

DES de Biologie

Année 2001 – 2002

Estimation du flux de carbone des protozoaires vers les huîtres: mise au point d'une méthodologie basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif



présenté par **Benoit Ringot**

Responsable scientifique : **Christine Dupuy (LBEM La Rochelle)**

En collaboration avec **Pierre Garen (CREMA L'Houmeau)** et

Stéphane Pouvreau (IFREMER Argenton)



Préambule et Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Pierre Chardy, professeur à l'université de Bordeaux 1 et directeur du Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon (LOB), d'avoir accepté d'être mon tuteur de DES de biologie.

Je tiens à remercier très particulièrement Christine Dupuy (The Famous Coach), qui m'a guidé avec beaucoup de patience dans mon travail et qui m'a toujours soutenu.

Cette étude m'a permis de travailler dans trois laboratoires :

- Merci à Gérard Blanchard pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biologie et Environnements Marins (LBEM) de La Rochelle et pour m'avoir initié au maniement de la radioactivité. Je tiens également à remercier Armelle Combaud et Christine Trichet pour leur aide plus que précieuse au sein de l'université de La Rochelle.

- Merci à Jean Claude Cochard pour m'avoir accueilli au sein de l'écloserie expérimentale IFREMER d'Argenton. Un grand merci à Stéphane Pouvreau, à l'origine de mon escale en Bretagne, pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

- Je remercie également Patrick Gentien pour m'avoir accepté au sein du Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture (CREMA) de L'Houmeau. Je remercie particulièrement Pierre Garen pour la mise au point du circuit expérimental fermé et pour ses conseils, Didier Leguay pour son inventivité et sa bonne humeur, Daniel Delmas pour ses conseils et pour m'avoir prêté le matériel nécessaire aux mesures de radioactivité, Alain Herbland pour sa disponibilité et ses réflexions toujours très précieuses. Un grand merci à Martine Bréret pour sa disponibilité et sa gentillesse. Enfin, je tiens à remercier Annick Derrien pour les analyses au turbidimètre, Anne Gaëlle Haubois pour ses conseils radioactifs, Françoise Laguardère et Pascal Laffargue pour leurs huîtres, sans oublier Monsieur Marcel Guillot le grand responsable du marais expérimental « du plomb ».

Enfin, j'adresse mes remerciements à mes différents colocataires, à mes amis et à ma famille.

Sommaire

Introduction	1
Matériel et méthodes	3
1- Le choix du protozoaire	3
2- Préparation du protozoaire cilié <i>Uronema marinum</i>	3
3- Etude des taux d'ingestion et d'absorption du protozoaire <i>Uronema marinum</i> par l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	4
1- Terminologie	4
2- Mesure des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par l'analyse des paramètres écophysologiques de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	5
1- Le circuit de mesure des paramètres écophysologiques	5
2- Les paramètres écophysologiques mesurés	6
A- La mesure de la turbidité	7
B- La mesure de la fluorescence	7
C- La mesure au compteur Coulter	8
3- Protocole expérimental	8
3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> par un marquage radioactif des protozoaires ciliés	9
1- Le choix du marqueur radioactif	9
2- Les mesures	9
3- Le circuit expérimental fermé	10
3- Manipulations préparatoires	11
A- Estimation de la concentration en thymidine tritiée nécessaire au marquage des protozoaires et estimation du temps d'incubation	11
B- Estimation de l'importance du marquage à la thymidine tritiée du compartiment bactérien et des agrégats	12
C- Tests du circuit expérimental fermé	14
3- Protocole général	14
Résultats	16
1- Séparation des protozoaires du milieu de culture et de marquage	16
2- Mesure des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par l'analyse des paramètres écophysologiques de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> .	17
1- Mesure de la quantité de protozoaires à la sortie des microcosmes : résultats des tests	17
Mesure de la quantité de protozoaires <i>Uronema</i> par turbidimétrie	17
Mesure de la quantité de protozoaires <i>Uronema</i> par fluorimétrie	17
Mesure de la quantité de protozoaires <i>Uronema</i> au compteur Coulter	19
2- Les pompes du circuit de mesure des paramètres écophysologiques	19
3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> par un marquage radioactif des protozoaires	20
1- Le circuit expérimental fermé	20
a- Homogénéité du bac tampon	20
b- Répartition des protozoaires dans le circuit	20
2- Temps d'incubation et concentration en thymidine tritiée	21
3- Importance du marquage à la thymidine tritiée du compartiment bactérien et des agrégats	22
a- L'effet de la filtration sur 20 µm :	22
b- Le marquage des bactéries du milieu de culture:	23
Discussion	24
1- Séparation de la culture de protozoaires <i>Uronema marinum</i> de leur milieu de culture et de marquage.	24
2- Mesures des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par mesure des paramètres écophysologiques de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> .	24

3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître <i>Crassostrea Gigas</i> sur les protozoaires <i>Uronema marinum</i>, par marquage à la thymidine tritiée	25
1- Le circuit expérimental fermé	25
2- Le marquage des protozoaires	26
a- Estimation de la concentration en thymidine tritiée nécessaire au marquage des protozoaires et estimation du temps d'incubation	26
b- Analyse du marquage des protozoaires	26
c- Les problèmes de marquage	26
1- Les agrégats	26
2- Les bactéries	27
3- Ingestion des protozoaires	27
Bilan	27
Perspectives	28
1- Mesures des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par mesure des paramètres écophysiologiques de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	28
2- Mesures du taux d'ingestion de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> sur les protozoaires <i>Uronema marinum</i>, par marquage à la thymidine tritiée	28
A- Le marquage radioactif	28
B- Homogénéité de la répartition des protozoaires dans le circuit	28
C- Mesure du taux d'absorption	29
3- Traitement de la souche de protozoaires avec des antibiotiques	29
4- Méthode de détection in situ	29
Références Bibliographiques	30
Annexe 1	32
Annexe 2	33

Introduction

Sur les cotes atlantiques françaises et plus particulièrement dans le bassin de Marennes-Oléron, la conchyliculture représente une activité économique de première importance. La Charente maritime est la première zone ostréicole en Europe (stock : 125 420 tonnes). Une part importante de la production d'huîtres *Crassostrea gigas* est cultivée sur l'estran vaseux, sur les grandes vasières intertidales des pertuis (4 800 ha) et dans les marais maritimes semi-clos, les claires ostréicoles (3 000 ha).

L'huître tire ses ressources énergétiques de l'eau de mer qu'elle filtre : elle capte au niveau de la branchie des particules organiques en suspension. Ces particules mesurent de 5 à 100 μm (Barillé *et al.*, 1993) et la rétention optimale s'exerce sur les particules de 8 à 20 μm (Héral, 1987). La croissance comme la reproduction de *Crassostrea gigas* dépendent de la valeur nutritive des éléments qu'elle retient (Bayne & Newell, 1983 ; Berg & Newell, 1986). L'importance du phytoplancton dans la nutrition de l'huître est bien connue (Héral, 1987 ; Pastoureaud *et al.*, 1996). Ainsi, une grande majorité des expériences de rétention de matériel sestonique par l'huître se font avec un mélange d'algues et de silts (Barillé *et al.*, 1993 ; Barillé *et al.*, 1997, Ren *et al.*, 2000). D'autres auteurs utilisent des prélèvements de seston naturel mais ne mesurent que la quantité de Chlorophylle *a* (Newell & Jordan, 1983 ; Prins *et al.*, 1996 ; Smaal & Haas, 1997). Paradoxalement, la production phytoplanctonique des écosystèmes ostréicoles du bassin de Marennes-Oléron est relativement faible et ne suffit pas à équilibrer la demande des huîtres (Héral, 1987).

Les grandes vasières sont le siège d'importantes productions benthiques autotrophes (microphytobenthos) et de faibles productions phytoplanctoniques limitées par la turbidité de l'eau (Ravail-Legrand *et al.*, 1993). Il est largement admis que la principale ressource énergétique des huîtres est le microphytobenthos lorsqu'il est remis en suspension par les courants de flux et de jusant (Blanchard, 1997).

Dans les claires ostréicoles, les conditions environnementales ne permettent pas le développement du phytoplancton. En effet, le confinement des bassins en période de mortes eaux provoque un épuisement rapide des nutriments (Zanette, 1980). Néanmoins, la biomasse de microphytobenthos des claires peut atteindre jusqu'à 25 fois celle du phytoplancton dans la colonne d'eau (Zanette, 1980 ; Robert, 1983), mais elle ne représente pas directement une ressource importante pour les

huîtres, car la remise en suspension y est faible, du fait du manque de turbulence de l'eau (Blanchard, 1997). Les claires sont aussi le siège d'une forte production bactérienne, qui est susceptible d'être transférée vers des niveaux trophiques supérieurs comme les protistes hétérotrophes et mixotrophes (nanoflagellés) (Dupuy *et al.*, 1999) très présents dans cet écosystème. Les bactéries sont trop petites pour être retenues par le filtre branchial de l'huître (Deslous-Paoli *et al.*, 1987), mais sont broutées par les protozoaires (Ohman & Snyder, 1991). Les protistes hétérotrophes et mixotrophes, du fait de leur taille (4 à 72 μm), n'échappent pas à la prédation des huîtres (Barillé *et al.*, 1993 ; Dupuy *et al.*, 1999). Ils servent de relais trophique entre les bactéries et l'huître.

L'ingestion des protozoaires par l'huître a été montrée de manière qualitative (Le Gall *et al.*, 1997) et de manière quantitative dans un système statique (Dupuy *et al.*, 1999). Le taux d'ingestion trouvé était de $126 \mu\text{g C h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de poids sec, ce qui représente un apport 4 fois plus important que le phytoplancton dans les mêmes conditions expérimentales ($27,5 \mu\text{g C h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de poids sec, Fiala-Medioni *et al.*, 1983).

En système statique la filtration de l'huître fait diminuer la concentration en phytoplancton. Or, le débit de filtration de l'huître varie en fonction de la concentration en phytoplancton (Barillé *et al.*, 1993 ; Hawkins *et al.*, 1998). Les systèmes dynamiques permettent de travailler à concentration constante (Riisgard, 2001). Des mesures sur de l'eau de mer côtière en système dynamique avec *Crassostrea gigas* donnaient en septembre 2001 des mesures d'ingestion de $1,495 \text{ mg MO h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de poids sec d'huître (Garen, com.pers.).

L'objectif de ce travail consiste à élaborer une ou plusieurs méthodes permettant d'obtenir les taux d'ingestion et d'absorption des protozoaires par l'huître *Crassostrea gigas* dans un système dynamique de circulation d'eau en flux laminaire. Nous travaillerons également sur l'espérance de croissance (SFG) de l'huître *Crassostrea gigas* nourrie par un flux continu de protozoaires.

Deux méthodes ont été étudiées en parallèle :

-la première méthode est basée sur la mesure de paramètres écophysologiques classiques permettant de savoir ce que l'huître a ingéré (Anonymes, 1984 ; Le Gall & Raillard, 1988 ; Barillé *et al.*, 1993, Ren *et al.*, 2000 ; Riisgard, 2001).

-la seconde méthode consiste en l'utilisation de protozoaires marqués radioactivement (Zubkov & Sleigh, 1995). Le marquage permet de quantifier la part

de protozoaires ingérés et absorbés par l'huître. Cette méthode est tirée des expériences de Kreeger & Newell (1996) sur l'ingestion de flagellés hétérotrophes et de bactéries marquées au carbone 14 par *Geukensia demissa* et *Mytilus edulis*.

Matériel et méthodes

1- Le choix du protozoaire

Les protistes sont des micro-organismes unicellulaires autotrophes, hétérotrophes ou mixotrophes. Le protiste hétérotrophe choisi est un cilié bactéricivore de forme ovale, mesurant 20 µm de long et 10 µm de large: *Uronema marinum*. Ce cilié a été choisi pour sa vitesse de croissance rapide (temps de génération de 4h (Dupuy, 1999)) et pour son abondance élevée en fin de phase exponentielle (Ohman et Snyder, 1991). En comparaison, d'autres ciliés sont bien moins performants, c'est le cas de *Strombidium* sp., dont l'abondance est 100 fois inférieure à celle d'*Uronema* sp. en fin de phase exponentielle (Ohman et Snyder, 1991).

La souche d'*Uronema marinum* a été isolée à partir des claires ostréicoles expérimentales du CREMA L'Houmeau (Charente Maritime) et maintenue sur un milieu FAG (annexe 1), où se développe un consortium de bactéries. Pour que la culture se développe de manière optimale, elle doit être mise à l'obscurité, à 20°C, sans bullage. Ce milieu de culture permet d'aboutir à $4,5 \times 10^5$ *Uronema* mL⁻¹.

2- Préparation du protozoaire cilié *Uronema marinum*

Afin d'obtenir une culture propre de ciliés *Uronema marinum*, deux techniques ont été testées :

- Un tamisage sur un nylon de vide de maille de 5 µm : le nylon est placé dans un bac rempli d'eau de mer en mouvement. Le volume de culture à filtrer est versé dans le nylon toujours dans l'eau. Le nylon doit retenir les ciliés et laisser passer le milieu de culture (FAG) et les bactéries.
- Une centrifugation : le milieu est d'abord filtré sur un nylon de vide de maille de 20 µm afin d'éliminer les films et amas bactériens. La culture est ensuite placée dans la glace pilée pendant 15 min afin de ralentir les protozoaires. Puis elle

est centrifugée à 1000 g pendant 15 min à 4°C (Ohman & Snyder, 1991). Le culot est récupéré et resuspendu dans de l'eau de mer filtrée stérile.

3- Etude des taux d'ingestion et d'absorption du protozoaire *Uronema marinum* par l'huître *Crassostrea gigas*

1- Terminologie

La consommation, en terme de flux d'énergie entre le milieu et l'animal, c'est ce que l'alimentation d'un animal fait disparaître du milieu où il vit. Plus précisément, il s'agit de la quantité de particules retenues par le filtre branchial de l'animal par unité de temps.

La nourriture ingérée (I) est la part qui pénètre dans l'œsophage , c'est à dire la nourriture retenue moins les pseudofèces (PF) lorsqu'ils existent (Anonymes, 1984).

$$I = FR - PF$$

I = ingestion (mg C d⁻¹ ind⁻¹)

FR = consommation (mg C d⁻¹ ind⁻¹)

PF = pseudofèces (mg C d⁻¹ ind⁻¹)

La nourriture absorbée (A) est au sens strict la fraction de la nourriture traversant la paroi du tube digestif vers le milieu intérieur. Elle correspond à la nourriture ingérée moins les rejets (féces (F)) (Anonymes, 1984).

$$A = FR - (PF + F)$$

A = absorption (mg C d⁻¹ ind⁻¹)

F = féces (mg C d⁻¹ ind⁻¹)

Le "scope for growth" (SFG) se définit comme la matière disponible pour la croissance. Le SFG est une valeur supplémentaire, qui nous informe sur l'état physiologique de l'animal. Il se calcule par la différence entre l'absorption et la respiration (R) (Bayne et Newell, 1983). Si SFG est négatif, l'animal utilise ses réserves pour assurer son métabolisme de maintenance. Dès que SFG devient

positif, la matière disponible autorise la croissance et la reproduction (Pouvreau, 1999).

$$\text{SFG} = \text{FR} - (\text{PF} + \text{F} + \text{R})$$

R = respiration ($\text{mg O}_2 \text{ d}^{-1} \text{ ind}^{-1}$ converti en $\text{mg C d}^{-1} \text{ ind}^{-1}$)

Deux méthodes de mesure des taux d'ingestion et d'absorption de l'huître *Crassostrea gigas* ont été expérimentées : l'une repose sur la mesure des paramètres écophysiologicals "classiques" de l'huître et l'autre sur le marquage radioactif du protozoaire cilié.

2- Mesure des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par l'analyse des paramètres écophysiologicals de l'huître *Crassostrea gigas*

1- Le circuit de mesure des paramètres écophysiologicals

Le circuit expérimental a été mis en place par l'IFREMER Argenton et utilisé pour des mesures d'ingestion, d'absorption et du SFG de *Crassostrea gigas* sur les algues *isochrysis* sp. (Anonymes, 1984) (figure 1).

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) utilisées sont de calibre n°4 ($1,64 \pm 0,29$ g de poids sec) et ont été acclimatées dans une eau à 18°C , de salinité 36 ‰ et nourries avant l'expérience d'un mélange d'algues à raison d'un apport quotidien de 8 % de matière sèche d'algues par gramme de matière sèche d'huître. Pour chaque mesure écophysiologicals, un minimum de quatre bacs est utilisé : le premier ne contient pas d'huître (le témoin), les autres contiennent une huître. Dès que l'huître s'ouvre, les mesures commencent.

L'eau de mer utilisée (EMF) sort du vivier d'Argenton ($17,5^\circ \text{C}$) et est filtrée en continu sur une maille de $1 \mu\text{m}$. Une pompe péristaltique envoie les protozoaires marqués (et lavés) dans le circuit d'eau. Le débit d'eau dans les bacs expérimentaux contenant les huîtres est conditionné par le débit d'EMF, par la pompe injectant la culture, par les robinets contrôlant l'entrée des bacs et par le trop plein (débit supplémentaire qui permet de diluer la solution injectée aux huîtres). Les bacs sont des microcosmes clos de 1,2 L (annexe 2). L'eau s'écoule de façon laminaire afin d'éviter toute remise en suspension des biodépôts de l'huître. Ce type d'écoulement permet également à l'animal d'être constamment alimenté en un mélange d'eau et de protozoaires à concentration constante (Beiras *et al.*, 1993). Ensuite la solution sort

des bacs et arrive à l'oxymètre et aux cuves de mesures de la turbidité et de la fluorescence, par une pompe à valves.

Les mouvements créés par la pompe péristaltique et par la pompe à valves sont susceptibles de faire éclater les cellules d'*Uronema marinum*. Afin d'estimer la mortalité des protozoaires au contact des différentes pompes, des comptages sur cellules de Malassez ont été faits avant et après chaque pompe (la pompe à valve testée est deux fois plus puissante (250 L h^{-1}) que celle du circuit).

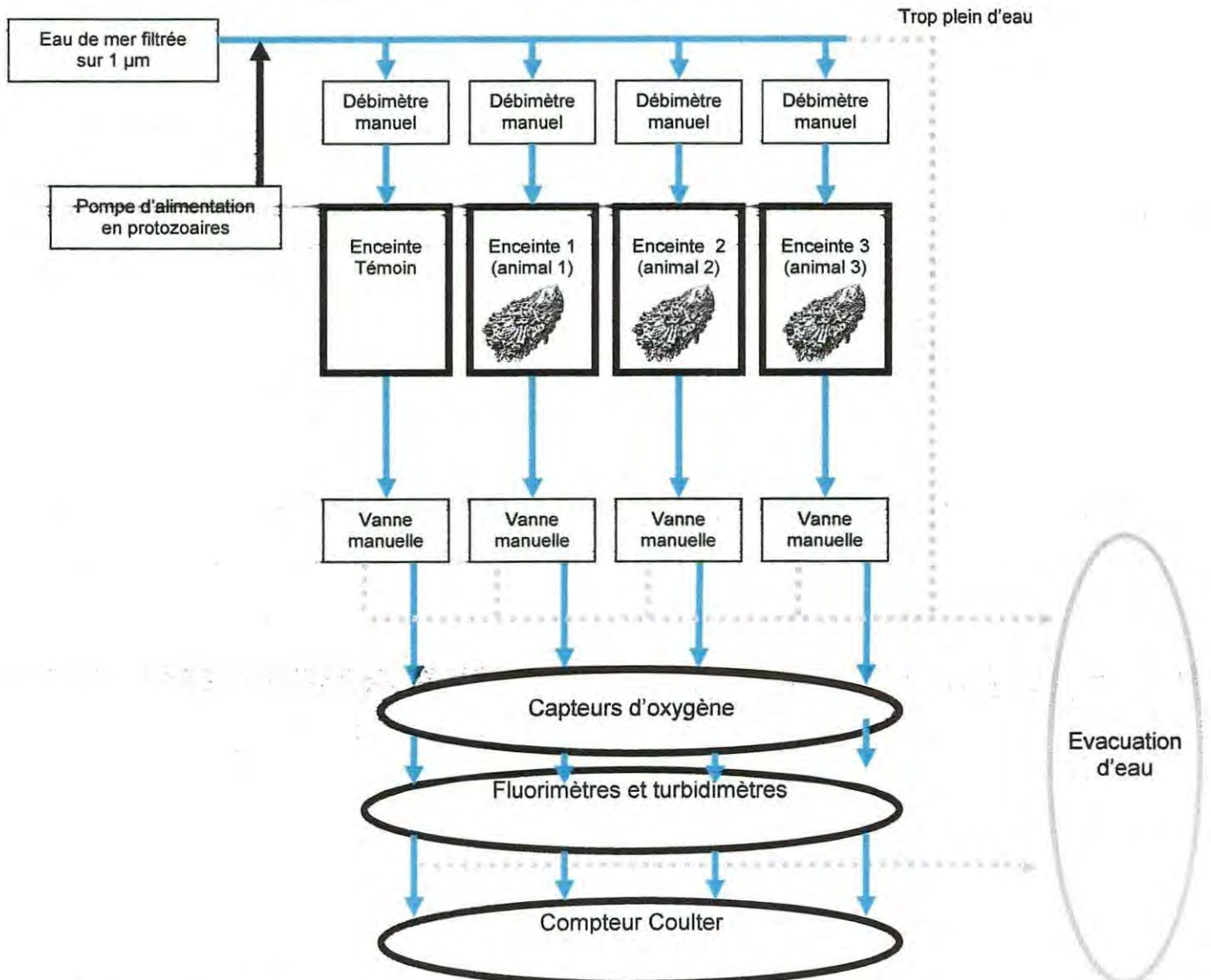


Figure 1 : Schéma du circuit expérimental de mesure des paramètres écophysologiques de l'huître (IFREMER Argenton)

2- Les paramètres écophysologiques mesurés

La respiration (R) est mesurée à l'aide d'un oxymètre placé dans le circuit. Les pseudofèces (PF) et les fèces (F) sont récupérés dans le bac à huître et leur teneur en carbone est mesurée au CHN analyser Carlo erba.

La consommation (FR) correspond à la différence entre le nombre de protozoaires dans le flux d'eau à l'entrée de l'enceinte de mesure et la concentration mesurée à sa sortie. Pour ce faire, il faut pouvoir mesurer les variations des concentrations en *Uronema* dans le circuit expérimental en temps réel.

Plusieurs techniques ont été testées (déjà utilisées pour les mesures faites avec des algues):

A- La mesure de la turbidité

Après mise en culture intensive des *Uronema*, une gamme étalon de concentrations croissantes de protozoaires est faite. Elle est d'abord testée au turbidimètre Hach Model 2100 au CREMA L'Houmeau puis testée sur le turbidimètre du circuit expérimental de l'IFREMER Argenton, aux concentrations requises.

B- La mesure de la fluorescence

Il est aisé de faire cette mesure sur des algues. En revanche les protozoaires hétérotrophes *Uronema* ne possèdent pas de pigments et ne sont donc pas fluorescents. Cependant, au moyen de colorants ou de fluorochromes, les protozoaires pourront être détectés par le fluorimètre du circuit. Ce fluorimètre émet une longueur d'onde à 470 nm et reçoit les longueurs d'ondes d'émissions des algues à 685 nm. Plusieurs substances correspondant plus ou moins bien à ces longueurs d'ondes ont été testées. Pour chacun la viabilité des protozoaires avec le marqueur, la concentration du marqueur et la durée du marquage ont été testées.

- Le DAPI se fixe sur l'ADN des cellules. La culture de protozoaires (26×10^3 cellules mL^{-1}) et le DAPI (concentration finale $2,5 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$) sont mélangés à l'obscurité pendant 30 minutes. Cette solution est homogénéisée puis placée dans la glace pilée durant 15 min. Elle est ensuite centrifugée à 1000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans de l'eau de mer filtrée stérile et à nouveau placé dans la glace avant d'être une nouvelle fois centrifugé dans les mêmes conditions et à nouveau resuspendu dans de l'eau de mer filtrée stérile.

La fluorescence a été d'abord testée sur le fluorimètre Turner 10 AU du CREMA L'Houmeau puis sur le fluorimètre du circuit expérimental de l'IFREMER Argenton.

- La fluorescéine se fixe sur les protéines cellulaires. Ce colorant (fluorescéine aqueuse à 1‰) est testé pour deux concentrations finales : $2,5 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ (comme pour le DAPI) et $5 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ avec une concentration d'*Uronema* de 26×10^3 ciliés mL^{-1} . L'incubation comme le lavage se déroulent selon le même protocole que pour le DAPI (sauf dans le cas où le colorant est à $5 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$: un lavage supplémentaire est nécessaire).

- La proflavine, se fixe sur les acides nucléiques. Elle est mélangée avec 50 ml de culture d'*Uronema marinum* (28×10^4 cellules mL^{-1}) pour une concentration finale de $8,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de proflavine (proflavine hemisulfate dihydrate (Fluka)) . Le protocole est le même que précédemment. La proflavine a été testée uniquement sur le fluorimètre Kontron SFM 25 du LBEM.

C- La mesure au compteur Coulter

Le compteur Coulter (Coulter counter TA II) permet l'énumération des cellules. Pour ce faire, il utilise les diamètres équivalents sphériques de toutes les particules en suspension dans le milieu conducteur.

Contrairement aux autres mesures, celle ci n'est pas faite en continu sur le circuit. Elle se fait à intervalles de temps réguliers en sortie de circuit et permet de contrôler les variations mises en évidences par les différentes sondes mesurant la consommation en continu (FR).

3- Protocole expérimental

Le protocole expérimental est résumé sur la figure 2. Après comptage de la souche de protozoaires *Uronema* à la cellule de Malassez ou de Nageotte (phase 1.2), un volume de culture est prélevé et mis à incuber avec un fluorochrome selon le protocole vu précédemment (phase 1.3). Puis la solution est lavée pour n'avoir plus que les protozoaires (phase 1.4). Ils sont alors resuspendus dans un volume précis pour obtenir la concentration voulue. Pour que les taux d'ingestion et d'absorption soient les plus proches de la réalité, les concentrations en protozoaires utilisées lors des expériences tendront vers celles du milieu naturel en zone côtière : 6 ciliés ml^{-1} . Le mélange eau et protozoaires est mis en circulation dans le circuit et est filtré par les huîtres (phase 3.1). Les mesures de fluorescence ou de turbidité sont converties en concentrations grâce aux valeurs du microcosme témoin ne contenant pas

d'huître. Les mesures écophysiologicals sont toutes suivies en direct sur un ordinateur et confrontées aux résultats ponctuels du compteur Coulter (phase 3.2) pendant 24 heures.

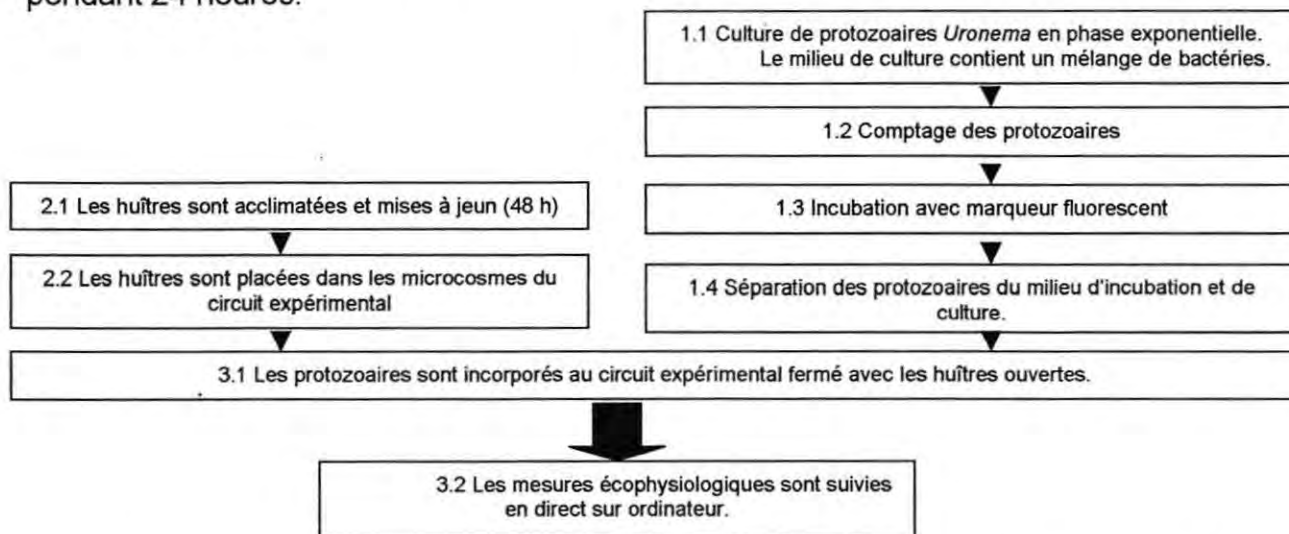


Figure 2 : Schéma du protocole expérimental de l'expérience de mesure des taux d'ingestion et d'absorption des protozoaires par les huîtres.

3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître *Crassostrea gigas* par un marqueur radioactif des protozoaires ciliés

1- Le choix du marqueur radioactif

Des études d'ingestion sur *Mytilus edulis* ont été effectuées en marquant au carbone 14 des flagellés hétérotrophes et des bactéries (Kreeger & Newell, 1996) et sur *Hydrobia ulvae* en marquant au carbone 14 des diatomées benthiques (Blanchard *et al*, 2000). Mais, le carbone est fortement respiré par les bactéries (Delmas, com. pers). Cette perte de radioactivité provoquerait un mauvais marquage des bactéries. La thymidine tritiée, largement utilisée dans les expériences de production bactérienne (Servais & Lavandier, 1995) est un marqueur radioactif, qui se fixe sur l'ADN et est très peu perdu par excrétion et respiration.

2- Les mesures

Le choix de la thymidine tritiée nous a contraint de ne travailler que sur les taux d'ingestion et d'absorption des protozoaires par l'huître. En effet, nous n'avions pas le matériel nous permettant de déterminer le SFG en mesurant la quantité de thymidine tritiée respirée par *Crassostrea gigas*.

Fiala-Medioni (1983) a montré lors d'expériences d'alimentation contrôlée que l'huître remplit complètement son tube digestif (phase de prise alimentaire), puis en

digère progressivement le contenu. La phase d'absorption se déroule donc sur un temps bien plus long que la phase d'ingestion. Pour des raisons de durée de l'expérience et de quantité de protozoaires à marquer radioactivement, nous nous sommes focalisés sur la détermination du taux d'ingestion des protozoaires ciliés par l'huître *Crassostrea gigas*. Pour ce faire, l'expérience est adaptée au temps de remplissage du tube digestif : 4h30 (à 20°C) (Fiala-Medioni, 1983).

3- Le circuit expérimental fermé

Le marquage des protozoaires étant radioactif, le circuit est fermé (figure 3): les eaux usées sont réutilisées en continu. Le circuit est constitué de 3 stands de 6 microcosmes. Les stands sont alimentés par trois pompes péristaltiques, qui mettent en circulation le mélange eau et protozoaires. C'est au niveau du bac d'homogénéisation que le mélange se fait entre l'eau recyclée et les protozoaires (les ciliés sont stockés dans le bac de réserve).

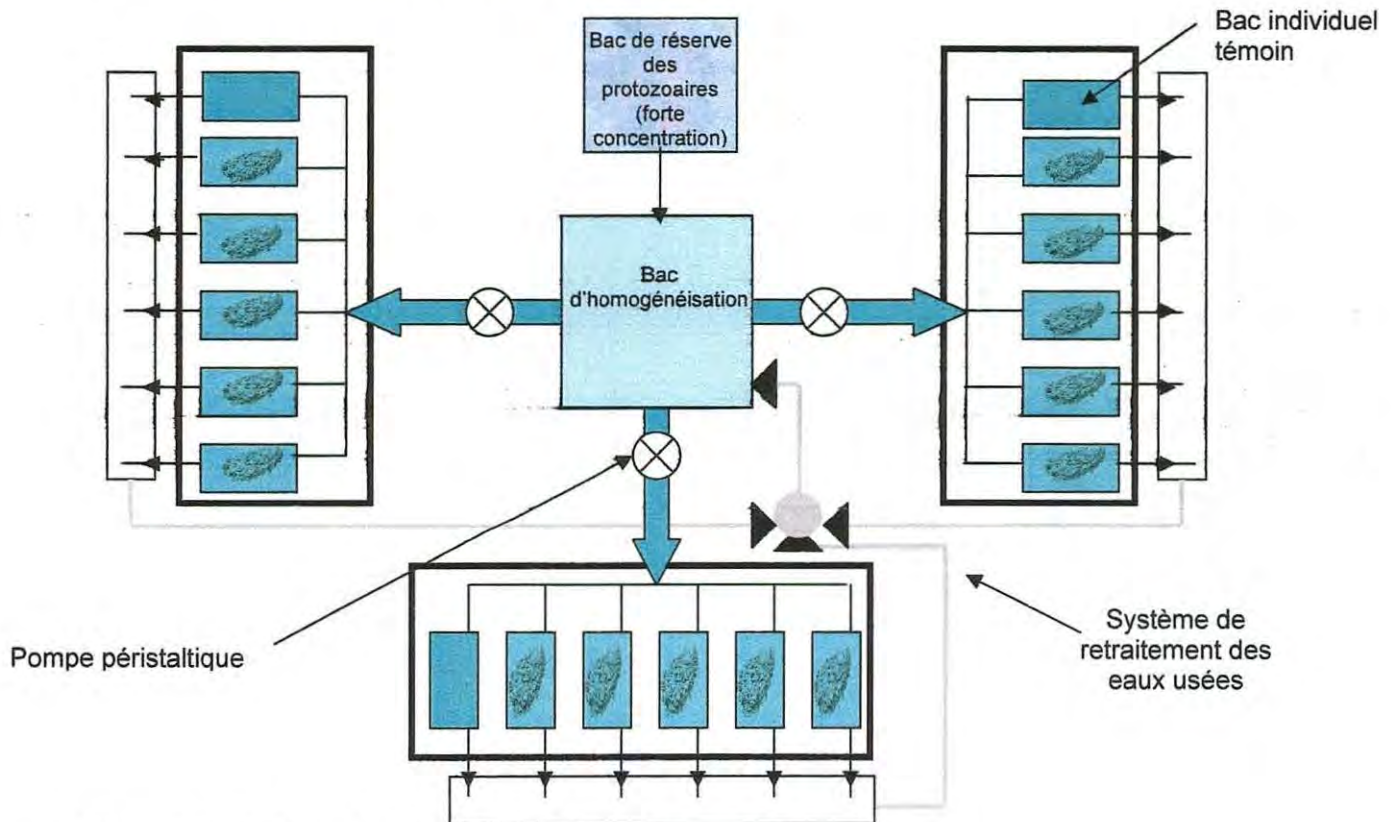


Figure 3 : Schéma du circuit expérimental fermé.

3- Manipulations préparatoires

A- Estimation de la concentration en thymidine tritiée nécessaire au marquage des protozoaires et estimation du temps d'incubation

La thymidine tritiée exogène est incorporée par les bactéries (Servais & Lavandier, 1995) et vient concurrencer la synthèse "de Novo" de thymidine de l'ADN des bactéries. L'idéal est que la seule voie de synthèse de l'ADN, soit celle utilisant la thymidine exogène (tritiée) afin qu'il n'y ait pas de dilution isotopique. De la même manière, les protozoaires peuvent potentiellement intégrer de la thymidine tritiée dissoute (figure 4).

De plus, les bactéries marquées à la thymidine tritiée sont la proie des protozoaires et leur transmettent donc le marquage (Zubkov & Sleight, 1994).

Enfin, les huîtres ingèrent les protozoaires marqués, qui sont alors quantifiés.

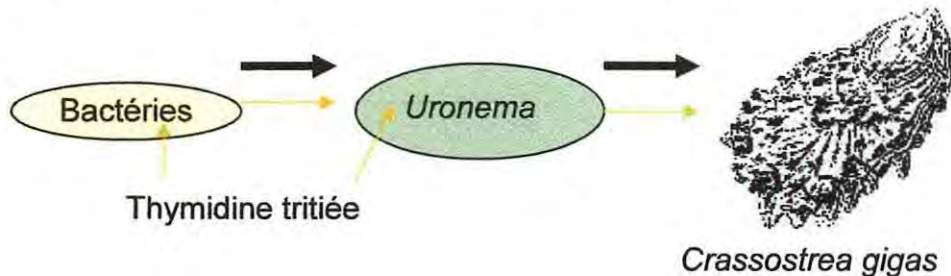


Figure 4 : schéma conceptuel du réseau trophique bactérie/Protozoaire/Huître et du trajet de la thymidine tritiée.

Il est important de travailler à concentration saturante en thymidine tritiée. La concentration est considérée saturante s'il n'y a pas d'augmentation du taux d'incorporation lorsque augmente la concentration en thymidine exogène.

Pour une même concentration en protozoaires ciliés (5×10^4 cellules mL^{-1}), trois concentrations finales de thymidine tritiée en triplicats proches de celles utilisées par Delmas (com. pers.) sont testées : 16×10^8 dpm L^{-1} , 22×10^8 dpm L^{-1} et 33×10^8 dpm L^{-1} . Comme nous ne pouvions pas tester plus de deux concentrations en même temps, l'expérience s'est déroulée en deux temps et le triplicat de 22×10^8 dpm L^{-1} a servi de référence. L'incubation se déroule dans les conditions de l'expérience. Toutes les 30 minutes et pendant 3 heures, un aliquot de 3 mL est prélevé pour chaque échantillon. Ils sont alors lavés deux fois avec 7 mL d'eau de mer filtrée stérile pour enlever la thymidine tritiée dissoute et les bactéries. Après la

seconde centrifugation, le culot est resuspendu dans 2,5 mL d'EMFS. Ce volume est mis dans une fiole à scintillation à laquelle est ajoutée 2,5 mL d'instagel (liquide scintillant). Les deux phases sont homogénéisées par agitation forte avant la mesure au compteur.

B- Estimation de l'importance du marquage à la thymidine tritiée du compartiment bactérien et des agrégats

a- Le compartiment agrégats

Après quelques heures, le milieu de culture contient de la MO détritique en agrégats sur laquelle des bactéries vivantes viennent s'agglomérer. Or, la centrifugation ne permet pas de séparer les agrégats et les protozoaires. De ce fait, ils sont mis en circulation dans le circuit expérimental fermé et viennent fausser les mesures d'ingestion faites sur l'huître. En filtrant le milieu de culture sur 20 μm , on mesure l'absorption de la thymidine tritiée par les plus gros agrégats ($>20 \mu\text{m}$). Le même protocole que dans la partie précédente est appliqué à deux triplicats de 20 mL de culture de protozoaires (26×10^3 cellules mL^{-1}) avec une concentration finale de 33×10^8 dpm L^{-1} de thymidine tritiée. Les mesures sont faites toutes les 20 minutes pendant 60 minutes.

b- Le compartiment bactérien

Le milieu de culture FAG permet le développement d'un consortium de bactéries nécessaires au développement des protozoaires ciliés hétérotrophes. On veut connaître l'efficacité du marquage des bactéries à la thymidine tritiée et ainsi visualiser le transfert de la radioactivité aux protozoaires (figure 4).

Le protocole est résumé sur la figure 5. Les bactéries du milieu de culture et les protozoaires *Uronema* sont séparés par centrifugation (2000 g) pendant 15 minutes à 4°C (phase 1.0). Le premier mL du surnageant est prélevé et est placé dans un puit de culture bactérienne avec 1 mL de milieu FAG. Après une nuit de culture et vérification au microscope de la viabilité des cellules, la culture bactérienne est relancée dans un volume de 100 mL de milieu de culture FAG (phase 1.1).

L'incorporation de la thymidine tritiée par les bactéries est classiquement mesurée dans la fraction insoluble à l'acide trichloroacétique (TCA) froid (0°C) (Servais & Lavandier, 1995). Le TCA a la particularité de casser les cellules et de faire précipiter les macromolécules comme l'ADN. Pratiquement, le protocole

appliqué est celui de Delmas (com. pers.) : 10 mL de culture bactérienne (en triplicat) sont marqués à la thymidine tritiée (concentration finale : 22×10^8 dpm L⁻¹) (phase 2.0). Toutes les 20 minutes, pendant une heure, 100 µL du milieu d'incubation sont prélevés et mélangés avec 150 µL de TCA 50 % et 1 mL d'eau très pure (miliQ : filtrée trois fois sur 0,2 µm) (phase 2.1). La suite du protocole doit se dérouler au froid pour que l'ADN reste précipité. Le mélange est donc placé pendant 30 minutes dans la glace pilée (phase 3.0), puis filtré sur filtre nuclépore 0,2 µm (P<100 mmHg) (phase 3.1). Les colonnes de filtration sont ensuite rincées trois fois avec 3 mL de TCA 5 %. Enfin, les filtres sont mis dans des tubes à scintillation de 6 mL , où ils sont recouverts de 4 mL d'instagel (liquide scintillant) (phase 3.2).

La mesure du marquage des bactéries à T0 est particulière, car un mélange de 10 mL culture bactérienne et de 1,5 mL de TCA 50 % est fait avant l'ajout de la thymidine tritiée (phase 2.2). Ce T0 donne la radioactivité naturelle des bactéries et le biais apporté par les manipulations de conditionnement des aliquotes.

En parallèle, à T0, T30 et T60, des comptages bactériens ont été faits (marquage au DAPI et comptages au microscope à épifluorescence).

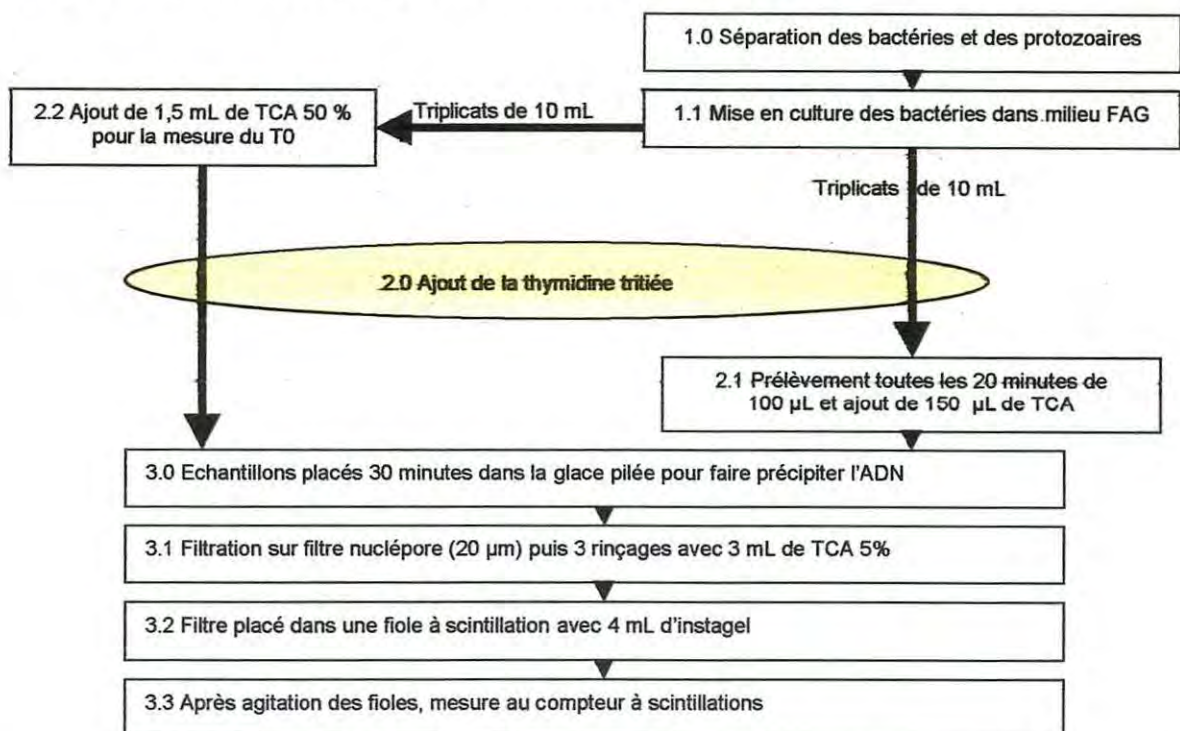


Figure 5 : Schéma du protocole expérimental de marquage des bactéries à la Thymidine tritiée.

C- Tests du circuit expérimental fermé

1- Test d'homogénéisation du bac tampon

Le bac tampon est un volume cubique de 55 L. Son rôle est d'homogénéiser l'eau et les protozoaires, qui viennent soit de la souche concentrée, soit du système de recyclage de l'eau du circuit. Pour mélanger les protozoaires et l'eau, on a mis au point un système couplé de :

- quatre barreaux magnétiques (à armature pour ne pas casser les protozoaires) répartis au fond du bac
- une pompe péristaltique qui aspire l'eau du fond et la rejète en surface
- le flux d'eau du circuit mis en mouvement par une pompe péristaltique.

La concentration finale théorique testée dans le bac de brassage est de 218 cellules mL⁻¹. 10 minutes après ajout, des prélèvements sont faits à mi-profondeur. Les échantillons sont fixés au formol (concentration finale 1%) et des comptages sont faits sur cellule de Nageotte ou chambre Utermöhl.

2- Test d'homogénéisation du circuit

La concentration en protozoaires *Uronema marinum* dans chaque microcosme doit être la même. On teste donc la répartition des protozoaires dans le circuit expérimental. Pour ce faire, un circuit réduit composé du bac de brassage de 55 L (système d'homogénéisation précédent) et d'un stand alimenté par une pompe péristaltique (prélève l'eau à mi-profondeur du bac de brassage) est monté. Seuls trois microcosmes du stand sont utilisés. Le premier microcosme est le témoin, les deux suivants contiennent chacun une huître.

Après ajout de protozoaires dans le bac d'homogénéisation (concentration finale : 218 cellules mL⁻¹). Des prélèvements sont faits dans les trois microcosmes à T30 min, T60 min et T105 min. Les échantillons sont fixés au formol (concentration finale 1%) et des comptages sont faits sur cellule de Nageotte ou chambre Utermöhl.

3- Protocole général

Le protocole de l'expérience est réalisé 3 fois dans les mêmes conditions et est résumé sur la figure 6. Les huîtres *Crassostrea gigas* sont élevées en poches dans le pertuis Breton et sont de calibre n°4. Elles sont acclimatées pendant 15 jours

dans un bassin d'évacuation de l'eau (19°C) du marais expérimental du CREMA L'Houmeau et sont mises à jeun 2 jours avant le début de l'expérience. Elles sont ensuite nettoyées et brossées (phase 2.1). Une huître est mise dans chaque microcosme (Phase 2.2). Elles y sont installées quelques heures à l'avance pour disposer d'animaux n'ayant subi aucun stress (Anonymes, 1984). L'huître est placée de telle manière que la charnière de l'huître soit tournée vers la sortie d'eau du microcosme (Annexe 2).

Les protozoaires *Uronema* sont en phase exponentielle de croissance et sont comptés à la cellule de Malassez avant l'expérience (phase 1.2). Une dose de thymidine tritiée déterminée par les expériences préliminaires est alors ajoutée à un volume calculé de la souche. L'incubation se fait pendant un temps défini par les expériences préliminaires, à l'obscurité, sur agitateur orbital et à température ambiante (20°C) (phase 1.3).

Les protozoaires sont séparés du milieu d'incubation et de culture (chapitre 2.2). Le surnageant est jeté dans un récipient à produits radioactifs, le culot est resuspendu dans de l'EMFS. L'opération est réalisée deux fois de suite (phase 1.4).

L'expérience est adaptée au temps de remplissage du tube digestif de l'huître *Crassostrea gigas* : 4h30 (à 20°C) (Fiala-Medioni, 1983). L'expérience en circuit commence quand les huîtres sont toutes ouvertes. Il faut alors prélever une huître toutes les 20 minutes, ce qui correspond à un temps total de 5 heures. En effet, en considérant que les quinze huîtres composant le système ne sont pas toutes ouvertes en même temps, nous sommes contraints de prévoir un temps de manipulation supérieur à 4h 30.

Dès que l'huître est sortie du circuit, la chair est détachée de la coquille (phase 4.1). On part du principe que la coquille n'absorbe pas de protozoaires. La chair est alors broyée au mixeur et placée dans un flacon à scintillation. Le broyat est alors recouvert de soluène qui va dissoudre la chair à 60°C (phase 4.2). Ensuite, le liquide scintillant (hionic fluor) est ajouté, le flacon est agité, et la radioactivité de l'échantillon est mesurée au compteur à scintillations Packard (2100 TR) (phase 4.3).

Pour ramener la mesure des DPM mesurées au compteur, à un nombre de cellules d'*Uronema*, un ratio de conversion (CR) est calculé (phase 1.5). Un aliquote de la souche marquée est passé au compteur à scintillation après ajout de liquide scintillant (instagel). Le nombre de cellules de l'aliquote a été déterminé par comptage à la cellule de Malassez ou de Nageotte.

$$\text{Taux d'ingestion} = \text{radioactivité ingérée} \times \text{CR}$$

(*Uronema*/ mollusque/ heure) (DPM/ mollusque/ heure) (*Uronema*/ DPM)

et radioactivité ingérée = radioactivité consommée – radioactivité des pseudofèces

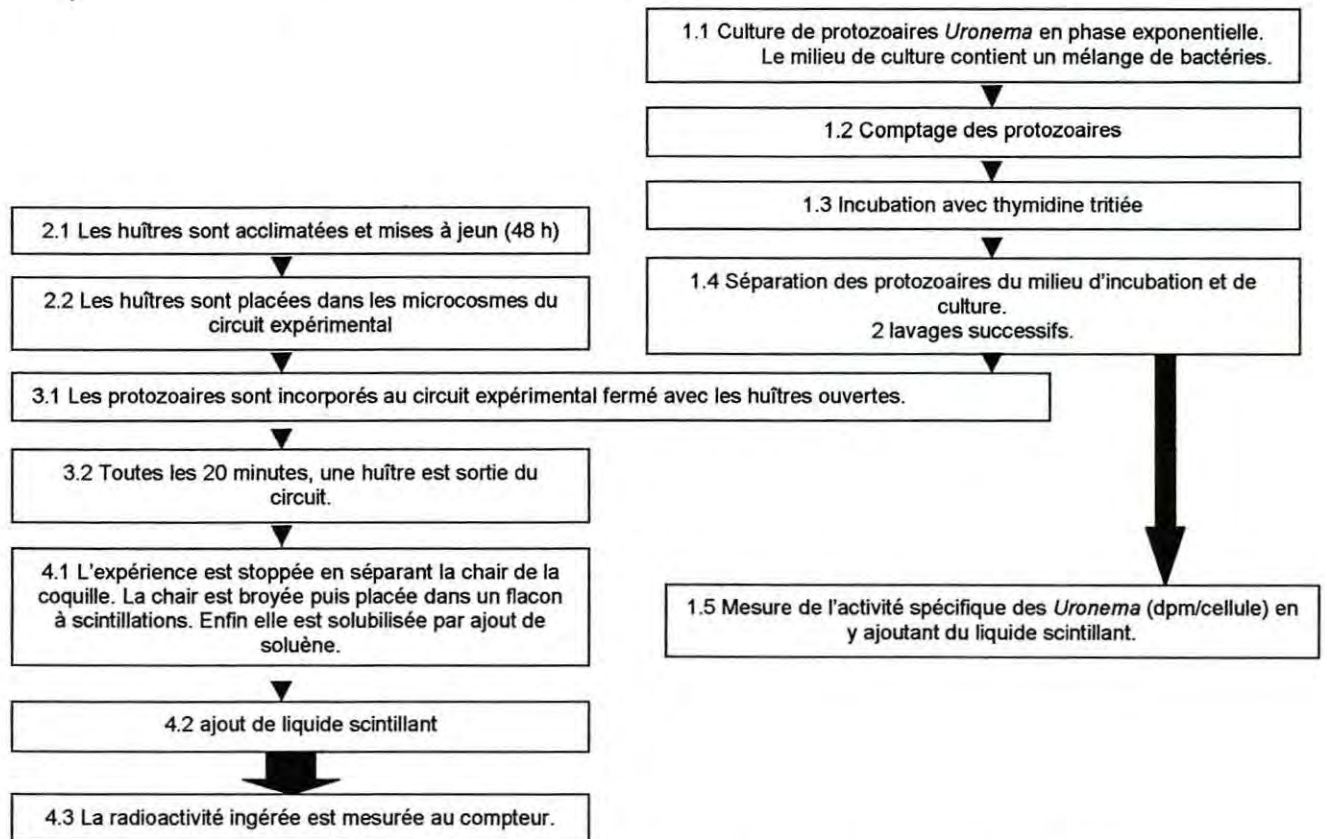


Figure 6 : Schéma du protocole expérimental de l'expérience d'ingestion des protozoaires marqués à la thymidine tritiée par les huîtres.

Résultats

1- Séparation des protozoaires du milieu de culture et de marquage

Les protozoaires *Uronema* traversent le nylon de vide de maille de 5 µm. La méthode de filtration ne permet pas la séparation des protozoaires de leur milieu (milieu de culture et d'incubation).

La méthode de centrifugation implique un pourcentage de perte de protozoaires de 36% pour chaque centrifugation de 15 minutes à 1000 g à 4°C.

2- Mesure des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par l'analyse des paramètres écophysologiques de l'huître *Crassostrea gigas*.

1- Mesure de la quantité de protozoaires à la sortie des microcosmes : résultats des tests

Mesure de la quantité de protozoaires *Uronema* par turbidimétrie

Les mesures faites dans un premier temps au CREMA L'Houmeau s'échelonnent sur une gamme de $4,6 \times 10^3$ à $4,6 \times 10^5$ cellules mL^{-1} (figure 7).

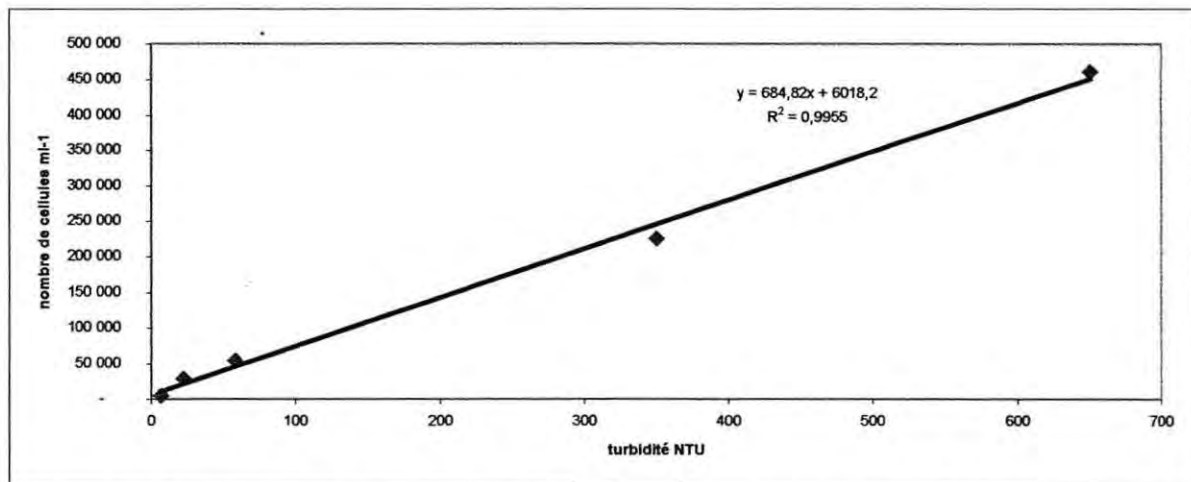


Figure 7 : Mesure de la turbidité en NTU en fonction de la concentration en protozoaires.

La turbidité augmente linéairement avec la concentration en protozoaires. Le coefficient de corrélation (R^2) est fort. Malheureusement, les mesures faites à l'IFREMER Argenton sur le turbidimètre du circuit expérimental ne donnent pas de signal suffisamment fort en dessous de 2×10^4 cellules mL^{-1} .

Mesure de la quantité de protozoaires *Uronema* par fluorimétrie

○ Le DAPI :

Après marquage au DAPI, les protozoaires *Uronema* sont vivants pendant 24h au moins. Dans un premier temps, une gamme étalon a été faite, s'étalant de 2 100 à 240 000 cellules mL^{-1} (figure 8).

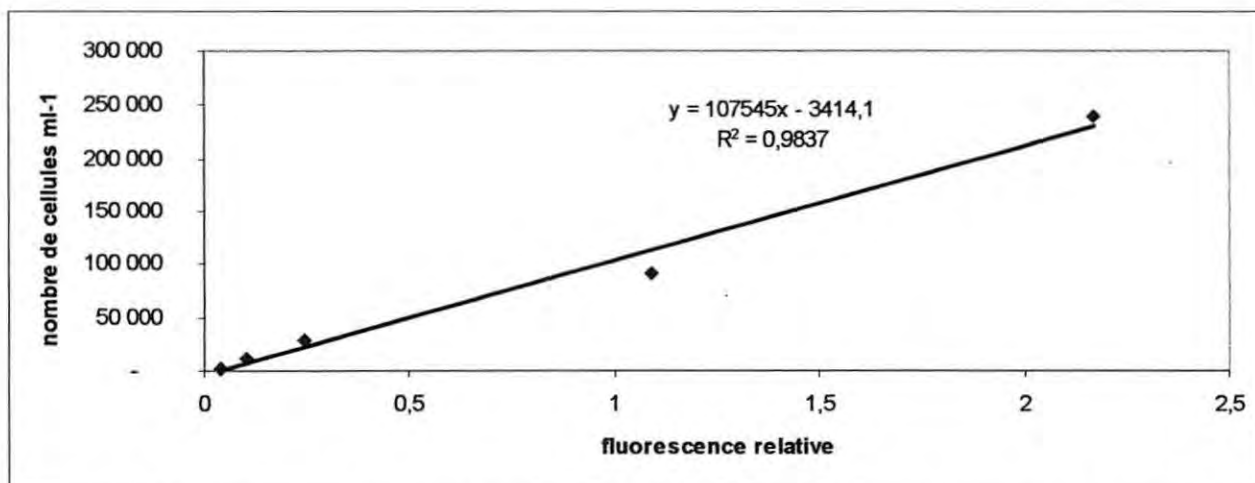


Figure 8 : Mesure de la fluorescence relative en fonction de la concentration en protozoaires marqués au DAPI.

La fluorescence relative augmente linéairement avec la concentration en protozoaires ($R^2=0,9837$). Les mesures faites par la suite sur la sonde fluorimétrique d'Argenton ont donné dans un premier temps un signal fort, puis 15 minutes après, la mesure du même échantillon donnait un signal faible.

o La fluorescéine :

Les protozoaires *Uronema* sont toujours vivants 24 heures après marquage à la fluorescéine. Les premiers tests effectués avec $2\,500\ \mu\text{g L}^{-1}$ de fluorescéine en concentration finale donnent un signal fort. Pour la concentration finale de $5\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$ de fluorescéine, une gamme étalon s'étalant de 0 à 12 cellules mL⁻¹ (concentrations du milieu naturel en zone côtière) est réalisée (figure 9).

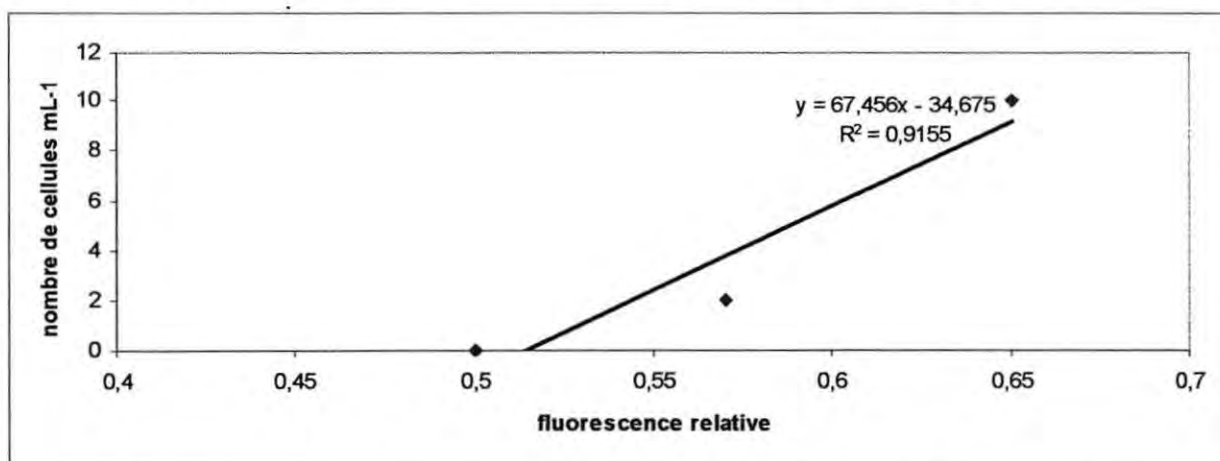


Figure 9 : Mesure de la fluorescence relative en fonction de la concentration en protozoaires marqués à la fluorescéine.

La fluorescence relative augmente avec la concentration en protozoaires, mais le coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9155$) est plus faible que dans les autres cas.

○ La proflavine :

Après marquage à la proflavine, les protozoaires sont toujours vivants au bout de 24 heures. La gamme étalon testée sur le fluorimètre du LBEM, dans les mêmes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission que celui du circuit expérimental, varie de 1,5 à 17 600 cellules mL^{-1} .

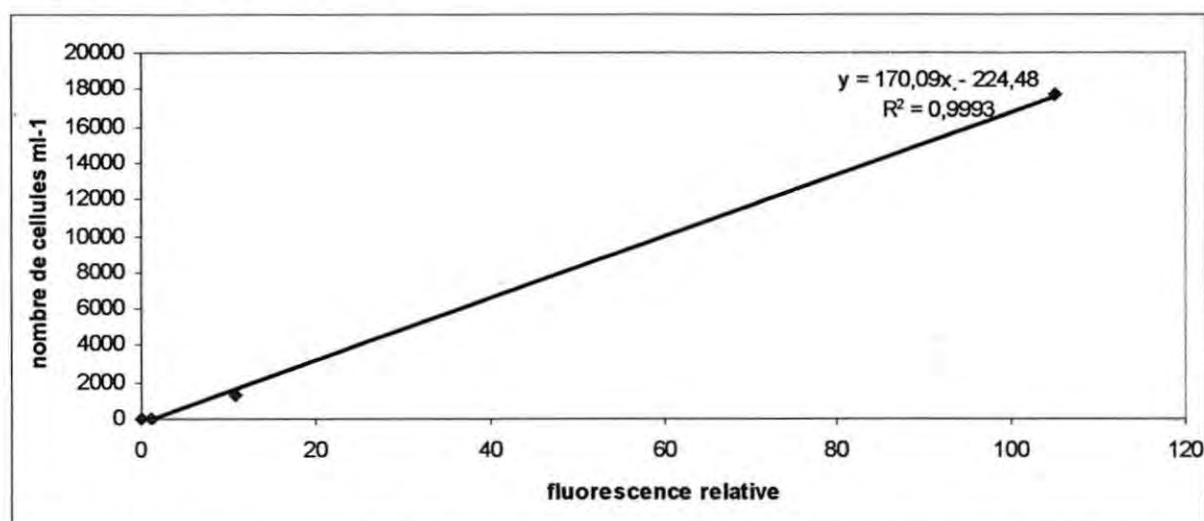


Figure 10 : Mesure de la fluorescence relative, en fonction de la concentration en protozoaires marqués à la proflavine.

La fluorescence relative augmente linéairement avec la concentration en protozoaires. Le coefficient de corrélation est très fort ($R^2 = 0,9993$) et la détection des protozoaires est très sensible ($1,5$ cellule $\cdot \text{mL}^{-1}$). Pour des raisons de temps, ce colorant n'a pas pu être testé sur le fluorimètre du circuit expérimental.

Mesure de la quantité de protozoaires *Uronema* au compteur Coulter

Les protozoaires *Uronema* forment des amas qui viennent souvent obstruer l'embouchure du compteur. Le signal est tout de même clair pour les faibles concentrations en protozoaires.

2- Les pompes du circuit de mesure des paramètres écophysologiques

La pompe péristaltique ne provoque pas d'éclatement des cellules d'*Uronema*, alors que la pompe à valves en détruit 4 % sachant que cette seconde pompe est deux fois plus puissante que celle utilisée dans le circuit expérimental.

3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître *Crassostrea gigas* par un marquage radioactif des protozoaires

1- Le circuit expérimental fermé

a- Homogénéité du bac tampon

Les prélèvements effectués dans des zones opposées du bac tampon, 10 minutes après l'ajout de protozoaires donnent des concentrations variant de 4,5 à 9,1 cellules mL⁻¹. La répartition des ciliés est donc mauvaise.

De plus, la concentration en protozoaires attendue dans le bac de 55 L était de 218 cellules mL⁻¹, or seuls 3 % sont dans les prélèvements. 97 % des cellules sont soit lysées par les différents appareils de mises en suspension (barreaux, pompes péristaltiques) soit elles sédimentent et échappent au courant de fond créé par la pompe péristaltique.

b- Répartition des protozoaires dans le circuit

La concentration théorique dans le bac tampon comme dans les microcosmes est de 218 cellules mL⁻¹. Le microcosme témoin est vide alors que les microcosmes 1 et 2 ont une huître chacun.

Tableau 1 : Concentration en protozoaires *Uronema marinum* (cellules mL⁻¹) dans 3 microcosmes en fonction du temps.

	témoin	microcosme 1	microcosme 2
T30	5,4	3,1	14,4
T60	12,9	17,4	4,5
T105	10,4	10,4	10,5

La mauvaise homogénéité du bac tampon donne des concentrations dans les microcosmes très inférieures à 218 cellules mL⁻¹ mais proches de celles du bac tampon. A T0, les concentrations en protozoaires varient de 3,1 à 14,4 cellules mL⁻¹.

D'une manière générale, le nombre de protozoaires dans les 3 microcosmes augmente pendant 60 minutes et se stabilise au bout de 105 minutes à 10,4 cellules mL⁻¹ (soit 5% de la concentration théorique). Le mélange eau/protozoaires est alors réparti de manière homogène dans les 3 microcosmes.

L'huître du microcosme 1 est restée fermée pendant les 105 minutes alors que l'huître du microcosme 2 filtre à T60, ce qui explique la diminution du nombre de protozoaires dans le microcosme.

2- Temps d'incubation et concentration en thymidine tritiée

Lors de la première expérience, deux concentrations ont été testées : 16×10^8 dpm L^{-1} et 22×10^8 dpm L^{-1} de thymidine tritiée. Pour des raisons méthodologiques, le T0 n'a pas été fait, la première mesure correspond à T30 minutes.

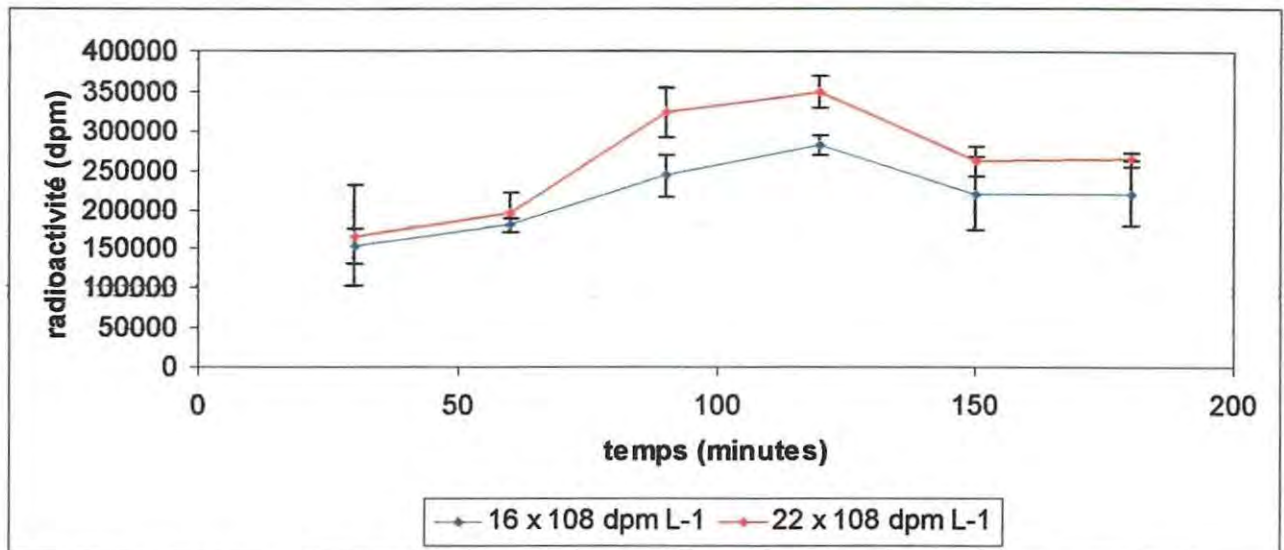


Figure 11 : Mesure de la radioactivité des protozoaires *Uronema* en fonction du temps d'incubation (la barre d'erreur représentée correspond à l'intervalle de confiance de la moyenne à 95%).

Sur ces deux courbes d'incubations, apparaissent plusieurs phases :

- Une première phase correspondant à une augmentation de la radioactivité des protozoaires pendant 120 minutes. Le maximum étant de $3,5 \times 10^5$ dpm pour la concentration de 22×10^8 dpm L^{-1} et $2,8 \times 10^5$ dpm pour celle de 16×10^8 dpm L^{-1} .
- Une seconde phase correspondant à une diminution de 9×10^4 dpm pour la concentration de 22×10^8 dpm L^{-1} et de 6×10^4 dpm pour celle de 16×10^8 dpm L^{-1} .
- Enfin, une dernière phase où la radioactivité se stabilise à $2,6 \times 10^5$ dpm pour la concentration de 22×10^8 dpm L^{-1} et à $2,2 \times 10^5$ dpm dans l'autre cas.

Lors de la seconde expérience, la concentration finale de 22×10^8 dpm L^{-1} a servi de référence (pour comparer avec les résultats précédents) et celle de 33×10^8 dpm L^{-1} a été testée.

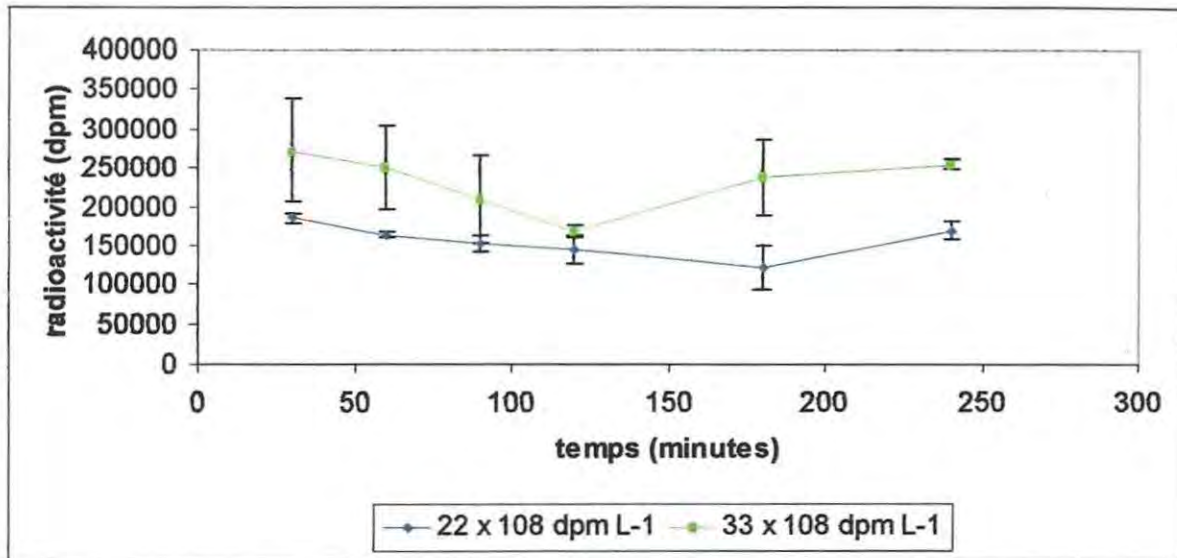


Figure 12 : Mesure de la radioactivité des protozoaires *Uronema* en fonction du temps d'incubation (la barre d'erreur représentée correspond à l'intervalle de confiance de la moyenne à 95%).

Les résultats obtenus diffèrent beaucoup de ceux trouvés dans l'expérience précédente et ne permettent pas d'estimer si les conditions de marquage sont saturantes.

La radioactivité des protozoaires marqués avec 22×10^8 dpm L⁻¹ commence à $1,8 \times 10^5$ dpm et diminue pendant 180 minutes pour arriver à $1,2 \times 10^5$ dpm et enfin remonter jusqu'à $1,7 \times 10^5$ dpm.

La radioactivité des protozoaires marqués avec 33×10^8 dpm L⁻¹ débute à $2,7 \times 10^5$ dpm puis diminue pendant 120 minutes jusqu'à $1,7 \times 10^5$ dpm et enfin remonte à $2,5 \times 10^5$ dpm.

3- Importance du marquage à la thymidine tritiée du compartiment bactérien et des agrégats

a- L'effet de la filtration sur 20 μm :

La radioactivité représentée (figure 13) correspond à la moyenne des mesures faites pendant une heure.

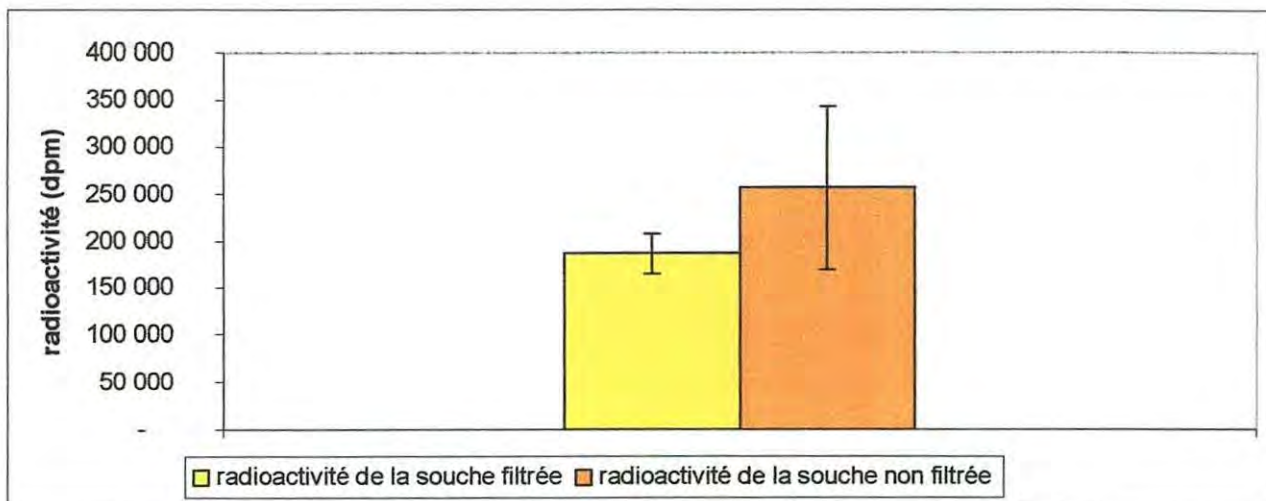


Figure 13 : Radioactivité moyenne des protozoaires des souches filtrées sur nylon de vide de maille de 20 μm et non filtrées. Les barres d'erreurs représentées sont les intervalles de confiance de la moyenne à 95%.

Les protozoaires sont marqués dans les deux cas avec 22×10^8 dpm L^{-1} de thymidine tritiée. Le signal obtenu dans le cas de la culture filtrée sans agrégat est en moyenne de $1,8 \times 10^5$ dpm. Dans le cas de la souche non filtrée, la radioactivité moyenne est de $2,5 \times 10^5$ dpm.

b- Le marquage des bactéries du milieu de culture:

Le marquage à la thymidine tritiée des bactéries du milieu de culture se fait en moins d'une heure (1 point toutes les 20 minutes).

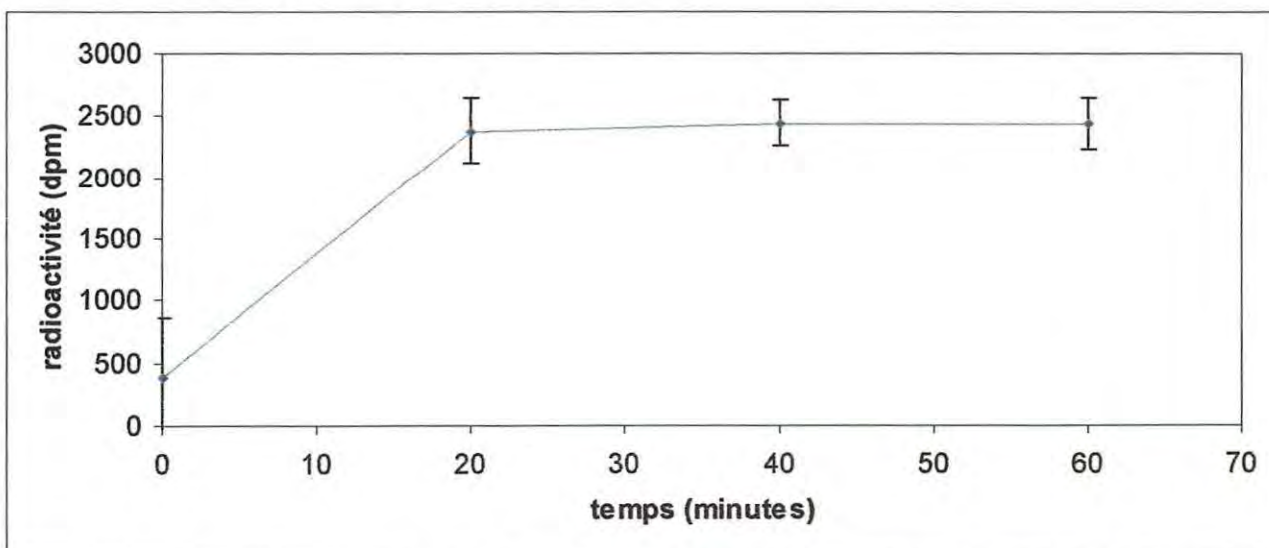


Figure 14 : Mesure de la radioactivité des bactéries en fonction du temps (la barre d'erreur représentée correspond à l'intervalle de confiance de la moyenne à 95%).

La radioactivité du T0 est de 380 dpm, puis augmente pendant 20 minutes jusqu'à 2 400 dpm, pour finalement se stabiliser à ce niveau de radioactivité.

Des comptages bactériens ont été effectués pendant le déroulement de l'expérience. La concentration en bactéries du milieu varie entre 8,9 et $9,3 \times 10^8$ bactéries mL⁻¹. La population bactérienne est composée de 61 % de formes coccoïdes, 31 % de formes bâtonnets et 8 % de cellules en cours de divisions.

Discussion

1- Séparation de la culture de protozoaires *Uronema marinum* de leur milieu de culture et de marquage.

Le tamisage sur un nylon de vide de maille de 5 µm ne permet pas de retenir les protozoaires *Uronema marinum* malgré leur taille (20 µm de longueur et 10 µm de large). Leur capacité à se déformer (ciliés nus) leur permet de traverser la maille. La deuxième méthode est la centrifugation différentielle. Elle implique 36 % de pertes de protozoaires à chaque centrifugation mais permet la meilleure séparation en laissant les bactéries du milieu de culture dans le surnageant. Cette forte perte est sûrement due à la fragilité des cellules d'*Uronema* qui éclatent sous l'effet de l'agitation et à une mauvaise migration des cellules (force centrifuge pas assez forte). En effet, la séparation n'est pas optimale car il reste des protozoaires en quantité non négligeable (220 cellules mL⁻¹) dans les premiers millilitres du surnageant, mais en augmentant la vitesse de rotation les cellules d'*Uronema* éclateraient encore plus. Pour séparer les protozoaires du milieu d'incubation, deux centrifugations sont nécessaires ce qui implique des pourcentages de perte de 72 %. Mais c'est tout de même la méthode retenue pour les expériences ultérieures.

2- Mesures des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par mesure des paramètres écophysologiques de l'huître *Crasostrea gigas*.

a- Détection des protozoaires

On a une relation entre la turbidité et le nombre de protozoaires ($R^2 = 0,9955$). Mais, les mesures de la quantité de protozoaires par turbidimétrie donnent un signal trop faible pour les concentrations que l'on veut tester et qui correspondent à celles du milieu naturel en zone côtière (6 000 cellules L⁻¹).

Les protozoaires *Uronema marinum* ont survécu aux trois fluorochromes testés. Le marquage des protozoaires au DAPI donne un signal fort au fluorimètre du circuit expérimental, même pour les faibles concentrations. Mais il est trop sensible à la lumière et son utilisation implique des contraintes trop dures pour l'expérience (le DAPI perd ses propriétés fluorescentes après quelques secondes à la lumière, même à faible intensité). Le marquage à la fluorescéine ne donne pas de signal assez fort dans les petites concentrations de protozoaires pour être retenu. Le spectre d'émission de la fluorescéine n'est pas entièrement capté par le fluorimètre. Le marquage des protozoaires à la proflavine donne un excellent signal dans les longueurs d'ondes du fluorimètre du circuit expérimental ($R^2= 0,9993$), et même pour les très faibles concentrations (jusqu'à $1,5 \text{ cellule mL}^{-1}$). Pour des raisons de temps, des essais avec des protozoaires marqués à la proflavine et le fluorimètre du circuit n'ont pas pu être faits.

La mesure au compteur Coulter donne des résultats satisfaisants pour les faibles concentrations uniquement. Le compteur ne donne que des mesures ponctuelles qui permettent de vérifier les variations des concentrations en protozoaires à la sortie des microcosmes.

b- Mesures d'ingestion, d'absorption et du SFG.

Du fait des problèmes de détection des protozoaires dans le circuit expérimental qui n'ont pu être résolus, l'expérience d'ingestion des protozoaires par l'huître n'a pas pu être effectuée dans le temps qui nous était imparti.

3- Mesure du taux d'ingestion de l'huître *Crassostrea Gigas* sur les protozoaires *Uronema marinum*, par marquage à la thymidine tritiée

1- Le circuit expérimental fermé

La concentration en ciliés dans le circuit passe de 3% (10 minutes après l'ajout des ciliés) à 5% de la concentration théorique (105 minutes après l'ajout des ciliés). Cette augmentation du nombre de protozoaires détectables tend à montrer qu'il y a un phénomène de remise en suspension des protozoaires par les mécanismes de brassage du bac tampon. La diminution de l'écart type entre les 3 microcosmes (de 5,9 pour T30 à 0,07 pour T105) montre que le mélange eau/protozoaires s'homogénéise au cours du temps (105 minutes) par phénomène de dilution.

Toutefois, 95% des ciliés *Uronema* ajoutés au bac tampon ne sont pas mis en circulation dans le circuit. Ce pourcentage de pertes implique un éclatement des cellules au contact des appareils de remise en suspension du bac tampon ou une sédimentation des protozoaires, qui ne serait pas compensée par l'effet des barreaux magnétiques et des pompes péristaltiques.

2- Le marquage des protozoaires

a- Estimation de la concentration en thymidine tritiée nécessaire au marquage des protozoaires et estimation du temps d'incubation

Les concentrations en thymidine tritiée exogène de 16×10^8 dpm L⁻¹ et 22×10^8 dpm L⁻¹ ne sont pas assez fortes pour saturer le marquage des bactéries et des protozoaires. En effet, la radioactivité des protozoaires augmente proportionnellement aux doses de thymidine tritiée testées. A titre de comparaison, Fuhrman et Azam (1980) utilisent pour leurs échantillons marins, des concentrations en thymidine tritiée 5×10^5 fois plus élevées pour saturer les processus d'assimilation des bactéries. Néanmoins, pour les deux concentrations testées, le temps de marquage des protozoaires est stable (120 minutes). Il correspond au maximum préconisé par Servais et Lavandier (1995) pour le marquage de leurs échantillons bactériens aquatiques.

b- Analyse du marquage des protozoaires

Dans cette étude, 5% de la thymidine tritiée totale du milieu d'incubation se retrouve dans les protozoaires. Pour la même expérience sans protozoaires, on ne retrouve que 1% de la thymidine tritiée totale dans les bactéries. Les protozoaires *Uronema* assimilent donc 4% environ de la thymidine tritiée exogène. De ce fait, les phénomènes d'assimilation étant régis par les concentrations extracellulaires, on peut penser que si la concentration en thymidine tritiée exogène est plus importante, alors le marquage sera plus fort.

c- Les problèmes de marquage

1- Les agrégats

La centrifugation différentielle fait migrer dans le culot les protozoaires mais aussi les agrégats. La filtration sur 20 µm est nécessaire car elle élimine les plus gros agrégats ce qui représente en moyenne 27 % de la radioactivité mesurée. Mais

les agrégats inférieurs à 20 µm restent dans le milieu et les plus gros migrent lors de la centrifugation, provoquant ainsi un biais inconnu dans nos mesures. La radioactivité de ces agrégats est très variable du fait de leur composition.

2- Les bactéries

La souche bactérienne a été contaminée par une grosse bactérie (bacille) que nous n'avons pas pu éliminer. De ce fait, la composition de la population bactérienne varie énormément d'un jour à l'autre et les expériences ne sont donc pas reproductibles.

3- Ingestion des protozoaires

Les variations de la composition de la population bactérienne et les agrégats créent des biais dans le marquage radioactif des protozoaires. Ces problèmes de marquage nous ont empêché encore une fois d'effectuer la seconde phase des expériences : la mesure du taux d'ingestion des protozoaires *Uronema marinum* par les huîtres *Crassostrea gigas*.

Bilan

Les mesures des paramètres écophysiologiques de l'huître *Crassostrea gigas* réalisées à l'IFREMER Argenton servent à déterminer en direct les taux d'ingestion, d'absorption et le SFG des huîtres sur les protozoaires. La détection des protozoaires par fluorimétrie n'ayant pas été finalisée, aucune mesure du SFG, des taux d'absorption et d'ingestion n'a pu être faite.

Le marquage des protozoaires à la thymidine tritiée réalisé au CREMA L'Houmeau sert à mesurer le taux d'ingestion des ciliés par l'huître. Nous avons été confrontés à deux problèmes qui nous ont empêché d'obtenir des résultats d'ingestion : des pertes énormes de ciliés dans le bac d'homogénéisation du circuit et un problème de marquage des protozoaires à la thymidine tritiée.

Le principal problème rencontré dans les deux cas, provient de la culture bactérienne sur laquelle poussent les *Uronema*. La composition du consortium bactérien variant d'un jour à l'autre, les expériences de marquage ne sont donc pas reproductibles.

L'objectif de cette étude était de mettre au point des méthodes permettant d'obtenir les valeurs d'ingestion, d'absorption ou de SFG des protozoaires par l'huître, mais finalement ce travail n'a pas abouti durant le temps qui nous était imparti. Par contre, il apporte beaucoup de résultats méthodologiques. Cette étude est une étape préliminaire nécessaire dans la détermination du rôle des protozoaires dans la nutrition, la croissance et la reproduction de l'huître.

Perspectives

1- Mesures des taux d'ingestion, d'absorption et du SFG par mesure des paramètres écophysiologiques de l'huître *Crassostrea gigas*

La détection des protozoaires est le principal problème rencontré au cours de cette étude. Les longueurs d'onde d'émission et d'absorption de la proflavine correspondent à celles requises par le fluorimètre du circuit expérimental de l'IFREMER Argenton. Il doit être testé en circuit et avec les huîtres.

2- Mesures du taux d'ingestion de l'huître *Crassostrea gigas* sur les protozoaires *Uronema marinum*, par marquage à la thymidine tritiée

A- Le marquage radioactif

Des doses de thymidine tritiée très supérieures à celles utilisées doivent être testées pour se rapprocher de celles préconisées par Servais & Lavandier (1995) comprises entre 5 et 20 nM.

Une fois la dose de thymidine tritiée connue, il faut tester la durée du marquage des protozoaires ainsi que sa linéarité.

La mesure de la radioactivité des huîtres au compteur à scintillation implique de broyer la chair de l'huître et de la solubiliser pour qu'elle se mélange avec le liquide scintillant (Hionic fluor). Le solvène permet de solubiliser la chair de l'huître (phase 4.2 de la figure 3). Il faut tester son temps d'action.

Enfin, il faut tester l'incorporation de la thymidine tritiée par la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*.

B- Homogénéité de la répartition des protozoaires dans le circuit

Pour que les protozoaires de culture se retrouvent tous en circulation dans le circuit, il faut empêcher la sédimentation dans le bac de brassage et donc

homogénéiser la répartition des protozoaires. Différents systèmes sont actuellement à l'étude comme une roue à aubes, un agitateur "à peinture", un système reproduisant le mouvement des vagues.

C- Mesure du taux d'absorption

Le taux d'absorption doit être mesuré pendant un temps plus long que celui utilisé pour la mesure du taux d'ingestion (>4h 30).

3- Traitement de la souche de protozoaires avec des antibiotiques

Pour éviter tous les problèmes de contamination de la culture bactérienne, les *Uronema* sont actuellement traités avec deux antibiotiques : la streptomycine (concentration finale : 1 mg L⁻¹) et la pénicilline A (concentration finale : 10 mg L⁻¹). les protozoaires sont cultivés sur un milieu FAG. En effet, la levure et les peptones permettent potentiellement la croissance du protozoaire. C'est le cas pour d'autres protozoaires comme *Tetrahymena termophyla* (Ethuin *et al.*, 1995 ; Ethuin & De Coninck, 1996).

Le but de l'expérience étant de rendre la souche axénique, de la cultiver avec de la MOD et de la marquer directement à la thymidine tritiée dissoute.

Actuellement, il ne reste visiblement plus qu'une souche bactérienne. Un troisième antibiotique doit être testé : la moxifloxacine.

4- Méthode de détection in situ

Une autre méthode de détection des protozoaires est à envisager. Elle consiste en la détection des protozoaires à l'aide d'un marqueur immunologique spécifique.

Références Bibliographiques

- Anonymes** (1984). Bilan énergétique chez les mollusques bivalves : terminologie et méthodologie. Compte rendu du groupe de travail réuni au laboratoire national « Ecosystème conchylicole » de l'IFREMER La Tremblade (13 et 14 septembre 1984).
- Barillé L., Prou J., Héral M., Bougrier S.** (1993). No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 171 : 91-106.
- Barillé L., Héral M., Barillé-Boyer A.L.** (1997). Modélisation de l'écophysologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. *Aquat Living Resour*, 10 : 31-48.
- Bayne B.L. & Newell I.E.** (1983). Physiological energetics of marine molluscs. *The mollusca vol. 4 physiology 1* : 407-515.
- Beiras R., Pérez C.A., Albentosa M.** (1993). Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture*, 116 : 335-365.
- Berg J.A. & Newell I.E.** (1986). Temporal and Spatial Variations in the composition of Seston Available to the Suspension Feeder *Crassostrea virginica*. *Estuar Coast Shelf Sci*, 23 : 375-386.
- Blanchard G., Sauriau P.G., Carriou-Le Gall V., Gouleau D., Garet M.J., Olivier F.** (1997). Kinetics of tidal resuspension of microbiota : testing the effects of sediment cohesiveness and bioturbation using flume experiments. *Mar Ecol Prog Ser*, 151 : 17-25.
- Blanchard G.F., Guarini J.M., Provot L., Richard P., Sauriau P.G.** (2000). Measurement of ingestion rate of *Hydrobia ulvae* (Pennant) on intertidal epipellic microalgae : the effect of mud snail density. *J Exp Mar Biol Ecol*, 255 : 247-260.
- Deslous-Paoli J.M., Héral M., Gouletquer P., Boromthananat W., Razet D., Garnier J., Prou J., Barillé L.** (1987). Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles. *Océanis*, 13 : 575-579.
- Dupuy C.** (1999). Rôle fonctionnel des protistes hétéro/mixotrophes dans le réseau trophique d'un écosystème conchylicole : le marais atlantique. Thèse Doctorat ès Sciences La Rochelle, Université de La Rochelle.
- Dupuy C., Le Gall S., Hartmann H.J., Bréret M.** (1999). Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar Ecol Prog Ser*, 177 : 165-175.
- Ethuin P., De Coninck J., Dhulster P., Guillochon D., Thomas D.** (1995). Comparaison of complex organic media for the temperature-sensitive mutant *Tetrahymena thermophyla* SJ180. *Enzyme Microb Technol*, 17 : 998-1002.
- Ethuin P. & De Coninck J.** (1996). Scaling up for mass cultivation of the temperature sensitive mutant *Tetrahymena thermophila* SJ180. *Biotechnol Tech*, vol. 10, 7 : 507-512.
- Fiala-Medioni A., Copello M., Colomines J.C.** (1983). Relations trophiques entre huître et milieu; influence de la concentration et de la taille des particules. Bases biologiques de l'aquaculture, IFREMER, Montpellier. Actes de colloques, 1 : 63-74.
- Fuhrman J.A. & Azam F.** (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia Antarctica and California. *Appl Environ Microbiol*, 39 : 1085-1095.
- Hawkins A.J.S., Bayne B.L., Bougrier S., Héral M., Iglesias J.I.P., Navarro E., Smith R.F.M., Urrutia M.B.** (1998). Some general relationships in comparing the feeding physiology of suspension-feeding bivalve molluscs. *J Exp Mar Biol Ecol*, 219 : 87-103.
- Héral M.** (1987). Shellfish Culture Development and Management – Aquaculture International Seminar, La Rochelle 4-9 mars 1985. Evaluation of the carrying capacity of molluscan shellfish ecosystems. IFREMER, Brest.
- Kreeger D.A. & Newell R.I.E.** (1996). Ingestion and assimilation of carbon from cellulolytic flagellates by the mussels

Geukensia demissa and *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *Aquat Microb Ecol*, 11 : 205-214.

Le Gall S., Bel Hassen M., Le Gall P. (1997). Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas* : protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Mar Ecol Prog Ser*, 152 : 301-306.

Le Gall J.L. & Raillard O. (1988). Influence de la température sur la physiologie de l'huître *Crassostrea gigas*. *Océanis*, 14 : 603-608.

Newell R.I.E. & Jordan S.J. (1983). Preferential ingestion of organic material by the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser*, 13 : 47-53.

Ohman M.D. & Snyder R.A. (1991). Growth kinetics of the omnivorous oligotrich ciliate *Strombidium sp.* *Limnol Oceanogr*, 36(5) : 922-935.

Pastoureaud A., Héral M., Prou J., Razet D., Russu P. (1996). Particle selection in the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) studied by pigment HPLC analysis under natural food conditions. *Oceanol Acta*, 19 : n°1.

Pouvreau S. (1999). Etude et modélisation des mécanismes impliqués dans la croissance de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera*, au sein de l'atoll de Takapoto (Polynésie Française). Thèse Doctorat ès Sciences Rennes, ENSA de Rennes.

Prins T.C., Smaal A.C., Pouwer A.J., Dankers N. (1996). Filtration and resuspension of particulate matter and phytoplankton on an intertidal mussel bed in the Oosterschelde estuary (SW Netherlands). *Mar Ecol Prog Ser*, 142 : 121-134.

Ravail-Légrand B., Robert J.M., Maestrini S.Y., Héral M. (1993). Variabilité à court terme,

liée à l'onde de marée, des propriétés physico-chimiques et biologiques des eaux du panache de dilution de la Charente, en période estivale. *J Rech Océanogr*, 18 : 64-66.

Ren J.S., Ross A.H., Schiel D.R. (2000). Functional descriptions of feeding and energetics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *Mar Ecol Prog Ser*, 208 : 119-130.

Riisgard H.U. (2001). On Measurement of filtration rates in bivalves – The stony road to reliable data : review and interpretation. *Mar Ecol Prog Ser*, 211 : 275-291.

Robert J.M. (1983). Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement : utilisation de l'azote par les diatomées dominantes. Thèse Doctorat ès Sciences Nantes, Université de Nantes.

Servais P. & Lavandier P. (1995). Mesures de production bactérienne par incorporation de thymidine et de leucine marquées : discussion des protocoles expérimentaux et exemples d'application. *Oceanis*, 21, 1 : 161-189.

Smaal A.C. & Haas H.A. (1997). Seston Dynamics and Food Availability on Mussel and Cockle Beds. *Estuar Coast Shelf Sci*, 45 : 247-259.

Zanette Y. (1980). Intervention de quelques facteurs dans l'évolution de la biomasse des claires de Marennes-Oléron. *Cons Inst Exp Mer, C. M., L*, 45 : 11.

Zubkov M.V. & Sleight M.A. (1995). Ingestion and assimilation by marine protists fed on bacteria labeled with radioactive thymidine and leucine estimated without separating predator and prey. *Microb Ecol*, 30 : 157-170.

Annexe 1

Le FAG est un milieu gélosé pour culture de bactéries marines.

Pour 1 litre de milieu FAG :

1-	<u>Peptone bactérien</u>	<u>3 g</u>
2-	<u>Extrait de levure</u>	<u>1 g</u>
3-	<u>Sulfate d'ammonium</u>	<u>1 g</u>
4-	<u>Fer-séquestrène</u>	<u>6 mg</u>
5-	<u>Glycérophosphate de sodium</u>	<u>25 mg</u>
6-	<u>Eau de mer filtrée</u>	<u>500 mL</u>
7-	<u>eau milliQ</u>	<u>1000 mL</u>

Puis le PH est ajusté entre 7,4 et 7,8, enfin le milieu est autoclavé.

Annexe 2

Dans les deux circuits expérimentaux utilisés pour mesurer l'ingestion des protozoaires par l'huître *Crassostrea gigas*, les bacs individuels contenant les huîtres ont des structures identiques. La seule différence est pour les bacs de mesure du circuit expérimental de l'IFREMER Argenton : ils sont complètement fermés à l'air. Une fois l'huître placée dans le bac, celui-ci est rempli de telle manière qu'aucune bulle d'air ne reste.

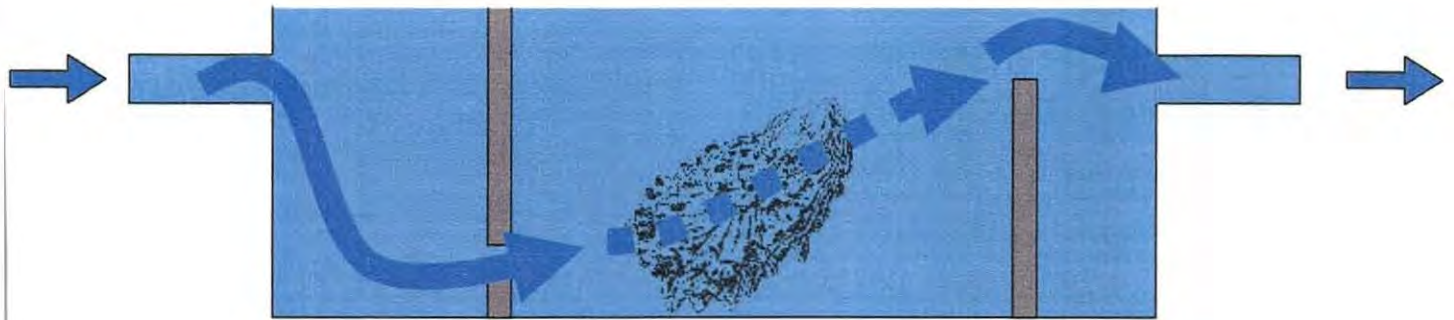


Figure 15 : Description du dispositif expérimental en flux laminaire pour les mesures écophysiologiques. Les flèches bleues indiquent le mouvement du mélange eau de mer et protozoaires. Les biodépôts restent sur place et sont facilement prélevés.