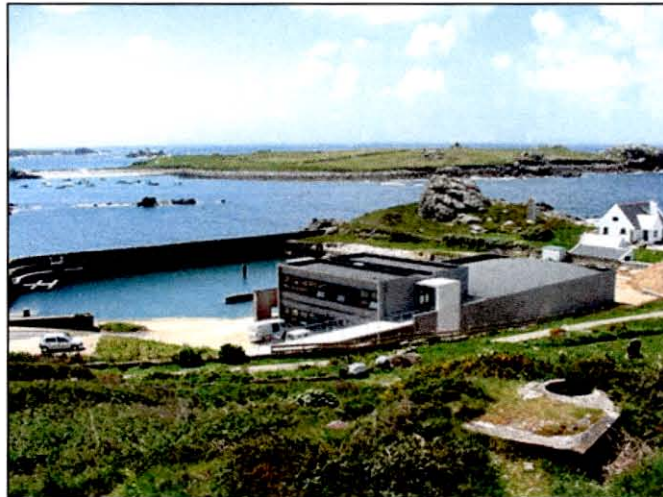


RAPPORT DE STAGE

présenté par

Madeleine BREUGNOT
Promotion James Cook (2000-2002)

**Les microalgues fourrage en éclosérie de mollusques:
de leur production à leur utilisation.**



Pour l'obtention du :
DIPLÔME DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER (DTSM)
délivré par:
Le Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM)

Stage placé sous la responsabilité de Mr ROBERT René, effectué du 10 avril au
30 septembre 2002, au
Laboratoire de Physiologie des Invertébrés marins- IFREMER Brest
Station expérimentale d'Argenton
Presqu'île du vivier
29840 Argenton en Landunvez
Tel: 02 98 89 51 05
Fax: 02 98 89 57 77
E. mail: rrobert@ifremer.fr

1. Introduction

La conchyliculture française s'est réellement développée dès le milieu du siècle dernier. Depuis son origine, la conchyliculture a été confrontée à de réelles difficultés notamment dues à la dégradation des eaux côtières, à l'augmentation des problèmes pathologiques et à l'irrégularité du recrutement. Des techniques de reproduction artificielle ont donc été développées. C'est dans les années 50 que sont apparues les premières écloséries de mollusques qui ont permis de maîtriser les processus de ponte, de fécondation, et d'élevage larvaire ainsi que des nourriceries où l'on contrôle surtout le prégrossissement du naissain.

Malgré la recherche d'aliment de substitution, la production de phytoplancton reste actuellement pour les écloséries la seule technique fiable pour permettre l'alimentation des larves de mollusques bivalves.

Ces microalgues doivent répondre à des exigences de taille pour pouvoir être ingérées par la larve, de qualité nutritionnelle et de facilité de production.

Sur la cinquantaine d'espèces testées, seule une douzaine présente un réel intérêt et est fréquemment utilisée en éclosérie-nurserie de bivalves.

Cependant, des incertitudes persistent sur l'identification des espèces cultivées. Pour cela un programme de caractérisation des microalgues fourrage, visant à améliorer les productions phytoplanctoniques en éclosérie de mollusques, a été mis en place. Cette caractérisation a été entreprise selon différentes approches : cytomorphologie, cytofluorimétrie, écotolérance, biochimie et génétique. En 2001, treize microalgues fourrage, appartenant au souchier d'Argenton, ont été étudiées. L'année 2002 est consacrée à l'étude de ces mêmes microalgues issues d'une algorithme référencée, CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, G.B) afin de recalibrer les données préalablement acquises.

L'un des objectifs de ce stage a consisté à étudier six souches de microalgues de référence (CCAP) sur le plan de la croissance et de la taille.

Des prélèvements sont alors opérés en phase exponentielle et stationnaire et transmis aux autres partenaires du programme pour les aspects biochimiques et cytofluorimétriques.

Cette étude constitue la première partie de ce rapport.

Par ailleurs, la technique de production de microalgues la plus répandue en éclosérie de mollusques est la culture en discontinue, dite en « batch ». Elle consiste à utiliser en totalité une culture dès que sa concentration est jugée satisfaisante. Mais, cette technique est caractérisée par une variabilité de la qualité bactériologique et biochimique du phytoplancton ainsi produit. De plus, pour maintenir en permanence cette chaîne de production, les interventions sont nombreuses (nettoyage des enceintes, stérilisation, préparation des milieux...) et donc très coûteuses. Pour pallier ces inconvénients, la mise au point d'un système de production en continu se développe.

Le suivi de cultures d'*Isochrysis affinis galbana* en grand volume (300 L) a donc été opéré et constitue la deuxième partie de ce rapport.

Enfin, la qualité nutritionnelle des microalgues est cruciale en éclosérie de mollusques, essentiellement en phase larvaire. En effet, la variabilité des performances des larves de mollusques en éclosérie est pour, une très large part, attribuée à une variabilité de la valeur alimentaire des microalgues fourrage utilisées.

La dernière partie de ce stage est consacrée à l'évaluation de la valeur alimentaire de trois microalgues sous sept différentes combinaisons, sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas*. Elle est rapportée dans le troisième chapitre de ce présent rapport.

2. Présentation de l'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) www.ifremer.fr : est né en 1984 par la fusion de l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes) et du CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans). L'IFREMER est un établissement public à caractère industriel et commercial placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement, des Transports et du Logement et de l'Environnement.

Le Centre de Brest : www.ifremer.fr/français/implant/brest.htm

Le Centre de Brest dont la construction a commencé en 1968 est situé sur la commune de Plouzané à quelques kilomètres de Brest. Ce centre est le plus important des sites IFREMER. Il regroupe plus de 600 personnes autour des thèmes de l'océanographie :

- Ressources Vivantes (Aquaculture et Halieutique)
- Recherches Océaniques (Géosciences, Océanographie Physique, Océanographie Spatiale, Environnement Profond).
- Ingénieries et Technologies marine.
- Environnement Littoral .

Le Centre accueille de plus un certain nombre de laboratoires d'autres centres de recherche (comme l'IRD, le BRGM, l'Institut Polaire et L'AFSSA) qui mènent en collaboration avec l'IFREMER, des programmes de recherche en Océanologie.

Quatre stations côtières (Saint-Malo, Concarneau, Lorient, La Trinité-sur-Mer) dépendent administrativement du Centre de Brest, complétant le dispositif de recherche Ifremer en Bretagne.

L'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton : www.ifremer.fr/drvrapi.htm

Cette écloserie, qui dépend du laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins de la Direction des Ressources Vivantes, est située à une trentaine de kilomètres au nord de Brest. Créée en 1974 au bord d'un vivier, elle a démarré ses activités par la mise au point de techniques de production contrôlée de juvéniles d'ormeau (*Haliotis tuberculata*) à une échelle semi-industrielle.

A partir de 1983, l'écloserie s'est tournée vers la mise en place, à une échelle semi-industrielle, des techniques de production contrôlée de juvéniles de coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*).

A partir de 1986, l'écloserie d'Argenton a étendu ses productions expérimentales à d'autres espèces de Pectinidés, Vénéridés et Ostréidés.

Aujourd'hui, les recherches portent sur la maîtrise des éclosions de bivalves et concernent pour l'essentiel l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, compte tenu de son importance économique. L'écloserie est constituée de quatre unités principales : la production phytoplanctonique, le conditionnement des géniteurs, l'élevage larvaire et l'élevage post-larvaire.

3. Matériels et méthodes

3.1. Caractérisation des microalgues fourrage

3.1.1. Microalgues étudiées

Isochrysis affinis galbana (T. iso) :

- Classe des Haptophyceae ou Prymnesiophyceae
- Ordre des Isochrysidales
- Famille des Isochrysidaceae
- Référence CCAP 927/14

Isochrysis galbana:

- Classe des Haptophyceae ou Prymnesiophyceae
- Ordre des Isochrysidales
- Famille des Isochrysidaceae
- Référence CCAP 927/1

Pavlova lutheri :

- Classe des Haptophyceae ou Prymnesiophyceae
- Ordre des Pavlovales
- Famille des Pavlovaceae
- Référence CCAP 931/1

Rhodomonas salina :

- Classe des Cryptophyceae
- Ordre des Cryptomonadales
- Famille des Cryptomonadaceae
- Référence CCAP 978/24

Tetraselmis suecica :

- Classe des Prasinophyceae
- Ordre des Chlorodendrales
- Famille des Chlorodendraceae
- Référence CCAP 66/4

Chaetoceros "minus" :

- Classe des Diatomophyceae
- Ordre des Centrales
- Famille des Chaetoceraceae

3.1.2. Méthode de culture

3.1.2.1. Inoculum

Pour chaque espèce 400 ml d'inoculum est préparé à partir d'une souche et maintenu durant une semaine en salle thermostatée et à faible luminosité.

3.1.2.2. Ensemencement

Les cultures sont réalisées en duplicat pour chaque espèce.

Chaque inoculum de 400 ml est réparti dans deux ballons de 2 litres.

Au préalable, les ballons sont préparés avec :

- 1,7 litres d'eau de mer filtrée à 1 μm
- 2 ml de Conway (annexe 1)
- 2 ml de silice pour les diatomées (ici *Chaetoceros minus*), (annexe 1).

Les ballons sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 45 minutes.



Photo 1: Cultures de microalgues en ballon de 2 litres (ROBERT R.).

3.1.2.3. Conditions de cultures

Les cultures sont maintenues pendant 10 jours sous conditions contrôlées correspondant à des conditions standard d'Argenton :

- Éclairement continu de 270 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$
- Température de 22-23°C
- Salinité de 37,5 ppm.
- Bullage permanent d'air enrichi en CO_2 (1 à 3 %).

3.1.3. Suivi des cultures

3.1.3.1. Croissance

La croissance est suivie quotidiennement.

De l'ensemencement au 3^{ème} jour, le comptage des cellules phytoplanctoniques est réalisé à la cellule de Malassez (annexe 2).

Du 3^{ème} au 10^{ème} jour, le comptage est opéré au compteur de particules (annexe 3).

En début de culture une surestimation des valeurs est obtenue au compteur de particules, liée à la présence de précipités de sels nutritifs.



Photo 2: Compteur de particules (Félix B.)

3.1.3.2. Taille

Les données de taille sont acquises au compteur de particules couplé à un channelyser C 256 aux 3^{ème}, 6^{ème} et 10^{ème} jours.

3.1.3.3. Paramètres physico-chimiques

Les mesures de température, salinité, pH, lumière et débit d'air sont réalisées à la mise en place des cultures et au 7^{ème} jour pour vérifier leur stabilité.

Des prélèvements sont effectués, en phase exponentielle et en phase stationnaire, pour la caractérisation biochimique et cytofluorimétrique réalisées par ailleurs.

3.2. Suivi d'un système de culture en continu

3.2.1. Choix de l'espèce algale

La souche algale utilisée est *Isochrysis affinis galbana*, plus couramment appelée *Isochrysis tahiti* ou T. iso.

Cette espèce est utilisée dans la plupart des écloséries de mollusques. Elle est d'ailleurs considérée comme l'algue « test » pour évaluer la croissance des larves de mollusques bivalves (CHRETIENNOT-DINET *et al.*, 1990). Cette microalgue est utilisée comme modèle biologique pour la mise au point des cultures en continu.

Le genre *Isochrysis* est composé de cellules mobiles solitaires et de forme allongée. Elles possèdent deux flagelles sub-égaux, lisses à insertion apicale et un haptonème réduit. Le plaste est généralement jaune d'or à pyrénoloïde immergé. Elles présentent une ou plusieurs couches d'écailles non minéralisées sur le corps cellulaire à stries rayonnantes. La taille des cellules est comprise entre 4 et 6 µm (CHRETIENNOT-DINET *et al.*, 1990).

T. iso est une souche tropicale d'*Isochrysis galbana* obtenue en culture mixte par J.L MARTIN à Tahiti et isolée ultérieurement par K. HAIES. Elle ne se différencie pas morphologiquement de *Isochrysis galbana* et est considérée comme un clone « géographique ».

T. iso est couramment incluse dans les rations alimentaires en mélange avec des diatomées. Elle constitue en effet, un aliment assez complet suivant l'espèce élevée. T. iso a largement remplacé l'espèce locale *Isochrysis galbana* pour ces facilités de culture en masse sous nos latitudes. En effet, elle supporte dans la plupart des écloséries mieux les variations de température qu'*Isochrysis galbana* qui présente une instabilité à des températures inférieures à 16 °C et supérieures à 22 °C.

L'intérêt de cette souche réside dans sa valeur nutritive et dans sa facilité de culture en masse (SOUDAR, 1999).

3.2.2. Principe de la culture en continu ou chemostat

La culture en continu permet de produire, à partir de la même enceinte de culture, une biomasse dont les caractéristiques biochimiques, sanitaires et de concentrations sont d'autant plus stables que le contexte de culture est maîtrisé.

Le principe consiste à remplacer un volume de culture (algue + milieu) par un même volume de milieu nutritif frais. Il s'agit donc d'une dilution.

Le taux de dilution de la culture dans le réacteur de culture est obtenu par l'équation :

$$D = F / V$$

F : volume d'apport du milieu nutritif durant l'intervalle de temps dt (égal au volume de culture récolté)

V : volume du réacteur.

La croissance apparente de la population peut alors s'exprimer par :

$$dX / dt = (\mu - D) X$$

X : Biomasse (nombre de cellules par litre)

μ : Taux de croissance (jour⁻¹)

D : Taux de dilution (jour⁻¹)

t : Temps (jour)

Trois cas de figure peuvent se présenter :

- $D > \mu$ d'où $dX / dt < 0$

La croissance algale ne suffit pas à compenser la dilution. La population décroît et finit par être « lessivée »

- $D < \mu$ d'où $dX / dt > 0$

La densité de la culture croît tant que les conditions demeurent optimales. A un moment donné, l'apport de milieu ne suffira plus à maintenir les conditions pour une population accrue, de sorte que le taux de croissance diminuera pour atteindre la valeur d'équilibre ($\mu = D$).

- $D = \mu$ d'où $dX / dt = 0$

La croissance est constante, la culture est en équilibre biologique.

3.2.3. Dispositif d'un système de production en continu

Un système de culture en continu implique un renouvellement permanent d'eau de mer. L'eau de mer apportée aux cylindres de culture doit être préalablement traitée afin de limiter l'introduction de contaminant qui pourrait nuire à l'équilibre des cultures.

Ce système est donc constitué d'un pasteurisateur qui permet un traitement de l'eau de mer en continu. Le principe consiste à faire circuler de l'eau de mer à 92 °C, pendant au moins dix minutes, afin de détruire les micro-organismes non sporulés.



Photo 3: Système de pasteurisation (Félix B.)

3.2.3.1. Installation

L'eau de mer, pompée dans le vivier d'Argenton, est préalablement filtrée sur lamelles ARKAL de 50 µm puis filtrée successivement sur trois cartouches de 5 µm et deux fois 1 µm avant d'entrer dans le réservoir du pasteurisateur.

L'eau est entraînée dans un échangeur à plaques au moyen d'une pompe de circulation où elle récupère une partie de la chaleur de l'eau qui sort du pasteurisateur (environ 70 °C). Elle circule ensuite successivement dans deux bonbonnes de l'extrémité inférieure à l'extrémité supérieure. A l'intérieure de ces enceintes sont placées deux résistances chauffantes permettant d'élever la température jusqu'à 96 °C. Un système de régulation couplé à deux thermomètres permet un contrôle de la température dans les enceintes. L'eau passe alors une seconde fois dans l'échangeur à plaques et restitue sa chaleur à l'eau qui entre. Elle ressort à une température d'environ 24 °C.

A la sortie de l'échangeur, l'excédent d'eau est dirigé vers le réservoir du pasteurisateur et l'autre partie, couplée à un apport de milieu nutritif (Conway) est entraînée vers les cultures. Le milieu de Conway (annexe 1) est contenu dans une réserve de 20 litres stérilisée à l'autoclave. Le milieu de culture est apporté dans le circuit par une pompe péristaltique ISMATEC à un débit de 0,4 ml/minute.

L'eau de mer enrichie est ensuite distribuée dans quatre cylindres dont les taux de renouvellement sont réglés individuellement à l'aide de débitmètres POLARIS à 30 à 50 ml.min⁻¹ correspondant à des taux de dilution de 20 et 30 %. La culture est récoltée pour chaque cylindre par une surverse située à une hauteur correspondant à 300 litres. Les quatre cultures sont récupérées dans un bac de récolte de 180 litres. Une surverse canalise l'excédent de culture vers l'égout.

3.2.3.2. Enceintes de culture

Le corps des cylindres de culture et du bac de réserve est en méthacrylate tandis que le couvercle et l'embase sont en fibre de verre.

Les cylindres de culture sont fermés hermétiquement (sellés au rubson). Une ouverture située sur le couvercle permet le nettoyage et l'ensemencement des cylindres.

3.2.3.3. Conditions de culture

Les cultures sont éclairées en permanence ($330 \mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) par des tubes fluorescents disposés verticalement.

Un bullage permanent d'air enrichi en CO_2 (1 à 3 %) est apporté par la base du cylindre.

Une température comprise entre 21 et 25 °C est maintenue dans les cultures.

3.2.4. Protocole d'ensemencement

3.2.4.1. Nettoyage du pasteurisateur

Les résistances du pasteurisateur sont arrêtées ainsi que l'alimentation des cylindres de culture. L'appareil fonctionne en boucle. Un litre d'eau de Javel est introduit dans le réservoir, soit 12,5ml de Javel par litre pour nettoyer les canalisations. Après deux heures de désinfection, les résistances sont allumées. Dès que l'eau est à 90 °C, les cylindres sont à nouveau alimentés et 20 ml d'eau de Javel sont injectés, au niveau de l'arrivée des sels, dans le circuit.

3.2.4.2. Nettoyage des cylindres de culture

Chaque cylindre est abondamment rincé à l'eau chaude puis rempli avec 50 litres d'eau douce, et 50 ml de Javel sont alors apportés pour nettoyer l'embase des cylindres. Ils sont ensuite remplis à 300 litres avec de l'eau, puis laissés en l'état pendant 12 h. Ils sont rincés à l'eau chaude et à nouveau remplis à l'eau froide jusqu'à 300 litres. Une seconde stérilisation à l'acide est alors opérée (500 ml d'acide chlorhydrique pendant 12 h). Les vannes et tuyaux d'air sont vidangés et les cylindres sont à nouveau rincés à l'eau chaude.

L'alimentation en eau pasteurisée est opérée afin d'éliminer le reste de chlore dans les canalisations. Une fois remplis les cylindres sont à nouveau vidangés et cylindres et canalisations, à nouveau rincés à l'eau chaude.



Photo 4: Cylindres de culture (Robert R.)

3.2.4.3. Ensemencement des cylindres

50 litres d'eau de mer pasteurisée sont apportés dans les cylindres.

10 litres d'une culture d'*Isochrysis affinis galbana* sontensemencés de façon stérile (à la flamme) par une trappe au niveau du couvercle. Les volumes de culture sont alors amenés progressivement à 300 litres sur 5 jours (apport continu de $30 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Lorsque les cultures débordent au niveau des surverses, deux taux de renouvellement sont alors appliqués, 30 % pour les cylindres 1 et 3, et 20 % pour les cylindres 2 et 4.

3.2.5. Suivis des cultures

Les prélèvements, autorisant le suivi, sont réalisés, au niveau du bac de récolte où débouche les quatre surverses (une par cylindre). Ce mode de prélèvement limite la contamination des cultures.

3.2.5.1. Paramètres physico-chimiques

Pour chaque culture, les paramètres, température, pH et salinité sont mesurés deux fois par semaine.

3.2.5.2. Concentration algale et taille

Les données de concentration et de taille sont acquises deux fois par semaine au compteur de particules ZM couplé à un channelyseur C256. Afin de respecter la gamme de mesure de l'appareil (100 000 particules pour 500 μ l) les prélèvements sont généralement dilués au 100^e à l'aide d'un diluteur automatique (Coulter diluteur PD IIIc), (annexe 3).

Des observations des cultures vivantes (non fixées) sous microscope sont régulièrement opérées afin d'apprécier la qualité de la culture (absence de contaminant) ainsi que la mobilité des cellules algales.

3.2.5.3. Suivi des protéines, lipides et glucides

Des prélèvements sont réalisés chaque semaine sur deux des quatre cultures afin d'étudier l'évolution de la composition proximale en protéines, lipides et glucides (P, L, G).

A partir des prélèvements, un volume précis de culture, correspondant au volume de saturation du filtre est récolté. Ce volume est fonction de la concentration algale : plus l'échantillon est concentré, moins le volume à filtrer est important. La concentration de chaque échantillon étant déterminée, le nombre de cellules algales sur le filtre est alors calculé. Pour chaque composant les prélèvements sont dupliqués.

La filtration est réalisée par l'intermédiaire d'une rampe de filtration reliée à une pompe à vide. Les microalgues sont retenues sur un filtre Whatman en microfibre de verre GF/F de diamètre 25 mm. Dans le cas des lipides, ces filtres sont préalablement brûlés à 450°C au four Pasteur afin d'éliminer toute trace parasite qui biaiserait les dosages. Lorsque l'échantillon est filtré et que le filtre est sec, ce dernier est placé dans un tube à hémolyse en polycarbonate identifié par quatre références :

- Nature de l'élément Protéine, Lipide ou Glucide
- Date du prélèvement
- Origine de l'échantillon
- Volume filtré

Les tubes sont ensuite placés au congélateur si le dosage n'est pas immédiat.

- Dosage des protéines (annexe 4)

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (1951).

Les échantillons (filtres + algues) sont broyés au Potter après adjonction de 2 ml d'eau distillée. Un volume de 500 µl de broyat est placé dans un tube au contact de soude (NaOH) 2N pour extraction. Les protéines ainsi extraites réagissent avec du Lowry (mélange de tartrate de potassium et de sulfate de cuivre) pour former un complexe cuivrique réduisant le phosphomolybdate en milieu basique. Les protéines des échantillons sont dosées par la lecture des DO à 750 nm, par rapport à une gamme étalon dont la source de protéines est comprise dans le sérum albumine (BSA).

Les résultats sont alors exprimés en picogramme par cellule en fonction de la concentration algale et du volume filtré.

- Dosage des glucides (annexe 5)

Les sucres sont dosés selon la méthode de Dubois (1956).

Une hydrolyse des sucres est effectuée, dans un premier temps, au contact d'H₂SO₄ concentré. L'addition de phénol permet d'obtenir un complexe coloré dont la DO est mesurée à 490 et 600 nm.

Les quantités de glucides sont déterminées en picogramme par cellule par rapport à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de glucose. Les DO obtenues sont cependant corrigées selon la formule : $DO_{490} - 1,5 (DO_{600} - 0,003)$ permettant d'éliminer les interférences liées à d'autres molécules.

- Dosage des lipides (annexe 6)

Les lipides sont dosés selon une technique gravimétrique après extraction selon la méthode de Bligh et Dyer (1956).

L'extraction se fait dans la glace dans des tubes en verre brûlés. Les lipides sont extraits dans un mélange dichlorométhane-éthanol-eau. Les filtres sont broyés à l'aide d'une spatule dans 400 µl d'eau distillée.

Trois extractions sont réalisées, la première dans un mélange monophasique et la deuxième permet d'obtenir deux phases :

- Une phase organique purifiée contenant les lipides
- Une phase alcool-eau contenant les impuretés.

La phase organique est récupérée, et le dichlorométhane est évaporé sous azote à -30°C. Une fois le dichlorométhane évaporé, les masses de lipides extraites (contenues dans les nacelles en téflon) sont pesées sur une microbalance (à 10⁻³ mg près).

3.2.5.4. Suivis bactériologiques

L'évolution de la flore bactérienne est appréciée deux fois par mois pour chaque culture et une fois par semaine sur l'eau du pasteurisateur.

Pour le suivi qualitatif, les colonies sont répertoriées uniquement suivant la fréquence d'apparition des colonies présentant les mêmes aspects et couleurs sur les boîtes de Pétri après incubation.

Les étalements sont effectués sur Marine Agar qui permet le développement de la microflore hétérotrophe marine (annexe 7).

3.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de *Crassostrea gigas*

3.3.1. Culture des microalgues étudiées

3.3.1.1. Présentation des microalgues

Pavlova lutheri :

- Classe des Prymnesiophyceae
- Ordre des Pavlovales
- Famille des Pavlovaceae
- Référence CCAP 931/1

Isochrysis affinis galbana :

- Classe des Prymnesiophyceae
- Ordre des Isochrysidales
- Famille des Isochrysidaceae
- Référence CCAP 927/14

Chaetoceros calcitrans forma *pumilum* :

- Classe des Diatomophyceae
- Ordre des centrales
- Familles des Chaetoceraceae
- Référence CCAP 1010/5

3.3.1.2. Méthode de culture

Les cultures de microalgues sont réalisées selon la technique des volumes croissants en eau de mer filtrée (1 µm) et enrichie (2 ml de Conway par litre de culture).

Un erlenmeyer de 200 ml estensemencé à partir d'une souche mère. Conservés ainsi entre 5 et 12 jours à faible luminosité, les erlenmeyers permettent d'inoculer des ballons de 2 litres, maintenus pendant 4 à 10 jours sous les conditions suivantes :

- Éclairage continu de 205 µmoles photon m⁻²s⁻¹.
- Température de 22-23°C.
- Bullage permanent pour assurer l'homogénéisation de la culture et apport de CO₂ (3% de l'apport d'air pour le maintien du pH).
- Salinité de 34,5 ppm, excepté pour la diatomée (28 ppm).

Chaque ballon de 2 litres sert àensemencer un ballon de 10 litres. La culture en 10 litres est distribuée aux larves 4 à 6 jours après leur inoculation.

Remarque : Les erlenmeyers et ballons, et leur contenu ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 45 min.

3.3.2. Origine des larves

3.3.2.1. La maturation des géniteurs

Les géniteurs sont issus du milieu naturel (naissain d'Arcachon, captage 1998). Le prégrossissement a été effectué en 1999 à Larmor-baden (Golfe du Morbihan). En 2000, les huîtres ont été transférées à l'Aber-Benoît (Bretagne Nord) et mises en poche sur table. Le 1 avril 2002, elles ont été prélevées et mises en conditionnement à l'écloserie d'Argenton à la température de 19 °C et avec un apport quotidien de nourriture d'*Isochrysis affinis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis chui* à raison de 4,6 à 7,4 millions de cellules algales par géniteur.

3.3.2.2. La ponte

La ponte a été réalisée le 13 mai 2002. Les gamètes mâles et femelles ont été obtenus par scarification des gonades (stripping). Les gamètes retenus sur un tamis de 20 µm sont mis en éprouvette de 1 à 2 litres. Après homogénéisation, des prélèvements de 50 à 100 µl sont effectués pour le dénombrement des ovocytes.

La nature et la qualité des gamètes sont déterminées sous microscope optique. Les spermatozoïdes doivent être très mobiles et les ovocytes ronds et réguliers. Pour cette expérience, les spermatozoïdes proviennent de 2 mâles et les ovocytes de 8 femelles.

3.3.2.3. La fécondation

Elle est réalisée dans une eau à 23-24°C en béccher de 5 litres. La fécondation se déroule pendant environ 1h30.

Dès la formation du globule polaire et l'apparition des premières divisions cellulaires, 5 millions d'embryons sont ensuite répartis dans des cuves cylindroconiques de 150 litres. Au bout de 48h, les larves D (premier stade larvaire) sont retenues sur un tamis de 45 µm et mises en éprouvette de 2 litres. Des prélèvements sont effectués pour dénombrer les larves, à l'aide d'une pipette et d'un disque ajouré permettant l'homogénéisation des larves.

Les larves sont alors réparties en bac cylindroconique de 30 litres à la densité de 5 larves.ml⁻¹.



Photo 5: Salle d'élevage larvaire (Robert R.).

3.3.3. Élevage larvaire

3.3.3.1. Protocole expérimental

L'élevage larvaire est conduit pendant 21 jours à une température de 23-24°C et à une salinité de 35 ppm. Un apport d'air est effectué à la base du cône pour maintenir la population de façon homogène dans la colonne d'eau. L'eau de mer utilisée est préalablement filtrée sur cartouche de 5 µm et deux fois 1 µm, limitant les apports exogènes.

Sept conditions nutritionnelles ont été appliquées associant des régimes monospécifiques et plurispécifiques. Chaque condition expérimentale était dupliquée.

- Témoin à jeun : aucune alimentation durant l'expérience.
- P (*Pavlova lutheri*)
- T (*Isochrysis affinis galbana*)
- C. pum (*Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*)
- PT
- PC. pum
- TC. pum
- PTC. pum qui est le mélange couramment utilisé à l'écloserie d'Argenton et sert de référence standard.

Un changement d'eau est effectué tous les 2 à 3 jours. Pour cela, les larves sont récupérées sur un tamis à la base du cône, de 45 µm les premiers jours puis 60 µm. Mises en éprouvettes de 500 ml elles sont homogénéisées et des prélèvements sont effectués. Les larves sont nourries tous les jours ou 2 jours suivant la disponibilité en nourriture dans le bac.

Période d'élevage	J2-J6	J7-J8	J9-J10	J11-J13	J14	J15	J16
Ration alimentaire (cellules algales µl ⁻¹)	15-18	30-35	60	75	90	120	150

Tableau 1: Nombre de cellules apportées par bac d'élevage. La valeur minimale correspondant à la valeur théorique, la valeur maximale correspondant à la valeur réelle déterminée dans certains bacs.

3.3.3.2. Paramètres suivis au cours de l'expérience

Afin d'apprécier le déroulement de la phase larvaire, des mesures ont été effectuées aux 2^e, 9^e, 16^e et 21^e jours.

3.3.3.2.1. Taille larvaire

Pour chaque régime nutritionnel et sur chaque duplicat, la taille larvaire était déterminée par traitement d'images avec le logiciel IMAQ Vision Builder (6.0). Pour chaque condition et en fonction du nombre d'objets présents ou retenus, la biométrie larvaire était effectuée sur 100 à 200 larves.

3.3.3.2.2. Taux de croissance

Deux taux de croissance sont calculés:

- Le taux de croissance global

Il représente la croissance moyenne en $\mu\text{m.j}^{-1}$, entre le 2^e jour et le X^e jour. Autrement dit, la croissance au cours des périodes J2-J9, J2-J16 et J2-J21.

- Le taux de croissance relatif

Il représente la croissance moyenne en $\mu\text{m.j}^{-1}$, entre J2-J9, J9-J16 et J16-J21.

3.3.3.2.3. Mortalité larvaire

Le taux de mortalité de chaque élevage a été obtenu par dénombrement des larves mortes caractérisées par des coquilles translucides sur des échantillons de 200 à 300 larves.

3.3.3.2.4. Broutage

Afin de déterminer la quantité de microalgues ingérée par les larves, des prélèvements sont réalisés immédiatement après la distribution des rations alimentaires et 24 h après. Les prélèvements de phytoplancton sont effectués au centre de chaque bac dans un tamis de 45 μm pour éviter le prélèvement des larves. Le dénombrement des cellules algales apportées ou restantes est effectué au compteur de particules.

4. RESULTATS

4.1. Caractérisation des microalgues fourrage

Deux séries expérimentales ont été conduites selon les méthodologies préalablement décrites. La première (Série 1) comprenait *Isochrysis* aff. *galbana*, *Pavlova lutheri*, *Rhodomonas salina* et *Tetraselmis suecica*. L'absence de données les 4^e et 5^e jours n'ayant pas permis d'identifier clairement les phases exponentielles, de nouvelles cultures ont étéensemencées. *R. salina* qui présente un intérêt plus limité en éclosion, n'a pas été cultivée à nouveau. Par contre, cette deuxième série expérimentale (Série 2) incluait deux autres espèces, l'une préalablement étudiée, *Isochrysis galbana* (LOUSSOUARN, 2002) et une nouvelle diatomée, en cours d'identification, que nous nommerons ici *Chaetoceros minus*.

4.1.1. Courbes de croissance

Les figures 1 à 5 présentent l'évolution au cours du temps de la concentration cellulaire des microalgues fourrage étudiées.

Afin d'identifier les différentes phases de croissance, il n'a pas été possible d'utiliser la même échelle sur l'axe des ordonnées pour l'ensemble des microalgues, les concentrations optimum variant de 2 millions de cellules.ml⁻¹ (*T. suecica*) à 90 millions de cellules.ml⁻¹ (*C. minus*).

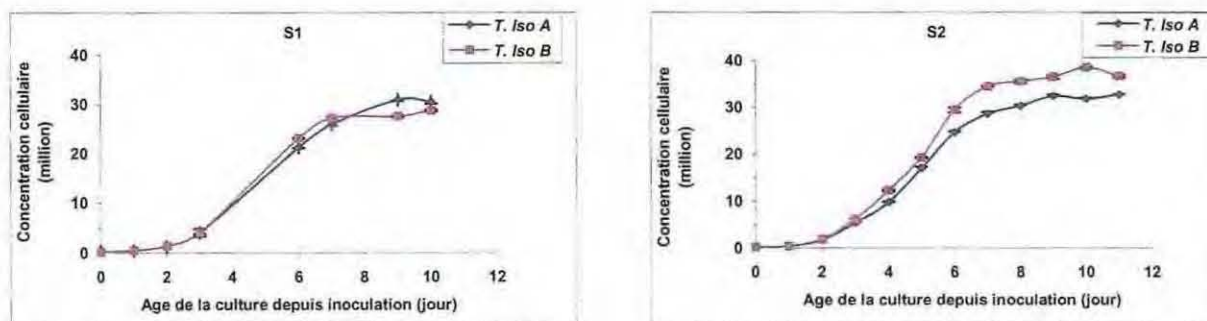


Fig. 1 : Croissance d'*Isochrysis* aff. *galbana* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient dupliquées (A, B) et deux séries expérimentales ont été conduites (S1, S2).

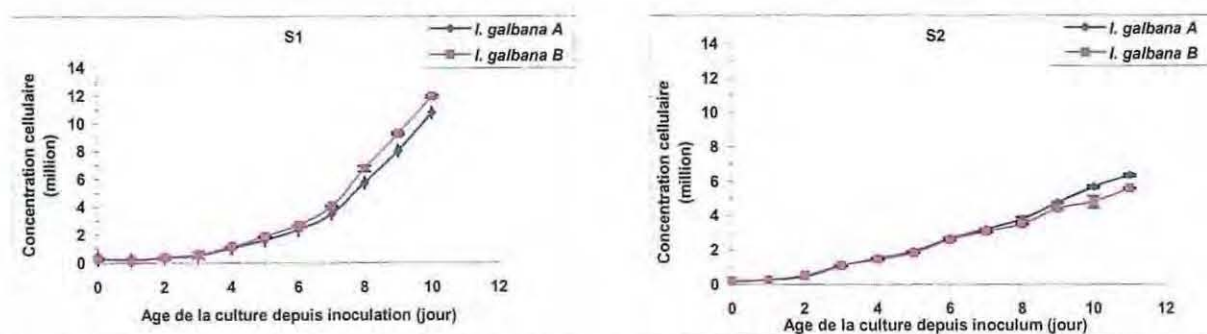


Fig. 2 : Croissance d'*Isochrysis galbana* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient dupliquées (A, B) et deux séries expérimentales ont été conduites (S1, S2).

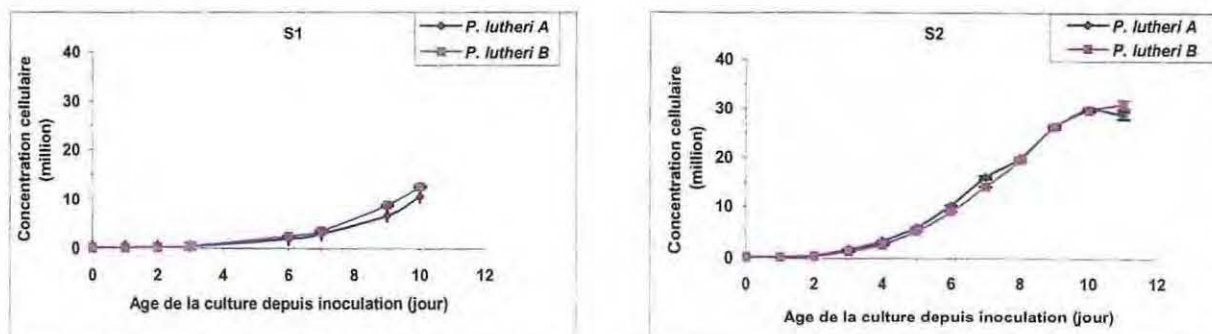


Fig. 3 : Croissance de *Pavlova lutheri* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient dupliquées (A, B) et deux séries expérimentales ont été conduites (S1, S2).

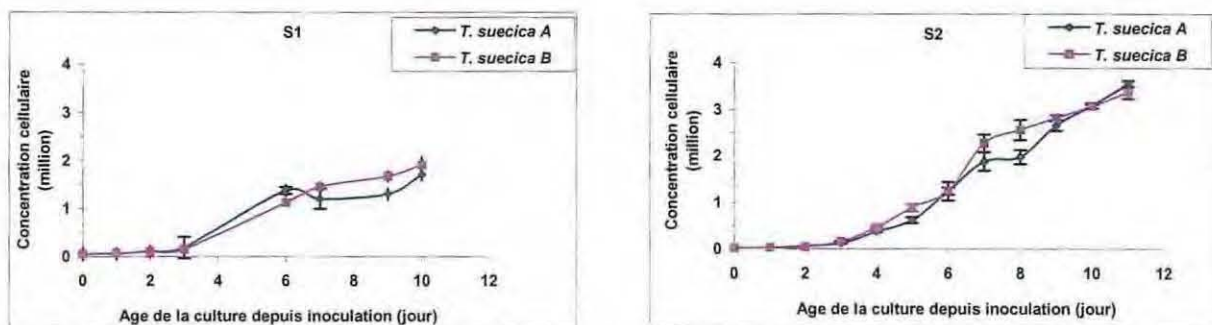


Fig. 4 : Croissance de *Tetraselmis suecica* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient dupliquées (A, B) et deux séries expérimentales ont été conduites (S1, S2).

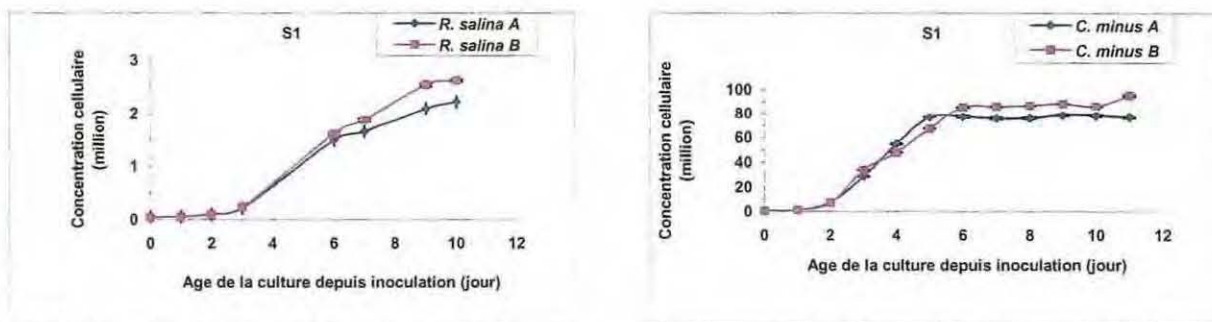


Fig. 5 : Croissance de *Rhodomonas salina* et *Chaetoceros minus* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient dupliquées (A, B) et une seule série expérimentale a été conduite (S1).

À l'exception de *Rhodomonas salina*, seules les données obtenues au cours de la deuxième série seront détaillées ici.

Isochrysis aff. *galbana* présente une phase de latence de deux jours, une phase exponentielle de cinq jours (J7) et une phase stationnaire d'au moins quatre jours, la sénescence des cultures n'ayant pas été observée. En fin de phase exponentielle (J7), la

concentration est comprise entre 28,5 millions.ml⁻¹ (S2, A) et 34,5 millions.ml⁻¹ (S2, B). Après avoir présenté un début de croissance similaire, une différence de développement est enregistrée en phase stationnaire, le témoin A présentant un déficit de croissance de 15 % qui est pourtant semblable à celle relevée lors de la première série expérimentale (fig. 1).

Isochrysis galbana présente une croissance très faible où les différentes phases sont difficilement identifiables. Au 11^e jour les cultures atteignent une densité de 6 millions.ml⁻¹ alors que cette même concentration est atteinte chez *T. iso* en trois jours. L'étude menée préalablement (LOUSSOUARN, 2002) relatait des performances également faibles, la concentration finale étant cependant supérieure à environ 11 à 12 millions.ml⁻¹ pour une durée équivalente (fig. 2).

Pavlova lutheri présente une phase de latence de deux jours, une phase exponentielle de huit jours et la phase stationnaire est quasi inexistante. Les deux témoins se comportent de manière similaire, des concentrations d'environ 30 millions.ml⁻¹ étant atteintes après dix jours de cultures. De telles performances n'ont pas été rencontrées au cours de la première série, qui se caractérise par des croissances médiocres, des concentrations d'environ 10 millions.ml⁻¹ étant atteintes après dix jours de culture (fig. 3).

Tetraselmis suecica présente une phase de latence de trois jours, une phase exponentielle de quatre jours et une phase de ralentissement de quatre jours minimum. Les témoins se comportent de manière similaire, des concentrations d'environ 3,5 millions.ml⁻¹ étant atteintes après onze jours de culture. De telles performances n'ont pas été rencontrées au cours de la première série, des concentrations de 1,8 millions.ml⁻¹ étant atteintes après dix jours de culture (fig. 4).

Rhodomonas salina présente une phase de latence de trois jours et une phase exponentielle difficilement identifiable du à un manque de données, et estimée à environ six jours. La phase stationnaire dure au moins un jour. Après avoir présenté un début de croissance similaire, une différence de développement est enregistrée en phase exponentielle, le témoin A présentant un déficit de croissance de 15 %. Des concentrations comprises entre 2,2 et 2,6 millions.ml⁻¹ sont atteintes au 10^e jour (fig. 5).

Chaetoceros minus présente une phase de latence d'un jour, une phase exponentielle de quatre à cinq jours et une phase stationnaire d'au moins six jours. Une différence de développement est enregistrée au cours de la phase exponentielle, le témoin A présentant un déficit de croissance de 10 % et une phase stationnaire plus précoce. Des concentrations comprises entre 76 et 85 millions.ml⁻¹ sont atteintes en fin de phase exponentielle au 5-6^e jour (fig. 5).

Parallèlement à cette étude, une modélisation des courbes de croissance a été réalisée sur les microalgues de la série 2 à l'aide du logiciel Mat Lab version 3 par Gaël Bougaran (Ifremer Nantes) (annexe 8).

4.1.2. Évolution de la taille moyenne au cours du temps

Les figures 6 à 11 représentent la distribution en taille des microalgues fourrage étudiées.

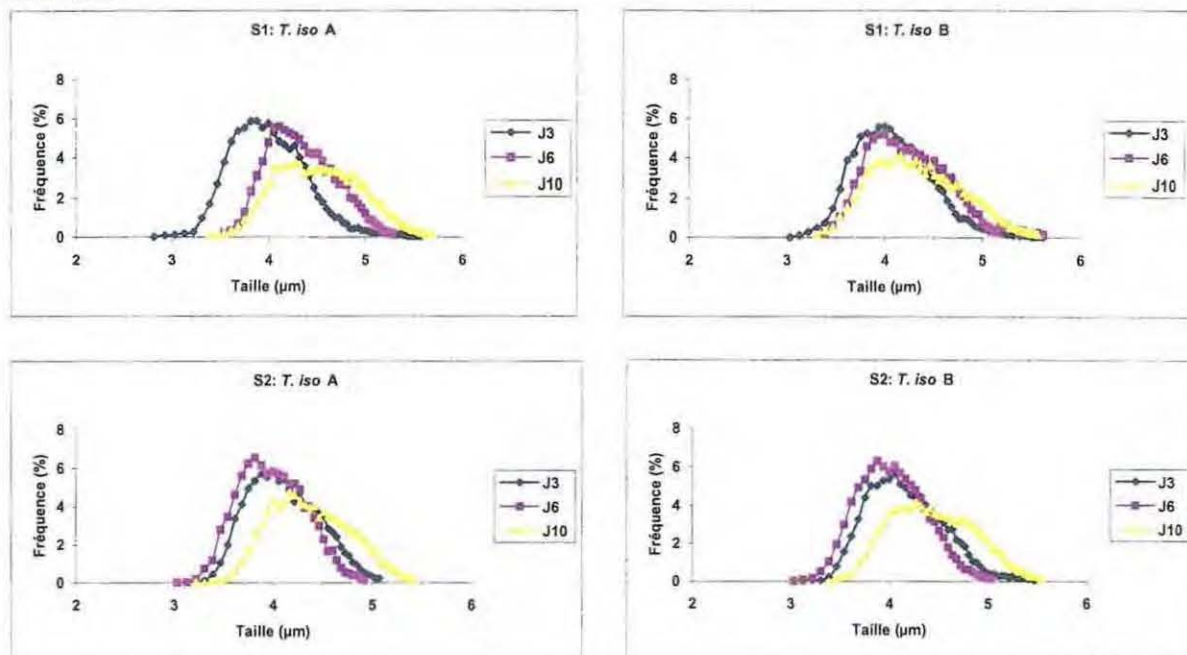


Fig. 6 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps d'*Isochrysis* aff. *galbana* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et deux séries ont été réalisées (S1, S2).

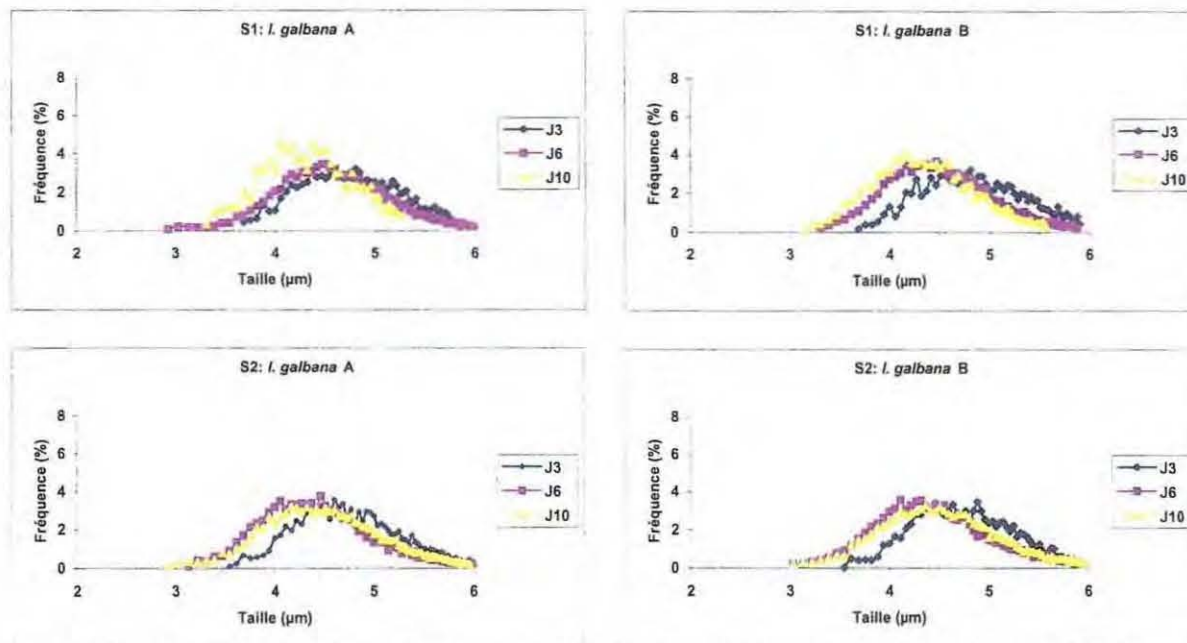


Fig. 7 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps d'*Isochrysis galbana* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et deux séries ont été réalisées (S1, S2).

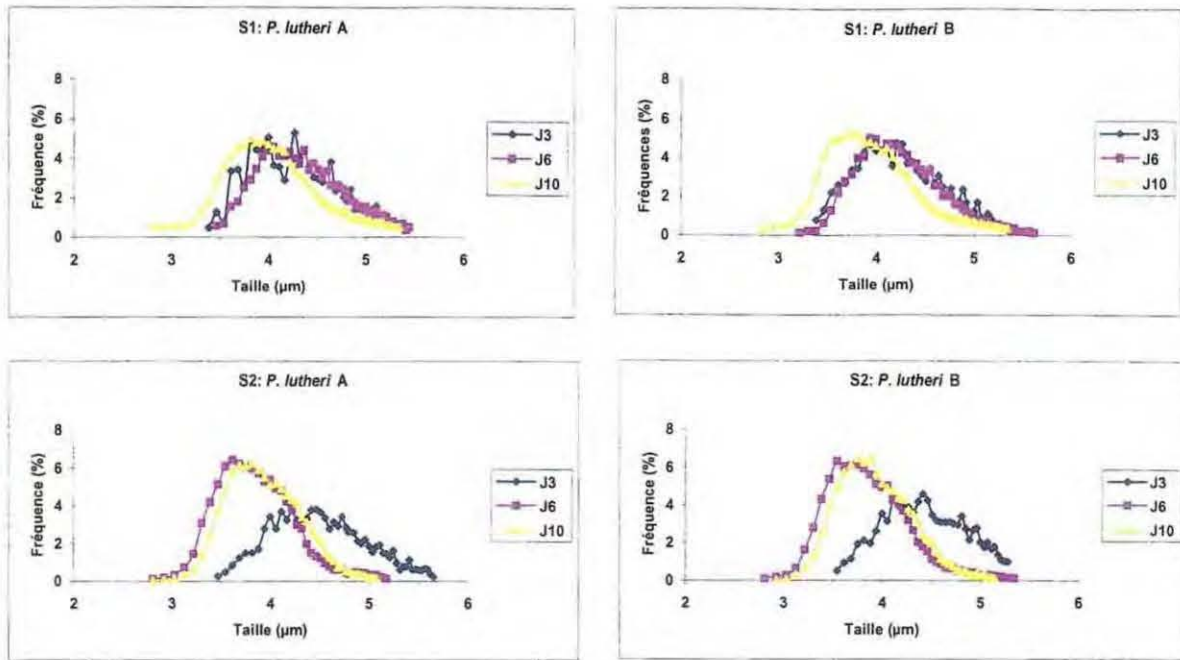


Fig. 8 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps de *Pavlova lutheri* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et deux séries ont été réalisées (S1, S2).

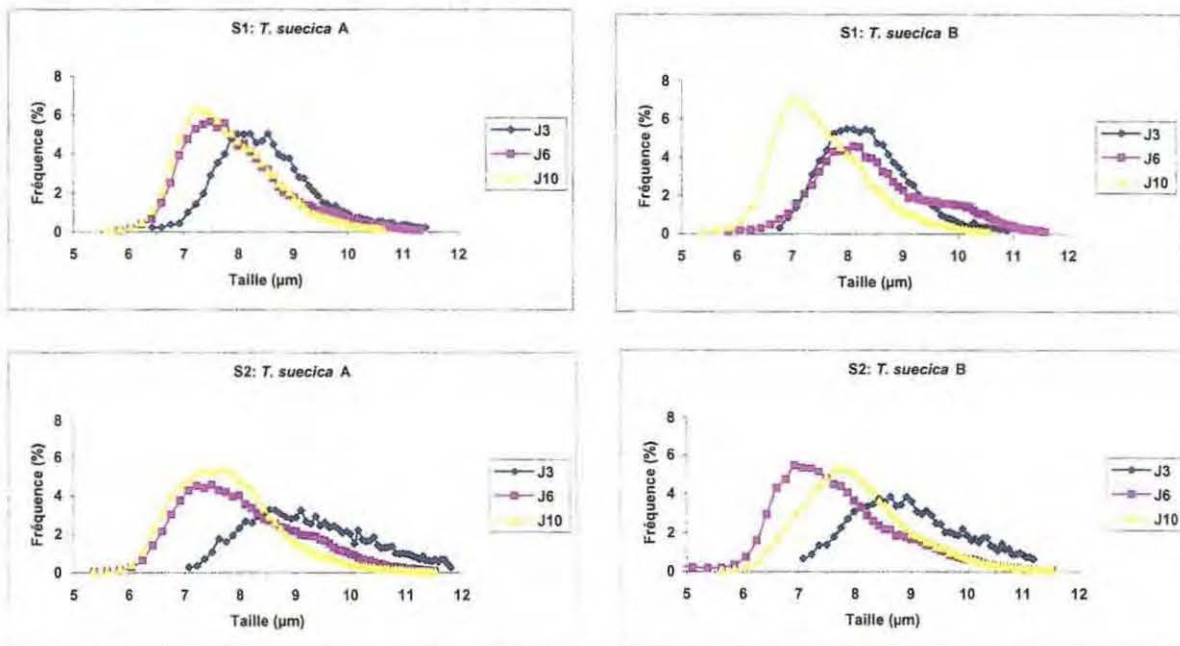


Fig. 9 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps de *Tetraselmis suecica* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et deux séries ont été réalisées (S1, S2).

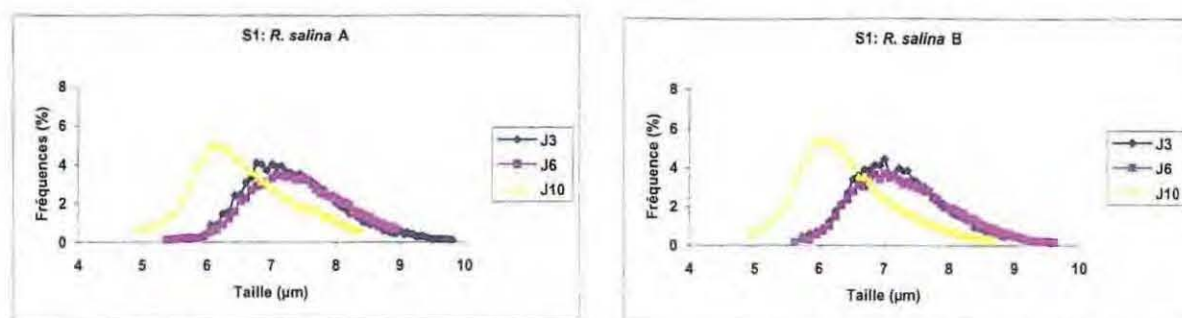


Fig. 10 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps de *Rhodomonas salina* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et une seule série a été réalisée (S1).

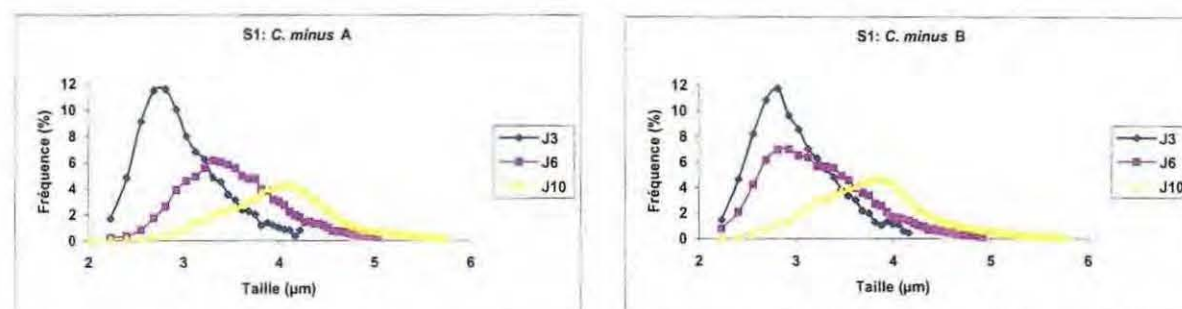


Fig. 11 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps de *Chaetoceros minus* en ballon de 2 litres. Les cultures étaient conduites en duplicat (A, B) et une seule série a été réalisée (S1).

Quelle que soit la culture (A, B) ou la série expérimentale considérée (S1, S2), les caractéristiques de taille des microalgues sont identiques. Ainsi, pour chaque culture, on observe une variation de taille moyenne des cellules phytoplanctoniques au cours du temps.

Pour *Isochrysis aff. galbana* et pour *Chaetoceros minus*, on observe une augmentation progressive du volume des cellules au cours du temps, ainsi qu'une distribution en taille de plus en plus hétérogène (figs. 6 et 11).

Pour *Isochrysis galbana*, quelle que soit la phase de croissance considérée, une assez forte hétérogénéité de la distribution en taille est notée. Par ailleurs, une faible diminution de la taille moyenne au cours du temps est enregistrée (fig. 7).

Pour *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* et *Rhodomonas salina*, on observe une diminution du volume moyen et un resserrement en taille au cours du temps (figs. 8, 9 et 10).

4.1.3. Taille moyenne des souches (annexe 9)

Pour chaque espèce, les données de taille ont été regroupées par phase de croissance, la phase exponentielle correspond à la moyenne de quatre distributions (A, B : J3, J6), tandis que la phase stationnaire correspond à la moyenne de deux distributions (A, B : J10). Les différentes données sont présentées dans la figure 12.

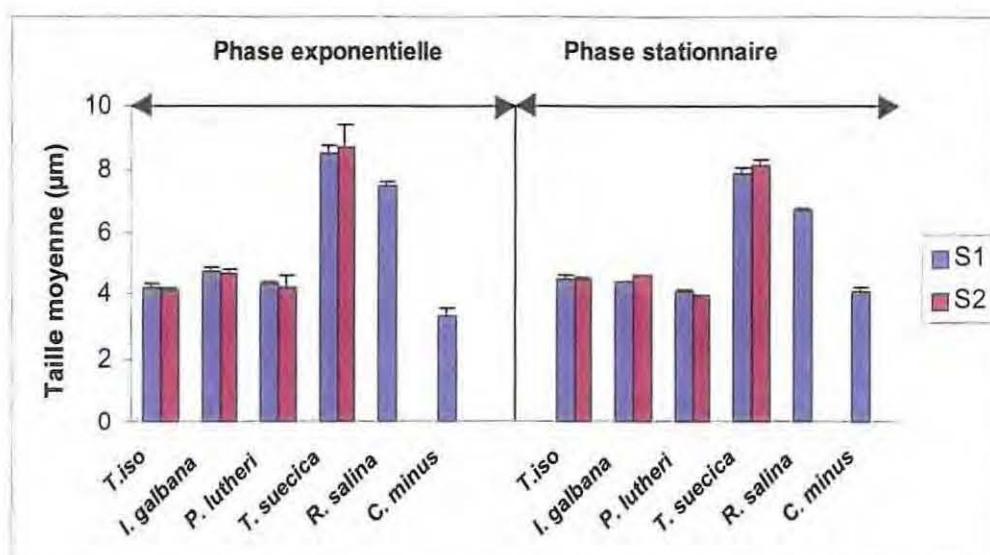


Fig. 12 : Taille moyenne (diamètre équivalent en μm) de microalgues fourrage cultivées en ballon de 2 litres, en phase exponentielle et stationnaire, au cours de deux séries expérimentales.

Par analyse de variance à un facteur, il n'a pas été mis en évidence d'effet « série » (S1, S2) sur la taille moyenne de façon globale puis par espèce (annexe 10 : tab. 2).

A l'inverse, l'effet « phase » est significatif chez *T. iso* ($p = 0,0008$), *I. galbana* ($p = 0,0311$), *T. suecica* ($p = 0,0359$) et *R. salina* ($p = 0,0013$), et ne l'est pas chez *P. lutheri* et *C. minus* (annexe 10 : tab. 3 et 4). Si ces différences sont significatives elles restent minimales pour les haptophycées (0,2 à 0,3 μm) mais plus marquées chez les prasinophycées et Cryptophycées (0,6 à 0,8 μm).

Par contre, une différence très hautement significative de taille ($p < 0,001$) est mise en évidence entre les différentes espèces de microalgues (annexe 10 : tabs. 5 et 6).

Un test de comparaison multiple de moyennes (test de Scheffé : annexe 10 : tab. 7) montre que *T. suecica* et *R. salina* présente une différence de taille très fortement significative avec chacune des autres espèces. De même, *C. minus* présente une différence de taille significative avec chacune des autres espèces.

A l'inverse, les Prymnesiophycées (*I. aff. galbana*, *I. galbana* et *P. lutheri*) ne présentent pas de différences significatives de taille entre elles.

Les tailles moyennes, toutes conditions confondues (témoin, série et phase) des différentes microalgues sont consignées dans le tableau 2 et la figure 13.

	Taille moyenne (μm)	Ecart-type
<i>I. aff galbana</i>	4.28	0.18
<i>I. galbana</i>	4.65	0.17
<i>P. lutheri</i>	4.20	0.23
<i>T. suecica</i>	8.41	0.52
<i>R. salina</i>	7.19	0.43
<i>C. minus</i>	3.55	0.46

Tableau 2 : Taille moyenne (diamètre équivalent en μm) des microalgues fourrage étudiées.

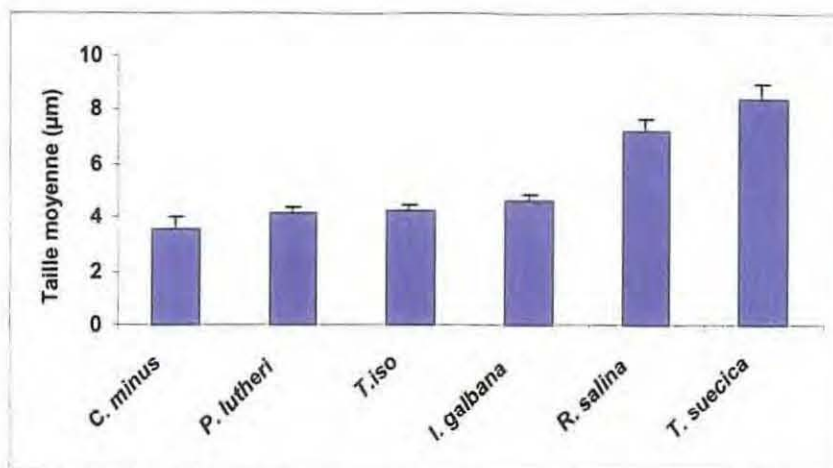


Fig. 13 : Taille moyenne toutes conditions confondues (témoin, série et phase) des différentes microalgues étudiées.

4.2. Culture en continu

4.2.1. Évolution des concentrations cellulaires

L'évolution des concentrations cellulaires des quatre cultures en continu d'*I. aff. galbana* est représentée en figure 14.

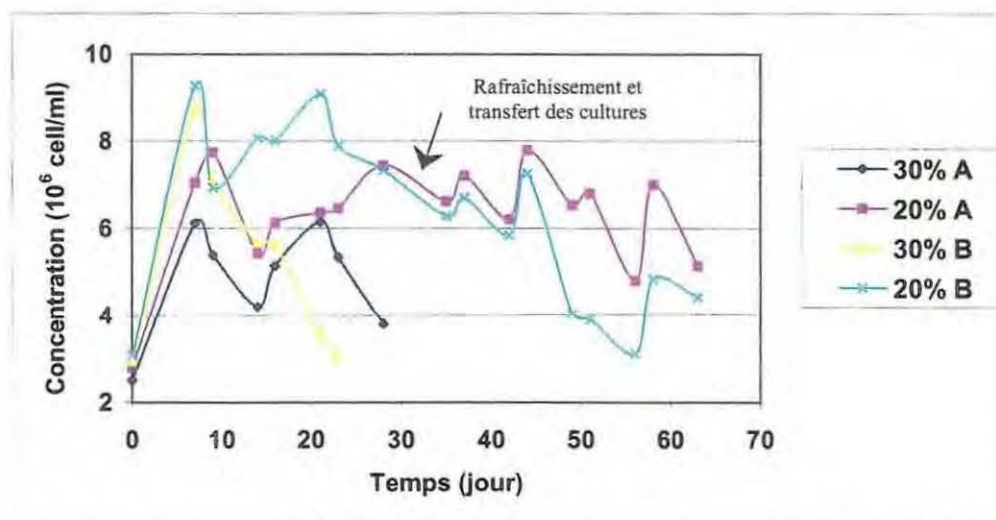


Fig. 14 : Évolution des concentrations cellulaires au cours du temps de quatre cultures en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à deux taux de renouvellement.

Les cultures se caractérisent par une forte augmentation de leur concentration cellulaire entre le 1^e jour (J0: premier débordement) et le 7^e jour, avec des volumes passant de 2-3 millions de cellules.ml⁻¹ à 6-9 millions cellules.ml⁻¹ (fig. 14). Ultérieurement, une baisse est enregistrée jusqu'au 8-15^e jour, les concentrations étant alors comprises entre 4-7 millions cellules.ml⁻¹. Après cette phase de diminution, on distingue deux groupes de cultures.

Celles à 20 % sont marquées, à partir du 10^e-14^e jour, par une réaugmentation puis une relative stabilisation de leur densité cellulaire, 6-8 millions de cellules.ml⁻¹, jusqu'au 44^e jour.

Au delà, une chute de leur concentration est observée. Ces deux cultures ont été volontairement arrêtées au 63^e jour, les concentrations étant alors de 4-5 millions de cellules.ml⁻¹.

Les cultures à 30 %, quant à elles, présentent un comportement très différent. La culture 30% A présente une reprise de croissance à partir du 16^e jour puis par une chute de sa concentration à partir du 23^e jour. Du 23^e au 28^e jour, cette culture passe de 6 à 3,8 millions de cellules.ml⁻¹. Une diminution progressive de la concentration cellulaire de la culture 30 % B est notée dès le 8^e jour passant de 9 à 3 millions de cellules.ml⁻¹ en 15 jours (fig.14).

Dans ces conditions, les cultures à 30 % ont été arrêtées au 28^e jour et celles à 20 % ont été rafraîchies en transférant la moitié des cultures 140 litres dans de nouveaux cylindres et en les complétant avec de l'eau de mer pasteurisée enrichie.

4.2.2. Évolution de la taille moyenne au cours du temps

L'évolution de la taille moyenne de culture en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à différents taux de renouvellement est présentée dans la figure 15.

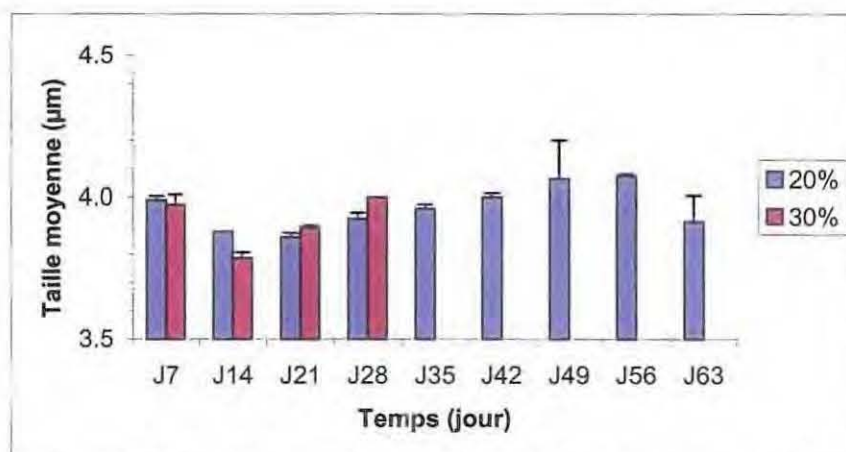


Fig. 15 : Taille moyenne (diamètre équivalent en µm) de culture en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à différents taux de renouvellement (annexe 11: tab 8).

Les cultures à 30 % n'ont pas pu être maintenues au delà de trois semaines. L'effet du facteur taux de renouvellement et cylindre ont donc été testés sur cette seule période pour les deux types de culture.

L'effet cylindre et taux de renouvellement n'ont aucune incidence sur la taille moyenne des microalgues, dont la valeur fluctue entre 3,8 et 4,0 µm (fig. 15, annexe 11 : tab. 9).

Les cultures à 20 % ont été maintenues jusqu'au 63^e jour. Là encore, l'effet cylindre n'a pu être mis en évidence au seuil de 5 % (annexe 11 : tabs. 9, 10 et 11) alors que l'analyse globale met en évidence la significativité du facteur temps bien qu'aucune différence significative de taille n'ait été observée jour à jour (fig. 15, annexe 11 : tab. 12, 13 et 14).

La distribution en taille de *I. aff. galbana* à 20 et 30 % de taux de renouvellement est représentée dans la figure 16.

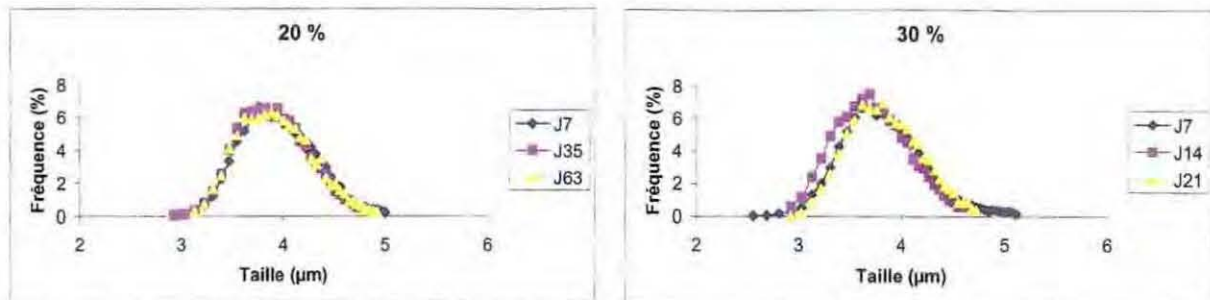


Fig. 16 : Évolution des spectres de taille (diamètre équivalent en μm) au cours du temps de cultures en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à 20 et 30 % de taux de renouvellement.

4.2.3. Suivi de la composition biochimique proximale (annexe 12 : tab. 15)

Le suivi de la composition biochimique a été opéré sur les quatre cultures. Les cultures à 30 % ont été arrêtées au bout d'un mois et pour ce taux de renouvellement, les données sont donc insuffisantes pour être correctement exploitées. Ainsi, les valeurs moyennes, toutes conditions confondues, des protides, lipides, et glucides (PLG) sont respectivement égales à 4,45 (0,65), 3,37 (0,29) et 1,34 (0,26) $\text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$.

L'évolution des teneurs en PLG des cultures d'*Isochrysis aff. galbana* à 20 % de taux de renouvellement est représentée dans la figure 17 (annexe 12 : tab. 1).

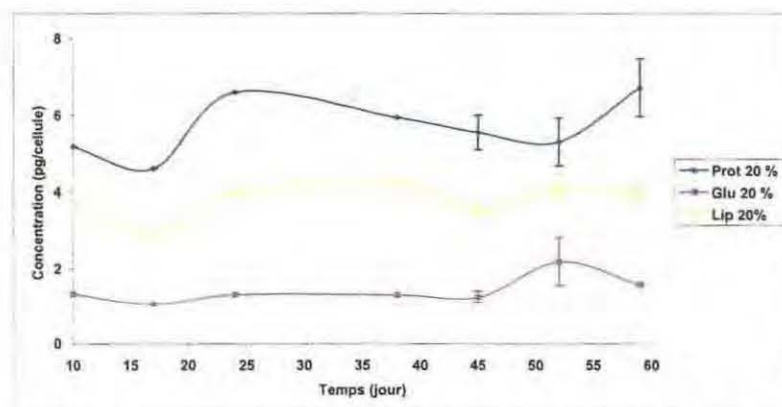


Fig. 17 : Évolution de la composition biochimique des cultures à 20 % (A + B).

Quel que soit le composant considéré la stabilité de la composition biochimique caractérise cette culture en continu à 20 % avec 4 à 6 $\text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$ de protéines ($4,45 \pm 0,65$), 3 à 4 $\text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$ de glucides ($1,34 \pm 0,20$) et 1 à 2 $\text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$ de lipides ($3,37 \pm 0,29$). Les composés biochimiques de la culture A sont présents à des concentrations légèrement supérieures ($< 0,5 \text{ pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$) à celles de la culture B.

La figure 18 représente l'évolution de la composition relative en PGL au cours du temps.

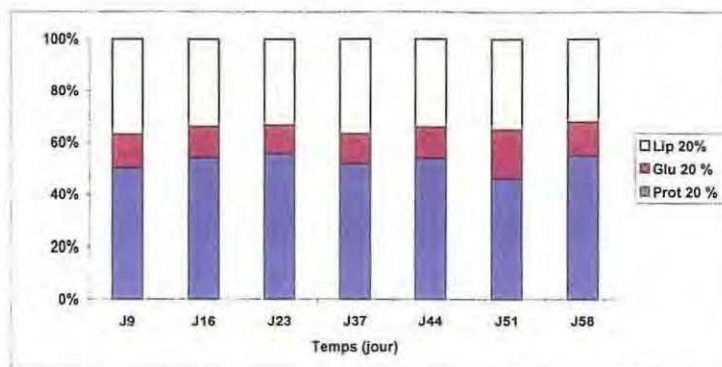


Fig. 18 : Évolution des proportions des composés biochimiques au cours du temps des cultures en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à 20 % de taux de renouvellement.

La proportion des différents composés biochimiques reste sensiblement la même pendant toute la durée de la culture jusqu'au 41^e jour. La part relative des protéines est de 50 %, celle des glucides de 15 % et celle des lipides de 35 %.

Au 51^e jour, une légère augmentation de la proportion en glucides (au détriment des protéines) est observée. Une diminution de la concentration cellulaire dans les cultures est parallèlement observée.

4.2.4. Suivi des populations bactériennes (annexe 12 : tab 16)

4.2.4.1. Aspect quantitatif

L'évolution de la flore bactérienne au cours du temps, pour chacune des quatre cultures, est présentée dans la figure 19.

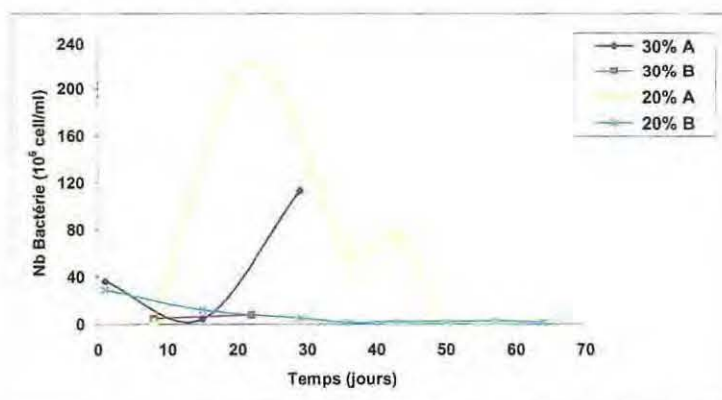


Fig. 19 : Évolution de la concentration bactérienne au cours du temps dans des cultures en continu d'*Isochrysis aff. galbana* à deux taux de renouvellement.

La charge en microflore bactérienne observée dans les cultures est de l'ordre 10⁶ UFC.ml⁻¹ variant de 1,5 à 224.

Le taux de renouvellement ne semble pas avoir d'effet sur la concentration bactérienne (fig. 19), la qualité des enceintes et/ou du circuit d'alimentation semblant être le paramètre prédominant.

La culture 20 % B présente une densité bactérienne qui se stabilise au cours du temps. Ainsi, la culture 20 % A possède une population bactérienne dont la concentration augmente rapidement entre les 11 et 25^e jours. Puis jusqu'au 39^e jour, une diminution par quatre de la charge bactérienne est enregistrée. Ceci est à mettre, en partie, en relation avec le rafraîchissement des cultures qui s'est déroulé le 28^e jour. Cette microflore bactérienne tend à se stabiliser à partir de 51^e jour.

La population bactérienne de la culture 30 % A ne semble pas se stabiliser au bout d'un mois. A l'inverse, entre le 8^e et 22^e jour une concentration bactérienne relativement stable dans la culture 30 % B est observée.

4.2.4.2. Aspect qualitatif

Les figures 20 et 21 représentent l'évolution des différentes colonies de chacune des cultures qui se caractérise par des populations bactériennes très diversifiées.

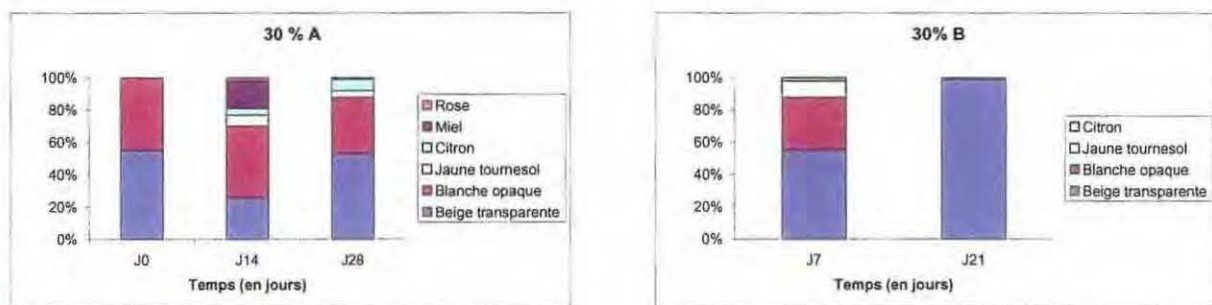


Fig. 20 : Évolution qualitative des populations bactériennes dans des cultures en continu d'*Isochrysis* aff. *galbana* à 30 % de taux de renouvellement.

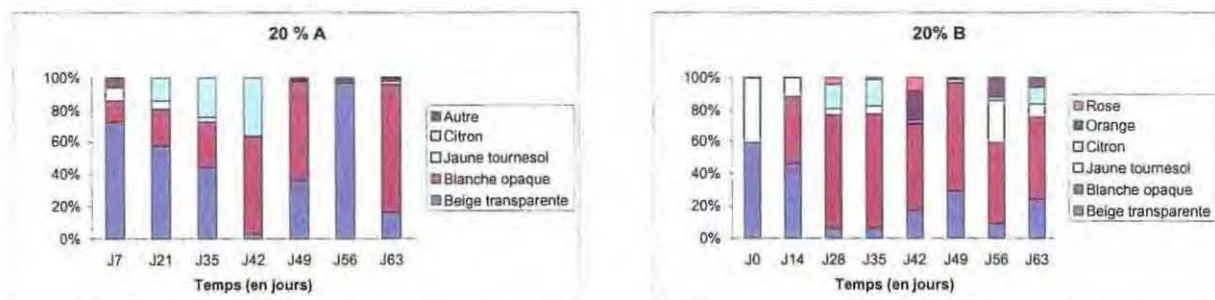


Fig. 21 : Évolution qualitative des populations bactériennes dans des cultures en continu d'*Isochrysis* aff. *galbana* à 20 % de taux de renouvellement.

Quel que soit le taux de renouvellement, on passe d'une population bactérienne bispécifique (J0), à 3-6 populations bactériennes au 14^e jour. Cette tendance peut s'inverser ultérieurement puisqu'au 21^e jour, la culture 30 % B n'est plus que bispécifique, ainsi que la 20 % A au 56^e jour. Il n'y a donc pas de stabilité des populations bactériennes sur le plan qualitatif. Or, les contaminations ne proviennent pas du système de pasteurisation, ni de la culture qui était axénique à l'origine et qui l'est restée jusqu'au volume de 10 litres (données non publiées). Il est cependant à noter qu'un incident technique est survenu le 9^e jour entraînant une inefficacité du système de pasteurisation durant quelques heures.

4.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de *Crassostrea gigas*

4.3.1. Croissance larvaire

Pour chaque régime alimentaire, la taille moyenne des larves est représentée au 9^e, 16^e et 21^e jour sur la figure 14.

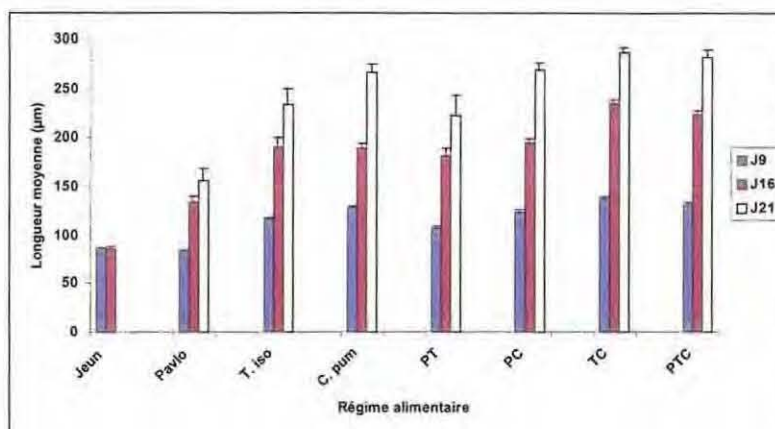


Fig. 14 : Longueur moyenne (\pm IC), de larves de *Crassostrea gigas*, alimentées en régimes mono ou plurispécifiques avec des microalgues originaires du CCAP aux 9^e, 16^e et 21^e jours.

La taille moyenne des larves au 9^e jour est comprise entre 85 et 138 μm correspondant à des taux de croissance journalière compris entre 1 $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$ (à jeun) et 8,4 $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$ (TC) (fig. 14 et tab. 3, annexe 13 : tab 17).

	Jeun	P. lutheri	T. iso	C. pum	PT	PC	TC	PTC
S1	1,24	1,06	5,56	7,20	3,97	6,55	8,45	7,70
S1+S2 (S2)	0,65 (0,05)	3,09 (5,12)	5,46 (5,36)	7,6 (8)	7,15 (10,34)	8,35 (10,14)	11,18 (13,91)	10,39 (13,08)
S1+ S2 + S3 (S3)	#N/A	4,11 (6,98)	8,18 (15,8)	9,9 (16,34)	7,54 (8,62)	10,03 (14,77)	11,07 (10,77)	10,85 (12,13)

Tableau 3 : Taux de croissance en $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$ entre le X^e et 2^e jour (et le taux de croissance relatif entre J9/J16 et J16 / J21).

$$S1 = J9 - J2$$

$$S2 = J16 - J9$$

$$S3 = J21 - J16.$$

Au 16^e jour, trois groupes se distinguent. Les larves alimentées avec le régime *P. lutheri* et celles à jeun ont une taille moyenne relativement faible (86 à 134 μm) induisant des taux de croissance de 0,7 à 3 $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$. Pour les régimes T. iso, *C. calcitrans* forma *pumilum*, PT et PC, les tailles moyennes observées sont de 182 à 195 μm et les taux de croissance journalière compris entre 5,5 et 8,4 $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$. Les régimes TC et PTC conduisent à des tailles moyennes comprises entre 224 et 234 μm pour des taux de croissance de 10,4 à 11,2 $\mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$ (fig. 14).

Pour les régimes *P. lutheri*, T. iso et *C. calcitrans* forma *pumilum*, un seul des duplicats est représenté sur la figure 14 au 21^e jour. Ces élevages ont volontairement été arrêtés en raison d'un fort taux de mortalité au 16^e jour.

Trois groupes se détachent au 21^e jour. Une taille moyenne (157 μm) et un taux de croissance faible ($4,1 \mu\text{m.j}^{-1}$) sont notés chez les larves alimentées avec le régime *P. lutheri*. Pour les régimes T. iso et PT, les larves mesurent entre 222 et 234 μm conduisant à des taux de croissance journalière compris entre $7,5$ et $8,2 \mu\text{m.j}^{-1}$. Les régimes *C. calcitrans* forma *pumilum*, PC, TC et PTC conduisent à des tailles moyennes (267 à 288 μm) et à des taux de croissance nettement supérieurs ($9,9$ à $11 \mu\text{m.j}^{-1}$) à ceux obtenus avec les autres régimes (fig. 14).

En conséquence, les larves alimentées avec les régimes monospécifiques *P. lutheri*, *I. aff. galbana* et bispécifique *P. lutheri* + *I. aff. galbana*, présentent une taille moyenne, au 21^e jour d'élevage, bien inférieure à celle obtenue avec les autres régimes.

L'influence des différents régimes nutritionnels a été testée par des analyses de variance aux 9^e, 16^e et 21^e jours sur la longueur larvaire.

Cette analyse met en évidence, au 9^e jour d'élevage, la forte influence du facteur nutritionnel sur la taille des larves (annexe 13 : tabs. 18 et 19).

Des comparaisons de moyennes deux à deux (test de Scheffé) montrent que ces différences sont significatives entre toutes les conditions nutritionnelles, excepté entre Jeun et *P. lutheri* d'une part, et *C. calcitrans* forma *pumilum* et PTC d'autre part (annexe 13 : tab. 20).

Une autre analyse effectuée à partir des données n'incluant pas les tailles des larves maintenues à jeun présente les mêmes résultats.

Les larves nourries avec des régimes comprenant exclusivement des flagellés (P, T et PT) présentent une croissance à forte variabilité. Le coefficient de variation ($100 \cdot \Gamma/m$) est particulièrement fort (30 à 40 %) indiquant que seule une partie de la population se développe normalement. Dans les autres conditions nutritionnelles ces valeurs sont voisines de 15 %.

Les mêmes analyses ont été réalisées au 16^e jour. Une forte influence du régime nutritionnel est à nouveau notée (annexe 13 : tabs. 21 et 22).

Des comparaisons de moyennes multiples montrent que ces différences sont significatives entre toutes les conditions nutritionnelles (annexe 13 : tab. 23), excepté entre : T. iso et C. pum, T. iso et PC, T. iso et PT, C. pum et PC, C. pum et PT, PTC et TC.

Une autre analyse effectuée à partir des données n'incluant pas les tailles des larves maintenues à jeun présente les mêmes résultats.

Au 21^e jour, ce même type d'analyse de variance confirme la forte influence du régime nutritionnel (annexe 13 : tabs. 24 et 25). Des tests de Scheffé montrent que des différences non significatives pour trois des six groupes du 16^e jour T. iso et PT, C. pum et PC, TC et PTC. Trois nouvelles combinaisons ne présentent pas de différence de taille entre elles, C. pum et TC, C. pum et PTC, PC et PTC. (annexe 13 : tab. 26). Six comparaisons de moyenne présentent des différences non significatives entre les régimes : T. iso et PT, C. pum et TC, C. pum et PTC.

4.3.2. Mortalité larvaire

Les taux de mortalité des larves alimentées à l'aide de différents assemblages phytoplanctoniques sont rapportés dans le tableau 4.

	J9	Ecart type	J16	Ecart type	J21	Ecart type
Jeun A	1		85			
Jeun B	0.2	0.6	76	6.8		
Pavlo A	0.0		58			
Pavlo B	0.5	0.3	8	35	66.3	
T. iso A	0.5		84			
T. iso B	0.6	0.1	4	56.6	13.2	
C. pum A	0.0		36			
C. pum B	0.5	0.4	0	24.9	2.2	
PT A	0.0		21		45.7	
PT B	0.1	0.1	5	11.7	26.2	13.8
PC A	0.8		3		1.6	
PC B	0.3	0.4	2	0.9	4.5	2
TC A	0		1		1.5	
TC B	0.2	0.1	0	0.3	2.5	0.7
PTC A	0		3		4.2	
PTC B	0	0	1	1.37	5.2	0.75

Tableau 4 : Evolution des taux de mortalité aux 9^e, 16^e et 21^e jours de larves de *Crassostrea gigas*, alimentées sur différents régimes mono ou plurispécifiques, constitués de microalgues originaires du CCAP.

Au 9^e jour, quel que soit le régime alimentaire, le taux de mortalité est $\leq 1\%$, y compris chez les larves maintenues à jeun (tab. 4).

Chez ces dernières, un taux de mortalité de 80 % est noté le 16^e jour.

Les régimes monospécifiques présentent des comportements de survie très différents entre les bacs d'élevage avec des coefficients de variation variant de 129 % pour T. iso à 138 % pour C. pum (vs 8 % pour les larves à jeun par exemple). Ainsi une forte mortalité est enregistrée chez les bacs A, 36 % (C. pum) à 84 % (T. iso), le bac *P. lutheri* A présentant une valeur intermédiaire de 58 %. A l'inverse, les bacs B se caractérisent par une plus faible mortalité, $\leq 8\%$.

Pour le régime plurispécifique PT, un taux de mortalité compris entre 5 et 21 % est noté. Par contre, les autres régimes (PC, TC et PTC) ont un taux de mortalité $\leq 3\%$ (tab. 4). Car voués à l'échec, les élevages, présentant une forte mortalité ($\geq 36\%$) n'ont pas été poursuivis au delà du 16^e jour d'élevage.

Alors que cet élevage représentait que 8 % de mortalité au 16^e jour (bac B), une mortalité de 66,3 % est relevée pour le régime *P. lutheri* au 21^e jour. A l'inverse, les autres régimes monospécifiques conduisent à un taux de mortalité relativement faible, 2 % pour C. pum 13 % pour T. iso à (tab. 4).

Pour les régimes plurispécifiques, aucune évolution notable n'est enregistrée depuis le 16^e jour, excepté pour le régime PT présentant un taux de mortalité croissant, (26-46 % vs 5-21 % le 16^e jour). Les autres assemblages plurispécifiques présentent toujours de faible taux de mortalité de 1,5 à 5,5 %.

Différentes analyses non paramétriques (Kruskal-Wallis) n'ont pas permis de mettre en évidence l'influence des différents régimes sur les mortalités larvaires (annexe 14 : tabs. 27 à 30) excepté lorsque le regroupement comporte trois blocs, à jeun, monospécifique et plurispécifique (annexe 14 : tabs. 31 et 32). Des tests de comparaison de moyennes (tests U de Mann-Whitney) ne permettent de valider une différence de mortalité qu'entre les larves

alimentées avec des régimes plurispécifiques et les larves maintenues à jeun ($p = 0,037$) (annexe 14 : tabs. 33 à 38).

4.3.3. Rendement larvaire

Au 21^e jour, avant leur transfert en micronurserie les larves les plus performantes sont sélectionnées sur tamis de 180 μm .

Le rendement larvaire qui représente le nombre de larves $>180 \mu\text{m}$ divisé par le nombre de larves initiales mises en élevage est alors établi. Le rendement larvaire de chaque régime alimentaire est présenté dans la figure 15 (annexe 15 : tab. 39).

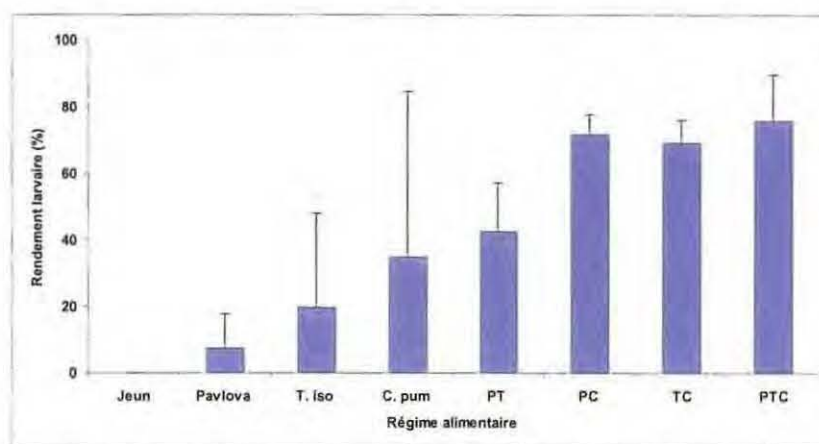


Fig. 15 : Rendement moyen (\pm écart type), de larves de *Crassostrea gigas*, alimentées en régimes mono ou plurispécifiques avec des microalgues originaires du CCAP.

Les régimes monospécifiques se caractérisent par des rendements extrêmement faibles compris entre 7 et 35 %, en partie liés à des survies entre bac différentes, à l'exception de *P. lutheri* pour qui le taux de mortalité très élevé est le même quel que soit le bac d'élevage considéré (fig. 15).

Les régimes plurispécifiques ont des rendements compris entre 70 et 80 %, à l'exception du régime composé des deux flagellés, PT avec 42 % (fig. 15).

L'effet de l'alimentation larvaire a été évalué au moyen du test non paramétrique de Kruskal-Wallis en considérant l'ensemble des régimes alimentaires. Aucune différence significative n'est mise en évidence ($P = 0,17$: annexe 15: tabs. 40 et 41). Cette absence de significativité peut s'expliquer par la forte variabilité interbac. Rappelons que tous les régimes monospécifiques ont conduit à de fortes mortalités dès le 16^e jour d'élevage et qu'un bac sur deux n'a pas été maintenu au delà.

Les données ont alors été regroupées. Trois groupes ont été créés correspondant aux différents types de régime : monospécifique, bispécifique et trispécifique. Là encore, une différence non significative est mise en évidence au seuil de 5 % ($p = 0,053$), (annexe 15: tabs. 42 et 43).

Par contre, cette différence est significative entre régimes monospécifique et régimes plurispécifique ($p = 0,0201$), (annexe 15: tabs. 44 et 45).

Ce même test de comparaison de moyennes non appariées (test U de Mann-Whitney) ne met pas en évidence de différence entre les groupes bispécifique et plurispécifique (annexe 15 : tabs. 46 et 47).

En conséquence, les régimes monospécifique et le régime bispécifique PT conduisent bien à des rendements significativement inférieurs à ceux obtenus avec des régimes plurispécifiques (fig. 15).

4.3.4. Consommation phytoplanctonique

La consommation larvaire journalière, correspondant à l'ingestion de phytoplancton exprimée en nombre de cellule.ml⁻¹, est représentée, pour les différents régimes alimentaires, sur les figures 16 à 19 (annexe 16 : tab. 48).

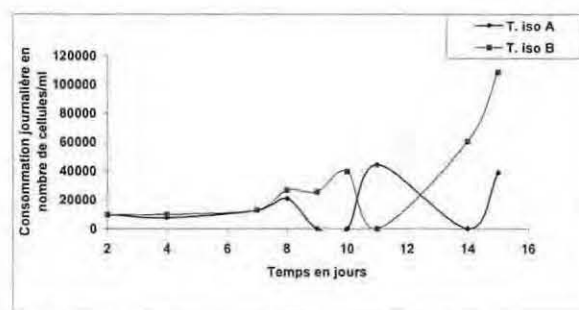
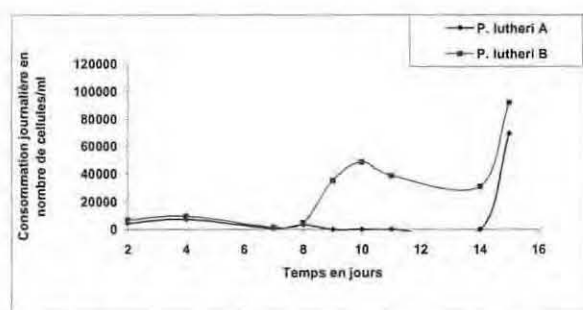


Fig. 16 : Evolution de la consommation journalière de larves de *Crassostrea gigas* alimentées avec *Pavlova lutheri* ou *Isochrysis aff. galbana* (T. iso). Les élevages étaient conduits en duplicat (A, B).

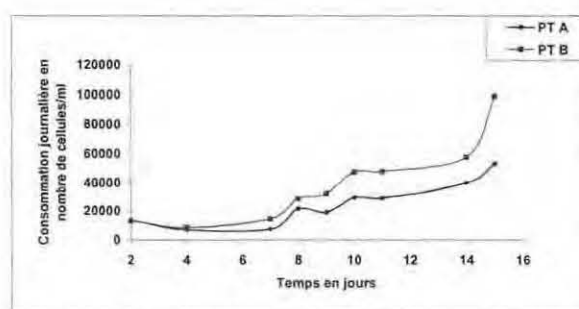
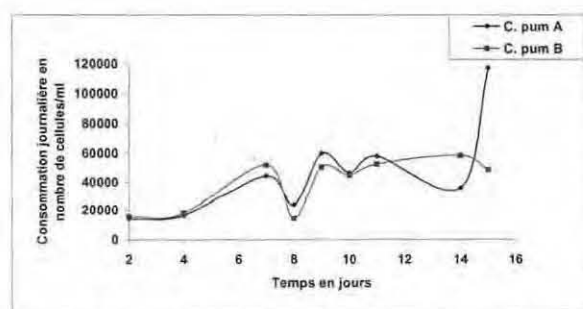


Fig. 17 : Evolution de la consommation journalière de larves de *Crassostrea gigas* alimentées avec *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* ou *Pavlova lutheri* + *Isochrysis aff. galbana* (PT). Les élevages étaient conduits en duplicat (A, B).

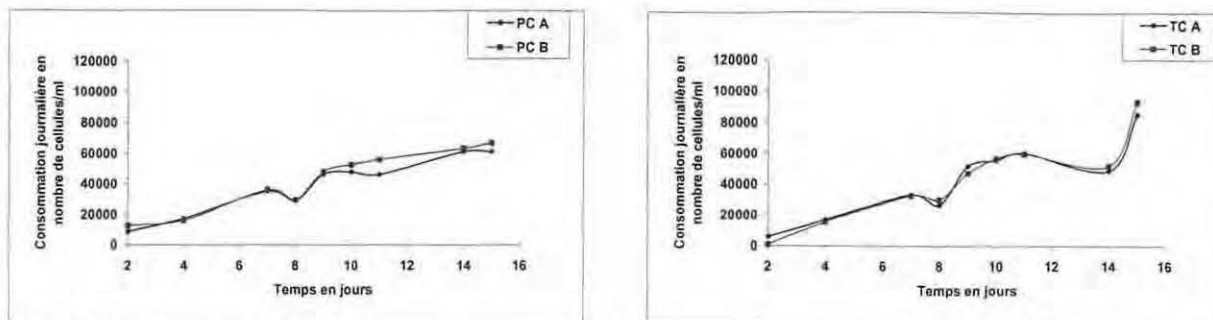


Fig. 18 : Evolution de la consommation journalière de larves de *Crassostrea gigas* alimentées avec les régimes bispécifiques *Pavlova lutheri* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (PC) ou *Isochrysis* aff. *galbana* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (TC). Les élevages étaient conduits en duplicat (A, B).

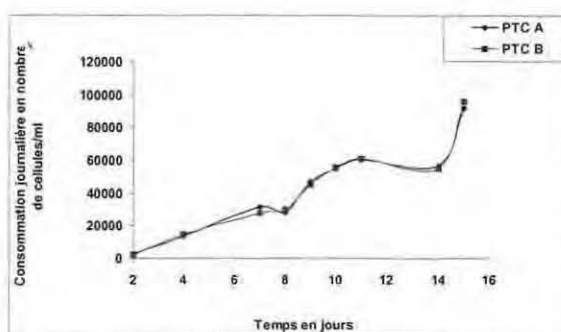


Fig. 19 : Evolution de la consommation journalière de larves de *Crassostrea gigas* alimentées avec le régime trispécifique *Pavlova lutheri* + *Isochrysis* aff. *galbana* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (PTC). Les élevages étaient conduits en duplicat (A, B).

Les larves alimentées avec la seule *Pavlova lutheri* (Pavlo) présentent une consommation journalière stable et inférieure à 10 000 cellules.ml⁻¹ jusqu'au 8^e jour d'élevage. Ultérieurement, une différence de consommation entre les deux bacs d'élevage est observée. Les larves conduites dans le bac B présentent une augmentation progressive de leur consommation journalière pour atteindre 90 000 cellules.ml⁻¹ au 15^e jour.

Une tendance inverse avec une consommation journalière quasiment nulle est enregistrée dans le bac A jusqu'au 14^e jour. Une reprise du broutage est alors observée le 15^e jour avec une consommation de 70 000 cellules.ml⁻¹ (fig. 16).

Les larves alimentées avec la seule *Isochrysis* aff. *galbana* (T. iso) présentent une consommation journalière stable et inférieure à 13 000 cellules.ml⁻¹ jusqu'au 7^e jour d'élevage. Une différence de comportement entre les bacs A et B est alors observée. Des fluctuations de 26 000 à 60 000 cellules.ml⁻¹ sont observées entre le 8^e et 14^e jour d'élevage. La consommation journalière atteint 38 000 cellules.ml⁻¹ pour le bac A et 108 000 cellules.ml⁻¹ pour le bac B au 15^e jour (fig. 16).

Les larves alimentées avec la seule *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (C. pum) présentent une consommation journalière stable et inférieure à 18 000 cellules.ml⁻¹ jusqu'au 4^e jour d'élevage. Au 7^e jour la consommation est comprise entre 44 000 et 51 000 cellules.ml⁻¹ alors qu'au 8^e jour, elle est comprise entre 15 000 et 24 000 cellules.ml⁻¹. A partir du 9^e jour, la consommation journalière se stabilise entre 45 000 et 60 000 cellules.ml⁻¹. Cette diminution de la consommation correspond très probablement à un manque de nourriture. Au 11^e jour, une différence de comportement est observée entre les deux bacs. La consommation

journalière dans le bac B tend à se stabiliser entre 48 000 et 58 000 cellules.ml⁻¹ alors que celle du bac A passe de 36 000 à 117 000 cellules.ml⁻¹ entre le 14^e et 15^e jour (fig. 17).

Les larves alimentées avec le régime bispécifique *Pavlova lutheri* + *Isochrysis* aff. *galbana* (PT) présentent une consommation journalière stable et inférieure à 14 500 cellules.ml⁻¹ jusqu'au 7^e jour d'élevage. Cependant, à partir du 4^e jour bien que les deux témoins présentent un comportement similaire, les larves du bac B présentent une consommation inférieure de 20 000 à 40 000 cellules.ml⁻¹ à celle du bac A. Une augmentation progressive du grazing est alors notée à partir du 7^e jour pour atteindre une consommation comprise entre 53 000 et 99 000 cellules.ml⁻¹ au 15^e jour (fig. 17).

Les larves alimentées avec le régime bispécifique *Pavlova lutheri* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (PC) présentent une augmentation progressive de leur consommation journalière. Au 8^e jour, il est observé comme pour le régime C. pum, une diminution de la consommation qui correspond à un manque de nourriture. Cependant, ce régime entraîne une consommation journalière au 15^e jour (64 000 cellules.ml⁻¹) inférieure à celle de tous les autres régimes (fig.18).

Les larves alimentées avec le régime bispécifique *Isochrysis* aff. *galbana* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (TC) et le régime trispécifique *Pavlova lutheri* + *Isochrysis* aff. *galbana* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (PTC) présentent un comportement similaire. Une augmentation progressive de leur consommation journalière est notée. Comme précédemment, il est enregistré une diminution de la consommation au 8^e jour correspondant à un manque de nourriture. De même, une augmentation de la ration entre le 14^e et le 15^e jour entraîne une forte reprise de la consommation, de 48 500 à 96 000 cellules.ml⁻¹. Au 15^e jour, la consommation journalière atteinte est de 90 000 cellules.ml⁻¹ pour le régime TC et de 94 000 cellules.ml⁻¹ pour le régime PTC (figs. 18 et 19).

En conséquence, les régimes monospécifiques et le régime bispécifique PT conduisent à une faible consommation journalière durant la première semaine d'élevage et à une augmentation de la consommation à partir de la deuxième semaine avec une forte irrégularité. Par contre, les régimes TC, PC et PTC conduisent à une augmentation régulière et progressive de la consommation journalière des larves.

Le nombre de cellule phytoplanctonique consommée par larve aux 9^e et 15^e jours est présenté dans le tableau 5 (en tenant compte des mortalités).

	Pavlo A	Pavlo B	T. iso A	T. iso B	C. pum A	C. pum B	PT A	PT B	PC A	PC B	TC A	TC B	PTC A	PTC B
J9	0	7116	0	5176	11947	10136	3772	6328	9322	9639	10319	9424	9401	9095
J15	33080	19987	48536	22577	54063	9600	13418	20800	12675	13688	17181	18593	18975	19406

Tableau 5 : Nombre de cellules consommées par larve et par jour aux 9 et 15^e jour d'élevage.

Les valeurs surlignées en gris ne peuvent être exploitées du fait d'une forte mortalité dans les bacs. Cette forte mortalité a probablement entraîné une modification du nombre de particules dans les bacs et les résultats ne reflètent pas forcément le nombre réel de cellules phytoplanctoniques ingérées (présence de débris).

Les larves alimentées avec les régimes monospécifiques T. iso ou *P. lutheri* (flagellés) présentent au 9^e jour une consommation nettement inférieure (5 000 à 7 000 cellules.larve⁻¹) à celle alimentée avec le régime C. pum (10 000 cellules.larve⁻¹). Le régime bispécifique constitué de deux flagellés (PT), conduit à une consommation plus faible (6 328 cellule.larve⁻¹

¹) que les autres régimes plurispécifiques (9 322 à 10 319 cellules.larve⁻¹). Quel que soit le régime incluant la diatomée *C. pum*, la consommation par larve est très supérieure à celle des régimes composés exclusivement de flagellés. L'apport de *P. lutheri* dans les régimes *C. Pum* et TC, ne modifie pas la consommation.

La tendance s'inverse au 15^e jour. Chaque larve alimentée sur les régimes monospécifiques *T. iso* ou *P. lutheri* consomme environ 21 000 cellules contrairement à celle nourrie avec *C. pum* qui ne consomme plus que 9 600 cellules. Les régimes plurispécifiques conduisent à des consommations par larve d'environ 19 000 cellules excepté pour le régime PC qui présente une consommation plus faible (13 000 cellules.larve⁻¹).

5. Discussion

5.1. Caractérisation des microalgues fourrage

5.1.1. Croissance

Afin de garantir une bonne valeur nutritionnelle pour les larves de mollusques, les microalgues sont utilisées en fin de phase exponentielle car en phase stationnaire leur composition biochimique tend à se modifier. De plus, les cultures sont rarement axéniques et au cours de cette phase stationnaire les populations bactériennes se développent rapidement ce qui peut présenter des risques pour les élevages (LOUSSOUARN, 2002).

Les croissances obtenues chez *Isochrysis* aff. *galbana*, originaire du CCAP, présentent le même profil que celles obtenues en 2001 avec la souche "dite" d'Argenton. En effet, la phase de latence est brève (1 à 2 jours), la phase exponentielle est bien marquée (5 jours) et les concentrations obtenues sont importantes (29 à 40 millions de cellules.ml⁻¹).

Les croissances obtenues chez *Isochrysis galbana*, originaire du CCAP, présentent des performances supérieures à celles obtenues en 2001 qui était également originaire du CCAP (la souche "dite" d'Argenton ayant été perdue). Cette microalgue semble difficile à cultiver car sa croissance reste très lente et sa concentration en fin de phase exponentielle peu importante. Sur chaque duplicat, les courbes de croissance sont quasi identiques, ce qui démontre la bonne reproductibilité des conditions expérimentales.

Les croissances obtenues chez *Pavlova lutheri*, originaire du CCAP, lors de la première série expérimentale, présentent des performances inférieures à celles enregistrées avec la souche d'Argenton. Cependant, lors de la deuxième série expérimentale, les performances de croissance sont légèrement supérieures et surtout plus reproductibles, car les duplicats présentent un développement similaire contrairement à celles obtenues avec la souche "dite" d'Argenton. La différence de performance de croissance entre les deux séries, réalisées avec la même souche du CCAP, pourrait s'expliquer par un problème d'adaptation de la souche à son nouvel environnement, la deuxième série expérimentale ayant été conduite quelques mois après réception de l'algue au laboratoire.

Une différence de croissance est également observée entre la première et la deuxième série expérimentale chez *Tetraselmis suecica* originaire du CCAP. Par rapport aux performances enregistrées avec la souche d'Argenton, *T. suecica* CCAP présente une croissance inférieure à celle obtenue avec la souche d'Argenton. Il est difficile d'invoquer une éventuelle adaptation de cette espèce à son nouvel environnement car elle est maintenue en stock à Argenton depuis plus d'un an.

A l'inverse, les croissances obtenues chez *Rhodomonas salina*, originaire du CCAP, présentent des performances nettement supérieures à celles obtenues avec la souche d'Argenton. Un moins bon maintien de la souche "dite" d'Argenton (repiquage trop tardif par exemple ou volume insuffisant) pourrait expliquer cette situation.

Les croissances obtenues chez *Chaetoceros minus*, isolée du milieu naturel, présentent des phases de croissance bien marquées.

Cette souche semble être facile à cultiver, sa croissance étant rapide et atteint des concentrations cellulaires très élevées de l'ordre de 75 à 90 millions de cellules.ml⁻¹ en fin de phase exponentielle. Cette diatomée semble "robuste" et ses performances en grands volumes sont actuellement en cours d'étude pour tester son utilisation potentielle par le naissain et/ou les adultes de mollusques.

Sur les six espèces de microalgues testées, toutes se sont développées sous nos conditions expérimentales : trois ont montré une croissance supérieure à celle obtenue avec celle issue du souchier d'Argenton (*I. galbana*, *P. lutheri* et *R. salina*), *I. aff. galbana* présente une croissance similaire tandis que *T. suecica* a une croissance plus lente. Seule une souche, *T. suecica*, qui à la propriété de s'enkyster ne subit pas d'effet "vieillesse". Pour les autres espèces la régénération des souches stocks a une influence importante sur leur performance de croissance donc une incidence sur la production.

La souche *Chaetoceros minus*, étudiée n'a pas d'homologue dans le souchier d'Argenton. Par rapport aux performances de croissance obtenue, cette souche semble présenter les qualités requises en éclosérie de mollusques. Son utilisation par les larves reste à confirmer, les premiers résultats obtenus sur *Crassostrea gigas* étant anciens (ROBERT *et al.*, 1989).

5.1.2. Taille

La taille représente un caractère incontournable car elle doit être compatible avec celle de la larve ou du juvénile à nourrir. Les larves de bivalves sont des microphages dont la plus grande dimension varie le plus souvent entre 60 et 350 µm. Le faible diamètre de leur bouche et œsophage empêche l'ingestion de particules de plus de 10 µm pour les jeunes stades (larves < 130 µm) et de 30 µm pour les stades plus âgés (ROBERT *et al.*, 1997). La taille des souches testées est comprise entre 3,9 et 9,5 µm ce qui est tout à fait adaptée à la taille des larves de mollusques. Les Prymnésiophytes comme *I. aff. galbana*, *I. galbana* et *P. lutheri* ayant une taille comprise entre 4,2 et 4,7 ont une taille adéquate pour le nourrissage des jeunes larves D (premier stade larvaire). Les microalgues telles que *T. suecica* ayant une taille moyenne de 8,4 µm sont plutôt utilisées dès que les larves véligères ont atteint une taille comprise entre 140 et 160 µm (stade umboné). *R. salina* (7,2 µm) n'a pas encore été utilisée pour nourrir les larves de *Crassostrea gigas*, mais des essais effectués sur des larves âgées de *Pecten maximus* ne montrent pas d'amélioration évidente tant pour la croissance larvaire que pour la métamorphose (NICOLAS, 1999).

Chaetoceros minus présente une taille adéquate (3,55 µm) pour nourrir les premiers stades larvaires.

5.2. Culture en continu

5.2.1. Concentration cellulaire

Quel que soit le taux de renouvellement appliqué aux cultures (20 ou 30 %), une forte augmentation de la croissance est notée. Mais, au 10^e jour les concentrations cellulaires des cultures à 30 % décroît régulièrement ce qui pourrait s'expliquer par un lessivage de la culture. Ce taux de renouvellement ne semble pas préconisé.

A l'inverse, la concentration cellulaire des cultures à 20 % présente une relative stabilité (entre 6 et 8 millions de cellules.ml⁻¹) entre le 16^e et le 46^e jour. Ensuite, une diminution progressive de la concentration cellulaire est enregistrée. Pour la culture en continu d'*I. aff. galbana*, le taux de renouvellement à 20 % semble être mieux adapté.

5.2.2. Taille moyenne

Le taux de renouvellement semble n'avoir aucune incidence sur la taille moyenne des microalgues. De plus celle-ci est stable au cours du temps. Cependant, il a été montré au cours de la première partie de ce chapitre qu'il existait une différence de taille entre phase exponentielle et stationnaire chez *T.iso* (4,2 vs 4,5 µm). Or, en continu à 20 % la taille moyenne fluctue entre 3,85 et 4,16 µm, confirmant ainsi que la culture est toujours restée en phase exponentielle. Il est par contre intéressant de noter que en culture en continu, les cellules de *T. iso* sont significativement plus petites (3,97 µm ± 0,04 vs 4,17 ± 0,08: moyenne tous points confondus ± écart type à 95 %).

5.2.3. Suivi biochimique

Le suivi de la composition proximale a permis de noter la stabilité des cultures d'*Isochrysis aff. galbana* en continu. Une prédominance des protéines (50%) est observée et les glucides sont minoritaires (15%). La part majoritaire des protéines dans des cultures en continu d'*Isochrysis aff. galbana* a été démontrée (FICHEZ, 2000). Par contre, nos résultats font état d'une part plus importante de lipides (35 % vs 10-15 %) pour un même taux de renouvellement. Des conditions de culture non similaires, ainsi que l'origine différente des souches (*T. iso* CCAP vs *T. iso* Argenton) pourraient expliquer ces différences.

5.2.4. Suivi bactériologique

Sur un plan quantitatif, seuls les suivis réalisés sur les cultures à 20 % sont interprétables. Les autres résultats peuvent uniquement confirmer l'ordre de grandeur de la concentration bactérienne initiale 10⁶-10⁷ UFC.ml⁻¹. La culture 20 % A présente une concentration bactérienne qui se stabilise dès le premier mois. A l'inverse, la culture 20 % B ne semble se stabiliser qu'à partir du 50^e jour.

Sur le plan qualitatif, l'interprétation des résultats est plus délicate. Les critères de caractérisation retenus sont en effet très subjectifs et l'on peut uniquement noter que dans toutes les cultures, les populations bactériennes sont très diversifiées et que certaines populations bactériennes sont dominantes.

Quel que soit le taux de renouvellement, la concentration bactérienne n'est pas stable au cours du temps. Or, aucune bactérie n'est décelée à la sortie du pasteurisateur. Cette contamination pourrait avoir comme origine la souche elle-même mais celle-ci était axénique. La seule explication possible est donc une contamination dans les enceintes qui ne présentent pas un isolement suffisant vis à vis du milieu environnant.

Une plus grande prophylaxie pourrait être mise en place, comme un nettoyage régulier à la vapeur des tuyaux de récolte et/ou une stérilisation partielle du circuit pasteurisateur/enceinte par javellisation.

5.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de *Crassostrea gigas*

Une fois ingérée, donc de taille ad hoc, la valeur nutritive des microalgues dépend avant tout de leur digestibilité (ROBERT et TRINTIGNAC, 1997).

Certaines microalgues peuvent être ingérées par les larves mais non digérées (EPIFANIO *et al*, 1981; ROBERT, 1998). La digestibilité d'une microalgue dépend à la fois de la nature et de l'épaisseur de sa paroi. L'utilisation d'algues à paroi fine et non complexe pour la nutrition des stades larvaires chez les bivalves, et notamment *Isochrysis aff. galbana* et *Pavlova lutheri* est préconisée. Les diatomées à thèque siliceuse sont moins digestes que d'autres microalgues à simple paroi organique. La diatomée *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* a une thèque fine qui permet son assimilation.

L'étude du broutage montre effectivement une ingestion de ces trois microalgues en régime monospécifique. De plus, toutes les larves se sont développées, ce qui confirme leur digestibilité, résultats préalablement acquis pour deux d'entre elles en microscopie à épifluorescence sur l'huître (ROBERT *et al*, 1989) ou la coquille St Jacques (LE PENNEC et RANGEL-DAVALOS, 1985).

5.3.1. Croissance larvaire

L'influence de la nutrition sur la croissance larvaire est significative dès la première semaine.

Les capacités de croissance des larves à jeun sont limitées par des faibles réserves nutritionnelles dont disposent les larves de *Crassostrea gigas*, par rapport à la coquille St Jacques, la moule ou la palourde: les réserves sont moindres et le passage à l'exotrophie se fait donc plus rapidement, au bout de 3 à 4 jours (ROBERT et TRINTIGNAC, 1997). Les taux de croissance des larves à jeun sont compris entre $1,24 \mu\text{m.j}^{-1}$ au 9^e jour et $0,65 \mu\text{m.j}^{-1}$ au 16^e jour. De précédentes études ont également montré des taux de croissance très faibles pour les larves à jeun, compris entre $0,14$ et $0,77 \mu\text{m.j}^{-1}$ au 14^e jour (tab. 6).

Jour	Années	Jeun		<i>P. lutheri</i>		<i>C. pumilum</i>		<i>I. aff. galbana</i>	
		Tx croissance	Mortalité	Tx croissance	Mortalité	Tx croissance	Mortalité	Tx croissance	Mortalité
14	1998					6,16	15	6,8	85
	1999			1,6	44	9,42	17		
	1999	0,17	59	0,92	32	6,11	14		
	1999	0,27	26	3,9	57	7,3	19		
	1999	0,14	28	1,72	20	4,57	5		
	1999			1,77	30	4,45	19		
	1999			3,63	68	6,2	20	3,94	53
	2002	0,77	21	0,77	42	6,44	8	6,24	4
24	1999			7,13	5	11,2	9		

Tableau 6 : Taux de croissance journalier ($\mu\text{m.j}^{-1}$) et mortalité (%) de larves de *Crassostrea gigas* alimentées sur différents régimes monospécifiques ou maintenues à jeun, obtenus lors de précédentes études (BROWN et ROBERT, 2002; DENIZOT, 2002; PONIS, 2002.).

Les régimes *C. pum*, PC, TC et PTC présentent les meilleurs taux de croissance au 9^e jour d'élevage compris entre $6,6$ et $8,5 \mu\text{m.j}^{-1}$. Des taux de croissance de $3,97 \mu\text{m.j}^{-1}$ pour PT et de $5,56 \mu\text{m.j}^{-1}$ pour T. iso sont enregistrés. Le régime *P. lutheri* présente le taux de croissance le plus faible ($1,06 \mu\text{m.j}^{-1}$), voire même inférieur à celui des larves à jeun ($1,24 \mu\text{m.j}^{-1}$).

Au 16^e jour, le même classement est obtenu à l'exception du régime PT qui devient supérieur à celui obtenu avec T. iso (7,15 vs 5,46). *P. lutheri* conduit toujours à un taux de croissance larvaire faible (3,09 $\mu\text{m.j}^{-1}$) et *C. pum* permet d'obtenir un fort taux de croissance (7,6 $\mu\text{m.j}^{-1}$). Ces résultats sont compatibles avec des travaux antérieurs menés dans un environnement d'élevage similaire (tab. 6) rapportant pour le 14^e jour d'élevage des taux de croissance compris entre 0,77 et 3,90 $\mu\text{m.j}^{-1}$ pour *P. lutheri* et entre 3,94 et 6,80 $\mu\text{m.j}^{-1}$ pour T. iso (BROWN et ROBERT, 2002; DENIZOT, 2002) et entre 4,45 à 9,42 $\mu\text{m.j}^{-1}$ pour *C. pum* (DENIZOT, 2002; PONIS 2002).

Au 21^e jour, ce classement reste inchangé à celui obtenu au 9^e jour. Des taux de croissance élevés sont obtenus avec les régimes *C. pum*, TC, PC et PTC (9,90 à 11,07 $\mu\text{m.j}^{-1}$). En régime monospécifique, *P. lutheri* génère toujours le taux de croissance larvaire le plus médiocre (4,11 $\mu\text{m.j}^{-1}$) et T. iso une croissance intermédiaire (8,20 $\mu\text{m.j}^{-1}$).

Le régime *C. pum* semble à lui seul assurer une croissance larvaire de 85 à 97 % de celle obtenues avec le régime PTC. A l'inverse, il est à noter que les régimes incluant *P. lutheri* comparativement à ces mêmes régimes ne l'incluant pas (*C. pum* et PC, TC et PTC) ont des taux de croissance quasi similaire en fin d'expérience. *P. lutheri* a une valeur alimentaire qui ne permet pas d'obtenir une croissance satisfaisante durant les trois premières semaines d'élevage. Cependant, une étude préalable (tab.6) avait consisté à alimenter les larves jusqu'au 15^e jour avec un régime PTC puis ultérieurement avec les seules *P. lutheri* ou *C. pum* jusqu'au 24^e jour (PONIS, 2002). Des taux de croissance larvaire entre J24 et J15 de 7,13 et de 11,2 $\mu\text{m.j}^{-1}$ ont respectivement été obtenus pour *P. lutheri* et *C. pum*. *P. lutheri* présenterait alors un intérêt exclusivement pour la croissance des larves umbonées.

Des résultats similaires ont été trouvés dans une expérience parallèlement menée à notre principal travail. Les larves ont été nourries jusqu'au 10^e jour avec le régime PTC, mises à jeun une journée et alimentées jusqu'au 21^e jour avec *P. lutheri* ou *P. lutheri* + *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*. Des taux de 6,04 et 8,13 $\mu\text{m.j}^{-1}$ ont alors été enregistrés.

Une étude réalisée sur *Pecten maximus* a montré que les régimes monospécifiques *P. lutheri* et *I. aff. galbana* présentaient respectivement une croissance de 4,5 et 4,4 $\mu\text{m.j}^{-1}$ (DELAUNAY *et al.*, 1993) alors que *Chaetoceros calcitrans* présentait un taux de croissance de 6,5 $\mu\text{m.j}^{-1}$. Pour les larves de *P. maximus*, la valeur alimentaire de *P. lutheri* serait semblable à celle de T. iso. En revanche, *Chaetoceros calcitrans* ou *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* conduit à des taux de croissance élevés que ce soit pour les larves de *C. gigas* ou de *P. maximus*. Ces diatomées assurent l'essentiel de la croissance chez *Crassostrea gigas*, un complément alimentaire par T. iso étant nécessaire pour l'obtention d'une meilleure homogénéité des croissances.

5.3.2. Rendement et mortalité larvaire

Les régimes plurispécifiques PC, TC et PTC conduisent à des rendements larvaires (70 à 75 %) très supérieurs à ceux obtenus avec les autres régimes (< 42 %). Il en est de même pour la mortalité. Les régimes PC, TC et PTC provoquent des mortalités larvaires très inférieures (<5 %) à celles obtenues avec les autres combinaisons. Au 16^e jour, la mortalité est élevée pour les élevages alimentés avec la seule *I. aff. galbana* (44 %), moyenne *P. lutheri* (33 %) et relativement faible avec *C. pumilum* (18 %). Des résultats similaires ont été rapportés lors de précédents travaux avec 50 % pour *I. aff. galbana*, 42 % pour *P. lutheri* et 15 % pour *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (tab. 6). La présence de cette diatomée dans les régimes alimentaires favorise la survie des larves et donc le rendement d'élevage larvaire.

5.3.3. Consommation

En première semaine, les larves alimentées par les régimes constitués exclusivement de flagellés (T. iso, *P. lutheri* et PT) présentent une consommation stable et faible (9 000 cellules.ml⁻¹). A l'inverse, le régime monospécifique *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* conduit à une consommation élevée comprise entre 15 000 à 48 000 cellules.ml⁻¹ entre le 2^e et le 7^e jour.

Les régimes plurispécifiques incluant cette diatomée se traduisent par une consommation qui augmente progressivement (1 000 à 33 000 cellules.ml⁻¹).

En conséquence, les larves semblent avoir une consommation préférentielle pour le régime monospécifique *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* au cours de la première semaine.

En deuxième semaine, les larves alimentées par les régimes *P. lutheri*, T. iso et PT présentent des comportements différents entre les duplicats. Ceci peut s'expliquer par des taux de mortalité très différents entre les bacs, relevés entre le 9^e et 16^e jour.

Une augmentation progressive de la consommation est enregistrée pour les régimes plurispécifiques incluant *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*. Cependant, une chute de leur consommation est notée le 8^e jour, correspondant à un déficit très probable d'alimentation. Il en est de même au 14^e jour pour les régimes TC et PTC.

Les régimes incluant *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* sont préférentiellement ingérés en fin d'expérience, notamment TC et PTC.

De plus, les larves nourries avec les régimes TC et PTC présentent un comportement similaire. L'exclusion de *P. lutheri* du régime PTC n'entraîne donc aucune modification de la consommation. A l'inverse de ce qui est rapporté par GERDES (1983) nous n'avons pas pu mettre clairement en évidence une augmentation de l'ingestion en fonction du type de régime, mono ou plurispécifique. En effet, l'ingestion dépend essentiellement du type d'assemblage opéré.

Actuellement le paramètre biochimique le plus fiable pour caractériser les différences de qualité nutritionnelle est la teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI à 20 et 22 atomes de carbone et plus de trois double liaisons) dans les algues fourrage. Ces acides gras sont essentiels pour la survie, la croissance et la métamorphose. Chez *P. lutheri* le 22:6 n-3 est présent et absent chez *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*.

Or, les larves alimentées avec des régimes composés de *P. lutheri* présentent des performances inférieures voire similaires (pour PTC et TC) aux autres régimes. De plus, en régime monospécifique, elle conduit à des performances larvaires nettement inférieures. A l'inverse, les larves alimentées avec des régimes composés de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* présentent des performances supérieures aux autres régimes. Dans le cas de cette étude, la composition en AGPI ne permet pas d'expliquer les médiocres performances de *P. lutheri* pour *Crassostrea gigas*.

Cette étude a montré que l'apport de *P. lutheri* dans les régimes alimentaires n'a pas d'influence bénéfique, ni sur la croissance, ni sur la consommation phytoplanctonique chez des jeunes larves de *C. gigas*. Elle présente un relatif intérêt pour des larves umbonées sur le plan de la croissance et il serait intéressant de vérifier si cette microalgue peut avoir un rôle bénéfique pour la métamorphose. Si tel était le cas, elle pourrait être apportée aux élevages de *C. gigas* en complément du régime PC à partir du stade umboné (10^e -12^e jour à 25 °C. Sinon,

il n'y a aucun intérêt à la cultiver en écloserie pour la production de l'huître japonaise. A l'inverse, l'apport de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* dans les régimes alimentaires entraîne une augmentation des performances larvaires tant sur le plan de la croissance, de la mortalité, du rendement larvaire, que de la consommation phytoplanctonique. De plus, en régime monospécifique, les larves se nourrissent préférentiellement de cette diatomée dès le premier jour d'alimentation.

Le régime monospécifique *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* permet une croissance larvaire quasi similaire à celle obtenue avec des régimes plurispécifiques. Cependant, une moindre mortalité est observée lorsque cette diatomée est associée à *T. iso* (TC) ou à *P. lutheri* (PC). De ce fait pour l'obtention de meilleurs rendements globaux d'élevage, il est nécessaire de l'associer à des flagellés. Cette diatomée joue un rôle fondamental dans le développement larvaire de *Crassostrea gigas* et il serait maintenant intéressant de savoir dans quelle proportion celle-ci doit être apportée en régime bispécifique (TC) pour optimiser les performances larvaires. En effet cette combinaison permet d'obtenir de fortes croissances et taux de survie équivalent à ceux obtenus avec les mélange PTC.

6. Conclusion

La caractérisation a permis d'établir le profil de croissance de six microalgues fourrage, d'en déterminer la taille et d'en apprécier son évolution au cours des différentes phases de croissance. La détermination des microalgues les plus adaptées à la production en masse dans notre contexte de production et la sélection des espèces sur le critère taille pour la nutrition des larves de mollusques ont ainsi été opérées au cours de cette première partie.

Au cours de la deuxième partie de ce travail, le suivi de quatre cultures en continu a permis de démontrer que 20 % était le taux de renouvellement le plus approprié pour *I. aff. galbana*. Il a pu être confirmé que sa composition biochimique est stable au cours du temps, les protéines restant majoritaires. A l'inverse, la stabilité des concentrations bactériennes n'a pas été montrée. Des améliorations prophylactiques doivent donc être apportées.

La troisième partie consacrée à l'étude de la valeur alimentaire de trois microalgues fourrage apportées selon différentes combinaisons, a permis de dégager que l'apport de *P. lutheri* dans les différents régimes n'améliorait pas les performances de développement des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. En revanche, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* est absolument nécessaire pour la croissance larvaire. En conséquence, le régime bispécifique TC suffirait pour assurer efficacement le développement larvaire de l'huître japonaise.

7. Bibliographie

BROWN M. & ROBERT R., 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, n° 207 : 289-309.

CHRETINNOT-DINET M.-J., BILLARD C. & SOURNIA A., 1990. Atlas du phytoplancton marin. *Ed. CNRS*, Vol.3, pp 85.

DELAUNEY 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 173: 163-179.

DENIZOT A., 2002. Impact de la « qualité » nutritionnelle de trois microalgues fourrage sur le développement larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Rapport de maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention milieu marin, Institut Universitaire Européen de la Mer*, 17 p.

FICHEZ M., 2000. Mise au point d'un pilote de production en continu de microalgues fourrage. *Rapport de DTSM, CNAN INTECHMER*, pp 36.

GERDES D., 1983. The pacific oyster *Crassostrea gigas*. Part I. Feeding behaviour of larvae and adults. *Aquaculture*, 31: 195-219.

LE PENNEC M. & RANGEL-DAVALOS C., 1985. Observation en microscopie à épifluorescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez des jeunes larves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia). *Aquaculture*, 47: 39-51.

LOUSSOUARN M., 2002. Participation au programme « caractérisation des microalgues fourrage ». *Rapport de maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention milieu marin, Institut Universitaire Européen de la Mer*, 19 p.

NICOLAS L., 1999. Étude sur la métamorphose et le développement post-larvaire de la coquille *St Jacques*, *Pecten maximus*, en éclosion. Éléments de comparaison avec l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, l'Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 224 p.

PONIS E., 2002. Produzione conservazione di microalghe concentrate: determinazione del loro valore nutrizionale su larve e giovanile di *Crassostrea gigas*. *Thèse de doctorat, université de Florence*, 145p.

ROBERT R., MINER P., MAZURET M. & CONNAN J.-P., 1994. L'éclosion expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspective. *Equinoxe*, 49 : 20-33.

ROBERT R., NOEL T. & GALOIS R., 1989. The food value five unicellular diatomss to the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg.. In *Aquaculture Europe 89*, E.A.S., Bordeaux, Special Publication n°10 : 215-216.

ROBERT R. & TRINTIGNAC P., 1997. Microalgues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques. Société Française de Malacologie. *Haliotis*, 26 : 1-13.

SOUDAR C., 1999. Mise au point d'un système de production en continu de microalgues fourrage destinées à l'alimentation de larves d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Rapport de stage, I.U.T Génie Biologique, Lyon*, 32 p.

8. Annexes

- 1 Solution de Conway
- 2 Cellule de Malassez
- 3 Le compteur de particule
- 4 Dosage des protéines totales
- 5 Dosage des glucides
- 6 Dosage des lipides
- 7 Microbiologie
- 8 Modélisation des courbes de croissance
- 9 Caractérisation : Tailles moyennes
- 10 Anova caractérisation
- 11 Anova continu
- 12 Paramètres de continu
- 13 Taille larvaire
- 14 Mortalité larvaire
- 15 Rendement larvaire
- 16 Grazing

Sommaire

1. INTRODUCTION.....	1
2. PRESENTATION DE L'IFREMER.....	2
3. MATERIELS ET METHODES.....	3
3.1. Caractérisation des microalgues fourrage.....	3
3.1.1. Microalgues étudiées.....	3
3.1.2. Méthode de culture.....	4
3.1.2.1. Inoculum.....	4
3.1.2.2. Ensemencement.....	4
3.1.2.3. Conditions de cultures.....	4
3.1.3. Suivi des cultures.....	4
3.1.3.1. Croissance.....	4
3.1.3.2. Taille.....	5
3.1.3.3. Paramètres physico-chimiques.....	5
3.2. Suivi d'un système de culture en continu.....	5
3.2.1. Choix de l'espèce algale.....	5
3.2.2. Principe de la culture en continu ou chemostat.....	6
3.2.3. Dispositif d'un système de production en continu.....	7
3.2.3.1. Installation.....	7
3.2.3.2. Enceintes de culture.....	7
3.2.3.3. Conditions de culture.....	8
3.2.4. Protocole d'ensemencement.....	8
3.2.4.1. Nettoyage du pasteurisateur.....	8
3.2.4.2. Nettoyage des cylindres de culture.....	8
3.2.4.3. Ensemencement des cylindres.....	8
3.2.5. Suivis des cultures.....	9
3.2.5.1. Paramètres physico-chimiques.....	9
3.2.5.2. Concentration algale et taille.....	9
3.2.5.3. Suivi des protéines, lipides et glucides.....	9
3.2.5.4. Suivis bactériologiques.....	10
3.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de <i>Crassostrea gigas</i>	11
3.3.1. Culture des microalgues étudiées.....	11
3.3.1.1. Présentation des microalgues.....	11
3.3.1.2. Méthode de culture.....	11
3.3.2. Origine des larves.....	12
3.3.2.1. La maturation des géniteurs.....	12
3.3.2.2. La ponte.....	12
3.3.2.3. La fécondation.....	12
3.3.3. Élevage larvaire.....	13
3.3.3.1. Protocole expérimental.....	13
3.3.3.2. Paramètres suivis au cours de l'expérience.....	13
3.3.3.2.1. Taille larvaire.....	13
3.3.3.2.2. Taux de croissance.....	14
3.3.3.2.3. Mortalité larvaire.....	14
3.3.3.2.4. Grazing.....	14
4. RESULTATS.....	15
4.1. Caractérisation des microalgues fourrage.....	15
4.1.1. Courbes de croissance.....	15

4.1.2. Évolution de la taille moyenne au cours du temps.....	18
4.1.3. Taille moyenne des souches.	20
4.2. Culture en continu.....	22
4.2.1. Évolution des concentrations cellulaires.....	22
4.2.2. Évolution de la taille moyenne au cours du temps.....	23
4.2.3. Suivi de la composition biochimique proximale.	24
4.2.4. Suivi des populations bactériennes.....	25
4.2.4.1. Aspect quantitatif.....	25
4.2.4.2. Aspect qualitatif.....	26
4.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de <i>Crassostrea gigas</i>	27
4.3.1. Croissance larvaire.....	27
4.3.2. Mortalité larvaire.....	28
4.3.3. Rendement larvaire.....	30
4.3.4. Consommation phytoplanctonique.....	31
5. DISCUSSION	35
5.1. Caractérisation des microalgues fourrage.....	35
5.1.1. Croissance.....	35
5.1.2. Taille.....	36
5.2. Culture en continu.....	36
5.2.1. Concentration cellulaire.....	36
5.2.2. Taille moyenne.....	37
5.2.3. Suivi biochimique.....	37
5.2.4. Suivi bactériologique.....	37
5.3. Valeur alimentaire de microalgues fourrage pour le développement larvaire de <i>Crassostrea gigas</i>	38
5.3.1. Croissance larvaire.....	38
5.3.2. Rendement et mortalité larvaire.....	39
5.3.3. Consommation.....	40
6. CONCLUSION.	42
7. BIBLIOGRAPHIE.	43
8. ANNEXES.	44