

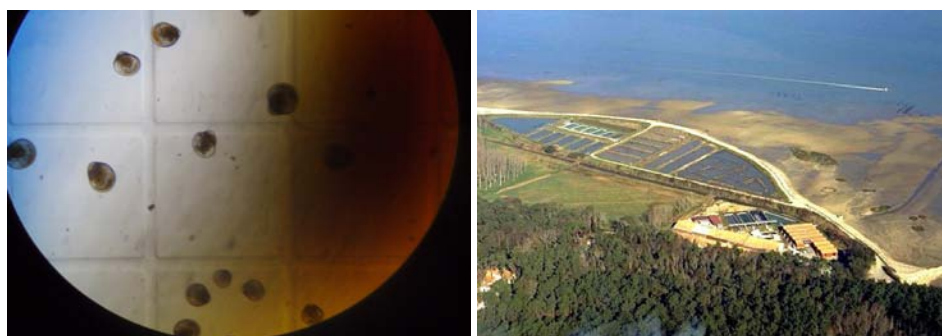
RAPPORT DE STAGE

présenté par

Matangi MOEROA

Promotion « Pourquoi Pas » (2006-2008)

« Production en écloserie expérimentale de familles d'huîtres creuses, Crassostrea gigas, dans le cadre de l'étude de son investissement reproducteur. »



Pour l'obtention du :

TITRE DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER (TTSM)

délivré par :

le Conservatoire national des arts et métiers (Cnam)

Stage placé sous la responsabilité de Sylvie LAPEGUE

Effectué du 14 avril au 29 août à la station :

IFREMER de La Tremblade

BP 133 Ronce-les-Bains

17390 La Tremblade

Tél : 05.46.76.26.10 Fax : 05.46.76.26.11

Sylvie.lapegue@ifremer.fr

Sommaire :

Remerciements :	6
1. Présentation de l'Ifremer :	7
1.1. Présentation de la station de La Tremblade :	7
1.2. Présentation du laboratoire Environnement Ressources (LER-PC) :	7
1.3. Présentation du laboratoire de Génétique et Pathologie :	7
2. Introduction :	8
3. Matériels :	10
3.1. Géniteurs :	10
3.1.1. Expérience préliminaire :	10
3.1.2. Expérience principale :.....	10
4. Méthodes :	11
4.1. Intrants :	11
4.1.1. Eau de mer :	11
4.1.2. Phytoplancton :.....	12
4.2. Maturation :	12
4.2.1. Matériel :	12
4.2.2. Traitement de l'eau :	12
4.2.3. Entretien des géniteurs :	12
4.2.4. Prophylaxie :	13
4.3. Croisement :	13
4.3.1. Sexage :	13
4.3.2. Récolte des gamètes :	13
4.3.3. Préparation des gamètes :	13
4.3.4. Dénombrement des gamètes :.....	14
4.3.5. La fécondation :.....	14
4.3.6. Embryogenèse :.....	14
4.4. Élevage larvaire :	15
4.4.1. Matériel :	15
4.4.2. Traitement de l'eau de mer :.....	15
4.4.3. Relevé des paramètres :.....	15
4.4.4. Densité larvaire :	15
4.4.5. Récupération des larves :.....	15
4.4.6. Estimation des effectifs et observations :	16

4.4.7.	Nourriture :	16
4.4.8.	Prophylaxie :	16
4.4.9.	Mesure de la taille des larves :	17
4.5.	Micronurserie :	17
4.5.1.	Matériel :	17
4.5.2.	Traitement de l'eau de mer :	17
4.5.3.	Suivi des futurs naissains :	17
4.5.4.	Estimation des effectifs :	18
4.5.5.	Prophylaxie :	18
5.	Résultats :	18
5.1.	Expérience préliminaire :	18
5.1.1.	Sexage et comptage des gamètes :	18
5.1.2.	Élevage larvaire :	19
5.2.	Expérience principale :	21
5.2.1.	Sexage:	21
5.2.2.	Croisement :	21
5.2.3.	Élevage larvaire :	23
5.2.4.	Taux de fixation :	26
5.2.5.	Taux de mortalité :	27
6.	Discussion :	27
6.1.	Expérience préliminaire :	27
6.2.	Expérience finale :	28
7.	Conclusion :	30
8.	Bibliographie :	31
9.	Annexe :	32
9.1.	Caractéristiques de l'eau de forage :	32
9.2.	Milieu de conway (La Tremblade) :	32
9.3.	Solution de vitamines :	33
9.4.	Samba :	33
9.5.	Sexage :	34
9.6.	Croisement biparentaux :	35
9.7.	Croisement multiparentaux :	36

9.8. Taux d'éclosion :	37
9.9. Taux de mortalité au cours de l'élevage :	38

Table des illustrations :

<i>Figure 1 : Cycle de développement de <u>C.gigas</u>. (d'après Lelong, 1999).</i>	8
<i>Figure 2 : Schéma du développement larvaire. (FAO)</i>	14
<i>Graphique 1 : Température de l'eau.</i>	19
<i>Graphique 2 : Salinité de l'eau.</i>	19
<i>Graphique 3 : Effet du régime alimentaire sur la croissance des larves.</i>	20
<i>Graphique 4 : Taux d'éclosion des lots.</i>	22
<i>Graphique 5 : Taux d'éclosion des croisements.</i>	22
<i>Graphique 6 : Température de l'eau.</i>	23
<i>Graphique 7 : Salinité de l'eau.</i>	23
<i>Graphique 8: Dénombrement larvaire au cours de l'élevage.</i>	24
<i>Graphique 9: Influence des parents sur la croissance larvaire.</i>	25
<i>Graphique 10: Croissance larvaires des Pools.</i>	25
<i>Graphique 11: Taux de fixation des lots.</i>	26
<i>Graphique 12: Taux de fixation des croisements.</i>	26
<i>Graphique 13: Taux de mortalité au cours de l'expérience.</i>	27
<i>Graphique 14: Effet du ventilo sur la température de l'eau d'élevage.</i>	28
<i>Photo 1 : Claires où les géniteurs étaient stockés. (M.M)</i>	10
<i>Photo 2 : Poches de stockage. (M.M)</i>	10
<i>Photo 3: Tris selon la taille. (M.M)</i>	13
<i>Photo 4: Bacs de maturation. (M.M)</i>	13
<i>Tableau 1 : Phytoplancton distribué en fonction du stade de développement de l'huître</i>	12
<i>Tableau 2: Dénombrement des gamètes.</i>	14
<i>Tableau 3: Nombre de gamètes</i>	14
<i>Tableau 4 : Densité larvaire au cours de l'élevage.</i>	15
<i>Tableau 5 : Taille théorique de tamis utilisé au cours de l'élevage larvaire.</i>	16
<i>Tableau 6 : Ration alimentaire en fonction des jours d'élevage utilisée à l'écloserie de La Tremblade.</i>	16
<i>Tableau 7 : Volume de gamètes pour les fécondations.</i>	18
<i>Tableau 8 : Estimation du taux d'éclosion à J-2</i>	20
<i>Tableau 9 : Effet du régime alimentaire sur la durée de l'élevage larvaire.</i>	20
<i>Tableau 10: Plan de croisement.</i>	21

Remerciements :

Je voudrais remercier Jean PROU, directeur de la station d'Ifremer de La Tremblade pour son accueil.

Je voudrais remercier Tristan RENAULT, directeur du laboratoire de génétique et pathologie pour m'avoir permis de faire mon stage à La Tremblade.

Je voudrais remercier Sylvie LAPEGUE, mon maître de stage pour m'avoir donné l'opportunité de faire mon stage dans cette station.

Je voudrais remercier tout particulièrement Florence CORNETTE, pour m'avoir fait découvrir les sorties sur terrain en milieu vaseux, et surtout pour m'avoir supporté et appris tout au long de ce stage.

Je voudrais remercier toute l'équipe de génétique qui m'a appris beaucoup et m'a permis de m'intégrer facilement à l'équipe.

Je remercie enfin tout le personnel de la station avec qui j'ai passé de bons moments.

« Maururu ia outou »

1. Présentation de l'Ifremer :

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, l'Ifremer contribue, par ses travaux et expertises à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance du milieu marin et littoral et au développement durable des activités maritimes. C'est pourquoi, il conçoit et met en œuvre des outils d'observation, d'expérimentation et de surveillance, et gère la flotte océanographique française pour l'ensemble de la communauté scientifique ainsi que des bases de données océanographiques. L'Ifremer est un Établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) créé en 1984 et placé sous la triple tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, du ministère de l'Agriculture et de la Pêche et du ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de l'Aménagement du Territoire.

1.1. Présentation de la station de La Tremblade :

La station Ifremer de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral. Dans le domaine conchylicole ses compétences géographiques s'étendent sur l'ensemble des pertuis charentais, depuis le sud de la Vendée jusqu'à l'estuaire de la Gironde.

1.2. Présentation du laboratoire Environnement Ressources (LER-PC) :

Il est né le 1er Janvier 2004, par la fusion de deux laboratoires de la Direction de l'Environnement littoral (La Rochelle et La Tremblade) et d'un laboratoire de la Direction des Ressources Vivantes (La Tremblade). Sa compétence géographique pour l'environnement littoral s'étend de la rive gauche de la Charente à la Gironde.

1.3. Présentation du laboratoire de Génétique et Pathologie :

Il développe depuis 20 ans des travaux de recherche dans le domaine de la génétique et de la pathologie chez les mollusques d'intérêt commercial. Il est impliqué dans l'acquisition de connaissances concernant l'amélioration génétique, le contrôle des performances et la santé des espèces d'intérêts en aquaculture marine.

Le Laboratoire assure différentes fonctions.

- Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) pour les maladies des coquillages depuis 1995,
- Laboratoire de référence pour l'Office Internationale des Epizooties (OIE) pour deux maladies parasitaires des coquillages (la bonamiose et la marteiliose).
- Il héberge également la coordination du réseau REPAMO et réalise les analyses officielles en termes de santé animale pour le compte de l'autorité compétente.

2. Introduction :

Embranchement :	Mollusques
Classe :	Bivalves
Ordre :	Ostreoida
Famille :	Ostreidae
(Thunberg, 1793)	<u>Crassostrea gigas</u>

L'huître creuse japonaise, Crassostrea gigas, élevée sur les côtes françaises depuis les années 70, est, contrairement à la moule Mytilus edulis, hermaphrodite simultanée. L'huître peut ainsi changer de sexe soit au cours d'une même saison de reproduction (rarement), soit au cours de saisons consécutives, mais ce n'est pas obligatoire. En dehors de la saison de reproduction, on ne peut déterminer son sexe, la gonade étant au repos. C'est à partir du printemps que les cellules sexuelles commencent à se mettre en place. La gonade devient blanchâtre et contient alors, selon les individus, des ovocytes ou des spermatozoïdes. On ne sait pas précisément ce qui détermine l'évolution d'une huître en mâle ou en femelle mais l'on sait que plus elle vieillit, plus elle a des chances d'être femelle. C'est pourquoi dans une population d'huîtres âgées de 1 an, on trouve en moyenne 30 à 40 % de femelles (et 60 à 70 % de mâles), dans une population d'huîtres âgées de 2 ans, 50 à 60 % de femelles tandis que dans une population plus âgée, jusqu'à 80 ou 90 % de femelles peuvent être observées.

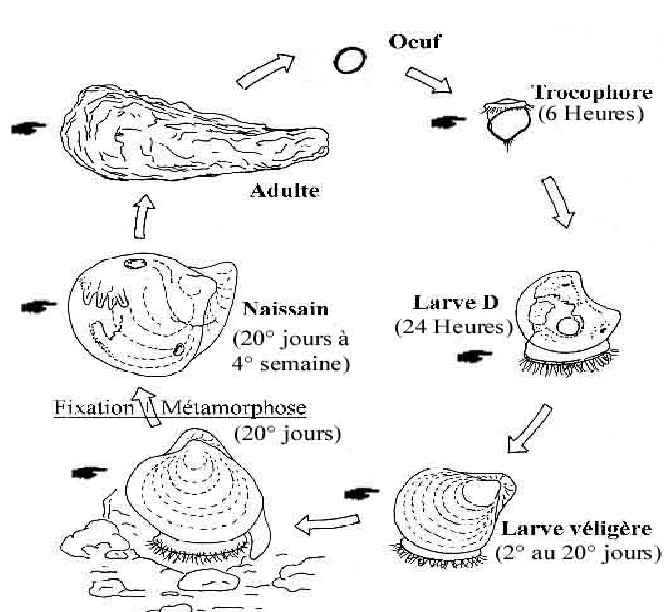


Figure 1 : Cycle de développement de C gigas. (d'après Lelong, 1999)

Une même huître peut pondre plusieurs fois pendant la saison de reproduction. Cette saison s'étend tout l'été, des mois de juin à septembre, les pontes les plus importantes surviennent en général au cours du mois de juillet. Entre les différentes émissions de gamètes, l'huître reconstruit des produits sexuels. Lorsqu'elles pondent, les femelles expulsent les ovules (plusieurs millions) en effectuant des battements des valves tandis que les mâles laissent échapper les spermatozoïdes (plusieurs centaines de millions) comme un mince filet continu, en entrouvrant leurs valves.

La fécondation a lieu dans l'eau et après 24 heures, une larve d'huître, appelée larve D car elle a la forme de cette lettre, est formée. Elle présente une coquille avec deux valves et une charnière ainsi qu'un velum, sorte de voile cilié, qu'elle déploie hors de sa coquille lorsqu'elle nage et qui lui sert à capter sa nourriture (algues microscopiques).

La vie pélagique de la larve appelée stade véligère, dure une vingtaine de jours pendant lesquels elle grandit et subit des transformations. Un crochet, ou umbo, se forme sur la charnière de la coquille. Une terminologie particulière, basée sur la taille des larves, est employée à l'usage des ostréiculteurs :

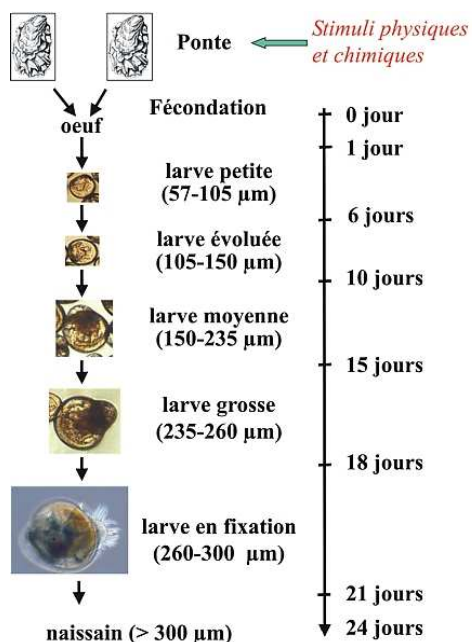


Figure 2 : Terminologies des ostréiculteurs (L.E.R. Arcachon)

Vers J-18 au moment de la métamorphose, la larve devient œillée, c'est-à-dire qu'une tache sombre, appelée improprement œil, apparaît. Il s'agit d'un organe sensoriel. Un pied se développe, à côté du velum cilié. On la nomme alors pédivéligère. Elle mesure environ 300 µm. C'est le moment où le captage commence. La larve peut faire plusieurs tentatives avant de choisir un support définitif. Sur les millions de larves D formées, seule une faible proportion arrivera à ce stade.

La fixation est une conséquence de la métamorphose, phase durant laquelle la larve subit de nombreuses transformations : le velum disparaît, le pied sécrète un ciment qui va assurer sa fixation définitive (ce pied disparaîtra par la suite), une nouvelle coquille se forme, les branchies

apparaissent... La larve est devenue un naissain, semblable à l'huître adulte. (D'après le L.E.R. Arcachon)

L'approvisionnement en juvéniles repose essentiellement sur le captage naturel. Les pontes ont lieu durant la période de juin à septembre. Des collecteurs sont déposés dans les zones de reproduction pour capter les larves en cours de métamorphose et les juvéniles ainsi collectés sont transférés dans des zones de grossissements. Trois à quatre ans d'élevage sont nécessaires pour avoir des individus commercialisables. Il est important pour la profession que ces zones soient conservées. Si le captage des larves est faible cela aura une répercussion sur les grossissements des juvéniles et sur la vente des adultes. Une alternative s'offre aux ostréiculteurs : les écloséries. En effet, elles peuvent fournir tout au long de l'année du naissain et permettent la distribution de naissain sélectionné inexistant dans le milieu naturel comme les huîtres triploïdes.

Le but de l'expérience dans laquelle s'inscrit mon stage est de chercher des marqueurs génétiques liés à l'effort reproducteur quantifié par le volume de la gonade (lignée haute et basse). Pour cela on fait un croisement interlignées pour produire une 1^e génération (G1) avec un phénotype de gonade intermédiaire : c'est l'objectif de mon travail. Les individus de la G1 croisés entre eux en 2009 engendreront des individus de 2^e génération (G2) présentant des phénotypes de gonade différents. Ces différences permettront de chercher des marqueurs génétiques.

3. **Matériels :**

3.1. **Géniteurs :**

3.1.1. **Expérience préliminaire :**

On a utilisé des géniteurs « tout venant » matures permettant de tester les conditions d'élevage : Le but était d'apprendre les techniques de reproduction des huîtres et d'élevage larvaire.

Cette expérience a permis de tester les qualités de phytoplancton étant donné les difficultés actuellement rencontrées sur ces cultures :

- Très faible croissance de ces microalgues.
- Difficultés à maintenir certaines espèces dans des conditions de routine.

Les causes de ces difficultés semblent être identifiées au niveau d'un problème de qualité d'eau dû au vieillissement de l'infrastructure de forage.

Le matériel et méthodes sont les mêmes que ceux utilisés pour l'expérience principale.

3.1.2. **Expérience principale :**

Dans le cadre d'une étude génétique sur l'effort de reproduction, des individus diploïdes ont été sélectionnés sur l'intensité de leur gamétogenèse, mesurée par le volume de leur gonade. On utilise les individus issus des croisements suivants comme géniteurs :

Lignée haute :	Mâles de lignée haute	X	Femelles de lignée haute
Lignée basse :	Mâles de lignée basse	X	Femelles de lignée basse

Lignée haute : individus sélectionnés pour un fort investissement reproducteur : grosse gonade.

Lignée basse : individus sélectionnés pour un faible investissement reproducteur : petite gonade.

Les géniteurs ont été produits en élevage larvaire et en micronurserie à La Tremblade. Le pré-grossissement a été réalisé à la nurserie d'Ifremer à Bouin. En décembre 2007, ces animaux ont été disposés sur des parcs de grossissement. Ils ont été affectés par divers épisodes de mortalités. Au mois d'avril 2008, deux poches de cinq cents individus ont été constituées pour chacune des lignées, l'une a été conservée en mer (Banc d'Agnas, Oléron), et l'autre a été placée en claire dans le marais proche de la station de La Tremblade. Une centaine d'individus de chaque lignée haute et basse sont placées en maturation à l'écloserie de La Tremblade.



Photo 1 : Claires où les géniteurs étaient stockés. (M.M)



Photo 2 : Poches de stockage. (M.M)

Plan de croisement :

N° de lot	N° de bac	Libellé
Lot 1	1	FB1*MH1
Lot 2	2	FB2*MH2
Lot 3	3	FB3*MH3
Lot 4	4	FB4*MH4
Lot 5	5	FB5*MH5
Lot 6	6	FB6*MH6
Lot 7	7	FB7*MH7
Lot 8	8	FB8*MH8
Lot 9	9	FB9*MH9
Lot 10	10	FB10*MH10
Lot 11	11	FB11*MH11
Lot 12	12	FB12*MH12
Pool 1	?	FB*MB

N° de lot	N° de bac	Libellé
Lot 13	13	FH1*MB1
Lot 14	14	FH2*MB2
Lot 15	15	FH3*MB3
Lot 16	16	FH4*MB4
Lot 17	17	FH5*MB5
Lot 18	18	FH6*MB6
Lot 19	19	FH7*MB7
Lot 20	20	FH8*MB8
Lot 21	21	FH9*MB9
Lot 22	22	FH10*MB10
Lot 23	23	FH11*MB11
Lot 24	24	FH12*MB12
Pool 2	?	FH*MH

4. Méthodes :

4.1. Intrants :

4.1.1. Eau de mer :

L'eau de mer est pompée directement dans la Seudre, stockée dans quatre bassins de décantation de 300 m³ et un de 450 m³. L'eau est filtrée sur un filtre à sable de 20 µm, puis l'eau est dégazée dans un bassin de 5 m³ avant d'être distribuée dans toutes les salles de l'écloserie. L'alimentation en eau de la station est dépendante des coefficients de marée, elle n'est opérationnelle qu'à partir d'un coefficient de marée de 31.

La station est équipée d'un forage d'eau de mer. Ce puits est à une profondeur de 110 m. Cette eau est employée pour la préparation des milieux de culture du phytoplancton. Elle peut être utilisée quand l'alimentation directe en eau de mer n'est pas possible. Cette eau est filtrée par la couche de sédiment. Ses caractéristiques sont indiquées en Annexes 9.1.

4.1.2. Phytoplancton :

Les microalgues marines sont cultivées pour être distribuées tout au long du développement des huîtres : Une diatomée *Skeletonema costatum* est cultivée en extérieur dans 4 bacs de 20 m³, permettant une production sur quatre jours, en lumière naturelle avec un éclairage complémentaire pour les jours de faible luminosité. Le milieu de culture est de l'eau de forage enrichi d'engrais. Un bac est distribué quotidiennement.

L'autre diatomée *Chaetoceros gracilis*, ainsi que les flagellés *Isochrysis (T-iso)*, *Tetraselmis suecica* sont cultivés en intérieur dans des volumes de 2, 6 et 300 L en lumière artificielle en continu. Du CO₂ et de l'air sont apportés par un bullage. Le milieu de culture utilisé est soit du milieu de Conway préparé à la station soit du milieu de Conway commercial. Le milieu de Conway apporte les sels minéraux. (Annexe 9.2). Une solution de vitamine est ajoutée (Annexe 9.3).

Pour la salle de maturation et la micronurserie, les microalgues sont injectées à l'eau de mer distribuée. L'apport des algues représente 10% du débit d'eau de mer. Les algues utilisées sont *Skeletonema costatum* (95% de la distribution) et quand les souches sont disponibles, *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis (T-Iso)*, et *Tetraselmis suecica* qui représentent 5% de la distribution.

L'élevage larvaire étant un point important du développement de l'huître, les larves ont un régime particulier. (Voir élevage larvaire). Les différentes espèces d'algues utilisées pour plusieurs stades d'élevage sont récapitulées dans le tableau ci après :

Espèces	Élevage larvaire	Micronurserie	Maturation
<i>S. costatum</i>	Non	Oui	Oui
<i>C. gracilis</i>	Oui	Oui	Oui
<i>T-iso</i>	Oui	Oui	Oui
<i>T. suecica</i>	Oui (en fin d'élevage)	Oui	Oui

Tableau 1 : Phytoplancton distribué en fonction du stade de développement de l'huître.

4.2. Maturation :

4.2.1. Matériel :

La maturation est réalisée dans des bacs rectangulaires à fond plat. La circulation de l'eau est de type flux ouvert (c'est-à-dire que l'eau n'est pas réutilisée) ce qui permet d'avoir les meilleures conditions possibles pour le développement des animaux.

4.2.2. Traitement de l'eau :

La température de l'eau de mer peut être modulée grâce à une arrivée d'eau froide et une arrivée d'eau de mer réchauffée. Pour optimiser le conditionnement, la température de l'eau est augmentée graduellement jusqu'à une température maximale de 19 °C qui est maintenue pendant environ 60 jours.

4.2.3. Entretien des géniteurs :

À leur entrée dans cette phase, les géniteurs sont rincés et frottés pour enlever l'épifaune et le sédiment. Ils sont disposés dans des clayettes surélevées pour éviter que les animaux ne soient en contact avec les fèces et les détrit. Ces déchets s'accumulent au fond du bac.



Photo 3: Tris selon la taille. (M.M)

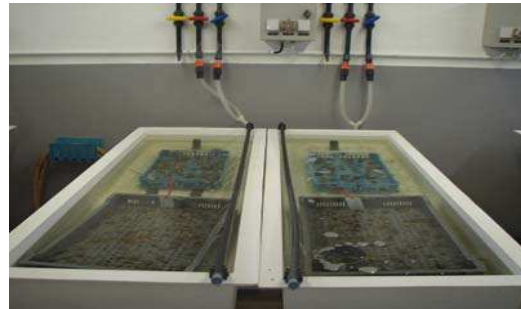


Photo 4: Bacs de maturation. (M.M)

La taille des huîtres étant hétérogène et plutôt petite, on a regroupé les plus grandes huîtres ensemble en plus faible densité pour favoriser leur développement. Pour plus de sécurité, les individus de chaque lignée sont séparés en deux réplicats pour éviter de perdre toute une lignée s'il arrivait des problèmes techniques à un bac.

4.2.4. Prophylaxie :

- Bottes obligatoires.
- Pédiluve rempli d'un bactéricide, virucide : VIRKON
- Désinfection des mains à l'alcool.
- Nettoyage quotidien des bacs et des clayettes à l'eau douce.
- Nettoyage mensuel du bac à l'Arvoxy.
- Nettoyage hebdomadaire des tuyaux de distribution d'eau avec un furet.

4.3. Croisement :

4.3.1. Sexage :

On nettoie l'extérieur des huîtres avec à l'eau de mer pour les débarrasser d'épibiontes et de fèces. On dépose les individus de même lignée sur des tablettes numérotées. On ouvre une à une les huîtres délicatement, pour ne pas entailler leur chair ni libérer les gamètes. On fait une biopsie avec une pipette automatique pour déterminer le sexe de l'huître. Les spermatozoïdes et les ovocytes sont déposés sur une lame et observés respectivement au grossissement X400 et X100. Il faut vérifier qu'un seul type de gamète est présent car les huîtres peuvent être hermaphrodites.

4.3.2. Récolte des gamètes :

Les ovocytes étant fragiles il faut stripper tous les mâles en premier. Les individus sont scarifiés sur la surface de la gonade avec un scalpel. On récupère les gamètes à l'aide d'une pissette d'eau de mer filtrée à 1 µm. On strippe chaque individu dans des récipients séparés.

4.3.3. Préparation des gamètes :

Quand tous les individus ont été strippés, il peut rester des fragments de l'huître avec les gamètes. Les ovocytes ont une taille moyenne de 45 µm et les spermatozoïdes de 35 µm. On tamise la suspension de gamètes à travers un tamis de 60 µm pour les ovocytes et de 40 µm pour les spermatozoïdes, pour extraire les morceaux

de tissu. On verse les gamètes dans des béciers séparés préalablement rincés avec de l'eau de mer à la température d'incubation (25°C) dans un volume de 200 mL.

4.3.4. Dénombrement des gamètes :

Le dénombrement des gamètes se fait grâce au système d'analyse d'image Samba¹ TM 2005 de TITN ALCATEL :

Échantillon	Ovocytes	Spermatozoïdes*
Support	Cellule de Malassez	Cellule de Thoma
Grossissement	X4	X40

Tableau 2: Dénombrement des gamètes.

*Les spermatozoïdes sont dilués au 1/20 (100 µl de formol 10%, 100 µl de spermatozoïdes et 1800 µl d'eau de mer filtrée à 1 µm).

4.3.5. La fécondation :

Les ovocytes sont incubés 30 minutes ce qui va permettre leur gonflement et ainsi favoriser la pénétration du spermatozoïde et en parallèle les spermatozoïdes sont dénombrés. La fécondation se fait en respectant une densité de 100 spermatozoïdes pour 1 ovocyte afin d'optimiser la rencontre des gamètes, tout en évitant la polyspermie. Les gamètes sont déposés dans un volume de 5L à une température de 22-25°C. Puis, 30 minutes après le début des croisements, les embryons sont transférés en salle d'élevage larvaire dans des scobalites de 30 L préalablement remplis d'eau de mer filtrée à la température de la fécondation.

Type de gamète	Ovocytes	Spermatozoïdes
Densité	100 / mL	100 / Ovocytes
Nombre pour 30 L	3 000 000 d'ovocytes	300 000 000 de spermatozoïdes

Tableau 3: Nombre de gamètes.

4.3.6. Embryogenèse :

L'expulsion du premier globule polaire montre que la fécondation est finie, commence alors le développement embryonnaire :



Figure 2 : Schéma du développement larvaire. (FAO)

A : spermatozoïdes autour de l'ovocyte.

B : Expulsion du 1^{er} globule polaire

C : stade 2 cellules

D : Stade 4 cellules

+ Expulsion du 2^e globule polaire

E : Stade 8 cellules

4.4. Élevage larvaire :

4.4.1. Matériel :

Les bacs ou scobalites utilisés sont des bacs cylindriques à base conique en PVC de volume de 30 et/ou de 150L. Une aération d'air par le dessous permet d'empêcher que les larves ne sédimentent pas au fond du bac. Pour des raisons pratiques, l'élevage larvaire se fait trois fois par semaine. Il faut empêcher l'accumulation de fèces dans le bac ainsi que les restes de phytoplancton qui pourraient entraîner le développement de bactéries. Certains protistes peuvent se développer comme les vorticelles qui se nourrissent des algues diminuant ainsi la ration alimentaire des larves.

4.4.2. Traitement de l'eau de mer :

La filtration :

L'eau préfiltrée à 20 µm est utilisée. Elle est traitée par 2 filtres à poches de 3 µm et 1 µm et une cartouche de 1 µm. Les poches sont par paire (3 et 1 µm) ce qui permet d'alterner leur utilisation.

La température :

La température est régulée grâce à un échangeur thermique. Une température entre 22 et 23 °C est requise. Il est important de vérifier que cette dernière est bien la même dans tous les bacs afin d'éviter d'introduire des effets environnementaux dans nos expériences.

4.4.3. Relevé des paramètres :

Au début de chaque jour d'élevage larvaire, la température et la salinité de tous les bacs sont mesurées grâce à un salinomètre WTW. Cela nous permet de mettre en corrélation les variations des facteurs abiotiques avec la variation de comportement (croissance, mobilité) des larves.

4.4.4. Densité larvaire :

Au cours d'un élevage, les larves ne se développent pas à la même vitesse. On observe ainsi une tête, un corps et une queue de lot. La tête de lot est la proportion de larves qui se sont le mieux développées. À l'inverse la queue de lot représente celles qui sont le moins performantes en termes de croissance. Le corps est la partie intermédiaire qui est généralement la plus nombreuse. Pour optimiser leur développement, des densités sont ajustées tout au long de l'élevage.

Jours d'élevage	J-0	J-2	J-8
Densité larvaire (nombre/mL)	100	10	5

Tableau 4: Densité larvaire au cours de l'élevage.

4.4.5. Récupération des larves :

Les tamis donnent une première indication sur la taille des larves. Pour ne perdre aucune larve il est important d'utiliser des tamis de taille de maille inférieure à la taille des larves, plusieurs tamis de taille de maille différents sont utilisés superposés. On utilise des mailles carrées. Le plus grand espace par lequel les larves peuvent passer est donc la diagonale qui représente la racine carrée de 2 fois la longueur ($d = L \times \sqrt{2}$). C'est cette

longueur qui va conditionner l'utilisation des tamis. On vidange les bacs avec un faible débit pour ne pas blesser les larves.

Jour d'élevage	Tamis (µm)
J2-J4	45
J7-J9	60
J11	70
J14	85
J16	100
J18	112
J21	125
J23-J25-J27-J29	150/250

Tableau 5: Taille théorique de tamis utilisé au cours de l'élevage larvaire.

4.4.6. Estimation des effectifs et observations :

Les larves tamisées sont récupérées dans des éprouvettes de volume fixé. Le sous-échantillon est prélevé par une pipette automatique en agitant le contenu de l'éprouvette contenant les larves de façon à avoir une répartition la plus homogène possible. Les cônes utilisés avec la pipette automatique devront être élargis au fur et à mesure que les larves grandissent pour ne pas biaiser le prélèvement. Puis on compte les larves, on fait une moyenne que l'on rapporte au volume de l'éprouvette. Les larves peuvent être très mobiles, on rajoute du formol 10% pour les immobiliser. On dépose trois sous-échantillons sur une lame. On observe l'anatomie, indice de l'avancement du cycle. La coloration des larves permet de constater si elles se sont nourries et la présence d'une tache en bord de coquille montre une croissance. La mobilité est révélatrice de l'état physiologique des larves.

4.4.7. Nourriture :

Les espèces d'algues qui présentent de bonnes valeurs nutritives pour l'élevage larvaire sont les diatomées *Chaetoceros gracilis*, et les flagellés *Isochrysis* (T-Iso). Au cours de l'élevage, on augmente la ration alimentaire :

Jour d'élevage	Densité nombre de larves par mL	Nombre total de cellule par mL	Nombre de cellule par mL	
			T-iso (70%)	<i>Chaetoceros gracilis</i> (30%)
J1	100	10 000	7 000	3 000
J5	10	20 000	14 000	6 000
J13	5	80 000	56 000	24 000
J16	5	140 000	98 000	42 000
J20	5	200 000	140 000	60 000
J24	5	300 000	210 000	90 000

Tableau 6: Ration alimentaire en fonction des jours d'élevage utilisée à l'éclosion de La Tremblade.

4.4.8. Prophylaxie :

- Bottes obligatoires.

- Pédiluve de bactéricide et virucide : VIRKON
- Désinfection des mains à l'alcool.
- Nettoyage des instruments utilisés par trempage dans du bactéricide et virucide : VIRKON
- Nettoyage des scobalites à l'eau chaude lors des élevages.
- Nettoyage 1 jour d'élevage sur 3 des scobalites à l'acide TAR26.
- Rinçage de la salle à l'eau douce.
- Utilisation d'un antibiotique l'érythromycine pour inhiber la croissance et la prolifération des bactéries. Elle inhibe la synthèse protéique en liant les sous-unités ribosomale-50s. Pour 1l de volume, on pèse 0,1 g d'antibiotique (en poudre), que l'on versera directement dans les scobalites d'élevage larvaire.

4.4.9. Mesure de la taille des larves :

Chaque jour d'élevage larvaire, on prélève 200 µL de la suspension des larves et on le stocke dans des eppendorfs bien identifiés avec une goutte de formol 10% pour les mesurer. Il faut laisser décanter les larves au fond du tube pour pouvoir toutes les récupérer. On dépose les larves avec une pipette automatique entre lame et lamelle et l'on utilise le système Samba pour estimer la taille moyenne des larves. Les mesures sont faites sur un effectif de 50 larves durant toute la durée de l'élevage larvaire.

4.5. Micronurserie :

4.5.1. Matériel :

Lorsque les larves sont oeillées et montrent un pied c'est qu'elles sont prêtes à se fixer. On les transfère dans la salle de micronurserie. Les bacs sont rectangulaires à fond plat. On utilise un tamis de maille 150 µm dont les rebords ont été enduits de paraffine pour éviter que les larves ne s'y fixent. Il est mis en eau dans un bac et l'on saupoudre le tamis de microbrisure en faisant attention à ne pas colmater le tamis. Un colmatage peut faire déborder le contenu du tamis et donc les larves. En conditions normales, la densité de fixation est de 40 000 individus par tamis. Pour une taille supérieure à 1000 µm, la densité est de 20 000 individus par tamis.

4.5.2. Traitement de l'eau de mer :

Filtration de l'eau :

L'eau préfiltrée à 20 µm est utilisée. Elle est traitée par un filtre à sable de Tous les jours, le filtre est nettoyé (backwash). L'alimentation en eau de chaque bac passe dans une colonne de qui contribue à limiter la formation de microbulles.

Température :

La température de l'eau peut être modulée grâce à une arrivée d'eau froide et une arrivée d'eau chaude par bac. Le réglage du débit est donc individuel.

4.5.3. Suivi des futurs naissains :

On observe un échantillon de larves à la binoculaire pour vérifier qu'elles sont fixées sur de la microbrisure. Dès qu'elles sont fixées, on élimine la microbrisure, et l'on tamise successivement sur des mailles de 500, 1000, 2000 µm au cours du temps en fonction de la taille des individus. Après chaque tamisage, on

remet les huîtres sur un tamis de maille inférieur à celle du tamisage. Les huîtres peuvent se fixer plusieurs fois ce qui peut entraîner une fixation sur le tamis malgré les précautions prises. Il faut essayer de les décoller sans les blesser. Il faut nettoyer les tamis tous les jours car les restes de phytoplancton retenu sur la maille sont des risques de contamination bactérienne, ils peuvent aussi colmater le tamis et utiliser l'oxygène présent dans l'eau.

4.5.4. Estimation des effectifs :

Pour connaître le nombre de naissain fixé, on fait une estimation d'effectif par poids moyen. On tare les tamis qui vont être utilisés pour récupérer les naissains après avoir été tamisé (poids noté). Le tamis et les larves sont égouttés pendant 20 à 30 minutes. On pèse la totalité du lot. On pèse 5 réplicats de 0,5g, puis on compte les larves de l'échantillon en prenant soin de bien décoller les larves entre elles. On obtient le poids moyen qui nous permettra d'estimer le nombre de naissains.

4.5.5. Prophylaxie :

- Bottes obligatoires.
- Pédiluve de bactéricide, virucide.
- Désinfection des mains à l'alcool.
- Nettoyage quotidien des bacs et des tamis
- Un nettoyage hebdomadaire des bacs à l'Arvoxy ou quand ils sont très sales.
- Nettoyage hebdomadaire des tuyaux de distribution d'eau avec un furet.

5. Résultats :

5.1. Expérience préliminaire :

5.1.1. Sexage et comptage des gamètes :

Pour cette expérience, 8 individus ont été ouverts, 5 femelles et 3 mâles. Pour les croisements, on utilise les femelles dont on a dénombré le plus grand nombre de gamètes et les 3 mâles. Le tableau permet d'obtenir les volumes qui sont utilisés pour réaliser les fécondations., Un réplicat a été fait pour chaque croisement, ce qui donne un total de 6 croisements.

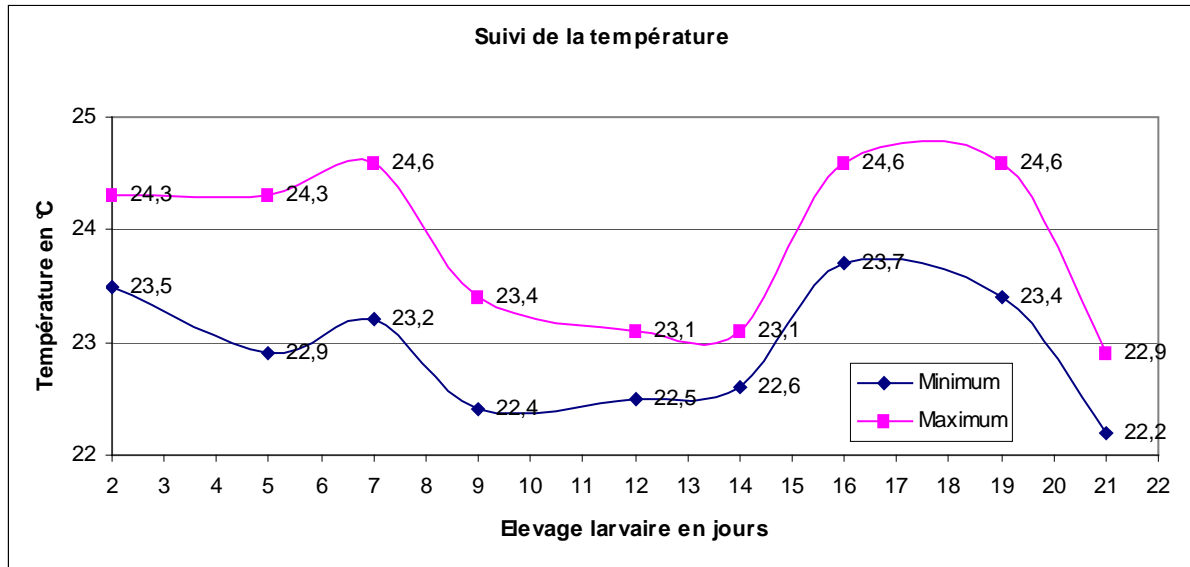
Femelle	Ovocytes/ml	Nombre ovocytes	Volume pour 30L en mL	Volume pour 150L en mL
1	30 641	6 128 280	97	489
2	92 045	18 408 900	32	162
3	56 790	11 358 000	52	264
4	104 999	20 999 800	28	142
5	60 320	12 064 040	49	248
Mâle	Spermatozoïdes/ml	Dilution	Volume pour 30L en µL	Volume pour 150L en µL
1	161 444 200	10	186	929
2	143 948 000	10	208	1042
3	120 693 000	10	249	1243

Tableau 7: Volume de gamètes pour les fécondations.

5.1.2. Élevage larvaire :

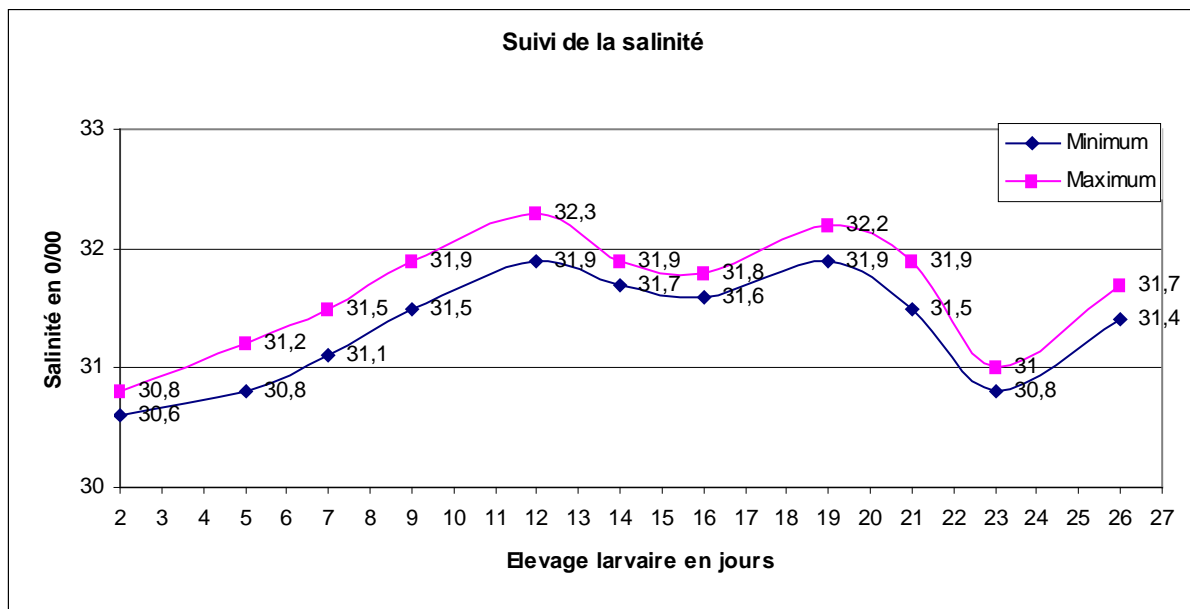
- **Paramètres abiotiques :**

Le suivi de la température et de la salinité de l'eau de mer est effectué chaque jour d'élevage. La salinité et la température de l'eau de mer varient au cours de l'élevage, mais elles varient aussi entre les bacs.



Graphique 1: Température de l'eau.

La température varie entre 22,2°C et 24,6°C. La salinité varie de 30,6 à 32,3 ‰.



Graphique 2: Salinité de l'eau.

- **Croisement :**

Le taux d'éclosion est le rapport entre le nombre de larve D à la première filtration J2 sur le nombre d'ovocytes utilisés pour les croisements : **(Nombre de larves à J-2) x 100**

3 000 000

Lot	1	2	3	4	5	6	Pool 1	Pool 2
Ovocytes	3 000 000	3 000 000	3 000 000	3 000 000	3 000 000	3 000 000	150 000 000	150 000 000
Larves ¹	5 180 000	6 106 667	4 380 000	4 806 667	8 533 333	7 006 667	5 520 000	6 8200 00
Taux (%)	172,6	203,6	146	160,2	284,4	233,6	3,7	4,5

Tableau 8: Estimation du taux d'éclosion à J-2.

¹ Effectif estimé à J-2.

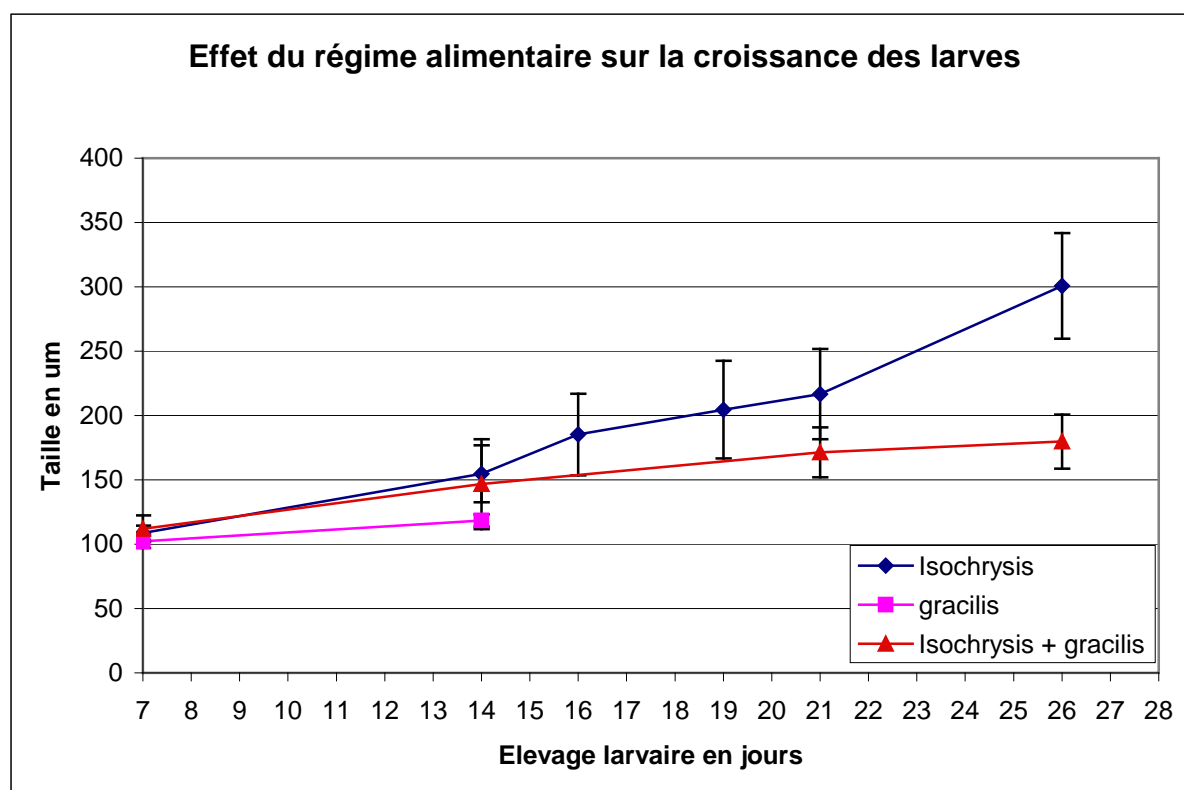
Le tableau ci-après, récapitule la durée d'élevage larvaire en fonction des régimes monospécifiques et bispécifiques :

Lot	1, 2, 3, 4, 5, 6, Pool 1, Pool 2	9, 10	11, 24
Régime	<i>Isochrysis + C. gracilis</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>C. gracilis</i>
Durée en jours	16 - 21	21	16 - 18

Tableau 9: Effet du régime alimentaire sur la durée de l'élevage larvaire.

- Croissance larvaire :

Après quelques jours d'élevage, un suivi de la croissance est réalisé. Le graphique ci-dessous, montre la croissance en fonction du régime alimentaire.



Graphique 3: Effet du régime alimentaire sur la croissance des larves.

Le graphique 1 montre que le régime à base uniquement de flagellés *Isochrysis* permet une meilleure croissance. La différence augmente sur la fin d'élevage. La croissance en régime bispécifique est linéaire, 70 µm en 20 jours. Pour celle qui est en monospécifique *C. gracilis*, on observe une pousse de 16 µm en 8 jours avant que toutes les larves ne meurent.

On observe 3 phases de croissances pour l'alimentation monospécifique *Isochrysis* :

- De J-7 à J-14 une faible croissance, pousse de 46 µm en 8 jours.
- De J-14 à J-21 une croissance plus forte en début de période qui diminue, pousse de 72 µm en 8 jours.
- De J-21 à J-26 une très forte croissance puisque les larves poussent de 84 µm en 6 jours.

5.2. Expérience principale :

5.2.1. Sexage:

Il a été nécessaire d'ouvrir 61 individus pour obtenir 13 femelles de lignée basse (FB), 14 mâles de lignée basse (MB), 18 femelles de lignée haute (FH), 12 mâles de lignée haute (MH) et un hermaphrodite (HERMA). Douze individus par type de parents ont été retenus en raison de la taille de la gonade. L'hermaphrodite a été exclu. (Feuille de sexage en Annexe 9.5)

5.2.2. Croisement :

Pour chaque lot, on croise les gamètes d'une femelle avec ceux d'un mâle de lignée différente. Pour la conservation des lignées, on décide de faire des Pools de chaque lignée. Pour les Pools, on utilise les gamètes des toutes les femelles et mâles d'une même lignée. Ainsi on obtient :

12 lots	FB x MH	Croisements biparentaux
12 lots	FH x MB	Croisements biparentaux
1 lot	FB x MB	Croisements multiparentaux (pool)
1 lot	FH x MH	Croisements multiparentaux (pool)

Tableau 10: Plan de croisement.

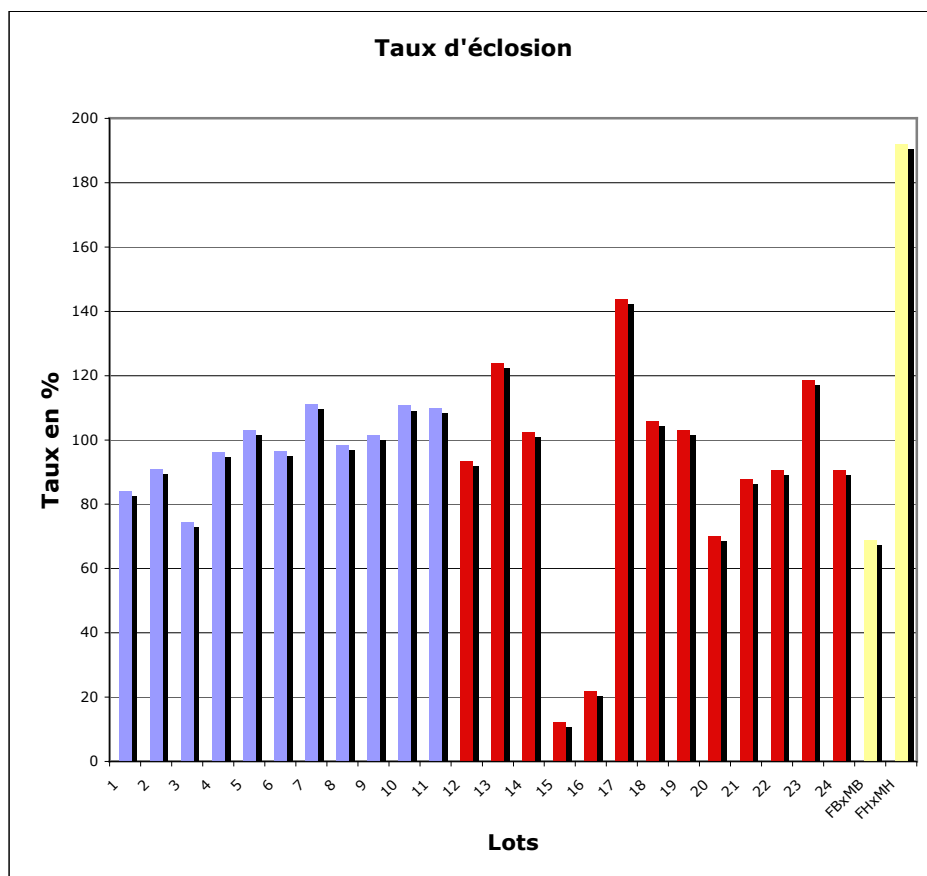
- **Volume des gamètes à distribuer pour chaque croisement:**

On dénombre le nombre de gamètes de chaque parent. Cette information est nécessaire pour préparer les volumes à utiliser lors de la fécondation et vérifier s'il y a suffisamment de gamètes. Les effectifs d'ovocytes des FB sont compris entre 3 000 000 et 12 000 000, alors que ceux des FH sont compris entre 1 000 000 et 9 000 000. Pour rappel, 3 000 000 d'ovocytes sont nécessaires. Le nombre de spermatozoïdes n'est pas un facteur limitant pour la fécondation. (Annexe 9.6)

Les gamètes restants de toutes les femelles de chaque lignée sont utilisés pour faire le Pool. Les femelles ne participent pas de la même façon à cette fécondation contrairement aux mâles dont le nombre de gamètes est suffisant. (Annexe 9.7)

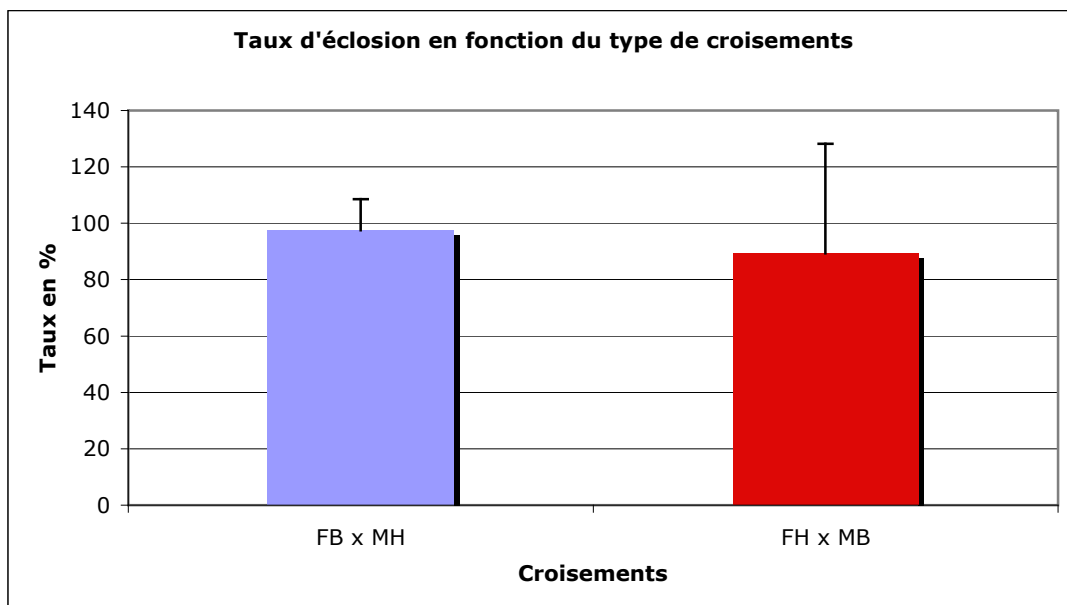
- **Taux d'éclosion:**

Ce graphique montre que pour les croisements FB x MH (lots bleus) le taux d'éclosion est supérieur à 74%. Alors que pour les croisements FH x MB (lots rouges) le taux est supérieur à 12,1 %.



Graphique 4: Taux d'éclosion des lots.

Le taux d'éclosion moyen par type de croisement est présenté dans le graphique suivant. Il n'y a pas de différence significative.

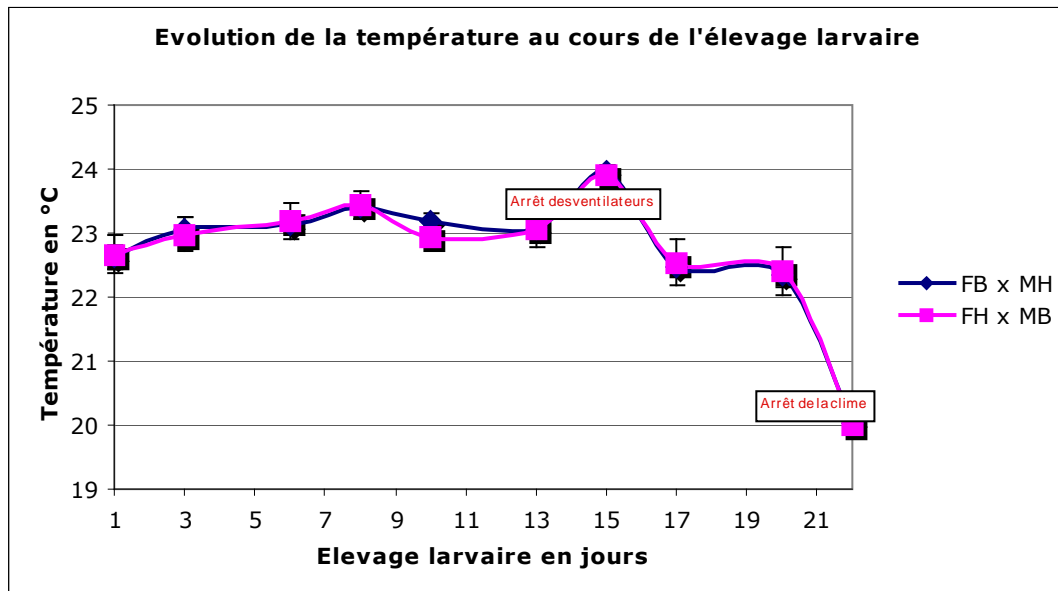


Graphique 5: Taux d'éclosion des croisements.

5.2.3. Élevage larvaire :

- Paramètres abiotiques:

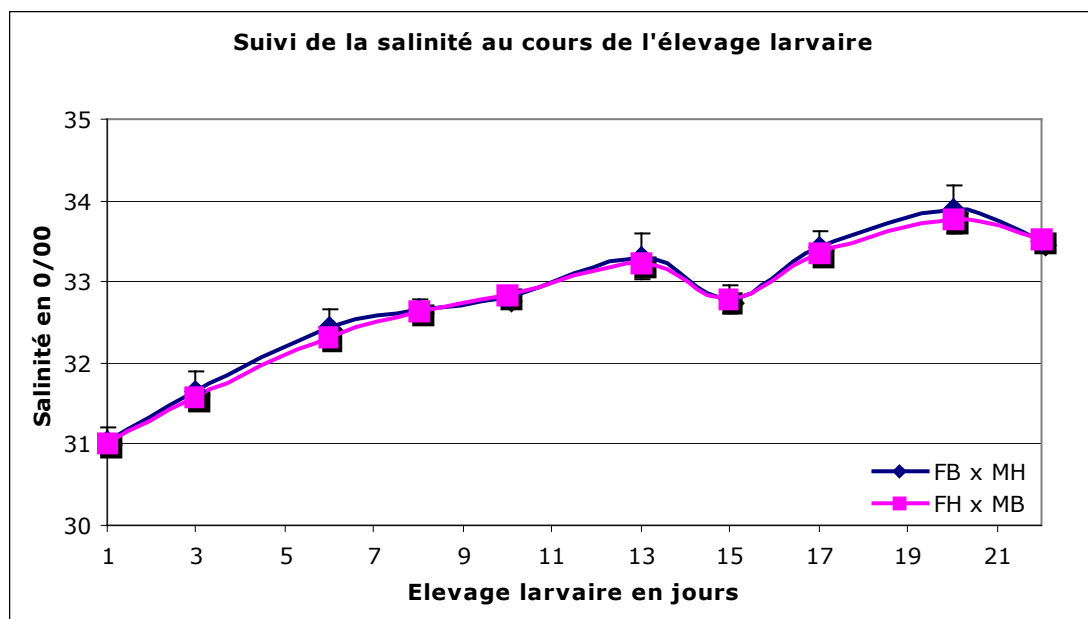
Que cela soit pour la température ou la salinité des bacs, il n'y a pas de différences significatives entre les deux types de croisements.



Graphique 6: Température de l'eau.

Au cours de l'élevage larvaire, la température a varié de 20 à 24°C.

- Jusqu'à J-13, la température varie très peu.
- À J-15, il y a une augmentation de 1°C. Elle est le fait d'un oubli de mise en route de ventilateurs.
- À J-22, une diminution de 2 °C provoqué par l'absence de climatisation est observée.



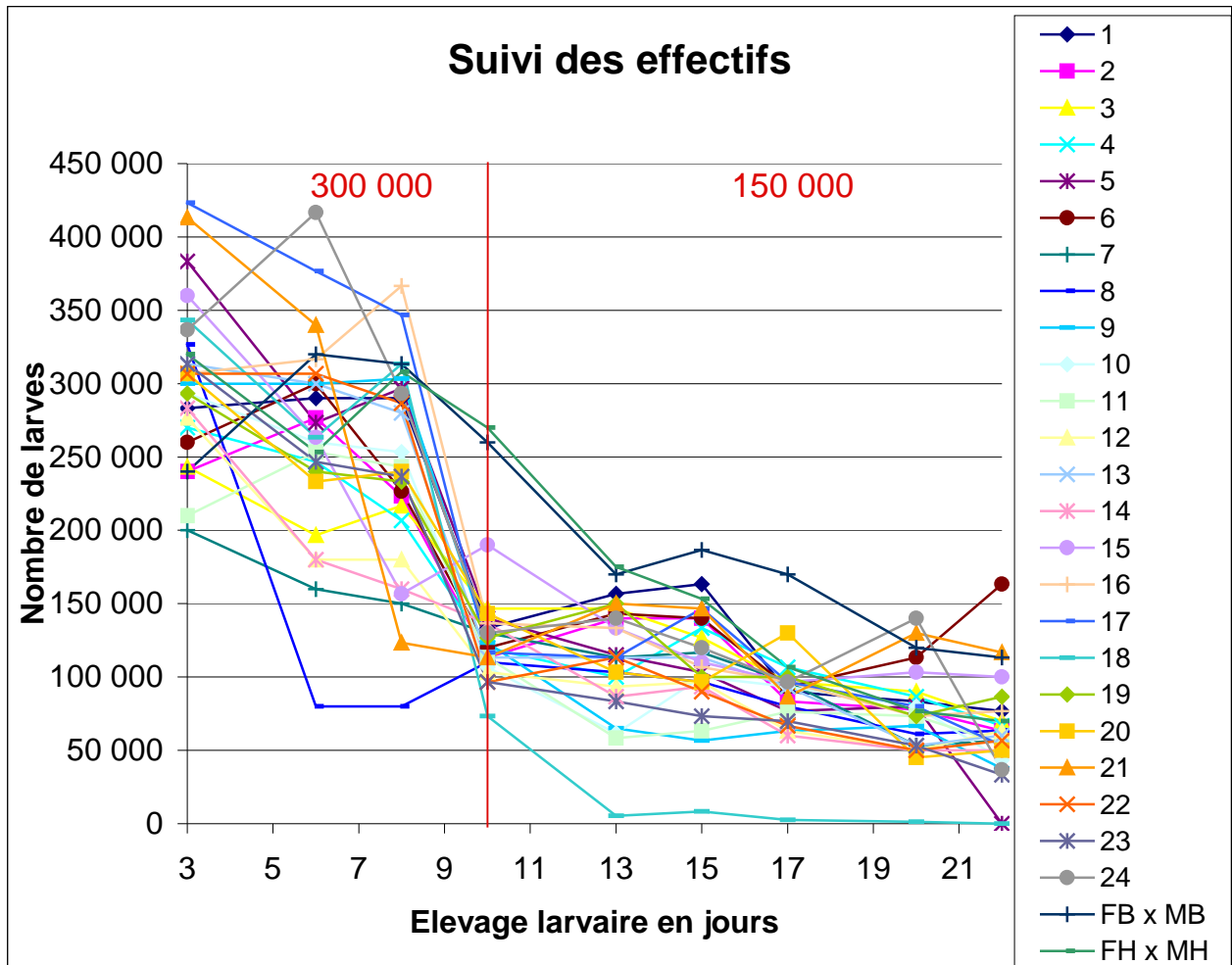
Graphique 7: Salinité de l'eau.

Quant à la salinité,

- Il y a une augmentation jusqu'à de J-1 à J-13.
- Une diminution est observée à J-15.
- Puis la salinité se stabilise entre 33,5 et 34 ‰.

- **Le dénombrement larvaire :**

Le suivi des effectifs est important, car on doit réajuster les densités à J-2 et J-8. Les effectifs au cours de l'élevage sont représentés ci-après.

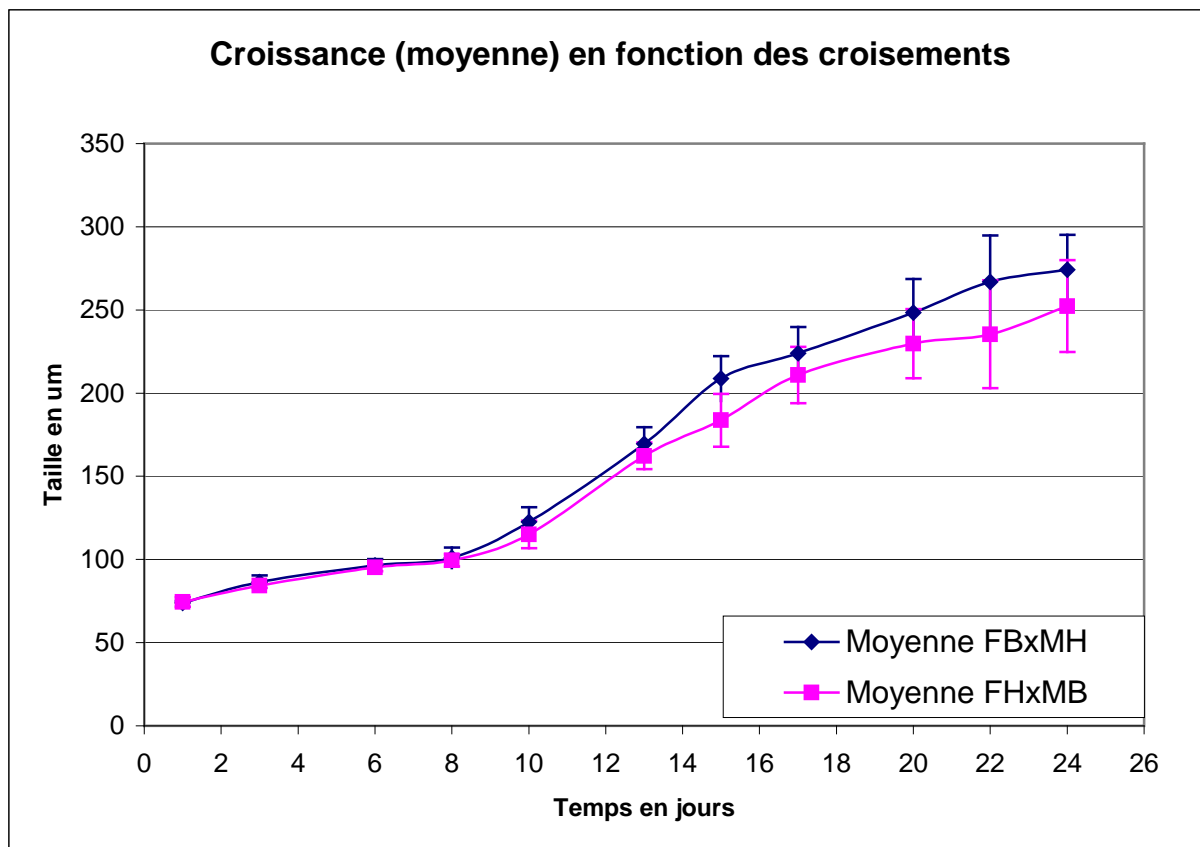


Graphique 8: Dénombrement larvaire au cours de l'élevage.

Au cours de l'élevage, on réajuste les effectifs dans les bacs pour optimiser leur développement (Tableau 3). La variation des courbes est aussi le fait de la technique d'échantillonnage. La mobilité des larves peut être une cause de la mauvaise homogénéisation de l'éprouvette contenant les larves lors du prélèvement.

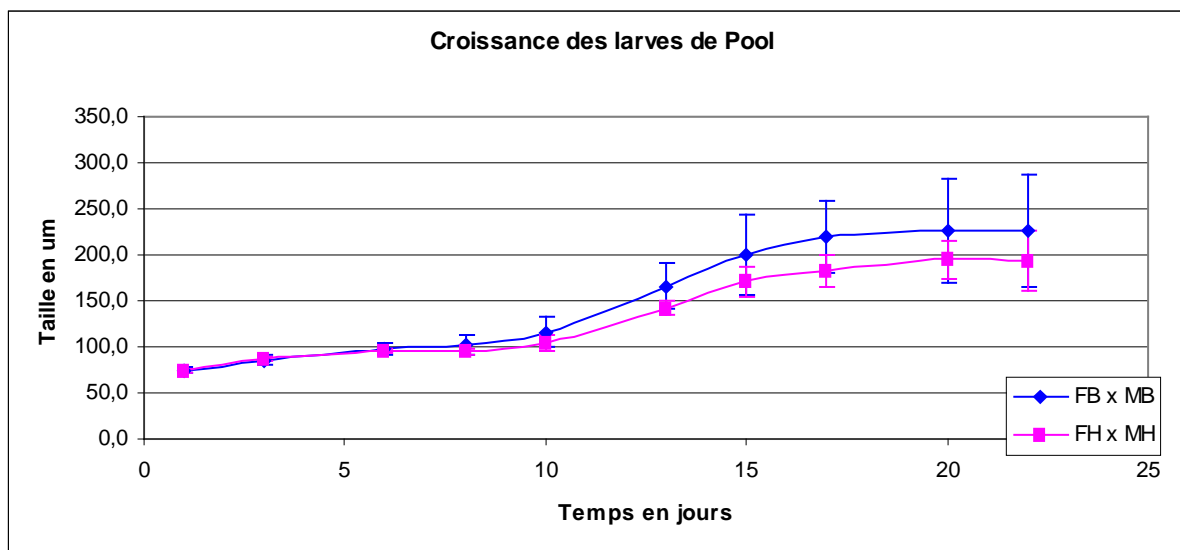
- **La croissance des larves :**

Le suivi de la croissance des larves se fait par la mesure à différents temps de la taille des larves. On a moyenné les croissances par jour par type de croisement pour que le graphique puisse être lisible.



Graphique 9: Influence des parents sur la croissance larvaire.

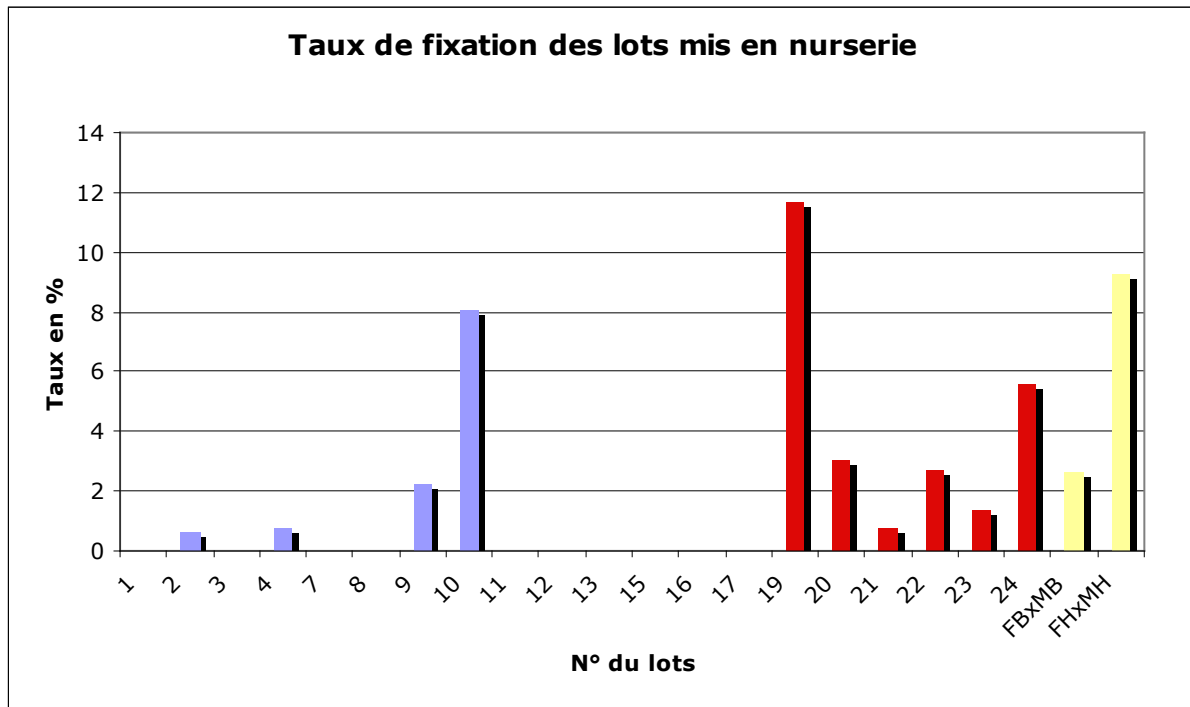
Si on fait la moyenne de la croissance par type de croisement (Graphique 9), il n'y a pas de différence significative entre les croisements. Il y'a une faible croissance de J-1 à J-10. À partir de J-10, la croissance est plus importante jusqu'à J-15, puis elle diminue. Il en est de même pour la croissance des Pools (Graphique 10).



Graphique 10: Croissance larvaires des Pools.

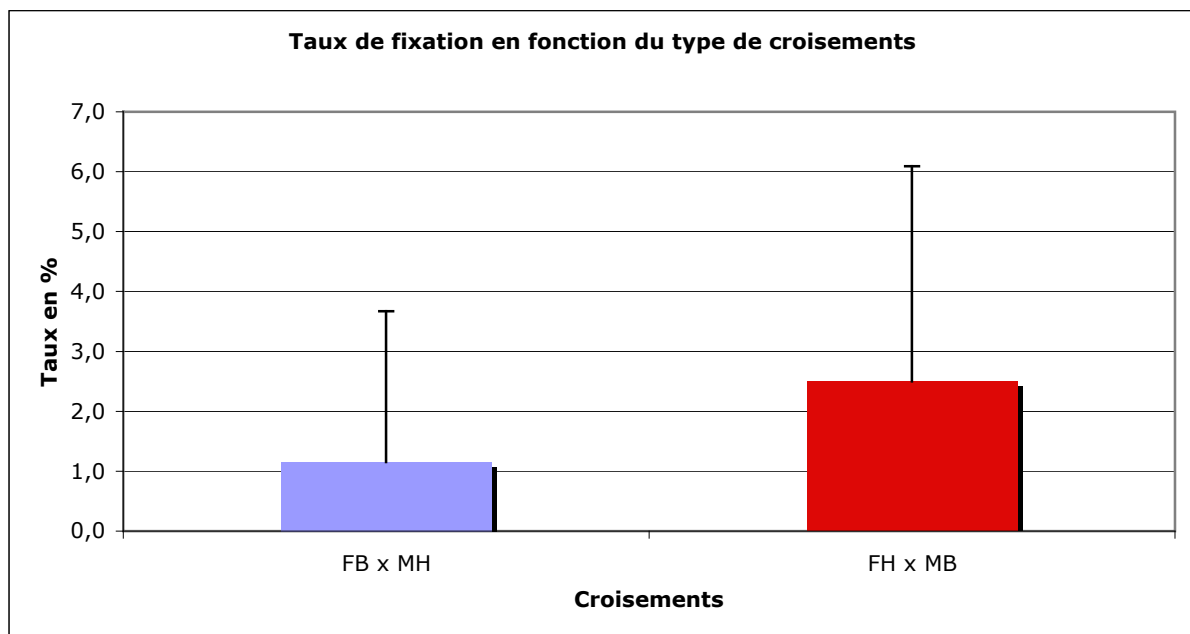
5.2.4. Taux de fixation :

Très peu lots ont survécu au début du stade de micronurserie.



Graphique 11: Taux de fixation des lots.

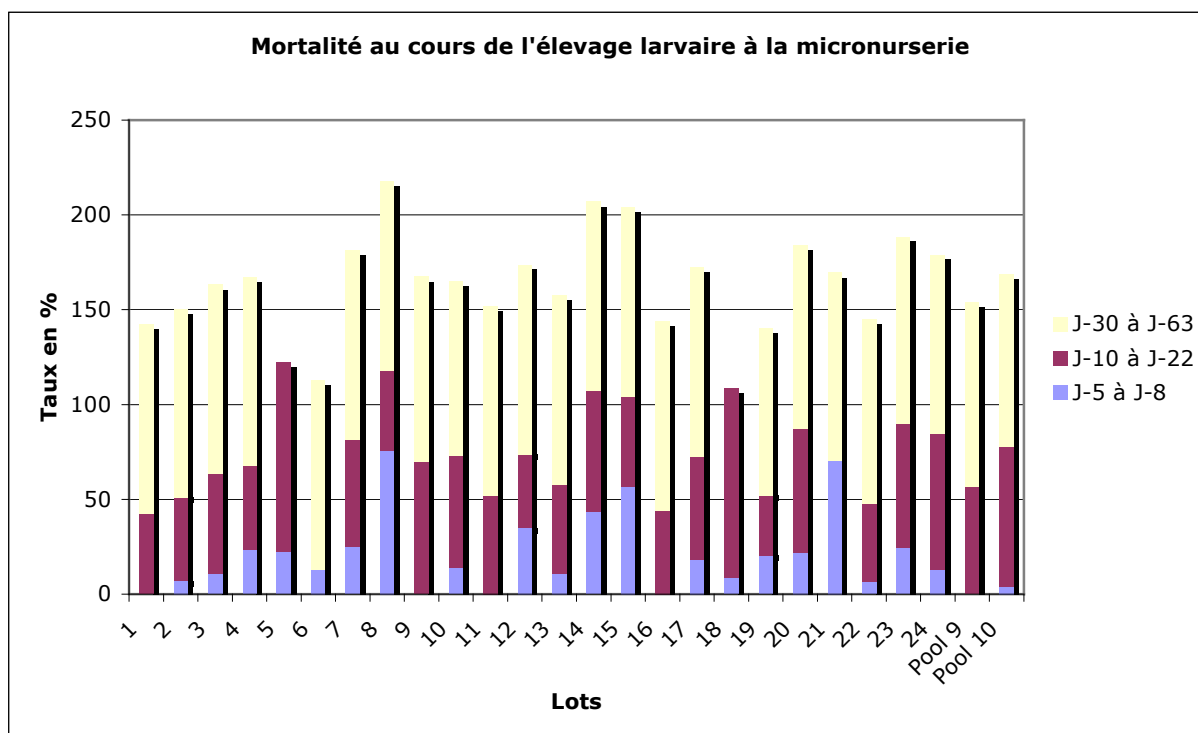
La moyenne a été faite par rapport au lot mis en fixation et non par rapport à la totalité des lots, puisqu'il y a eu des épisodes de mortalités lors de l'élevage larvaire.



Graphique 12: Taux de fixation des croisements.

5.2.5. Taux de mortalité :

Ci-après un graphique représentant le taux de mortalité de chaque lot au cours de l'élevage larvaire, le taux d'éclosion n'est pas pris en compte.



Graphique 13: Taux de mortalité au cours de l'expérience.

Au cours de l'élevage larvaire, on fait une remise à densité à J-2, J-5 et J-8. Les taux ci-dessus sont calculés par rapport au nombre de larves estimé en début et en fin de période. L'expérience est décomposée en trois périodes. Les deux premières se déroulent en élevage larvaire, alors que la dernière représente le temps passé en micronurserie. Il reste 4 lots sur 12 pour les croisements FB x MH, alors que pour l'autre croisement, il reste 6 lots sur 12 en micronurserie. (Annexe 9.9)

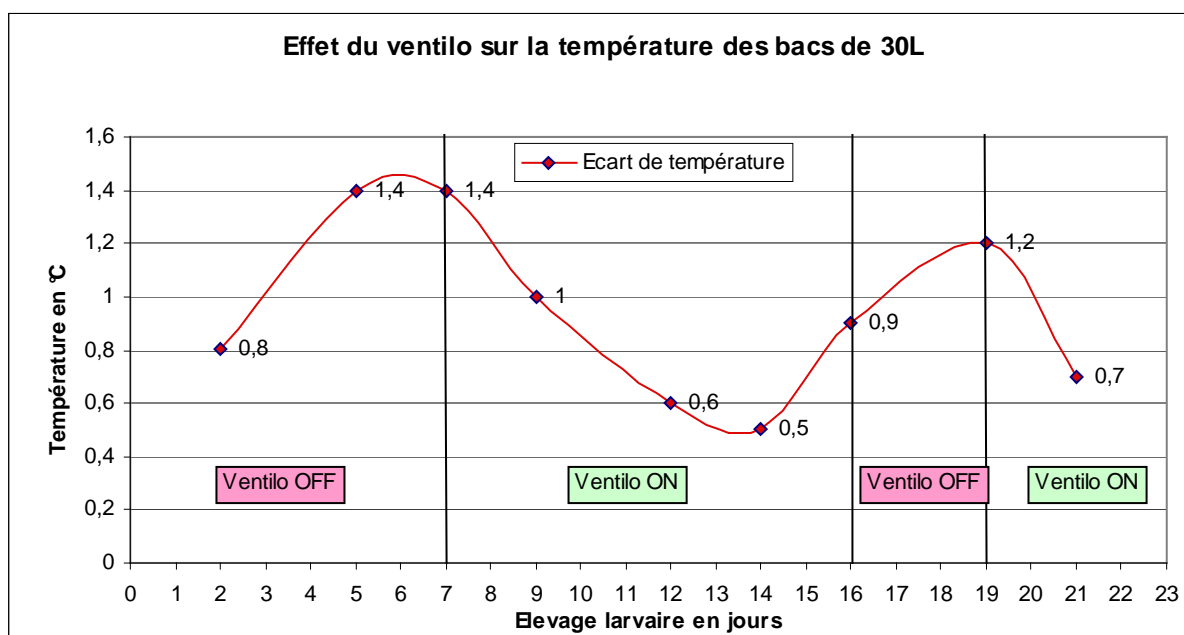
6. Discussion :

6.1. Expérience préliminaire :

Les géniteurs utilisés sont plus âgés que ceux de l'expérience principale. Ainsi la sexe ratio ne devrait pas être un facteur limitant. En effet, les huîtres étant des hermaphrodites protandres alternatifs. La première année, la proportion de mâles est importante. Le nombre de femelles sera donc l'élément limitant pour la fécondation de l'expérience principale.

Les conditions thermiques ne sont pas stables sur 24h. Un gradient de température de l'eau des bacs est observé. De plus hautes températures sont observées dans les bacs qui sont les plus proches de la sortie d'air de la climatisation utilisée pour stabiliser les températures de l'eau d'élevages. On a utilisé un ventilateur pour tenter d'homogénéiser le flux d'air dans toute la salle. Grâce à cette utilisation, nous avons observé un écart de température entre 0,5 et 1°C contre 1,4°C sans ventilateur. Ce résultat conforte l'utilisation de deux ventilateurs

pour l'expérience principale. La salinité varie tout au long de l'élevage, mais aucun moyen ne permet d'ajuster la salinité.



Graphique 14: Effet du ventilo sur la température de l'eau d'élevage.

Le taux d'éclosion est supérieur à 100% pour les 6 croisements biparentaux. Ceci s'explique par une surestimation des ovocytes lors de leur comptage. Malgré cela, la remise à densité à J-2 permet de corriger cette erreur. Pour les croisements en Pool le taux est inférieur à 5% car, lors de la fécondation, les volumes de gamètes ont été préparés pour un volume d'élevage de 30L et non pas de 150L. En conséquent, le volume d'eau des bacs est réajusté à demi hauteur des bacs.

Les lots nourris avec la diatomée en monospécifique ont la plus mauvaise croissance. Même en régime bispécifique (*C. gracilis* + *Isochrysis*), la croissance est moindre que le régime à base d'*Isochrysis*. On suppose que la diatomée a un effet négatif sur la croissance des larves. Cette supposition est confirmée par l'arrêt de l'élevage au 16^e jour du fait de la mort des larves (Tableau 8). Pour l'expérience principale, la diatomée *C.gracilis* n'a pas été distribuée aux larves.

Cette expérience a été mise en place pour me permettre de découvrir et apprendre les techniques permettant le suivi d'un élevage. Les différentes erreurs commises m'ont permis d'acquérir l'expérience nécessaire pour réaliser l'expérience principale.

6.2. Expérience finale :

Malgré le jeune âge des huîtres, on a eu une sexe ratio de 48% de femelles pour la lignée basse contre 58% de femelles pour la lignée haute. Le nombre de femelles n'a donc pas été limitant et ces résultats ont permis de réaliser le croisement souhaité.

Il y a eu peu de surestimation lors du comptage des gamètes puisque le nombre de larves à J-2 est sensiblement égal au nombre d'ovocytes. Pour les croisements biparentaux, le nombre de gamètes était suffisant pour toutes les femelles sauf 3 : 3 femelles de la lignée haute FH6 (1 415 700 ovocytes), FH7 (2 598 900 ovocytes) et FH8 (1 070 800 ovocytes) avaient un nombre de gamètes limitant. Malgré cela les 3 croisements par des mâles de lignée basse ont donné des taux d'éclosion respectivement de 106%, 103% et 70%. La moyenne du taux d'éclosion des croisements **FB x MH** est de 97,6 % (écart-type = 11), alors que celle des croisements **FH x MB** est de 89,4 % (écart-type = 38,8). D'après le graphique ci-après, il n'y a pas de différence significative. On peut supposer que malgré la différence d'investissement reproducteur, aucune des deux lignées n'est plus féconde que l'autre. Par contre, au niveau des croisements FH x MB, il y a une variabilité inter-lots puisque l'on observe des taux d'éclosions de 12% à 100%. Elle peut être le fait soit d'une incompatibilité des gamètes, soit d'un arrêt de développement lors de l'embryogenèse. Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, il aurait fallu faire des prélèvements à intervalles réguliers lors de l'embryogenèse pour estimer la proportion d'embryons.

La variation des effectifs, au cours d'une période durant laquelle l'effectif doit être constant, est expliquée par une mauvaise homogénéisation de l'éprouvette contenant les larves lors du prélèvement servant à l'échantillonnage. La mobilité importante des larves de certains lots est la principale cause. Avec un agitateur, on remet les larves déposées au fond du récipient en suspension. Seulement, quand les larves sont mobiles elles se trouvent aussi dans la colonne d'eau ce qui nécessite de moins agiter. Or je n'ai pas su adapter mon agitation par rapport à la mobilité des larves. J'ai trop agité l'eau ce qui a apporté les larves en surface et ainsi j'ai faussé l'estimation.

Globalement, il n'y a pas de différence significative sur la croissance des larves si on prend en compte le type de croisement. Par contre il a été remarqué qu'à J-23, les larves avaient la taille indicatrice de la fixation, sans pour autant être oeillées ou pédivelligères. Suite à des problèmes de phytoplancton, une seule souche de microalgues a été distribuée. On peut émettre l'hypothèse que l'apport nutritionnel n'était pas suffisant.

Pour le passage en micronurserie, certains lots ne présentaient pas les caractéristiques anatomiques (présence du pied) pour être transférés sur de la microbrisure. Néanmoins, l'observation de coquilles vides, de plus en plus nombreuses, nous a décidés à les transférer en micronurserie en espérant améliorer les conditions d'élevage. Après le nettoyage des bassins de décantation, une forte mortalité a été observée sur les lots 1, 2, 3, 7, 10, 11, 12, 17 et sur le Pool FH x MH. Certains lots présentaient une mortalité des larves fixées. L'hypothèse de la mauvaise qualité d'eau causant la mort des larves est la plus probable. D'ailleurs elle serait la cause de la plus forte mortalité des larves durant toute l'expérience (Graphique 13).

Le contexte dans lequel s'est déroulée l'expérience n'était pas des plus favorables. Elle a commencé au début du mois de juin. Depuis des années, une mortalité est observée pendant la période estivale. Mais cette année, la mortalité fut plus importante, avec des taux de mortalité élevés du naissain qu'il soit d'écloserie ou du captage naturel.

En sortie de micronurserie, 1000 individus par lot étaient nécessaires. Loin de ce résultat, il a été décidé de relancer une nouvelle expérience avec les mêmes lots de géniteurs. À l'ouverture des géniteurs pour le sexage, on s'est rendu compte que les huîtres avaient perdu. L'expérience a donc été annulée et les individus en micronurserie conservés.

7. Conclusion :

Mon choix de stage a été motivé par la possibilité de travailler dans une écloserie de mollusques mais surtout par l'opportunité de travailler dans une structure expérimentale. Les membres de l'équipe génétique m'ont formé à la zootechnie relative à un élevage d'huître creuse *Crassostrea gigas* comme la culture de phytoplancton, la fécondation par stripping, l'élevage larvaire, la micronurserie et la maturation. Le caractère expérimental m'a appris à m'adapter aux conditions particulières appliquées lors des élevages, comme l'élevage larvaire de nombreux lots différents en même temps, la récupération de tous les individus et pas seulement le corps ou la tête de lot.

Les problèmes rencontrés (qualité d'eau et qualité de phytoplancton) lors des expériences m'ont confronté à tous les cas de figures observables en écloserie. La forte mortalité observée sur le terrain, m'a permis de collaborer avec le personnel des autres laboratoires de l'IFREMER ainsi que les affaires maritimes pour des échantillonnages. Cela m'a permis, au cours de ces interventions, de rencontrer les professionnels sur le terrain. Ce stage a été à mon sens complet.

8. Bibliographie :

- Allen Jr, Downing S., Chew K., 1989. Hatchery manual for producing triploid oysters. University of Washington.
- Audineau, Blancheton, 1986. Production d'Algues unicellulaire. Ifremer Palavas.
- Brenier M., Guillo A., 2007. Mise en place du système de management environnemental 14001 dans l'écloserie de la station Ifremer de la Tremblade. Ifremer La Tremblade. Rapport de stage.
- Breugnot M., 2002. Les microalgues fourrage en écloserie de mollusques : de leur production à leur utilisation. Ifremer Argenton. Rapport de stage.
- Huvet A., Royer J., Moal J., Burgeot T., Lapègue S., Boulo V., Nicolas J.L., Lambert C., Van Wormhoudt A., Samain J.F., 2007. Caractérisation phénotypique des souches R Résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale. In : Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Ed. Ifremer/Quae, pp. 185-228.
- Helm M.M., Bourne N., 2006. Ecloserie de bivalves, un manuel pratique. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture-Rome.
- Lambert C., Moal J. Le Moullac G., Pouvreau S., 2007. Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. In : Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Ed. Ifremer/Quae, pp. 51-94.
- Nicolas L., 1999. Étude sur la métamorphose et le développement post-larvaire de la coquille St Jacques, *Pecten Maximus*, en écloserie. Éléments de comparaisons avec l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'université de Bretagne Occidentale. pp 11-16.
- Pajot R., Trintignac P., Lipart C.. Démarche régionale pour une production contrôlée de naissains d'huître creuse. Syndicat Mixte pour le Développement Aquacole en Pays de la Loire. Structure de Conseil aquacole.
- Utting S.D., Spencer B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Laboratory leaflet number 68. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft.

9. Annexe :

9.1. Caractéristiques de l'eau de forage :

Lieu de prélèvement : Puits de pompage
 Point de prélèvement : Sortie de pompe

Déterminations chimiques		
Conductivité à 25 °C	μS/cm	46700
Chlorures (Cl ⁻)	g/l	19,2
pH		7,15 à 20 °C
Alcalinité totale (TAC)	°F	23
Titre alcalimétrique	°F	<0,2
Sulfates (SO ₄ ⁻⁻)	mg/l	2480
Nitrates (NO ₃ ⁻)	mg/l	<1
Nitrites (NO ₂ ⁻)	mg/l	<0,05
Phosphates (PO ₄ ⁻⁻⁻)	mg/l	0,14
Ammonium (NH ₄ ⁺)	mg/l	2,2
Potassium (K ⁺)	mg/l	321
Silice (SiO ₂)	mg/l	8,8
Éléments inorganiques		
Fer total	μg/l	430
Manganèse total	μg/l	710
Déterminations chimiques		
Azote Kjeldahl (NK)	mg/l	1,6

9.2. Milieu de conway (La Tremblade) :

Cet enrichissement est ajouté à raison de 1mL/litre de culture avant autoclavage du milieu.

Produits	En g pour 10L
NaN ₃	1000
NaH ₂ PO ₄	200
EDTA	450
Acide borique	336

9.3. Solution de vitamines :

La solution est ajoutée à raison de 1mL/L de milieu de culture juste avant l'ensemencement. Elle est préparée avec de l'eau distillée autoclavée et stockée au frais après préparation.

Solution de vitamines	En g pour 1L
Thiamine	5
Vitamine B12	0,02
Biotine	0,01

9.4. Samba :

Le système Samba est composé d'une caméra, en noir et blanc, montée sur un microscope qui est connecté à un dispositif qui digitalise l'image en combinant un procédé de balayage et un photodétecteur. Chaque point image est représenté par ses coordonnées et par une valeur numérique correspondant à son niveau de gris (256 analysés). Le processeur interne de commande et de traitement permet la réalisation physique des mesures et des calculs.

9.5. Sexage :

Individu	Sexe	Individu	Sexe
1	FB1	36	FH5
2	FB2	37	MH2
3	FB3	38	MH3
4	FB4	39	HERMA
5	MB1	40	FH6
6	MB2	41	MH4
7	MB3	42	FH7
8	FB5	43	MH5
9	FB6	44	FH8
10	FB7	45	FH9
11	FB8	46	MH6
12	MB4	47	MH7
13	FB9	48	FH10
14	FB10	49	FH11
15	FB11	50	FH12
16	MB5	51	MH8
17	FB12	52	MH9
18	MB6	53	FH13
19	MB7	54	MH10
20	MB8	55	FH14
21	FB13	56	FH15
22	MB9	57	FH16
23	MB10	58	MH11
24	FB14	59	FH17
25	MB11	60	FH18
26	MB12	61	MH12
27	MB13		
28	FB15		
29	FB16		
30	MB14		
31	FH1		
32	FH2		
33	MH1		
34	FH3		
35	FH4		

<u>FB</u> :	Femelle lignée basse
<u>FH</u> :	Femelle lignée haute
<u>MB</u> :	Mâle lignée basse
<u>MH</u> :	Mâle lignée haute
<u>HERMA</u> :	Hermaphrodite simultané

9.6. Croisement biparentaux :

Femelle	Ovocytes/ml	Nombre ovocytes	Volume à prélever
FB 1	108 007	10 800 700	28 mL
FB 2	80 734	8 073 400	37 mL
FB 3	41 230	4 122 950	73 mL
FB 4	40 026	4 002 600	75 mL
FB 5	115 226	11 522 600	26 mL
FB 6	34 491	3 449 100	87 mL
FB 7	40 387	4 038 700	74 mL
FB 8	125 525	12 552 500	24 mL
FB 9	50 855	5 085 500	59 mL
FB 10	38 422	3 842 200	78 mL
FB 11	52 298	5 229 800	57 mL
FB 12	67 499	6 749 900	44 mL
FH1	49 852	4 985 200	60 mL
FH2	33 128	3 312 800	91 mL
FH3	43 475	4 347 500	69 mL
FH4	42 232	4 223 200	71 mL
FH5	41 630	4 163 000	72 mL
FH6	14 157	1 415 700	212 mL
FH7	25 989	2 598 900	115 mL
FH8	10 708	1 070 800	280 mL
FH9	32 165	3 216 500	93 mL
FH10	96 456	9 645 600	31 mL
FH11	46 523	4 652 300	64 mL
FH12	29 759	2 975 900	101 mL

Mâle	Spermatozoïdes/ml	Dilution	Volume à prélever
MB1	54 713 900	20	274 µL
MB2	23 319 900	20	643 µL
MB3	15 415 000	20	973 µL
MB4	32 538 300	20	461 µL
MB5	49 637 400	20	302 µL
MB6	24 609 200	20	286 µL
MB7	36 817 100	20	353 µL
MB8	29 629 300	20	181 µL
MB9	40 346 500	20	372 µL
MB10	34 786 500	20	431 µL
MB11	45 036 300	20	333 µL
MB12	31 611 600	20	475 µL
MH1	73 513 300	20	204 µL
MH2	74 802 600	20	201 µL
MH3	52 594 700	20	285 µL
MH4	32 691 400	20	459 µL
MH5	30 290 100	20	495 µL
MH6	26 825 100	20	559 µL
MH7	40 926 700	20	367 µL
MH8	19 790 500	20	758 µL
MH9	18 944 400	20	792 µL
MH10	6 446 410	20	2327 µL
MH11	19 540 700	20	768 µL
MH12	20 556 000	20	730 µL

9.7. Croisement multiparentaux :

Femelle	Volume à prélever (mL)	Mâle	Volume à prélever (µL)
FB 1	4,2	MB1	41,1
FB 2	5,6	MB2	96,5
FB 3	10,9	MB3	146,0
FB 4	11,2	MB4	69,1
FB 5	3,9	MB5	45,3
FB 6	13,0	MB6	91,4
FB 7	11,1	MB7	61,1
FB 8	3,6	MB8	75,9
FB 9	8,8	MB9	55,8
FB 10	11,7	MB10	64,7
FB 11	8,6	MB11	50,0
FB 12	6,7	MB12	71,2

FH1	4,3	MH1	9,8
FH2	6,5	MH2	9,6
FH3	5,0	MH3	13,7
FH4	5,1	MH4	22,0
FH5	5,2	MH5	23,8
FH6	15,3	MH6	26,8
FH7	8,3	MH7	17,6
FH8	20,2	MH8	36,4
FH9	6,7	MH9	38,0
FH10	2,2	MH10	111,7
FH11	4,6	MH11	36,8
FH12	7,3	MH12	35,0

9.8. Taux d'éclosion :

Lot	Ovocytes	Larves à J-1	Taux en %
1	3 000 000	2 526 667	84,2
2	3 000 000	2 726 667	90,9
3	3 000 000	2 233 333	74,4
4	3 000 000	2 886 667	96,2
5	3 000 000	3 093 333	103,1
6	3 000 000	2 893 333	96,4
7	3 000 000	3 340 000	111,3
8	3 000 000	2 953 333	98,4
9	3 000 000	3 046 667	101,6
10	3 000 000	3 320 000	110,7
11	3 000 000	3 293 333	109,8
12	3 000 000	2 806 667	93,6
13	3 000 000	3 720 000	124,0
14	3 000 000	3 073 333	102,4
15	3 000 000	363 333	12,1
16	3 000 000	653 333	21,8
17	3 000 000	4 313 333	143,8
18	3 000 000	1 066 667	35,6
19	3 000 000	2 680 000	89,3
20	3 000 000	706 667	23,6
21	3 000 000	2 633 333	87,8
22	3 000 000	2 720 000	90,7
23	3 000 000	3 560 000	118,7
24	3 000 000	2 720 000	90,7
FBxMB	3 000 000	2 066 667	68,9
FHxMH	3 000 000	5 760 000	192,0

Lot	Effectif mis en fixation à J-30	Effectif fixé à J-63	Taux de fixation (%)
1	26 000	0	0,0
2	27000	164	0,6
3	16 000	0	0,0
4	13 000	95	0,7
7	8 000	0	0,0
8	35 000	0	0,0
9	16 000	350	2,2
10	3000	241	8,0
11	31 000	0	0,0
12	3 400	0	0,0
13	6 000	0	0,0
15	15 000	0	0,0
16	13 000	0	0,0
17	15 000	0	0,0
19	25 000	2917	11,7
20	10 000	300	3,0
21	15 000	110	0,7
22	33 000	885	2,7
23	21 000	283	1,3
24	20 000	1113	5,6
FBxMB	7 000	185	2,6
FHxMH	2000	185	9,3

9.9. Taux de mortalité au cours de l'élevage :

Mortalité en %	J-2 à J-8	J-9 à J-22	J-30 à J-63
1	0,0	42,5	100
2	6,9	44,1	99,4
3	11,0	52,3	100
4	23,5	44,4	99,3
5	22,6	100	
6	12,8	0,0	100
7	25,0	56,4	100
8	75,5	42,2	100
9	0,0	69,6	97,8
10	13,6	59,4	92,0
11	0,0	51,8	100
12	34,9	38,7	100
13	10,6	47,1	100
14	43,5	63,4	100
15	56,5	47,4	100
16	0,0	43,9	100
17	18,1	54,3	100
18	8,7	100	
19	20,5	31,6	88,3
20	21,7	65,1	97,0
21	70,2	0,0	99,3
22	6,5	41,4	97,3
23	24,5	65,5	98,7
24	12,9	71,8	94,4
Pool 9	0,0	56,4	97,4
Pool 10	3,8	74,1	90,8