PS	MO	PS	MO	PS	MO	PS	MO
2	131 (1)	38 (3)	131 (1)	38 (3)	131 (1)	38 (3)	131 (1)	38 (3)	131 (1)	38 (3)
6	518 (30)	202 (11)	186 (5)	66 (5)	413 (18)	129 (29)				
10	960 (2)	385 (14)	582 (185)	161 (82)	463 (41)	66 (23)	1228 (90)	381 (24)		
14	1886 (43)	436 (24)	1506 (38)	465 (6)	1013 (84)	311 (26)	1289 (38)	362 (8)	2435 (16)	393 (52)
18	4886 (265)	849 (40)	3311 (583)	442 (46)	2459 (284)	388 (2)	1816 (52)	458 (10)	2380 (65)	200 (5)
22			6023 (423)	844 (153)	5118 (291)	606 (46)				

**Tableau 19: évolution du poids sec (moyenne  $\pm$  écart-type) et de la matière organique (moyenne  $\pm$  écart-type) en ng larve<sup>-1</sup> chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique (n = 2). Le témoin est nourri tout au long de l'élevage.**

Le poids sec initial relevé au second jour est de 131 ng larve<sup>-1</sup>. Celui-ci augmente progressivement chez le témoin pendant la première semaine pour atteindre 518 ng larve<sup>-1</sup> au sixième jour. Puis, il ne cesse de doubler tous les quatre jours jusqu'à atteindre 4800 ng larve<sup>-1</sup>, juste avant la métamorphose (18<sup>e</sup> j). Ainsi le taux global de l'accumulation de la matière sèche pour une larve régulièrement alimentée est de 292 ng j<sup>-1</sup>. La mise à jeun se traduit par un arrêt de la croissance pondérale (PS) qui reprend dès que les individus sont réalimentés. En ce qui concerne le jeûne déclenché à l'issue de l'embryogenèse (J2J6), le poids sec des individus est en moyenne de 186 ng larve<sup>-1</sup> au sixième jour, ce qui correspond à seulement 34 % du poids du témoin. Le taux d'accroissement pondéral pendant ces quatre jours de jeûne est de 11 ng larve<sup>-1</sup>

$^1 \text{ j}^{-1}$  vs  $98 \text{ ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  chez le témoin. Dès qu'un apport nutritionnel est fourni, la croissance pondérale redémarre et les valeurs atteignent une moyenne de  $6000 \text{ ng}$  au vingt-deuxième jour, juste avant la métamorphose. Ceci correspond à un taux d'accroissement similaire à celui relevé chez le témoin ( $295 \text{ ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ). Il en est de même pour le jeûne J6J10 qui engendre une stabilisation des valeurs entre  $413$  et  $463 \text{ ng}$ , ce qui équivaut à une accumulation journalière de seulement  $13 \text{ ng}$  pendant ces quatre jours de traitement vs  $111 \text{ ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  chez le témoin pendant le même laps de temps ( $6-10^{\text{e}}$  j). Les valeurs augmentent suite à l'approvisionnement en microalgues et atteignent une moyenne de  $5118 \text{ ng}$  au vingt-deuxième jour, juste avant la métamorphose. Le taux d'accroissement global calculé est de  $250 \text{ ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$ . Le réajustement pondéral semble être plus lent quand le jeûne est plus tardif (J10J14). En effet, après une stabilisation des valeurs entre  $1228$  et  $1289 \text{ ng}$  provoquée par l'absence de nourriture, une augmentation relativement légère est notée au dix-huitième jour ( $1816 \text{ ng}$  vs  $4886 \text{ ng}$  pour le témoin). Enfin, pour le jeûne provoqué vers la fin du développement larvaire (J14J18), un arrêt pondéral est également mis en évidence mais les mesures n'ont pas été poursuivies au-delà du dix-huitième jour puisque les animaux ont été placés en processus de métamorphose.

La matière organique initiale relevée au deuxième jour est de  $38 \text{ ng larve}^{-1}$  (tableau 19). Elle augmente rapidement pendant la première semaine, chez le témoin, pour atteindre une moyenne de  $200 \text{ ng larve}^{-1}$  au sixième jour, soit un accroissement approximatif de cinq fois. Ensuite, le rythme de croissance de la matière organique se ralentit entre les dixième et quatorzième jours ( $385$  et  $436 \text{ ng}$  respectivement) et s'accélère juste avant la métamorphose. La valeur de la matière organique relevée au dix-huitième jour est en moyenne de  $849 \text{ ng larve}^{-1}$ . Excepté pour le jeûne très précoce (J2J6), un amaigrissement des animaux est noté lorsque ceux-ci sont privés de nourriture pendant quatre jours. En effet, une décroissance de la matière organique est enregistrée à l'issue du traitement. Le poids organique continue à augmenter légèrement malgré le jeûne J2J6 ( $66 \text{ ng larve}^{-1}$  au sixième jour vs  $38 \text{ ng larve}^{-1}$  au second jour). Cette accumulation reste néanmoins  $33 \%$  moins importante que celle notée chez les témoins.

Les résultats de l'évolution du pourcentage de matière organique par rapport au poids sec sont consignés dans le tableau 20. La teneur initiale de la matière organique relative est de  $29 \%$  au deuxième jour. Elle augmente jusqu'à  $39 \%$  au sixième jour chez les larves nourries en permanence pour rester stable jusqu'au dixième jour. A partir de cette date, une décroissance progressive est enregistrée jusqu'à la fin du cycle larvaire ( $18 \%$  au dix-huitième jour). Une évolution similaire est notée chez les larves subissant le jeûne précoce J2J6, avec des valeurs plus faibles vers la fin du développement larvaire ( $12-13 \%$ ). Le jeûne déclenché à

l'issue de la première semaine (J6J10) se traduit, quant à lui, par une chute de la moitié du rapport MO/PS à l'issue du traitement (14 %) suivie d'une augmentation aussi importante au quatorzième jour (31 %). A l'instar des deux conditions précédentes (témoin et J2J6), le rapport subit une décroissance vers la fin du cycle larvaire. La condition J10J14 est caractérisée par des valeurs plus stables (28-31 %). La mise à jeun, dans ce cas, ne s'est pas traduite par une chute importante du rapport. Les larves soumises au jeûne tardif (J14J18) montrent un rapport de 16 % avant le traitement et de 8 % après, soit une chute de la moitié des valeurs. Cette décroissance, ne peut cependant pas être amputée à l'effet du jeûne ; une même baisse est observée chez les témoins, moins brusque néanmoins.

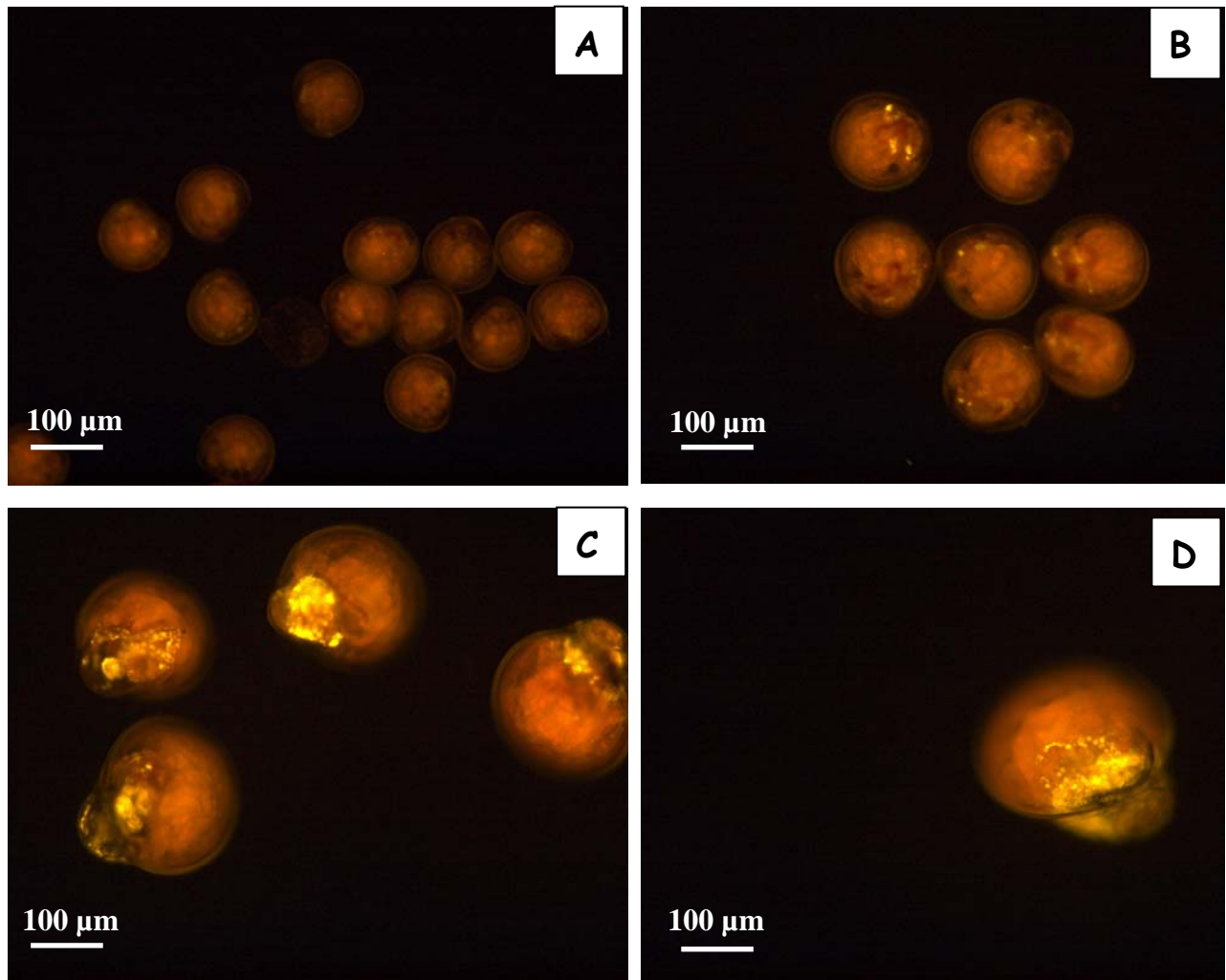
Temps depuis la fécondation (jour)	Témoin (TCp)	Jeûne (J2J6)	Jeûne (J6J10)	Jeûne (J10J14)	Jeûne (J14J18)
2	29,1 (2,3)	29,1 (2,3)	29,1 (2,3)	29,1 (2,3)	29,1 (2,3)
6	39,2 (0,1)	38,8 (4,2)	31,0 (5,6)		
10	39,1 (1,4)	26,9 (6,0)	14,2 (3,8)	31,1 (0,3)	
14	23,3 (1,8)	30,9 (0,4)	30,8 (0,4)	28,3 (0,3)	16,1 (2,3)
18	18,8 (1,8)	13,4 (1,0)	15,4 (1,6)	26,6 (1,4)	8,4 (0,5)
22		12,3 (1,8)	11,8 (0,2)		

**Tableau 20** : évolution du rapport MO/PS (moyenne ± écart-type) chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage.

#### 6.4.2.3. Indice lipidique global

Au deuxième jour, les lipides n'occupent que 6 % de la surface de la larve. Chez les individus subissant un jeûne précoce J2J6, la teneur lipidique est nulle à l'issue du traitement (6<sup>e</sup> j ; figure 40 : photo A et figure 41). Par contre, ce taux initial reste stable, chez les individus nourris, jusqu'au sixième jour puis augmente brusquement pour atteindre 21 % au dixième jour (figure 41). Ultérieurement, de légères fluctuations sont relevées (16 % au quatorzième jour et 24 % au seizième jour) suivies d'une baisse des valeurs (13 %) au dix-huitième jour, juste avant la métamorphose. A l'inverse des individus maintenus à jeun en permanence, dont le taux lipidique reste indéfiniment nul, les larves maintenues à jeun temporairement montrent une récupération lipidique rapide suite à leur réalimentation (19 %

au dixième jour). Les valeurs se stabilisent ultérieurement (16-20 %), avec une légère tendance à la baisse juste avant la métamorphose (18 % au 22<sup>e</sup> j). Une même évolution est observée lorsque les larves sont privées de nourriture entre les sixième et dixième jours (J6J10) ; la consommation lipidique totale consécutive au jeûne (figure 40 : photo B et figure 41) est suivie d'une importante régénération puisqu'au quatorzième jour la surface lipidique occupe 22 % de la surface de la larve et 31 % au seizième jour. Juste avant la métamorphose (22<sup>e</sup> j), une même baisse des valeurs est constatée (25 %). Les jeûnes temporaires plus tardifs, J10J14 et J14J18, ne provoquent pas, quant à eux, une consommation totale des réserves (figure 40 : photos C et D et figure 41). A l'issue des traitements, les teneurs respectives sont de 5 et 9 %. Dans les deux cas et après quatre jours de réalimentation, les teneurs atteignent environ 20 %. Une baisse de la surface lipidique est également notée juste avant métamorphose, au vingt-cinquième jour, pour ces deux conditions (11-13 % : figure 41).



**Figure 40 : gestion des réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas* soumises à différentes périodes de jeûne.** Photo A : absence totale de réserves lipidiques chez les larves âgées de six jours et soumises au jeûne J2J6. Photo B : absence des réserves lipidiques chez les larves âgées de dix jours et soumises au jeûne J6J10. Photo C : persistance de quelques réserves lipidiques chez les larves âgées de quatorze jours et soumises au jeûne J10J14. Photo D : persistance des réserves lipidiques chez les larves âgées de dix-huit jours et soumises au jeûne J14J18.

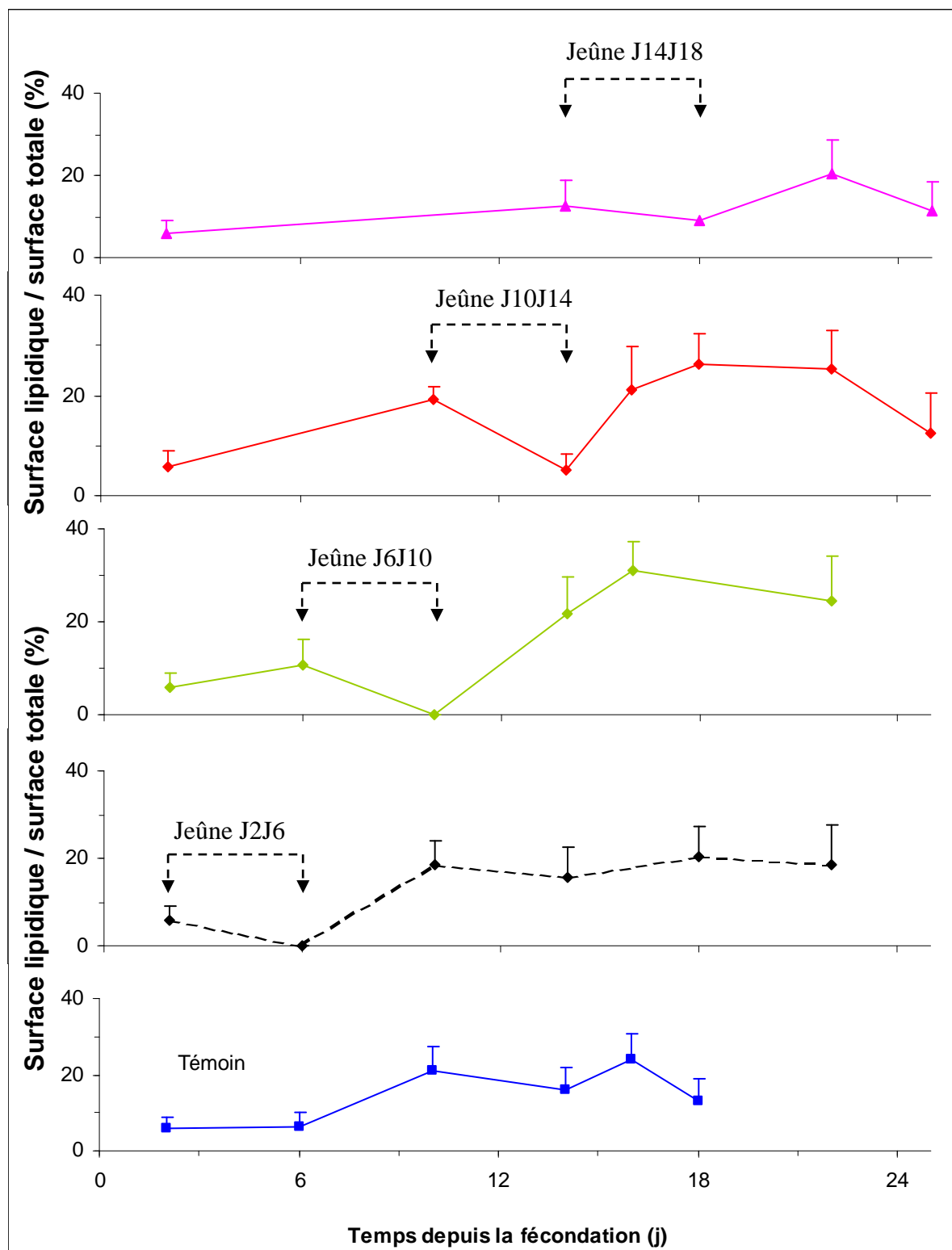


Figure 41 : évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types. La flèche indique la période de mise à jeun.

#### 6.4.2.4. Indice biochimique structurel

L'évolution des teneurs de triacylglycérols (TAG) et de stérols (ST) a été suivie au cours du développement larvaire de *C. gigas* chez des individus régulièrement nourris (témoins) et soumis à des durées de jeûne de quatre jours, à différentes périodes du cycle larvaire (tableau 21). Les mesures juste avant le jeûne (espaces hachurés dans le tableau) n'ont pas été effectuées car les larves étaient soumises aux mêmes conditions que celles des témoins. Chez les témoins, l'accroissement en triacylglycérols en première semaine est quasiment nul (1,2 ng larve<sup>-1</sup> au sixième jour) mais les teneurs augmentent rapidement à partir de la deuxième semaine (42 ng larve<sup>-1</sup> au 14<sup>e</sup> j : tableau 21). Une larve pré métamorphique (18<sup>e</sup> j) renferme en moyenne 124 ng larve<sup>-1</sup> de triacylglycérols, soit un accroissement journalier de 8 ng larve<sup>-1</sup>. A l'instar de l'étude colorimétrique, l'analyse biochimique montre une consommation intégrale des réserves de lipides neutres (triacylglycérols) suite aux jeûnes précoces, J2J6 et J6J10 (tableau 21 ; figures 41 : photos A et B), tandis que pour les jeûnes plus tardifs, J10J14 et J14J18, des teneurs, néanmoins très faibles, sont détectées (2 et 9 ng larve<sup>-1</sup> respectivement) à l'issue du traitement (tableau 19 ; figures 41 : photos C et D), d'où la faible coloration. Quelle que soit la condition, les teneurs des triacylglycérols sont rapidement restaurées suite à la réalimentation des individus.

L'accroissement en stérols est faible en première semaine (0,6 ng larve<sup>-1</sup> au sixième jour) mais s'accélère ultérieurement (15 ng larve<sup>-1</sup> au 18<sup>e</sup> j) chez les témoins, ce qui conduit à une accumulation journalière de 1 ng larve<sup>-1</sup> (tableau 21). Suite au jeûne, la dégradation de ces lipides de structure est moins importante que celle des lipides de réserve. En effet, alors que la consommation des triacylglycérols est intégrale (92-100 %), seulement 51 à 88 % des stérols sont dégradés suite à l'absence de microalgues et 33 % dans le cas d'un jeûne précoce J2J6.

Temps depuis la fécondation (j)	Témoin		J2J6		J6J10		J10J14		J14J18			
	TAG	ST	TAG	ST	TAG	ST	TAG	ST	TAG	ST		
2	1,1 (0,2)	0,3 (0,0)	1,1 (0,2)	0,3 (0,0)	1,1 (0,2)	0,3 (0,0)	1,1 (0,2)	0,3 (0,0)	1,1 (0,2)	0,3 (0,0)		
6	1,2 (0,2)	0,6 (0,1)	0,0 (0,0)	0,4 (0,0)								
10	28,0 (5,1)	3,5 (0,3)	8,0 (0,8)	0,91 (0,0)							0,0 (0,0)	0,8 (0,1)
14	42,1 (9,0)	8,8 (0,8)	41,3 (3,4)	6,5 (0,3)							30,1 (0,8)	3,8 (0,0)
18	124,0 (3,0)	14,9 (3,2)	188,0 (16,0)	10,9 (2,9)	169,0 (26,4)	13,3 (3,0)	92,6 (5,8)	8,3 (1,1)	9,3 (2,1)	8,3 (1,0)		

**Tableau 21** : évolution des triacylglycérols (TAG) et des stérols (ST) en ng larve<sup>-1</sup> (moyenne  $\pm$  écart-type) chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage.

L'évolution du rapport TAG/ST au cours du développement larvaire de *C. gigas* nourrie régulièrement (témoin) ou soumise à des durées de jeûne de quatre jours, à différentes périodes de leur cycle est représentée dans la figure 42. Le rapport évolue d'une façon irrégulière au cours du temps. Chez les témoins, le rapport est faible en début d'élevage et diminue de 3 à 2 du second au sixième jour. Un optimum est noté au dixième jour (8) suivi d'une légère décroissance, les valeurs étant comprises entre 5 et 8 en fin d'élevage. Chaque période de jeûne se traduit chez les larves par la consommation intégrale des triacylglycérols et partielle des stérols (tableau 21), entraînant par conséquent un effondrement de ce rapport (figure 42). Celui-ci augmente rapidement suite à la réalimentation des larves et la reconstitution de leurs réserves.



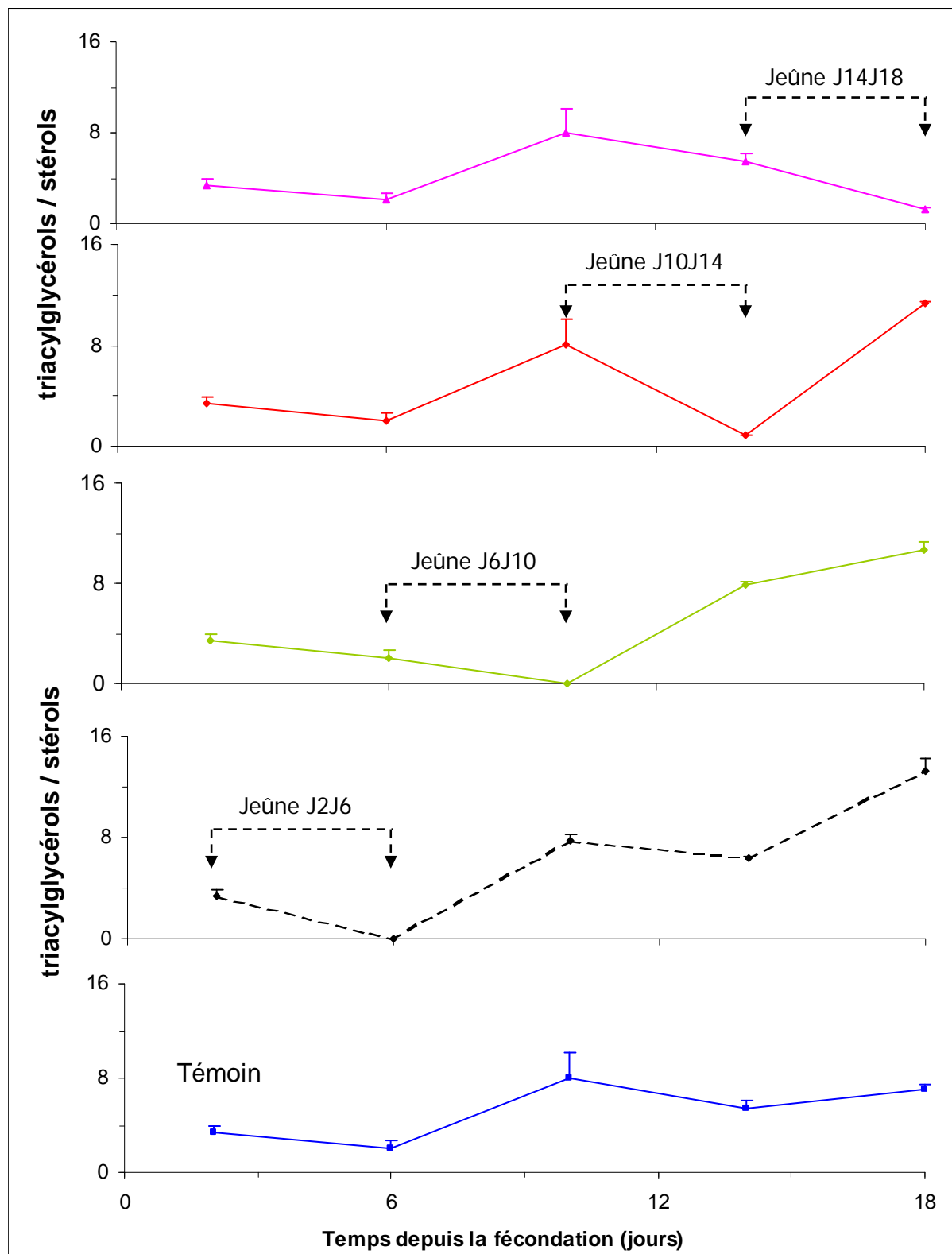


Figure 42 : évolution du rapport triacylglycérols / stérols chez des larves de *C. gigas* soumises à un jeûne temporaire, de quatre jours, à différentes périodes du cycle pélagique. Le témoin est nourri tout au long de l'élevage. Les barres verticales correspondent aux écart-types (n = 2). La flèche indique la date de la mise à jeun.

## 6.5. Discussion et conclusion

Dans le milieu naturel, la concentration et la qualité du phytoplancton sont en fluctuation temporelle et spatiale permanente. Les larves sont donc confrontées à une diminution voire à une absence de nourriture durant certaines phases de leur développement. Sur les mollusques et spécialement les bivalves, les connaissances acquises à ce jour concernant l'incidence du jeûne sur les performances larvaires, en milieu contrôlé, restent rares.

En général, il a été rapporté que les larves présentent une grande tolérance vis-à-vis du jeûne et que les survies sont relativement élevées chez les individus soumis à un tel stress (Qiu *et al.*, 1998 ; Moran et Manahan, 2004). Des larves d'*Ostrea edulis* élevées pendant douze jours sans apport de nourriture présentent une survie finale de 83 % (Labarta *et al.*, 1999). Chez *C. gigas*, les taux de survie des individus nourris régulièrement et ceux ayant subi un jeûne initial de quatorze jours ne sont pas significativement différents (Moran et Manahan, 2004). Dans le présent travail, après deux et même trois semaines consécutives de jeûne (1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> séries respectivement), les taux de survie sont similaires à ceux des témoins nourris témoignant de la qualité hygiénique de nos élevages. La survie des individus n'est significativement affectée qu'après 25 jours. Cependant, chez la même espèce, alors qu'une période de jeûne initiale de deux ou trois jours est sans conséquence sur la survie et la croissance, une mortalité quasi-totale des larves à partir du huitième jour de jeûne est décrite par His et Seaman (1992) qui avancent que l'apport nutritionnel est nécessaire dès les premiers jours suivant la fécondation. Contrairement à nos résultats qui ont montré qu'une période de jeûne initiale est sans influence biologique notable sur les individus, l'apport nutritionnel paraît donc nécessaire dès les premiers jours après la fécondation, selon ces auteurs. Ces conclusions vont à l'encontre des données rapportées récemment chez l'huître japonaise où il a été démontré, sans ambiguïté, que pour des températures  $\leq 28^{\circ}\text{C}$  et une concentration phytoplanctonique permanente de 40 cellules  $\text{l}^{-1}$ , le taux d'ingestion des microalgues reste faible jusqu'au 5<sup>e</sup> j (Rico-Villa *et al.*, 2006). De ce fait, les mortalités rapportées par His et Seaman (1992) ne peuvent être la conséquence directe du jeûne et l'hypothèse d'une vibriose reste très probable, celle-ci étant connue comme étant particulièrement virulente chez les larves de mollusques (Elston, 1993).

Nos résultats montrent que le jeûne se répercute, par contre, sur la croissance larvaire avec une quasi absence de développement quand le traitement est prolongé et un arrêt

transitoire quand celui-ci est temporaire. Il est à signaler que lorsque la privation alimentaire est précoce (D2D6), on note un accroissement de matière sèche et de matière organique, quoique relativement mineur par rapport à celui enregistré chez les individus régulièrement nourris. Puisqu'une filtration fine de l'eau de mer à 1  $\mu\text{m}$  a été systématiquement appliquée au cours de nos expérimentations, il est donc probable que la matière dissoute soit à l'origine de cet accroissement comme préalablement démontré chez diverses larves d'invertébrés (Jaeckle et Manahan, 1992). Comme démontré dans les autres chapitres, le rapport MO/PS est inapte à traduire les écarts de performance observés et apparaît comme un médiocre indicateur de qualité chez les larves de *C. gigas*. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Lucas *et al.* (1986) et Whyte *et al.* (1988) qui considèrent ce rapport comme un bon indicateur de la compétence larvaire à la métamorphose chez la moule *Mytilus edulis* et le pétoncle *Patinopecten yessoensis* sans étayer cependant leur affirmation par des travaux expérimentaux ciblés. Ils sont en revanche pleinement en phase avec ceux rapportés par Robert *et al.* (1999) qui démontrent une faible corrélation entre ce rapport et le taux de métamorphose chez *P. maximus*. Nos résultats montrent aussi que les larves de *C. gigas* présentent une certaine tolérance à un jeûne limité ainsi qu'une rapide récupération physiologique. La période de jeûne initiale D2D6 est sans influence biologique notable sur les individus. Ainsi, au cours de la première série expérimentale, les larves présentent un taux de croissance similaire au témoin malgré une moindre période cumulée d'alimentation (12 vs 14 j) engendrant même un meilleur taux de métamorphose. A l'inverse, dans la deuxième série expérimentale, le taux de croissance des larves mises à jeun précocement est inférieur à celui du témoin nourri continuellement, cette différence de taille ne se répercutant cependant pas sur le taux de métamorphose.

Ces écarts de croissance larvaire pourraient s'expliquer par des niveaux initiaux de réserves lipidiques différents. En effet alors qu'au deuxième jour, les lipides occupent 22 % de la surface larvaire au cours de la première série expérimentale, ils représentent seulement 8 % chez les larves issues de la deuxième ponte. Par contre, cet écart n'est pas suffisant pour traduire des mortalités différentielles comme rapportées antérieurement chez *O. edulis*, (Holland et Spencer, 1983), *Mercenaria mercenaria* et *C. virginica* (Gallager et Mann, 1986). Si le jeûne appliqué précocement juste après embryogenèse (D2D6) semble être une situation naturelle dans la mesure où les larves à ce stade dépendent encore, en large partie, de leurs réserves vitellines, le jeûne provoqué vers la fin de la première semaine (D6D10) reste toutefois critique. En effet, alors qu'au cours de la première série expérimentale, cette condition de jeûne se traduit par une survie relativement faible, une reprise médiocre de la croissance et une inaptitude à la métamorphose, la deuxième série expérimentale se caractérise

par des taux de survie et de compétence larvaires élevés malgré une moindre teneur lipidique initiale. Il est intéressant de noter que les témoins normalement nourris présentent une plus forte croissance au cours de la première série d'expérience ( $16$  vs  $13 \mu\text{m j}^{-1}$ ) alors que les autres indicateurs du développement larvaire (survie, compétence, métamorphose) sont similaires. Dans ce cas la demande énergétique est plus forte et malgré des réserves initiales plus conséquentes leur consommation est intense. Elle pourrait alors expliquer la différence de résistance des larves au stress nutritionnel imposé au cours de cette phase particulière (D6-D10) entre les deux expériences. En effet, chez *C. gigas* cette période du développement larvaire correspond à une transition entre la phase mixotrophe, au cours de laquelle les larves puisent l'essentiel de leur énergie dans leurs réserves vitellines et, de façon moindre, à partir des particules planctoniques exogènes, vers une phase exotrophe où les microalgues apportées vont jouer un rôle capital dans leur développement ultérieur, notamment dans leur succès à la métamorphose. Ainsi, quel que soit l'indice utilisé (indice lipidique global ou TAG/ST), les résultats montrent que suite à une privation nutritionnelle, les lipides neutres sont totalement consommés au 6<sup>e</sup> j démontrant ainsi que les réserves endogènes chez *C. gigas* sont entièrement utilisées au cours de la première semaine, pour une température d'élevage de 25° C. Par conséquent, pendant les premiers jours d'élevage, et conformément aux résultats de Labarta *et al.* (1999) chez *O. edulis*, l'apport exogène est limité chez *C. gigas* mais nécessaire pour probablement stimuler le système digestif. Le passage à l'exotrophie stricte correspond à une période où la larve est particulièrement sensible aux déficits énergétiques. Il n'est donc pas surprenant que les larves privées temporairement de nourriture à l'issue de la première semaine, et présentant un épuisement quasi complet des réserves lipidiques, soient moins résistantes à des agressions de type bactériennes.

Tandis qu'un point de non retour est atteint chez *O. edulis* quand les réserves endogènes sont totalement épuisées (Labarta *et al.*, 1999) un jeûne temporaire de quatre jours se traduit par un intense catabolisme des réserves chez des larves de *C. gigas* qui n'affecte pas leur reconstitution ultérieure dès la réalimentation des élevages. Par ailleurs, chez des larves normalement alimentées, la présence au sixième jour de lipides neutres en faible quantité (3 – 6 % et 1,2 ng de TAG), confirme qu'elles ont bien épuisé leurs réserves endogènes initiales et ont déjà commencé à consommer des microalgues, sans pour autant être en mesure d'accumuler des réserves lipidiques. Or, l'ingestion des microalgues a été rapportée à partir du stade D, quelques heures seulement après la formation de la prodissoconque I (Lucas et Rangel, 1983 ; Robert, 1998). Cette incapacité de stockage lipidique au cours de la première semaine de vie larvaire pourrait être due soit à un besoin vital de dépenser le stock lipidique endogène avant de pouvoir accumuler de nouvelles réserves exogènes, soit à un système

enzymatique déficient capable de lipolyse mais pas encore de liposynthèse comme démontré chez les larves de *Solea senegalensis* (Fehri-Bedoui *et al.*, 2000). Afin de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses des dosages enzymatiques spécifiques sont nécessaires chez les premiers stades larvaires de *C. gigas*.

Nos travaux démontrent également que les réserves lipidiques deviennent importantes chez *C. gigas* à partir du dixième jour (19 – 21 % et 28 ng de TAG). Grâce à ces réserves néoformées liées à une forte consommation microalgale, les jeûnes provoqués à partir du dixième jour (J10J14 et J14J18), ne conduisent qu'à un épuisement lipidique partiel. Cette accumulation lipidique semble plus précoce chez la coquille St Jacques *P. maximus* puisqu'elle commence au sixième jour, quatre jours après la première alimentation (Delaunay *et al.*, 1992). Elle serait légèrement plus tardive chez les *M. edulis* avec la fin de l'utilisation du vitellus au huitième jour suivie d'un fort accroissement de la teneur lipidique correspondant à la néoformation de réserves (Lucas *et al.*, 1986).

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que la métamorphose n'est pas liée à un niveau donné de réserves lipidiques. En effet, les lots D2D6 et D6D10 ne sont pas aptes à se métamorphoser au dix-huitième jour alors qu'elles contiennent des teneurs en TAG et lipides neutres supérieures à celles du témoin. Des observations similaires ont été réalisées chez *M. edulis* où, en fin d'élevage larvaire, un apport complémentaire de microsphères lipidiques aux microalgues n'améliore pas le taux de métamorphose (Pernet *et al.*, 2004). D'autres critères, comme une taille minimale, sont probablement nécessaires pour que les individus acquièrent l'aptitude à la métamorphose. Une taille critique estimée à 250-290  $\mu\text{m}$  (Coon *et al.*, 1990) et 300-320  $\mu\text{m}$  (Helm *et al.*, 2004) est rapportée respectivement chez *C. gigas* et *O. edulis*. Les larves de *C. gigas* sont caractérisées par une grande plasticité face au jeûne temporaire, qui constitue une épreuve forte mais de courte durée, et une grande faculté de récupération et de retour à l'état physiologique initial, dès que de bonnes conditions nutritionnelles sont rétablies. Pour faire face à un tel stress trophique, les individus ont adopté des stratégies adaptatives grâce à des mécanismes de réduction de leur métabolisme (stratégie vitale d'économie d'énergie), mise en évidence par le ralentissement voire l'arrêt de la croissance pondérale et linéaire ainsi qu'une consommation intégrale ou partielle de leurs lipides de réserve, démontrée aussi bien par la méthode colorimétrique que biochimique, pour le maintien de leur métabolisme basal. En outre, et pour limiter toute dépense énergétique, nous avons pu aussi constater que les véligères, privés de nourriture, cessaient toute activité de nage et se cantonnaient dans le fond des bacs ou des béciers.

La pertinence de l'indice lipidique global est toutefois à prendre avec précaution. En effet, il rend bien compte de la gestion des réserves lipidiques particulièrement dans ce type

d'expérimentation où l'impact du jeûne est marquant sur les processus d'épuisement et de restauration des stocks lipidiques et où il montre une grande plasticité et de tolérance de cette espèce vis-à-vis d'un tel stress. Cependant, sa corrélation avec les performances d'élevage n'est pas entièrement satisfaisante puisque des indices faibles voire nuls ne sont pas systématiquement associés à de mauvaises croissances, survies ou métamorphoses. Ceci est sans doute lié à la grande faculté de récupération des larves de *C. gigas* et que les lipides ne sont probablement pas le seul facteur limitant pour le développement larvaire de *C. gigas*.

**Influence combinée des techniques de production  
larvaire et phytoplanctonique sur les performances et la  
qualité physiologique des élevages de *C. gigas***





## **7. Influence combinée des techniques de production larvaire et phytoplanctonique sur les performances et la qualité physiologique des élevages de *C. gigas***

### **7.1. Cadre expérimental**

#### **7.1.1. Les microalgues**

Afin de définir la valeur alimentaire des microalgues testées sur les larves de *C. gigas* au cours des élevages Gig0609 (ponte du 11 septembre 2006) et Gig0611 (ponte du 15 novembre 2006), des prélèvements phytoplanctoniques ont été opérés les 22, 28 et 29 septembre pour le premier élevage et les 23 et 30 novembre pour le second. Leur teneur en poids sec, protéine/lipide/glucide, acide gras et stérols ont été acquise.

Pour l'estimation du poids sec 50 ml de culture phytoplanctonique sont centrifugés (3000 tr min<sup>-1</sup>, 10 min). Le culot est repris dans une solution de formiate d'ammonium (35 ‰) et centrifugé à nouveau avant d'être transféré dans une nacelle tarée. Après séchage à l'étuve (100 °C, 24h) et évaporation du formiate, le poids sec est obtenu par une nouvelle pesée.

Pour la détermination de la composition biochimique proximale 50 ml de microalgues sont centrifugés (3000 tr min<sup>-1</sup>, 10 min). Le culot, remis en suspension dans de l'eau de mer, subit une nouvelle centrifugation, avant d'être mis à sec pour conservation au congélateur. Les protéines et glucides sont dosés par spectrophotométrie, respectivement selon les méthodes de Lowry *et al.* (1951) et de Dubois *et al.* (1956), tandis que les lipides sont mesurés par pesée, après extraction au dichlorométhane, selon la méthode de Bligh et Dyer (1959).

Pour la quantification des acides gras et stérols 300 millions de cellules de microalgues environ sont retenues sur filtre GF/F préalablement brûlé (450 °C, 4h) afin d'éliminer toute trace de matière organique, puis stocké à -20 °C, dans 6 ml de réactif de Folch (chloroforme / méthanol, 2/1).

### 7.1.2. Les essais biologiques

L'incidence combinée de la technique de culture phytoplanctonique (batch en ballon de 6 L ou en cylindre de 300 L selon des méthodes classiques à Argenton *vs* continu en photobioréacteurs de 18 L (Bougaran *et al.*, 2003)) et de la technique d'élevage larvaire (séquentiel *vs* flux ouvert) sur les performances d'élevage et les indices de condition a été recherchée chez les larves de *C. gigas*. Pour ce faire, cinq séries expérimentales ont été conduites dans le triple objectif de tester trois régimes alimentaires (voir partie matériels et méthodes).

Le premier objectif visait à déterminer l'impact d'une alimentation monospécifique de type Haptophycée à base d'*Isochrysis affinis galbana* (T). A cet effet, deux séries expérimentales ont été conduites : Gig0605 (ponte du 05 avril 2006) et Gig0606 (ponte du 10 mai 2006).

L'étude de l'influence d'un régime monospécifique de type Diatomophycée à base de *Chaetoceros gracilis* (C) constituait notre deuxième objectif. Pour cela, deux expérimentations ont été conduites : Gig0610 (ponte du 16 octobre 2006) et Gig0611 (ponte du 15 novembre 2006).

Le troisième objectif visait à vérifier l'influence d'une alimentation bispécifique (TC) dans le cadre d'un élevage effectué le 11 septembre 2006 (Gig0609).

Les élevages ont été conduits, en duplicata, en bacs cylindro-coniques de 30 L et 150 L, ce dernier autorisant un suivi biochimique.

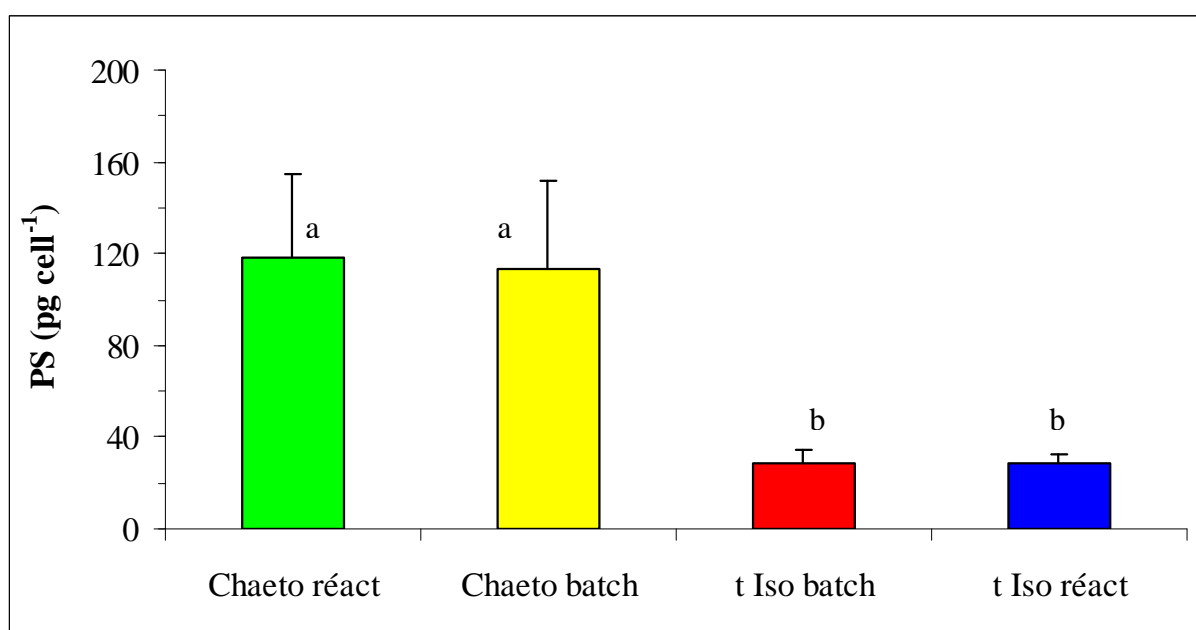
Des prélèvements de larves sont régulièrement opérés tous les deux jours pour :

- l'acquisition de la longueur en analyse d'images,
- l'estimation de la mortalité par dénombrement des larves translucides au projecteur de profil,
- le suivi de la qualité physiologique des larves à travers les réserves lipidiques au moyen d'un indice colorimétrique ou la détermination du ratio triglycérides / stérols.

## 7.2. Composition biochimique des microalgues

### 7.2.1. Poids sec

Les cultures produites en continu présentent un poids sec équivalent à celui noté en batch (figure 43). Il est de 28-29 pg pour une cellule d'*I. aff. galbana* ( $p > 0,9999$ ), et quatre fois plus élevé pour *C. gracilis* (113-119 pg cellule<sup>-1</sup> mais ne présentent pas de différence significative entre les techniques de culture pour les deux espèces considérées ( $p = 0,98$ ).



**Figure 43 :** poids sec, en pg cellule<sup>-1</sup>, d'*I. aff. galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 10). Les histogrammes surmontés de la même lettre ne sont pas significativement différents, au seuil de 5 %.

### 7.2.2. Composition biochimique proximale

La composition biochimique proximale des microalgues est représentée dans la figure 44, tandis que le pourcentage relatif (total composants :  $\sum P+L+G$ ) est rapporté dans la figure 45. La composition biochimique proximale est statistiquement similaire chez la même espèce, quel que soit son type de production (batch ou continu). La teneur en lipide (figure 44 a) est de 8 pg cellule<sup>-1</sup> chez *C. gracilis*, soit environ deux fois plus importante que chez *I. aff. galbana* ( $p < 0,05$ ). Les taux de protéine (figure 44 b) sont également environ deux fois plus importants

avec 8-9 pg cellule<sup>-1</sup> chez la diatomée vs 4-5 pg cellule<sup>-1</sup> chez le flagellé (p < 0,05). En revanche, les glucides forment la classe la moins dominante (figure 44 c) et ne présentent aucune différence significative entre les deux espèces de microalgues (p = 0,35).

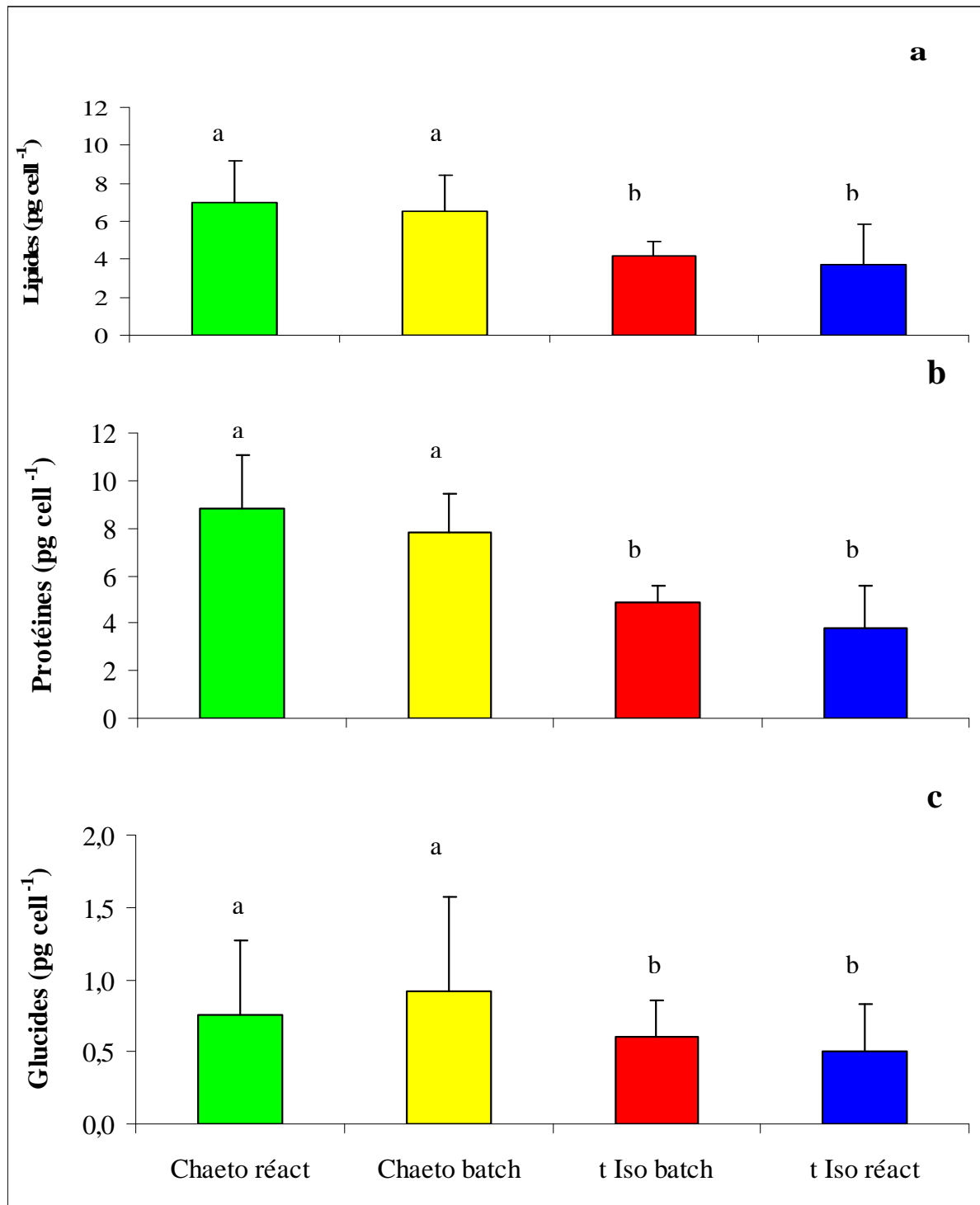
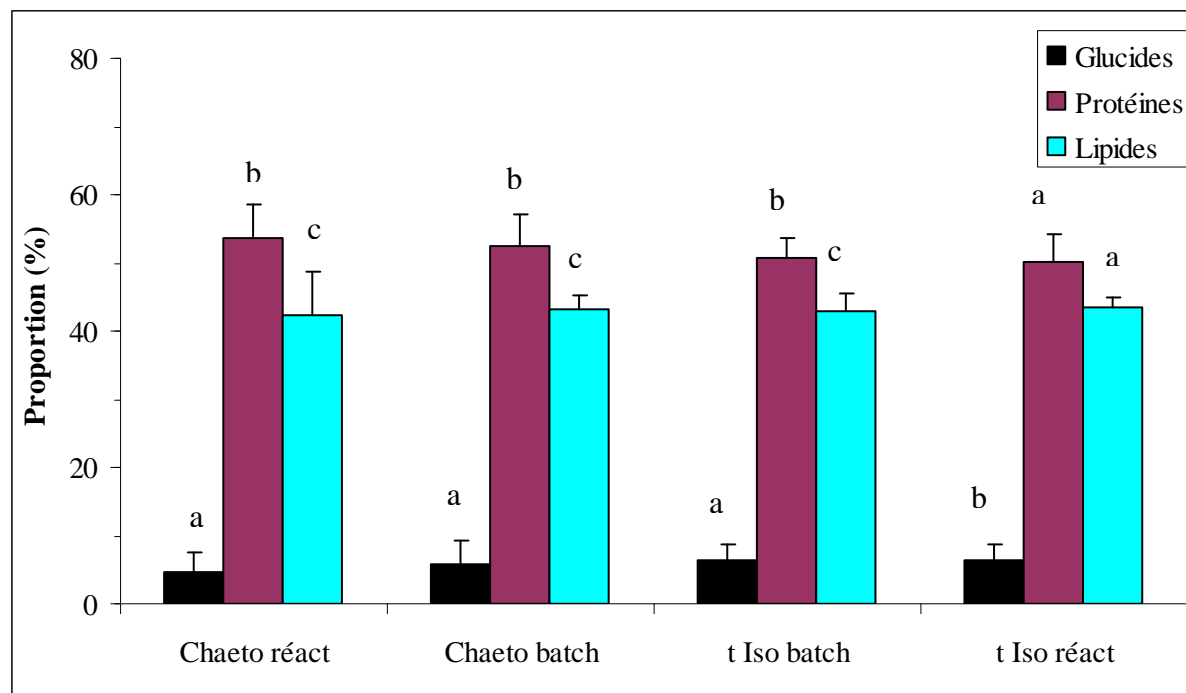


Figure 44 : teneur en lipide (a), protéine (b) et glucide (c), en pg cellule<sup>-1</sup>, chez *I. ration galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 10). L'échelle des ordonnées du graphe c est comprise entre 0 et 2. Les histogrammes surmontés de la même lettre ne sont pas significativement différents, au seuil de 5 %.

Quels que soient l'espèce et le type de production, les protéines constituent la fraction majoritaire, avec des valeurs comprises entre 50 et 54 % de la composition biochimique proximale (figure 45), et les lipides légèrement inférieurs (42-44 %). Les glucides constituent, en revanche, la fraction mineure avec des pourcentages de l'ordre de 5-6 % (figure 45).



**Figure 45 : pourcentage relatif des glucides, protéines et lipides chez *I. rasion galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch).** Les barres verticales représentent les écart-types (n = 10). Les histogrammes surmontés de la même lettre ne sont pas significativement différents, au seuil de 5 %.

### 7.2.3. Composition en acides gras

Le profil des acides gras d'*I. rasion galbana* et de *C. gracilis* est représenté dans le tableau 22 et la figure 46. Produite en batch ou en continu, la tendance est similaire pour une même espèce. Ainsi, le flagellé *I. rasion galbana* renferme 24-25 % d'acides gras saturés, constitués majoritairement par les acides myristique 14 :0 (14 %) et palmitique 16 :0 (9 %). Des proportions comparables sont également relevées chez la diatomée *C. gracilis*. En revanche, cette dernière renferme des pourcentages supérieurs en acides gras monoinsaturés (23-28 %), représentés principalement par l'acide palmitoléique 16 :1n8 (20-24 %). Celui-ci est décelé avec un pourcentage de seulement 5 % chez *I. rasion galbana* qui contient, en plus, l'acide oléique 18 :1n9 (9-10 %). Le taux des acides gras monoinsaturés chez ce flagellé est de

l'ordre de 16-18 %. Concernant les acides gras polyinsaturés, les deux espèces renferment des taux comparables : 56-59 % dans *I. ration galbana* vs 48-54 % dans *C. gracilis*. La composition de cette fraction est, cependant, différente selon la microalgue mais pas en fonction de son mode de production (continu ou batch). Ainsi, *I. ration galbana* est caractérisée par la présence des acides linoléique 18 :2n6 (9-14%), linoléique 18 :3n3 (8 %), stéaridonique 18 :4n3 (14-19 %) et docosahexaénoïque 22 :6n3 (10-11 %). L'acide eicosapentaénoïque (20 :5n3) est, quant à lui, présent en trace (0,8-0,8 %). En revanche, la diatomée *C. gracilis* se distingue par des contenus plus élevés en acides eicosapentaénoïque 20 :5n3 (24 %) et palmitoléique 16 :3n4 (11-15 %).

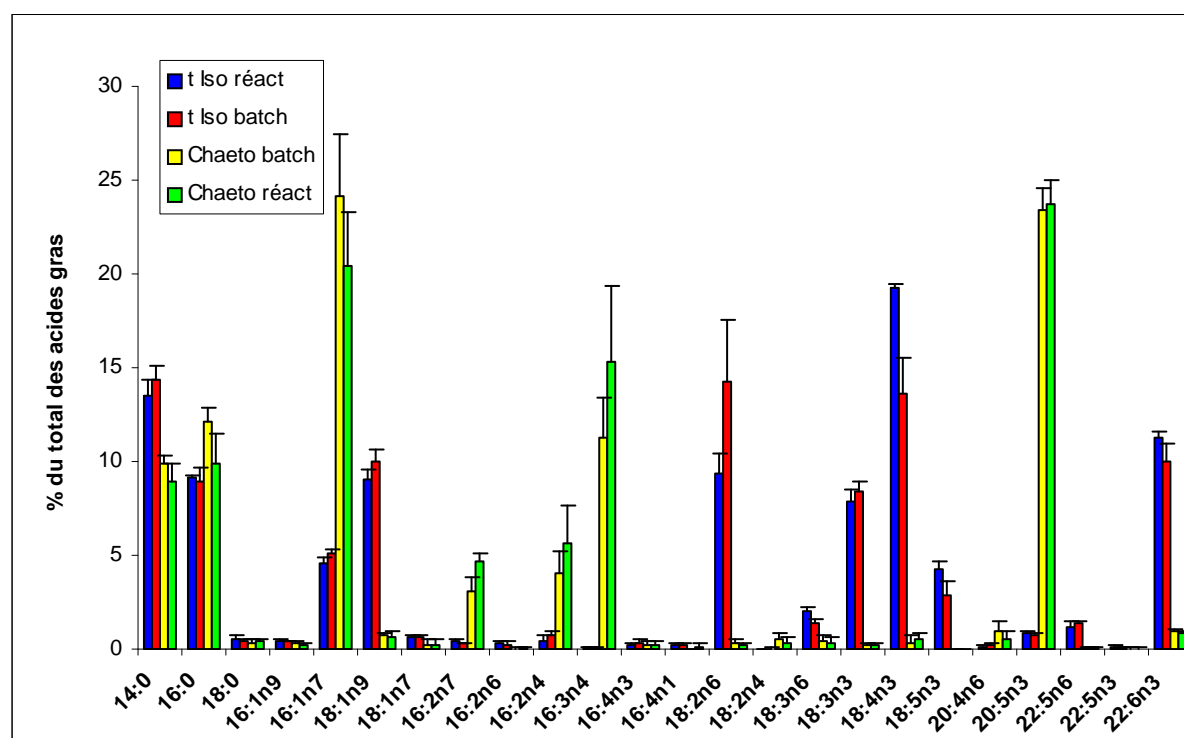


Figure 46 : pourcentage d'acides gras présents dans *I. ration galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch). Les barres verticales représentent les écart-types.

Acides gras	t Iso réact (n = 2)	t Iso batch (n = 5)	Chaeto réact (n = 5)	Chaeto batch (n = 5)
14:0	13,54 (0,88) <sup>a</sup>	14,39 (0,84) <sup>a</sup>	8,98 (0,91) <sup>b</sup>	10,08 (0,33) <sup>b</sup>
16:0	9,19 (0,08) <sup>ab</sup>	8,90 (0,88) <sup>a</sup>	9,85 (1,64) <sup>ab</sup>	12,15 (0,52) <sup>b</sup>
18:0	0,55 (0,21) <sup>a</sup>	0,43 (0,05) <sup>a</sup>	0,40 (0,13) <sup>a</sup>	0,56 (0,11) <sup>a</sup>
<b>Σ Saturés</b>	<b>23,28 (1,05)<sup>ab</sup></b>	<b>23,83 (1,50)<sup>a</sup></b>	<b>19,44 (2,30)<sup>b</sup></b>	<b>22,89 (0,95)<sup>ab</sup></b>
16:1n9	0,42 (0,09) <sup>a</sup>	0,38 (0,05) <sup>a</sup>	0,25 (0,05) <sup>b</sup>	0,39 (0,08) <sup>ab</sup>
16:1n8	4,61 (0,34) <sup>a</sup>	5,13 (0,21) <sup>a</sup>	20,48 (2,81) <sup>b</sup>	23,58 (4,41) <sup>b</sup>
18:1n9	9,09 (0,60) <sup>a</sup>	10,02 (0,59) <sup>a</sup>	0,61 (0,38) <sup>b</sup>	0,61 (0,04) <sup>b</sup>
18:1n8	0,68 (0,05) <sup>ab</sup>	0,66 (0,08) <sup>a</sup>	0,28 (0,28) <sup>b</sup>	0,55 (0,05) <sup>ab</sup>
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>14,89 (0,90)<sup>a</sup></b>	<b>16,19 (0,64)<sup>a</sup></b>	<b>21,59 (2,48)<sup>b</sup></b>	<b>25,11 (4,26)<sup>b</sup></b>
16:2n8	0,43 (0,12) <sup>a</sup>	0,29 (0,05) <sup>a</sup>	4,81 (0,35) <sup>c</sup>	2,089 (0,93) <sup>b</sup>
16:2n6	0,28 (0,11) <sup>a</sup>	0,18 (0,24) <sup>a</sup>	0,08 (0,05) <sup>a</sup>	0,04 (0,04) <sup>a</sup>
16:2n4	0,48 (0,25) <sup>a</sup>	0,80 (0,24) <sup>a</sup>	5,68 (2,01) <sup>b</sup>	4,53 (2,00) <sup>ab</sup>
16:3n4	0,08 (0,03) <sup>a</sup>	0,08 (0,02) <sup>a</sup>	15,38 (3,98) <sup>b</sup>	10,91 (2,83) <sup>b</sup>
16:4n3	0,18 (0,15) <sup>a</sup>	0,32 (0,19) <sup>a</sup>	0,22 (0,21) <sup>a</sup>	0,46(0,00) <sup>a</sup>
16:4n1	0,19 (0,10) <sup>a</sup>	0,24 (0,08) <sup>a</sup>	0,12 (0,16) <sup>a</sup>	0,04 (0,03) <sup>a</sup>
18:2n6	9,35 (1,21) <sup>a</sup>	14,24 (3,29) <sup>a</sup>	0,26 (0,10) <sup>b</sup>	0,58 (0,03) <sup>b</sup>
18:2n4	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	0,04 (0,03) <sup>a</sup>	0,36 (0,28) <sup>a</sup>	0,09 (0,03) <sup>a</sup>
18:3n6	2,03 (0,22) <sup>c</sup>	1,36 (0,22) <sup>b</sup>	0,36 (0,23) <sup>a</sup>	0,88 (0,13) <sup>ab</sup>
18:3n3	8,93 (0,69) <sup>a</sup>	8,46 (0,46) <sup>a</sup>	0,18 (0,14) <sup>b</sup>	0,03 (0,01) <sup>b</sup>
18:4n3	19,32 (0,31) <sup>b</sup>	13,63 (1,94) <sup>c</sup>	0,49 (0,38) <sup>a</sup>	0,80 (0,08) <sup>a</sup>
18:5n3	4,29 (0,36) <sup>a</sup>	2,91 (0,83) <sup>b</sup>	0,00 (0,00) <sup>c</sup>	0,00 (0,01) <sup>c</sup>
20:4n6 (AA)	0,14 (0,06) <sup>a</sup>	0,21 (0,09) <sup>a</sup>	0,54 (0,40) <sup>a</sup>	0,88 (0,43) <sup>a</sup>
20:5n3 (EPA)	0,81 (0,14) <sup>a</sup>	0,80 (0,10) <sup>a</sup>	23,84 (1,29) <sup>b</sup>	22,15 (1,16) <sup>b</sup>
22:5n6	1,16 (0,35) <sup>a</sup>	1,42 (0,10) <sup>a</sup>	0,06 (0,06) <sup>b</sup>	0,06 (0,01) <sup>b</sup>
22:5n3	0,12 (0,04) <sup>a</sup>	0,11 (0,01) <sup>a</sup>	0,03 (0,02) <sup>b</sup>	0,04 (0,01) <sup>b</sup>
22:6n3 (DHA)	11,33 (0,21) <sup>a</sup>	10,05 (0,90) <sup>a</sup>	0,83 (0,13) <sup>b</sup>	0,98 (0,06) <sup>b</sup>
<b>Σ Polyinsaturés</b>	<b>58,13 (2,22)<sup>ac</sup></b>	<b>54,94 (1,83)<sup>ac</sup></b>	<b>53,02 (3,88)<sup>bc</sup></b>	<b>45,03 (3,43)<sup>b</sup></b>
Σ n-6	12,98 (1,98) <sup>a</sup>	18,40 (3,49) <sup>a</sup>	1,29 (0,39) <sup>b</sup>	2,22 (0,56) <sup>b</sup>
Σ n-3	43,99 (0,19) <sup>a</sup>	36,18 (3,40) <sup>b</sup>	25,49 (1,23) <sup>c</sup>	24,48 (0,18) <sup>c</sup>
n-3/n-6	3,43 (0,51) <sup>ac</sup>	2,15 (0,50) <sup>ac</sup>	21, 28 (6,55) <sup>b</sup>	11,41 (2,98) <sup>bc</sup>
22:6/20:5	14,08 (2,08) <sup>a</sup>	14,68 (2,82) <sup>a</sup>	0,04 (0,01) <sup>b</sup>	0,04 (0,00) <sup>b</sup>
22:5/20:4	9,32 (1,46) <sup>a</sup>	8,21 (3,21) <sup>a</sup>	0,21 (0,13) <sup>b</sup>	0,15 (0,10) <sup>b</sup>
<b>Σ (fg / cell)</b>	<b>1532,99 (86,19)<sup>ac</sup></b>	<b>1802,20 (252,20)<sup>ac</sup></b>	<b>3388,90 (410,80)<sup>b</sup></b>	<b>2558,80 (805,03)<sup>bc</sup></b>

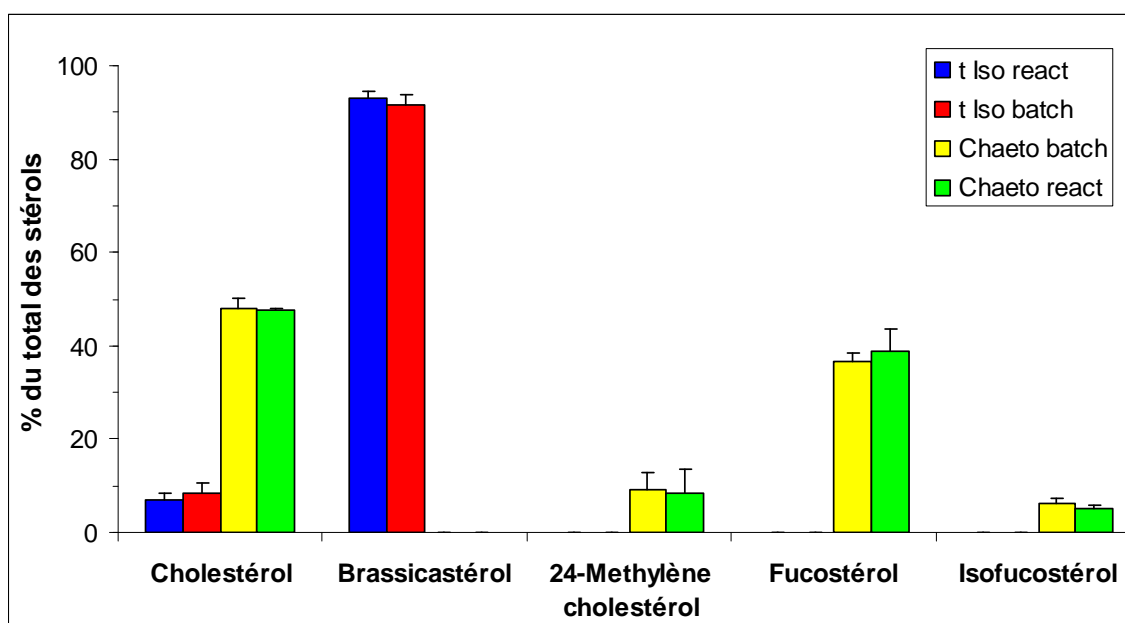
**Tableau 22 : pourcentage d'acides gras (moyenne ± écart-type) présents dans *I. ration galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch). Pour une même ligne, les valeurs annotées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.**

#### 7.2.4. Composition en stérols

La composition en stérols est similaire pour chaque microalgue, quel que soit son type de production (tableau 23, figure 47). Ainsi, *I. rasion galbana* se caractérise par la dominance en brassicastérol (92 et 93 % respectivement en batch et en continu) et par une faible concentration en cholestérol (8 et 8 % respectivement en batch et en continu). Chez *C. gracilis*, deux groupes majeurs se distinguent, à savoir le cholestérol (48 %) et le fucostérol (36 et 39 % respectivement en batch et en continu). Les autres phytostérols 24-méthylène cholestérol et l'isofucostérol figurent, quant à eux, en faible proportion (9 et 6 %, respectivement).

Stérols	t Iso batch (n = 3)	t Iso react (n = 3)	Chaeto batch (n = 3)	Chaeto react (n = 3)
Cholestérol	8,45 (2,20) <sup>a</sup>	6,92 (1,48) <sup>a</sup>	48,06 (2,14) <sup>b</sup>	48,55 (0,52) <sup>b</sup>
Brassicastérol	91,55 (2,20) <sup>a</sup>	93,08 (1,48) <sup>a</sup>	0,00 (0,00) <sup>b</sup>	0,00 (0,00) <sup>b</sup>
24-Méthylène cholestérol	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	9,33 (3,34) <sup>b</sup>	8,56 (4,99) <sup>b</sup>
Fucostérol	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	36,45 (1,90) <sup>b</sup>	38,69 (4,88) <sup>b</sup>
Isofucostérol	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	0,00 (0,00) <sup>a</sup>	6,16 (1,03) <sup>b</sup>	5,21 (0,59) <sup>b</sup>
Somme	100	100	100	100

**Tableau 23 :** pourcentage des stérols (moyenne ± écart-type) présents dans *I. rasion galbana* produite en continu (t. Iso Réact) et en batch (t. Iso Batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto Réact) et en batch (Chaeto Batch). Pour une même ligne, les valeurs annotées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.



**Figure 47 :** pourcentage des stérols présents dans *I. rasion galbana* produite en continu (t Iso réact) et en batch (t Iso batch) et de *C. gracilis* produite en continu (Chaeto réact) et en batch (Chaeto batch). Les barres verticales représentent les écart-types.



### 7.3. Traduction biologique sur les élevages larvaires

#### 7.3.1. Influence d'une alimentation monospécifique : *Isochrysis affinis galbana*

##### 7.3.1.1. Expérimentation I

##### 7.3.1.1.1. Performances d'élevage larvaire

Seules les larves maintenues à jeun pendant toute la durée de l'expérimentation n'ont pu être conduites à terme, l'élevage ayant été entièrement décimé au quatorzième jour (tableau 24). L'élevage témoin a présenté une faible survie puisqu'au seizième jour, seules 29 % des larves ont survécu. Ces faibles survies, du même ordre de grandeur (25-32 %) ont été également relevées pour toutes les autres conditions d'élevage en séquentiel, quel que soit le mode de production phytoplanctonique (batch ou continu). Par contre, cette situation était largement améliorée lorsque les larves étaient élevées en flux ouvert, avec des survies comprises entre 46 et 59 %. Pour des raisons techniques, les élevages n'ont pas été poursuivis et de ce fait, aucune donnée de compétence n'a été acquise.

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)		
		J8	J14	J16
Témoin (TCp)	16	93,5 (1,6)	31,6 (8,0)	28,8 (2,2)
A jeun	14	80,9 (2,6)	0,0 (0,0)	---
ESPC20	16	89,5 (1,9)	39,2 (4,0)	32,0 (6,8)
ESPC100	16	85,4 (2,5)	28,0 (10,5)	24,8 (1,8)
ESPB	16	86,2 (4,8)	32,6 (12,6)	28,6 (4,8)
FOPC20	16	81,0 (4,4)	63,1 (8,9)	46,3 (8,6)
FOPC100	16	80,8 (4,1)	61,4 (13,6)	59,1 (12,5)
FOPB	16	64,9 (5,8)	55,4 (8,3)	55,3 (15,8)

Tableau 24 : survie (moyenne ± écart-type) chez *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *I. raiton galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture, 20 % (PC20) et 100 % (PC100).

Avec  $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$ , l'élevage maintenu à jeun présente une croissance insignifiante, alors que les témoins atteignent  $16 \mu\text{m j}^{-1}$  (figure 48). Les larves élevées en flux ouvert présentent une croissance inférieure au témoin, celle-ci étant cependant très satisfaisante pour une alimentation de type monospécifique puisque les taux de croissance sont compris entre  $10,8$  et  $12 \mu\text{m j}^{-1}$ . Les microalgues ayant un taux de renouvellement journalier de  $20\%$  ont permis un meilleur développement ( $12 \mu\text{m j}^{-1}$ ) que celles renouvelées à  $100\%$  ( $10,8 \mu\text{m j}^{-1}$ ). Par contre, en fin d'élevage, il n'y a pas de différences significatives avec les larves nourries de phytoplancton produit en batch ( $11,4 \mu\text{m j}^{-1}$ ). Les autres élevages, conduits en séquentiel et recevant également une alimentation monospécifique produite en continu présentent un faible développement et les plus mauvaises performances ( $5-8,5 \mu\text{m j}^{-1}$ : figure 48), la croissance étant légèrement améliorée vers la fin de l'élevage en cas de renouvellement à  $100\%$  des microalgues. Les larves élevées selon cette même technique mais nourries de phytoplancton produit en batch présentent une croissance supérieure ( $9 \mu\text{m j}^{-1}$ ).

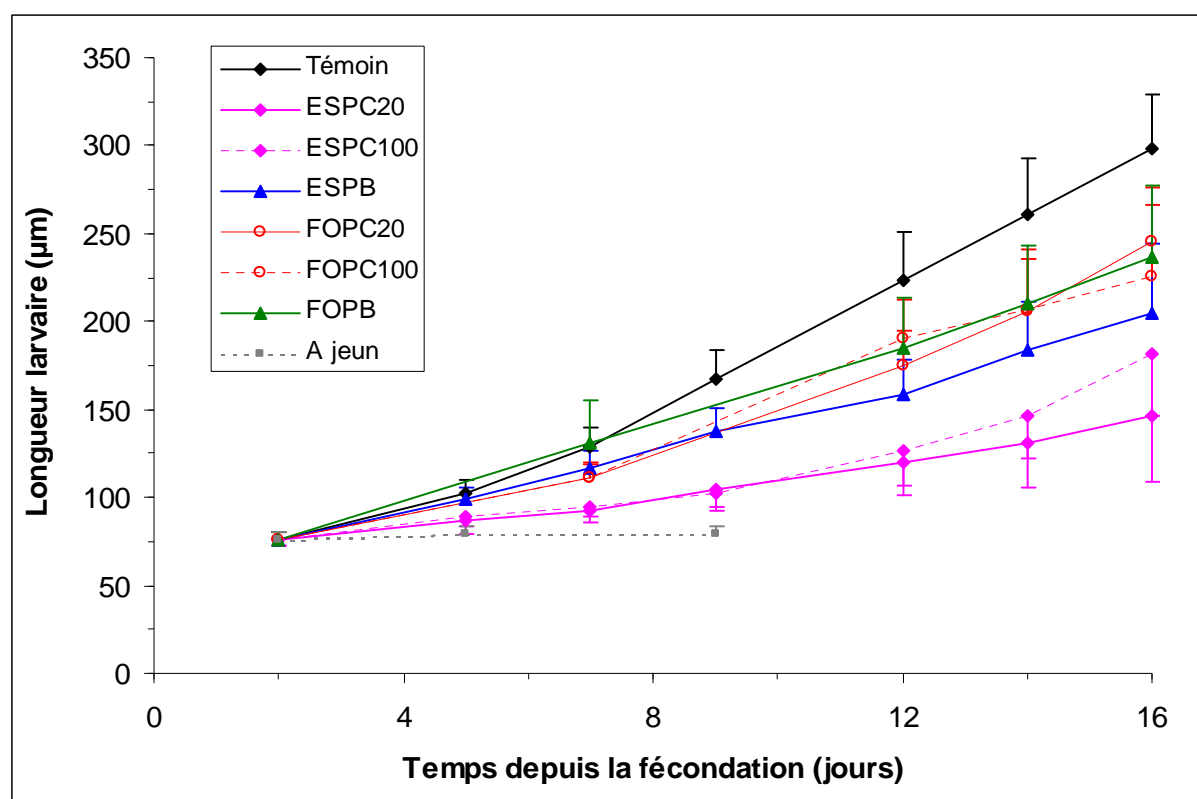


Figure 48 : croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *I. ration galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture,  $20\%$  (PC20) et  $100\%$  (PC100). Le témoin est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (A jeun). Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n > 100$ ).

7.3.1.1.2. Indice de condition larvaire

Les plus fortes croissances pondérales, relevées au seizième jour d'élevage (tableau 25), sont enregistrées chez le témoin et la condition FOPB avec des poids secs d'environ 4000 et 4800 ng larve<sup>-1</sup> et des poids de matière organique de l'ordre de 1400 ng larve<sup>-1</sup>. Par contre, les plus faibles poids secs ( $\approx 1000$  ng larve<sup>-1</sup>) et organiques ( $\approx 300$  ng larve<sup>-1</sup>) sont notés chez les larves élevées en séquentiel. Les larves élevées en flux ouvert et ayant reçu une alimentation produite en continu présentent des poids intermédiaires ( $\approx 2200-2800$  ng larve<sup>-1</sup> pour le poids sec et  $\approx 800-930$  ng larve<sup>-1</sup> pour la matière organique). Concernant l'indice de condition ( $100 \cdot MO/PS$ ), des fortes valeurs sont enregistrées chez les larves élevées en flux ouvert (55-63 %). Celles-ci sont inférieures lorsque les élevages se déroulent en séquentiel (28-39 %), mais également chez le témoin (32 %).

7.3.1.1.3. Indice biochimique structurel

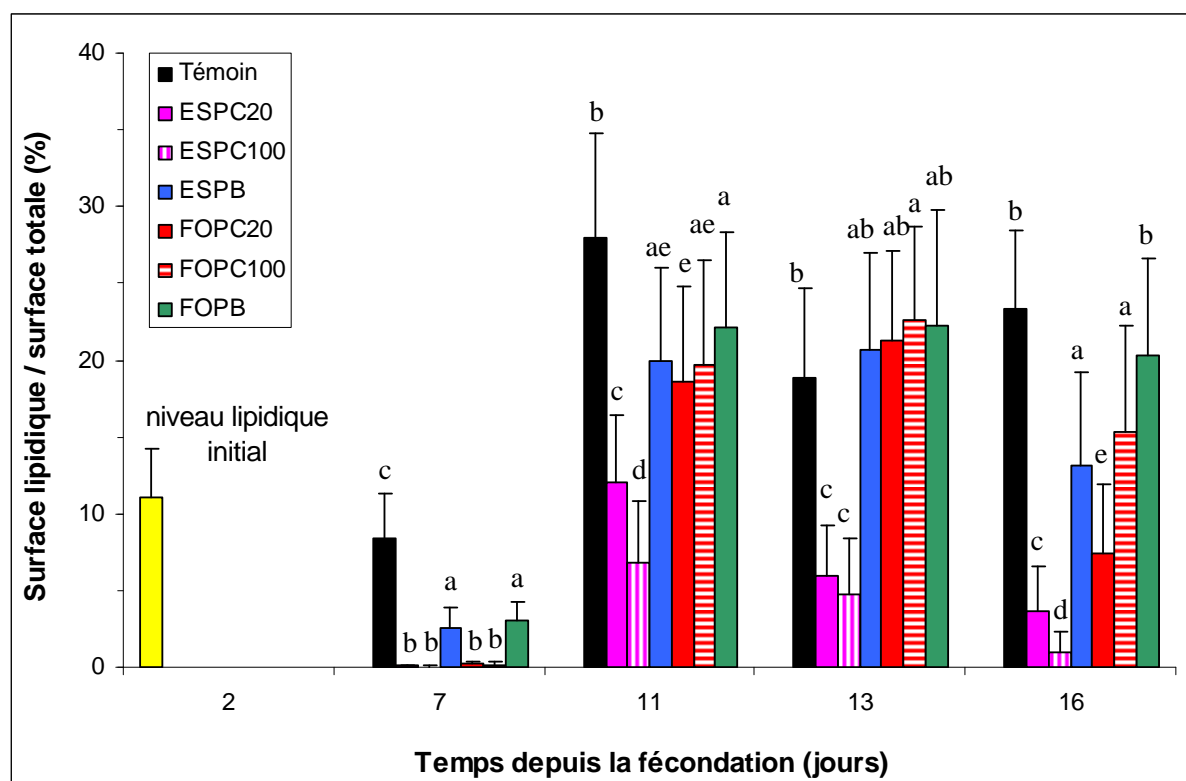
Les plus fortes teneurs en triacylglycérols et stérols sont enregistrées chez le témoin, avec des valeurs respectives de 144 et 14,4 ng larve<sup>-1</sup> suivies par la condition FOPB (121 et 8 ng larve<sup>-1</sup> respectivement). En revanche, les larves élevées selon la même technique mais nourries de phytoplancton produit en continu ont des teneurs lipidiques faibles ne dépassant pas 48 ng larve<sup>-1</sup> pour les triacylglycérols et 6,6 ng larve<sup>-1</sup> pour les stérols. Enfin, les larves élevées en séquentiel renferment les teneurs les plus faibles (9-21 ng larve<sup>-1</sup> pour les triacylglycérols et  $\approx 2$  ng larve<sup>-1</sup> pour les stérols), voire presque nulles pour la condition ESPC100. En ce qui concerne le rapport TAG / ST, les valeurs les plus élevées sont notées chez les larves élevées en flux ouvert et recevant des microalgues produites en batch (FOPB ; 18) suivies des témoins (15). Pour le même type de phytoplancton apporté, les valeurs chutent en passant de l'élevage conduit en flux ouvert (6-10) au séquentiel (0-4), exceptées les larves recevant des microalgues produites en batch qui montrent une valeur relativement élevée (10).

Conditions	PS (ng larve <sup>-1</sup> )	MO (ng larve <sup>-1</sup> )	MO/PS (%)	TAG (ng larve <sup>-1</sup> )	ST (ng larve <sup>-1</sup> )	TAG/ST
Témoin (TCp)	4808 (921)	1488 (238)	31,6 (8,0)	144,0 (40,3)	14,4 (3,8)	14,8 (1,2)
ESPC20	1030 (4)	291 (38)	39,2 (4,0)	8,5 (1,2)	2,0 (0,6)	3,8 (0,3)
ESPC100	1014 (103)	291 (8)	28,0 (10,5)	0,0	0,8 (0,0)	0,0
ESPB	1295 (66)	480 (2)	32,6 (12,6)	21,0 (1,8)	2,2 (0,4)	9,9 (1,9)
FOPC20	2821 (189)	930 (106)	63,1 (8,9)	48,3 (12,0)	5,3 (0,2)	10,2 (1,2)
FOPC100	2224 (89)	801 (48)	61,4 (13,6)	38,1 (3,0)	6,6 (0,8)	6,1 (0,8)
FOPB	4034 (341)	1392 (115)	55,4 (8,3)	120,8 (39,0)	8,1 (1,5)	16,5 (3,3)

**Tableau 25 : indices physiologiques des larves (moyenne ± écart-type) de *C. gigas* en fin d'élevage (16<sup>e</sup> j) conduites en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *I. ration galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20 % (PC20) et 100 % (PC100). Le témoin est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). PS : poids sec ; MO : matière organique, TAG : triacylglycérols, ST : stérols.**

#### 7.3.1.1.4. Indice lipidique global

La surface lipidique des larves âgées de deux jours occupe en moyenne 11 % de la surface totale (figure 49). Au septième jour et quelle que soit la condition, cette surface lipidique décroît, de façon beaucoup plus marquée chez les larves recevant du phytoplancton produit en continu dont la surface lipidique est presque nulle. Celle-ci est légèrement supérieure dans le cas d'une alimentation produite en batch (3 %). Les témoins, nourris à partir d'un régime bispécifique TCp, présentent la surface lipidique la plus élevée (8 % ;  $p < 0,0001$ ). Ultérieurement, une récupération lipidique est notée chez tous les lots. Ainsi, les surfaces varient de 8 à 28 % au onzième jour. Le ratio lipidique relevé chez les témoins est significativement supérieur (28 % ;  $p < 0,0001$ ). A l'inverse, les individus élevés en séquentiel et recevant des microalgues produites en continu présentent les surfaces lipidiques les plus faibles (8-12 %) et ce, jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cette situation est nettement améliorée lorsque les élevages se déroulent en flux ouvert. Les témoins, quant à eux, montrent un ratio quasi-stable tout au long de l'expérimentation.



**Figure 49 :** évolution des réserves lipidiques chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *I. raiton galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture, 20 % (PC20) et 100 % (PC100). Le témoin est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Les barres verticales correspondent aux écart-types. Pour une même date, les histogrammes surmontés d'une même lettre ne sont pas significativement différents, au seuil de 5 %.

### 7.3.1.2. Expérimentation II

#### 7.3.1.2.1. Performances d'élevage larvaire

Seules les larves élevées en flux ouvert et recevant du phytoplancton produit en continu, à faible taux de renouvellement (FOPC20) n'ont pu être menées à terme, les élevages étant totalement décimés au vingt-et-unième jour (tableau 26). De faibles survies, de l'ordre de 30 %, sont également relevées pour les élevages conduits en séquentiel, celles-ci étant exacerbées (18 %) lorsque les larves reçoivent du phytoplancton produit en continu à 20 % de renouvellement (tableau 26). La qualité intrinsèque des larves à la formation et / ou la qualité biologique de l'eau d'élevage étaient particulièrement élevées puisque les élevages à jeun ont été maintenues jusqu'au vingt-et-unième jour avec une excellente survie (91 % : tableau 26). Il

faudra attendre le vingt-cinquième jour pour noter une quasi-mortalité totale. La survie la plus élevée a été enregistrée chez le lot FOPB ( $\approx 80\%$ ), suivie de FOPC100 ( $\approx 81\%$ ) et les témoins ( $\approx 61\%$ ). Le nombre de larves oeillées (compétentes) en fin d'élevage est compris entre 20 et 88%. Paradoxalement, les élevages ayant la plus faible survie (séquentiel) montrent des compétences élevées (51-64%) tandis que les élevages conduits en flux ouvert engendrent une faible compétence (20-25%). Les témoins montrent la compétence la plus élevée (88%). Les taux de métamorphose suivent la même tendance à savoir des taux satisfaisants pour les élevages conduits en séquentiel (55-58%) et faibles à flux ouvert (13-34%). Les témoins ont engendré 64% de post larves

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)			Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J8	J14	Fin d'élevage		
Témoin (TCp)	16	98,6 (1,3)	68,1 (8,9)	61,1 (5,8)	88,4 (8,4)	64,1 (14,2)
Jeûne permanent	21	100,0 (0,0)	96,3 (0,8)	90,8 (2,8)	---	---
ESPC20	21	96,6 (1,5)	33,9 (14,1)	16,8 (8,4)	63,6 (5,6)	58,8 (6,8)
ESPC100	21	98,8 (0,5)	48,3 (19,5)	31,8 (20,4)	51,0 (32,0)	58,0 (8,6)
ESPB	21	96,8 (1,4)	34,8 (6,2)	33,6 (4,5)	56,8 (2,1)	55,2 (10,8)
FOPC20	21	98,1 (0,5)	83,88 (4,2)	0,0 (0,0)	---	---
FOPC100	21	94,0 (1,8)	86,2 (5,3)	81,1 (5,6)	24,8 (6,1)	13,3 (10,8)
FOPB	21	98,0 (1,6)	81,5 (5,2)	89,1 (6,1)	20,3 (3,8)	34,2 (8,8)

**Tableau 26 : performances d'élevages larvaires (moyenne  $\pm$  écart-type) de *C. gigas* conduits en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentés avec *I. ration galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).**

Aucun apport nutritionnel extérieur n'a été relevé chez les larves à jeun en permanence qui montrent une croissance négligeable de  $0,8 \mu\text{m j}^{-1}$  (figure 50). A l'inverse, le témoin, recevant une alimentation bispécifique TCp produite en batch, croît rapidement à raison de  $16 \mu\text{m j}^{-1}$ . Les larves élevées en séquentiel et quel que soit le type de production d'algues, présentent un moindre développement avec environ  $11 \mu\text{m j}^{-1}$ . Par contre, alors que la croissance des individus élevés en flux ouvert était comparable à celle des larves en séquentiel jusqu'au quatorzième jour (longueurs moyennes comprises entre 195 et 213  $\mu\text{m}$ ), un

événement est apparu sur les élevages en flux ouvert, ce qui a entraîné un ralentissement marqué de leur développement (figure 50). De ce fait, la croissance globale de ces larves est médiocre et ne représente que la moitié de celle du témoin positif (de l'ordre de  $8 \mu\text{m j}^{-1}$ ).

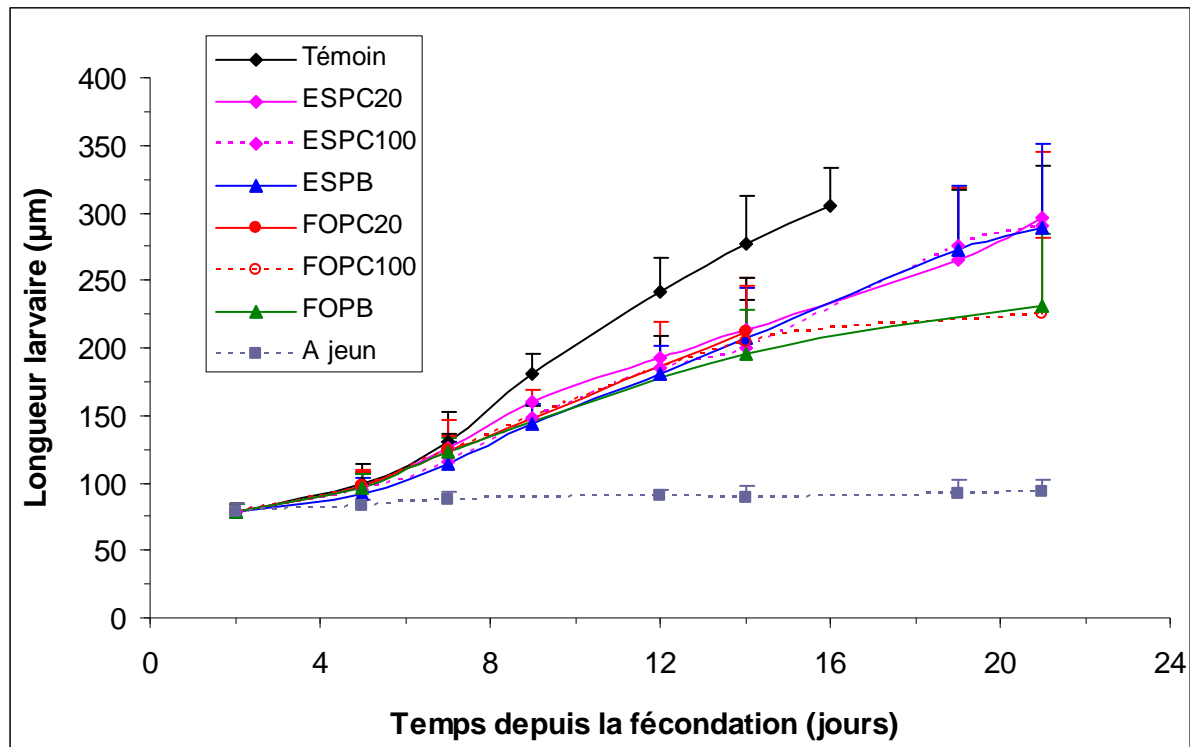
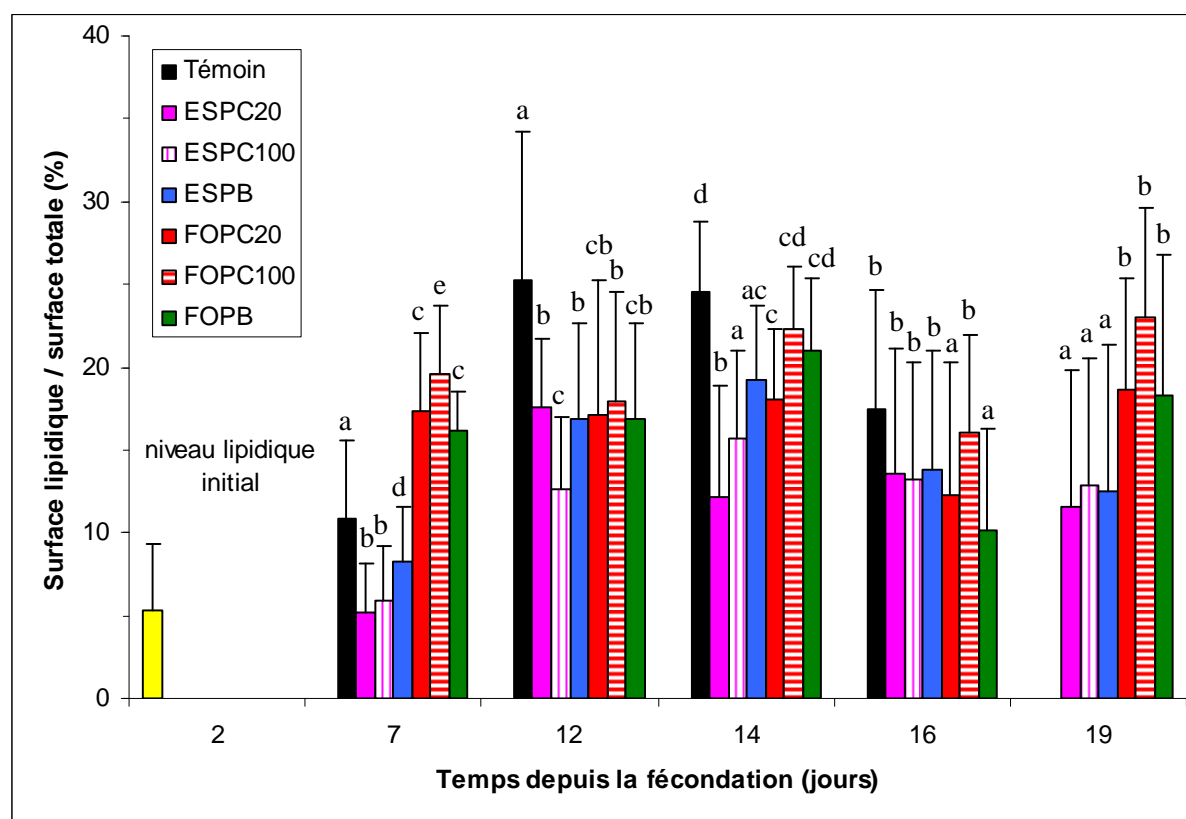


Figure 50 : croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *I. galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20 % (PC20) et 100 % (PC100). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (A jeun). Les barres verticales correspondent aux écart-types.

#### 7.3.1.2.2. Indice lipidique global

A l'issue de l'embryogenèse, avec seulement 5 % de surface occupée, les lipides de réserve sont peu présents dans les larves D (figure 51). Au septième jour, une accumulation lipidique est enregistrée chez les témoins (11 %) et les larves élevées en flux ouvert (16-20 %), alors que celles en séquentiel montrent des ratios stables compris entre 5 et 8 %. Une mise en réserve lipidique plus importante est notée chez ces dernières au douzième jour (13-18 %), rattrapant ainsi les niveaux lipidiques des larves en flux ouvert (18 %). Les témoins, quant à eux, présentent, à cette date, une surface lipidique de 25 %. Au seizième jour, une légère diminution lipidique est notée chez tous les lots et les surfaces sont alors comprises entre 10 % (FOPB) et 18 % (témoin). Au dix-neuvième jour et alors que les réserves des larves élevées en séquentiel sont maintenues quasi-stables (12-13 %), celles des individus en flux ouvert ont subi une augmentation (18-23 %).



**Figure 51 :** évolution des réserves lipidiques chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel S (a) ou en flux ouvert FO (b) et alimentées avec *I. rathion galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture, 20 % (PC20) et 100 % (PC100). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Les barres verticales correspondent aux écart-types. Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 7.3.2. Influence d'une alimentation monospécifique : *Chaetoceros gracilis*

#### 7.3.2.1. Expérimentation I

##### 7.3.2.1.1. Performances d'élevage larvaire

Au cours de cette expérimentation, trois conditions n'ont pu être menées à terme, dont l'une pour une raison inexplicable (témoin 1) qui a montré une grande hétérogénéité inter bacs, en terme de survie dès le douzième jour, avec décimation complète d'un des triplicatas. Cette condition a été, malgré ces écarts, conduite jusqu'au dix-neuvième jour et des taux de compétence extrêmes entre les deux bacs restant, exprimés par de forts écart-types ont été relevés (tableau 27). Vu les différences de comportement des larves, élevées dans des

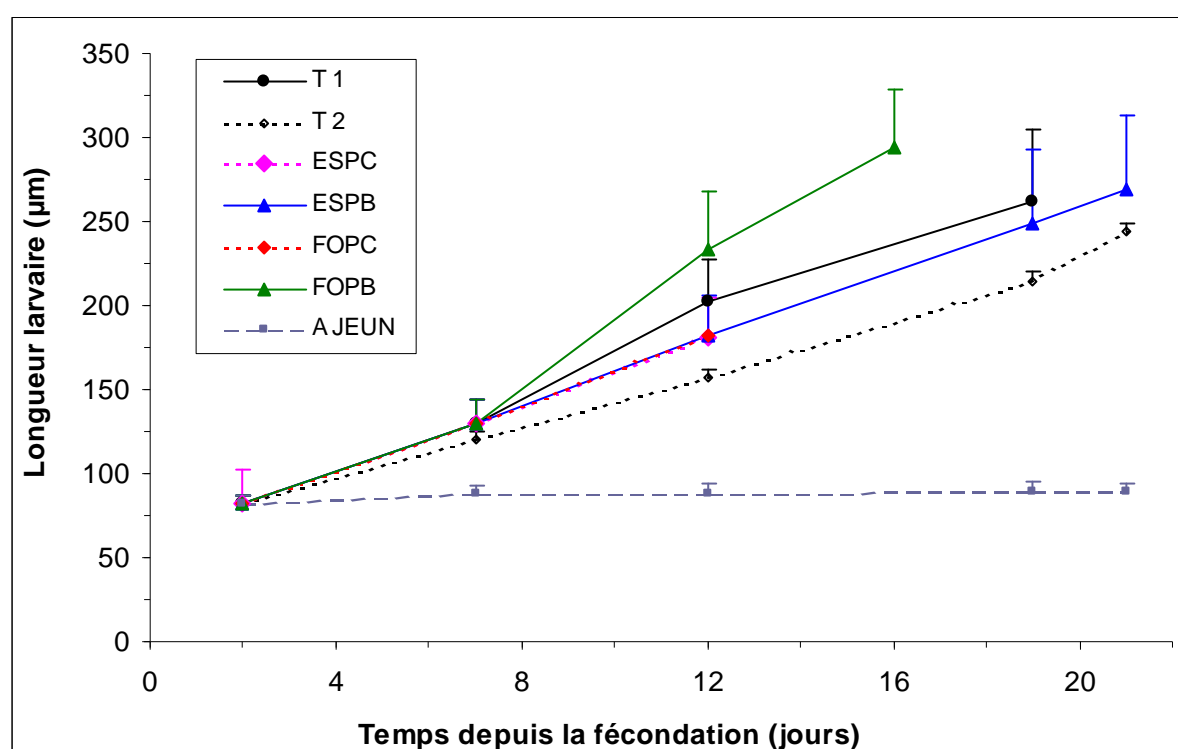


conditions strictement similaires, la métamorphose n'a pas été suivie dans ce cas. Les deux autres conditions qui n'ont pas été conduites avec succès sont des élevages recevant *Chaetoceros gracilis* produite en photobioréacteur. Les mortalités larvaires apparaissent rapidement dans les élevages conduits en flux ouvert (68 % au douzième jour, soit après cinq jours d'alimentation sur la seule *C. gracilis*) mais sont différées en séquentiel (mortalité quasi-totale au dix-neuvième jour : tableau 27). Par contre, les larves recevant seulement *C. gracilis* produite en batch (cylindre) dès le stade D présentent une bonne survie, 84 % en fin d'élevage (21<sup>e</sup> j). Cependant, la compétence est peu élevée (26 %) et se traduit par une moindre métamorphose (11,5 % : tableau 27). La meilleure performance larvaire est enregistrée pour la condition FOPB c'est à dire pour des larves élevées en flux ouvert et alimentées avec *C. gracilis* produite en batch avec 89 % de survie et 80 % de larves compétente en fin d'élevage (16<sup>e</sup> j) qui se traduisent par un taux de métamorphose de 56 % (tableau 27). Les larves recevant la même origine de nourriture mais élevées de façon traditionnelle, c'est à dire en séquentiel, présentent des performances similaires en terme de survie avec cependant des taux de compétence et de métamorphose légèrement inférieurs (48 % : tableau 27).

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)		Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J12	Fin d'élevage		
T1 (TCp)	19 : éliminé	62,58 (45,8)	61,4 (28,1)	40,23 (38,39)	***
T2 ( <i>C. gracilis</i> permanent)	21	93,91 (3,88)	84,18 (9,91)	26,04 (4,58)	11,5 (3,18)
ESPC	19 : éliminé	92,09 (2,81)	0,0	***	***
ESPB	21	90,22 (5,08)	89,28 (8,68)	48,05 (4,98)	46,89 (6,36)
FOPC	12 : éliminé	33,38 (2,48)	***	***	***
FOPB	16	85,83 (2,59)	88,68 (2,6)	69,08 (5,22)	56,13 (14,26)
A JEUN	21	89,59 (3,01)	41,34 (15,52)	***	***

**Tableau 27 : performances d'élevage larvaire (moyenne ± écart-type) de *C. gigas* conduite en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin 1 (T1) est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch), tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (jeûne permanent). Le témoin 2 reçoit dès le stade D la seule diatomée *C. gracilis* produite en batch.**

La quasi-absence de croissance ( $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$ ) observée chez les larves non alimentées (figure 52) confirme l'absence d'apport nutritionnel exogène. La plus faible croissance est observée chez les larves nourries dès le stade D en régime monospécifique à base de *C. gracilis* (produite en batch), avec une croissance globale de  $8 \mu\text{m j}^{-1}$ . En revanche, le meilleur développement est décelé en flux ouvert et algues produites en batch (FOPB) avec  $15,2 \mu\text{m j}^{-1}$  (figure 52). Avec des taux de croissance respectifs de  $10,6$  et  $9,9 \mu\text{m j}^{-1}$ , les conditions T1 et ESPB occupent une position intermédiaire. Les larves élevées en flux ouvert ou en séquentiel mais alimentées avec *C. gracilis* produite en continu (FOPC et ESPC) ont un développement similaire à la condition ESPB mais les élevages n'ont pas pu être conduits à terme en raison des fortes mortalités décelées (tableau 27).

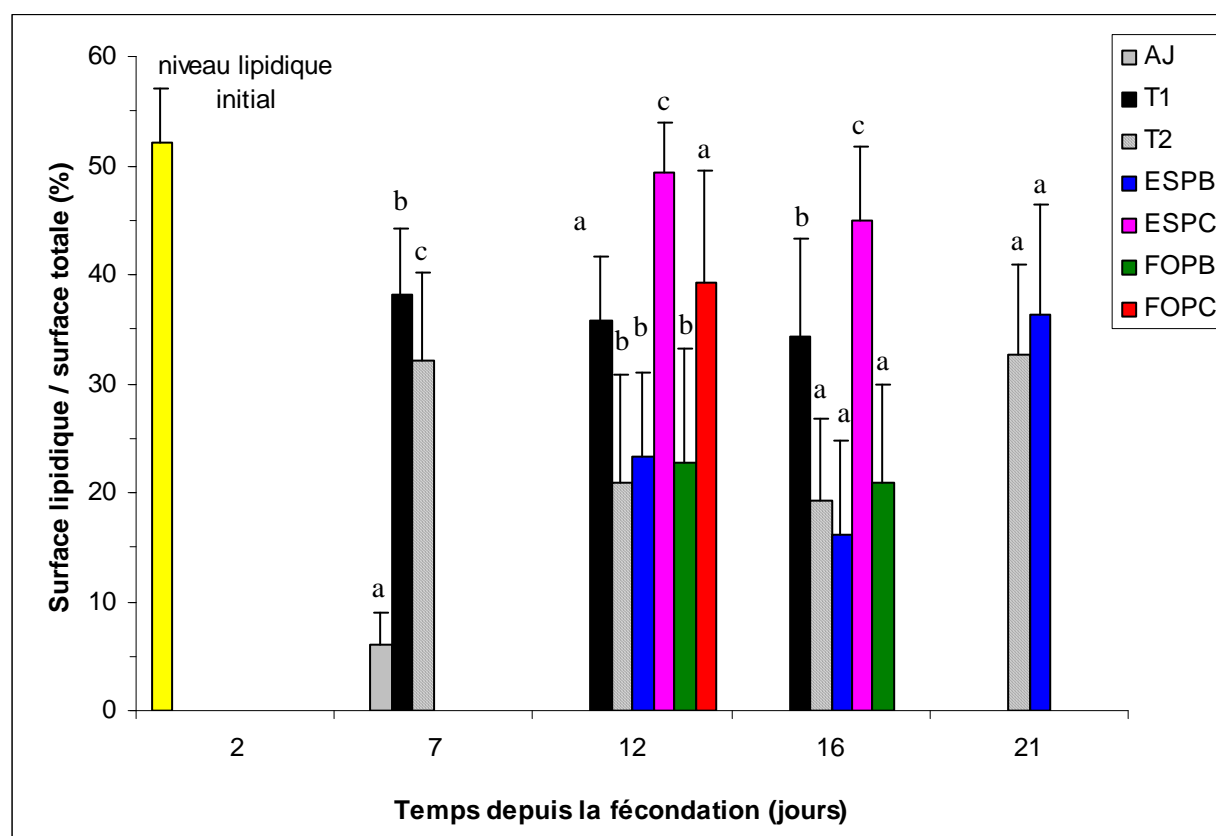


**Figure 52 : croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC) à partir du 8<sup>e</sup> jour. Le témoin 1 est élevé selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (A JEUN). Le témoin 2 reçoit dès le stade D la seule diatomée *C. gracilis* produite en batch. Les barres verticales correspondent aux écart-types.**

#### 7.3.2.1.2. Indice lipidique global

La surface lipidique initiale relevée chez les larves au second jour est particulièrement élevée pour cette ponte (52 % : figure 53), ce qui explique, très probablement, la résistance des individus soumis au jeûne permanent (41 % de survie au 21<sup>e</sup> j : tableau 27) et la persistance

des gouttelettes lipidiques (6 %) jusqu'au septième jour, totalement consommées ultérieurement. A cette date, les apports phytoplanctoniques (régimes monospécifique *C. gracilis* ou bispécifique TCp) autorisent la compensation de la consommation des réserves endogènes puisque les surfaces lipidiques des larves alimentées T1 et T2 sont respectivement de 38 et 32 %. A partir de cette date (8<sup>e</sup> j), rappelons que les larves du lot T1 ont été réparties en flux ouvert et en séquentiel et n'ont reçu désormais que la seule diatomée *C. gracilis*, produite en batch ou en continu ou le régime bispécifique d'origine TCp (T1). Ainsi au douzième jour, les larves des conditions T2, ESPB et FOPB montrent une baisse de leur surface lipidique (23 %). En revanche, celle des témoins T1 et le lot FOPC n'a pas subi de fluctuations notables (36-39 % respectivement). Le lot ESPC montre, quant à lui, une teneur lipidique particulièrement élevée (49 %), qui se maintient jusqu'à la fin de l'expérimentation (16<sup>e</sup> j). A cette date, les témoins présentent une surface lipidique de 34 % alors que les larves des conditions T2, ESPB et FOPB sont caractérisées par une moindre teneur lipidique (16-20 %). Enfin, juste avant la métamorphose (21<sup>e</sup> j), les larves T2 et ESPB montrent des surfaces comparables comprises entre 33 et 38 %.



**Figure 53 :** évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif T1 est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Un autre témoin positif T2 reçoit dès le stade larve D *C. gracilis* produite en batch. Au 8<sup>e</sup> j, le pourcentage lipidique du témoin T1 correspond également au contenu lipidique de départ des différentes conditions expérimentales appliquées ultérieurement ESPB, ESPC, FOPB et FOPC. Les barres verticales correspondent aux écart-types. Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 7.3.2.1.3. Indice biochimique structurel

Les teneurs en triacylglycérols et en stérols ont été déterminées aux second, douzième jour et en fin d'élevage larvaire (figures 54 a et b). Chez les témoins, les mesures n'ont pas été poursuivies au-delà du douzième jour à cause de la grande hétérogénéité inter bacs signalée plus haut. La condition FOPC n'a pas fait l'objet de cette étude à cause de la forte mortalité intervenue dès le douzième jour (68 %). La teneur initiale en triacylglycérols mesurée au second jour est en moyenne de 1,5 ng larve<sup>-1</sup> (figure 54 a). Une accumulation plus ou moins forte est notée selon la condition d'élevage. Ainsi, la teneur la plus faible est détectée chez les individus élevés en séquentiel et ayant reçu du phytoplancton produit en batch (ESPB : 18 ng larve<sup>-1</sup>) contrairement à ceux ayant reçu le même type de régime mais en flux ouvert (FOPB : 96 ng larve<sup>-1</sup>), soit une teneur 5,6 plus forte (figure 54 a). Chez le témoin 1 (TCp) et les larves élevées en séquentiel et alimentées par des algues produites en continu (ESPC), des teneurs intermédiaires de 38 et 48 ng larve<sup>-1</sup> ont été respectivement notées. En fin d'élevage, seuls les individus nourris par des algues produites en batch (ESPB et FOPB) sont compétents et renferment respectivement 168 et 138 ng larve<sup>-1</sup> (figure 54 a). Rappelons que les individus issus de l'élevage en flux ouvert ont acquis la compétence au seizième jour tandis que ceux élevés en séquentiel ne l'atteignent que le vingt-et-unième jour (tableau 28).

Concernant les stérols (figure 54 b), les teneurs relevées au second jour sont en moyenne de 0,35 ng larve<sup>-1</sup>. Au douzième jour, les quantités les plus faibles ont été décelées chez les larves alimentées de phytoplancton produit en continu (ESPC : ng larve<sup>-1</sup>). Les témoins et ESPB possèdent des quantités similaires (8 ng larve<sup>-1</sup>) tandis que les larves élevées en flux ouvert montrent les teneurs les plus élevées (19 ng larve<sup>-1</sup>). En fin d'élevage, ESPB et FOPB présentent des concentrations quasi-similaires (28 et 29 ng larve<sup>-1</sup> respectivement).

Le ratio TAG / ST (figure 54 c) montre une valeur initiale de 4 au second jour. Au douzième jour, les valeurs passent du simple au quadruple. Ainsi, une valeur de 2 est attribuée à l'élevage ESPB et 8 pour la condition ESPC. Le témoin et FOPB affichent des valeurs très proches de 4,8 et 5 respectivement. Il est difficile d'établir une relation entre ces valeurs et les performances zootechniques obtenues puisque les deux élevages qui ont atteint le stade de la compétence sont ESPB qui a montré le ratio le plus faible (2) et FOPB qui présente une valeur intermédiaire (5). L'élevage ayant montré la plus forte valeur (8) n'a pu être mené à terme à cause d'une soudaine mortalité intervenue au dix-neuvième jour ; ceci peut être la conséquence

d'une brusque contamination bactérienne qui ne s'exprime pas forcément sur les teneurs des compositions biochimiques et par conséquent non décelable au moyen du rapport TAG /ST. En fin d'élevage, des valeurs respectives de 5 et 6 ont été relevées chez FOPB et ESPB.

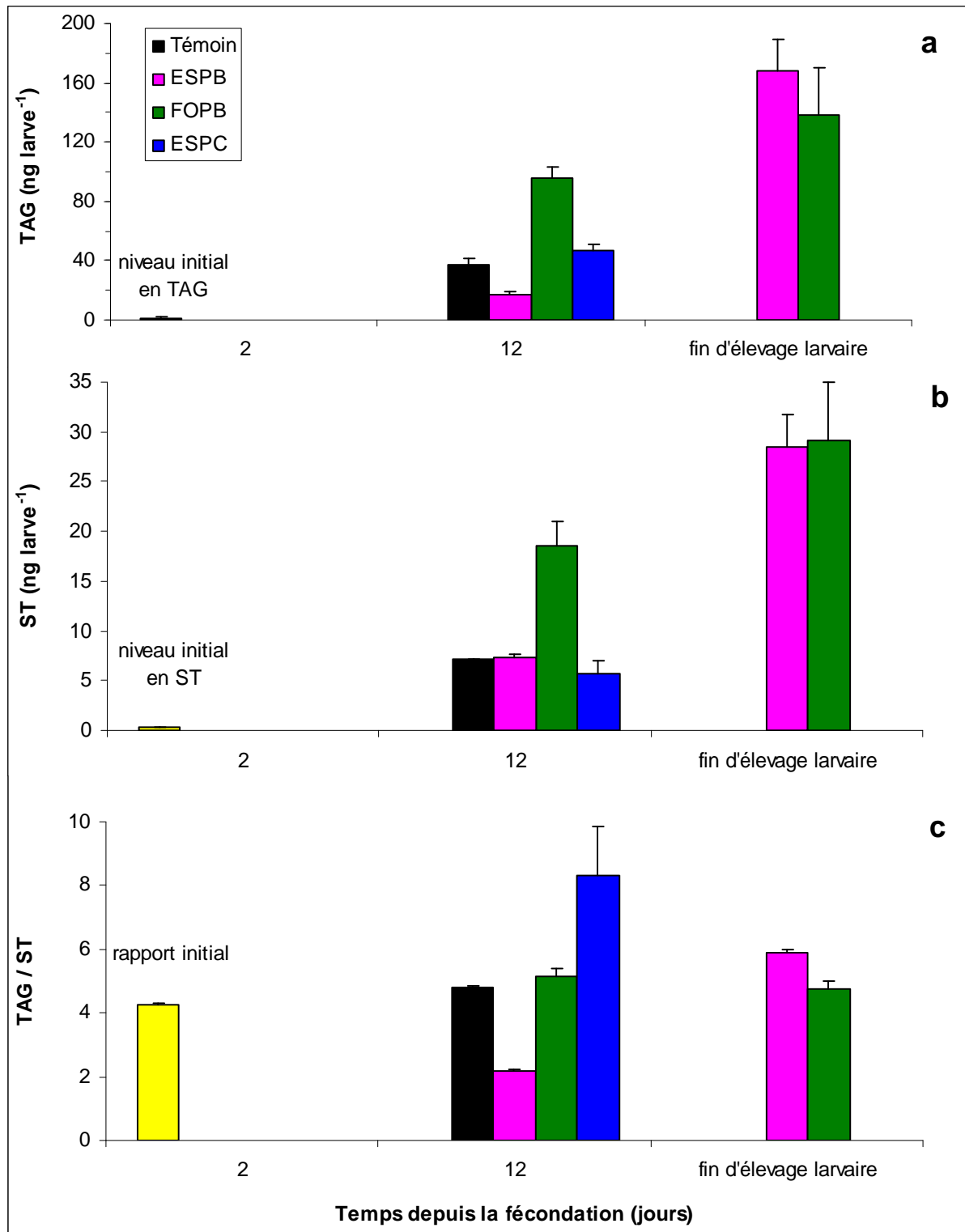


Figure 54 : évolution de la teneur des triacylglycérols (a), des stérols (b) en ng larve<sup>-1</sup> et du rapport TAG/ST (c) chez les larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Les barres verticales correspondent aux écart-types.

### *7.3.2.2. Deuxième série expérimentale : Gig0611 (ponte du 15 novembre 2006)*

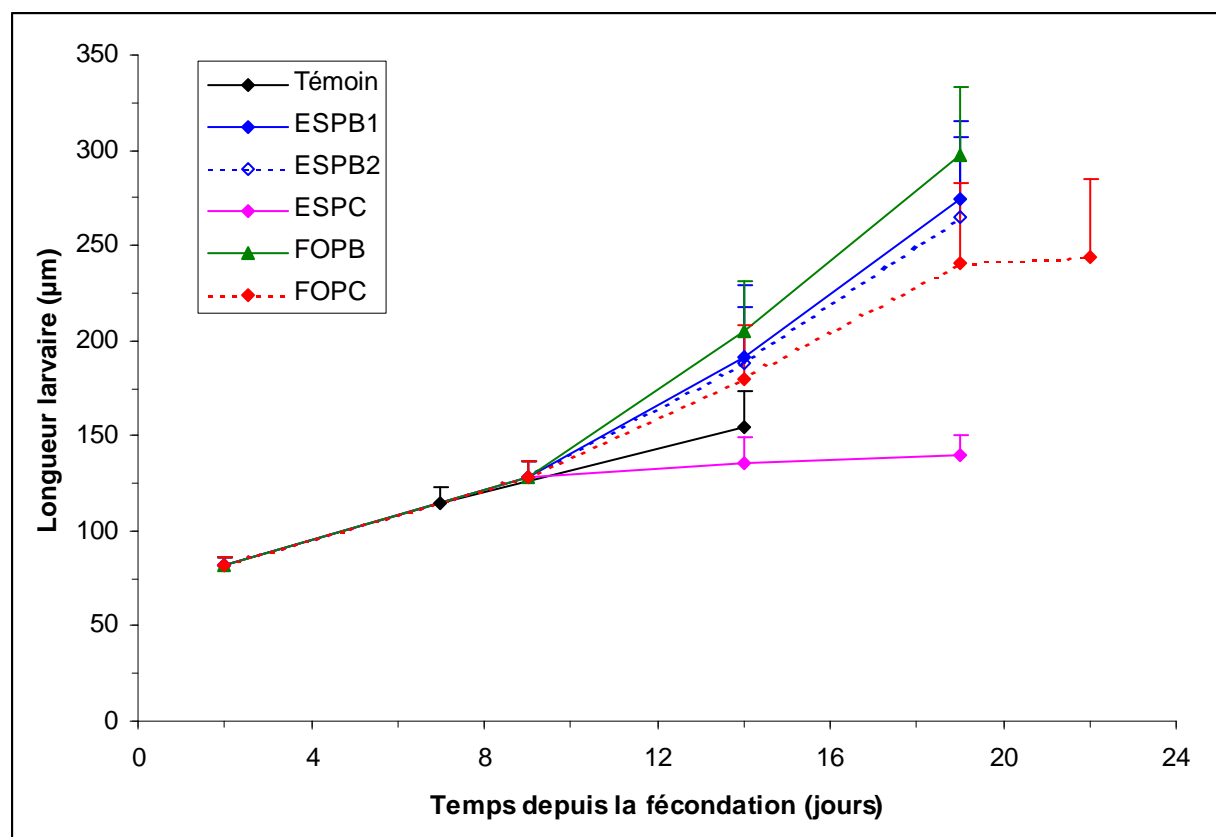
#### *7.3.2.2.1. Performances du développement larvaire*

Au cours de cette expérimentation, deux conditions n'ont pu être menées à terme, dont l'une pour une raison inexplicée (témoin) où 100 % de l'élevage a été décimé au seizième jour (tableau 28). Pour des raisons techniques, cette condition s'est déroulée en béccher de 5 L. Il est probable que, malgré des conditions zootechniques (température, eau d'élevage et microalgues) standards, les larves supportent moins bien d'être élevées en petits volumes qu'en volumes plus grands (30 ou 150 L), surtout en deuxième partie du cycle larvaire. La deuxième condition qui a échoué est ESPC (élevage séquentiel alimenté à partir de phytoplancton produit en continu) qui ne présentait que 46 % de survie au dix-neuvième jour et une grande hétérogénéité inter bacs, exprimés par des écart-types élevés (tableau 28). Dans ces conditions, la métamorphose n'a pas été étudiée. Pour les élevages conduits en flux ouvert, les survies sont élevées, de l'ordre de 86 à 92 % en fin d'élevage avec, cependant, des différences marquées en termes de compétence et taux de métamorphose en fonction de l'origine de la nourriture (tableau 28). Ainsi, la qualité du phytoplancton produit en continu ne génère au vingt-deuxième jour que 30 % de larves compétentes qui se traduisent par un taux modeste de métamorphose, également de l'ordre de 30 %. A l'inverse, le phytoplancton produit en batch autorise un meilleur développement puisque 85 % de larves compétentes sont dénombrées dès le dix-neuvième jour donnant naissance à 81 % de post larves le vingt-troisième jour. En ce qui concerne les élevages conduits en séquentiel et quelle que soit l'alimentation de départ (TCp ou *C. gracilis*), les performances de développement sont quasi similaires avec des survies comprises entre 64 et 83 % le dix-neuvième jour, des compétences larvaires de 43 à 45 % générant des taux de métamorphose de 36 à 42 % (tableau 28).

Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)		Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J14	Fin d'élevage		
Témoin	16 : éliminé	66,0 (10,9)	0,0 (0,0)	***	***
ESPB1	19	68,5 (5,4)	63,9 (8,4)	42,8 (8,6)	42,2 (4,3)
ESPB2	19	80,6 (0,8)	83,4 (8,3)	44,8 (11,8)	35,8 (10,9)
ESPC	19 : éliminé	82,8 (8,8)	46,2 (28,0)	***	***
FOPB	19	94,3 (2,3)	91,9 (2,6)	84,8 (5,4)	81,1 (4,3)
FOPC	22	95,2 (2,4)	86,4 (2,6)	28,8 (4,4)	28,2 (8,0)

**Tableau 28: performances d'élevage larvaire (moyenne  $\pm$  écart-type) de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le second jour tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le septième jour. Dans ce cas, les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*I. ration galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*).**

La plus faible croissance est observée chez les larves conduites en séquentiel et alimentée avec *C. gracilis* produite en continu (ESPC : figure 55). Une perte de valeur alimentaire est relevée à partir du neuvième jour de culture puisqu'au delà aucune croissance larvaire n'est enregistrée conduisant à un taux global de croissance de  $3,4 \mu\text{m j}^{-1}$ . L'élevage en flux ouvert recevant du phytoplancton en continu (FOPC) présente un taux de croissance de  $8 \mu\text{m j}^{-1}$ , celui-ci passant à  $12,8 \mu\text{m j}^{-1}$  en présence de phytoplancton en batch (FOPB : figure 55). En ce qui concerne les élevages en séquentiel, et quelle que soit la date de l'apport de *C. gracilis* (2<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> j), les croissances sont similaires avec des taux de croissance voisins de  $11 \mu\text{m j}^{-1}$  (figure 55). Le témoin montre un développement faible ( $6 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et une taille moyenne de seulement  $150 \mu\text{m}$  au quatorzième jour confirmant la mauvaise qualité de ces larves.



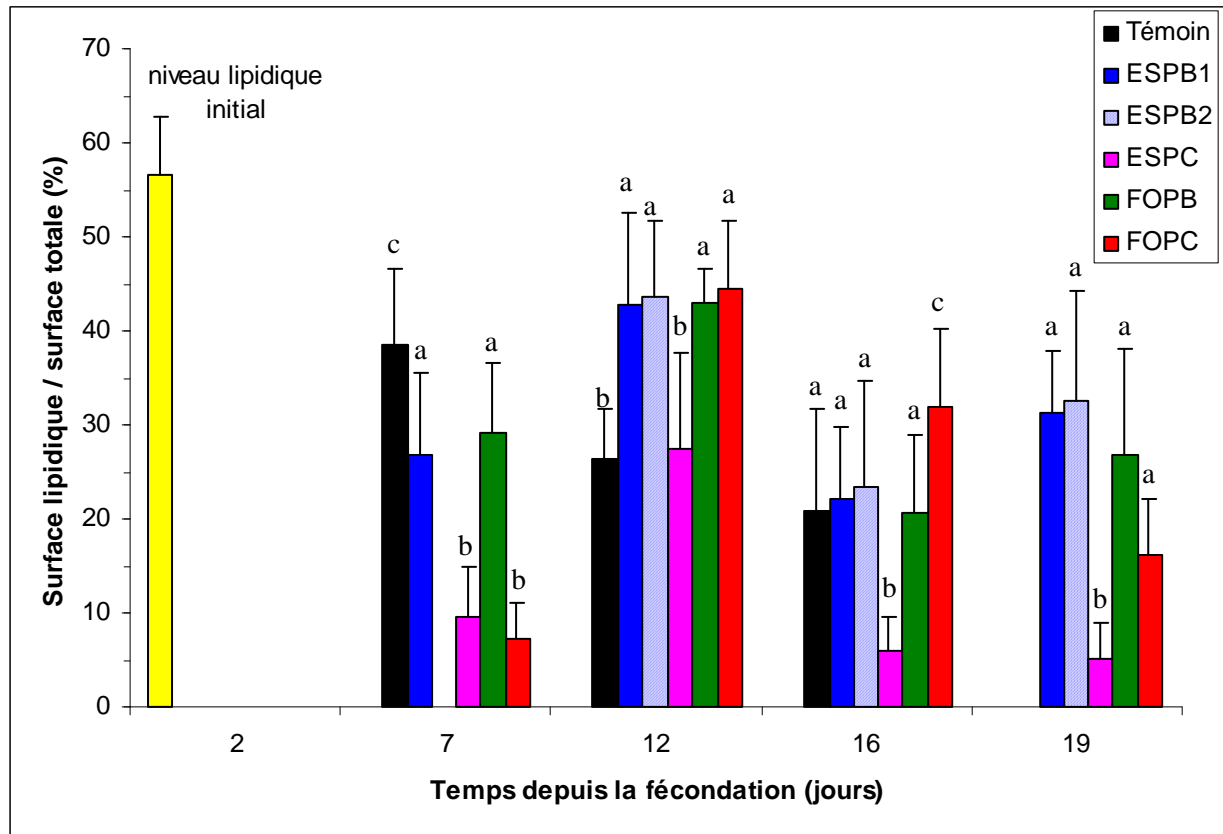
**Figure 55 :** croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *C. gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le second jour tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le septième jour. Dans ce cas, les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*I. ration galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*). Les barres verticales représentent les écart-types.

#### 7.3.2.2.2. Indice lipidique global

La surface lipidique initiale relevée chez les larves au second jour est également particulièrement élevée pour cette ponte (58 % : figure 56). Quelle que soit la condition, un effondrement de la surface lipidique est relevé ultérieurement (figure 56). Celui-ci est particulièrement marqué pour la condition ESPC avec un rapport passant progressivement de 58 % à 5 % du second au dix-neuvième jour d'élevage. Chez le témoin, ce rapport subit également une diminution progressive au cours du développement larvaire, avec des valeurs finales de 21 % (16<sup>e</sup> j). Cette consommation est également notée dans les autres conditions jusqu'au seizième jour, avec des valeurs comprises entre 21 % et 32 %, se stabilisant ultérieurement (figure 56). Au dix-neuvième jour, chez les larves alimentées de phytoplancton produit en batch et quelle que soit la méthode d'élevage, les surfaces lipidiques sont comprises



entre 28 et 32 % alors que les individus nourris de microalgues produites en continu (FOPC) n'en renferment que 16 % (figure 56).



**Figure 56 :** évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le second jour tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le septième jour. Dans ce cas, les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*I. ration galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*). Les barres verticales représentent les écart-types. Les barres verticales correspondent aux écart-types. Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

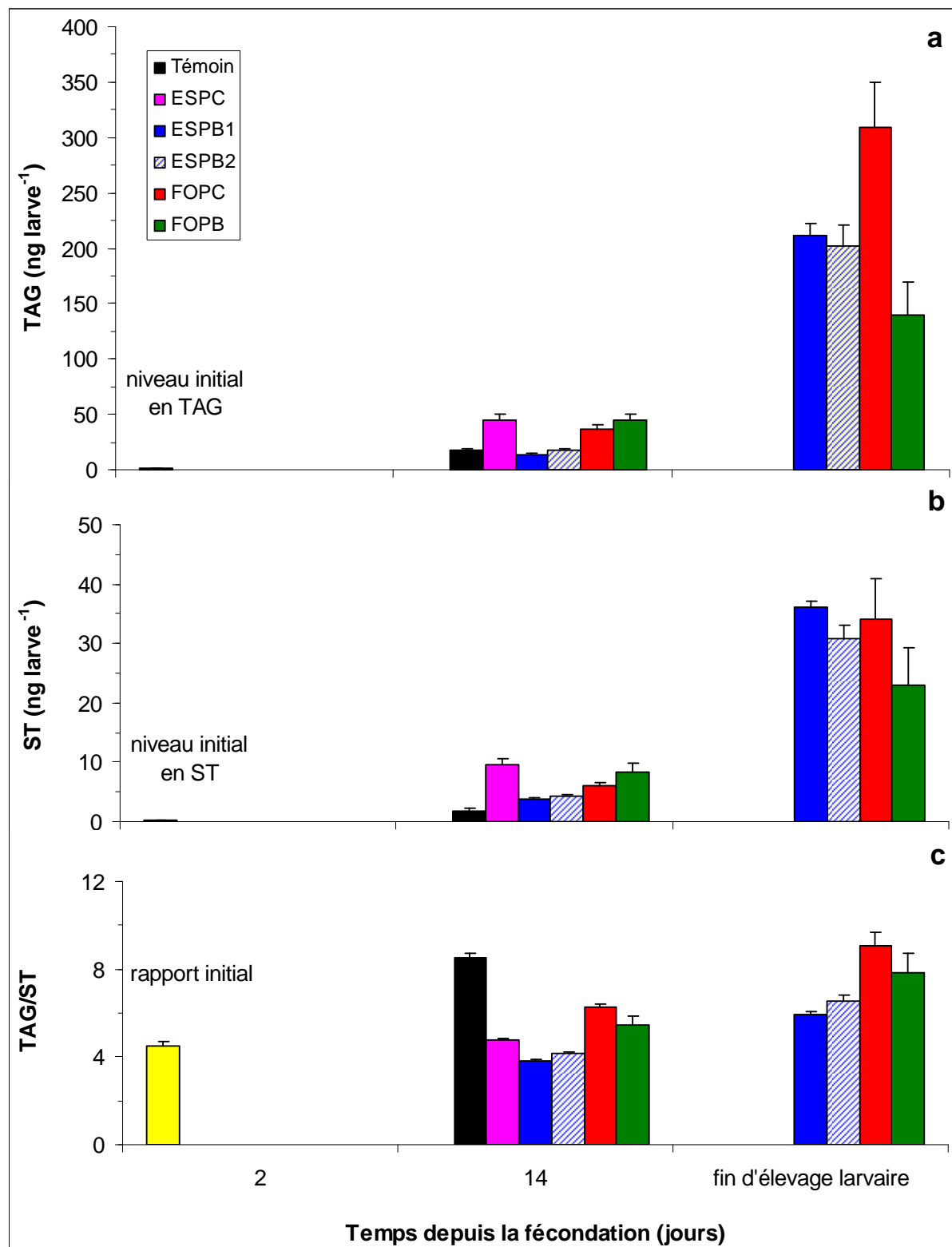
#### 7.3.2.2.3. Indice biochimique structurel

Les teneurs en triacylgcérols et en stérols ont été déterminées aux second et quatorzième jours ainsi qu'en fin d'élevage larvaire chez *C. gigas* (figures 57 a et b). La teneur initiale en triacylgcérols mesurée au second jour est en moyenne de 1,6 ng larve<sup>-1</sup> (figure 57 a). Une accumulation plus ou moins forte est notée selon la condition d'élevage. Ainsi, au quatorzième jour, la teneur la plus faible a été notée chez le témoin (18 ng ind<sup>-1</sup> : figure 57 a) et

les larves élevées en séquentiel ayant reçu du phytoplancton produit en batch (ESPB1 et ESPB2 : 14 ng ind<sup>-1</sup>). Les autres conditions avaient des teneurs comprises entre 36 et 48 ng ind<sup>-1</sup>. En fin d'élevage (19-22<sup>e</sup> j), les larves conduites en flux ouvert et alimentées avec des algues produites en continu (FOPC) renferment les teneurs les plus fortes (> 300 ng ind<sup>-1</sup>) malgré des performances moyennes en terme de compétence (29 %) et de métamorphose (28 %). Ils sont suivis des élevages conduits en séquentiel (ESPB1 et ESPB2) avec des teneurs supérieures à 200 ng ind<sup>-1</sup> et des performances qui restent encore modérées (43-45 % de compétence et 36-42 % de métamorphose). L'élevage le plus performant FOPC montre des teneurs en triacylglycérols les plus faibles (140 ng larve<sup>-1</sup> : figure 57 a).

Les stérols évoluent de la même manière que les triacylglycérols (figure 57 b). Des quantités initiales de 0,3 ng larve<sup>-1</sup> ont été enregistrées au second jour. Au quatorzième jour, les teneurs les plus faibles sont décelées chez les témoins, avec 2 ng larve<sup>-1</sup>, suivis par les individus élevés en séquentiel avec apport de microalgues cultivées en batch (ESPB1 et ESPB2 : 4 ng larve<sup>-1</sup>). Les plus fortes teneurs sont enregistrées pour les conditions FOPB et ESPC avec respectivement 8 et 10 ng larve<sup>-1</sup>. En fin d'élevage (19-22<sup>e</sup> j), les larves les plus performantes se caractérisent par les plus faibles teneurs (23 ng larve<sup>-1</sup>), suivies par celles issues des autres conditions, avec des concentrations comprises entre 31 et 36 ng larve<sup>-1</sup> (figure 57 b).

L'évolution du rapport TAG / ST (figure 57 c) est là encore difficile à relier aux performances d'élevage larvaire malgré des résultats très contrastés selon la condition expérimentale. Ainsi, la valeur du ratio enregistrée au second jour est de 4,5. Au quatorzième jour, le témoin (qui n'a pas été mené à terme à cause des fortes mortalités survenues au seizième jour) exprime la valeur la plus élevée (9). Les élevages conduits en séquentiel et ayant reçu du phytoplancton produit en batch (ESPB1 et ESPB2) se distinguent des autres conditions par des valeurs faibles et stables, voisines de 4 jusqu'au quatorzième jour et 6 et 8 respectivement en fin d'élevage (22<sup>e</sup> j). Ces élevages n'ont pas pour autant montré des performances médiocres puisqu'ils se caractérisent par un taux de croissance de 11 µm j<sup>-1</sup>, une bonne survie en fin d'élevage (64 %) et 43 % de larves compétentes ayant engendré 42 % de post larves : tableau 28. Les autres conditions présentent des tendances générales similaires.



**Figure 57 :** évolution de la teneur des triacylglycérols (TAG : a), des stérols (ST : b) et du rapport TAG/ST (c) chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *C. gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le second jour tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le septième jour. Dans ce cas les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*I. ration galbana* et *C. calcitrans* forma *pumilum*). Les barres verticales représentent les écart-types.

### 7.3.3. Influence d'une alimentation bispécifique : *Isochrysis affinis galbana* et *Chaetoceros gracilis*

#### 7.3.3.1. Performances d'élevage larvaire

Seule la condition ESPC (élevage séquentiel alimenté à partir de phytoplancton produit en continu) n'a pu être conduite à terme à cause d'un problème technique apparu dans les réacteurs à partir du seizième jour (tableau 29). Avec une survie de 94 %, le témoin a été conduit avec succès. Au dix-huitième jour, 85 % de larves compétentes autorisent 48 % de métamorphose (tableau 29). Pour les autres conditions, les survies sont moindres (40 et 80 %) tandis que la compétence larvaire est généralement supérieure. Le taux de métamorphose le plus important (89 %) est obtenu pour la condition ESPB, malgré un plus bas niveau de compétence (55 %). Les autres élevages conduits en flux ouvert présentent un très faible taux de métamorphose (13-18 %) malgré des taux de compétence élevés (tableau 29).

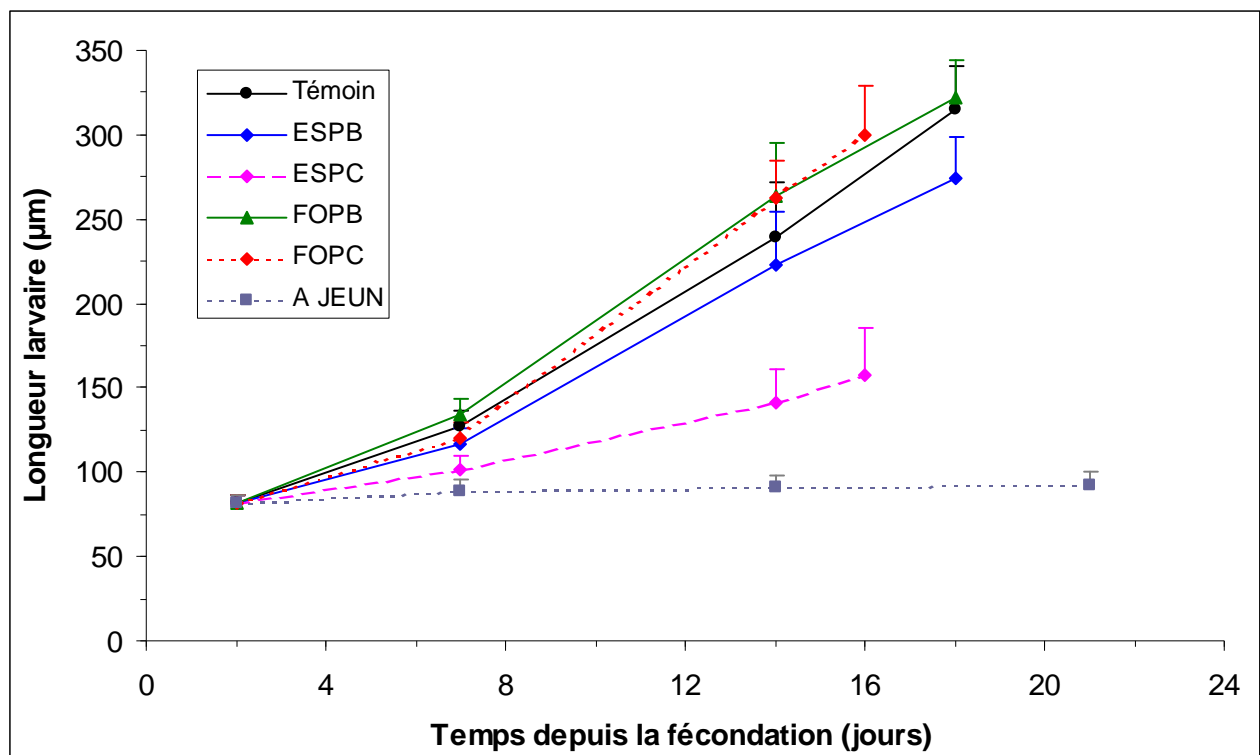
Conditions	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie (%)			Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
		J8	J14	Fin d'élevage		
Témoin (TCp)	18	95,8 (3,4)	95,8 (1,3)	94,1 (2,3)	85,1 (24,3)	48,4 (13,2)
ESPC	16 : éliminé	95,6 (3,9)	91,1 (3,0)	89,4 (5,8)	-----	-----
ESPB	18	83,6 (23,8)	82,4 (22,9)	81,4 (30,3)	55,1 (22,2)	89,6 (10,4)
FOPC	16	81,8 (16,0)	62,4 (26,0)	61,6 (19,6)	81,8 (8,8)	16,8 (8,6)
FOPB	18	82,8 (9,2)	64,3 (28,3)	42,2 (4,4)	100,0 (0,0)	12,8 (1,8)

**Tableau 29:** performances d'élevage larvaire (moyenne  $\pm$  écart-type) de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *I. ration galbana* et *C. gracilis* produites en batch (PB) ou en continu (PC).

La plus faible croissance est observée chez les larves élevées en séquentiel et alimentées avec des microalgues produites en continu (ESPC), avec une croissance globale de  $5,4 \mu\text{m j}^{-1}$  (figure 58). Celle-ci est nettement améliorée quand les animaux sont alimentés avec du phytoplancton produit en batch (ESPB ;  $12 \mu\text{m j}^{-1}$ ). Les larves élevées en flux ouvert et

alimentées avec du phytoplancton produit en continu (FOPC) présentent une très bonne croissance, avec un taux journalier de  $15,6 \mu\text{m j}^{-1}$ , supérieur à celui observé chez le témoin positif ( $14,6 \mu\text{m j}^{-1}$ , figure 58) mais peu différent des élevages menés en flux ouvert et alimentés avec des algues produites en batch (FOPB ;  $15 \mu\text{m j}^{-1}$ ). La quasi-absence de croissance observée chez les larves non alimentées ( $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$ , figure 58) démontre que le système de filtration de l'eau d'élevage était efficace et que les larves n'ont pas reçu, au cours de cette expérimentation, d'apport nutritionnel exogène pouvant perturber l'interprétation des résultats.

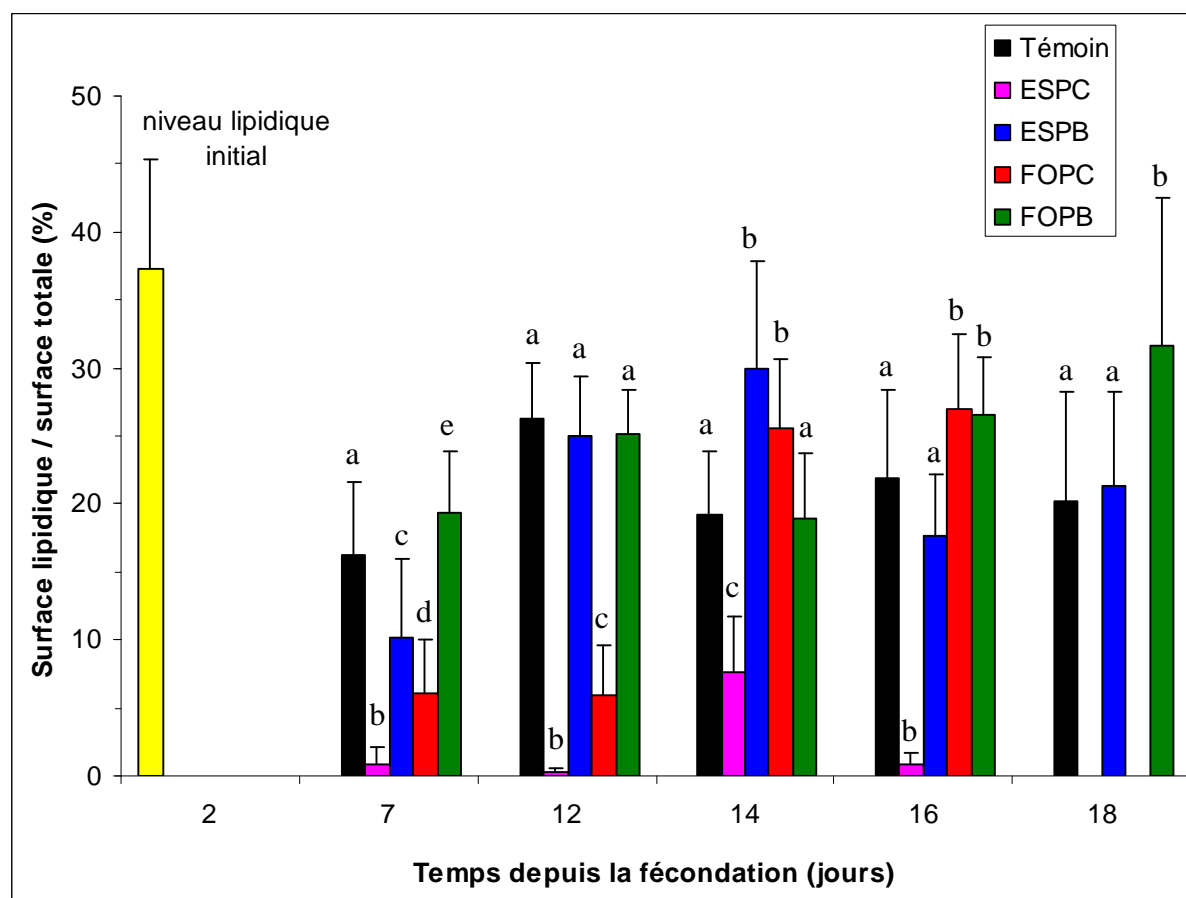
Au cours de cette expérimentation, des résultats discordants ont été obtenus au niveau des performances du développement. En effet, les meilleures croissances larvaires sont acquises chez les élevages conduits en flux ouvert ( $15$  à  $15,6 \mu\text{m j}^{-1}$ ) ainsi que les taux les plus élevés de compétence larvaire qui se traduisent, cependant, par de faibles taux de métamorphose ( $12$  à  $18\%$  : tableau 29).



**Figure 58 : croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *I. ration galbana* et *C. gracilis* produites en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (A JEUN). Les barres verticales représentent les écart-types.**

### *7.3.3.2. Indice lipidique global*

La surface lipidique relevée, chez les larves D, au deuxième jour est de 38 %. Une consommation de ces réserves est notée ultérieurement, de façon plus ou moins marquée selon la condition expérimentale. Ainsi, une diminution marquée de la surface lipidique est notée pour les élevages conduits en séquentiel et alimentés avec du phytoplancton produit en continu (ESPC), avec des valeurs quasi-nulles aux septième et douzième jours (figure 59). Une légère accumulation est observée (8 %) au quatorzième jour, mais celle-ci est labile puisqu'au seizième jour, les lipides sont négligeables (1 % : figure 59). Pour un même type de production phytoplanctonique (en continu), les larves conduites en flux ouvert (FOPC) présentent également une consommation marquée de leurs réserves lipidiques jusqu'au douzième jour (6 %) mais se caractérisent par une récupération prononcée aux quatorzième et seizième jours (26-28 % : figure 59). Pour les autres conditions (témoin et élevages alimentés par du phytoplancton produit en batch, FOPB et ESPB), une consommation moins brutale est notée au cours de la première semaine d'élevage, période au cours de laquelle les surfaces lipidiques sont comprises entre 10 et 19 % pour ces trois conditions. Une ré accumulation lipidique s'opère au douzième jour, date à partir de laquelle, les réserves restent stables, jusqu'à la fin de l'expérimentation, pour les témoins (19-22 %) et pour ESPB (18-30 %) et FOPB (19-32 %).



**Figure 59:** évolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *I. raiton galbana* et *C. gracilis* produites en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Les barres verticales représentent les écart-types. Pour une même date, les valeurs possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

### 7.3.3.3. Indice biochimique structurel

Les teneurs en triacylgcérols et en stérols ont été déterminées aux second, septième, et quatorzième jours ainsi qu'en fin d'élevage larvaire (figures 60 a et b). La teneur initiale en triacylgcérols mesurée au second jour est en moyenne de 2 ng larve<sup>-1</sup> (figure 60 a). Au septième jour, de très faibles valeurs sont notées, notamment dans le cas des larves nourries de phytoplancton produit en continu (ESPC et FOPC), celles-ci n'excédant pas 2 ng larve<sup>-1</sup>. L'apport de microalgues produites en batch permet, à l'inverse, une légère accumulation (8 ng larve<sup>-1</sup> vs 8,5 ng larve<sup>-1</sup> pour le témoin). Au quatorzième jour, un fort stockage lipidique est observé pour la condition FOPC, dont les valeurs atteignent 63 ng larve<sup>-1</sup>, contrairement aux

individus alimentés par le même type d'algue mais élevés en séquentiel chez qui les concentrations en triacylglycérols restent faibles (9 ng larve<sup>-1</sup>). La condition FOPB montre une faible accumulation (36 ng larve<sup>-1</sup>) par rapport aux témoins (94 ng larve<sup>-1</sup>) ou ESPB (65 ng larve<sup>-1</sup>). En fin d'élevage larvaire (16-18<sup>e</sup> j), les teneurs enregistrées sont supérieures à 83 ng larve<sup>-1</sup>, sauf pour la condition ESPC, dont les teneurs restent définitivement faibles (13 ng larve<sup>-1</sup> : figure 60 a).

La teneur initiale en stérols, mesurée au second jour, est en moyenne de 0,4 ng larve<sup>-1</sup> (figure 60 b). Au septième jour, les quantités sont comprises entre 0,8 et 1,5 ng larve<sup>-1</sup> et atteignent au quatorzième jour 10 à 14 ng larve<sup>-1</sup>, sauf pour la condition ESPC dont les teneurs sont faibles (4 ng larve<sup>-1</sup>). Il en est de même en fin d'élevage larvaire (4,8 ng larve<sup>-1</sup> au seizième jour) tandis que les autres conditions présentent des quantités comprises entre 15 et 26 ng larve<sup>-1</sup>.

Au second jour, le rapport TAG / ST est de 5,6 (figure 60 c). Il est compris entre 2 et 8 ultérieurement, toute condition expérimentale confondue. Ainsi, au septième jour, les individus alimentés de phytoplancton produit en continu, et quelle que soit la méthode d'élevage (flux ouvert ou séquentiel), affichent les valeurs les plus faibles (environ 2), suivis des individus de la condition FOPB et les témoins (environ 5) et enfin ESPB associé au rapport le plus fort (8). Au quatorzième jour, la même fourchette de valeurs est observée, avec la même tendance, à savoir les valeurs les plus faibles associées à un apport de phytoplancton produit en continu (2-4). Les témoins et la condition ESPB présentent toujours des rapports élevés (6,8 et 6 respectivement), tandis que les individus de la condition FOPB montrent une diminution de ce ratio (3,6), due à une faible accumulation des triacylglycérols à cette période (36 ng larve<sup>-1</sup> vs 94 ng larve<sup>-1</sup> chez le témoin). Cette dernière condition montre, cependant, une bonne récupération ultérieure puisque ce rapport est égal à 8,3 en fin d'élevage, valeur qui se situe en position intermédiaire entre ESPB (6,4) et le témoin (8,5). Les larves alimentées de phytoplancton produit en continu montrent toujours des faibles valeurs, voisines de 4.



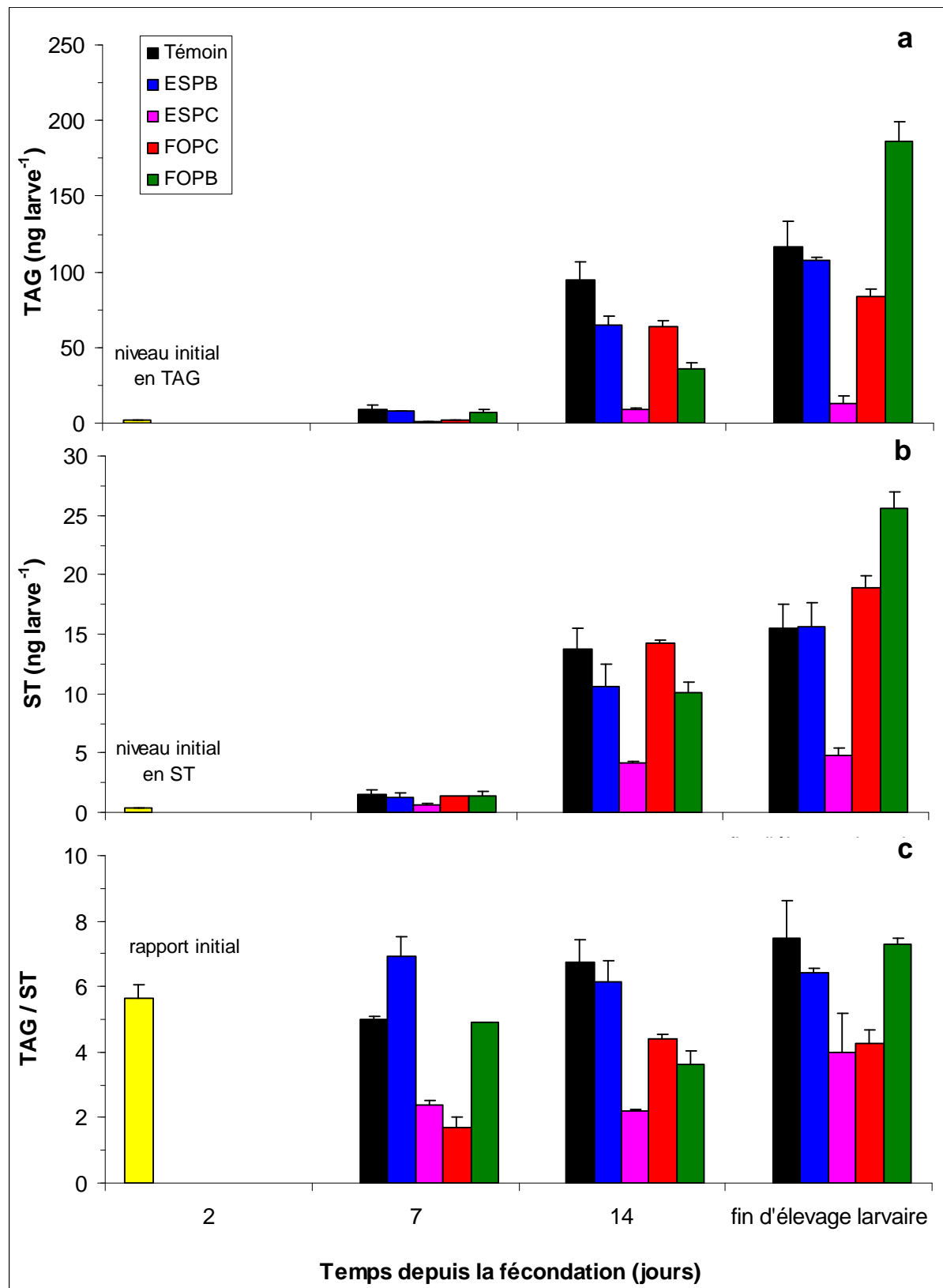


Figure 60 : évolution de la teneur des triacylgcérols (a), des stérols (b) en ng larve<sup>-1</sup> et du rapport TAG/ST (c) chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *I. ration galbana* et *C. gracilis* produites en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif est conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch). Les barres verticales représentent les écart-types.

#### 7.4. Discussion et conclusion

La qualité biochimique de *Chaetoceros gracilis* et d'*Isochrysis affinis galbana*, cultivés en batch, a déjà été estimée lors de travaux précédents (Brown *et al.*, 1998 ; McCausland *et al.*, 1999, Ponis *et al.*, 2003 ; Robert *et al.*, 2004). Toutefois, de nouvelles analyses ont été apportées dans la présente étude afin de comparer la valeur alimentaire des microalgues produites en batch et en continu et d'en vérifier la traduction biologique sur le développement larvaire de *C. gigas*. Les photobioréacteurs, qui constituent encore aujourd'hui un défi technologique, ont été développés dans le but de garantir une meilleure qualité et une constance des cultures destinées aux larves (Bougaran *et al.*, 2003). Or, les résultats de la présente étude montrent que les cultures produites en continu ont une qualité biochimique quasiment égale à celles produites en batch, dans nos conditions expérimentales où les paramètres d'environnement (T°C, lumière et nutriment) sont maintenues constantes. Ainsi, les deux microalgues étudiées présentent globalement une composition similaire en acides gras et en stérols quel que soit leur mode de culture, néanmoins très différente selon l'espèce considérée. En particulier, et comme attendu, la diatomée est une algue riche en acide eicosapentaénoïque EPA (23-24 %) et déficiente en acide docosahexaénoïque DHA (0,8-0,9 %), l'inverse étant noté chez le flagellé (DHA : 10-11 % ; EPA : 0,8-0,8 %). Des valeurs comparables sont obtenues par Rico-Villa *et al.* (2006) chez la petite diatomée *C. calcitrans* forma *pumilum* (28 % d'EPA) et chez *I. ration galbana* (10 % de DHA). Il en est de même en ce qui concerne ces espèces, cultivées en 2 L à Argenton, avec 15-20 % d'EPA chez *C. gracilis* et environ 11 % de DHA chez *I. ration galbana* (Robert *et al.*, 2004). Des valeurs légèrement différentes sont signalées par Pernet *et al* (2008) : 18 % d'EPA chez *C. gracilis* et 20 % de DHA chez *I. ration galbana*, mettant clairement en avant l'effet "souche" et / ou "conditions de culture" (Webb et Chu, 1983 ; Brown *et al.*, 1993). Cependant, il est à noter que les acides gras totaux sont quantitativement plus importants lorsque les microalgues sont produites en continu, notamment dans le cas de *C. gracilis*. En effet, cette diatomée renferme 3388 fg cellule<sup>-1</sup> lorsqu'elle est cultivée en continu vs 2559 fg cellule<sup>-1</sup> en batch. Chez *I. ration galbana*, la quantité d'acides gras totaux est estimée à 1802 fg cellule<sup>-1</sup> en production continue vs 1562 fg cellule<sup>-1</sup> dans le cas d'une production en batch.

En ce qui concerne les stérols, notre étude montre que, produite en batch ou en continu, *I. ration galbana*, se différencie de *C. gracilis* par l'abondance en brassicastérol (92-93 %) et sa faible concentration en cholestérol (8-8 %). En revanche, ce dernier est présent en

forte proportion dans *C. gracilis* (48 %), suivi par le fucostérol (36-39 %), et ceci quel que soit le mode de production de cette microalgue. Le 24-Méthylène cholestérol et l'isofucostérol sont également détectés dans la diatomée mais en faibles proportions (9 et 6 % respectivement). Cette richesse en cholestérol des *Chaetoceros* a été soulignée dans des travaux précédents (Robert *et al.*, 2004 ; Rico-Villa *et al.*, 2006 ; Tremblay *et al.*, 2008). Ces analyses biochimiques montrent clairement la complémentarité de ces deux espèces. Ainsi, afin de garantir un équilibre alimentaire chez les larves de bivalves, il est important d'apporter des rations phytoplanctoniques, au moins bispécifiques, composées d'un flagellé pour sa contribution en DHA et en brassicostérol et d'une diatomée à cause de ses teneurs relativement élevées en EPA, cholestérol et fucostérol. Ces éléments sont en effet considérés comme essentiels pour le développement larvaire des mollusques (Robert et Trintignac, 1998 ; Brown et McCausland, 2000 ; Brown et Robert, 2002). Ainsi, la déficience en DHA dans l'aliment semble avoir un effet négatif sur la fixation et la métamorphose chez les larves de *Pecten maximus* alors qu'une carence en EPA est responsable d'un ralentissement du développement (Soudant, 1995). De même, l'importance d'une alimentation riche en stérols semble être capitale puisqu'il a été rapporté que la capacité des bivalves à synthétiser les stérols de novo est considérée comme limitée ou nulle (Knauer *et al.*, 1999 ; Kanazawa, 2001).

Si la composition en acides gras et stérols est très variable entre *C. gracilis* et *I. rasion galbana*, leur composition proximale est, par contre, peu différente et ce, quel que soit leur mode de production. Ainsi, la proportion en protéines est comprise entre 50 et 54 % chez les deux espèces. Les lipides sont présents entre 42 et 44 % alors que les glucides sont de loin les plus minoritaires (5-6 %). La corrélation entre la composition proximale des microalgues et les performances d'élevage larvaire est, cependant, controversée. Volkman et Brown (2006) suggèrent que celle-ci n'est pas généralement le paramètre corrélé à la valeur nutritionnelle d'une microalgue bien que chez les larves de *Pinctada margaritifera*, la croissance est positivement corrélée aux teneurs en protéines, lipides et glucides alimentaires (Martinez-Fernández *et al.*, 2006). Chez l'huître plate *O. edulis*, le développement des juvéniles est fortement stimulé par des teneurs élevées en sucres (Enright *et al.*, 1986) alors que chez l'huître creuse, se sont les protéines qui conduisent à la meilleure croissance aussi bien chez les larves (Powell *et al.*, 2002) que chez les juvéniles (Knuckey *et al.*, 2002). Cependant, les premiers auteurs notent un moindre stockage de réserves chez les larves à fort développement réduisant ainsi les chances de succès à la métamorphose.

Par ailleurs, notre étude montre que les poids secs des microalgues élevées en continu et en batch sont similaires. Cependant, si le poids sec d'*I. rasion galbana* est cohérent (28 pg

cellule<sup>-1</sup>) par rapport aux valeurs relevées dans la littérature (15-20 %), celui de *C. gracilis* est particulièrement élevé (113-119 pg cellule<sup>-1</sup>), soit environ quatre fois plus important que les valeurs attendues. Cette anomalie est très probablement liée à un mauvais état physiologique des algues qui se traduit par un accroissement anormal des cellules mais aussi par la difficulté d'estimation de la concentration cellulaire.

Au cours de ce chapitre, l'influence de deux méthodes de production phytoplanctoniques (batch et continu) a été recherchée sur les performances des larves élevées en séquentiel et en flux ouvert. Pour cela, trois types de régime alimentaire ont été testés. L'impact d'une alimentation monospécifique de type Haptophycée à base d'*I. aff. galbana* a été d'abord recherché au cours de deux séries expérimentales. Malgré un problème technique survenu lors de la première expérimentation (Gig0605) et l'arrêt des élevages au seizième jour, des tendances peuvent être dégagées, en particulier sur l'influence de la technique d'élevage. Ainsi, les larves élevées en flux ouvert se caractérisent par des survies supérieures (46-59 %) à celles enregistrées chez les individus conduits en séquentiel (25-32 %) et par de meilleurs développements (11-12  $\mu\text{m j}^{-1}$  vs 5-9  $\mu\text{m j}^{-1}$ ). Conduit selon un procédé standard, c'est-à-dire en séquentiel, le témoin, nourri sur régime bispécifique (TCp), présente aussi des survies faibles (29 %) mais un fort développement larvaire (16  $\mu\text{m j}^{-1}$ ).

L'indice de condition (100\*MO/PS) enregistré en fin d'élevage (16<sup>e</sup> j) ne reflète, cependant, pas les écarts de développement larvaire puisque le témoin présente une valeur peu différente des autres élevages en séquentiel, malgré un écart marqué de croissance. Le pourcentage de matière organique est, en revanche, deux fois plus important chez les larves en flux ouvert. Selon le modèle biochimique décrit par Powell *et al.* (2002) chez *C. gigas*, un développement larvaire rapide réduit la capacité d'accumulation des réserves énergétiques, ce qui pourrait expliquer, la présence d'un moindre pourcentage de matière organique chez le témoin (fort développement larvaire) que chez les larves élevées en flux ouvert (croissance moins rapide). A l'inverse, le rapport TAG/ST enregistré au seizième jour semble mieux traduire l'état physiologique des larves, avec des valeurs fortes rattachées à un bon développement et faibles à nulles chez les individus à croissance médiocre.

Concernant les réserves lipidiques, des tendances globales similaires sont cernées par les approches biochimique et colorimétrique. En effet, le témoin bénéficiant d'un apport bispécifique (TCp) et les larves élevées en flux ouvert recevant uniquement le flagellé produit en batch (FOPB) se caractérisent par des concentrations en triacylglycérols et en stérols nettement plus élevées en fin d'élevage (16<sup>e</sup> j) que celles enregistrées chez les lots conduits en séquentiel. Ceci se traduit également sur leur surface lipidique (20-23 %). A l'inverse, les

individus élevés en séquentiel et alimentés par t. Iso produit en continu (ESPC) sont très pauvres en triacylglycérols et en stérols et présentent des surfaces lipidiques comprises entre seulement 1 et 4 %.

Au cours de la seconde expérimentation (Gig0606), des taux de survie plus importants sont également enregistrés, en fin d'élevage, chez les larves élevées en flux ouvert (81-89 % vs 18-34 % en séquentiel). Par contre, alors que la croissance est similaire antérieurement, un événement est apparu à partir du quatorzième jour sur les élevages en flux ouvert, entraînant un ralentissement marqué de leur développement. En conséquence, la croissance globale de ces larves est médiocre ( $8 \mu\text{m j}^{-1}$ ), inférieure à celle notée chez les individus en séquentiel ( $11 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et ne représentant que la moitié de celle du témoin ( $16 \mu\text{m j}^{-1}$ ). De plus, peu de larves compétentes (20-25 %) et de post larves (13 et 34 %) sont dénombrées. Cet événement ne s'est pourtant pas reflété sur les réserves lipidiques puisqu'en fin d'élevage (19<sup>e</sup> j), elles occupent 19 à 23 % de la surface chez les individus en flux ouvert vs 12-13 % chez les larves élevées en séquentiel. Les performances médiocres constatées chez les élevages en flux ouvert ne sont donc pas dues à une déficience lipidique.

Par ailleurs, l'impact d'un régime monospécifique à base de *C. gracilis* produite en batch et en continu sur les performances d'élevage de *C. gigas* conduite en séquentiel et en flux ouvert a été également abordé au cours de deux séries expérimentales. Au cours de la première expérimentation (Gig0610), la diatomée cultivée en continu conduit à des mortalités massives, quelle que soit la méthode d'élevage larvaire (séquentiel / flux ouvert). Cependant, en dehors de cette condition conduisant à un développement anormal, l'influence de la seule technique d'élevage larvaire se dégage nettement. Ainsi, pour le même type de microalgues produites en batch, les larves élevées en flux ouvert présentent une survie similaire à celle notée chez les individus en séquentiel (89 %) mais un taux de croissance plus important ( $15 \mu\text{m j}^{-1}$  vs  $10 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et donc un cycle d'élevage plus court (16 j vs 21 j). Des taux de compétence et métamorphose supérieurs sont également notés lorsque les larves sont maintenues en flux ouvert. Par ailleurs, il est intéressant de noter l'importance d'une alimentation équilibrée et/ou basée sur l'apport d'une petite diatomée en début d'élevage. En effet, le témoin 2 (T2), exclusivement nourri sur *C. gracilis* ( $\approx 80 \mu\text{m}^3$ ) dès le stade D, présente globalement un moindre développement ( $8 \mu\text{m j}^{-1}$ ) que les larves recevant pendant tout le cycle un régime bispécifique standard TCp (témoin 1 :  $11 \mu\text{m j}^{-1}$ ) ou ce même régime bispécifique (TCp) pendant la première semaine avant d'être soumis à la seule *C. gracilis* ultérieurement (ESPB :  $10 \mu\text{m j}^{-1}$ ). De plus, l'apport exclusif de cette diatomée du début

jusqu'à la fin du développement larvaire conduit également à de très faibles taux de compétence (26 %) et de métamorphose (12 %).

Il est, cependant, difficile de relier les performances d'élevage larvaire à l'évolution de l'indice lipidique global. En effet, pour des aires lipidiques quasi-similaires (33-36 %), relevées en fin d'élevage (21<sup>e</sup> j), les larves des conditions T2 et ESPB montrent des taux de compétence et de métamorphose très contrastés. Il en est de même pour les larves conduites en flux ouvert et alimentées à partir de la diatomée produite en batch (FOPB) qui sont les plus performantes malgré des surfaces lipidiques, au seizième jour, similaires à celles des autres traitements ayant conduit à des performances faibles à médiocres. A l'inverse, les larves recevant du phytoplancton en continu, affectées par de fortes mortalités, présentent des surfaces lipidiques particulièrement élevées. Ainsi, au douzième jour, les conditions FOPC et ESPC sont associées à des teneurs respectives de 39 et 49 %. Une forte teneur lipidique est également relevée au seizième jour pour ESPC (45 %). Cette situation anormale n'a jamais été rencontrée au cours des élevages précédents. Les larves analysées sont probablement moribondes ou mortes récemment. Soumises au Nile Red, leur surface lipidique présente une coloration inhabituelle jaune orange vif. Cet aspect constitue un des points contraignants de cette méthode colorimétrique que nous discuterons dans la conclusion générale.

Au douzième jour, la valeur du rapport TAG / ST la plus élevée est également notée chez les larves alimentées par du phytoplancton produit en continu (ESPC : 8 vs 5 pour le témoin et FOPB et 2 pour ESPB). La condition FOPC n'a pas fait l'objet d'étude chromatographique au vue des mortalités massives décelées dans les échantillons risquant de fausser l'interprétation des analyses biochimiques.

Au cours de la deuxième expérimentation (Gig0611), un problème de qualité du phytoplancton produit en continu a encore été décelé, celui-ci étant exacerbé lorsque l'eau d'élevage est faiblement renouvelée. La mortalité de plus de la moitié de la population élevée en séquentiel est enregistrée (ESPC : 54 % au 19<sup>e</sup> j) tandis que de faibles taux de compétence et de métamorphose sont relevés lorsque l'élevage se déroule en flux ouvert (FOPC : 28 %). Pour les deux conditions, des taux de croissances faibles à modérés sont notés (3 et 8  $\mu\text{m j}^{-1}$ , respectivement). Là aussi, l'influence de la seule technique d'élevage larvaire se dégage nettement puisque pour le même mode de production phytoplanctonique (batch), les larves élevées en flux ouvert sont caractérisées par les meilleures performances, en terme de survie (92 %), de croissance (13  $\mu\text{m j}^{-1}$ ) ainsi que des taux de compétence (85 %) et de métamorphose (81 %). Les individus élevés en séquentiel, quelle que soit leur alimentation d'origine (TCp : ESPB2 ou *C. gracilis* : ESPB1), montrent des performances quasi-similaires. En effet, avec

des taux de croissance identiques ( $11 \mu\text{m j}^{-1}$ ), la compétence larvaire est atteinte dans les deux cas au dix-neuvième jour (43-45 %) donnant lieu à des pourcentages de post larves compris entre 36 et 42 %. En fin d'élevage, le taux de survie est néanmoins légèrement inférieur chez les larves alimentées tout au long de l'élevage sur la seule *C. gracilis* (ESPB1 : 64 %) vs (ESPB2 : 83 %).

L'indice lipidique global, déterminé via l'approche colorimétrique, ne traduit, cependant, que partiellement ces résultats zootechniques. En effet, si le faible développement larvaire et les performances médiocres constatés chez ESPC peuvent être associés à de faibles réserves lipidiques tout au long du cycle larvaire, l'inverse n'est pas vrai. En effet, aucune relation directe ne peut être dégagée entre les bonnes performances du lot FOPB et l'évolution de l'indice lipidique global, celui-ci ne se démarquant pas particulièrement des indices lipidiques relatifs aux conditions ESPB1, ESPB2 et FOPC, élevages à performances faibles à moyennes. Les teneurs en triacylglycérols et stérols, relevées juste avant la métamorphose, se sont même avérées les plus basses chez ce lot (FOPB : 140 et 23  $\text{ng larve}^{-1}$ , respectivement) alors que les triacylglycérols atteignent le double pour la condition FOPC (309  $\text{ng larve}^{-1}$ ). Les valeurs du rapport TAG / ST, en fin d'élevage sont de 6 à 8 pour les lots conduits en séquentiel et de 8 à 9 pour ceux en flux ouvert, caractérisés aussi par une plus forte survie.

Enfin, le dernier objectif de ce chapitre traite de l'influence d'un régime bispécifique à base d'*I. aff. galbana* et *C. gracilis* cultivés en batch et en continu sur les performances d'élevages de *C. gigas* conduits en séquentiel et en flux ouvert. Là aussi, un problème de qualité du phytoplancton produit en continu se dégage de façon claire, fortement exacerbé lorsque l'eau d'élevage est faiblement renouvelée (en séquentiel). Ainsi, la condition ESPC n'a pu être conduite à terme à cause du développement médiocre manifesté ( $5 \mu\text{m j}^{-1}$ ), malgré une bonne survie en fin d'expérimentation (89 %). L'état physiologique des larves de *C. gigas* à travers l'indice lipidique global (approche colorimétrique) et l'indice biochimique structurel (étude chromatographique) montre que cette condition est particulièrement stressante et que les individus ont très peu constitué de réserves lipidiques. La surface lipidique de ces animaux n'a pas dépassé 8 % tout au long du développement larvaire. Quant aux triacylglycérols et stérols, les teneurs finales n'atteignent que 13 et 5  $\text{ng larve}^{-1}$ , respectivement (vs 118 et 15  $\text{ng larve}^{-1}$  chez le témoin). Un tel stress est également mis en évidence pour la condition FOPC au cours de la première semaine d'élevage, période au cours de laquelle la surface lipidique est faible (6 %) mais une mise en réserve s'opère ultérieurement, puisque l'aire lipidique augmente brusquement à 26-28 %. Le taux de métamorphose enregistré chez ce lot est pourtant très

faible (18 %), malgré une forte compétence larvaire (82 %). Ces deux conditions manifestent, en revanche, le rapport TAG / ST le plus faible en fin d'élevage (4 vs 8 chez le témoin).

Pour le même type d'alimentation produit en batch, des résultats mitigés sont obtenus en fonction de la méthode d'élevage. En effet, les larves élevées selon la procédure classique, (séquentiel : ESPB) montrent une meilleure survie en fin d'élevage (81 % vs 42 % en flux ouvert). Avec un accroissement global de  $12 \mu\text{m j}^{-1}$ , 55 % des larves élevées en séquentiel sont compétentes au dix-huitième jour engendrant 90 % de post larves. La surface lipidique relevée chez ce lot tout au long du développement larvaire est comprise entre 10 et 30 %. Malgré un développement supérieur ( $15 \mu\text{m j}^{-1}$ ) et une compétence concernant l'intégralité de la population au dix-huitième jour, seules 13 % de post larves sont dénombrées en flux ouvert. Pourtant, les réserves lipidiques déterminées chez ce lot par les deux approches sont élevées. La surface lipidique est comprise entre 19 et 32 % au cours du développement et la teneur finale en triacylglycérols est de  $186 \text{ ng larve}^{-1}$ . Les bonnes performances larvaires (croissance et survie) semblent être reliées ici à de fortes concentrations lipidiques mais pas les taux de métamorphose.

Il apparaît, par ailleurs, qu'en élevage séquentiel, l'apport de petites diatomées dans le régime nutritionnel est avantageux par rapport à des diatomées de plus grande taille tout au long de l'élevage. Ainsi, chez le témoin, l'adjonction dans le régime bispécifique de *C. calcitrans* f. *pumilum*, dont le volume cellulaire est environ deux fois moindre que celui de *C. gracilis* (Robert *et al.*, 2004), autorise une meilleure croissance larvaire (15 vs  $12 \mu\text{m j}^{-1}$  pour ESPB), une plus forte compétence (85 vs 55 % pour ESPB) mais curieusement une moindre métamorphose (48 vs 90 % pour ESPB). L'évolution des réserves lipidiques ne permet, cependant, pas d'expliquer clairement ces différences. En effet, juste avant la métamorphose, les surfaces lipidiques de ces deux lots sont similaires (20-21 %) tout comme les teneurs en triacylglycérols et stérols.

Notre étude montre que les lipides jouent un rôle important dans le développement larvaire de *C. gigas* et la métamorphose puisque de faibles teneurs lipidiques sont associées à des performances zootechniques faibles à médiocres. Cependant, cette variable n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer les écarts de performances constatés entre élevages. En effet, nous avons pu démontrer, aussi bien par l'approche colorimétrique que l'étude biochimique, que certains lots présentent des taux très faibles de métamorphose malgré des teneurs lipidiques élevées. L'importance des lipides au cours du développement larvaire et la métamorphose chez les bivalves a été évoquée lors de travaux précédents (Holland, 1988 ; Lucas, 1982 ; Gallagher et Mann, 1986 ; Gallagher *et al.*, 1986) sans toutefois l'établissement



d'une relation concrète. Les travaux se sont alors tournés sur le rôle des protéines dans ce processus (Utting, 1986 ; Whyte *et al.*, 1988 ; His et Maurer, 1988). Utting (1986) rapporte aussi que le taux de métamorphose chez *C. gigas* est fortement amélioré par un apport phytoplanctonique riche en protéines. La composition en acides aminés essentiels chez les larves de la même espèce reflète exactement celle des aliments consommés, suggérant ainsi que les protéines seraient un facteur déterminant de la valeur nutritionnelle de la microalgue (Brown, 2002). Le modèle biochimique développé par Hofmann *et al.* (2004) prédit qu'un déficit protéinique chez les larves de *C. gigas* conduit à un développement médiocre alors qu'un excès affecte négativement la métamorphose. Finalement, un équilibre entre les trois composés biochimiques (protéines, lipides et sucres) serait un facteur critique pour la métamorphose chez *C. gigas* (Haws *et al.*, 1993 ; Garcia-Esquivel *et al.*, 2001).

Par ailleurs, la culture des algues en continu est une technique automatisée, conduisant à d'importantes économies de main d'œuvre en minimisant les nombreuses interventions humaines nécessaires lors des cultures en batch (nettoyage des enceintes, stérilisation, ensemencement, etc.). Dans notre dispositif expérimental, la seule intervention requise pour ce système en continu est le remplissage de la cuve d'alimentation, tous les dix jours. Cependant, les algues produites en photobioréacteurs montrent des résultats éloignés de ceux escomptés. Une étude bactériologique menée en parallèle montre que les algues produites en continu étaient sujettes à une forte charge microbienne, en particulier *Vibrio*, ayant des effets délétères connus chez les larves de *C. gigas*. Malgré les avantages évidents des cultures en continu, plusieurs inconvénients peuvent être rencontrés. La conception et la mise en route de ce mode de culture est complexe et nécessite un contrôle rigoureux des paramètres de culture. Certaines fluctuations du pH ou de la température peuvent fortement modifier le développement des microalgues de manière irréversible. De plus, une augmentation anormale de la concentration en oxygène peut être engendrée par la forte biomasse se traduisant par une photo inhibition (Brown, 2002). Enfin, les souches doivent être parfaitement axéniques et le système de traitement de l'eau particulièrement efficace, la moindre contamination pouvant se développer rapidement. C'est à ce niveau que les problèmes ont été rencontrés au cours de la présente étude et des améliorations techniques devraient y remédier. En effet, le système actuel consiste à remplir au préalable, tous les dix jours, une réserve d'eau de mer filtrée enrichie en sels minéraux et vitamines, alimentant les réacteurs. Cette réserve devra être supprimée puisque l'eau de mer stagnante devient une source de prolifération bactérienne. Il faudra la remplacer par une arrivée continue d'eau de mer stérile (filtrée et traitée par ultraviolet ou pasteurisée) couplée à une injection directe des sels nutritifs.



**Développement larvaire de *C. gigas* et évolution de  
deux indices de qualité en conditions standardisées**



## **8. Développement larvaire de *C. gigas* et évolution de deux indices de qualité en conditions standardisées**

### **8.1. Cadre expérimental**

#### **8.1.1. Élevages larvaires**

Après avoir étudié l'impact des facteurs de l'environnement tels que la température, la nourriture (aspect quantitatif et qualitatif) et le jeûne, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'étude de l'évolution des indices de qualité (TAG/ST et MO/PS) ainsi que leur limite de variation dans des conditions constantes dites standardisées. Pour ce faire, six séries d'élevage ont été reproduites, de février à septembre 2004, selon les mêmes conditions zootechniques, depuis le conditionnement des géniteurs jusqu'à la métamorphose (voir chapitre matériels et méthodes). Deux autres élevages ont été conduits en 2005 et 2006, selon ces mêmes procédures standardisées. Les performances d'élevage (croissance, survie et compétence) et le succès à la métamorphose ont été suivis parallèlement à l'évolution des indices physiologiques (MO/PS et TAG/ST) tout au long du cycle larvaire. Les phospholipides ont un rôle énergétique important durant les stades larvaires précoces et les périodes de jeûne

(Fraser, 1989; Delaunay *et al.*, 1992) rendant l'utilisation du rapport TAG/ST plus appropriée pour l'estimation de la qualité larvaire que le rapport TAG/PL (Pernet *et al.*, 2003).

#### **8.1.2. Analyses biochimiques**

L'évolution du poids sec (PS) et de la matière organique (MO) a été suivie tous les deux jours en récupérant un nombre déterminé de larves allant de 10 000 à 200 000, en fonction du stade larvaire. Le suivi des teneurs des triacylglycérols (TAG) et des stérols (ST) a été effectué tous les deux jours par prélèvement d'un nombre déterminé de larves allant de 25 000 à 100 000 selon leur âge (voir chapitre Matériels et méthodes détaillé).

### 8.1.3. Analyses statistiques

Les différences significatives entre les moyennes ont été détectées au seuil de significativité de 5 % par ANOVA et par test à posteriori de comparaison multiple de moyennes (test de Scheffé), après transformation préalable des résultats, exprimés en pourcentage, par la fonction [arcsin (racine  $x_i/100$ )], grâce au logiciel Statview 5.

## 8.2. Fluctuations intra annuelles : élevages standardisés au cours de 2004

### 8.2.1. Performances d'élevage larvaire

Les performances larvaires observées au cours des élevages conduits de 2004 à 2006 selon les mêmes conditions zootechniques sont représentées dans le tableau 30. Le cycle larvaire est compris entre 16 et 19 jours pour une même température d'élevage ( $24 \pm 1$  °C). La survie larvaire relevée en fin d'élevage est globalement supérieure à 48 %, excepté pour les élevages Gig0408 (juin 2004) et Gig0409 (août 2004). Pour le premier, une décimation quasi-totale des larves, due à une contamination par la bactérie du genre *Vibrio*, est relevée au seizième jour et le deuxième a montré une survie faible de 29 %. Les taux de croissance, calculés à partir du stade larve D jusqu'au stade larve oeillée, sont relativement rapides ( $> 10 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) et ne sont pas significativement différents, quel que soit l'élevage ( $p > 0,05$ ). A la fin du cycle larvaire (16-19° j), les taux de compétence (nombre de larves oeillées / nombre de larves vivantes) sont compris entre 46 et 88 %. En dépit d'une survie faible enregistrée pour l'élevage Gig0409, 48 % des larves étaient compétentes au dix-neuvième jour engendrant cependant seulement 28 % de post larves

A l'opposé, Gig0405 est l'élevage le plus performant en termes de survie (64 %), de compétence (83 %) et de taux de métamorphose (89 %). Il en est de même pour Gig0404 dont la compétence est particulièrement précoce (16° j), engendrant un taux de métamorphose satisfaisant (51 %) et significativement égal à ceux relevés pour Gig0406 et Gig0408 ( $p > 0,05$ ). Pour les autres élevages, les taux de métamorphose ne sont pas significativement différents (42-51 %).

Élevages larvaires	Durée d'élevage larvaire (j)	Survie en fin d'élevage (%)	Taux de croissance ( $\mu\text{m j}^{-1}$ )	Taux de compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
Gig0404 (mars 04)	16	59,9 (11,5) <sup>a</sup>	15,6 (2,9) <sup>a</sup>	51,4 (10,1) <sup>a</sup>	51,3 (4,6) <sup>ac</sup>
Gig0405 (avril 04)	18	64,4 (6,3) <sup>a</sup>	13,3 (2,3) <sup>a</sup>	82,6 (14,4) <sup>bc</sup>	89,4 (0,9) <sup>bc</sup>
Gig0406 (mai 04)	19	58,6 (10,2) <sup>a</sup>	12,0 (2,6) <sup>a</sup>	46,2 (5,5) <sup>a</sup>	50,6 (8,9) <sup>ac</sup>
Gig0408 (juin 04)	16	8,5 (2,5) <sup>b</sup>	10,2 (1,8) <sup>a</sup>	***	***
Gig0408 (juil 04)	19	48,2 (2,2) <sup>a</sup>	13,4 (1,8) <sup>a</sup>	64,6 (0,8) <sup>abc</sup>	42,1 (10,3) <sup>a</sup>
Gig0409 (août 04)	19	28,8 (10,4) <sup>b</sup>	13,3 (1,5) <sup>a</sup>	48,1 (8,9) <sup>a</sup>	28,1 (4,1) <sup>a</sup>
Gig0503 (mars 05)	16	59,0 (2,4) <sup>a</sup>	14,2 (3,8) <sup>a</sup>	55,0 (8,0) <sup>ab</sup>	81,9 (4,3) <sup>c</sup>
Gig0606 (mai 06)	16	54,2 (9,4) <sup>a</sup>	16,3 (2,2) <sup>a</sup>	88,0 (10,1) <sup>c</sup>	69,6 (12,5) <sup>c</sup>

**Tableau 30 : performances (moyenne  $\pm$  écart-type) des élevages larvaires de *C. gigas* conduits de 2004 à 2006, selon les mêmes conditions zootechniques.** Les valeurs possédant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes, au seuil de 5 %.

La croissance a été étudiée tous les deux jours du stade larve D, âgée de deux jours après la fécondation jusqu'au stade de larve oeuillée, prête à la métamorphose (16-19<sup>c</sup> j), à  $24 \pm 1$  °C. L'évolution de la croissance larvaire au cours du temps (figure 61) présente une même tendance générale, malgré des taux de croissance journaliers différents selon l'élevage (allant de  $10,2 \pm 1,8$  à  $15,6 \pm 2,9$   $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$  : tableau 30). La représentation graphique montre une courbe sigmoïde (en forme de S étalé) qui traduit une première phase de croissance modérée, durant laquelle les taux de croissance varient entre 6,0 et  $10,8 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ , avant que ne démarre la forte croissance ( $16,0$ - $19,8 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ ). Le taux de croissance diminue à l'approche de la métamorphose ( $8$ - $15 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ ). Les larves présentent une longueur moyenne initiale comprise entre 88 et 88  $\mu\text{m}$  et atteignent au bout d'une semaine d'élevage une longueur moyenne de coquille comprise entre  $118 \pm 10$  et  $138 \pm 8 \mu\text{m}$ . A la fin du cycle larvaire, la taille moyenne de fixation est comprise entre  $281 \pm 44$  et  $312 \pm 30 \mu\text{m}$ .

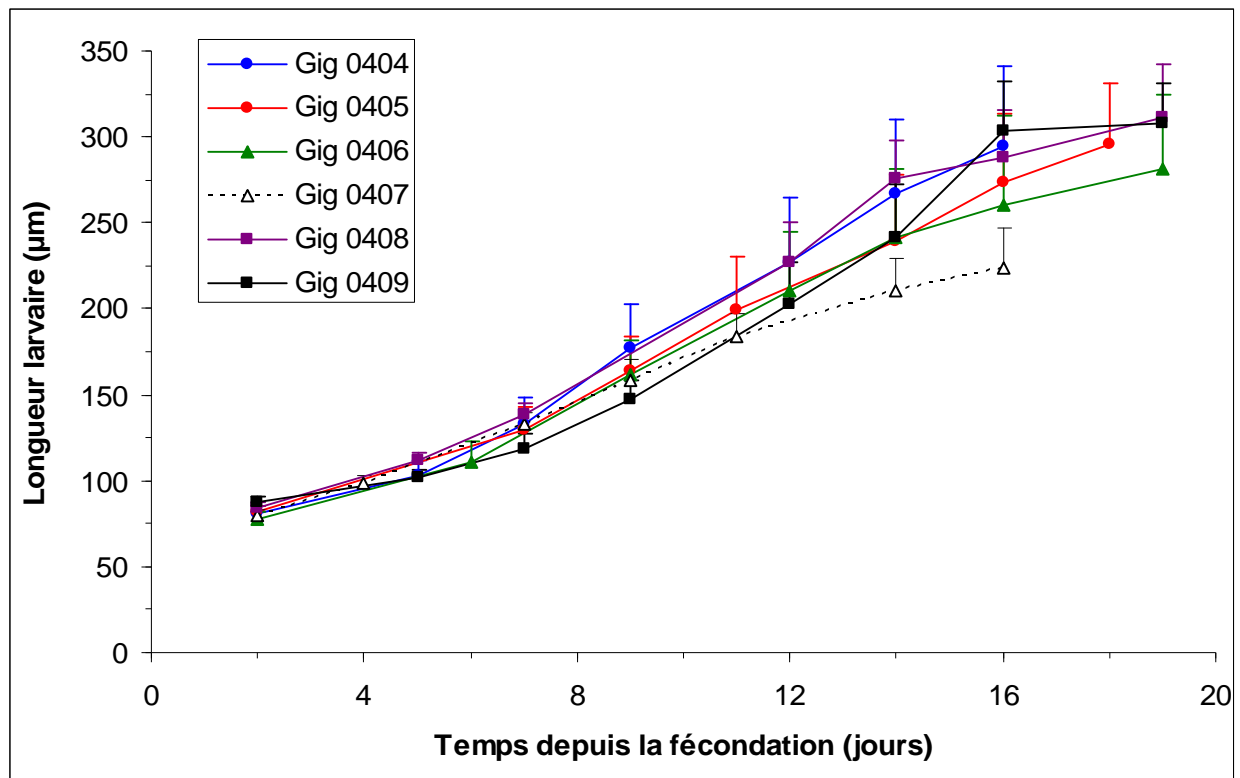


Figure 61: croissance larvaire observée dans les élevages de *C. gigas* conduits de 2004 à 2006, selon les mêmes conditions zootechniques. Les barres verticales correspondent aux écarts-types ( $n > 100$ ).

### 8.2.2. Indice de condition larvaire

L'évolution du poids sec (PS), de la matière organique (MO) ainsi que du rapport MO/PS au cours du développement larvaire est représentée dans la figure 62. Le poids sec augmente progressivement au cours de la première semaine de développement passant de 83-131 ng larve<sup>-1</sup> au second jour à 386-914 ng larve<sup>-1</sup> au septième jour (figure 62 a), ce qui conduit à un accroissement journalier compris entre 58 et 161 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, selon l'élevage. Au quatorzième jour, les valeurs sont comprises entre 2183 et 3583 ng larve<sup>-1</sup>, ce qui conduit à un accroissement de 258 à 380 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, du septième au quatorzième jour. Juste avant la métamorphose (16-19<sup>e</sup> j), les teneurs finales sont comprises entre 3840 et 6392 ng larve<sup>-1</sup>. Ceci conduit à un accroissement en poids sec journalier de 408 à 893 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, au cours de la troisième semaine d'élevage. Le taux d'accroissement global, calculé du second jour jusqu'à la fin de la vie larvaire, est compris entre 261 et 393 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> selon l'élevage.



La matière organique (figure 62 b) évolue de la même manière que le poids sec. Ainsi, la matière organique initiale, relevée au second jour, varie de 9 à 36 ng larve<sup>-1</sup>, pour atteindre au septième jour 41 à 211 ng larve<sup>-1</sup>, selon l'élevage. Le taux d'accroissement pendant la première semaine oscille entre 6 et 38 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Au quatorzième jour, les valeurs sont comprises entre 515 et 1200 ng ind<sup>-1</sup>, ce qui entraîne un taux d'accroissement de 68 à 142 ng ind<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, au cours de la deuxième semaine. Juste avant la métamorphose (16-19<sup>e</sup> j), les teneurs finales, passant du simple au triple, sont comprises entre 800 et 2400 ng ind<sup>-1</sup>, conduisant à un accroissement de 143 à 358 ng ind<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, au cours de la troisième semaine. Les teneurs les plus élevées sont enregistrées pour l'élevage Gig0405 alors que les concentrations les plus faibles sont notées pour Gig0404. Le taux d'accroissement global, calculé du second jour jusqu'à la fin de la vie larvaire, est compris entre 58 et 150 ng ind<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

L'indice de condition (MO/PS)\*100 montre des valeurs stables au cours du développement larvaire avec toutefois une légère tendance à la hausse en fin du cycle larvaire (figure 62 c). Ainsi, au second jour, les valeurs sont comprises entre 15 et 28 % pour passer au quatorzième jour à 26-38 %. En fin d'élevage larvaire (16-19<sup>e</sup> j), cet intervalle est compris entre 30 et 38 %. Gig0404 montre l'indice de condition le plus faible avec des valeurs stables autour de 10 % pendant la première semaine pour atteindre des valeurs comprises entre 16 et 21 % à partir du douzième jour jusqu'à la fin de la vie larvaire. Ces faibles valeurs sont dues à la faible teneur en matière organique, enregistrée durant tout le cycle larvaire.

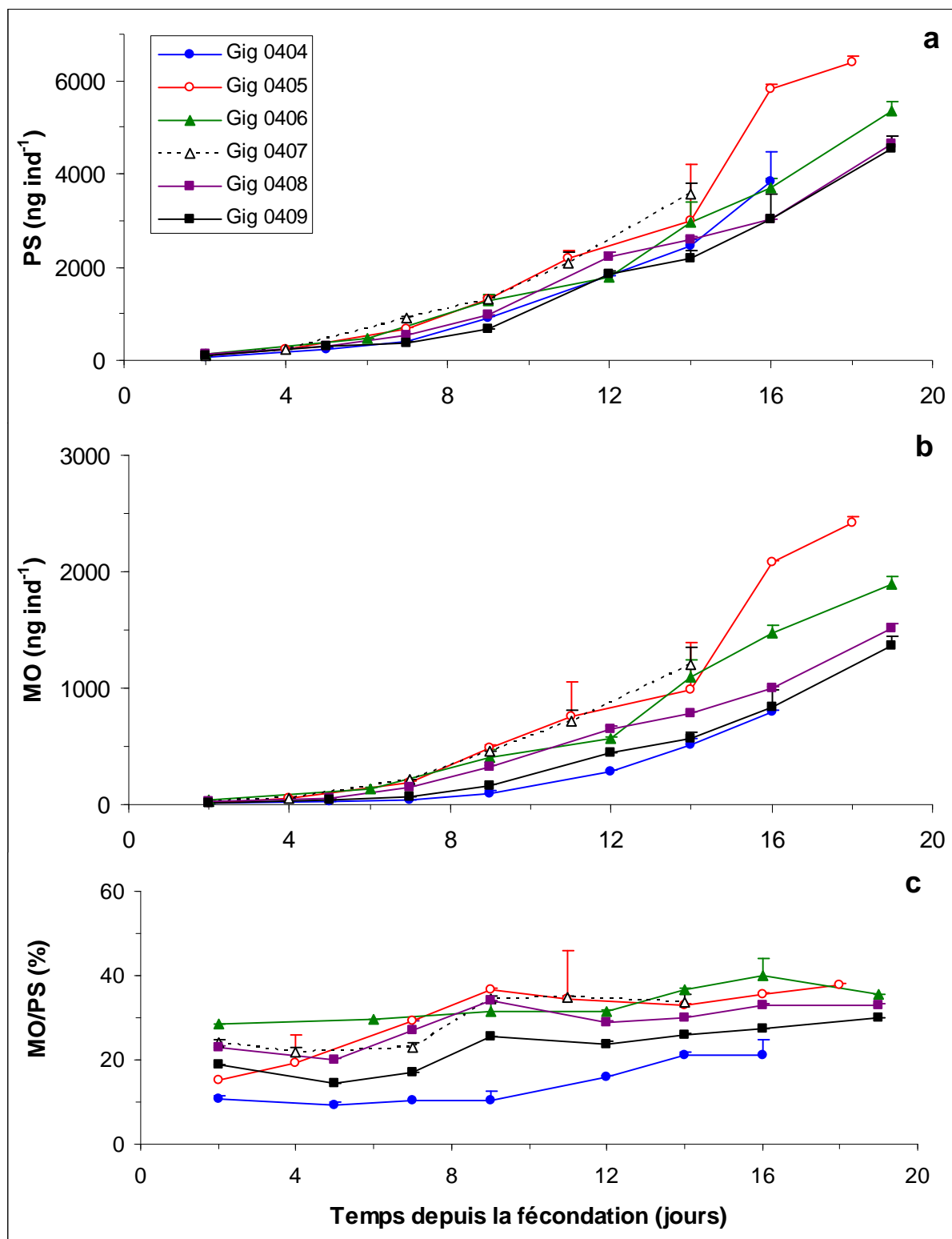


Figure 62 : évolution du poids sec (a), de la matière organique (b) et de la matière organique relative (c) chez les larves de *C. gigas* élevées selon les mêmes conditions zootecniques. Les barres verticales représentent les écart-types (n=2).

### 8.2.3. Indice biochimique structurel

L'évolution des triacylglycérols (TAG), des stérols (ST) ainsi que du rapport TAG/ST au cours du développement larvaire est représentée dans la figure 63. Les teneurs des triacylglycérols sont très faibles pendant la première semaine et passent de 1-2 ng larve<sup>-1</sup> au second jour à des quantités inférieures à 14 ng larve<sup>-1</sup> au septième jour (figure 63 a). A partir du quatorzième jour, une forte accumulation est notée, avec des valeurs comprises entre 60-85 ng larve<sup>-1</sup> pour l'ensemble des élevages, et 134 ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0404. Juste avant la métamorphose, les quantités de ces lipides de réserves atteignent 96-163 ng larve<sup>-1</sup>.

Les stérols montrent une évolution similaire à celle des triacylglycérols, avec de faibles teneurs en première semaine (0,6 à 1 ng larve<sup>-1</sup>), et forte accumulation en deuxième semaine durant laquelle les valeurs atteignent 9-13 ng larve<sup>-1</sup> pour l'ensemble des élevages et 20 ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0404, au quatorzième jour (figure 63 b). Juste avant la métamorphose, les valeurs se rangent entre 16 et 24 ng larve<sup>-1</sup>.

L'indice biochimique structurel (TAG/ST : figure 63 c) montre, quant à lui, une évolution en dents de scie avec des valeurs comprises entre 4 et 8 au deuxième jour. Puis, une baisse systématique est détectée aux 5-6<sup>e</sup> jours d'élevage. Les deux cas où une légère augmentation est enregistrée correspondent à des mesures effectuées au quatrième jour (Gig0405 et Gig0408). Ultérieurement, entre les septième et neuvième jours, un pic est détecté, correspondant à une accumulation plus rapide des lipides de réserves (TAG) par rapport aux lipides de structure (ST). Une décroissance du rapport est notée vers la fin du cycle larvaire. L'élevage Gig0408 (décimation quasi-totale de la population au 16<sup>e</sup> j) a montré un rapport quasi-stable pendant les deux premières semaines.

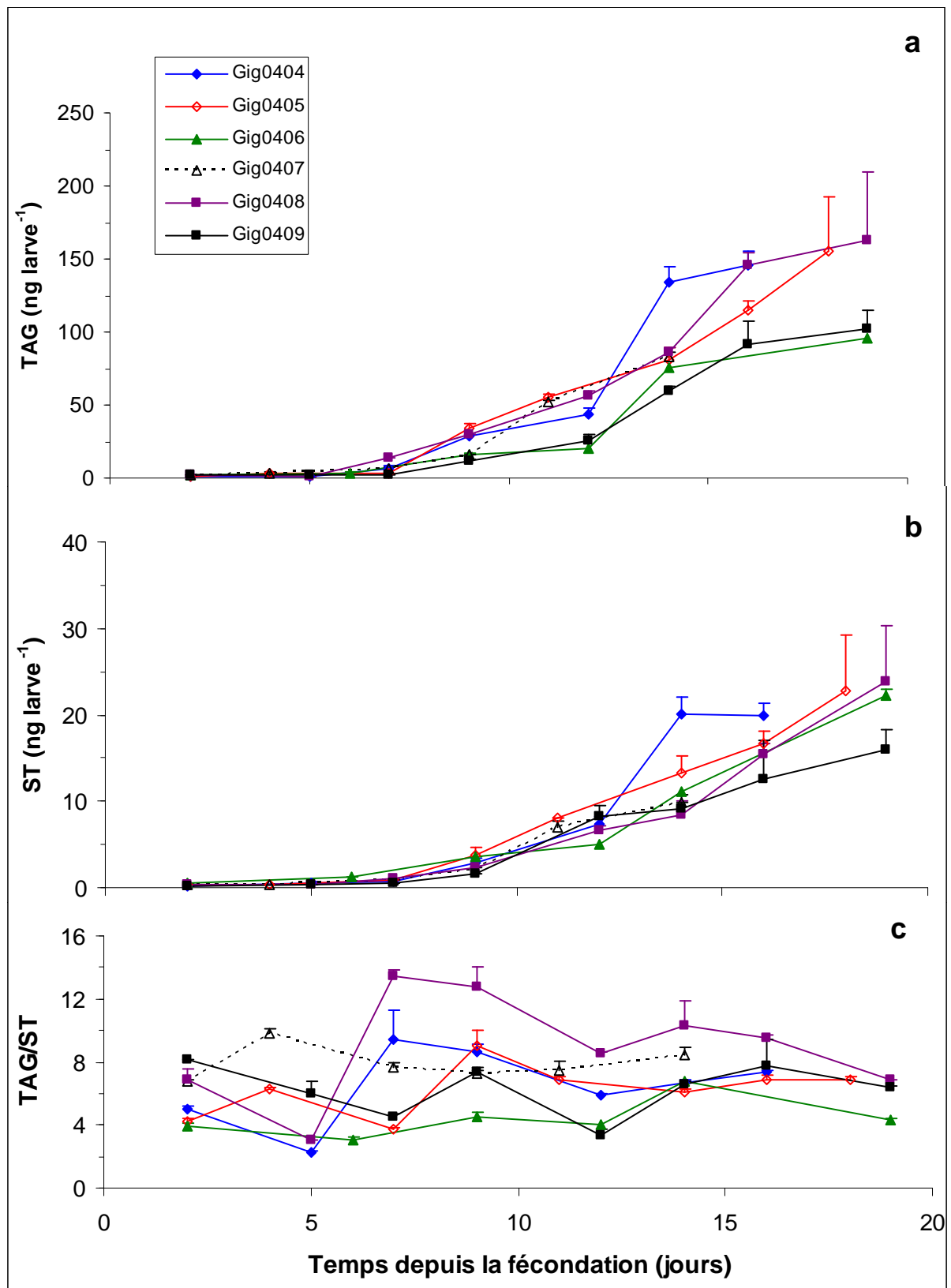


Figure 63 : évolution des triacylglycérols (a), des stérols (b) et du rapport TAG/ST (c) chez les larves de *C. gigas*, élevées selon les mêmes conditions zootechniques. Les barres verticales représentent les écart-types (n=2).

### 8.3. Fluctuations interannuelles : élevages de référence 2005 et 2006

Afin de recadrer ce travail par rapport aux élevages standardisés de l'année 2004, deux élevages ont été conduits selon les procédures dites standardisées en 2005 et 2006 dont les principaux résultats sont présentés ci-dessous :

#### 8.3.1. Performances d'élevage larvaire

Les performances larvaires sont représentées dans le tableau 31. Les survies relevées au 16<sup>e</sup> jour (54 et 59 %) ne présentent pas de différences significatives, au seuil de 5 %, entre les deux élevages ( $F = 1,444$  et  $p = 0,26$ ). En revanche, les taux de croissance enregistrés sont significativement différents ( $F = 46,045$  et  $p < 0,0001$ ). Les larves issues de la ponte de mai 2006 montrent une croissance plus rapide ( $16 \mu\text{m j}^{-1}$  vs  $14 \mu\text{m j}^{-1}$  chez les larves élevées en mars 2005), conduisant à des tailles moyennes finales significativement plus importantes ( $F = 31,380$  et  $p < 0,0001$ ). Cependant, dans les deux cas, les larves sont aptes à se métamorphoser dès le seizième jour, avec des taux de compétence significativement différents ( $F = 19,523$  et  $p = 0,0008$ ). L'élevage effectué en mai 2006 présente un taux de compétence supérieur (88 vs 55 % chez les larves de mars 2005), n'engendrant cependant pas le meilleur taux de métamorphose (80 vs 82 % chez les larves de mars 2005).

Ces performances se situent dans la même gamme de variation des élevages standards conduits au printemps 2004, dont la moyenne est la suivante : durée d'élevage  $18,8 \pm 1,5$  j, survie en fin d'élevage larvaire  $61 \pm 3$  %, taux de croissance global  $13,6 \pm 1,8 \mu\text{m j}^{-1}$ , compétence  $56,8 \pm 14$  % et métamorphose  $64 \pm 22$  %.

Élevages	Durée de l'élevage larvaire (j)	Longueur en fin d'élevage ( $\mu\text{m}$ )	Taux de croissance ( $\mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ )	Survie en fin d'élevage (%)	Taux de Compétence (%)	Taux de métamorphose (%)
Gig0503 (mars 05)	16	283,4 (51,2) <sup>a</sup>	14,2 (3,8) <sup>a</sup>	59,0 (2,4) <sup>a</sup>	55,0 (8,0) <sup>a</sup>	81,9 (4,3)
Gig0606 (mai 06)	16	306,3 (30,9) <sup>b</sup>	16,3 (2,2) <sup>b</sup>	54,2 (9,4) <sup>a</sup>	88,0 (10,1) <sup>b</sup>	69,6 (12,5)

Tableau 31: performances (moyenne  $\pm$  écart-type) des deux élevages larvaires de *C. gigas* conduits en 2005 et 2006, selon les mêmes conditions zootechniques qu'en 2004.

L'évolution de la croissance larvaire au cours du temps (figure 64) montre une même allure générale entre les deux élevages, avec cependant des taux de croissance différents à partir du neuvième jour (test de Scheffé :  $p < 0,0001$ , au seuil de significativité de 5 %). En première semaine, du second au neuvième jour, les taux de croissance, sont de 11,3 et 12,3  $\mu\text{m larve}^{-1} \text{j}^{-1}$ , respectivement pour Gig0503 et Gig0606. En deuxième semaine, les taux passent respectivement à 18,1 et 21,8  $\mu\text{m larve}^{-1} \text{j}^{-1}$  et en fin d'élevage, à l'approche de la métamorphose, une légère baisse est notée (15 et 18  $\mu\text{m larve}^{-1} \text{j}^{-1}$ ). L'élevage Gig0503 se caractérise par une grande hétérogénéité intra populationnelle (écart-types élevés).

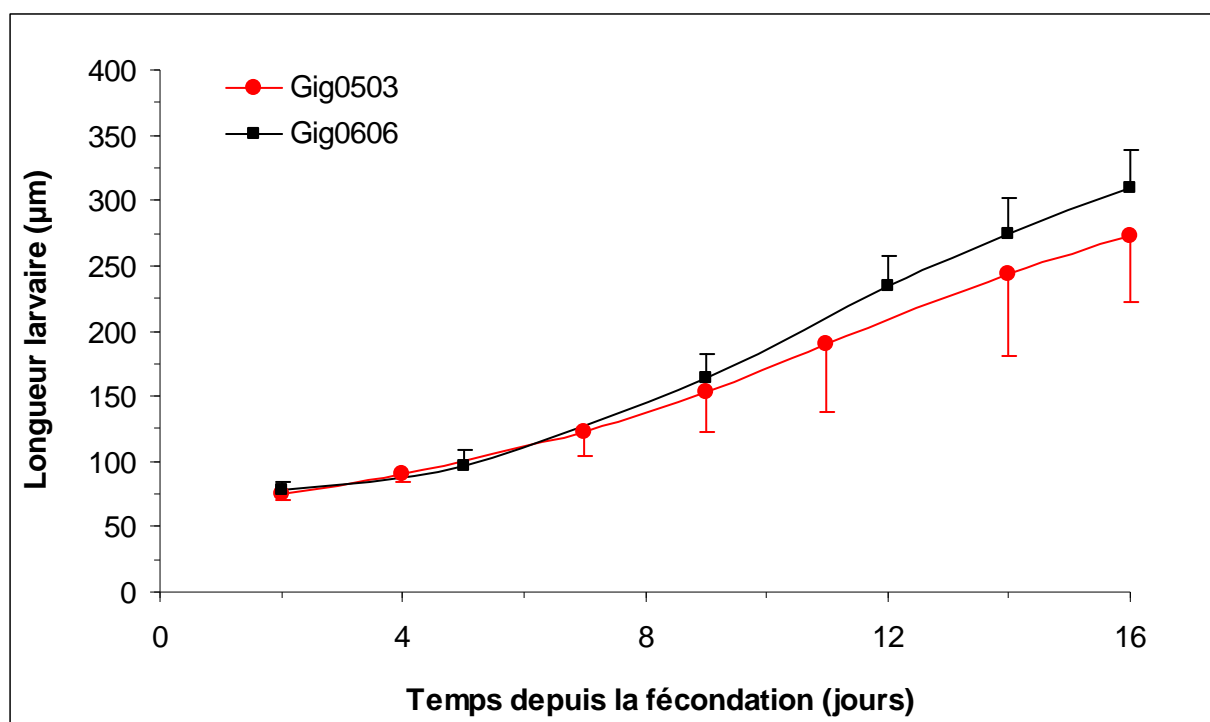


Figure 64 : croissance larvaire observée au cours des deux élevages de *C. gigas* conduits en 2005 et 2006, selon les mêmes conditions zootechniques qu'en 2004. Les barres verticales correspondent aux écart-types ( $n > 100$ ).

### 8.3.2. Indice de condition larvaire

L'évolution du poids sec (PS), de la matière organique (MO) ainsi que du rapport MO/PS au cours du développement larvaire des deux élevages effectués en 2005 et 2006 est représentée dans la figure 65. Quel que soit l'élevage, une même tendance est notée, c'est à dire une augmentation progressive au cours du temps des teneurs en poids sec (figure 65 a) et en matière organique (figure 65 b). Les deux élevages montrent, cependant, des cinétiques

d'accumulation différentes, notamment en fin de cycle larvaire. Ainsi, au second jour, des valeurs de poids sec, statistiquement différentes ( $p = 0,0184$ ), ont été relevées. Les larves issues de Gig0503 présentent un poids sec moyen de  $160 \pm 18 \text{ ng larve}^{-1}$  alors que celles résultant de Gig0606 montrent une moyenne de  $280 \pm 12 \text{ ng larve}^{-1}$ . Il en est de même au neuvième jour, où des valeurs respectives de  $1029 \pm 28$  et  $1305 \pm 12 \text{ ng larve}^{-1}$  ont été enregistrées pour Gig0503 et Gig0606. Ceci conduit à un accroissement pondéral respectif de 124 et 148  $\text{ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pendant la première semaine. Au quatorzième jour, les différences sont lissées puisque les larves issues de Gig0503 semblent rattraper leur retard et montrent un poids sec de  $3633 \pm 328 \text{ ng larve}^{-1}$ , non significativement différent de celui relevé pour Gig0606 ( $3442 \pm 540 \text{ ng larve}^{-1}$ ;  $p = 0,68$ ). Ce rajustement est de courte durée et au seizième jour, les valeurs passent du simple au double. Elles sont de  $4265 \pm 118 \text{ ng larve}^{-1}$  pour Gig0503 et  $8120 \pm 289 \text{ ng larve}^{-1}$  pour Gig0606 ( $p < 0,0001$ ). Globalement, l'accroissement de la matière sèche est de 293  $\text{ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pour Gig0503 et 561  $\text{ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  pour Gig0606, soit un accroissement deux fois plus important.

Concernant la matière organique (figure 65 b) les valeurs initiales, mesurées au second jour, sont de  $88 \pm 16$  et  $161 \pm 48 \text{ ng larve}^{-1}$ , respectivement pour Gig0503 et Gig0606, sans qu'aucune différence significative n'ait été détectée ( $p = 0,14$ ). Au neuvième jour, les valeurs de matière organique enregistrées sont significativement différentes ( $p = 0,0138$ ). Elles sont de  $352 \pm 20 \text{ ng larve}^{-1}$  et  $536 \pm 24 \text{ ng larve}^{-1}$ , respectivement pour Gig0503 et Gig0606, ce qui conduit à des accroissements pondéraux respectifs de 39 et 54  $\text{ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$ . Au seizième jour, c'est à dire juste avant la métamorphose, les valeurs passent presque du simple au double avec des poids organiques de  $1453 \pm 194 \text{ ng larve}^{-1}$  pour Gig0503 et  $2419 \pm 80 \text{ ng larve}^{-1}$  pour Gig0606 ( $p = 0,0002$ ), ce qui conduit à un accroissement global de 98 et 161  $\text{ng larve}^{-1} \text{ j}^{-1}$  respectivement pour Gig0503 et Gig0606.

Les rapports de MO/PS (figure 65 c) mesurés au deuxième jour ne sont pas significativement différents ( $p = 0,40$ ). Les valeurs sont de  $48 \pm 5$  pour Gig0503 et  $59 \pm 15 \%$  pour Gig0606. Les seules différences significatives entre élevages sont détectées aux neuvième et quatorzième jours ( $p = 0,0304$  et  $0,0068$  respectivement), avec des tendances opposées. Ainsi, au neuvième jour, le rapport relevé pour Gig0503 est inférieur à celui noté pour Gig0606 ( $34 \pm 1$  et  $41 \pm 1 \%$  respectivement) alors qu'au quatorzième jour, les tendances s'inversent et des valeurs respectives de  $36 \pm 3$  et  $25 \pm 2$  sont obtenues. Au seizième jour, avec des valeurs comprises entre 30 et 34 %, aucune différence significative n'a été détectée ( $p = 0,14$ ). Il est à noter que l'élevage Gig0503 montre des rapports plus stables au cours du

développement larvaire (34 – 36 %) alors que pour Gig0606, les valeurs sont plus fluctuantes et comprises entre 30 et 41 % avec un minimum de 25 % au quatorzième jour.

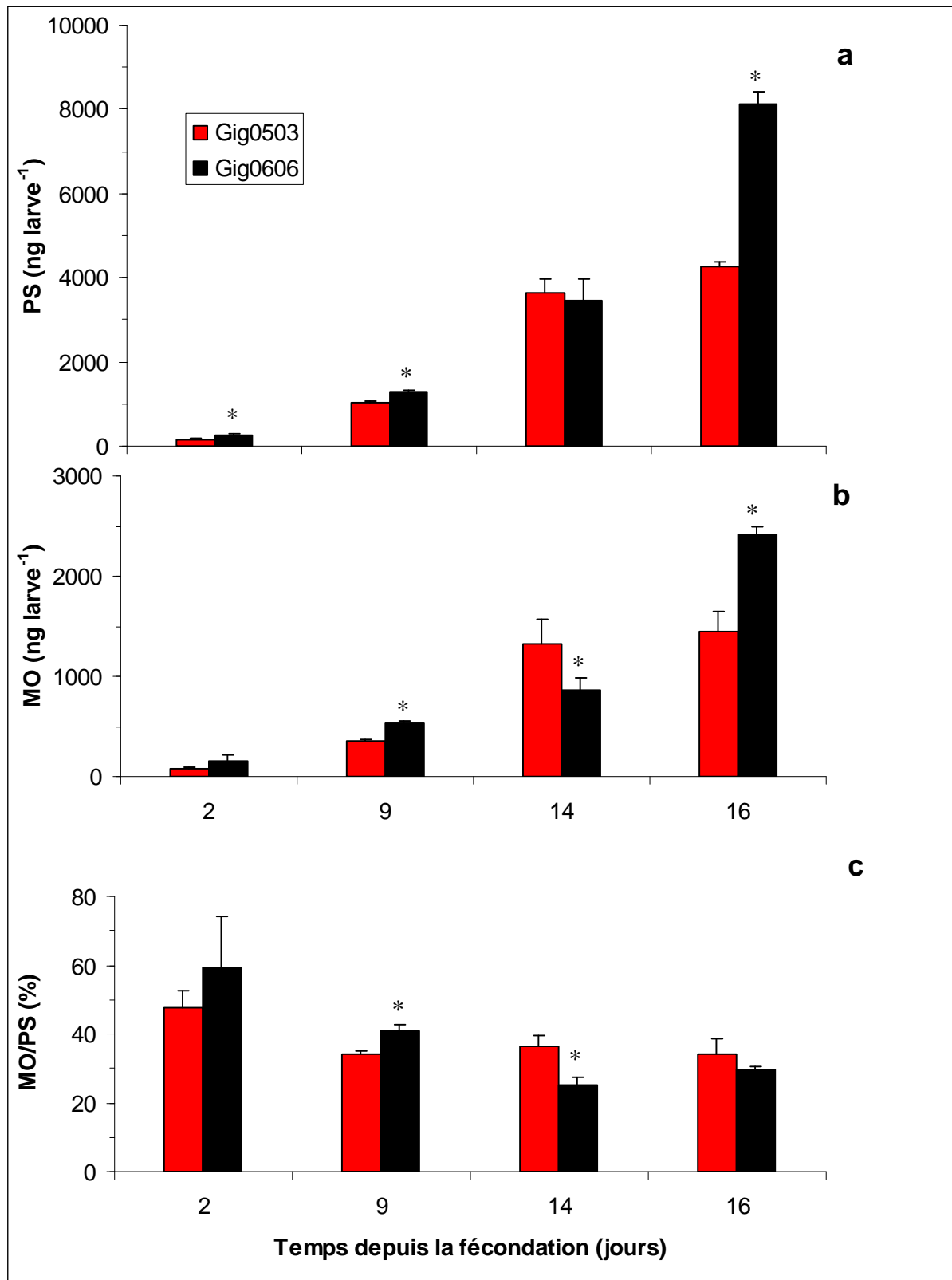


Figure 65 : évolution du poids sec (a), de la matière organique (b) et de la matière organique relative (c) au cours de deux élevages larvaires de *C. gigas* conduits en 2005 et 2006, selon les mêmes conditions zootechniques qu'en 2004. Les barres verticales représentent les écart-types (n=2). (\*) : indique une différence significative, au seuil de 5 %.



### 8.3.3. Indice biochimique structurel

L'évolution des triacylglycérols (TAG), des stérols (ST) ainsi que du rapport TAG/ST au cours du développement larvaire est représentée dans la figure 66. Les teneurs initiales des triacylglycérols (figure 66 a), relevées au second jour, présentent une différence significative entre les deux élevages ( $p = 0,0024$ ). Elles sont de  $2,1 \pm 0,1$  ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0503 et presque la moitié ( $1,2 \pm 0,0$  ng larve<sup>-1</sup>) pour Gig0606. Au delà, cette tendance se confirme puisque les larves issues de Gig0606 renferment des teneurs significativement plus élevées que celles de Gig0503. Ainsi, au neuvième jour, des quantités de  $8,5 \pm 0,3$  ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0503 et  $15,9 \pm 1,4$  ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0606 sont mentionnées ( $p = 0,0024$ ). Ceci conduit à des accroissements respectifs en triacylglycérols de 0,9 et 2,1 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pendant la première semaine. Au quatorzième jour, les larves issues de Gig0503 renferment une quantité 3,5 fois moins importante ( $50 \pm 8$  ng larve<sup>-1</sup>) que celles de Gig0606 ( $185 \pm 14$  ng larve<sup>-1</sup>) ( $p = 0,0015$ ). Juste avant la métamorphose (16<sup>e</sup> j), les écarts des teneurs en triacylglycérols sont très marqués (facteur de 4,8 ;  $p < 0,0001$ ). En effet, avec seulement  $92 \pm 16$  ng larve<sup>-1</sup> de triacylglycérols présents au seizième jour, les larves issues de Gig0503 présentent un taux d'accumulation global de 6,4 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> alors que celles de Gig0606, ayant une quantité finale de  $429 \pm 34$  ng larve<sup>-1</sup> sont caractérisées par un taux d'accroissement presque cinq fois plus élevé (30,6 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>).

Pour les stérols (figure 66 b), les seules différences significatives entre les deux élevages sont détectées au seizième jour ( $p = 0,0001$ ). Au second jour, des teneurs de  $0,4 \pm 0,0$  ng larve<sup>-1</sup> et  $0,3 \pm 0,0$  ng larve<sup>-1</sup> sont respectivement enregistrées pour Gig0503 et Gig0606 ( $p = 0,12$ ). Au neuvième jour, une légère accumulation est mise en évidence dans les deux élevages (2-2,3 ng larve<sup>-1</sup>;  $p = 0,10$ ), ce qui conduit à un accroissement en stérols de 0,2 et 0,3 ng larve<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Au quatorzième jour, les stérols sont présents avec une concentration de 9 ng larve<sup>-1</sup>. En revanche, au seizième jour, ce composé biochimique est quatre fois plus concentré chez les larves issues de Gig0606 ( $45 \pm$  ng larve<sup>-1</sup> vs  $11 \pm 4$  ng larve<sup>-1</sup> pour Gig0503). Ceci conduit à un taux d'accroissement global respectif de 0,8 et 3,2. Il est à noter que contrairement aux triacylglycérols dont les teneurs sont beaucoup plus concentrées chez les larves issues de Gig0606 aux neuvième et quatorzième jours, les stérols, eux, sont présents d'une façon statistiquement similaires.

Les valeurs du rapport TAG/ST (figure 66 c) sont comprises entre 6 et 10 pour Gig0503, avec un minimum de 4 enregistré au neuvième jour. En revanche, l'élevage Gig0606 se distingue par des fluctuations plus importantes, les valeurs évoluant entre 4 et 10 avec un

pic particulièrement élevé (20) au quatorzième jour. Les seules différences significatives sont détectées au neuvième ( $p = 0,0206$ ) et au quatorzième jour ( $p = 0,0048$ ). Rappelons que pendant cette période, les écarts entre les teneurs en triacylglycérols sont notables entre les deux élevages, celles-ci étant inexistantes pour les stérols. En fin de cycle larvaire ( $16^{\text{e}}$  j), le rapport se stabilise autour de la valeur de 10 ( $p = 0,88$ ) malgré les différences significatives entre les concentrations de ces deux composés biochimiques (facteur de 4 pour les stérols et 4,8 pour les triacylglycérols).

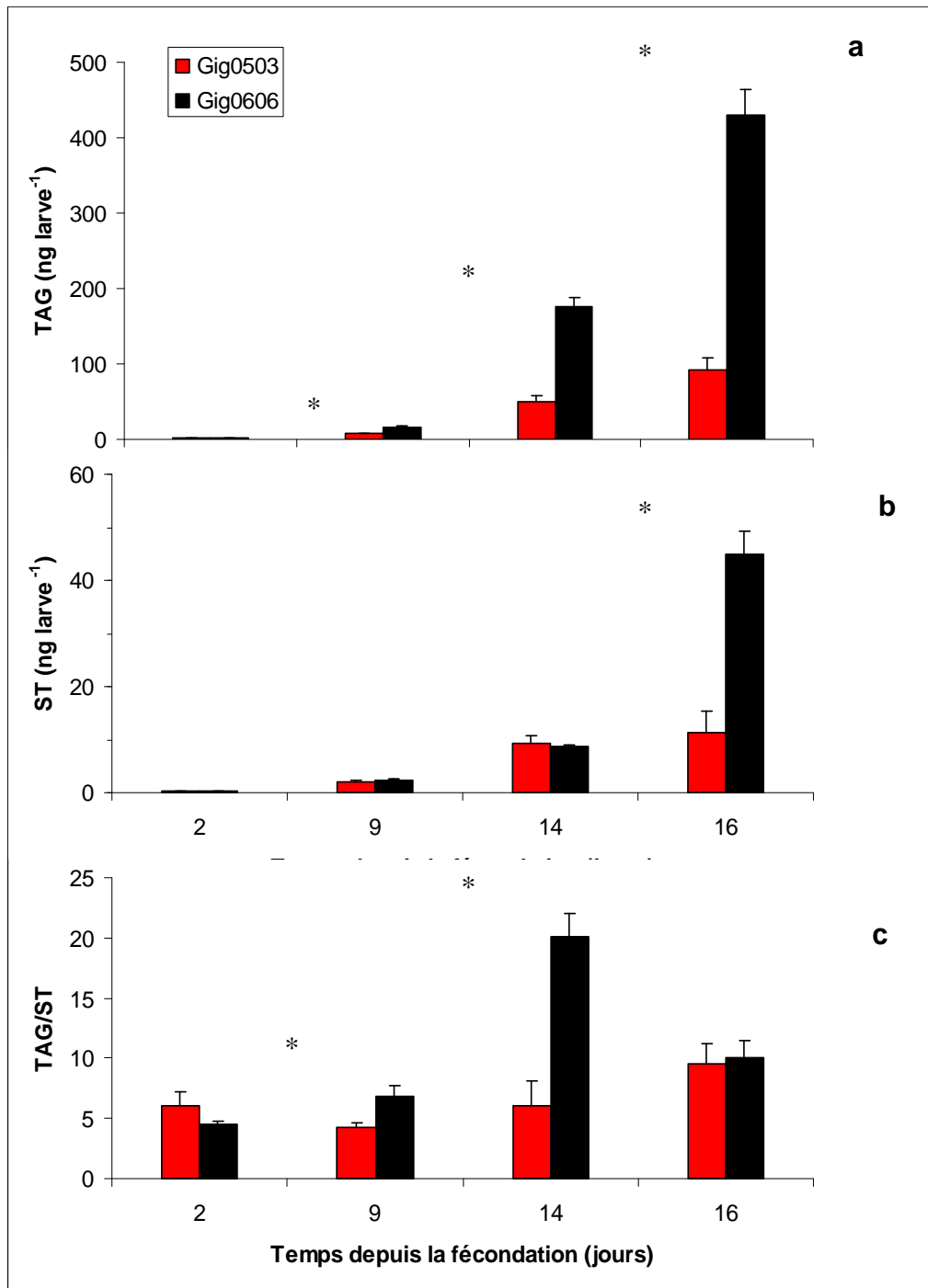


Figure 66 : évolution des triacylglycérols (a), des stérols (b) et du rapport TAG/ST (c) chez les larves de *C. gigas* élevées en 2005 et 2006, selon les mêmes conditions zootechniques qu'en 2004. Les barres verticales représentent les écart-types (n=2). (\*) : indique une différence significative, au seuil de 5 %.

#### 8.4. Discussion et conclusion

Dans un premier temps, la recherche d'éléments caractérisant l'état physiologique des larves conduites selon les mêmes conditions zootechniques a été opérée en se basant sur deux indices : MO/PS et TAG/ST ainsi que sur l'évolution quantitative de chaque composé au cours du développement larvaire. Il se dégage de cette étude que les performances des élevages larvaires, conduits en 2004, montrent une variabilité intra annuelle importantes malgré la standardisation des procédures zootechniques, depuis le conditionnement des géniteurs jusqu'à la métamorphose des larves. Ainsi, les six élevages réalisés peuvent être classés comme suit :

- élevages performants : Gig0404 et Gig0405, se caractérisant par une survie en fin d'élevage supérieure à 60 %, une aptitude à la métamorphose précoce (16 et 18<sup>e</sup> j respectivement) et des taux de compétence et de fixation supérieurs à 51 %,
- élevages satisfaisants : Gig0406 et Gig0408, avec une survie en fin d'élevage supérieure à 48 %, une aptitude à la métamorphose dès le dix-neuvième jour et des taux de compétence et de métamorphose supérieurs à 42 %,
- élevages médiocres : Gig0408 et Gig0409, le premier manifestant une mortalité brusque et massive au seizième jour et le deuxième montrant une survie très faible en fin d'élevage (29 %) permettant, toutefois, l'acquisition de la compétence dès le dix-neuvième jour (48 %) et un taux de métamorphose de seulement 28 %.

Ces écarts de performances, déjà cités à maintes reprises dans la littérature (Loosanoff et Davis, 1963 ; Delaunay *et al.*, 1992 ; Robert et Gérard, 1999), sont dus, en grande partie, à la variation de la qualité biologique de l'eau de mer, particulièrement aggravée en printemps et / ou en été, lors du réchauffement de la mer, coïncidant avec des périodes de floraisons phytoplanctoniques intenses et des intrants de vibrions, non négligeables, dans les systèmes d'élevage. L'importance d'une bonne qualité stable de l'eau de mer est tellement capitale que dans quelques années, il sera impossible de produire des larves D, d'une grande variété d'espèces de bivalves, dans l'eau de mer des écloséries et ce même à partir d'œufs de bonne qualité (Helm *et al.*, 2004).

Le suivi de la biomasse au cours du développement larvaire montre, quelle que soit l'expérimentation, une évolution quasi-similaire du poids sec et de la matière organique, généralement faible en début d'élevage et forte en fin du cycle. Un même phénomène est observé au niveau de la croissance linéaire, avec un taux de croissance beaucoup plus fort au cours de la deuxième semaine. Ainsi, le taux moyen de croissance, en première semaine, de

l'ensemble des élevages conduits en 2004 dans des conditions normées est égal à  $9,3 \pm 1,8 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$  tandis que celui de la deuxième semaine est de  $16,5 \pm 3,0 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ . En fin d'élevage, à l'approche de la métamorphose, un ralentissement de la croissance linéaire est noté, plus ou moins marqué selon l'élevage ( $10,8 \pm 4,0 \mu\text{m ind}^{-1} \text{j}^{-1}$ ). De telles observations ont été rapportées par Gerdes (1983), dans des conditions proches d'élevage chez les larves de *C. gigas* (25 °C, 50-100 cellules. $\mu\text{l}^{-1}$  d'*I. galbana* et *C. calcitrans*), qui mentionne des valeurs finales de poids sec d'environ 1850 ng larve<sup>-1</sup>, enregistrées au dix-neuvième jour chez des individus mesurant 321  $\mu\text{m}$ . Ces différences de taux de croissance pondérale et linéaire selon le stade larvaire sont la conséquence d'une activité de filtration discontinue dans le temps : les larves filtrent beaucoup plus activement durant la deuxième semaine d'élevage, quand elles atteignent une taille comprise entre 120 et 300  $\mu\text{m}$  (Gerdes, 1983 ; Rico-Villa *et al.*, 2006). A l'approche de la métamorphose, le taux de filtration diminue de nouveau, à cause de la perte de mobilité et du changement morphologique que subit les animaux à ce stade critique de leur vie. Cette tendance a également été signalée chez la même espèce par Nicolas (1999), avec cependant des valeurs de poids sec plus fortes, dues au tamisage sélectif des individus retenant ainsi "la tête de lot", et variables selon l'élevage : 11800 ng larve<sup>-1</sup> au dix-neuvième jour (premier élevage) et 8500 ng larve<sup>-1</sup> au vingt-et-unième jour (deuxième élevage) *vs* des valeurs comprises entre 4000 et 6400 ng larve<sup>-1</sup>, relevées dans le présent travail juste avant la métamorphose (16-19<sup>e</sup> j). Les teneurs en matière organique sont, quant à elles, comprises entre 800 et 2400 ng larve<sup>-1</sup>, durant le même laps de temps. Chez la même espèce, Nicolas (1999) a rapporté des valeurs plus élevées au cours de son premier élevage (4092 ng larve<sup>-1</sup> au 19<sup>e</sup> j) mais dans le même ordre de grandeur au cours de son deuxième élevage (1992 ng larve<sup>-1</sup> au 21<sup>e</sup> j).

Cependant, aucune relation ne peut être établie entre le poids sec ou la matière organique et les performances d'élevage larvaire. En effet, deux tendances opposées sont dégagées pour les deux élevages les plus performants Gig0405 et Gig0404. Si le premier se caractérise par des teneurs en poids sec et en matière organique significativement plus élevées vers la fin du développement larvaire (16-18<sup>e</sup> j), le deuxième montre des valeurs de poids sec comparables à celles notées pour les autres élevages et des teneurs en matière organique plus faibles. Il en est de même pour la teneur initiale absolue en matière organique des pédivéligères, relevée juste avant la métamorphose. En effet, pour des taux de métamorphose statistiquement comparables (42-51 %), la teneur en matière organique des larves pré métamorphiques varie du simple ( $800 \pm 14$  ng larve<sup>-1</sup> : Gig0404) au double ( $\approx 1500 \pm 30$  ng larve<sup>-1</sup> : Gig0408 et  $1900 \pm 61$  ng larve<sup>-1</sup> : Gig0409). De même, une forte teneur en matière

organique ( $1400 \pm 85$  ng larve<sup>-1</sup> : Gig0409) ne conduit pas à un fort taux de métamorphose (28 %).

En ce qui concerne l'indice de condition MO/PS (matière organique relative), nous avons montré que la matière organique représente 10 à 40 % ( $26,3 \pm 8,4$  %) du poids sec, tous élevages et âges confondus des larves. Chez la même espèce, Nicolas (1999) a rapporté un pourcentage de matière organique compris entre 19 et 35 % du poids sec. Nos résultats ont démontré, par ailleurs, une augmentation de cet indice au cours du développement larvaire, avec des valeurs comprises entre 10 et 28 % en fin de la première semaine et 21-38 %, juste avant la métamorphose. Ces données sont compatibles avec celles trouvées dans la littérature. Ainsi, en condition pré métamorphique, des taux de 30 à 40 % ont été rapportés chez la même espèce (Laing et Earl, 1998). Des valeurs de 19-20 % en première semaine et 21-35 % en deuxième et troisième semaines ont été relevées par Nicolas (1999). En milieu naturel, et toujours chez la même espèce, His et Maurer (1988) ont rapporté des valeurs de 15-20 % en première semaine et 20-30 % ultérieurement. Chez les larves de *Mytilus edulis*, Lucas *et al.* (1986) ont également noté une augmentation de cet indice juste avant la métamorphose, après une diminution initiale brusque et soutenue au début du cycle, suggérant ainsi que l'augmentation pré métamorphique de la matière organique relative est un bon indicateur de compétence à la métamorphose et que cette dernière ne peut avoir lieu, chez cette espèce, qu'après une augmentation des valeurs à 45-50 % à 20 °C. Chez les larves d'*Ostrea edulis*, des valeurs plus faibles ont été enregistrées mais augmentent de 18 à 26,5 % juste avant la métamorphose (Holland et Spencer, 1983). Cet accroissement pré métamorphique s'explique, d'une part, par un développement relatif plus important de la matière organique et, d'autre part, par une moindre croissance pondérale de la coquille en deuxième partie du cycle larvaire (matière inorganique), notamment à l'approche de la métamorphose. Ainsi, chez *M. edulis*, Lucas *et al.* (1986) ont montré qu'il y a une augmentation brusque de la teneur absolue de matière organique, quelques jours avant la métamorphose, tandis que le taux de croissance coquillière reste stable. Cette période qui précède la métamorphose se caractérise donc, en général, par une production différentielle de chair par rapport à la coquille. Cependant, aucune relation claire ne se dégage entre l'évolution de ce rapport et les performances d'élevage puisque l'élevage le plus performant (Gig0405) en terme de compétence (83 %) et de métamorphose (89 %) est associé à un rapport métamorphique de MO/PS (38 %) statistiquement comparable à celui noté pour les autres élevages. De plus, l'élevage le moins performant (28 % de métamorphose : Gig0409) n'est pas forcément relié au rapport le plus faible (30 %). Les valeurs les plus basses ont été justement détectées chez Gig0404 (21 % en

fin d'élevage), celui-ci ayant généré, pourtant, des taux de compétence (51 %) et de métamorphose (51 %) satisfaisants.

Concernant l'étude biochimique des triacylglycérols et des stérols, une tendance quasi-similaire au cours du développement larvaire est notée. A l'instar de la croissance linéaire et pondérale, l'accumulation de ces deux composés biochimiques est faible au début du cycle larvaire. Au second jour, les teneurs en triacylglycérols ne dépassent pas 2 ng larve<sup>-1</sup>, alors que pour les stérols, les concentrations sont comprises entre seulement 0,2 et 0,6 ng larve<sup>-1</sup>. A partir des septième neuvième jours, l'accroissement devient plus marqué. Des quantités finales comprises entre 100 et 160 ng larve<sup>-1</sup> pour les triacylglycérols et 16-24 ng larve<sup>-1</sup> pour les stérols sont obtenues. Ceci prouve que l'influence de la nourriture ne se traduit au niveau des réserves lipidiques qu'à partir du septième jour et que l'accumulation de ces réserves ne peut avoir lieu qu'après cinq jours environ de la première prise de nourriture, bien que les larves soient capables d'ingérer les microalgues à partir du stade D (Lucas et Rangel, 1983). Delaunay *et al.* (1992) ont rapporté que chez *Pecten maximus*, les triacylglycérols commencent à s'accumuler trois jours après la première prise de nourriture. Selon ces auteurs, un accroissement continu en triacylglycérols ainsi qu'une transition de quelques jours entre les phases endogène et exogène reflètent l'efficacité d'assimilation des microalgues ingérées ainsi qu'un bon développement larvaire. Dans la présente étude, des résultats contradictoires sont relevés puisque les triacylglycérols s'accroissent selon le même rythme que ce soit pour les élevages performants ou médiocres, et de ce fait, aucune relation directe entre l'évolution ni les teneurs en triacylglycérols et / ou en stérols et les performances du développement ne peut être mise en avant. Nous avons constaté, néanmoins, que la teneur en triacylglycérols, mesurée le jour du passage des larves compétentes en métamorphose, est comprise entre 96 et 163 ng larve<sup>-1</sup>, mais nos expérimentations ne nous permettent pas de dégager une valeur seuil, nécessaire à l'acquisition de la compétence. Gallager *et al.* (1986) ont suggéré, quant à eux, qu'une valeur minimale de 21 ng de triacylglycérols, correspondant à 48 % du niveau initial, est nécessaire à l'accomplissement de la métamorphose chez *C. virginica*. Cependant, ils ont également conclu qu'une teneur lipidique élevée est nécessaire mais ne garantit pas systématiquement le succès à la métamorphose.

Le rapport physiologique TAG/ST présente des fluctuations asynchrones au cours du développement larvaire. Des tendances globales ont pu être, cependant, dégagées. La diminution systématique enregistrée aux cinquième sixième jours indique probablement l'utilisation d'une partie des réserves vitellines pour la synthèse des stérols (membranes et tissus). Le pic détecté vers les septième neuvième jours, montre une phase d'accumulation des

réserves, de nature exogène, coïncidant avec le début de l'accroissement notable des triacylglycérols. Ceci marque la transition de la phase endogène à la phase exogène. Enfin, la tendance de ce rapport à décroître en fin de cycle larvaire met en évidence le début de la mobilisation des réserves accumulées, par le processus métamorphique, qui se met progressivement en place. Chez le pétoncle géant, cette tendance à la baisse témoigne de la présence de conditions stressantes dans le milieu et des individus en mauvaise qualité physiologique (Fraser, 1989 ; Pernet *et al.*, 2008). A l'opposé, un rapport élevé indique une bonne qualité en terme de survie seulement puisque les individus n'ont jamais atteint la métamorphose (Pernet *et al.*, 2008). Dans la présente étude, il est difficile de dégager une corrélation nette entre performances de développement larvaire et valeurs de TAG/ST. Par exemple, pour les deux élevages les plus performants, Gig0404 et Gig0405, les valeurs de TAG/ST enregistrées chez les larves D sont respectivement de 5 et 4 alors qu'elles sont de 8 et 8 respectivement pour Gig0408 et Gig0409 considérés comme élevages médiocres. Ces résultats confirment ceux de Gallagher et Mann (1986) sur le fait qu'une corrélation existe entre contenu lipidique initial de l'ovocyte chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria* et le rendement de larves D mais pas avec la croissance ultérieure des individus. Il en est de même au neuvième jour, par exemple, où l'élevage moyen Gig0408 montre la valeur la plus élevée du rapport (13) tandis que les deux élevages les plus performants sont associés à une valeur de 8. Un rapport peu différent (8) est noté chez les élevages médiocres. Enfin et excepté l'élevage Gig0406 associé à un rapport de 4, les autres lots montrent des valeurs voisines, comprises entre 6 et 8 malgré des taux de compétence et de métamorphose différents. Delaunay *et al.* (1992) ont signalé qu'un rapport TAG/lipides totaux relevé au second jour chez les larves de *Pecten maximus* n'est pas relié à la croissance, contrairement à des valeurs basses enregistrées ultérieurement (10 %) qui semblent être corrélées à un faible développement. Cependant, un faible rapport initial TAG/MO semble être associé à une faible croissance mais la relation inverse n'est pas vraie, c'est à dire un rapport fort ne traduit pas forcément une bonne croissance (Delaunay *et al.*, 1992). Ces auteurs ont alors mis en valeur l'influence des facteurs environnementaux et génétiques sur la qualité des ovocytes lors de la maturation. Pernet *et al.* (2003), quant à eux, ont démontré l'existence d'une relation positive entre la taille des larves de *Placopecten magellanicus* au huitième jour et la qualité larvaire mesurée au vingtième jour par le rapport TAG/ST. De même, une relation positive entre le taux de compétence et la valeur TAG/ST enregistrée au huitième jour est mise en avant. Paradoxalement, ces mêmes auteurs ont mis en évidence une relation négative entre la valeur de ce rapport au vingt-huitième jour et le succès de la métamorphose : plus ce rapport est fort et plus le taux de fixation est faible. Ainsi, selon ces auteurs, ces larves vont retarder leur

métamorphose dans le but de sélectionner un bon substrat. A l'inverse, un faible rapport, et donc des réserves énergétiques déficientes, incite les larves à se fixer rapidement. Les différences de résultats entre nos travaux et ceux des auteurs ci-dessus cités résident probablement dans le choix de l'espèce. Il est probable que les processus métaboliques soient différents d'une espèce à l'autre. Par ailleurs, Pernet *et al.* (2003) ont basé leurs expérimentations sur trois régimes alimentaires différents alors que, dans la première partie du présent travail, les élevages ont été conduits selon des conditions zootechniques similaires. Par conséquent, et malgré les écarts de performances, le rapport TAG/ST n'est pas assez puissant pour refléter ces divergences, ce qui a conduit à la mise en place d'expérimentations ciblées.



**Conclusion générale  
et perspectives**



### 9. Conclusion générale et perspectives

#### 9.1. Rappel de la problématique

Les objectifs de cette thèse étaient de déterminer des indices prédictifs de développement larvaire et / ou de succès à la métamorphose chez *Crassostrea gigas*. Nos efforts ont été axés sur les réserves lipidiques vue l'importance énergétique de ce composé dans la vie des organismes marins en général et chez les bivalves en particulier (Holland, 1988 ; Gallagher *et al.* 1986 ; Castell et Mann, 1994 ; Soudant, 1995 ; Robert *et al.* 1999 ; Pernet, 2003). Une phase préliminaire a donc été nécessaire pour la détermination d'une méthode pertinente et reproductible afin de mettre en évidence et quantifier les réserves lipidiques chez les larves de *C. gigas*. Ainsi, les premiers essais de coloration lipidique au moyen de l'Oil Red O se sont révélés médiocres. La méthode a donc été substituée par une autre technique utilisant le Nile Red, colorant fluorescent très spécifique des lipides neutres. Afin de corroborer cette approche colorimétrique, une étude biochimique a été effectuée parallèlement. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'évolution des teneurs des triacylglycérols et stérols au cours du cycle larvaire. Les données bibliographiques concordent, en effet, sur la majeure implication de ces lipides neutres, notamment les triacylglycérols, dans le développement larvaire des bivalves (Waldock et Nascimento, 1989; Gallagher *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1988; Pernet 2003). Enfin, le troisième "indicateur" validé dans ce travail est l'indice de condition larvaire MO / PS. Celui-ci a été décrit comme un bon référentiel de la compétence larvaire chez la moule *Mytilus edulis* (Lucas *et al.*, 1986) et le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1988) alors qu'une faible corrélation entre ce paramètre et la métamorphose était dégagée chez *Pecten maximus* (Robert *et al.*, 1999).

#### 9.2. Avancées biologiques et écophysiological

Dans le cadre des élevages conduits selon les mêmes procédures zootechniques standard, des écarts de performances ont été relevés, laissant supposer l'interférence de la qualité biologique de l'eau de mer dans ce phénomène. En effet, des éléments dissous peuvent être introduits dans le système malgré une filtration routinière fine de l'eau de mer (filtres installés en cascade 5 et 1  $\mu\text{m}$ ). La filtration à elle seule peut être insuffisante à certaines périodes délicates de l'année, notamment en été, lors des élévations thermiques, propices au

## Conclusion générale

---

développement bactérien, favorisé dans notre cas par la présence d'un vivier, servant de réserve d'eau, dont le renouvellement quotidien n'est que partiel. Une introduction de bactéries, en particulier de genre *Vibrio*, peut ainsi affecter les élevages. Des précautions supplémentaires devraient être prises à ce niveau, comme par exemple un traitement de l'eau de mer sous ultra violet et / ou utilisation d'une filtration plus fine (0,2  $\mu\text{m}$ ).

La température et la nourriture sont deux paramètres interdépendants et essentiels pour le développement larvaire de *C. gigas*. En effet, l'augmentation de la température provoque l'accroissement des besoins énergétiques des animaux qu'il faut alors compenser par un apport nutritionnel proportionnel. De manière similaire, une augmentation de la ration alimentaire doit être accompagnée par une élévation thermique sans laquelle une limitation du développement larvaire peut être engendrée à cause d'une surcharge nutritionnelle. Dans le présent travail, l'influence de chacun de ces paramètres a été étudiée mais pas de façon combinée. L'étude de la variation du régime thermique montre qu'à 18°C, le cycle larvaire est allongé à 23 jours vs 18-19 jours pour un cycle standard (24°C) suite à un ralentissement de la croissance (8  $\mu\text{m j}^{-1}$  vs 12-13  $\mu\text{m j}^{-1}$  chez les lots conduits selon la norme standard). Cette baisse d'activité physiologique est couplée à une forte mise en réserve lipidique, démontrée aussi bien par l'approche colorimétrique (19-29 % de surface lipidique) que l'analyse biochimique (TAG en fin d'élevage : 91-135 ng larve<sup>-1</sup>). A l'inverse, à 32°C, la durée du cycle larvaire ainsi que le développement des individus sont comparables à ceux élevés selon la procédure standard (18 j et 11  $\mu\text{m j}^{-1}$ , respectivement) par contre une amélioration sensible de la métamorphose est notée (91 %). De point de vue réserves lipidiques, une forte consommation a été mise en évidence. Les surfaces lipidiques relevées tout au long du développement larvaire sont comprises entre 5 et 16 %. Les teneurs en triacylglycérols enregistrées en fin d'élevage larvaire varient de 50 à 82 ng larve<sup>-1</sup>.

Concernant la variation de la charge phytoplanctonique apportée, notre étude montre que les larves sous alimentées présentent un cycle pélagique plus long (25 j) conjointement à un moindre développement des animaux (9  $\mu\text{m j}^{-1}$ ) par rapport à ceux soumis à une ration de référence. Les réserves lipidiques quantifiées par l'approche colorimétrique sont comprises entre seulement 1 et 11 %. De manière similaire, les teneurs en triacylglycérols relevées en fin de développement larvaire sont situées entre 22 et 33 ng larve<sup>-1</sup>. A l'inverse, une forte charge algale engendre un raccourcissement de la vie planctonique (16 j) et un développement larvaire notable (18  $\mu\text{m j}^{-1}$ ). Les larves soumises sous ce régime riche en phytoplancton montrent des réserves lipidiques nettement plus importantes. Leurs surfaces lipidiques sont comprises entre

18 et 31 % et les proportions en triacylglycérols varient de 219 à 268 ng larve<sup>-1</sup> en fin d'élevage.

Le choix des aliments apportés aux larves est également un élément essentiel pour un développement larvaire optimisé. Ainsi, notre étude met en avant la faible valeur alimentaire de *Pavlova lutheri* (P), *Isochrysis affinis galbana* (T) ainsi que leur association (PT). Ces régimes engendrent un faible développement larvaire et une inaptitude des individus à la métamorphose (jusqu'au 18<sup>e</sup> j). Les larves analysées présentent une déficience des réserves lipidiques soit au cours de la première semaine (T), soit au cours de la deuxième semaine (PT) soit les deux (P). A l'inverse les mélanges TCp et PTCp ainsi qu'une ration monospécifique Cp autorisent une bonne croissance ainsi que des taux de compétence et de métamorphose élevés. Les réserves lipidiques sont soit quasi-constantes soit consommées progressivement, de façon modérée. Ces résultats montrent clairement l'effet bénéfique de cette petite diatomée (Cp) par rapport aux deux prymnésiofycées (P et T). Elle présente, en effet, la particularité d'être riche en EPA (25 %) vs 0,4 % chez *I. aff. galbana* (Robert *et al.*, 2004). Par contre, malgré un taux d'EPA comparable (24 %) et une proportion relativement élevée en DHA (8 %) (Robert *et al.*, 2004), *P. lutheri* engendre de mauvaises performances du développement larvaire, laissant suggérer l'implication d'autres paramètres mesurés ou non, telle que la digestibilité du phytoplancton. On peut, peut être, invoquer une déficience alimentaire mettant alors clairement en avant l'insuffisance de critères biochimiques retenus actuellement à savoir les seuls besoins essentiels en EPA et DHA.

Ensuite, si le flux ouvert permet d'améliorer sensiblement les performances d'élevage larvaire, la production phytoplanctonique en continu montre des résultats éloignés de ceux escomptés. En effet, en ce qui concerne *Chaetoceros gracilis*, les mauvais résultats obtenus sont liés à une méconnaissance des besoins écophysiological de cette espèce en termes de lumière, température et nutriment. Par contre, pour *I. aff. galbana*, qui est considérée comme une algue facile à produire, une source de contamination bactérienne (la réserve d'eau) a sensiblement affecté les élevages même ceux conduits en flux ouvert, système où normalement un lessivage des *vibrios* aurait dû se produire.

Des améliorations doivent être donc apportées à ce système de production phytoplanctonique, qui constitue une voie prometteuse pour l'avenir. En effet, le système adapté pour la présente étude a servi pour la production de la diatomée ainsi que du flagellé. En dehors de la lumière, seul paramètre sur lequel on pouvait intervenir par réglage du nombre des tubes néon disposés, globalement, les paramètres étaient sensiblement les mêmes. Il est donc nécessaire d'adopter un système qui prend en compte les besoins de chacune des

microalgues. De plus, une meilleure gestion sanitaire s'impose en supprimant la réserve d'eau alimentant les photobioréacteurs puisqu'elle constitue une source de prolifération bactérienne. Il faudra la remplacer par une arrivée continue d'eau de mer stérile (filtrée et traitée par ultraviolet ou pasteurisée) couplée à une injection directe des sels nutritifs.

### 9.3. Les indices de qualité

Concernant le rapport MO / PS, nous avons montré que dans des conditions standardisées, la matière organique représente 10 à 40 % du poids sec, tous élevages et âges des larves de *C. gigas* confondus. Cet intervalle est cohérent par rapport à ce qui a été signalé chez les larves de bivalves dans les travaux précédents (Lucas *et al.*, 1986 ; His et Maurer, 1988 ; Laing et Earl, 1998 ; Nicolas, 1999). Cependant, il est impossible, d'une part, d'établir une relation directe entre l'évolution de ce rapport et les performances d'élevage larvaire. D'autre part, son évolution au cours du temps est irrégulière. En effet, deux réponses contradictoires ont été obtenues au cours de ce travail, rendant ainsi difficile l'interprétation des résultats. Dans le cadre des élevages standardisés, une quasi-stabilité des valeurs est relevée au cours du développement larvaire avec une tendance à la hausse juste avant la métamorphose alors qu'un effondrement du rapport est noté lors des expérimentations ultérieures. Bien appliquée chez les adultes et les juvéniles, cette technique devient contraignante chez les larves. Outre la nécessité de prélever un très grand nombre d'individus (100 000 à 2 millions de larves pour les stades compris entre les 2<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> j et 10 000 individus à partir du 9<sup>e</sup> j), le risque d'erreur impliqué par la manipulation d'un si petit matériel biologique est important. De plus, un piégeage probable de sels minéraux peut en résulter malgré le rinçage préalable au formiate d'ammonium. Finalement l'impossibilité de séparer la coquille de la chair pourrait être une source supplémentaire d'erreurs puisque la matière organique de la coquille est ainsi prise en compte. A ce propos, Walne et Millican (1988) ont démontré que, chez le naissain de *C. gigas*, la coquille renferme 3 à 5,2 % de matière organique et que vue l'importance en poids de celle-ci, cette fraction organique représente 35 à 59 % de la matière organique totale de l'animal. De plus, selon Rainer et Mann (1992), un indice de condition fiable doit comporter un numérateur sensible et fluctuant par rapport à un dénominateur stable et stationnaire. Or, chez *C. gigas*, aussi bien la matière organique que le poids sec constituent deux paramètres fortement variables au cours du cycle larvaire.

Concernant le rapport TAG / ST, aucune relation directe n'a pu être établie avec les performances du développement larvaire dans le cadre des élevages standardisés et l'expérimentation traitant de la variation du facteur thermique. Cependant, ce ratio est sensible aux variations de la disponibilité de nourriture. Ainsi, les larves suralimentées montrent les valeurs les plus élevées (6 à 9). A l'inverse, une insuffisance alimentaire se traduit par de faibles valeurs (2 et 3). Les larves soumises à un jeûne temporaire montrent des rapports quasi-nuls à l'issue du traitement, mais récupèrent dès qu'elles sont à nouveau nourries. Ce rapport renseigne, comme l'ont suggéré Farias *et al.* (2003), plutôt sur l'état nutritionnel des individus que sur l'état physiologique. Il a été démontré qu'un rapport inférieur à 0,2 indique une carence alimentaire sévère chez les larves d'anchois *Engraulis mordax*, engendrant ainsi des effets négatifs irréversibles (Hakanson, 1989 b).

L'évolution de l'indice lipidique global mis au point par l'approche colorimétrique s'est avéré globalement cohérente et corrobore les résultats de l'analyse biochimique. De plus, la technique employée est simple, rapide à mettre en place et peu coûteuse en matériel biologique. Les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse laissent envisager que l'utilisation de cette méthode est un bon moyen d'appréhender l'évolution des réserves lipidiques et leur gestion au cours du temps. Elle présente, néanmoins des limites, en terme d'application. En effet, cette technique nécessite un appareillage particulièrement adapté. D'une part, un réglage microscopique fin et reproductible (filtres, grossissement, lumière, etc.) doit être mis en place. D'autre part, un réglage minutieux des paramètres de la caméra couleur (gain, exposition, saturation des couleurs, etc.) doit être fixé au préalable pour une acquisition uniforme d'images. Cette constance des paramètres d'acquisition est primordiale pour un traitement ultérieur des photographies acquises. Il convient de signaler également un autre biais pouvant résulter de l'aspect des larves de très mauvaises qualités. En effet, nous avons vu au cours du sixième chapitre, que les larves alimentées par du phytoplancton produit en continu présentaient une surface lipidique de couleur inhabituelle jaune orange vif. La teneur lipidique déterminée chez ces larves est particulièrement élevée (39-49 %). Dans ce cas précis, la forte proportion lipidique relevée n'est pas indicatrice de bon état des larves, bien au contraire ces larves sont caractérisées par un développement médiocre et affectées par des mortalités massives. Les larves analysées sont probablement mortes récemment ou moribondes. En effet, la présence d'une teneur élevée en acides gras libres dans les tissus (> 10 %) témoigne de la présence d'une forte mortalité larvaire chez *Placopecten magellanicus* et indique généralement une dégradation lipidique et une modification des teneurs en triacylglycérols et stérols (Pernet *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est difficile de dégager une relation entre les valeurs pré-métamorphiques de cet indice et les taux de métamorphose. Notre

étude a montré que des taux de métamorphose élevés sont obtenus chez des larves présentant des valeurs faibles de cet indice juste avant la métamorphose. Inversement, des taux de métamorphose faibles sont enregistrés malgré une surface lipidique importante. Chez *Placopecten magellanicus*, il a été démontré que le succès de fixation est indépendant de la teneur en triacylglycérols et que la réponse des animaux vis-à-vis des niveaux différents en triacylglycérols serait en interaction avec les facteurs de l'environnement (Pernet *et al.*, 2003). Il est également intéressant de signaler que sur le plan biologique, la littérature rapporte deux éléments visant à un épuisement progressif des réserves lipidiques de la pédivéligère à la post larve. D'un côté la larve compétente, préalablement à la métamorphose, doit chercher un substrat de fixation par reptation au fond des structures d'élevage et pour ce faire elle doit réduire sa flottabilité par consommation de ses réserves lipidiques (Holland, 1988). De l'autre ses réserves doivent lui assurer les besoins énergétiques au cours de la métamorphose, durant laquelle la larve est supposée être incapable de s'alimenter du fait de l'expulsion de son vélum et la non fonctionnalité de ses branchies. Si chez *Pecten maximus*, cette dernière hypothèse a été clairement établie (Dwiono, 1992 ; Robert *et al.*, 1999 ; Nicolas et Robert, 2001), chez l'huître creuse il est probable que cette phase soit très rapide, la baisse de consommation n'étant enregistrée que pendant vingt-quatre heures (Rico-Villa *et al.*, 2006). De même, selon Baker et Mann (1994), cette incapacité de s'alimenter ne dure que quelques heures chez *C. virginica*.

Enfin, la visualisation microscopique de la surface larvaire en trois dimensions semble être une alternative intéressante et mérite d'être signalée comme perspective. Des observations au microscope confocal en trois dimensions de larves colorées au Nile Red ont pu être réalisées à titre prospectif. Cette méthode a permis de visualiser l'ensemble de l'animal par balayage laser. Une meilleure appréhension des réserves lipidiques pourrait en découler puisque cette technique tridimensionnelle est un moyen d'observation et d'analyse plus précis, tenant en compte la répartition des éléments dans les trois dimensions de l'espace alors qu'en microscopie classique, seul un plan de coupe de l'objet est analysé. Un nouvel indice lipidique global pourrait ainsi être mis au point comme étant le rapport d'un volume de l'image occupée par les lipides sur le volume total de l'individu.

D'autre part, notre étude a montré que les larves de *C. gigas* présentent une activité endotrophique prononcée. En effet, les larves commencent à ingérer les particules phytoplanctoniques dès le stade D (10 000 – 15 000 cellules  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Malgré cette capacité précoce d'ingestion et de digestion (Lucas et Rangel, 1983), les animaux continuent à puiser dans leurs réserves endogènes. Les teneurs lipidiques très faibles relevées au cours de la



première semaine d'élevage témoignent de cette endotrophie marquée. En effet, les proportions en triacylglycérols enregistrées au septième jour sont comprises entre seulement 3 et 14 ng larve<sup>-1</sup> chez les larves élevées selon la procédure standard. Ensuite, ce n'est qu'au cours de la deuxième semaine et si de bonnes conditions sont réunies qu'une accélération du métabolisme larvaire est notée. Une forte accumulation lipidique est alors mise en place et les teneurs en triacylglycérols peuvent atteindre entre 96 et 163 ng larve<sup>-1</sup>, juste avant la métamorphose. Deux hypothèses peuvent alors être émises quant à cette incapacité de stockage lipidique au cours de la première semaine : soit un besoin vital de dépenser leur stock lipidique endogène avant de pouvoir ré accumuler de nouvelles réserves exogènes, soit un système enzymatique déficient capable de lipolyse mais pas de liposynthèse. Cette dernière semble être plus pertinente dans la mesure où un phénomène similaire a été signalé chez les larves de poisson (ex : *Solea senegalensis* : Fehri-Bedoui *et al.*, 2000). Chez cette espèce, il a été rapporté que le stockage des réserves lipidiques n'est observé qu'au huitième jour bien que les fonctions de digestion et d'absorption soient déjà assurées par le tube digestif. Afin de conforter ou non cette hypothèse, des dosages enzymatiques spécifiques devraient être effectués au cours de ce développement précoce chez les larves de *C. gigas*.

Par ailleurs, les expérimentations relatives au jeûne temporaire montrent que le traitement imposé à l'issue de la première semaine (J6J10) semble être délicat. En effet, cette période coïncide, comme on l'a déjà signalée, au passage de la phase endotrophe à la phase strictement exotrophe. Pour surmonter cette épreuve, il semble que la larve doit se munir de réserves lipidiques conséquentes, sans lesquelles des répercussions négatives irréversibles en résultent. Chez *P. maximus*, il a été rapporté que si le relais nutritionnel n'est pas correctement réalisé, la croissance sera altérée (Delaunay, 1992). La survie à la compétence chez *P. magellanicus* serait même en partie expliquée par une efficacité de récupération des réserves énergétiques à l'issue de l'embryogenèse, située plus particulièrement au huitième jour (Pernet, 2003). En outre, la capacité des larves à passer ce cap du relais nutritionnel peut être affectée par des facteurs strictement endogènes et / ou environnementaux liés aux paramètres d'élevage (Delaunay, 1992). En dehors de cette période charnière, cette espèce s'est révélée particulièrement résistante vis-à-vis d'un jeûne temporaire (4 j ici) et adopte des stratégies d'économie d'énergie (ralentissement voire arrêt de la croissance linéaire et pondérale, cessation de la nage et cantonnement dans les fonds des bacs) dès qu'elle est confrontée à une absence de nourriture. A l'issue du traitement, les jeunes larves épuisent intégralement leurs réserves lipidiques alors qu'aux stades plus avancés (à partir du 10<sup>e</sup> j) le catabolisme des lipides n'est que partiel. Quel que soit le cas, les individus montrent une grande capacité de restauration dès le rétablissement de bonnes conditions environnementales, en l'occurrence

nutritionnelle. Un retour à l'état physiologique initial est alors constaté. Cette utilisation des réserves lipidiques suite au jeûne souligne clairement le rôle fondamental de ce composé biochimique comme source d'énergie, lors des périodes de stress environnemental, comme signalé par plusieurs auteurs (Holland, 1988 ; Lucas, 1982 ; Gallagher et Mann, 1986 ; Gallagher *et al.*, 1986 ; Dwiono *et al.*, 1991). Cependant, l'ensemble des expérimentations réalisées au cours de ce travail montre que la teneur lipidique des animaux n'explique pas à elle seule les performances larvaires. Une déficience lipidique se traduit par un développement médiocre mais de fortes proportions ne garantissent pas systématiquement le bon déroulement de l'élevage. Cette relation à sens unique a été rencontrée chez plusieurs larves de bivalves (Gallagher *et al.*, 1986 ; Pernet, 2003). Elle met en avant, d'une part, l'existence d'un seuil lipidique critique pour assurer les différents besoins énergétiques vitaux et, d'autre part, le nécessaire équilibre entre les différents composés biochimiques (lipides, protéines et sucres) en interaction avec les facteurs de l'environnement.

Enfin, pour conclure ce travail, nous proposons, de cibler l'étude des indices de qualité sur les stades larvaires critiques, à savoir les phases du relais nutritionnel (à l'issue de la première semaine) et juste avant la métamorphose. Pour cette dernière, il serait judicieux d'homogénéiser les populations par tamisage sélectif selon différentes classes de taille de larves compétentes afin de mieux appréhender les critères d'aptitude à la métamorphose.

## **Références bibliographiques**



## 10. Références bibliographique

Agreste, 2003. AGRESTE Primeur, premier recensement de la conchyliculture, 126 : 4 pp.

Auby I., Maurer D., Masson N., Durand N. Sautour B., Taris N., D'Amico F., Guillard F., Guéguen C., Trut G., Cantin C. & Pellier C. (2002). Étude sur la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon- Année 2001- RST. DEL/02.03/Arcachon : 160 pp + annexes.

Baker S.M. & Mann R., 1994. Description of metamorphic phases in the oyster *Crassostrea virginica* and effects of hypoxia on metamorphosis. Marine Ecology Progress Series 104 (1-2) : 91-99.

Baker S.M. & Mann R., 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1891) and the effects of hypoxia on postsettlement ingestion rates. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 181 (2) : 239-253.

Bayne B.L., 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. In The Mollusca. Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M. & Tompa, A.S., eds. Vol. 3, Development. New York, Academic Press : 299-343.

Bligh E.G. & Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 38 : 911-918.

Bochenek E.A., Klinck J.M., Powell E.N. & Hofmann E.E., 2001. A biochemically-based model of the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae. Journal of Shellfish Research 20 (1) : 243-265.

Bodoy A., Prou J. & Berthomé J.P., 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Haliotis, 15 : 183-182.

Bougaran G., Le Dean L., Lukomska E., Kaas R. & Baron R., 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti*. Aquatic Living Resources 16 (4) : 389-394.

Brown W.J., Sullivan T.R. & Greenspan P., 1992. Nile Red staining of lysosomal phospholipid inclusions. Histochemistry 98 (4) : 349-354.

- Brown M.R., Dunstan G.A., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Barrett S.M. & Leroi J.M., 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp (clone T-ISO). *Journal of Phycology* 29 (5) : 601-612.
- Brown M.R., Jeffrey S.W., Volkman J.K. & Dunstan G.A., 1998. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151 (1-4) : 315-331.
- Brown M.R. & McCausland M.A., 2000. Increasing the growth of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal and dried diets. *Aquaculture Research* 31 (8-9) : 681-682.
- Brown M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown M. & Robert R., 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 208 (3-4) : 289-309.
- Castell L.L. & Mann R., 1994. Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. *Aquaculture* 119 (1) : 89-100.
- Coon S.L., Fitt W.K. & Bonar D.B., 1990. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 106 (3) : 389-388.
- Crockett, E.L., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist*, 38 : 291-304.
- Dekshenieks M.M., Hofmann E.E. & Powell E.N., 1993. Environmental effects on the growth and development of eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1891), larvae : a modeling study. *Journal of Shellfish research*, 12 (2) : 241-254.
- Delaunay F., 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. *Océanologie Biologique*. Thèse de Doctorat de l'Université de Brest : 192 pp.
- Delaunay F., Marty Y., Moal J., & Samain J.F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 163 (2) : 209-219.

- Delaunay F., Marty Y., Moal J. & Samain J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 183 : 163–189.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 : 350-356.
- Dwiono S.A.P., Diouris M., Le Pennec M., Samain J.F. & Cochard C., 1991. Some biochemical and nutritional aspects of the metamorphosis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). 8<sup>th</sup> International pectinid workshop, Cherbourg (France).
- Dwiono S.A.P., 1992. La métamorphose chez *Pecten maximus* (L.) (Mollusque, bivalve). *Océanologie Biologique*. Thèse de Doctorat de l'Université de Brest : 80 pp.
- Elston R.A., 1993. Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3 : 259-286.
- Enright C.T., Newkirk G.F. Craigie J.S. & Castell J.D., 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96 : 1-13.
- FAO. 2008. Statistiques des pêches et de l'aquaculture.
- Farias A., Bell J. G., Uriarte I. & Sargent J. R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture* 228 (1-4) : 289-305.
- Fehri-Bedoui R., Dinis M.T. & Maamouri F., 2000. Étude histologique du développement de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse de la sole, *Solea senegalensis* (Soleidae). *Cybiurn* 24 (4) : 343-358.
- Fraser A.J., Sargent J.R., Gamble J.C. and MacLachlan P., 1988. Lipid class and fatty acid composition as indicators of the nutritional condition of larval Atlantic herring. *American Fisheries Society Symposium* 2 : 129-143.
- Fraser A.J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 46 : 1868-1883.
- Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris : 1113 pp.
- Gallager S.M. & Mann R., 1981. Use of lipid-specific staining techniques for assaying condition in cultured bivalve larvae. *Journal of Shellfish Research* 1 (1) : 69-83.

- Gallager S.M. & Mann R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56 (2) : 105-121.
- Gallager S.M. & Mann R., 1986. Individual variability in lipid content of bivalve larvae quantified histochemically by absorption photometry. *Journal of Plankton Research* 8 (5) : 928-938.
- Gallager S.M., Mann R., & Sasaki G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56 (2) : 81-103.
- Galtsoff P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). United State Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service 64 : 480 pp.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M. & Gonzalez-Gomez M.A., 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263 (1) : 88-103.
- Gerdes D., 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas* .1. Feeding behavior of larvae and adults. *Aquaculture* 31 (2-4) : 195-219.
- Greenspan P. & Fowler S.D., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research* 26 (8) : 881-889.
- Greenspan P., Mayer E.P. & Fowler S.D., 1985. Nile Red, a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology* 100 (3) : 965-983.
- Hakanson J.L., 1989. Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Marine Biology* 102 : 143-151.
- Haws M.C. & DiMichele L., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2 (4) : 208-218.
- Hazel J.R. & Williams E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physiological environment. *Progress in Lipid Research*, 29 : 168-228.
- Helm M.M., Laing I. & Jones E., 1989. The development of a 200 l algal culture vessel a Conway. Fisheries Research Technical Report, MAFF Directory Fisheries Research, Lowestoft, 53 (1) : 1-8.



- Helm M.M. & Laing I., 1988. Preliminary observations on the nutritional value of Tahiti *Isochrysis* to bivalve larvae. *Aquaculture* 62 : 281-288.
- Helm M.M., Bourne N. & Lovatelli A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. *FAO Fisheries Technical Paper* 481: 188 pp.
- Henderson B.A., 1983. Practical methods of handling and setting eyed-pediveliger larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thurnberg). *Journal of Shellfish Research*, 2 (1) : 119-120.
- His E. & Maurer D., 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture* 69 (1-2) : 185-194.
- His E. & Seaman M.N.L., 1992. Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae, *Marine Biology* 114 : 288-289.
- Hofmann E.E., Powell E.N., Bochenek E.A. & Klinck J.M., 2004. A modelling study of the influence of environment and food supply on survival of *Crassostrea gigas* larvae. *Ices Journal of Marine Science* 61 (4) : 596-616.
- Holden M.J. & Patterson G.W., 1991. Absence of sterol biosynthesis in oyster tissue culture. *Lipids* 26 : 81-82.
- Holiday J.E., Allan G.L. & Frances J., 1991. Cold storage effects on setting of larvae of the Sydney Rock oyster, *Saccostrea commercialis*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 92 (2-3) : 189-185.
- Holland D.L. & Spencer B.E., 1983. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53 : 288-298.
- Holland D.L. & Hannant P.J., 1984. Biochemical changes during growth of the spat of the oyster, *Ostrea edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 1008-1016.
- Holland D.L., 1988. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In : Malins. D.C. Sargent. J.R. *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press, London: 85-123.

- Jackson D.L., 1993. Use of Nile Red as a histochemical technique for monitoring physiological condition of bivalve larvae. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 93 (4) : 32-34.
- Jaeckle W.B. & Manahan D.T., 1992. Experimental manipulations of the organic chemistry of seawater: Implications for studies of energy budgets in marine invertebrate larvae (Mollusca, Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 156 : 283-284.
- Jones C. & Jones B., 1983. Methods for setting hatchery produced oyster larvae. B.C. Marine Resources Branch : 61 pp.
- Jones G. & Jones B., 1988. Advances in the remote setting of oyster larvae. British Columbia Ministry of Environment, Marine Resources Branch : 88 pp.
- Kanazawa A., 2001. Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Science* 68 (6) : 998-1008.
- Knauer J., Kerr R.G., Lindley D., & Southgate P.C., 1998. Sterol Metabolism of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Spat. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology* 119 (1) : 81-84.
- Knauer J. & Southgate P.C., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Review Fisheries Sciences* 8 : 241-280.
- Knauer J., Barrett S.M., Volkman J.K. & Southgate P.C., 1999. Assimilation of dietary phytosterols by Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture Nutrition* 5 : 258-266.
- Knuckey R.M., Brown M.R., Barrett S.M. & Hallegraeff G.M., 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for the juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211 : 253-284.
- Labarta U., Fernandez-Reiriz M.J. & Perez-Camacho A., 1999. Dynamics of fatty acids in the larval development, metamorphosis and post-metamorphosis of *Ostrea edulis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* 123 (3) : 249-254.
- Labarta U., Fernandez-Reiriz M.J. & Pérez-Camacho A., 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 238 (2) : 225-242.

- Labarta U., Fernandez-Reiriz M.J. & Pérez-Camacho A., 1999. Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia* 405 : 125-131.
- Laing I., 1995. Effect of food supply on oyster spatfall. *Aquaculture* 131 (3-4) : 315-324.
- Laing I. & Earl N.H., 1998. The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, larvae. *Aquaculture Research* 29 (1) : 19-25.
- Langdon C.J. & Waldock M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 61 : 431-448.
- Loosanoff V.L. & Davis H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Advance in marine biology*, Academic press, London, F.S. Russel Edit. 136 pp.
- Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 : 265.
- Lucas A., 1982. Remarques sur les rendements de production chez les Bivalves marins. *Haliotis*, 12 : 48-60.
- Lucas A. & Rangel C., 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture* 30 (1-4) : 369-384.
- Lucas A., Chebab-Chalabi L. & Aldana-Aranda D., 1986. Transition from endotrophy to exotrophy in the larvae of *Mytilus edulis*. *Oceanologica Acta* 9 (1) : 98-103.
- Lucas A., Chebab-Chalabi L. & Beninger P., 1986. Variation of relative organic matter in *Mytilus edulis* L. larvae and postlarvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 95 (1) : 99-103.
- Mann R., 1988. A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. In: J.H. Thorp and I.W. Gibbons (Editors), *Energy and Environment Stress In Aquatic Systems*. DOE Symposium Series 48 : 484-498.
- Mann R., 1989. Some biogeochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 59 : 95-110 .

- Marteil L., 1989. La conchyliculture française, biologie de l'huître et de la moule. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.40 (2) : 149-346.
- Martínez-Fernández E., Acosta-Salmón H. & Southgate P.C., 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. Aquaculture 258 (1-4) : 491-503.
- Marty Y., Delaunay F., Moal J., Samain J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 163 : 221–234.
- McCausland M.A., Brown M.R., Barrett S.M. Diemar J.A. & Heasman M.P., 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 184 (3-4) : 323-342.
- Millican P.F. & Helm M.M., 1983. Preliminary observations on the culture of the larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. ICES, C.M. - 1983/K - 33 : 10 pp.
- Mirejovsky D., Patel A.P., Rodriguez D.D., Hunt T.J., 1991. Lipid adsorption onto hydrogel contact lens material: advantages of Nile red over Oil red in visualisation of lipids. Optometry and Vision Science, 68 : 858-864.
- Moran A.L. & Manahan D.T., 2004. Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 306 (1) : 18-36.
- Nair M. & Appukuttan K.K., 2003. Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1858). Aquaculture Research 34 (12) : 1038-1045.
- Napolitano G.E., Ackman R.G. & Silva-Serra M.A., 1993. Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. Marine Biology 118 : 648–654.
- Nascimento I.A., 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. Journal du Conseil 39 (2) : 134-139.
- Nicolas L., 1999. Etude sur la métamorphose et le développement post-larvaire de la coquille St Jacques, *Pecten maximus*, en éclosion. Eléments de comparaison avec l'huître creuse,

*Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat en océanologie biologique à l'Université de Brest : 224 pp.

- Nicolas L. & Robert R., 2001. The effect of food supply on metamorphosis and post-larval development in hatchery-reared *Pecten maximus*. *Aquaculture* 192 (2-4) : 348-359.
- Parrish C.C. & Wangersky P.J., 1990. Growth and lipid class composition of the marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, in laboratory and mass culture turbidostats. *Journal of plankton research*, 12 (5) : 1011-102.
- Pernet F., 2003. Nutrition et hydrodynamique : effet sur la reproduction et la performance larvaire des mollusques bivalves. Thèse de Doctorat à la Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec : 188 pp.
- Pernet F., Tremblay R. & Bouget E., 2003a. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part I: Broodstock conditioning and young larval performance. *Journal of Shellfish Research* 22 (2) : 365-385.
- Pernet F., Tremblay R. & Bouget E., 2003b. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: Larval growth, competency and settlement. *Journal of Shellfish Research* 22 (2) : 388-388.
- Pernet F., Tremblay R., Langdon C. & Bourget E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Marine Biology* 144 (4) : 693-803.
- Pernet F., Tremblay R., Gionet C. & Landry T., 2006. Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *The Journal of Experimental Biology* 209 : 4663-4685.
- Pernet F., Tremblay R., Bourget E. & Roussy M., 2008. Optimisation de la diète et de la fixation des larves de pétoncle géant *Placopecten magellanicus* – Phase 1. Les publications de la Direction de l'innovation et des technologies. Rapport de recherche – développement, Québec, 156 : 18 pp.
- Ponis E., Robert R. & Parisi G., 2003. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 221 (1-4) : 491-505.

- Ponis E., Parisi G., Le Coz J.R., Robert R., Zittelli G.C. & Tredici M.R., 2006a. Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture Nutrition* 12 : 322–329.
- Ponis E., Probert I., Véron B., Le Coz J.R., Mathieu M. & Robert R., 2006b. Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture* 254 : 544–553.
- Powell E.N., Bochenek E.A., Klinck J.M. & Hofmann E.E., 2002. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae : a modelling approach. *Aquaculture* 210 (1-4) : 89-118.
- Qiu J.W., Gosselin L.A. & Qian P.Y., 1998. Effects of short-term variation in food availability on larval development in the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite*. *Marine Ecology Progress Series* (161) : 83-91.
- Rainer J.S. & Mann R., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, (Gmelin, 1891). *Journal of Shellfish Research* 11(1) : 55-58.
- Richard N., 2006. Effet du taux et de la nature des lipides alimentaires sur les mécanismes intervenant dans la constitution des dépôts lipidiques (transport, captage, synthèse) chez la truie arc-en-ciel et le bar. Ecole doctorale des sciences du vivant, géosciences, sciences de l'environnement. Thèse de Doctorat à l'Université de Bordeaux I : 189 pp.
- Rico-Villa B., Le Coz J.R., Mingant C. & Robert R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256 (1-4) : 388-388.
- Robert R. & Trintignac P., 1998. Microalgues et nutrition larvaire en éclosérie de mollusques. *Haliotis*, 26 : 1-13.
- Robert R., 1998. Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichococcus bacillaris* for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Haliotis* 28 : 29-34.
- Robert R. & Gerard A., 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12 (2) : 121-130.

- Robert R., Nicolas L., Moisan C. & Barbier G., 1999. Morphological and biochemical characterizations of the great scallop *Pecten maximus* metamorphosis. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la Vie* 322 (10) : 848-853.
- Robert R., Chrétiennot-Dinet M.J., Kaas R., Martin-Jézéquel V., Moal J., Le Coz J.R., Nicolas J.L., Bernard E., Connan J.P., Le Dean L., Gourrierec G., Leroy B. & Quéré C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage, RI DRV/RA-2004-05 : 149 pp.
- Rodriguez J.L., Sedano F.J., Garcia-Martin L.O., Perez-Camacho A. & Sanchez J.L., 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Marine Biology* 106 : 109-111.
- Roland W.G., Broadley T.A. & Sutherland I.R., 1988. Solving problems with remote setting Pacific oyster larvae in British Columbia. *Aquaculture International Congress and Exposition, Vancouver, B.C. (Canada), 6-9 Sep 1988.*
- Scheffer H., Gaubert Y., Francoual M. & Le Meur J., 2003. Spécial naissain. L'ostréiculture française. 164 : 20-25.
- Soudant P., 1995. Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de coquille Saint Jaques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. *Océanologie Biologique. Thèse de Doctorat de l'Université de Brest* : 294 pp.
- Soudant P., Moal J., Marty Y. & Samain J.F., 1996. Impact of the quality of dietary acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, 205 : 149-163.
- Soudant P., Marty Y., Moal J., Masski H. & Samain J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 121 : 279-288.
- Teshima S., Kanazawa A. & Shimamoto R., 1988. Anatomical distribution of sterols and fatty acids in the bivalve *Macra chinensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (2) : 293-298.
- Tremblay M.J., 1991. Sea scallop larvae *Placopecten magellanicus* in the Georges Banks Region : Distribution, abundance and condition. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada : 210 pp.

- Tremblay R., Cartier S., Miner P., Pernet F., Quéré C., Moal J., Muzellec M.L., Mazuret M. & Samain J.F., 2008. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262 : 410-418.
- Utting S.D., 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* 56 (2) : 123-138.
- Utting S.D. & Spencer B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Fisheries, Lowestoft, Research Laboratory Leaflet 68 : 31 pp.
- Volkman J.K. & Brown M.R., 2006. Nutritional value of microalgae and applications. In: Subba Rao, D.V. (Ed.), *Algal Cultures, Analogues of Bloom and Applications*. Science Publishers, Enfield (NH), USA : 408-458.
- Waldock M.J. & Nascimento I.A., 1989. Triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Marine Biology Letters* 1 (2) : 88-86.
- Walne P.R. & Mann R., 1985. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Proc. 9<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium, Barnes, H., (Ed.), Aberdeen Univ. Press: 588-608.
- Walne P.R. & Millican P.F., 1988. Condition index and organic content of small oyster spat. *Journal du Conseil* 38 (2) : 230-233.
- Webb K.L. & Chu F.E., 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: "Proceedings of the second international Conference on Aquaculture Nutrition and physiological approaches to shellfish nutrition", Oct 28-29, 1981. Pruder, G.D., Langdon C.J., D. E. Conklin (eds.), Louisiana State University.
- Whyte J.N.C., Bourne N. & Hodgson C.A., 1988. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the Scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 113 (2) : 113-124.



**Publications issues de ce travail**





Short communication

## Impact of temperature on larval development and evolution of physiological indices in *Crassostrea gigas*

R. Ben Kheder, J. Moal, R. Robert \*

Ifremer, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Station Expérimentale d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez, et Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 June 2010

Received in revised form 31 August 2010

Accepted 2 September 2010

## Keywords:

*Crassostrea gigas*

Larvae

Growth

Metamorphosis

Temperature

Lipids

Physiological indices

## ABSTRACT

The effect of four temperatures, ranging between 17 °C and 32 °C, was studied on development and lipid reserve management of *Crassostrea gigas* larvae. No effect of temperature was found on larval mortality, as high survival (>90%) was recorded before competence at all temperatures studied. Temperature did, nonetheless, have a strong effect on growth and settlement success. At low temperature (17 °C), larvae competent to metamorphose were only observed from day 23 and only a low percentage finally achieved metamorphosis (12%). The opposite was seen at temperatures  $\geq 27$  °C: larval competence appeared at day 18 and led to high rates of metamorphosis (60–90%). This difference at settlement seemed to be linked to larval growth, which showed rates of  $7 \mu\text{m d}^{-1}$  at 17 °C vs.  $10.5 \mu\text{m d}^{-1}$  at 32 °C. In addition, a higher accumulation of lipid reserves at low temperature was revealed by both biochemical (TAG/ST) and colorimetric (OLI) methods. In fact, the lower the temperature, the higher the mean TAG/ST levels recorded (6–9 at 17 °C vs. 2–4 at 32 °C). In the same way, larvae reared at 17 °C had a percentage lipid surface coverage between 19 and 29% (at sizes between 80 and 230  $\mu\text{m}$ ), while lipids covered only 5 to 16% of the surface of larvae reared at 32 °C (at size <250  $\mu\text{m}$ ). Neither of these physiological indices can, however, provide a relevant indication of the larval performance induced by different rearing temperatures.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Since the introduction of *Crassostrea gigas* to French coasts in the 1970s, this species has been grown in all the main oyster farming basins, where it now represents 99% of French oyster production (Buestel et al., 2009). Until recently, the industry relied on supplies of wild-caught spat collected in the nursery basins of Marennes-Oléron and Arcachon (AGRESTE, 2005). Due to high interannual fluctuations in settlement and growing interest in triploid seed, however, an increased demand for hatchery-produced oyster spat has developed. Although greater technical control is required over all stages in the hatchery (Robert and Gérard, 1999), it is the larval and early postlarval stages that are the most sensitive in the mollusc life cycle (Helm et al., 2004) and no viable predictive tool yet exists. The usefulness of three physiological indices, larval condition index (OM/DW), structural biochemical index (TAG/ST) and overall lipid index (OLI) has been investigated in previous studies, which looked at the evolution of these indices in larvae fed diets of differing quality and quantity (Ben Kheder et al., 2010a), and during periods of temporary starvation (Ben Kheder et al., 2010b).

OM/DW appears to be the least relevant of these three indices (Ben Kheder et al., 2010a,b). We therefore concentrated the present

study on the other two, TAG/ST and OLI, which are lipid-based. Indeed lipids are known to be the main energetic reserves in many bivalves (Knauer and Southgate, 1999). Our objective was to look at the effect of four temperatures, varying from 17 to 32 °C on larval rearing performances of *C. gigas* and the evolution that occurs in these chosen lipidic indices over larval development. Such temperature scale was chosen because it allowed Pacific oyster larval development with high survival (Rico-Villa et al., 2008). Temperature is the most important factor influencing mollusc rearing, after nutrition, especially during the pelagic phase (Helm et al., 2004). It is generally accepted that larval survival is high at low temperature, but that growth is stimulated as temperature increases (Doroudi et al., 1999). Temperature also acts on the metabolism by overall acceleration of all metabolic functions, like respiration and ingestion (Rico-Villa et al., 2009), and is therefore a major factor regulating energetic requirements of individuals. Rearing temperature has also been shown to interact with food-related factors to affect mechanisms involved in the laying down of lipid deposits. In the trout in particular, the transport of lipids is accelerated at low temperature but neosynthesis capacity is lessened (Corraze et al., 1999).

## 2. Materials and methods

The experiments were conducted using genitors conditioned according to methods described by Ben Kheder et al. (2010a). Following a controlled fertilisation using gametes from three males and six females, groups of the resulting larvae were reared at 17, 22, 27 and 32 °C at a

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 89 51 05; fax: +33 2 98 89 57 77.  
E-mail address: [rene.robert@ifremer.fr](mailto:rene.robert@ifremer.fr) (R. Robert).

density of 30 larvae  $\text{ml}^{-1}$  in duplicate 150 l cylindro-conical tanks in a flow through rearing system. These temperatures were maintained constant throughout the rearing period using thermo-regulated automatic valves. The larvae were fed continuously with *Isochrysis affinis galbana* (T-ISO: strain CCAP 927/14) and *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (strain CCAP 1010/05) at a 1:1 cell biovolume. In a static rearing system the quantity of food supplied during larval and settlement stages depends on uptake of microalgae by larvae that showed a constant consumption increase during week 2 (after fertilisation) and a sharp decrease during metamorphosis (Rico-Villa et al., 2006). In a continuous rearing system, whatever biomass and renewal seawater flow, phytoplankton should be maintained at a constant level to improve growth performances (Rico-Villa et al., 2008). A phytoplankton level of  $1000 \mu\text{m}^3 \mu\text{l}^{-1}$  (17 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ ) was accordingly continuously maintained for a seawater flow of  $20 \text{l h}^{-1}$  (seawater renewal rate:  $13\% \text{ h}^{-1}$ ). Once a week the tanks were emptied so that the rearing structures could be cleaned and larval survival estimated. Intermediate samples were taken from the rearing tanks every 2–4 days for the study of growth. At the end of larval rearing period, from day 18, when  $\geq 30\%$  of the population was competent (larvae with active foot and eyes) plastic disks (15 cm diameter) were placed in larval rearing tanks and used as collectors. Postlarvae developed a new shell (dissoconch) and mainly settled on collectors. After 5 days, metamorphosis was evaluated by counting the number of remaining larvae and subtracting them from the total number of larvae initially present. An estimation of spat attached to collectors and tank walls was performed to confirm results.

Throughout whole larval life samples for physiological indices measurements were regularly taken. Such analysis techniques have been previously detailed (Ben Kheder et al., 2010a) so only a brief outline will be given here. Overall lipid index (OLI) was calculated on 50 individuals per tank, every 4 days, by coloration of neutral lipids with Nile Red, followed by their quantification using image analysis to calculate lipid surface relative to total larval surface. The second index TAG/ST was measured, every 2 days, by means of analysis of lipids after preservation of samples of larvae (50,000 to 200,000 according to their development stage) in Folch's liquid, and neutral lipid classes were analysed in HPTLC (high performance thin layer chromatography) using a CAMAG system.

Larval performances were analysed by one-way analysis of variance followed by Fisher's least significant difference pairwise comparison ( $P < 0.05$ ); where necessary data were arcsine transformed to achieve homogeneity of variance and normality using Statview 5, SAS Software. Data are summarized as mean  $\pm$  standard deviation of the mean. After logarithmic transformation of lipidic indices slope-fitting tests were made on the data, according to temperature, using R software. The significance of the slopes was tested with *t* tests.

### 3. Results

#### 3.1. Larval performances

Survival at the end of larval development was found to be similarly high at all rearing temperatures ( $>90\%$ : Table 1). Other parameters were more variable with temperature because the higher the

temperature, the shorter the duration of the larval phase. At high temperatures therefore (27 and 32 °C), 33 to 43% of larvae were competent at 18 days, successfully becoming postlarvae in 60 to 90% of cases (Table 1). Inversely, at 17 °C, the percentage of competent larvae was only 17% at day 23 and only 12% became postlarvae.

#### 3.2. Structural biochemical index: TAG/ST

The kinetics of triacylglycerol accumulation followed an exponential pattern in relation to larval size (Fig. 1a), with this form of curve fitting the data satisfactorily for all rearing temperatures ( $0.83 > R^2 > 0.93$ ). At an equivalent size, the increase in triacylglycerols in the larvae was greatest at 17 °C. At day 23, therefore, a mean value of 120 ng was found at 17 °C in individuals measuring 230  $\mu\text{m}$ , while at 27 and 32 °C, contents were 33 and 20 ng, respectively, for larvae of a similar size (Fig. 1a). Sterols also accumulated according to an exponential curve (Fig. 1b), which fitted the relationship at all rearing temperatures ( $0.98 > R^2 > 0.95$ ). Above 150  $\mu\text{m}$ , accumulation of sterols by larvae was more marked at 17 °C, but contents recorded at higher temperatures (between 22 and 32 °C) only showed slight differences at equivalent size (Fig. 1b). In contrast, no relation was found between the TAG/ST ratio and larval size (Fig. 2a) at any of the temperatures studied ( $R^2 < 0.19$ ). This lack of correlation was confirmed by a *t* test, showing that no slope was statistically different from zero. It is nevertheless interesting to point out an increasing gradient of mean TAG/ST values with decreasing temperature: at 32 °C TAG/ST values were between 1.5 and 5, contrasting with values of 6 to 12 at 17 °C.

#### 3.3. Overall lipid index

As with TAG/ST, no relationship was found between OLI and larval size at any of the rearing temperatures (Fig. 2b); the correlation coefficients were between 0.25 and 0.51, apart from at 27 °C where  $R^2 = 0.79$ . This overall absence of correlation was confirmed by *t* test. Here again the highest values, except for larvae at hatching, were recorded in veligers reared at 17 °C (19–29%, compared with 5–16% at 32 °C).

### 4. Discussion

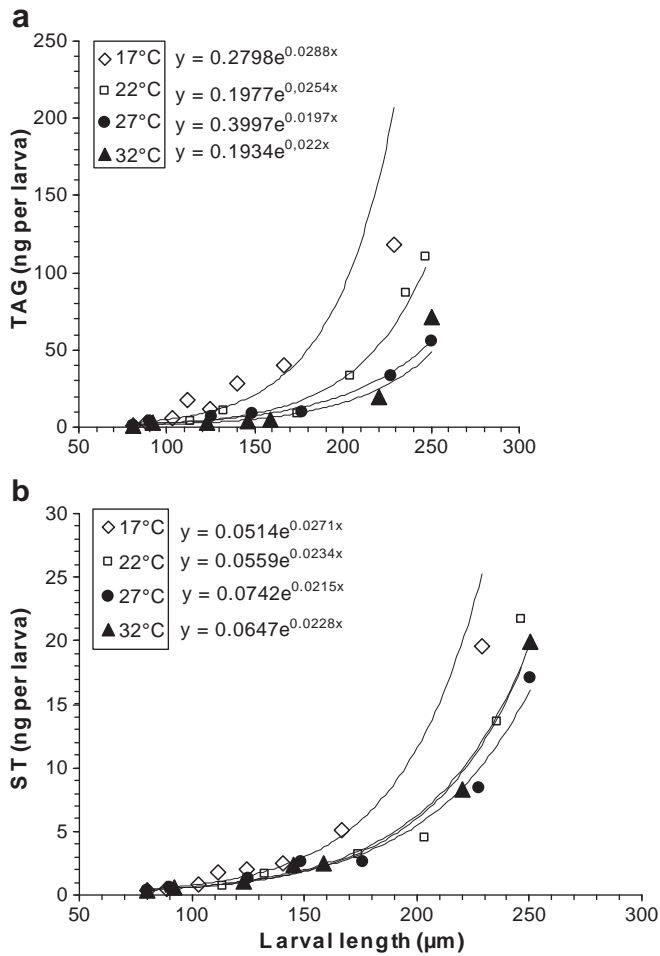
No effect of temperature on larval mortality until competence was found in our study, as survival at the end of larval development was always above 90% at all temperatures tested (between 17 and 32 °C). Conversely, the influence of temperature on larval growth is clearly demonstrated and agrees with the work of His et al. (1989) conducted in a static flow system over a week. In the present study, the optimal performances recorded at 32 °C could be explained by an overall stimulation of the metabolism, as previously demonstrated in larvae of *C. gigas* (Rico-Villa et al., 2009). Furthermore, temperature can modify the efficacy of digestion as suggested in the green mussel (Nair and Appukuttan, 2003), or affect the efficiency of certain enzymes involved in neosynthesis or lipid transport in trout (Corraze et al., 1999).

Indices from the two methodological approaches used in this study, biochemical (TAG/ST) and colorimetric (OLI), showed no relationship with larval size at any rearing temperature. However, lipid storage

**Table 1**

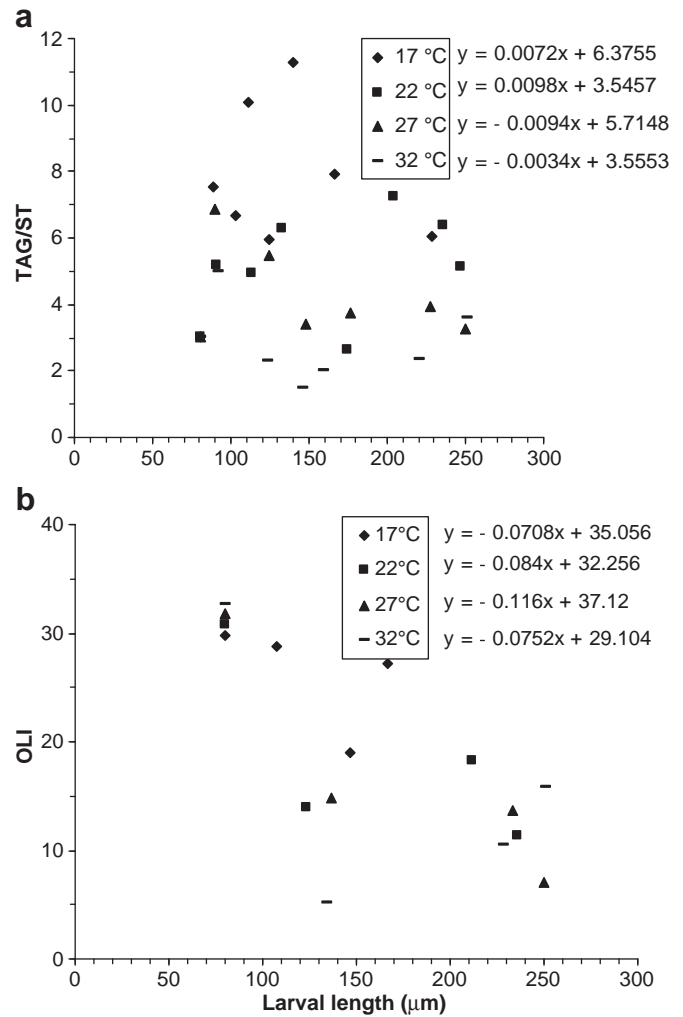
Larval development performances (mean  $\pm$  standard deviation) of *C. gigas* reared at different temperatures. The values with the same letter in the same column are not significantly different at the 5% level. For each temperature settlement was estimated 5 days following larval competence evaluation (end of larval rearing).

Temperature (°C)	Larval life duration (days)	Survival until competence excluding embryogenesis (%)	Mean larval length (sd) at the end of larval rearing	Larval growth rates ( $\mu\text{m day}^{-1}$ )	Larval competence (%)	Settlement (%)
17	23	92.0 (6.6) <sup>a</sup>	229.1 (38.5) <sup>a</sup>	7.1 (1.8) <sup>a</sup>	17 (3) <sup>a</sup>	12 (7) <sup>a</sup>
22	21	91.0 (5.4) <sup>a</sup>	246.6 (33.4) <sup>ab</sup>	8.7 (1.8) <sup>a</sup>	37 (10) <sup>bc</sup>	25 (3) <sup>b</sup>
27	18	93.6 (2.7) <sup>a</sup>	250.1 (27.3) <sup>b</sup>	10.6 (1.7) <sup>b</sup>	33 (4) <sup>b</sup>	58 (1) <sup>c</sup>
32	18	92.4 (2.9) <sup>a</sup>	250.6 (29.4) <sup>b</sup>	10.5 (1.9) <sup>b</sup>	43 (6) <sup>c</sup>	91 (1) <sup>d</sup>



**Fig. 1.** Kinetics of triacylglycerol TAG (a) and sterol ST (b) accumulation, and their relationships with *C. gigas* larval size at four rearing temperatures from 17 to 32 °C.

appeared to be more pronounced at low temperature. Larval metabolism is slower at 17 °C and a preferential accumulation of TAG was noted, together with small amounts of ST, leading to higher values of TAG/ST than those recorded at higher temperatures. In the same way, we demonstrated that the lipidic surface is greater at low temperature. These results agree with those of Farias et al. (2003), who noted an increase in cholesterol and steryl esters in *Argopecten purpuratus* at low temperature. Also, the decrease in rearing temperature from 22 to 16 °C in sea bass increases the lipid content of muscle (Richard, 2006). According to the author, it appears that  $\beta$ -oxidation is less activated at low temperature. In *C. virginica*, a slight accumulation of lipids in the digestive gland was reported in larvae reared at 25 °C (compared with 30 °C) by Gallager et al. (1986), who noted that larvae became competent at 32 °C but did not metamorphose because they did not have enough lipid reserves. The data of the present study disagree with those found by these previous authors because, although reserves diminished with temperature, metamorphosis was high (91%) at 32 °C with moderate lipid reserves (OLI  $\approx$  15%). On the other hand, a poor rate of metamorphosis success (12%) was found at 17 °C in larvae with reserves almost twice as high (27%). Similarly, temperature had positive effects on metamorphosis with high settlement related to high larval competence for temperatures  $\geq$  27 °C and, in contrast low effects at temperatures  $\leq$  22 °C with an important delay in competence achievement. This delay in competence and settlement can be explained by slower growth at 17 and 22 °C, which was 7 and 8.7  $\mu\text{m d}^{-1}$ , respectively, compared with 10.6  $\mu\text{m d}^{-1}$  for temperatures  $\geq$  27 °C. Metamorphosis success is clearly related to temperature and not to lipids accumulation. Indeed neither of these physiological indices can,



**Fig. 2.** Relationship of structural biochemical index TAG/ST (a) and overall lipid index OLI (b) with larval size in *C. gigas* reared at different temperatures from 17 to 32 °C.

provide a relevant indication of the larval performance induced by different rearing temperatures.

Temperature also has a fundamental influence on membrane lipid metabolism. The study of variations in lipidic composition of membranes with temperature has led to the development of the theory of homeoviscous adaptation (Hulbert et al., 2007). Thus modification of membrane fluidity allows these ectothermic organisms to adapt to temperature changes. Membrane lipids are remodelled by changes in the composition of phospholipids, fatty acids and cholesterol content in relation to temperature acclimation (Hazel and Williams, 1990). Cholesterol is an essential component of animal membranes, with multiple effects on their physical properties, including membrane fluidity, thickness and permeability (Crockett, 1998). It was demonstrated that the quantity of sterols in bivalve molluscs increases as the temperature rises, and that this serves to stabilise the membranes and their associated enzymes (Pernet et al., 2006). Our results appear to suggest, in contrast, that homeoviscous adaptation by increase in sterols with temperature does not apply to the early stages of bivalve development. However, most studies on homeoviscous membrane adaptation to temperature describe regulation by the desaturation of fatty acids or the relative composition in terms of PC/PE (phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine), aspects that the present study did not examine. Chromatographic doses of polar fatty acids and more detailed studies on the class of sterols in *C. gigas* larvae will allow us to validate these first results.

Finally, while these two parameters were particularly relevant for showing the quantitative and qualitative influence of nutritional factors (Ben Kheder et al., 2010a,b), they did not allow us to examine at the physiological aspects of rearing performance differences due to temperature.

### Acknowledgements

This work could not have been completed without the technical support of the team at the Argenton Ifremer station: C. Mingant, I. Quéau, L. Lebrun and P. Le Souchu. The authors also wish to thank I. Bernard, PhD student, for his statistical assistance in slope regression analysis. Rym Ben Kheder is also grateful to the Tunisian Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, the French embassy in Tunis and the Centre Régional des Œuvres Universitaires et Scolaires de Rennes, which contributed to the funding of her doctoral visit to France.

### References

- AGRESTE, 2005. AGRESTE Primeur, premier Recensement de la conchyliculture 2001, Agreste Cahiers n 1, février 2005. 89 pp.
- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., Robert, R., 2010a. Effect of nutrition on *C. gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture* 305, 165–173.
- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., Robert, R., 2010b. Effect of nutrition on *C. gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part B: effects of temporary food deprivation. *Aquaculture* doi:10.1016/j.aquaculture.2010.08.030.
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., Goulletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28 (4), 813–820.
- Corraze, G., Larroquet, L., Médale, F., 1999. Alimentation et dépôts lipidiques chez la truite arc-en-ciel, effet de la température d'élevage. *INRA Prod. Anim.* 12 (4), 249–256.
- Crockett, E.L., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* 38, 291–304.
- Doroudi, M.S., Southgate, P.S., Mayer, R.J., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. *Aquat. Res.* 30, 271–277.
- Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture* 228 (1–4), 289–305.
- Gallager, S.M., Mann, R., Sasaki, G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56 (2), 81–103.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167–227.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. In: Lovatelli, A. (Ed.), FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations Publishing, Rome, Italy. 177 pp.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87, 1175–1213.
- Knauer, J., Southgate, P.C., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 7, 241–280.
- Nair, M., Appukuttan, K.K., 2003. Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Aquacult. Res.* 34 (12), 1037–1045.
- Pernet, F., Tremblay, R., Gionet, C., Landry, T., 2006. Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *J. Exp. Biol.* 209, 4663–4675.
- Richard, N., 2006. Effet du taux et de la nature des lipides alimentaires sur les mécanismes intervenant dans la constitution des dépôts lipidiques (transport, captage, synthèse) chez la truite arc-en-ciel et le bar. Ecole doctorale des sciences du vivant, géosciences, sciences de l'environnement. Thèse de Doctorat à l'Université de Bordeaux I. 189 pp.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 377–388.
- Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Lepiver, D., Pouvreau, S., Hamon, M., Robert, R., 2008. A flow-through rearing system for ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 282, 54–60.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* 12, 121–130.





# Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects

R. Ben Kheder, C. Quéré, J. Moal, R. Robert\*

Ifremer, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Station Expérimentale d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez, et Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 9 December 2009

Received in revised form 21 April 2010

Accepted 23 April 2010

### Keywords:

*Crassostrea gigas*

Larvae

Growth

Metamorphosis

Nutrition level and quality

Lipids

Condition indices

## ABSTRACT

Several quality indices have been defined for marine bivalve larvae, including the coloration of whole larvae and the Triacylglycerols/Sterols ratio (TAG/ST), putting emphasis on the role of lipids in larval development. Using an image analysis system, epifluorescence microscopy and Nile Red, to specifically colour the reserves, we improved and quantified the overall physiological index based on the ratio of the lipid surface to the total larval surface. This Overall Lipid Index (OLI) was then tested in two experiments on the influence of nutritional parameters on larval development and metamorphosis in *Crassostrea gigas*, following the parallel evolution of the indices. The higher the input of microalgae, the quicker larvae developed, leading to a maximum development rate of  $16.5 \mu\text{m d}^{-1}$ . This rate was accompanied by the highest lipid reserves. At the end of rearing, the lipid reserves occupied 30% of the larval surface in the batches with the highest food ration, while they only covered 12% in the larvae on the lowest ration. In the same way, the TAG/ST ratio increased over the rearing period and reached its highest levels in larvae with the highest food ration. We also noted that the decrease in lipids over the first week of rearing was higher when the nutritional input was lower. Finally, deficient reserves and poor performances were recorded in larvae fed only the flagellates *Pavlova lutheri* (P), *Isochrysis affinis galbana* (T) or a mixture of these species (PT). In contrast, a high lipid accumulation and better performances were shown when the diet was based on the diatom *C. calcitrans* f. *pumilum* (Cp), whether alone or in combination with other species.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Due to the decimation of *Crassostrea angulata* stocks by an epizootic, several hundred tonnes of *Crassostrea gigas* were imported from 1971 to 1973 to serve as new broodstock in sanctuaries in France. The species, imported from British Columbia (Canada), became established, and abundant spat settlement in Marennes-Oleron allowed healthy, fast-growing oysters to be produced (Grizel and Héral, 1991). Meanwhile, another 10000 t spat were imported from Japan, and production increased quickly. Spat capture developed rapidly in Arcachon and Marennes-Oleron, so that further spat imports became unnecessary (Buestel et al., 2009) and French *C. gigas* production relied progressively on local stocks.

Nowadays French oyster production relies on spat that are principally collected in the wild, with three-quarters of these juveniles supplied from the nursery basins of Marennes-Oléron and Arcachon (AGRESTE, 2005). Up until the last decade, the supply of hatchery spat was relatively small and served to complement natural supplies when capture from the wild was insufficient (Robert and Gérard 1999). However, the inter-annual variation in capture noted since 1998 in the main French nursery area (Auby and Maurer, 2004; Pouvreau et al.,

2008) and the growing demand for new shellfish farming products like triploids (Normand et al., 2009) have gradually increased this hatchery production from 5 to 25%. Because the larval stages are presently thought to be the most critical stages in the life of bivalves and despite a high level of technical know-how in commercial hatcheries today (Helm et al., 2004), many biological questions on these stages remain unanswered. This means that, as yet, there are no reliable tools for predicting the health of a larval rearing batch.

There are presently no suitable condition indices for bivalve larvae that allow quality and success of larval growth and/or metamorphosis to be predicted. The practical usefulness of such indices is undeniable: they can reveal possible perturbations before they are shown by a halt in growth and/or death of individuals. Among the approaches that have been explored, the importance of lipids in larval rearing performance of molluscs is particularly well supported in the literature. It has been shown that diets rich in lipids are especially beneficial for larval growth in *C. gigas* (Powell et al., 2002), *Argopecten purpuratus* (Nevejan et al., 2003) and *Pecten maximus* (Delaunay et al., 1992; Tremblay et al., 2007). A lipid-rich diet also increases competence to metamorphosis in *C. gigas* (which has higher needs in terms of lipids than *C. virginica* (Haws et al., 1993)) as well as in *P. maximus* (Tremblay et al., 2007). It is therefore not surprising that previous studies have sought to use such lipid approaches. Thus, Gallager and Mann (1981, 1986) and Gallager et al. (1986) provided a visual index for estimating lipid resources in bivalve larvae on a relative basis using the lipid specific stain, Oil Red O.

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 89 51 05; fax: +33 2 98 89 57 77.

E-mail address: [rene.robert@ifremer.fr](mailto:rene.robert@ifremer.fr) (R. Robert).

However, as results were highly heterogeneous, only a broad trend was obtained.

Such index seemed to be particularly well correlated with survival, as high survival rates were found to be linked to high levels of lipids, although the opposite was not true (univocal relationship: Gallager et al., 1986). In addition, these authors suggested using lipids as a predictive indicator for metamorphosis in the two bivalve species *C. virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Previous work on overall lipid indices have mostly been based on a semi-quantitative scale and the results were highly heterogeneous, partly due to the limitations posed by rearing conditions (e.g. monospecific diet). These indices only allowed strong trends to be revealed: indices of 0 and 1 were linked to metamorphosis percentages below 10% and indices of 2 and 3 to percentages between 10 and 90%. Image analysis of photographs offers possibilities of improving overall lipid index and it was the primary objective of the present study to apply such a method to this objective.

Another index, triacylglycerols/sterols (TAG/ST), has already been used to estimate larval quality in *Placopecten magellanicus* (Pernet et al., 2003). Triacylglycerols are known to be the principal constituent of reserves in larvae of *C. gigas* (Whyte et al., 1987; Waldock and Nascimento, 1979), and *P. maximus* (Delaunay et al., 1992). Sterols, on the other hand, while classed as neutral lipids according to their polarity, are integrated into structural membranes to give rigidity. They increase with the membrane surface as these increase in size, and can therefore represent a reference weighted according to lipid reserves. In *P. magellanicus*, a relation was revealed between TAG/ST and level of metamorphosis competence (Pernet et al., 2003).

Finally, the ratio of organic matter to dry matter (OM/DW), considered by many authors to be a relevant physiological indicator, was also examined in the present work. Both organic matter and dry weight have been seen to increase at the end of the pelagic stage in *C. gigas* (His and Maurer, 1988). According to these authors, this organic matter accumulation corresponds to the critical metamorphosis period. The same pattern has been seen in the blue mussel *Mytilus edulis* (Lucas et al., 1986) and the scallop *Patinopecten yessoensis* (Whyte et al., 1987). The relative percentage of organic matter ( $100 \times \text{OM/DW}$ ) was considered by these last authors to be a good indicator of larval metamorphosis competence, but this same index (called Larval Condition Index) showed a weak correlation with the rate of metamorphosis in *P. maximus* (Robert et al., 1999). In the present study, we sought to test its validity as a predictor of metamorphosis in the Pacific oyster, where metamorphosis is much more rapid (2–7 d compared with 7–14 d in the scallop *P. maximus*).

The objective of this work was therefore to study the evolution and relevance of these three indices throughout the pelagic cycle in *C. gigas* larvae subjected to different nutritional conditions in a controlled environment. The first part of this study (A), described in the present paper, addresses the effects of quantity and quality of food, while a second paper (B) concerns the effects of temporary food deprivation. In the present work two experiments are reported, the first on the influence of the food ration and the second on the impact of the quality of algal diet (species composition) on survival, growth, metamorphosis and development of lipid reserves measured by these different indices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Broodstock conditioning, microalgal culture, larval development and competence

Genitors aged 2 years, issued from the same batch of origin (spatfall from Arcachon) were stocked at Aber Benoît (North Brittany) with regular transfers to the Argenton experimental station for conditioning. Sixty individuals were placed in 800 l tanks for 1.5 months in flow through at 19 °C with a daily phytoplankton supply equivalent to 6% of oyster dry weight.

Three microalgae species were supplied in equal quantity in an equivalent volume: *Isochrysis affinis galbana* (T. Iso = T, strain CCAP 927/14), *Chaetoceros gracilis* (Cg, strain Utxex LB 2375) and *Skeletonema marinoi* (S, strain CCAP 1077/3). Microalgae were initially cultured in 250-ml Erlenmeyer flasks and then in 2-l, 6-l, 10-l glass carboys and finally in 300-l Perspex cylinders, in batch cultures. Large scale cultures (300-l) were generally devoted to broodstock conditioning while 6 to 10-l cultures were used for larvae. Seawater at ambient salinity (33–34 ppt) was 1- $\mu\text{m}$  filtered, enriched with sterilised Conway medium (Walne, 1966) and either autoclaved ( $\leq 10$ -l) or U.V. treated. For diatoms culture sodium metasilicate ( $40 \text{ mg l}^{-1}$ ) was added as a silica source and salinity was reduced to 25 ppt by addition of distilled water. Temperature and continuous illumination, provided by white fluorescent tubes, ranged between 19–20 °C and 35–50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (flasks) and 22–23 °C and 180–220  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (carboys and cylinders) respectively. Carboys and cylinders were aerated with a 3%  $\text{CO}_2$ /air mixture to support growth and to maintain the pH within a range of 7.5–8.1. To be used as diets, microalgae were harvested at the end of the exponential phase.

So as to minimise genetic effects, the gametes of three males and six females were separately mixed after stripping the gonads of the genitors. After counting, fertilisation was performed at a ratio of 50 spermatozooids per oocyte. Two hours later, the embryos were put to incubate in 150 l cylindro-conical tanks at a density of 40 embryos  $\text{ml}^{-1}$ . Seawater filtered at 1  $\mu\text{m}$  was regulated at  $24 \pm 1$  °C and mixed by air bubbling from the base of the cone ( $0.5 \text{ l min}^{-1}$ ). At the end of 48 h incubation, the percentage of D-larvae was determined and the veligers transferred to cylindro-conical tanks of 30 or 150 l depending on the experiment.

Towards the end of the pelagic cycle (16–19 d) the larvae, which by now had a foot, developed a pigmented spot known as an eye (Coon et al., 1990; Baker and Mann, 1994). These larvae, considered as ready to metamorphose or 'competent' were counted and the percentage of competence determined. Selective sieving was made on a sieve of 225  $\mu\text{m}$  mesh size. The selected larvae were returned to water at a density of 2 pediveligers  $\text{ml}^{-1}$ , in 30 l tanks in which plastic discs for settlement of 15 cm diameter had been placed. The rearing conditions were similar to those maintained during larval development. After 5 days, the percentage of metamorphosis was calculated indirectly by estimating the number of free non-settled larvae (swimming and dead).

### 2.2. Experimental trials

The influence of quantity and quality of food on larval rearing performances and the building of lipid reserves were tested in two independent experiments.

In the first experiment, the influence of food quantity was estimated by feeding larvae at three levels, in triplicate: half ration (25–100 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ ), standard ration (50–200 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ ; Rico-Villa et al., 2006) and double ration (100–400 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ ), of a bi-specific mixture of *I. affinis galbana* (T) and *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (CCAP 1010/05 (Cp)) fed 50/50 in equivalent volume. The experiment was conducted in three 150-l and three 450-l cylindro-conical tanks. The 150-l tanks served as control references for monitoring larval development (growth and survival), because the larval density remained constant throughout the rearing period. The 450-l tanks were used for the biological samples (physiological indices), which required a greater number of larvae; these tanks were also used for the measurements to determine competence and percentage metamorphosis. The effect of tank volume (150 l vs. 450 l) had previously been tested and no significant effect on larval performances detected (Nicolas, 1999).

The second experiment tested the influence of each species of microalga, and paired combinations at equal volume. The larvae were reared in triplicate in 30-l tanks and fed daily according to their needs,



estimated by particle counts (grazing), on monospecific diets composed of *Pavlova lutheri*: CCAP 931/1 (P), *I. affinis galbana* (T), *C. calcitrans forma pumilum* (Cp) or on bi-specific mixtures (PT, PCp, TCp) mixed in equal proportions, with equal volume. Microalgae used for larvae exhibited similar cell size in their exponential phase of growth (40 to 45  $\mu\text{m}^3$ ) equivalent to 4.2 to 4.4  $\mu\text{m}$  diameter) as well as similar dry individual weight (18 to 20 pg; Robert et al., 2004) and mixed feeding ration was accordingly based on a ration 1:1. The rations varied from 15 to 180 cells  $\mu\text{l}^{-1}$  across all the diets and ages. Positive control consisted in tri-specific diet PTCp.

All rearing was conducted sequentially with seawater renewed every two days and a larval density of 5 larvae  $\text{ml}^{-1}$ . Seawater, filtered to 1  $\mu\text{m}$ , was maintained at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  at ambient salinity (34 ppt) with no added antibiotics. Algae were distributed once a day. Light air bubbling from the bottom of the cone was applied throughout the rearing period to mix the larvae and algae in the water column and avoid an accumulation of organic matter that could encourage bacterial development.

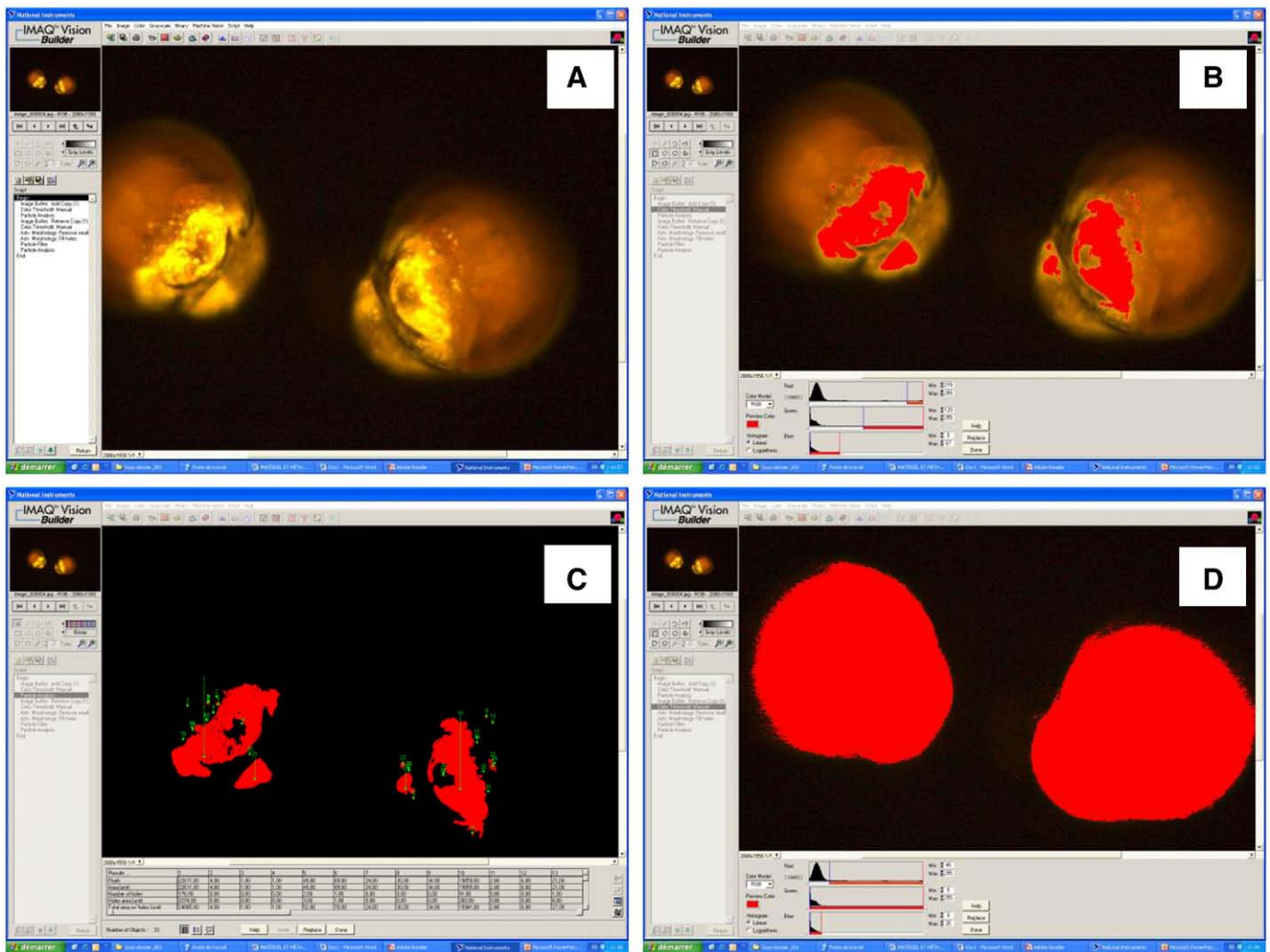
Over the larval rearing period and at each water renewal, the larvae were recovered by draining the tanks. They were counted to estimate survival and then 200 to 300 larvae were sampled and stored in 3-ml wells of 24-cell microcellular plates filled with 1- $\mu\text{m}$  filtered seawater and fixed with a 5% formalin solution. For each well, the entire population was photographed using Win Imager software

under an inverted microscope (Olympus, type IMT-2), avoiding photographic overlap. The photographs were then treated by image analysis using the software Imaq Vision Builder version 6.0 allowing the surface of each object to be determined and its length calculated (de Pontual et al., 1998) and larval growth accordingly achieved.

### 2.3. Quantification of reserve lipids and definition of overall lipid index

The lipid reserves of *C. gigas* larvae were revealed according to the protocol of Castell and Mann (1994). A stock solution of Nile Red was prepared by adding acetone as a solvent vector (250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The larvae were first starved for at least 6 h to reduce interference from undigested algal lipids. They were then transferred to Eppendorf tubes containing 2 ml filtered seawater, to which 10  $\mu\text{l}$  of Nile Red solution were then added.

After a 90 min contact time, the larvae were rinsed in filtered seawater and fixed in formaldehyde. Microscopic examination was made under an epifluorescence microscope (Laborlux Leica), equipped with a HBO 50 W/AC mercury vapour lamp and I3 filter block for PLOEMOPAK illuminator (band-pass excitation filter providing transmission at 450–490 nm). A Leica NPL 10/0.25 objective was used. The photographs were taken with a colour camera (Leica DFC320), resistant to the heating that occurs with epifluorescence, within 4 h of coloration so as to avoid any deterioration of the fluorescence.



**Fig. 1.** The different steps in image analysis with the program IMAQ vision builder (National Instrument). A: open file containing the photographs taken with the Leica colour camera, B: adjustment of the grey-scale corresponding to the lipid surface revealed by Nile Red, C: automatic calculation of lipid areas selected as pixels, D: adjustment of the grey-scale corresponding to the total surface of the larva and determination of the area as pixels.

The photographs were then treated by image analysis using Imaq Vision Builder version 6. Following conversion, using a previously-established script, the colours represented by grey-scale corresponded to the lipid surface revealed by Nile Red and the total surface of the larva (Fig. 1), the ratio of the surface of the image occupied by the lipids to the total surface of the larva was determined. This analysis was made on 50 individuals per tank.

#### 2.4. Structural biochemical index (triacylglycerols/sterols: TAG/ST)

A sample of larvae, varying from 50 000 to 200 000 according to their development stage, were taken on each second day. The larvae were collected on a (previously precombusted) GF/C filter and put in 6 ml tubes of Folch's liquid (2:1 chloroform:methanol) in which they were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Just before the analysis, all the samples were ground by sonification and centrifuged for 10 min at 100 rpm. Neutral lipid classes were analysed by HPTLC (high performance thin layer chromatography) using a CAMAG system, consisting of a sampler (TLC Sampler 4) and a reader (TLC Scanner 3). Silica plates (HPTLC plates silica gel 60, 10 20 cm, Merck) previously cleaned with a 1:1 hexane-diethyl ether mixture, were activated for 30 min at  $120^{\circ}\text{C}$ . The lipid samples ( $\approx 3\ \mu\text{g}$ ) were put through a double migration: first with a hexane-diethyl ether-acetic acid mixture (20:5:0.5), then with a hexane-diethyl ether mixture (97:3). The lipid classes appeared as black marks after the silica plates had been soaked in a solution of copper sulphate (3%)-orthophosphoric acid (8%) and heated to  $120^{\circ}\text{C}$  for 20 min. To quantify the lipid classes, a mixture of standards was deposited on each plate. This mixture of standards was prepared in similar proportions to those found in the neutral lipids of oysters: 58% menhaden oil for the triglycerides, 14% cholesterol for the sterols, 3% 1-octadecanol for the alcohols, 10% cholesterol palmitate for the sterol esters, 13% 1-0 hexadecyl-2,3 dipalmitoyl-rac-glycerol for the glyceride ethers and 2% stearic acid for the free fatty acids. Results were obtained by making readings at 370 nm and quantifying the marks with the Wincats program; the sterols and triglycerides were expressed in  $\mu\text{g}$  per larva.

#### 2.5. Larval condition index: relative organic matter content (OM/DW)

Depending on the larval stage, samples of  $n = 10\ 000$  to  $1000\ 000$  larvae, made in duplicate, were concentrated on a  $40\ \mu\text{m}$  sieve and rinsed with an aqueous isotonic solution of ammonium formate ( $32\ \text{g l}^{-1}$ ). After transfer into hemolysis tubes, the samples were preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The larvae were then transferred into an aluminium cap that had previously been weighed and burnt. Dry weight was obtained after 48 h in a drying oven at  $65^{\circ}\text{C}$ , and organic weight obtained by the difference in weight after 4 h in a muffle furnace at  $460^{\circ}\text{C}$ . The weights were measured to a precision of  $10\ \mu\text{g}$  on a microbalance (Sartorius, type CP225 D; 0.01 mg to 1 g).

#### 2.6. Statistics

In most cases data were analysed by one-way analysis of variance followed by Fisher's Least Significant Difference pairwise comparison ( $P < 0.05$ ); where necessary data were arcsine transformed to achieve

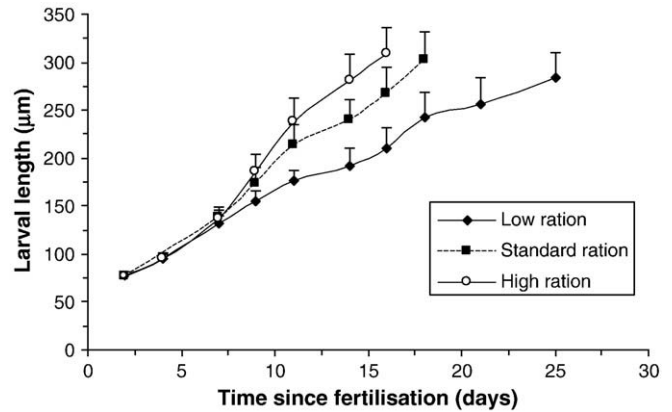


Fig. 2. Larval growth of *C. gigas* fed at three rations. Vertical bars represent standard deviations ( $n = 3$ ).

homogeneity of variance and normality. Analyses were performed using Statview 5, SAS Software. Data are summarized as mean  $\pm$  standard deviation of the mean.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of food ration

##### 3.1.1. Larval performances

The quantity of food supplied had a notable influence on the duration of the larval phase (Table 1). The higher the concentration of phytoplankton, the faster larval development took place and the shorter the pelagic phase overall. During the first week of rearing, no significant difference in growth was seen (Fig. 2): larvae measuring  $78\text{--}138\ \mu\text{m}$  by day 7, considering all diets together. Beyond this point in time, size differences became more marked between diets and growth rates statistically different. By day 14, the larvae on the lowest food ration measured only  $192\ \mu\text{m}$  mean length, compared with  $281\ \mu\text{m}$  for the larvae fed on the highest ration. The larvae fed the standard ration measured  $303\ \mu\text{m}$  in mean length on day 18. Those given the double ration measured  $309\ \mu\text{m}$  on day 16, but those on the half ration measured only  $283\ \mu\text{m}$  on day 25 (Fig. 2).

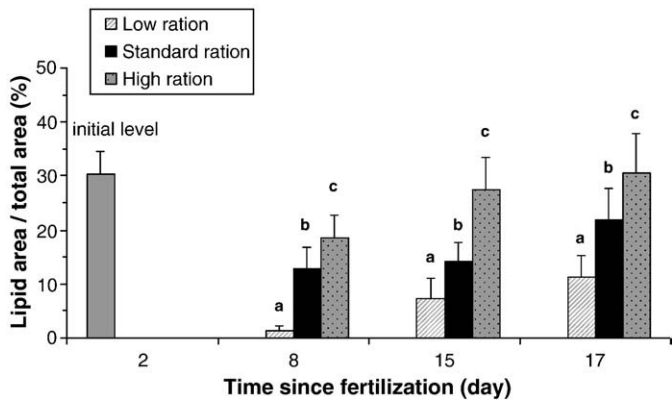
The double ration allowed a high percentage of larvae to reach competence (86%) after 16 days (Table 1). On the half ration, larval competence was only reached nine days later and by only about one third the number of larvae. Metamorphosis success was only 50% in the half ration treatment whereas it reached  $\approx 80\%$  with the standard ration and double ration, which were not significantly different from one another ( $P = 0.1609$ , Table 1). Survival was high for all three batches ( $> 86\%$ ).

##### 3.1.2. Overall lipid index

Results reveal a positive relationship between the quantity of food received and the levels of reserves accumulated (Fig. 3). In a 2-day-old larva, lipids covered about 30% of the surface. Then, regardless of the phytoplankton input level, these reserves were catabolised until day 8. This effect was very strong in the underfed (half ration) larvae, where

Table 1  
Performances (mean  $\pm$  standard deviation) in larval rearing of *C. gigas* fed at three increasing food rations. The values with the same letter in the same column are not significantly different at the 5% level.

Ration (cells $\mu\text{l}^{-1}\ \text{d}^{-1}$ )	Duration of rearing (d)	Survival to the end of rearing (%)	Growth rate ( $\mu\text{m d}^{-1}$ )	Competence (%)	Metamorphosis (%)
Half ration (25–100)	25	86 (5) <sup>a</sup>	9.0 (1.2) <sup>a</sup>	31.8 (1.3) <sup>a</sup>	49.7 (5.9) <sup>a</sup>
Standard ration (50–200)	18	96 (2) <sup>b</sup>	14.1 (1.9) <sup>b</sup>	43.6 (4.6) <sup>b</sup>	83.5 (2.3) <sup>b</sup>
Double ration (100–400)	16	94 (2) <sup>ab</sup>	16.5 (1.9) <sup>c</sup>	86.2 (3.2) <sup>c</sup>	79.7 (9.9) <sup>b</sup>

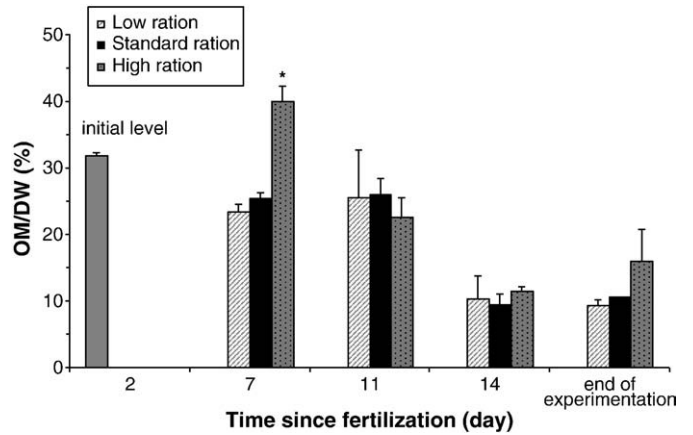


**Fig. 3.** Development of lipid reserves in *C. gigas* larvae fed at three rations. Vertical bars represent standard deviations ( $n = 3$ ). For each date, the values with the same letter are not significantly different at the 5% level.

the lipid surface was only 1.3% on day 8 compared with 13 and 19% for the reference and double ration diets, respectively. The larvae subsequently built up some reserves whatever the food ration (10%, 20–30%; Fig. 3) in proportion to the level at which they were fed.

**3.1.3. Index of larval condition (OM/DW)**

Larval dry weight increased progressively over the first week, the levels moving from around 100 ng larva<sup>-1</sup> at day 2 to 740–970 ng larva<sup>-1</sup> at day 7 (all diets considered together), without showing any significant differences between the three rations ( $P > 0.05$ ; Fig. 4a). From day 9, the effect of dietary ration became more marked, but the difference between treatments did not really develop until day 14. At this point, the low microalgal input led to larvae with a mean dry weight of 2100 ± 64 ng larva<sup>-1</sup> while a double ration led to a dry weight more than twice as large (4899 ± 332 ng larva<sup>-1</sup>). At the end of the planktonic phase, a larva fed at the highest rate weighed 7630 ± 820 on average compared with 4667 ±



**Fig. 5.** Evolution of the OM/DW ratio (%) in *C. gigas* larvae fed at three different rations. Vertical bars represent standard deviations ( $n = 2$ ). \* indicates a significant difference at the 5% level.

45 ng larva<sup>-1</sup> at the lowest food level. Dry weight always followed an exponential pattern with time, whatever the food level ( $DW = ae^{bt}$ ), with increasing speeds (b) in the order: half ration < standard ration < double ration. At the highest food level, the larvae showed weight increases twice as rapid as those of the underfed larvae.

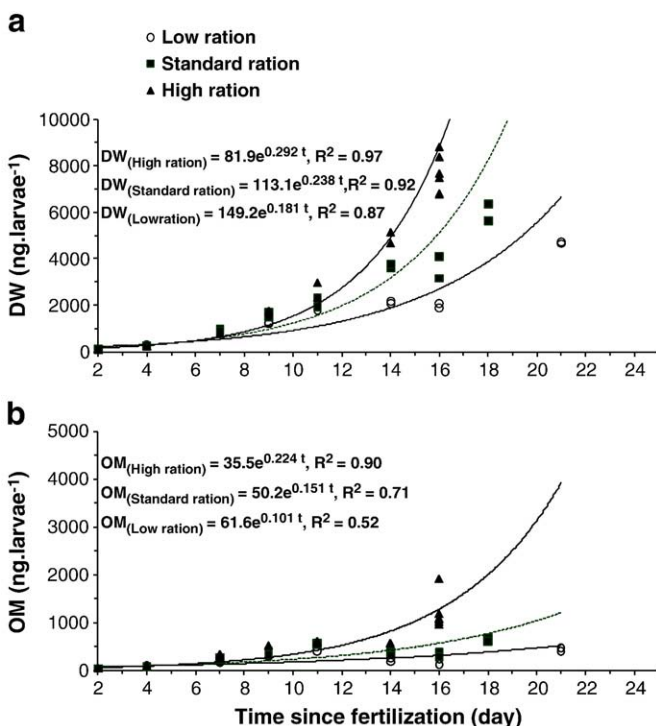
The same pattern was seen for organic matter, where the evolution over time showed differences from the second week according to food ration (Fig. 4b). The weight of organic matter went from 32 ng in a 2-day-old larva to 218 ± 64 ng larva<sup>-1</sup> and 562 ± 3 ng larva<sup>-1</sup> on day 14 in the larvae fed on the lowest and highest rations, respectively. At the end of larval rearing, a low microalgal input was associated with a very low organic matter level (431 ± 49 ng larva<sup>-1</sup>), while larvae fed the high ration had a value three times as large (1202 ± 359 ng larva<sup>-1</sup>). The slope of the equation modelling the increase in organic matter, therefore, showed that this increased about twice as fast in highly-fed individuals (Fig. 4b).

In 2-day-old D-larvae the OM/DW ratio was 32% (Fig. 5). By day 7, the larvae on the standard ration showed a slight decrease in this ratio (to 25%), but it then remained stable until day 11 (26%). Another decrease was then observed, to reach 9% on day 14. At the end of larval rearing, on day 18, the ratio was 11%. The same pattern was seen in larvae on the half ration, with no significant differences at any point in the experiment ( $P > 0.05$ ). The only difference revealed between treatments in the experiment was at day 7, when the larvae on double ration experienced a notable increase over the other two treatments to reach a value of 40%.

**3.1.4. Structural biochemical index: TAG/ST**

From the first week, the accumulation of triacylglycerols and sterols in the larvae was strongly dependant on the quantity of food supplied (Fig. 6a and b). In larvae on the lowest ration, triacylglycerol levels remained low and increased from 1.8 ± 0.1 ng larva<sup>-1</sup> on day 2 to only 27 ± 8 ng larva<sup>-1</sup> at the end of larval rearing (day 25) compared with increases to 214 ± 32 ng larva<sup>-1</sup> (day 18) and 237 ± 71 ng larva<sup>-1</sup> (day 16), in medium and high rations, respectively. The accumulation of triacylglycerols by a larva follows an exponential relationship with time and the rates of increase were increasingly greater in the order: half ration < standard ration < double ration. The accumulation of triacylglycerols was, therefore, 2.5 times faster in larvae receiving twice the standard ration compared with those receiving half the standard ration.

The same pattern appeared for the sterols, although there was a less marked nutritional influence. The values in larvae on the half ration increased from 0.4 ± 0.0 ng larva<sup>-1</sup> on day 2 to 14.2 ± 0.7 ng larva<sup>-1</sup> at the end of larval rearing, compared with 26.5 ± 3.9 ng larva<sup>-1</sup> on the standard ration and 29.4 ± 1.4 ng larva<sup>-1</sup> on the double ration (Fig. 6b). The accumulation of sterols by larvae over the course of their



**Fig. 4.** Evolution of dry weight (DW) and organic matter (OM) over the course of larval development in *C. gigas* fed at three rations ( $n = 2$ ).



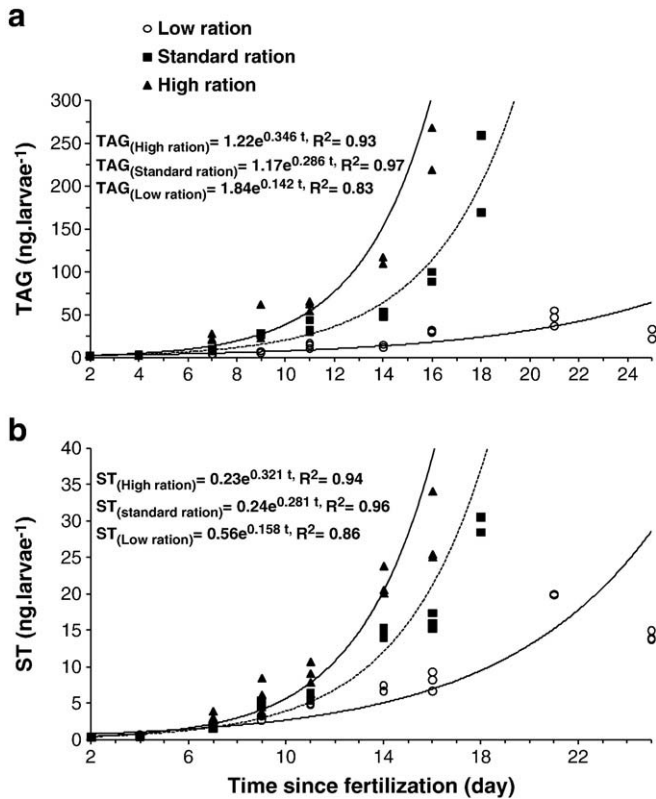


Fig. 6. Evolution of triacylglycerols TAG (a) and sterols ST (b) in *C. gigas* larvae fed at three rations ( $n=2$ ).

development followed an exponential law, with increasing speeds according to increasing ration once again—as in the triacylglycerols mentioned above (Fig. 6b).

A positive relationship was shown between ration level and the TAG/ST structural biochemical index (Fig. 7). With the lowest phytoplankton input, following an initial fall from 5 to 2 from the 2nd to the 7th day, values remained low and stable ( $\approx 2$ ) for the rest of larval development. Relatively stable values (5–6) were associated with the standard ration until day 11. They then dropped by day 14 (3) and increased once more (7) just before metamorphosis (Fig. 7). Finally, the double food ration was associated with higher values: the ratio varied little until day 11 (7–9), diminished by day 14 (6) and rose once more at the end of larval development (9).

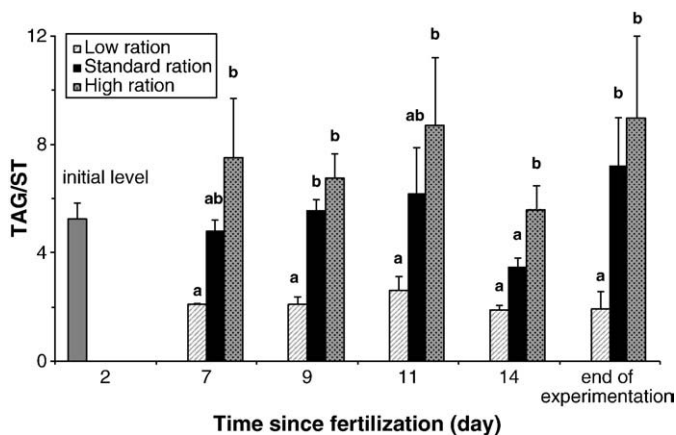


Fig. 7. Evolution of the structural biochemical index TAG/ST in *C. gigas* larvae fed at three rations. Vertical bars represent standard deviations ( $n=2$ ). For each date, the values with the same letter are not significantly different at the 5% level.

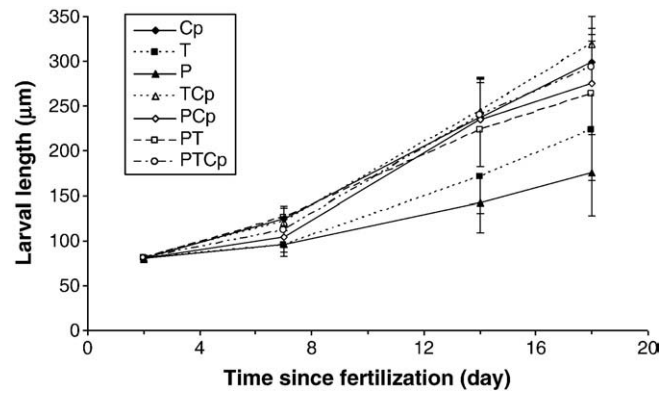


Fig. 8. Growth of *C. gigas* larvae fed on different species of microalgae or species mixtures. Vertical bars represent standard deviations ( $n=3$ ). P: *Pavlova lutheri*; CCAP 931/1, T: *Isochrysis affinis galbana*, Cp: *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*; PT, PCp and TCp: bi-specific mixtures mixed in equal proportions, with equal volume; PTCp: tri-specific mixture.

### 3.2. Effect of food quality

#### 3.2.1. Larval performances

For all the larval rearing batches raised on monospecific diets, only the Cp diet gave good larval performances (Fig 8, Table 2). With a growth rate of  $13.6 \mu\text{m d}^{-1}$ , 80% of the larvae were competent at day 18, and 82% postlarvae recorded at day 25. Apart from a lower survival (75%), these performances were similar to those of the control fed on a mixture of 3 species PTCp. Diets T and P gave poorer results, with 9 and  $6 \mu\text{m d}^{-1}$ , respectively, and the larvae never reached competence, despite good survival throughout larval rearing (70 to 80%). The same result was found with the mixture PT, which gave good growth ( $11.5 \mu\text{m d}^{-1}$ ) and survival (87%) to the end of larval rearing, nonetheless. On diet PCp, 28% of larvae were competent to metamorphose on day 18, giving 57% postlarvae. Finally, the best combination was TCp, with a growth rate of  $15 \mu\text{m d}^{-1}$ , 86% of larvae competent by day 18 and 83% postlarvae obtained (Fig. 8, Table 2).

At day 14, the larval lengths were between 142 and  $244 \mu\text{m}$  and in three significantly different groups: P, T and the group containing Cp, alone and in mixtures (Fig. 8). These differences between and within groups widened at day 18 and the larvae fed TCp were significantly larger than in the other treatments ( $320 \pm 30 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.0001$ ). In decreasing order, the different treatments can be classed as follows: TCp > Cp ( $299 \pm 32 \mu\text{m}$ ) = PTCp ( $293 \pm 43 \mu\text{m}$ ) > PCp ( $276 \pm 46 \mu\text{m}$ ) > PT ( $263 \pm 44$ ) > T ( $223 \pm 56 \mu\text{m}$ ) > P ( $175 \pm 47 \mu\text{m}$ ).

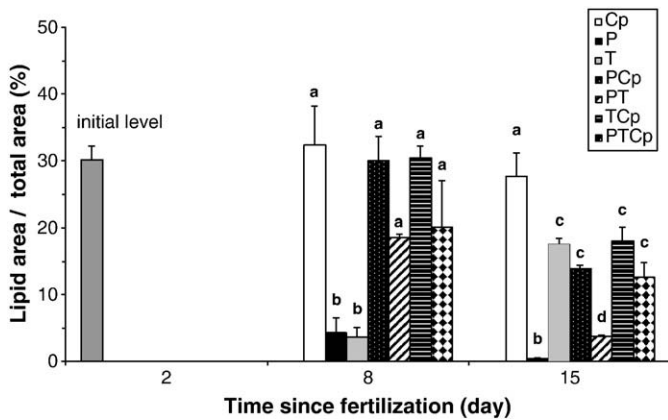
#### 3.2.2. Overall lipid index

On day 2, lipid reserves represented 30% of the larval surface (Fig. 9). When larvae received monospecific diets of *P. lutheri* (P) or *I. affinis galbana* (T) OLI decreased to 4% on day 8. This ratio dropped to 0.3% on

Table 2

Larval rearing performances (mean  $\pm$  standard error) of *C. gigas* fed on different species of microalgae and mixtures. P: *P. lutheri*; CCAP 931/1, T: *I. affinis galbana*, Cp: *C. calcitrans* forma *pumilum*; PT, PCp and TCp: bi-specific mixtures mixed in equal proportions, with equal volume; PTCp: tri-specific mixture.

Diet	Duration of rearing (d)	Survival to the end of rearing (%)	Growth rate ( $\mu\text{m d}^{-1}$ )	Competence (%)	Metamorphosis (%)
Cp	18	74.7 (8.5) <sup>a</sup>	13.6 (1.9) <sup>a</sup>	79.6 (5.3) <sup>a</sup>	82.0 (0.7) <sup>a</sup>
T	18	70.0 (11.7) <sup>a</sup>	8.9 (3.5) <sup>bc</sup>	***	***
P	18	80.2 (9.9) <sup>ac</sup>	5.9 (2.9) <sup>cd</sup>	***	***
TCp	18	90.5 (0.9) <sup>b</sup>	15.0 (1.9) <sup>ae</sup>	85.7 (7.2) <sup>a</sup>	79.4 (4.9) <sup>a</sup>
PCp	18	90.8 (2.8) <sup>b</sup>	12.2 (2.9) <sup>abe</sup>	28.3 (8.4) <sup>b</sup>	56.7 (6.9) <sup>b</sup>
PT	18	87.3 (0.3) <sup>bc</sup>	11.5 (2.8) <sup>abe</sup>	***	***
PTCp	18	90.7 (5.2) <sup>b</sup>	13.3 (2.7) <sup>ae</sup>	77.5 (5.6) <sup>a</sup>	83.3 (5.3) <sup>a</sup>



**Fig. 9.** Development of lipid reserves in *C. gigas* larvae fed on different species of microalgae or species mixtures. Vertical bars represent standard deviations ( $n = 3$ ). For each date, the values with the same letter are not significantly different at the 5% level. P: *P. lutheri*; CCAP 931/1, T: *I. affinis galbana*, Cp: *C. calcitrans forma pumilum*; PT, PCp and TCp: bi-specific mixtures mixed in equal proportions, with equal volume; PTCp: tri-specific mixture.

day 15 for larvae fed *P. lutheri* but lipid reserves represented 17% of the larval surface when larvae were fed *I. affinis galbana*. The larvae in treatments PCp and TCp showed stabilisation of this ratio during the first week of rearing (at 30%) and a decrease over the second week (to 14 and 18%, respectively). For the diets PT and PTCp, a more progressive OLI decrease was noted over time: a first decrease was seen during the first week (19 and 20% respectively) and a second, more marked decrease was seen in the larvae fed the PT diet in the second week (5%). In contrast, the rate of deposition of lipids was particularly high when larvae were fed *C. calcitrans forma pumilum* (Cp) with lipid reserves representing 33% of the larval surface on day 8 and 28% on day 15.

#### 4. Discussion

Throughout this study we analysed the relevance of indices describing the quality of larval rearing in *C. gigas*. Two of these indices aim to quantify the accumulation of neutral lipids in the larva. TAG (triacylglycerides) constitute the principal energetic reserves of oyster larvae (Whyte et al., 1987) and are preferentially catabolised in periods of starvation (Gallager et al., 1986). TAG content is also positively correlated with growth rate in *C. gigas* larvae (Waldock and Nascimento, 1979), *P. maximus* (Delaunay et al., 1992) and *P. magellanicus* (Pernet et al., 2006).

Nile Red is an excellent specific colorant for lipids (Greenspan and Fowler, 1985). Neutral and polar lipids are differentially coloured allowing energetic reserves (triacylglycerols and cholesteryl esters) to be easily identified and sterols to be coloured yellow in contrast to phospholipids, which emit a weak red-orange fluorescence (Greenspan et al., 1985; Brown et al., 1992; Castell and Mann, 1994). In the present study the evaluation of lipid reserves in *C. gigas* was performed in toto, according to the protocol of Castell and Mann (1994), initially developed for larvae of *C. virginica*, and also applied to larvae of *P. magellanicus* (Jackson, 1993). Using image analysis, the fluorescent surface and total surface of the larvae could be measured and quantified. The overall lipid index (OLI) is represented by the ratio between these two surfaces. OLI takes into account the variations in size and allowed the development of lipid reserves and their management over time to be followed throughout this work. The effect of the phytoplankton ration on the laying down of reserves in veligers was therefore clearly demonstrated, the overall lipid index being partially or totally correlated with larval development performances. Underfed larvae showed low levels of lipid reserves (OLI = 1 to 10%) accompanied by lower growth, competence and metamorphosis ( $9 \mu\text{m d}^{-1}$ , 32% and 50%, respectively). Inversely, larvae that received the highest ration had characteristically high lipid

reserves (OLI = 15 to 30%), which coincided with the best performances (growth of  $16.5 \mu\text{m d}^{-1}$  and 80% metamorphosis). The same patterns were seen in response to the food quality of different microalgae or their mixtures. A diet based solely on *P. lutheri* led to particularly poor lipid reserves (OLI = 0.3 to 4%) accompanied by low larval performance ( $6 \mu\text{m d}^{-1}$  and no metamorphosis), while feeding with mixtures including the diatom *C. calcitrans forma pumilum* led to high lipid reserve levels and good larval development ( $>12 \mu\text{m d}^{-1}$ , metamorphosis  $>55\%$ ). However, this relationship between OLI and zootechnical performances is not absolute as, for example, the standard ration generated less lipid reserves than the double ration but had the same levels of larval survival and metamorphosis. As this index is based on the surface ratio, it does not take into account the intensity of coloration and, therefore, the concentration of the lipids. This explains why it is so highly influenced by larval size, as it probably represents the growth of the digestive gland, a storage organ for lipids in larvae. In contrast to classic biochemical analyses, the technique is simple, quickly performed and uses little biological material. However, this OLI has limitations in terms of application because it requires special equipment (epifluorescence) and fine and reproducible microscope regulation (filters, magnification, light, etc.). A detailed adjustment of the colour camera parameters (gain, exposure, colour saturation, etc.) must also be set up beforehand to obtain uniform image acquisition within an experimental series. It should also be noted that though we optimised the yellow fluorescence, and therefore the neutral lipid measurement, with the  $<500 \text{ nm}$  excitation filter, we did not filter the emission colour, and the values of total fluorescence could be influenced by background noise from phospholipids giving weak red emissions. In the same way, the position of the larva with respect to the image plane is also a source of variation in the measurement of surfaces, and three-dimensional microscopy (confocal) of the larval surface could, therefore, represent an interesting alternative. This method, allowing the viewing of the whole animal by sweeps of a laser, could offer a better estimation of lipid reserves than a conventional microscope where only a single cutting plane of an object is analysed. A new overall lipid index could then be developed, as the ratio between the volume of the image occupied by the lipids over the total volume of the individual.

The second index used to represent the concentration of neutral lipids in the larva was the TAG/ST ratio. Because sterols are structural lipids that vary little in the overall mass, they were chosen as a reference to compare larvae of different size. Their concentration in the membrane structure varies little except with temperature, enabling fluidity to be maintained (Róg et al., 2009). Sterols were favoured over phospholipids as the latter are more sensitive to the nutritional factor due to their energetic role in early larval stages and periods of starvation (Fraser, 1989; Delaunay et al., 1992), making the use of the TAG/PL ratio less appropriate for the estimation of larval quality. Our results demonstrated that the TAG/sterol ratio of *C. gigas* larvae was highly quantitatively dependant on the food ration. This index thus varied from 2 to 5 over larval development in larvae on the lowest ration and from 6 to 9 in larvae on the highest ration. These results agree with those of Farias et al. (2003) who described this ratio as sensitive to variation in food availability and as giving information on nutritional status of individuals rather than their physiological status. This correlation should be strong, as Hakanson (1989) showed that a ratio below 0.2 indicates a severe food deficiency in anchovy larvae *Engraulis mordax*, which causes severe irreversible effects. No such limit was recorded in the present study on the larvae of *C. gigas*, because, even for the underfed larvae, the lowest values of this ratio remained above this threshold and the larvae were able to survive, develop and metamorphose, though to a lesser extent than the better-fed treatments. Additionally, according to Pernet et al. (2003), a positive relationship was revealed between TAG/ST ratio measured on the 8th day after fertilisation and the percentage of competence achieved (number of larvae ready for metamorphosis). Paradoxically, according to the same authors, this ration was negatively correlated

with metamorphosis success, suggesting that larvae in good physiological condition spend more time searching for a suitable substrate for settlement, in contrast to larvae in poorer condition, which settle as soon as they have found a substrate. In the present study a decrease in the TAG/sterols ratio was noted on the 14th day, whatever the food ration supplied. For the standard and double ration diets, this decrease at the end of larval rearing could be explained by the mobilisation of reserves leading to a decrease or even a halt in ingestion for the metamorphosis process (Rico-Villa et al., 2006). This pattern did not occur at the lowest food ration, where competent larvae only appeared 10 days later.

The effect of food ration can also be seen to affect these two lipid indices from days 7–8, which is compatible with short phases of endotrophy and mixotrophy. *C. gigas* larvae are therefore capable of ingesting algae as early as the D-stage, this is to say 24 h after fertilisation (Lucas and Rangel 1983), while the mixotrophic phase lasts 4–5 days at rearing temperatures between 22 and 30 °C (Rico-Villa et al., 2009). It is also interesting to note that at the end of rearing, the effect of algal ration on the settlement percentage became weak or non-existent from a certain threshold (here 200 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Similarly, Pernet et al. (2004) demonstrated that when *Isochrysis* and lipid microspheres impregnated with triacylglycerols were given to *Mytilus edulis* larvae just before metamorphosis, this led to an increase in larval triacylglycerol content that depended on the initial proportion of this compound in the food, but which provided no additional benefit for settlement.

Finally, our results show that the third index, OM/DW, was inadequate for representing the observed differences in performance. Despite an accumulation of dry and organic matter that was twice as fast in the highly-fed larvae compared with the underfed ones, the values of OM/DW ratio were not significantly different. Although valid for adults (Walne and Mann, 1975; Bodoy et al., 1986), OM/DW seems to be a poor indicator for *C. gigas* larvae, probably due to an erroneous estimation of organic matter. The method makes an overestimation of organic matter by integrating the organic weight of the shell. As Walne and Millican (1978) reported that the shell of *C. gigas* spat can contain 3 to 5.2% organic matter and, taking into account its weight, this organic fraction can represent 35 to 59% of the total organic matter of the animal. This index is probably better at conveying the relationship of flesh to shell than representing larval quality. The results of the present study, therefore, clearly demonstrate that the OM/DW is not suitable for the evaluation of larval performances in *C. gigas*. The two other indices, however, rely on the evolution of lipids over time. OLI and TAG/ST are correctly correlated with zootechnical performances, confirming both the qualitative and quantitative importance of lipids in the early life stages of molluscs. Concerning the quality of lipids, bivalves are known to have high concentrations of PUFA and especially *n*–3 (Knauer and Southgate, 1999) and although, among these, the importance of DHA and EPA is generally recognised, the specific needs of larvae and juveniles of different species of mollusc is not yet clearly established (Volkman and Brown, 2006).

Our results also showed unequivocally that feeding with *C. calcitrans* forma *pumilum* (Cp) alone gave better larval development, competence and metamorphosis results than other single species diets. Results with this microalga alone were sometimes equivalent or better than a mixed diet, confirming previous findings with the same species (Millican and Helm, 1973; Nascimento, 1980). Additionally our results agree with those of Helm and Laing (1987) and Utting and Spencer (1991), which recommend the use of the bi-specific mixture TCp to obtain optimal performance in *C. gigas* larvae from the earliest age (2nd day). Another interesting point is that the bi-specific TCp diet leads to the same larval development performances as the tri-specific PTCp diet, as already suggested by Rico-Villa et al. (2006). In contrast, the other monospecific diets, *P. lutheri* (P) and *I. aff. galbana* (T), as well as their combination (PT), did not allow the production of competent larvae after 18 days of rearing. At the beginning of rearing

(day 8), it was noted that larvae fed on either of these microalgae had a very low overall lipid index (less than 5%), which could be explained by a very low ingestion of these species.

The inadequacy of *P. lutheri* due to its lack of ingestion by *C. gigas* larvae and postlarvae has already been seen in other studies (Ponis et al., 2003; Ponis et al., 2006). Additionally, the two flagellates used in our study have the same lipid content and their quantitative contribution of long-chain PUFA is similar (Chu and Webb, 1984; Langdon and Waldock, 1981; Delaunay et al., 1992). When these species are associated with *C. calcitrans* forma *pumilum*, the overall lipid index of the larvae is increased, but remains lower than that achieved with the diatom alone by the end of rearing. These results confirm that the larvae of *C. gigas* preferentially ingest this diatom compared with the two Prymnesiophyceae, despite the similar size of these microalgae (Rico-Villa et al., 2006). In the more advanced stages of larval development, a higher overall lipid index seems to indicate that *I. aff. galbana* is better ingested than *P. lutheri*. Whether it is supplied alone or in a mixture, the nutritional contribution of *P. lutheri* to *C. gigas* larval growth and development is low. *P. lutheri* is, therefore, of limited interest for feeding this oyster species during its larval stages.

## 5. Conclusion

The experiments reported here showed that:

1. The best development of *C. gigas* larvae was recorded at the highest food level supplied. This performance was accompanied by the highest lipid deposition expressed through TAG/ST ratio as well as through OLI and, both lipids indices were well correlated with zootechnical performances.
2. When fed *P. lutheri* or *I. aff. galbana*, poor larval development and a low lipid deposition were reported, while *C. calcitrans* f. *pumilum* allowed good larval development and high lipid storage maintenance throughout larval life, whether it was supplied alone or in combination with other species.
3. In contrast OM/DW does not appear to be suitable for the evaluation of larval performances in *C. gigas*.

## Acknowledgements

This work could not have been completed without the technical support of the team at the Argenton Ifremer station—C. Mingant, I. Quéau, L. Lebrun and P. Le Souchu—and the help of a project student A. Henocq, all of whom we wish to thank. We are also grateful to the Tunisian Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, the French Embassy in Tunis and the Centre Régional des Œuvres Universitaires et Scolaires de Rennes, who contributed to the funding of the doctoral visit of one of the authors to France.

## References

- AGRESTE, 2005. AGRESTE Primeur, premier recensement de la conchyliculture 2001. Agreste Cahiers n°1, février 2005, 89pp.
- Auby, I., Maurer, D., 2004. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon-Rapport final. R.INT.DEL/AR 04.03, 201 p.+ Annexes.
- Baker, S.M., Mann, R., 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 181, 223–253.
- Bodoy, A., Prou, J., Berthomé, J.P., 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Haliotis 15, 173–182.
- Brown, W.J., Sullivan, T.R., Greenspan, P., 1992. Nile Red staining of lysosomal phospholipid inclusions. Histochemistry 97 (4), 349–354.
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., Gouletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. J. Shellfish Res. 28 (4), 813–820.
- Castell, L.L., Mann, R., 1994. Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. Aquaculture 119 (1), 89–100.
- Chu, F.L.E., Webb, K.L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 110, 229–236.
- Coon, S.L., Fitt, W.K., Bonar, D.B., 1990. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 106 (3), 379–387.



- de Pontual, H., Robert, R., Miner, P., 1998. Study of bivalve larval growth using image processing. *Aquac. Eng.* 17, 85–94.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163 (2), 209–219.
- Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture* 228 (1–4), 289–305.
- Fraser, A.J., 1989. Triacylglycerol content as condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 46, 1868–1873.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1981. Use of lipid-specific staining techniques for assaying condition culture bivalve larvae. *J. Shellfish Res.* 1, 69–73.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986. Individual variability in lipid content of bivalve larvae quantified histochemically by absorption photometry. *J. Plankton Res.* 8 (5), 927–937.
- Gallager, S.M., Mann, R., Sasaki, G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56 (2), 81–103.
- Greenspan, P., Fowler, S.D., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* 26 (7), 781–789.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile Red, a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100 (3), 965–973.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Explor. Mer.* 47, 399–403.
- Hakanson, J.L., 1989. Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Mar. Biol.* 102, 143–151.
- Haws, M.C., DiMichelle, L., Hand, S.C., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the Eastern oyster *Crassostrea virginica* and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2 (4), 207–217.
- Helm, M.M., Laing, I., 1987. Preliminary observations on the nutritional value of Tahiti *Isochrysis* to bivalve larvae. *Aquaculture* 62, 281–288.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. In: Lovatelli, A. (Ed.), FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations Publishing, Rome, Italy, 177 pp.
- His, E., Maurer, D., 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture* 69 (1–2), 185–194.
- Jackson, D.L., 1993. Use of Nile Red as a histochemical technique for monitoring physiological condition of bivalve larvae. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* 93–4, 32–34.
- Knauer, J., Southgate, P.C., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 7, 241–280.
- Langdon, C.J., Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diet on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 62, 431–448.
- Lucas, A., Rangel, C., 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture* 30 (1–4), 369–374.
- Lucas, A., Chebab-Chalabi, L., Aldana-Aranda D., 1986. Transition from endotrophy to exotrophy in the larvae of *Mytilus edulis*. *Oceanol. Acta* 9 (1), 97–103.
- Millican, P.F., Helm, M.M., 1973. Preliminary observations on the culture of the larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *ICES, C.M.—1973/K—33*, 10 pp.
- Nascimento, I.A., 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. *J. Cons. Inter. Explor. Mer* 39 (2), 134–139.
- Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 2003. Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 134 (4), 599–613.
- Nicolas, L., 1999. Etude sur la métamorphose et le développement postlarvaire de la coquille St Jacques, *Pecten maximus* en éclosion. *Eléments de comparaison avec l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat, Université de Brest, 224 pp.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P., 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of intensively reared 5-month-old diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquat. Biol.* 7 (3), 229–241.
- Pernet, F., Tremblay, R., Bouget, E., 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part I: Broodstock conditioning and young larval performance. *J. Shellfish Res.* 22 (2), 365–375.
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Mar. Biol.* 144 (4), 693–703.
- Pernet, F., Bricelj, V.M., Cartier, S., 2006. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 329 (2), 265–280.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., 2003. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 221 (1–4), 491–505.
- Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Le Coz, J.R., Mathieu, M., Robert, R., 2006. Nutritional value of six pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture* 254, 544–553.
- Pouvreau, S., Maurer, D., Auby, I., Soletchnik, P., Mille, D., Bernard, I., Bédier, E., 2008. Temporal variability in the Pacific oyster spatfall along the French coast: a new monitoring project. *PHYSIOMAR 08 1–4 September 2008, Brest, France, Book of Abstract*, 147–147.
- Powell, E.N., Bochenek, E.A., Klinck, J.M., Hofmann, E.E., 2002. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modelling approach. *Aquaculture* 210 (1–4), 89–117.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256 (1–4), 377–388.
- Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery techniques: current situation for the oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus*. *Aquat. Living Resour.* 12 (2), 121–130.
- Robert, R., Nicolas, L., Moisan, C., Barbier G., 1999. Morphological and biochemical characterizations of the great scallop *Pecten maximus* metamorphosis. *C.R.A.S. Acad. Sciences. Serie 3, Sciences de la Vie* 322 (10), 847–853.
- Robert, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Kaas, R., Martin-Jézéquel, V., Moal, J., Le Coz, J.R., Nicolas, J.L., Bernard, E., Connan, J.P., Le Dean, L., Gourrierc, G., Leroy, B., Quéré, C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage, RI DRV/RA-2004-05, 149 pp.
- Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M., 2009. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 97–121.
- Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, F., Quéré, C., Moal, J., Muzellec, M.L., Mazuret, M., Samain, J.F., 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262, 410–418.
- Utting, S.D., Spencer, B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Laboratory Leaflet MAFF Fisheries Research of Lowestoft, No. 68. 31 pp.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., 2006. Nutritional value of microalgae and applications. In: Subba Rao, D.V. (Ed.), *Algal Cultures, Analogues of Bloom and Applications*. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp. 407–457.
- Waldock, M.J., Nascimento, I.A., 1979. Triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Mar. Biol. Lett.* 1 (2), 77–86.
- Walne, P.R., 1966. Large scale culture of larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest.*, II 25, 1–52.
- Walne, P.R., Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In: Barnes, H. (Ed.), *Proceedings of the ninth European Marine Biology Symposium*. Aberdeen University Press, Aberdeen Scotland, pp. 587–607.
- Walne, P.R., Millican, P.F., 1978. Condition index and organic content of small oyster spat. *Journal du Conseil* 38 (2), 230–233.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N., Hodgson C.A., 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the Scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113 (2), 113–124.







# Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices

## Part B: Effects of temporary food deprivation

R. Ben Kheder, C. Quéré, J. Moal, R. Robert \*

Ifremer, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Station Expérimentale d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez, et Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 February 2010

Received in revised form 27 August 2010

Accepted 30 August 2010

#### Keywords:

*Crassostrea gigas*

Larvae

Growth

Metamorphosis

Starvation

Lipids

### ABSTRACT

In the natural environment bivalve larvae are exposed to variable conditions and can therefore face periods of food shortage. To understand the resistance of early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), larvae were experimentally starved for 4 days at different periods of their development, and the resulting variations in their lipid reserves then analysed using image analysis and biochemical techniques. Faced with a temporary lack of food, the larvae halted their growth in size and weight and started to live off their lipid reserves; this effect was highly marked when the period of food deprivation was at the beginning of larval rearing, but was less marked when food deprivation was after day 14. The larvae conserved their developmental capacity despite these starvation treatments: when feeding was resumed, the larvae started to grow once more, rebuilt their reserves and showed a survival rate between 45 and 91% to the end of the experiment. Apart from the treatment where larvae were starved between days 6 and 10, high percentages became competent (56–85%) leading to a metamorphosis rate of 58–93%. Coloration of neutral lipids with Nile Red, followed by their quantification using image analysis to calculate lipid surface relative to total larval surface (OLI: overall lipid index) was particularly suited to studying the evolution of reserves through larval development. Results collected in this way supported those obtained in parallel using biochemical tests: triacylglycerols/sterols ratio (TAG/ST). The image analysis method offers the advantage of requiring less biological material to obtain a result; the correlation coefficient between OLI and TAG/ST ratio was 0.75.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The technical knowledge underlying the controlled reproduction of bivalves is relatively recent, as it dates from the 1960s (Loosanoff and Davis, 1963; Walne, 1974), and despite the unquestionable progress that has been made in genitor conditioning, phytoplankton production and developments in rearing of larval and postlarval stages (Helm et al., 2004), hatchery production techniques are still not fully defined for most economically important species. *Crassostrea gigas* has become a species of vital importance for world shellfisheries, and accounts for 99% of oyster production in France (FAO, 2008). Although the majority of cultivated oysters originate from natural recruitment (5.6 billion wild captured spat: 80% of the supply), the demand from hatchery juveniles continues to increase (1.4 billion in 2008). This expansion has occurred due to the interannual variation and, therefore, unreliability of natural spat collection in the production basins. Producers have also shown a growing interest in new products for shellfish farming such as triploids, which offer reduced

fertility, increased growth and potentially a greater resistance to summer mortality (Samain and McCombie, 2007).

Because the larval stages are presently thought to be the most critical stages in the life of bivalves and despite a high level of technical know-how in commercial hatcheries today, many biological questions on these stages remain unanswered. This means that, as yet, there are no suitable condition indices for bivalve larvae that allow quality and success of larval growth and/or metamorphosis to be predicted. Among environmental factors, food supply has been shown to have a predominating effect on larval development in many previous studies (His et al., 1989; Robert et al., 2004; Rico-Villa et al., 2006, 2009). Moreover, in the natural environment, the concentration and quality of phytoplankton resources fluctuate continually on both spatial and temporal scales. Larvae can therefore be faced with a shortage or even an absence of food during certain phases of their development. Little information is available today on the effects of starvation on marine invertebrate larvae, particularly by controlled experiments on bivalve molluscs. Invertebrate larvae have been reported to have a generally high tolerance of food deprivation, and survival rates are relatively high in individuals exposed to such stress (Qiu et al., 1997; Moran and Manahan, 2004; Böer et al., 2006). Thus, no effect of larval survival or nutritional capacity was detected after

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 89 51 05; fax: +33 2 98 89 57 77.  
E-mail address: [rene.robert@ifremer.fr](mailto:rene.robert@ifremer.fr) (R. Robert).

33 days without food in the study by Moran and Manahan (2004), while His and Seaman (1992) found that larvae reached a 'point of no return' after 4 days stress at the beginning of development, and similar results were found in *Ostrea edulis* by Labarta et al. (1999b). A temporary absence of food resources during the larval phase has been seen to alter growth and survival in *Crepidula onyx* (Zhao et al., 2003), and even to affect growth of juveniles post metamorphosis in *C. fornicata* (Pechenik et al., 2002). Results on food deprivation in the same species are accordingly contradictory between studies. Moreover these previous studies reported only the effects of starvation on growth and survival.

However, some physiological indices have shown to be very informative. Thus, several quality indices have been described for marine organisms and most of these emphasize the importance of lipids, particularly triacylglycerols in the case of bivalve physiology (Waldock and Nascimento, 1979; Gallager et al., 1986; Whyte et al., 1987; Castell and Mann, 1994; Soudant, 1995; Pernet, 2003). The importance of these compounds in larvae is shown by their accumulation in the tissues under conditions with abundant trophic resources, and their catabolism in cases of trophic stress (Holland, 1978) or at critical points of development, such as embryogenesis and metamorphosis (Haws and DiMichele, 1993; Labarta et al., 1999a; Robert et al., 1999). To study the evolution and relevance of some physiological indices throughout the pelagic cycle in *C. gigas*, a recent study was carried out under different feeding conditions (Ben Kheder et al., 2010). The triacylglycerol/sterol (TAG/ST) ratio was shown to be closely related to the feeding level as did the second index, the overall lipid index (OLI), corresponding to the ratio of the area of lipids, revealed by Nile Red coloration of whole larvae, to the total larval surface. The third index tested was that of larval condition (organic matter/dry weight), previously described as a good indicator of larval competence in the mussel *Mytilus edulis* (Lucas et al., 1986a) and scallop *Patinopecten yessoensis* (Whyte et al., 1987), and a good indicator of metamorphosis in *C. gigas* (His and Maurer, 1988).

We decided to use the same physiological indices to look at the effects of a marked stress on larval development, and planned the present study to examine the effect of starvation stress during this critical phase. All of the previous studies dedicated to mollusc starvation concentrate on an early starvation period imposed following the end of embryogenesis; no information is therefore available on the effects of food deprivation occurring later in larval development. The objective of the present study was therefore to examine the effects of a temporary period of starvation of 4 days applied at different times during larval development on larval rearing performances and the expression of three physiological indices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Broodstock conditioning, larval development and competence

The techniques used in this study were previously described in Ben Kheder et al. (2010), so only a brief outline will be given here. The larvae were produced from genitors conditioned using tested methods: open circuit, 19 °C, feeding at 6% of oyster dry weight with a mixture of microalgae (in equal quantity at an equivalent volume) *Isochrysis affinis galbana* (T. Iso = T, strain CCAP 927/14), *Chaetoceros gracilis* (Cg, strain Utex LB 2375) and *Skeletonema marinoi* (S, strain CCAP 1077/3). The larvae were reared at a density of 5 larvae ml<sup>-1</sup>, in cylindro-conical tanks of 30 or 150 L according to the part of the trial. Batches were reared sequentially with total water replacement every 2–3 days. The seawater, filtered to 1 µm, was maintained at 24 ± 1 °C, ambient salinity (34 ppm). The nutritional input was made up, in equal volume parts of a mixture of T. Iso and *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (CCAP 1010/05 (Cp)), which was fed daily at a concentration of 50 cells µl<sup>-1</sup> during the first week and 100 cells subsequently. Light air bubbling (0.5 l min<sup>-1</sup>), from the

base of the cone was used throughout larval rearing to mix the algae and larvae in the water column and avoid accumulation of organic matter that could encourage the development of bacteria.

Larval mortality was assessed and survival rates calculated on days 6–7, 14 and at the end of larval rearing. Growth was studied every 4 days by image analysis of samples of 200–300 larvae fixed in formaldehyde (5%) and photographed using Win Imager software under an inverted microscope to determine the surface area and length of each larva (de Pontual et al., 1998).

Towards the end of the pelagic phase of development the larvae considered competent, i.e., those with a foot and an eye spot, were counted. When their number exceeded 40%, a selective sieving was made on a 225-µm screen. Competent larvae were put separately in 30-l tanks in which plastic discs for settlement of 15-cm diameter had been placed. Rearing conditions were similar to those maintained during larval development. Larvae were then fed on an equal volume mix of *Isochrysis affinis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* fed daily at a concentration of 100–150 cells µl<sup>-1</sup>. After 5 days, the percentage metamorphosis was calculated indirectly by the estimation of the number of free non-settled larvae (swimming and dead).

### 2.2. Experimental trials

Short periods of food deprivation were imposed at different times during larval life on a series of treatment batches. These periods of starvation started at 2, 6, 10, 14, and 18 days after fertilisation and lasted 4 days each, after which the larvae were fed once more; treatments were named D2D6, D6D10, D10D14, D14D18 and D18D22, respectively. There were also two types of control: the first was fed on the reference ration TCp throughout the larval rearing period, and the second was left unfed throughout the experiment. In total, seven treatments were applied in triplicate and this kind of experimental design was carried out twice, once in spring and once in summer using different larval batches. During the first experiment, the larvae were reared in triplicate, exclusively in 30-l tanks, and lipids were measured by OLI alone. In the second experiment, which was more comprehensive, the reared batches were studied using all three physiological indices: overall lipid index (OLI), structural biochemical index (TAG/ST) and larval condition index (OM/DW). The experiment was conducted in three 30-l and two 150-l cylindro-conical tanks. The 30-l tanks served as control references for monitoring larval development, because the larval density remained almost constant throughout the rearing period. The 150-l tanks were used for the biological samples (physiological indices) which required a greater number of larvae. The effect of tank volume (30-l vs. 150-l) had previously been tested and no significant effect on larval performances detected (Robert, unpublished data).

The effect of food deprivation on larval development and metamorphosis success was measured considering that the end point of larval rearing was when 40% of larvae had eyespots.

### 2.3. Physiological indices

The three indices were previously described in detail in Ben Kheder et al. (2010) so we will provide only an outline here.

#### 2.3.1. Overall lipid index

The lipid reserves of *C. gigas* larvae were stained according to the protocol of Castell and Mann (1994). After a 90 min contact time with Nile Red, the larvae were rinsed in filtered seawater and fixed in formaldehyde (95%). Microscopic examination and photography was done within the following 4 h to avoid any decrease in fluorescence. The photographs were then treated by image analysis using Imaq Vision Builder version 6, with a batch treatment function. The images were converted, using a previously-established script, so that colors

were represented by a grey-scale corresponding to the lipid surface revealed by Nile Red and the total surface of the larva, represented in pixels. From these two values, the ratio of the surface of the image occupied by lipids to the total surface of the larva was determined. This analysis was made on a sample of 50 individuals per tank.

### 2.3.2. Structural biochemical index (triacylglycerols/sterols: TAG/ST)

Every 4 days, depending on the larval stage, samples of larvae ( $n=50000$  to  $200000$ ) were collected on GF/C filter (previously burned at  $450^\circ\text{C}$ ) and put in 6-ml tubes of Folch's liquid (2:1 chloroform:methanol) in which they were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Neutral lipid classes were analysed by HPTLC (high performance thin layer chromatography) using a CAMAG system consisting of a sampler (TLC Sampler 4) and a reader (TLC Scanner 3). Results obtained after taking readings at 370 nm and quantifying the marks with the Wincats program were expressed in  $\mu\text{g}$  sterols and triglycerides per larva (Ben Kheder et al., 2010).

### 2.3.3. Larval condition index: relative organic matter content (OM/DW)

Every 4 days, depending on the larval stage, samples of  $n=10000$  to  $1000000$  larvae, made in duplicate, were concentrated on a  $40\text{-}\mu\text{m}$  sieve and rinsed with an aqueous isotonic solution of ammonium formate ( $32\text{ g l}^{-1}$ ). After transfer into hemolysis tubes, the samples were preserved at  $-20^\circ\text{C}$  until use. The larvae were then transferred into an aluminium cap that had previously been weighed and burnt at  $450^\circ\text{C}$ . Dry and organic weights were taken on a microbalance after treatment in a drying oven at  $65^\circ\text{C}$  and muffle furnace at  $450^\circ\text{C}$ , respectively.

## 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were made in Statview 5. Significant differences were detected between the means at the 5% threshold using ANOVA and an *a posteriori* multiple comparison test between the means (Scheffe's test), after transformation of percentage data by the function [ $\arcsin(\text{racine } xi/100)$ ].

## 3. Results

### 3.1. First experiment

#### 3.1.1. Larval performances

The rearing of the control larvae under continuous food deprivation conditions was continued until day 21, with a high survival rate of 80% (Table 1). It is interesting to note that 91% of these larvae were still alive at the end of the second week and that this survival rate was similar to that of the continuously-fed control and sometimes higher than those of the treatments that only experienced temporary starvation (e.g., D6D10 and D10D14). Treatments D6D10 and D10D14 led to a significant drop in survival following the food deprivation period, as only 58–64% of larvae survived after 2 weeks of rearing, compared with 96% in the continuously-fed control (Table 1,  $p<0.0001$ ). However, while re-feeding caused mortality to stabilise in

D10D14, at a level similar to the control ( $p=0.3214$ ), survival of the individuals starved between days 6 and 10 (D6D10) continued to decrease significantly, even after re-feeding, to reach 45% at the end of the experiment, compared with 76% in the fed control ( $p<0.0001$ ). For the other treatments, survival to the end of rearing was between 76 and 85% and was not significantly different from the control (Table 1,  $p>0.05$ ).

Apart from the larvae deprived of food throughout rearing and those deprived of food between days 6 and 10, neither of which achieved metamorphosis within the time provided, all the other treatments enabled larvae to become competent, although there was a time-lag of a few days, according to the treatment (Table 1). Competent larvae were observed at day 16 in the control and in the early (D2) and very late (D14) food deprivation treatments. It was delayed until day 21 in the other treatments.

Metamorphosis percentages were generally high ( $>58\%$ , Table 1). The continuously-fed control reached 74%, which was statistically similar to the percentage reached in the D10D14 batches (63%). In contrast, the larvae deprived of food at the end of larval development (D14D18) showed a significantly lower metamorphosis percentage (58%), while those deprived early in development (D2D6) suffered no detrimental effects to metamorphosis and even showed a significantly higher percentage (93%) than the continuously-fed control.

As for larval development, a slowing or even a complete halt in growth was observed in larvae as soon as feeding stopped, whatever the period of rearing (Fig. 1). Larvae continued their development as soon as feeding was resumed. When food deprivation was experienced at the start of rearing (D2D6) compensatory growth occurred rapidly, but when the food deprivation period was imposed beyond the first week of rearing (D6D10), subsequent development was slower. When food deprivation was during the second week of rearing (D10D14), the larvae only achieved a final size equivalent to the control after 21 days (compared with 14 days for the fed control). When the deprivation period was late in larval development (D14D18), a slowing of growth was noted between days 14 and 16, but this could not be attributed to lack of food as the same change was seen in the controls, just before metamorphosis (Fig. 1).

#### 3.1.2. Overall lipid index

On day 2, endogenous lipids occupied 22% of the larval surface (Fig. 2). After day 2, the reserves were intensively consumed during the first week in all treatments, going down to 0–3%, (including the controls) and were then reconstituted in all except larvae in continuous food deprivation (data not shown). In the fed control, the reserves were rapidly restored to their initial level by day 10 (20%) and this level was maintained until day 14. At day 16, just before metamorphosis, this lipid ratio doubled, reaching 42% of the larval surface (Fig. 2). When food deprivation had been imposed early in development (D2D6 and D6D10), the physiological response was immediate, leading to the consumption of the entirety of the reserves, but as soon as they were fed again, the larvae built their resources up again just as fast. Their lipid reserves continued to increase progressively to reach 34% for D2D6 and 25% for D6D10 at the end

**Table 1**  
Survival, competence and metamorphosis (mean  $\pm$  SD;  $n=3$ ) of *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (first experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p>0.05$ .

Treatments	Larval life (days)	Larval survival (%)			Larval competence (%)	Metamorphosis (%)
		D7	D14	End of experiment		
Control (TCp)	16	97.3 (3.6) <sup>ab</sup>	95.8 (6.1) <sup>ac</sup>	75.5 (12.9) <sup>ac</sup>	80.5 (10.9) <sup>a</sup>	74.0 (8.1) <sup>bd</sup>
Starved larvae	21	98.0 (4.1) <sup>ab</sup>	90.9 (7.5) <sup>ac</sup>	79.0 (10.2) <sup>a</sup>	0	0
D2D6	16	98.5 (3.0) <sup>ab</sup>	85.2 (11.8) <sup>c</sup>	75.7 (5.2) <sup>ac</sup>	80.1 (13.4) <sup>a</sup>	92.9 (4.6) <sup>c</sup>
D6D10	21	98.2 (3.5) <sup>ab</sup>	58.5 (14.4) <sup>b</sup>	44.8 (9.5) <sup>b</sup>	0	0
D10D14	21	98.6 (2.9) <sup>ab</sup>	64.1 (15.6) <sup>b</sup>	62.0 (8.7) <sup>bc</sup>	59.0 (7.2) <sup>b</sup>	63.1 (8.4) <sup>ad</sup>
D14D18	16	99.6 (1.7) <sup>b</sup>	96.2 (7.3) <sup>a</sup>	85.4 (8.4) <sup>a</sup>	61.6 (9.5) <sup>b</sup>	58.3 (8.4) <sup>a</sup>

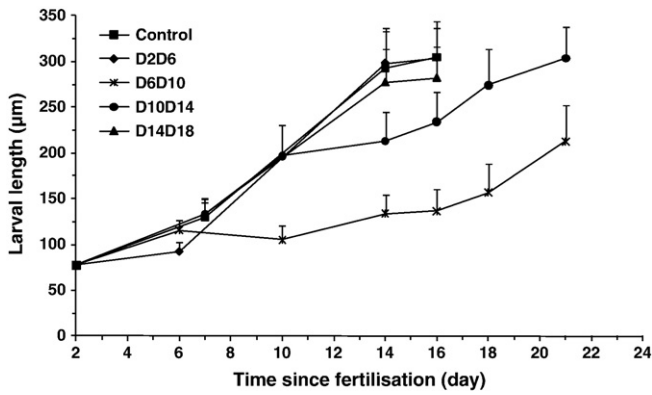


Fig. 1. Larval growth (mean ± SD; n ≥ 100) of *C. gigas* larvae normally fed (control) or exposed to 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (first experiment).

of the experiment (day 16). In contrast, later food deprivation (D10D14) caused different behaviour, as the absence of food only induced a partial consumption of lipid reserves: the lipid level dropped from 14% on day 10 to 6.4% at the end of food deprivation on day 14. This decrease was followed by a rapid increase in lipid reserves by day 16 (to 41%: a level equivalent to the controls). The latest food deprivation treatment, applied close to the end of the larval phase (D14D18), did not lead to a loss of lipid reserves but rather to a stabilisation of values around 21%, which was about half the level observed in the fed control. However, as the larvae were already competent by day 16, measurements were not made on day 18 (Table 1). The larvae were put in the tanks with the plastic discs and

the food deprivation was continued for the remaining 2 days of the treatment.

### 3.2. Second experiment

#### 3.2.1. Larval performances

Apart from the continuously-starved control larvae, which were strongly affected (45%), the survival levels at the end of the experiment were high (76–86%). It is particularly notable that at the end of the second week of rearing, 92% of the larvae in the unfed batch were still alive (Table 2). In the same way as in the previous experiment, competence was delayed according to treatment. When the food deprivation period was at the beginning of development, (D2D6), the acquisition of competence was not observed until day 18 (35%) but by day 22 a level had been reached that was similar to the control at day 18 (85% and 76%, respectively); these two treatments received the same cumulative amount of food during the 16 days considered. The case of treatment D6D10 was similar, although a lower percentage competence was observed for a similar feeding period (37%, Table 3). Later food deprivation treatments (D10D14 and D14D18) caused a greater time-lag in development, so that at day 22 only 14 and 21% competence was recorded in treatments D10D14 and D14D18, respectively. At day 25, however, after having been fed for 19 cumulative days, their percentage competence was high, ranging between 67 and 72% (Table 3). No impact of food deprivation was shown on metamorphosis, which was around 65% and not significantly different from the fed control (79%, Table 3). Only food deprivation at the end of larval rearing (D14D18) resulted in lower metamorphosis, which nevertheless attained 56% (Table 3).

As in the first experiment, the temporary food deprivation periods were accompanied by a sudden halt in growth, which resumed when the larvae were fed again but without any compensatory effect (Fig. 3). The control larvae that were fed throughout had the highest growth ( $12.9 \mu\text{m d}^{-1}$ ), while those that experienced periods of food deprivation had significantly lower growth ( $9.5\text{--}10.5 \mu\text{m d}^{-1}$ ;  $p < 0.0001$ ). Growth was negligible in the unfed control ( $0.5 \mu\text{m d}^{-1}$ ).

#### 3.2.2. Overall lipid index

On day 2, lipids occupied only 6% of the larval surface (Fig. 4) in the second experiment. This level remained stable until day 6 in the batches that were fed (Fig. 5A), then sharply increased to reach 21% on day 10 (Figs. 4 and 5C). Later, slight fluctuations were seen, followed by a decrease in values (13%) at day 18, just before metamorphosis (Figs. 4 and 5E and G). In the individuals subjected to an early period of food deprivation (D2D6), there were no lipids on the larval surface at day 6, at the end of the food deprivation period itself (Figs. 4 and 5B). As soon as these larvae were re-fed, however, they started to build up lipid reserves quickly (19% was reached on day 10) and these levels then stabilised (Fig. 4), in contrast to the larvae under continuous food deprivation conditions, which never had a recordable lipid level. The same pattern was observed in the D6D10 batch, with the total consumption of lipid reserves during food deprivation (Fig. 5D), followed by a high recovery (31% on day 16) then a decreasing trend just before metamorphosis (Fig. 4). When the temporary food deprivation periods were later (D10D14 and D14D18) reserve lipids were only partially consumed (Figs. 4 and 5F and H), therefore giving values of 5 and 9%, respectively, at the end of the treatment periods. In both cases, after 4 days of re-feeding, the lipid contents reached about 20% and decreased just before metamorphosis, on day 25 (11–13%, Fig. 4).

#### 3.2.3. Structural biochemical index (TAG/ST)

The continuously-fed control larvae only showed a very slight increase in TAG over the first week, with values increasing from 0.9 to 1.2 ng larva<sup>-1</sup> between day 2 and day 6. Values then increased more steeply during the second week (35 ng larva<sup>-1</sup> on day 14, Table 4). A

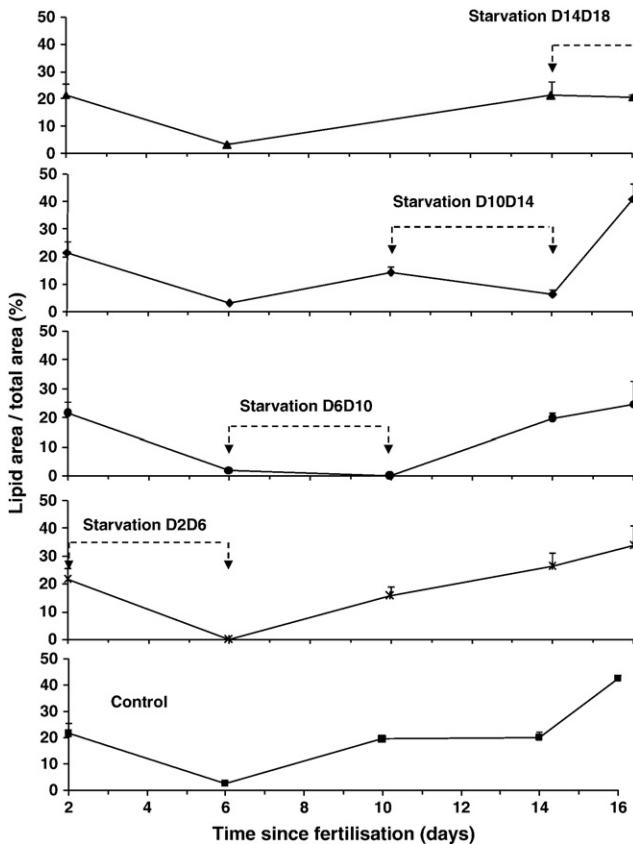


Fig. 2. Overall lipid index evolution (mean ± SD; n = 3) in *C. gigas* larvae normally fed (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (first experiment). Arrows and dashed lines indicate food deprivation periods.



**Table 2**  
Survival (mean  $\pm$  SD; n = 3) of *C. gigas* larvae continuously fed (control), unfed (starved larvae) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p > 0.05$ . nd: not determined.

Treatments	Larval life (days)	Survival (%)				
		D6	D14	D18	D22	D25
Control (TCp)	18	85.0 (7.5) <sup>a</sup>	79.7 (9.1) <sup>a</sup>	78.3 (12.1) <sup>a</sup>	–	–
Starved larvae	25	96.0 (3.5) <sup>a</sup>	91.7 (5.0) <sup>a</sup>	nd	nd	44.5 (7.8) <sup>b</sup>
D2D6	22	90.7 (5.1) <sup>a</sup>	93.7 (3.1) <sup>a</sup>	88.7 (5.7) <sup>a</sup>	86.3 (4.5) <sup>a</sup>	–
D6D10	22	91.7 (2.5) <sup>a</sup>	89.7 (4.9) <sup>a</sup>	91.0 (0.0) <sup>a</sup>	86.0 (5.7) <sup>a</sup>	–
D10D14	25	91.7 (4.0) <sup>a</sup>	91.0 (3.6) <sup>a</sup>	87.7 (8.7) <sup>a</sup>	87.7 (3.8) <sup>a</sup>	84.3 (4.7) <sup>a</sup>
D14D18	25	92.7 (2.1) <sup>a</sup>	90.3 (7.5) <sup>a</sup>	80.0 (4.6) <sup>a</sup>	76.3(9.0) <sup>a</sup>	76.3 (15.9) <sup>ab</sup>

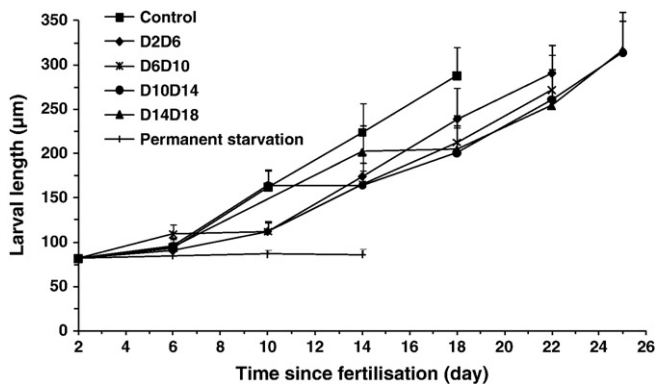
**Table 3**  
Larval period length (days), competence and metamorphosis (mean  $\pm$  SD; n = 3;% ) of *C. gigas* larvae continuously fed (control), unfed (starved larvae) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p > 0.05$ .

Treatments	Larval life (days)	Competence (%)			Metamorphosis (%)
		D18	D22	D25	
Control (TCp)	18	75.5 (6.4) <sup>b</sup>	–	–	79.0 (7.8) <sup>a</sup>
Starved larvae	25	0 (0.0) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>	0 (0.0) <sup>b</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>
D2D6	22	35.0 (4.6) <sup>c</sup>	84.5 (10.6) <sup>b</sup>	–	66.3 (10.1) <sup>ac</sup>
D6D10	22	3 (1) <sup>d</sup>	37.3 (4.5) <sup>c</sup>	–	65.3 (4.5) <sup>ab</sup>
D10D14	25	0 (0.0) <sup>a</sup>	21.0 (4.0) <sup>ac</sup>	71.5 (20.5) <sup>a</sup>	65.7 (1.5) <sup>ac</sup>
D14D18	25	0 (0.0) <sup>a</sup>	14.0 (9.5) <sup>a</sup>	67.0 (18.4) <sup>a</sup>	56.0 (6.0) <sup>bc</sup>

pre-metamorphic larva of 18 days contained 125 ng TAG on average, meaning that 8 ng larva<sup>-1</sup> were accumulated per day. As with the colorimetric study, the biochemical analysis showed that all reserves of neutral lipids (TAG) were totally consumed when food deprivation was imposed early (D2D6 and D6D10) whereas, low levels were still detected following later food deprivation treatments (D10D14 and D14D18: 2 and 9 ng larva<sup>-1</sup>, respectively, Table 4). TAG was rapidly restored following re-feeding in all treatments (Table 4).

Sterols also increased slowly during the first week ( $\approx 0.07$  ng larva<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). The levels in continuously-fed larvae increased regularly to reach 15 ng larva<sup>-1</sup> at the end of larval rearing on day 18 (Table 5), corresponding to an accumulation of 1 ng larva<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. The increase in sterols followed the increase in dry weight and there was a strong correlation between these two variables ( $R^2 = 0.89$ , Fig. 6). Food deprivation led to a lesser impact on these structural lipids than on the reserve lipids.

While triacylglycerols were almost wholly consumed (93–100%), sterols diminished little (30 and 12% decreases in treatments D10D14 and D14D18, respectively) during food deprivation. In the early food



**Fig. 3.** Larval growth (mean  $\pm$  SD; n  $\geq$  100) of *C. gigas* larvae normally fed (control), unfed (permanent starvation) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment).

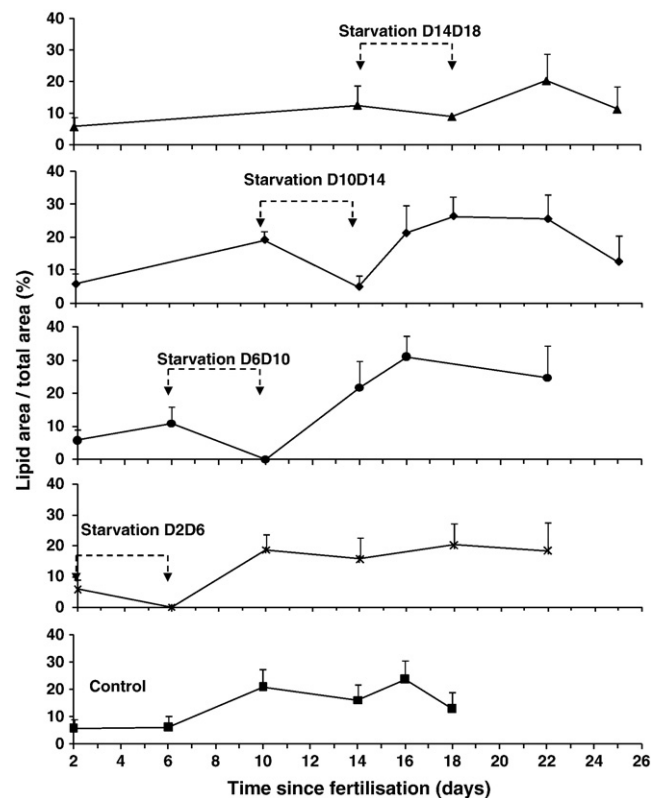
deprivation treatments (D2D6 and D6D10), sterol catabolism was virtually inexistent (Table 5).

The TAG/ST ratio evolved over time in a specific way according to the nutritional conditions. In the control larvae fed throughout rearing, this index was low at the start of rearing (3) and decreased slightly by day 6 (2). An optimum was seen on day 10 (10), and values subsequently remained between 5 and 9 (Fig. 7). Periods of food deprivation always led to a decrease in the ratio, but this increased rapidly on re-feeding as reserves were rebuilt (Fig. 7). A linear regression was found between the TAG/ST ratio and the overall lipid index analysed above with  $OLI = 1.5$  (TAG/ST) + 4.8 and  $R^2 = 0.75$ .

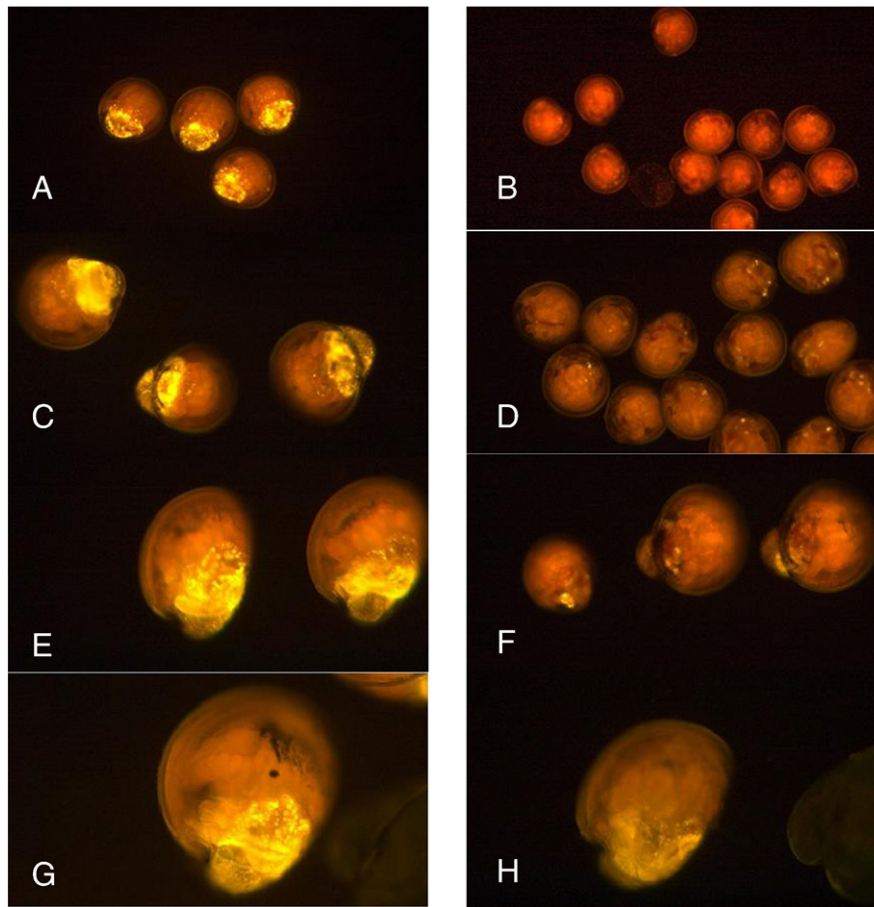
Similar regression was also found between TAG content per larvae (%) and OLI with  $OLI = 3.6$  TAG + 6.6 and  $R^2 = 0.72$ .

### 3.2.4. Larval condition index (OM/DW)

Dry weight increased progressively over the first week in the fed control (Table 6). It then doubled approximately every 4 days to attain 4800 ng larva<sup>-1</sup>, just before metamorphosis (day 18). The resulting overall rate of dry weight increase was about 292 ng d<sup>-1</sup> larva<sup>-1</sup>.



**Fig. 4.** Overall lipid index evolution (mean  $\pm$  SD; n = 3) in *C. gigas* larvae normally fed (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Arrows and dashed lines indicate food deprivation periods.



**Fig. 5.** Metabolism of lipid reserves in *C. gigas* larvae normally fed (control) having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). On the left, the yellow areas correspond to Nile Red-stained lipid reserves after fluorescent light exposition on continuously-fed larvae aged 6 days ( $94 \pm 12 \mu\text{m}$ : A), 10 days ( $162 \pm 20 \mu\text{m}$ : C), 14 days ( $224 \pm 33 \mu\text{m}$ : E), 18 days ( $288 \pm 33 \mu\text{m}$ : G). On the right, the small or absent areas of lipid reserves correspond to larvae exposed to 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life (second experiment). Larvae were aged 6 days (treatment D2D6: B), 10 days (treatment D6D10: D), 14 days (treatment D10D14: F) and 18 days (treatment D14D18: H).

Food deprivation led to a halt in weight increase, which was resumed on re-feeding. During the period without food, the dry weight increase rate was between  $11$  and  $13 \text{ ng d}^{-1} \text{ larva}^{-1}$ , except in D14D18 where a loss in weight was recorded.

Organic matter increased rapidly in the fed control over the first week, reaching a mean of  $200 \text{ ng larva}^{-1}$  on day 6, equivalent to a 5-fold increase (Table 7). The rate of organic growth then slowed between days 10 and 14 (375 and 436 ng, respectively) and doubled just before metamorphosis ( $849 \text{ ng larva}^{-1}$ , Table 7). Apart from the earliest food deprivation treatment (D2D6), diminution by half (D6D10 and D14D18) or stabilisation was observed in the index values at the end of the food deprivation period (Table 7).

**Table 4**

Triacylglycerol content (mean  $\pm$  SD;  $n=2$ ;  $\text{ng larva}^{-1}$ ) evolution in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p>0.05$ . nd: not determined.

Age of larvae (days)	Control	D2D6	D6D10	D10D14	D14D18
2	0.9 (0.1) <sup>a</sup>	0.9 (0.1) <sup>a</sup>	0.9 (0.1) <sup>a</sup>	0.9 (0.1) <sup>a</sup>	0.9 (0.1) <sup>a</sup>
6	1.2 (0.2) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	1.3 (0.2) <sup>a</sup>	nd	nd
10	31.7 (4.5) <sup>b</sup>	7.0 (0.8) <sup>ab</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	24.3 (1.8) <sup>b</sup>	nd
14	34.6 (0.1) <sup>b</sup>	41.3 (3.4) <sup>b</sup>	30.1 (0.7) <sup>a</sup>	2.3 (0.0) <sup>a</sup>	49.7 (3.2) <sup>b</sup>
18	125.2 (3.6) <sup>c</sup>	177.0 (16.0) <sup>c</sup>	169.1 (26.4) <sup>b</sup>	92.6 (5.8) <sup>c</sup>	9.3 (2.1) <sup>a</sup>

The larval condition index (OM/DW) went from 29% on day 2 to 39% on day 6 in the larvae fed continuously (Fig. 8). It stabilised from day 6 to day 10, and then decreased until the end of larval rearing (18% on day 18, Fig. 8). A similar evolution was noted in the larvae exposed to food deprivation early (D2D6) except that values were lower at the end of larval rearing (12–13%, Fig. 8). The same pattern was seen once more in treatment D10D14, except that the food deprivation period led to a stabilisation of the index rather than a fall (27–31%, Fig. 8). Inversely, food deprivation at the end of the first week (D6D10) or just before metamorphosis (D14D18) caused values of this index to fall by half (14 and 8%, respectively, Fig. 8).

**Table 5**

Sterol content (mean  $\pm$  SD;  $n=2$ ;  $\text{ng larva}^{-1}$ ) evolution in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p>0.05$ . nd: not determined.

Age of larvae (days)	Control	D2D6	D6D10	D10D14	D14D18
2	0.3 (0.0) <sup>a</sup>	0.3 (0.0) <sup>a</sup>	0.3 (0.0) <sup>a</sup>	0.3 (0.0) <sup>a</sup>	0.3 (0.0) <sup>a</sup>
6	0.6 (0.1) <sup>a</sup>	0.4 (0.0) <sup>a</sup>	0.7 (0.1) <sup>a</sup>	nd	nd
10	3.3 (0.2) <sup>ab</sup>	0.9 (0.0) <sup>a</sup>	0.8 (0.1) <sup>a</sup>	3.7 (0.0) <sup>b</sup>	nd
14	7.1 (0.3) <sup>b</sup>	6.5 (0.3) <sup>b</sup>	3.8 (0.0) <sup>a</sup>	2.8 (0.1) <sup>ab</sup>	8.3 (0.1) <sup>b</sup>
18	14.4 (3.0) <sup>c</sup>	11.5 (0.2) <sup>c</sup>	13.1 (2.1) <sup>b</sup>	6.9 (1.2) <sup>c</sup>	7.3 (1.0) <sup>b</sup>

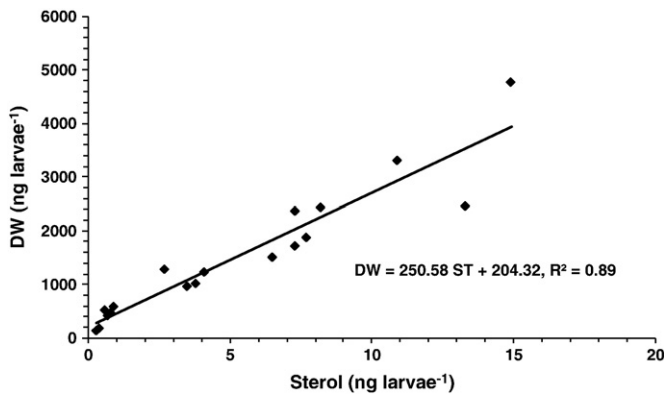


Fig. 6. Correlation between sterol content and dry weight in *C. gigas* larvae.

#### 4. Discussion

Invertebrate larvae have been reported to have a generally high tolerance of food deprivation, thus larvae of Antarctic species such as echinoderms can survive several months on their endogenous resources alone (Fraser and Manahan, 1994). Similarly, the arctic pteropod *Clione limacina* can survive 100 to 260 days without food, depending on its initial reserves. Larvae of temperate and tropical regions can only withstand the absence of food for a much shorter period, amounting to days or weeks (Fraser and Manahan, 1994). Larvae of *Ostrea edulis*, reared for 12 days without any food input had a survival rate of 73% (Labarta et al., 1999b). In *C. gigas*, the survival rate of larvae that had been starved for their first 14 days was not found to be significantly different from that of larvae that had been fed continuously (Moran and Manahan, 2004). In the present work, after

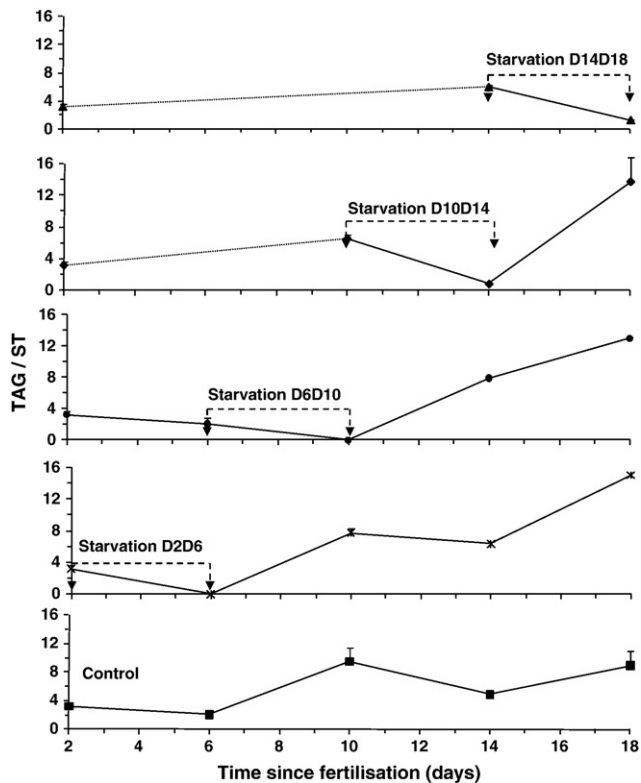


Fig. 7. Triacylglycerols/sterols (TAG/ST) content evolution (mean  $\pm$  SD;  $n=2$ ) in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Arrows and dashed lines indicate starvation periods.

Table 6

Dry weight (mean  $\pm$  SD;  $n=2$ ; ng larva $^{-1}$ ) evolution in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p>0.05$ . nd: not determined.

Age of larvae (days)	Control	D2D6	D6D10	D10D14	D14D18
2	131 (1) <sup>a</sup>	131 (1) <sup>a</sup>	131 (1) <sup>a</sup>	131 (1) <sup>a</sup>	131 (1) <sup>a</sup>
6	517 (30) <sup>ab</sup>	176 (5) <sup>b</sup>	413 (18) <sup>c</sup>	nd	nd
10	960 (2) <sup>b</sup>	582 (175) <sup>ab</sup>	463 (41) <sup>ab</sup>	1227 (90) <sup>b</sup>	nd
14	1876 (43) <sup>c</sup>	1506 (37) <sup>b</sup>	1013 (74) <sup>b</sup>	1279 (38) <sup>b</sup>	2435 (16) <sup>b</sup>
18	4776 (265) <sup>d</sup>	3311 (583) <sup>c</sup>	2459 (274) <sup>c</sup>	1716 (52) <sup>c</sup>	2370 (65) <sup>b</sup>

2 or even 3 weeks of continuous food deprivation (1st and 2nd experiments, respectively), the survival rates also were similar to the continuously-fed controls. Survival was only significantly affected after 25 days without food, but another study on the same species found that almost all larvae died after only 8 days without food (His and Seaman, 1992), and suggested that food input is necessary from the first days following fertilisation. This conclusion contradicts recent findings on the Pacific oyster in which it was clearly shown that at temperatures  $\leq 27$  °C and a stable phytoplankton concentration of 40 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ , the ingestion of microalgae by oyster larvae remains low until day 5 (Rico-Villa et al., 2008, 2009). Considering this finding, the mortalities reported by His and Seaman (1992) cannot have occurred as a direct result of lack of food; the hypothesis of vibriosis is quite possible as vibrios are known to be particularly virulent towards mollusc larvae (Elston, 1995). Our results show that food deprivation has repercussions for larval growth, with almost no size increase when the treatment is prolonged and a transitory halt in growth when the treatment is temporary. It should be noted that when food deprivation is early (D2D6), dry matter and organic matter increase, nevertheless at a relatively minor scale compared with the continuously-fed control. As the water was systematically filtered to 1  $\mu\text{m}$  in our experiments, it is probable that this increase in size, nevertheless at a relative lesser scale, was due to dissolved materials, as already shown in other invertebrate larvae (Jaekle and Manahan, 1992). As previously demonstrated elsewhere (Ben Kheder et al., 2010), the OM/DW ratio is unsuitable for representing the differences in performance observed and appears to be a poor indicator of quality in *C. gigas* larvae. These results disagree with those of Lucas et al. (1986a) and Whyte et al. (1987) who consider this ratio to be a good indicator of larval competence for metamorphosis in the mussel *Mytilus edulis* and the Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* but without providing evidence to support this assertion. These previous studies do, however, agree with results reported by Robert et al. (1999), demonstrating a weak correlation between this ratio and the percentage metamorphosis in *P. maximus*.

Our results also show that *C. gigas* larvae have a certain tolerance to limited food deprivation and rapid physiological recuperation capacity. The first food deprivation period, D2D6, did not have a

Table 7

Dry organic weight (mean  $\pm$  SD;  $n=2$ ; ng larva $^{-1}$ ) evolution in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment). Values within the same column with a common superscript letter are not significantly different at  $p>0.05$ . nd: not determined.

Age of larvae (days)	Control	D2D6	D6D10	D10D14	D14D18
2	38 (3) <sup>a</sup>	38 (3) <sup>a</sup>	38 (3) <sup>a</sup>	38 (3) <sup>a</sup>	38 (3) <sup>a</sup>
6	202 (11) <sup>b</sup>	66 (5) <sup>a</sup>	129 (29) <sup>a</sup>	nd	nd
10	375 (14) <sup>c</sup>	161 (82) <sup>a</sup>	66 (23) <sup>a</sup>	381 (24) <sup>b</sup>	nd
14	436 (24) <sup>c</sup>	442 (46) <sup>b</sup>	311 (26) <sup>b</sup>	362 (7) <sup>b</sup>	393 (52) <sup>b</sup>
18	849 (40) <sup>d</sup>	465 (6) <sup>b</sup>	378 (2) <sup>b</sup>	457 (10) <sup>c</sup>	200 (5) <sup>c</sup>



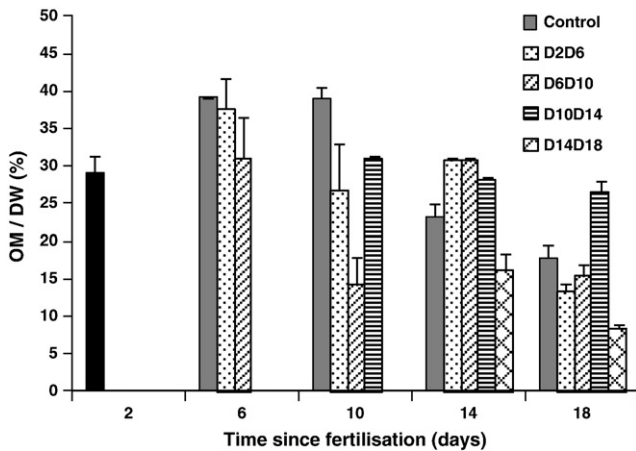


Fig. 8. Organic matter/dry weight (OM/DW) (mean  $\pm$  SD;  $n = 2$ ) evolution in *C. gigas* larvae fed continuously (control) or having had 4 consecutive days of food deprivation at 4 different periods of larval life according to treatment (second experiment).

strong influence on the biology of the studied individuals. In the first experiment, the larvae in this treatment had a similar growth rate to the control, despite having a shorter cumulative period of feeding (12 vs 14 days), and subsequently had a better percentage metamorphosis. Conversely, in the second experiment, the growth rate of the larvae in the earliest feed deprivation treatment was below that of the control, although this difference had no repercussions for the percentage metamorphosis achieved. These differences in larval growth could be explained by difference in the initial levels of lipid reserves between the two experiments. In fact, at day 2, while lipids covered 22% of the larval surface in the first experiment, they only covered 7% in the larvae of the second experiment. Differences of this type cannot, however, explain differential mortalities such as those previously reported in *O. edulis* (Holland and Spencer, 1973), *Mercenaria mercenaria* and *C. virginica* (Gallager and Mann, 1986). Although food deprivation at the start of larval development (D2D6) induces low subsequent consequences because larvae of this stage are still to a large extent dependent on their vitellin reserves (Rico-Villa et al., 2009), food deprivation at the end of the first week (D6D10) appears to be more critical. In the first experiment, the D6D10 treatment led to relatively low survival, poor growth recovery and an incapacity for metamorphosis. The second experiment had high survival and larval competence despite the low initial lipid content. It is interesting to see that the normally-fed controls of the first experiment had higher growth than those of the second experiment (16 vs 13  $\mu\text{m d}^{-1}$ ), while other indicators of larval development (survival, competence and metamorphosis) were similar between the two experiments. Difference in larval resistance between the two experiments to the imposed nutritional stress at D6D10 could be explained by a higher energetic consumption in the first experiment, during the first week, due to faster growth. In this condition initial reserves, however higher in experiment 1, were actively catabolized and accordingly larvae were more fragile. In *C. gigas*, this period of larval development corresponds to a transition between the mixotrophic phase, during which the larvae draw most of their energy from their endogenous reserves and, to a lesser extent, from exogenous planktonic particles, and the exotrophic phase, where microalgae added to the rearing vessel come to play a vital role in larval development, notably in metamorphosis success. Whatever index is used, (OLI or TAG/ST) results show that, following food deprivation, neutral lipids were totally consumed by day 6; this demonstrates that *C. gigas* uses all its endogenous reserves in the first week at a rearing temperature of 25 °C. As a result, larval use of the exogenous food supply is limited during the early days of rearing, in line with results of Labarta et al. (1999b) on *O. edulis*, but is necessary,

probably for stimulating the digestive system. The transition to strict exotrophy is a period when larvae are particularly sensitive to energy deficits. While in *O. edulis*, a point of no return is reached when endogenous reserves are exhausted (Labarta et al., 1999b), the temporary food deprivation period of 4 days applied in this study led to intense catabolism of reserves in *C. gigas* larvae, which did not affect their ability to reconstitute their reserves once they were re-fed. Additionally, in continuously-fed larvae, the low level of neutral lipids present at day 6 (3–6%, 1.2 ng TAG) confirms that the endogenous reserves had been consumed and that the larvae had started to consume microalgae, although they were not yet able to accumulate lipid reserves. Ingestion of microalgae has been reported from D-stage, only a few hours after the formation of the prodissoconch I (Lucas and Rangel, 1983; Robert, 1998). This incapacity for lipid storage during the first week of larval life could be due either to a vital need to use up the endogenous lipid reserves before accumulating new exogenous reserves, or to a deficient enzymatic system capable of lipolysis but not yet able to perform liposynthesis, as shown by larvae of *Solea senegalensis* (Fehri-Bedoui et al., 2000). To decide between these hypotheses, the quantities of specific enzymes would need to be measured in the early larval stages of *C. gigas*. Our work demonstrates that the lipid reserves start to become evident from the tenth day (19–21% and 28 ng TAG); it is these reserves, linked to high microalgae consumption, that prevent the food deprivation treatments after the 10th day (D10D14 and D14D18) from causing complete exhaustion of the lipid reserves. This lipid accumulation appears to occur earlier in the scallop *P. maximus*, as it starts at day 6, 4 days after the first feeding (Delaunay et al., 1992). It is slightly later in *M. edulis*, with the end of vitellus use at day 8, followed by a strong increase in the lipid content corresponding to reserves build-up (Lucas et al., 1986b). It is also interesting to note that metamorphosis is not linked to a particular level of lipid reserves: batches D2D6 and D6D10 contained more TAG and neutral lipid reserves than the control at day 10 but were not capable of metamorphosis. Similar observations were made on *M. edulis*, where the addition of lipid microspheres at the end of larval rearing did not improve the rate of metamorphosis (Pernet et al., 2004). Other criteria, like minimum size, are probably necessary for individuals to become competent to metamorphose. The minimum size necessary for metamorphosis is estimated at 250–290  $\mu\text{m}$  in *C. gigas* (Coon et al., 1990) and 300–320  $\mu\text{m}$  in *O. edulis* (Helm et al., 2004).

*C. gigas* larvae show a great plasticity when faced with temporary food deprivation, which is a strong stress but a short one, and have a large capacity for recovery and ability to return to their initial physiological state as soon as good nutritional conditions are re-established. To cope with a trophic stress such as this, the larvae showed adaptive strategies based on a reduction of their metabolism (a vital strategy for energy economy); this was revealed by the slowing or stopping of increases in weight and size and a total or partial consumption of their lipid reserves to maintain their basal metabolism. Additionally, we noted that unfed veligers stopped swimming and confined themselves to the bottom of their tanks or beakers, presumably to minimise energy use.

The colorimetric approach is a simple technique, which is rapid to set up and requires little biological material (Ben Kheder et al., 2010). Nile Red is a fluorescent dye specific for lipids (Greenspan and Fowler, 1985), with different coloration according to lipid type: neutral lipids are colored yellow and phospholipids emit weak red-orange fluorescence (Greenspan et al., 1985; Brown et al., 1992). The results provided by this technique corroborate the data obtained by the biochemical technique, as a good correlation is shown between these two indices (OLI and TAG/ST). The results reported here and those from our previous study (Ben Kheder et al., 2010) demonstrate that this method can be used to understand the evolution of lipid reserves over time. The correlation between OLI and larval rearing performances was not entirely satisfactory, however, as low or null



indices were not always associated with poor results in terms of growth, survival or metamorphosis. This is probably linked to the large capacity for recuperation shown by *C. gigas* larvae and because lipids are most likely not the only limiting factor for *C. gigas* larval development.

## Acknowledgements

This work was performed with the help of the technical team at Ifremer Argenton (C. Mingant, I. Quéau, L. Lebrun and P. Le Souchu). We are also grateful to the Tunisian Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, the French embassy in Tunis and the Centre Régional des Oeuvres Universitaires et Scolaires de Rennes, who contributed to the funding of the doctoral visit of one of the authors to France.

## References

- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., Robert, R., 2010. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture* 305, 165–173.
- Böer, M., Graeve, M., Kattner, G., 2006. Impact of feeding and starvation on the lipid metabolism of the Arctic pteropod *Clione limacine*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 328 (11), 98–112.
- Brown, W.J., Sullivan, T.R., Greenspan, P., 1992. Nile Red staining of lysosomal phospholipid inclusions. *Histochemistry* 97 (4), 349–354.
- Castell, L.L., Mann, R., 1994. Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. *Aquaculture* 119 (1), 89–100.
- Coon, S.L., Fitt, W.K., Bonar, D.B., 1990. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 106 (3), 379–387.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163 (2), 209–219.
- Elston, R., 1995. Mollusc disease. Guide for the Shellfish Farmer. University of Washington Press, Seattle and London. 73 pp.
- FAO, 2008. Fisheries and Aquaculture Department. *Aquaculture Production*, pp. 1950–2006.
- Fehri-Bedoui, R., Dinis, M.T., Maamouri, F., 2000. Étude histologique du développement de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse de la sole, *Solea senegalensis* (Soleidae). *Cybium* 24 (4), 343–358.
- Fraser, M.S., Manahan, D.T., 1994. Energy metabolism and amino acid transport during early development of Antarctic and temperate echinoderms. *Biol. Bull.* 187 (3), 398–407.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56, 105–121.
- Gallager, S.M., Mann, R., Sasaki, G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56 (2), 81–103.
- Greenspan, P., Fowler, S.D., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* 26 (7), 781–789.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile Red, a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100 (3), 965–973.
- Haws, M.C., DiMichele, L., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2 (4), 207–217.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. In: Lovatelli, A. (Ed.), *FAO Fisheries Technical Paper 471*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Publishing, Rome, Italy. 177 pp.
- His, E., Maurer, D., 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture* 69 (1–2), 185–194.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100 (4), 455–463.
- His, E., Seaman, M.N.L., 1992. Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.* 114, 277–279.
- Holland, D.L., Spencer, B.E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53, 287–298.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: Malins, D.C., Sargent, J.R. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, pp. 85–123.
- Jaekle, W.B., Manahan, D.T., 1992. Experimental manipulations of the organic composition of seawater: implications for studies of energy budgets in marine invertebrate larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 156, 273–284.
- Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., 1999a. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238 (2), 225–242.
- Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., 1999b. Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia* 405, 125–131.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. In: Russell, F.S. (Ed.), *Advances in Marine Biology*, vol 1. Academic Press Inc., London and New York, p. 136.
- Lucas, A., Rangel, C., 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture* 30 (1–4), 369–374.
- Lucas, A., Chebab-Chalabi, L., Beninger, P., 1986a. Variation of relative organic matter in *Mytilus edulis* L. larvae and postlarvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 95 (1), 99–103.
- Lucas, A., Chebab-Chalabi, L., Aldana-Aranda, D., 1986b. Transition from endotrophy to exotrophy in the larvae of *Mytilus edulis*. *Oceanol. Acta* 9 (1), 97–103.
- Moran, A.L., Manahan, D.T., 2004. Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306 (1), 17–36.
- Pontual de, H., Robert, R., Miner, P., 1998. Study of bivalve larval growth using image processing. *Aquacult. Eng.* 17, 85–94.
- Pechenik, J.A., Jarrett, J.N., Rooney, J., 2002. Relationships between larval nutritional experience, larval growth rates, juvenile growth rates, and juvenile feeding rates in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 280, 63–78.
- Pernet, F., 2003. Nutrition et hydrodynamique : effet sur la reproduction et la performance larvaire des mollusques bivalves. Thèse de Doctorat à la Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec. 187 pp.
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Mar. Biol.* 144 (4), 693–703.
- Qiu, J.W., Gosselin, L.A., Qian, P.Y., 1997. Effects of short-term variation in food availability on larval development in the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 83–91.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256 (1–4), 377–388.
- Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Hamont, M., Pouvreau, S., Lepiver, D., Robert, R., 2008. A flow-through rearing system device for Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae ecophysiological studies. *Aquaculture* 282, 54–60.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Robert, R., 1998. Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichococcus bacillaris* for the oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Haliotis* 27, 29–34.
- Robert, R., Nicolas, L., Moisan, C., Barbier, G., 1999. Morphological and biochemical characterizations of the great scallop *Pecten maximus* metamorphosis. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série 3* 322 (10), 847–853.
- Robert, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Kaas, R., Martin-Jézéquel, V., Moal, J., Le Coz, J.R., Nicolas, J.L., Bernard, E., Connan, J.P., Le Dean, L., Gourrirec, G., Leroy, B., Quéré, C., 2004. Amélioration des productions phytoplanktoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage. *RI DRV/RA-2004-05*. 149 pp.
- Samain, J.F., McCombie, H. (Eds.), 2007. Mortalités estivales de l'huître creuse *crassostrea gigas*. *Défi Moresit/Editeur Quae, Ifremer*. 379 p.
- Soudant, P., 1995. Les phospholipides et les stéroïdes des géniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. *Océanologie Biologique*. Thèse de Doctorat de l'Université de Brest. 294 pp.
- Waldock, M.J., Nascimento, I.A., 1979. Triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Mar. Biol. Lett.* 1 (2), 77–86.
- Walne, P.R., 1974. *Culture of Bivalve Molluscs*. Fishing News Books Ltd, England. 173 p.
- Whyte, N., Hodgson, C.A., Bourne, J.N.C., 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves, in larvae of the Scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113 (2), 113–124.
- Zhao, B., Qiu, J.-W., Qian, P.-Y., 2003. Effects of food availability on larval development in the slipper limpet *Crepidula onyx* (Sowerby). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 294, 219–233.