

L'Institut Agro Rennes-Angers

☐ Site d'Angers ☒ Site de Rennes

Année universitaire : 2023 - 2024

Spécialité :

Ingénieur agronome

Spécialisation (et option éventuelle) :

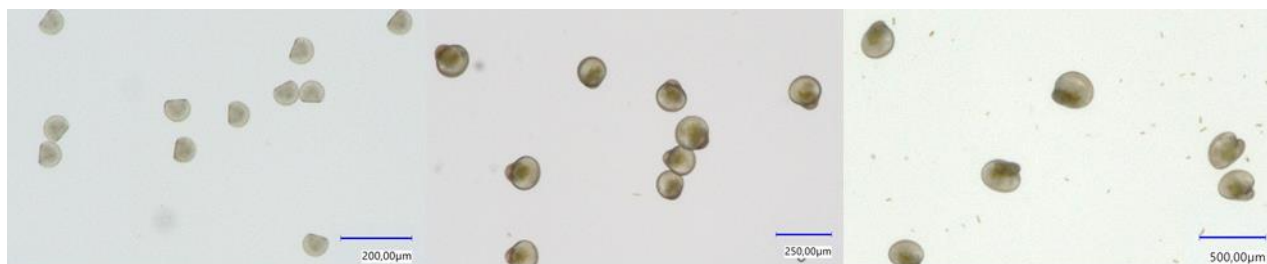
Sciences halieutiques et aquacoles, préparée à
l'Institut Agro Rennes-Angers (option
Aquaculture)

Mémoire de fin d'études

d'ingénieur de Bordeaux Sciences Agro (École nationale supérieure des sciences agronomiques
de Bordeaux)

Optimisation de l'élevage larvaire expérimental d'huîtres creuses, *Magallana* (ex *Crassostrea*) *gigas*, en vue de limiter le développement de communautés bactériennes pathogènes

Par Sarah LE GALL



Soutenu à Rennes le 10/09/2024

Président et enseignant référent : Hervé LE BRIS, Institut Agro de Rennes UMR DECOD

Maître de stage : Dimitri MORIN, Ifremer Unité EMMA Plateforme PMMLT

Autres membres du jury : Grégory RAYMOND, Institut Agro de Rennes Plateau Aquacole
Expérimentation et Formation et Stéphane POUVREAU, Ifremer Laboratoire LEMAR

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de
Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

☒ Non ☐ Oui si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du maître de stage ⁽²⁾ : 22/08/2024 D.Morin : 
(ou de l'étudiant-entrepreneur)

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous
(droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur ⁽³⁾ **Le Gall Sarah**

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☒ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

- ☐ la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾
- ☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- ☒ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) ☐ accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-BY-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur : 30/07/2024 

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☒ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- ☐ la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾
- ☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- ☒ la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant : 7 novembre 2024 

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation de l'Institut Agro Rennes-Angers s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier mon tuteur, Dimitri Morin de m'avoir accompagnée avec bienveillance tout au long de ce stage. Ses conseils et sa disponibilité m'ont été d'une grande aide. Je tiens également à remercier toute l'équipe de la PMMLT, Anne, Frédéric, Maïlou, Miguel, JC, Jean-Pierre et Pascal de m'avoir chaleureusement accueillie et pour les bons moments passés ensemble. Merci aussi à eux de s'être parfois occupés des élevages larvaires du projet les week-ends et d'avoir poursuivi l'élevage en micro-nurseries.

Un énorme merci à Cyril Noël pour avoir traité les données de bioinformatiques malgré les divers problèmes techniques rencontrés et pour sa pédagogie lors de ma formation.

Je remercie également Lionel Degremont et Elise Maurouard pour m'avoir appris les rudiments de la conduite d'un élevage larvaire d'huîtres creuses.

Merci aussi à Delphine Tourbiez et Maelann Roger de m'avoir encadrée lors de mes manipulations en biologie moléculaire, et pour leurs précieux conseils techniques.

Je tiens également à remercier Benjamin Morga, Christophe Stravakakis, Dimitri Morin, Frédéric Girardin et Lionel Degremont pour la relecture du mémoire et pour leurs expertises.

Table des matières

I. Introduction générale.....	1
1. L'importance de l'ostréiculture en France et ses défis contemporains	1
a. Les chiffres clés de la production ostréicole	1
b. Les causes de mortalités et de malformations des larves d'huîtres	1
c. Le projet ALADIN	3
2. Le sujet d'étude	4
II. Matériels et méthodes	6
1. Matériel biologique	6
2. Designs expérimentaux	6
3. Indicateurs de performances larvaires	9
4. Echantillonnage pour le metabarcoding	9
5. Metabarcoding 16S: extraction d'ADN, PCR et séquençage long-read	10
6. Analyses en bio-informatiques	11
7. Analyses statistiques	12
a. Données de performances larvaires	12
b. Données de metabarcoding	12
III. Résultats	14
1. Elevage larvaire n°1 : du 20 février au 8 mars 2024	14
a. Effet des trois facteurs sur les performances larvaires	14
b. Caractérisation des communautés bactériennes	17
2. Elevage larvaire n°2 : du 15 avril au 3 mai 2024	22
a. Effet des 3 facteurs sur les performances larvaires	22
IV. Discussion	25
1. Les facteurs influençant les différences de survie et d'éclosion entre les élevages larvaires	25
2. L'analyse des performances larvaires pour les 2 élevages	28
a. Le taux d'éclosion	28
b. La survie larvaire	28
c. La croissance	29
d. La fixation	30
3. Caractérisation des communautés bactériennes	31
4. Voies d'optimisation et implications pour la PMMLT	32

a. Par les facteurs fixés étudiés.....	32
b. Par d'autres facteurs non contrôlés	33
Conclusion, perspectives et limites de l'étude.....	34
Bibliographie.....	35
Annexes	1

Liste des abréviations

ACP : Analyse en composantes principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALADIN : Amélioration des performances en élevages larvaires d'invertébrés marins (Projet)

ANOVA : Analyse de Variance

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ASIM : Unité Adaptation Santé des Invertébrés Marins

CCEM : Unité Contamination Chimique des Ecosystèmes Marins

CE50 : Concentration Efficace 50%

DHA : Acide Docosahexaénoïque

DL50 : Dose létale 50%

EAC : Environmental Assessment Criteria

EDM : Eau de mer

EMMA : Unité Expérimentale Mollusques Marins Atlantique

EPA : Acide Eïcosapentaénoïque

ETM : Eléments-Traces Métalliques

HDPE : Polyéthylène Haute Densité

IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

INSEV3i : Utilisation d'INcubateurs in situ pour l'évaluation de la QUALité chimique des eaux côtières et de son impact sur le développement et la survie des huîtres

LEAD-NC : Unité de Recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable de Nouvelle Calédonie

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

NMDS : Positionnement Multidimensionnel Non-Métrique

OsHV-1 : Ostreid Herpes Virus de type 1

PERMANOVA : ANalyse de VAriance par PERMutations

PCR : Polymerase Chain Reaction

PP : Polypropylène

PVC : Chlorure de Polyvinyle

PMMB : Plateforme Expérimentale Mollusques Marins de Bouin

PMMLT : Plateforme Expérimentale Mollusques Marins de La Tremblade

RCC : Roscoff Culture Collection

REML : Maximum de Vraisemblance Restreinte

SAMBA : Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses workflow

SeBiMER : Service de Bioinformatique de l'Ifremer

Glossaire

Barcode : lors d'un séquençage Nanopore plusieurs échantillons doivent être séquencés, les barcodes sont des séquences d'ADN d'une trentaine de paires de bases qui vont se fixer aux extrémités des amplicons et permettre de discriminer les échantillons une fois poolés.

Basecalling : conversion des données permettant de traduire les signaux électriques produits par le séquenceur en nucléotides.

Base de référence : base de données non exhaustive comprenant les séquences de plusieurs taxons.

Boxplot : (en français boîte à moustaches) graphique en forme de boîte permettant de représenter plusieurs statistiques descriptives comme la médiane, le minimum, le maximum, le premier quartile et le troisième quartile.

Cluster : regroupement d'ordinateurs permettant de dépasser les limitations d'une machine en termes de puissance de calcul.

Demultiplexing : action consistant à regrouper les séquences associées à chaque échantillon grâce aux barcodes fixés.

Flowcell : technologie contenant des nanopores chargés électriquement par lesquels les brins d'ADN passent. Lors de ce passage, en fonction de la nature des nucléotides la perturbation électrique sera différente, l'appareil déterminera alors la séquence d'ADN associée sous forme de signaux électriques.

Ligase : enzyme liant les extrémités 3' OH et 5'phosphate de deux nucléotides par des liaisons phosphodiesters.

Macro : programme informatique permettant d'automatiser des commandes

Métabarcoding : méthode permettant « l'identification de l'ensemble des espèces (ou niveaux taxonomiques supérieurs) sur la base des gènes marqueurs amplifiés et séquencés à partir de l'ADN total extrait d'un échantillon environnemental (sol, eau, fèces) ou d'un mélange de plusieurs spécimens » (Taberlet et al., 2012).

Outliers : données considérées comme extrêmes car elles s'éloignent de manière anormale des autres valeurs.

Polymerase : enzyme permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire lors de la phase d'élongation en PCR.

Pooling : fécondation effectuée en regroupant les gamètes mâles et femelles au sein d'un même béccher.

Salinité : « La grandeur « salinité » représente la masse de sels dissous contenue dans un kilogramme d'eau de mer. La salinité étant un rapport entre deux grandeurs de mêmes unités, elle s'exprime sans indication d'unité » (Ifremer, 2020)

Séquençage long-read : technique de séquençage permettant de séquencer l'ensemble des régions du gène marqueur et ainsi d'obtenir une identification à une échelle taxonomique plus fine qu'en séquençage short read.

Stripping : incision effectuée sur les gonades de façon à collecter les gamètes ainsi libérées (reproduction non naturelle).

Thermocycleur : appareil permettant de programmer des cycles à différentes températures et ainsi, d'automatiser la réaction PCR.

Ultrafiltration : procédé utilisé dans le traitement de l'eau permettant de filtrer à 0,01 µm les colloïdes, les bactéries, les virus et les macromolécules organiques

Workflow : suite d'étapes s'enchainant de manière automatique lié au traitement de données.

Liste des figures

Figure 1 – Design expérimental commun aux deux élevages larvaires	1
Figure 2 – Etapes d'un élevage larvaire d'huîtres creuses, <i>M.gigas</i> , en se basant sur son cycle de développement	8
Figure 3 – Etapes du protocole de Polymerase Chain Reaction suivi pendant cette étude.....	11
Figure 4 – Protocole SQK NBD 114-24 adapté pour le kit Native Barcoding 24 V14.....	11
Figure 5 – Moyenne du taux d'éclosion pour la condition avec antibiotiques (A) et sans antibiotiques (PA). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.....	14
Figure 6 –Taux de survie moyen (en %) par essai pour le premier élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9).....	15
Figure 7 – Taux de fixation moyen (en %) par essai pour le premier élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9).....	16
Figure 8 – Taille moyenne des larves (en μm) en fonction du jour d'élevage et des essais. La moyenne a été calculée sur 90 larves, soit 30 larves par réplicat. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.....	17
Figure 9 – Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) représentant les distances de Bray Curtis entre 36 échantillons selon la variable « Compartiment ».....	18
Figure 10 – ACP des 17 échantillons d'EDM en fonction des variables « Antibiotique » et « Jour d'élevage ». Les 10 genres les plus corrélés avec les axes sont représentés sur le cercle des corrélations.....	20
Figure 11 – ACP des 9 échantillons de phytoplancton en fonction de la variable « Jour d'élevage ». Les 10 genres les plus corrélés avec les axes sont représentés sur le cercle des corrélations....	21
Figure 12 – Abondance relative en pourcent des genres bactériens les plus présents dans chaque échantillon.....	21
Figure 13 – Taux d'éclosion moyen pour la condition avec antibiotiques (A) et sans antibiotiques (PA). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.....	22
Figure 14 – Taux de survie moyen (en %) par essai pour le second élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9).....	23
Figure 15 – a) Taux de fixation moyen (en %) par essai. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9). b) Taux de fixation moyen (en %) en fonction de l'interaction entre le facteur « Antibiotique » (n = 36) et le facteur « Changement d'eau » (n = 36).....	24
Figure 16 – Taille moyenne des larves (en μm) en fonction du jour d'élevage et des essais. La moyenne a été calculée sur 90 larves, soit 30 larves par réplicat. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.....	25

Liste des tableaux

Tableau 1 - Nombre d'échantillons prélevés pour les essais A3x100 et PA3x100 destinés au metabarcoding 16S.....	10
Tableau 2 - Diversité alpha pour les 3 compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton ». Les données entre parenthèses représentent les écarts types à la moyenne.....	18
Tableau 3 - Diversité alpha en fonction des variables « Antibiotique » et « Jour d'élevage » au sein des trois compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton ». Les données entre parenthèses représentent les écarts types à la moyenne.....	19
Tableau 4 - Performances larvaires d'élevages conduits à la PMMLT entre 2021 et 2024.....	26

I. Introduction générale

1. L'importance de l'ostréiculture en France et ses défis contemporains

a. Les chiffres clés de la production ostréicole

En 2022, la production aquacole française représentait 183 746 tonnes, dont 81 887 tonnes d'huîtres soit plus de 40% de la production. Les huîtres comptent parmi les espèces aquacoles les plus consommées en France mais également parmi les espèces les plus exportées en valeurs, témoignant de leur importance économique dans le secteur de l'aquaculture (Delorme, 2024). L'ostréiculture est essentiellement basée sur la production de l'huître creuse, *Magallana (ex Crassostrea) gigas*, importée en France en 1971 à la suite d'épizooties successives sur *Ostrea edulis*, espèce autochtone, et *Crassostrea angulata* (Grizel & Heral, 1991). Pour se fournir en naissains, les ostréiculteurs se tournent soit vers le captage naturel soit vers les écloséries. Si dans les années 2000 la part de naissains d'écloséries avoisinaient les 15% (Waechter et al., 2002), en 2020 on se rapproche des 70% (Prost, 2021). Ainsi, les ostréiculteurs s'affranchissent des variabilités du captage, fortement dépendant des paramètres environnementaux du milieu, ce qui instaure une stabilité d'approvisionnement. Ils peuvent également faire le choix de se fournir en naissains triploïdes permettant d'étaler les ventes tout au long de l'année (Rico Villa, 2009).

b. Les causes de mortalités et de malformations des larves d'huîtres

Cependant, faire appel en masse aux écloséries entraîne une certaine dépendance des ostréiculteurs à cette production. De plus, des mortalités récurrentes ainsi que des malformations larvaires ont été observées ces dernières années dans les écloséries commerciales comme dans celles expérimentales. Les causes de ces mortalités et malformations sont multifactorielles : **Éléments-traces métalliques (ETM), pesticides, microplastiques ou encore bactéries et virus.**

En effet, la présence d'**Éléments-Traces Métalliques (ETM)** a été identifiée de manière récurrente dans l'eau de mer alimentant la station expérimentale de Bouin (Stavrakakis, 2024). Il a été montré qu'une contamination au cuivre du phytoplancton entraîne une bioaccumulation de ce cuivre dans les tissus du naissain d'huître. Cela conduit à une diminution de l'indice de chair potentiellement engendré par un changement de composition des acides gras du phytoplancton (Akcha et al., 2022). Si cette étude se concentrait sur les effets d'un seul ETM sur le stade post-larve, il serait alors pertinent de se demander : « *quel pourrait être l'impact d'un tel ETM sur le stade larvaire ?* ». Lors de travaux de thèse réalisés par Levallois en 2023, les effets d'un autre ETM, l'aluminium, ont été étudiés en se focalisant sur l'effet du cocktail de métaux libéré par une anode galvanique à base d'aluminium (Al). Il a été mis en évidence une concentration efficace 50% (CE50) de 190 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les anodes galvaniques à base d'Al. L'effet toxique a été évalué par le pourcentage de larves-D anormales obtenu à la fin de l'embryogénèse. De plus, à partir de 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'Al, concentration que l'on peut trouver dans les milieux côtiers pollués, un développement anormal des larves D est observé.

Un autre facteur possible de mortalité mis en avant sont les **pesticides**. Le projet « Utilisation d'INcubateurs *in situ* pour l'évaluation de la QUALité chimique des eaux côtières et de son impact sur le développement et la survie des huîtres » (INSEV3i), mené entre 2013 et 2015, a montré la présence de contaminants chimiques dans les eaux alimentant la Plateforme Mollusques Marins de Bouin (PMMB) de l'Ifremer (Akcha et al., 2012). Parmi les contaminants les plus présents, le nicosulfuron a été identifié à des concentrations élevées, avec une concentration maximum de $0,08 \mu\text{g.L}^{-1}$, et de manière fréquente. De plus, l'impact du nicosulfuron, et de 5 autres pesticides, a été testé sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse. Lors de cette étude, une LOEC, plus faible concentration induisant un effet, à $0,015 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été déterminée. Ainsi, l'eau alimentant la station de Bouin dépasse la LOEC alors même que cette molécule a un effet négatif avéré sur la croissance des larves et la proportion de larves-D malformées (Bringer et al., 2021). La même étude avance qu'une quantité maximum de $0,019 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été détectée en 2019 à l'embouchure de l'estuaire de la Seudre, pouvant alors contaminer l'eau de mer pompée par la Plateforme Mollusques Marins de la Tremblade (PMMLT) et donc les espèces produites à la plateforme. En 2014, une autre analyse portée par Barranger et al. et menée en partie à la PMMLT a vu le jour. Celle-ci s'est intéressée aux effets génotoxiques du diuron, pesticide retrouvé dans le bassin Marennes-Oléron. Pour cela, des huîtres creuses ont été exposées à des concentrations de diuron proches de celles du milieu, environ $0,51 \mu\text{g.L}^{-1}$, pendant la période de gamétogénèse. A l'issue de cette étude, plusieurs conclusions ont pu être tirées. Premièrement, les spermatozoïdes des huîtres creuses exposées au diuron présentaient des cassures de brins d'ADN. Deuxièmement, la transmission de cet ADN endommagé pourrait être responsable des anomalies observées sur la descendance. En effet, les larves issues des géniteurs exposés au diuron présentaient des taux de fécondation moindres, une croissance ralentie et des malformations comparées aux larves d'huîtres creuses saines.

Pour ajouter à cela, même à un stade larvaire plus avancé les pesticides ont un effet négatif sur les larves. En effet, d'après une publication de Sol Dourdin et al. en 2023, les larves exposées à des cocktails de 18 pesticides se métamorphoseraient tardivement et ce bien qu'elles aient atteint le stade pédivéligère, stade où elles passent de la phase planctonique à la phase benthique.

Les **microplastiques** sont une autre source de perturbations du développement chez les huîtres, leurs tailles facilitant leur ingestion. Ces petites particules sont le fruit de la dégradation de macroplastiques dans le milieu marin ou bien d'une contamination par la production de plastiques de cette taille, notamment pour le textile synthétique. De plus en plus d'études s'intéressant aux effets des microplastiques sont parues, à la lumière d'une production toujours en hausse. De plus, 92% du plastique dans les océans serait des microplastiques (Eriksen et al., 2014). La thèse de Bringer en 2022 s'est notamment intéressée aux effets des microplastiques retrouvés dans les Pertuis Charentais sur les stades précoces et tardifs de l'huître creuse. Les microplastiques étudiés sont le PP, le PVC et l'HDPE, polymères constituant respectivement les coupelles, les tubes de captage et les poches ostréicoles. Même si d'après l'UICN (2017), la contamination du milieu marin par les microplastiques est à 98% d'origine terrestre, ces 3 polymères font partie des principaux constituants pour tous types de plastiques (Boucher &

Friot, 2017). De plus, les Pertuis Charentais concentrent une grande partie de la production ostréicole, de ce fait la contribution de source marine à la pollution plastique peut être plus importante dans cette zone. L'auteur de la thèse a alors observé que ces polymères favorisaient la proportion de larves-D malformées et que pour le stade pédivéligère il y avait une réduction du taux de fixation et de la croissance.

Si les publications discutant des effets des ETM, des pesticides et des microplastiques ne mentionnent pas directement des mortalités accrues malgré des effets avérés sur la croissance et le développement, ce n'est pas le cas des publications traitant **des micro-organismes**. Il est bien établi que les micro-organismes peuvent provoquer des mortalités significatives tant dans les élevages que dans le milieu naturel. C'est notamment le cas du **virus** *ostreid herpesvirus* type 1 (OsHV-1) ou des **bactéries** du genre *Vibrio*, comme *V. coralliilyticus* (Elston et al., 2008), *V. tubiashii* (Tubiash et al., 1965) et *V. splendidus* (Sugumar et al., 1998). En effet, pour sa publication Estes a isolé des souches de bactéries présentes en élevage larvaire d'huîtres creuses et elle a identifié 3 souches hautement pathogènes pouvant être assimilées au genre *Vibrio*. La pathogénicité de ces souches était observée au travers de la motilité et de la mortalité des larves infectées dont les signes apparaissaient dès les premières 24H de la contamination, avec une dose létale 50 (DL50) à partir de $10^{4,6}$ UFC.mL⁻¹ (Estes et al., 2004). Concernant OsHV-1, le stade larvaire est le stade le plus sensible chez l'huître creuse. La première observation de OsHV-1 chez cette espèce en France date de 1992, à la suite de fortes mortalités dans les éclosiers françaises comprises entre 90% et 100% (Renault et al., 1994). Aujourd'hui, plusieurs stratégies sont étudiées pour atténuer les effets de ce virus comme le développement de programme de sélection ou encore l'optimisation des pratiques d'élevage (Rodgers et al., 2019).

c. Le projet ALADIN

C'est dans ce contexte que le projet Amélioration des performances en élevages larvaires d'invertébrés marins (ALADIN) porté par l'Ifremer, et notamment par l'unité Expérimentale Mollusques Marins Atlantique (EMMA), a vu le jour (Annexe I). L'unité EMMA a pour rôle de « proposer des moyens expérimentaux pertinents pour l'ensemble des unités de recherche travaillant sur les mollusques marins » (Ifremer, 2023). Cette unité intègre deux plateformes expérimentales mollusques marins à savoir la PMMLT, située à la Tremblade en Charente-Maritime et la PMMB, située à Bouin en Vendée. A la suite de mortalités observées en élevage larvaire d'huîtres creuses sur les deux plateformes, deux analyses des causes, réalisées en concertation avec les équipes concernées (Morin et al., 2023 ; François et al., 2023), ont permis d'identifier plusieurs causes pouvant provoquer ces mortalités. Parmi ces causes potentielles, les deux plus probables ont été étudiées lors du projet ALADIN, à savoir les ETM et les communautés bactériennes. L'IFREMER étant divisé en plusieurs unités, ce projet fédère 5 unités aux compétences complémentaires. Des mortalités récurrentes ayant été également observées en production expérimentale d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, à l'Alfred Wegener Institut (AWI) et l'Université de Rostock en Allemagne, ces deux entités apportent leur expertise sur le modèle de l'huître plate.

En ce qui concerne les ETM, les expérimentations sont réalisées au sein des installations de la plateforme expérimentale de Bouin (PMMB) par l'unité Contamination Chimique des Ecosystèmes Marins (CCEM) et l'unité EMMA fournit les moyens expérimentaux. L'unité CCEM « développe des connaissances scientifiques sur le transfert et les effets biologiques des contaminants chimiques dans les écosystèmes marins » (IFREMER, 2024). Dans le cadre du projet, l'unité CCEM est en charge du volet analytique, de la réalisation et du suivi de tests écotoxicologiques.

En ce qui concerne les communautés bactériennes, les expérimentations sont effectuées au sein des installations de la PMMLT en collaboration avec l'unité Adaptation Santé des Invertébrés Marins (ASIM) et l'unité EMMA fournit les moyens expérimentaux. L'unité ASIM « a pour principaux objectifs de comprendre voire anticiper les émergences d'organismes pathogènes et de comprendre comment les invertébrés marins s'adaptent aux changements environnementaux, la diminution de la biodiversité et l'altération de la qualité des écosystèmes » (IFREMER, 2024). Lors du projet, l'unité ASIM s'occupe du volet zootechnique, du plan d'expérimentations et d'échantillonnages et des analyses en metabarcoding.

Enfin, l'unité SeBiMER est en charge de la définition des plans expérimentaux de séquençage et de l'analyse bio-informatique des données de metabarcoding.

Quant à la cinquième unité, l'unité LEAD-NC, ayant déjà conduit une démarche similaire sur leurs élevages de crevettes, l'unité agit en tant qu'expert pour partager son expérience.

2. Le sujet d'étude

Le sujet d'étude correspond au volet « communauté bactérienne » du projet ALADIN, dans lequel j'ai travaillé au sein de la PMMLT (unité EMMA) en collaboration avec les unités ASIM et SeBiMER. La problématique du volet découle d'un questionnement autour des causes pouvant favoriser ou desservir le développement de bactéries. Ces communautés bactériennes peuvent provenir de différents compartiments : de l'eau de mer (EDM), en fonction de sa qualité, du phytoplancton, en fonction des conditions de culture et du microbiote des parents. En outre, les compartiments EDM et phytoplancton ont déjà été identifiés comme principales sources d'infection par des bactéries pathogènes par une publication de Genard en 2011. Pour lutter contre ces pathogènes, les éclosiers se tournent vers les antibiotiques dont l'usage peut devenir systématique lorsque les lots sont sensibles. C'est notamment le cas des lots cryoconservés. Cependant, l'utilisation d'antibiotiques développerait une antibiorésistance (Laroche et al., 2018) et perturberait le microbiome de l'huître ce qui pourrait conduire à une diminution du succès de la métamorphose (Pernet et al., 2006). La surconsommation des antibiotiques que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire a favorisé l'apparition de souches bactériennes résistantes dans tous les écosystèmes, les rendant ainsi moins efficaces. Cette question de santé publique est au cœur des préoccupations de l'approche « One Health » qui consiste à lier santé humaine, animale et environnementale en une seule santé unifiée. Ainsi, cette approche globale a conduit en France à la mise en place de plan de prévention et de surveillance. Par la suite en janvier 2022, le règlement 2019/6 du Parlement européen et du Conseil a été mis en vigueur. Parmi d'autres mesures, celui-ci stipule que « les médicaments

antibiotiques ne devraient être utilisés à des fins prophylactiques que dans des cas exceptionnels et uniquement pour un animal déterminé ». Il semble alors impératif pour les élevages de trouver des alternatives à l'utilisation de ces produits, notamment pour ceux qui en faisaient une utilisation à titre prophylactique. De ce fait, jouer sur les méthodes d'élevage plutôt que recourir aux antibiotiques pourrait être une voie d'amélioration des performances larvaires ainsi qu'une manière de freiner le développement de pathogènes.

Des recommandations zootechniques ont été formulées à travers un guide pratique édité par la FAO en 2004, notamment concernant le changement d'eau des bacs et les densités d'élevages. Les auteurs préconisent un changement d'eau tous les 48h et des densités d'élevage comprises entre 10 à 20 larves.mL⁻¹ lorsque les larves sont au stade « larve D ». Ils s'appuient notamment sur des expérimentations réalisées en 1977 lors desquelles ils avaient constaté que la croissance était fonction décroissante de la densité larvaire (Helm & Millican, 1977). Depuis 2004, peu de publications se sont intéressées aux effets des paramètres zootechniques en élevage larvaire de bivalves.

En 2008, un manuel technique sur la production en éclosiers d'huîtres, applicable à toutes les espèces du genre *Crassostrea*, est rédigé (Wallace et al., 2008). De nouveau, les auteurs recommandent des densités d'élevage au premier stade larvaire de 10 larves.mL⁻¹ et un changement d'eau toutes les 48h. Cependant, cette fois-ci un changement d'eau toutes les 24h est préconisé à mesure que les larves approchent de la fin de leur cycle larvaire. En 2009, une publication portée par Antonio et al. a étudié les effets de la salinité, de la densité et du changement d'eau sur la croissance et la survie de l'huître de palétuvier (*Crassostrea rhizophorae*). Concernant le changement d'eau, ils avaient sélectionné 3 modalités : toutes les 24h, toutes les 48h et toutes les 72h. A la fin de l'élevage ils ont conclu qu'un changement d'eau toutes les 48h ou 72h offrait une meilleure survie et une meilleure croissance aux larves. Pour ce qui est de la densité, lorsque la larve était au stade de « larve-D », les bacs d'élevage contenaient soit 3, 6 ou 12 larves.mL⁻¹ et pour une larve umbonée, environ après 7 jours d'élevage, les bacs contenaient 2, 4 ou 8 larves.mL⁻¹. Au stade de « larve-D », ils ont observé que la croissance était favorisée lorsque les densités étaient les plus faibles. Aucune tendance n'a pu être dégagée de la croissance au stade de larve umbonée. Ainsi, les mêmes conclusions ont été tirées par les trois publications sur des espèces d'huîtres différentes mais appartenant au même genre. Une mise à jour des recommandations au regard des préoccupations actuelles semble pertinente.

C'est la raison pour laquelle, l'objectif de ce stage est d'optimiser l'élevage larvaire expérimental d'huîtres creuses (*Magallana gigas*), en vue de limiter le développement de communautés bactériennes pathogènes. Pour cela, deux sous-objectifs ont été déterminés. Le premier est la mise en évidence de l'effet des optimisations zootechniques sur les performances larvaires. Le second est la caractérisation des communautés bactériennes présentes dans 3 compartiments : EDM, larves et phytoplancton en fonction du traitement antibiotiques en utilisant le metabarcoding 16S. Les hypothèses suivantes ont pu être avancées :

- (1) Les conditions favorisant les performances larvaires pourraient être l'utilisation d'antibiotiques, une densité réduite de moitié et un changement d'eau quotidien des bacs.

- (2) Les communautés bactériennes varieraient en diversité et en abondance en fonction des conditions d'élevage et du temps d'élevage mais également en fonction des compartiments étudiés.

II. Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Les larves d'huîtres creuses, *Magallana gigas*, ont été produites à partir des lots de géniteurs en maturation à la PMMLT. Ces géniteurs ont été maintenus dans des clayettes, placées dans des auges de 250L à flux ouvert. La gamétogénèse a été réalisée en maintenant les géniteurs à une température de 20°C et en leur fournissant une alimentation *ad libitum*, principalement composée de *Skeletonema marinoi* (RCC 75) cultivée à la PMMLT. Les géniteurs utilisés étaient âgés de 2 ans et pesaient entre 50 et 60 grammes.

Lors du premier élevage larvaire, les géniteurs provenaient du lot ASI-LT, adulte standardisé Ifremer croisé à la Tremblade avec des géniteurs d'écloserie d'Argenton, et avaient 8,5 semaines de maturation. La ponte a été effectuée le 20/02/2024.

Lors du deuxième élevage larvaire, les lots ASI, adulte standardisé Ifremer, et LF-PMMLT, adultes issus de la reproduction d'huîtres venant du parc ostréicole nommé la Floride (commune de la Tremblade), ont été utilisés et avaient 6,5 semaines de maturation. La ponte a été effectuée le 15/04/2024, avec 20 géniteurs, 10 mâles et 10 femelles.

Dans les deux cas, les gamètes ont été récupérés par stripping et une fécondation en masse a été réalisée en regroupant les ovocytes de toutes les femelles qui ont été fécondés par un mélange de sperme de tous les mâles (pooling). Enfin, après la fécondation, 3 000 000 d'ovocytes/embryons ont été ajoutés dans chaque bac d'élevage larvaire.

En ce qui concerne l'élevage larvaire, celui-ci s'est fait en statique dans des bacs cylindro-coniques de 30L. La température de la salle était thermorégulée à 24°C afin de maintenir la température de l'eau de mer proche de cette valeur. Au préalable, l'eau entrant dans la plateforme expérimentale est filtrée sur un média de type verre avec une finesse de filtration de 5 à 10 microns puis elle passe par un stérilisateur UV-C de 80 mJ.cm⁻² (Girardin & Morin, 2020). Ensuite, l'eau de mer rentrant dans la salle d'élevage traverse un stérilisateur UV-C à une dose de 33 mJ.cm⁻² puis 2 filtres mécaniques, un filtre à poche de 1 µm et un filtre à cartouche de 1 µm. Les larves étaient alimentées quotidiennement par ajout de *Tisochrysis lutea* (RCC 1349) puis *Thalassiosira weissglogi* (RCC 76) était ajouté à la ration à partir de J5 (Annexe II). Avant cela les larves ne peuvent pas ingérer cette espèce de phytoplancton en raison de sa taille égale à 10 µm par rapport à *Tisochrysis lutea* qui mesure en moyenne 6 µm (RCC). L'O₂ était contrôlé par un système de bullage d'air dans les bacs pour obtenir entre 6,5 et 7,5 mg/L d'oxygène dissous (Helm et al., 2004).

2. Designs expérimentaux

Le premier élevage s'est déroulé du 20 février au 8 mars 2024 et le second du 15 avril au 03 mai 2024. Le second élevage est une reproduction du premier, c'est-à-dire que les 3 mêmes facteurs ont été testés. Ainsi, le design expérimental suit la Figure 1. La disposition des bacs dans la salle était cependant différente entre les deux élevages (Annexe III et IV)

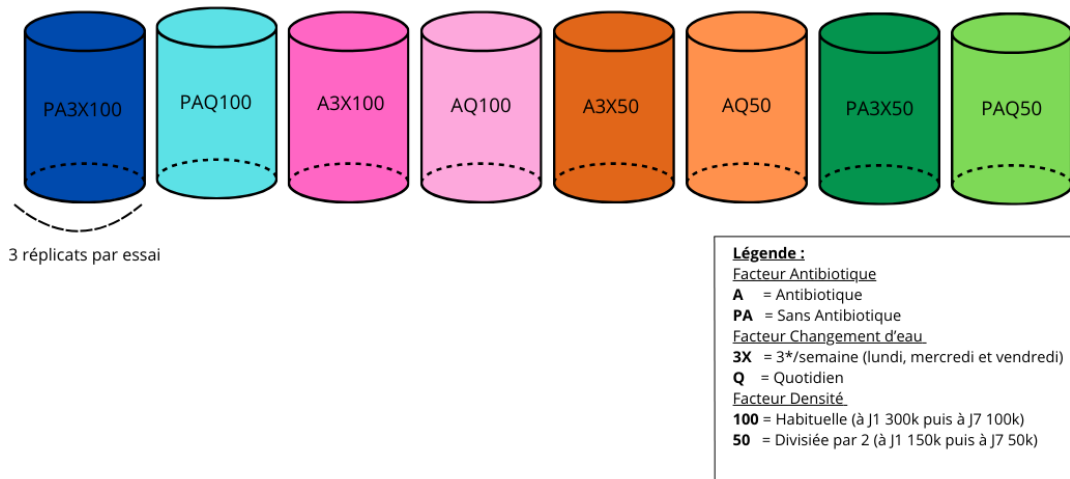


Figure 1 - Design expérimental commun aux deux élevages larvaires

Les trois facteurs testés lors des élevages comportaient 2 modalités. Pour obtenir un plan complet, il faut alors avoir un croisement de chacune de ces modalités, soit un total de 8 essais (2^3). Enfin, chaque essai était répliqué par trois bacs larvaires de 30L, soit un total de 24 bacs utilisés pour chaque élevage.

- Le facteur « **changement d'eau** » : habituellement à la PMMLT, le changement d'eau des bacs larvaires se fait 3 fois par semaine, les lundis, mercredis et vendredis, ce sont les essais comportant l'appellation « 3x ». Les autres essais ont reçu un changement d'eau quotidien pendant toute la durée de l'élevage (Q).
- Le facteur « **antibiotique** » : dans les bacs portant la mention « A », 4.5mL d'antibiotique, Gentamicine 4% (VirbacTM) prescrit par le vétérinaire, était ajouté le matin après chaque changement d'eau. Les bacs portant la mention « PA » n'ont pas reçu d'antibiotiques. La gentamicine est un antibiotique à large spectre actif contre les bacilles à Gram négatif et les bacilles à Gram positif (VIDAL, 2016).
- Le facteur « **densité** » : une densité réduite de moitié a été mise en place dans les bacs avec le numéro « 50 ». Par la même occasion, la quantité de phytoplancton ajoutée dans les bacs larvaires a été divisée par 2 pour cette modalité. Habituellement à la PMMLT la densité est ajustée à 300 000 larves par bac (10 larves/mL) au premier jour d'élevage (J1) puis ce nombre est réduit à 100 000 (3 larves/mL) au septième jour (J7).

Les deux élevages larvaires ont été conduits de la même manière. Une fois les ovocytes fécondés, ils ont été répartis dans les bacs d'élevage au nombre de 3 000 000 par bac et de l'antibiotique a été ajouté dans les bacs concernés. A partir de J1, les embryons sont devenus des larves-D et chaque bac a été remis à densité pour avoir soit 300 000 larves pour la modalité « 100 », soit 150 000 larves pour la modalité « 50 » (Figure 2). Lors des remises à densité ou des changements d'eau, les larves ont été récupérées sur des tamis dont la maille varie en taille en fonction du jour d'élevage. La maille devient de plus en plus large au fur et à mesure que la

larve croît (Annexe V). Les larves n'ayant pas atteint la taille souhaitée, selon des tailles de référence, ne sont pas retenues sur le tamis et sont considérées comme « la queue de lot ». Elles ont alors été jetées. A J1, le vélum, organe cilié, va alors se former et permettre à la larve de nager dans la colonne d'eau et de s'alimenter en phytoplancton (Helm et al., 2004). C'est également à partir de ce jour que les larves ont commencé à être nourries et que tous les facteurs ont été mis en place. A J7, une nouvelle remise à densité des larves a été opérée lorsqu'elles ont atteint le stade de larves umbonées, avec soit 100 000 larves soit 50 000 larves par bac pour les conditions « 100 » et « 50 ». A partir de J14 et jusqu'à la fin de l'élevage, une partie des larves ont atteint le stade pédivéligère, reconnaissable par le développement d'un pied et d'un œil, et elles sont devenues compétentes à la fixation et à la métamorphose (Ben Kheder, 2017). La compétence à la fixation relève d'un changement de comportement puisque les larves vont passer d'une phase planctonique à une phase benthique sessile en se fixant à un substrat, tandis que la compétence de métamorphose relève d'un changement morphologique puisqu'une fois fixée les larves perdront leur pied et le vélum se résorbera pour laisser place aux branchies (Bayne, 2017). De ce fait, les larves ont été triées en fonction de leurs tailles, celles qui sont retenues sur une maille de 220 μm sont parties en salle de micro-nurserie pour fixation sur de la micro-brisure, et les autres de tailles inférieures ont été recoulées en élevage larvaire. Lors de ces dates clés, le comptage des larves pour les remises à densité et pour les envois en fixation a été utilisé pour les indicateurs de performances larvaires. Pour plus d'informations sur la conduite d'élevage larvaire, un protocole est détaillé en Annexe VI.

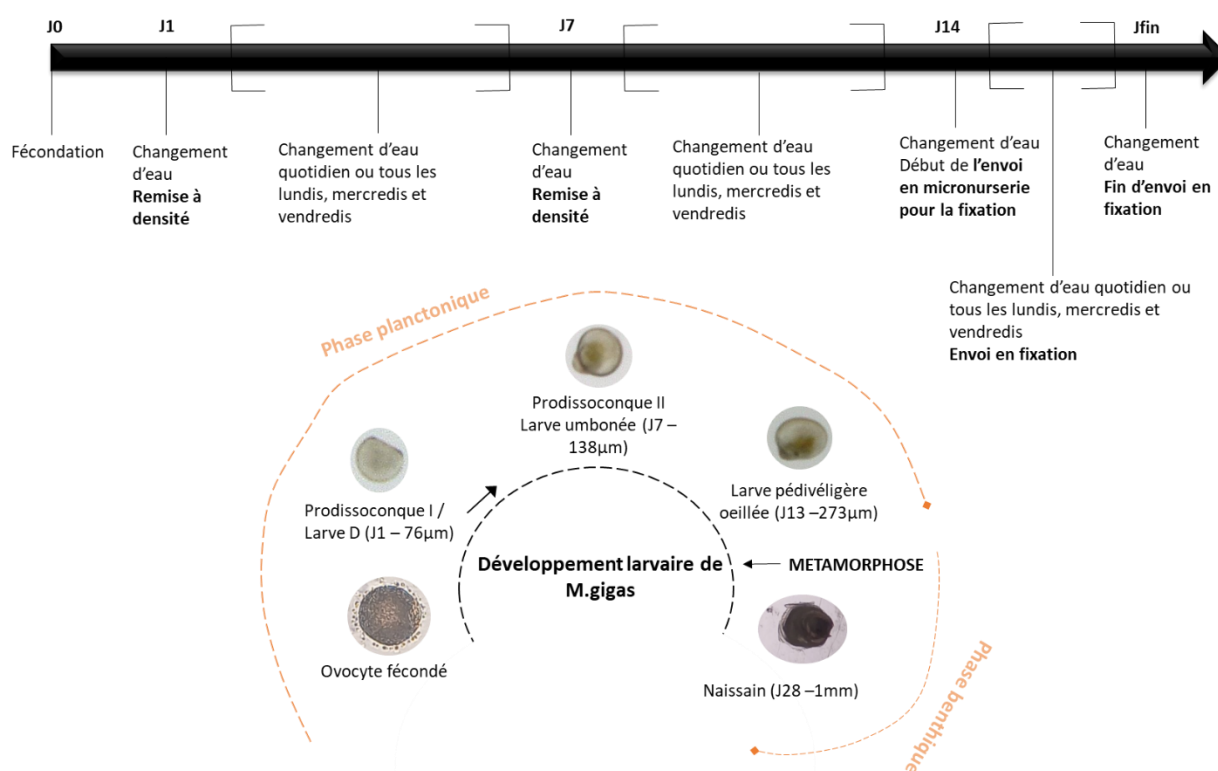


Figure 2 - Etapes d'un élevage larvaire d'huîtres creuses, *M. gigas*, en se basant sur son cycle de développement

Les paramètres physico-chimiques étaient mesurés chaque matin à l'aide d'un appareil multiparamètre (Multi 3630 IDS) raccordé métrologiquement au Système International d'unités SI et sur lequel était branché une sonde O_2 dissous (FDO 925), une sonde pH (Electrode Sentix 940-3, pH de 0 à 14) et une sonde pour la salinité (Tetracon 925). La température était également

suivie grâce à deux thermo boutons (Plug&Track) relevant la température toutes les 30 minutes, l'un placé dans un bac avec changement d'eau 3 fois par semaine et l'autre dans un bac avec changement d'eau quotidien.

3. Indicateurs de performances larvaires

Pour évaluer l'effet des facteurs sur les performances larvaires, 4 indicateurs ont été sélectionnés : le taux d'éclosion, le taux de survie, le taux de fixation et la croissance.

Le taux d'éclosion se calcule de la manière suivante :

$$Tx_{eclosion} = \frac{Nb_{larvesJ1}}{Nb_{ovocytes}} \quad \text{Avec } Nb_{ovocytes} = 3\,000\,000$$

Il permet de déterminer le nombre d'ovocytes fécondés ayant atteint le stade de larves-D. Le nombre de larves à J1 est compté avant la remise à densité.

Le taux de survie se calcule de la manière suivante :

$$Tx_{survie} = \frac{Nb_{comptéesJ7}}{Nb_{remisàdensitéJ1}} \times \frac{Nb_{comptéesJfin}}{Nb_{remisàdensitéJ7}} \quad \text{Avec } Nb_{remisàdensitéJ1} = 300\,000 \text{ ou } 150\,000$$

$$Nb_{remisàdensitéJ7} = 100\,000 \text{ ou } 50\,000$$

Etant donné que la survie larvaire commence à être calculée après la première remise à densité à J1 et que par la suite, une remise à densité à J7 a lieu, la survie est alors le produit de deux survies séquentielles. Les larves ont été comptées à J7 et à Jfin.

Le taux de fixation se calcule de la manière suivante :

$$Tx_{fixation} = \frac{Nb_{larvesfixées}}{Nb_{envoyéesfixation}}$$

Il correspond au nombre de larves ayant fixées à la micro-brisure sur le nombre de larves qui a été envoyées en micro-nurserie pour fixation.

Tous les comptages ont été effectués en triplicats pour réduire les erreurs aléatoires, ce qui donnent 72 comptages par indicateur (24*3). Les comptages suivent le protocole en Annexe VI.

Quant à la croissance, elle a été estimée en mesurant le diamètre maximal des larves de chaque bac à partir d'un prélèvement de 1mL à J1, J7 et J14. Dans chaque prélèvement, 200 µL de formol à 36% était ajouté pour fixer les larves. La taille des larves a été estimée au microscope numérique Keyence, pour chaque bac, 30 larves prélevées étaient prises en photo. Ces photos ont été traitées sur le logiciel ImageJ afin d'obtenir la taille maximale de chaque larve. Depuis ce logiciel, une macro a été développée pour optimiser le traitement d'images et automatiser le calcul du diamètre (Annexe VII).

4. Echantillonnage pour le metabarcoding

Comme évoqué précédemment, les analyses se sont faites sur des prélèvements provenant de 3 compartiments : EDM, larves et phytoplancton (Tableau 1). Seulement 2 essais ont été analysés à savoir : A3x100 et PA3x100, ce qui correspond aux conditions habituelles d'élevage avec ou

sans antibiotiques. Les prélèvements de chaque compartiment ont été faits à la même date à J1, J7 et J14, correspondant respectivement aux stades de larves-D, umbonées et pédivéligères. Ils ont systématiquement été réalisés avec du matériel stérile.

Pour le compartiment « EDM », le bac larvaire a été vidé, et 800 mL d'eau de mer « usagée » du bac ont été prélevés au travers d'un tamis de maille 20 µm pour retirer les déchets pouvant perturber la future filtration. En plus, aux 3 dates, 800mL d'eau de mer en sortie de tuyau ont également été prélevés, agissant en tant que témoin de la qualité de l'eau entrante dans le système. Ces 800 mL ont ensuite été passés sur rampe de filtration avec un filtre de 0,2 µm. Ce filtre était ensuite découpé en 4 morceaux répartis dans 4 tubes distincts et stockés à -80°C.

En ce qui concerne le compartiment « larves », en moyenne 10 000 larves étaient prélevées par bac. Les tubes étaient centrifugés rapidement pour éliminer le surnageant, puis plongés dans de l'azote liquide pendant quelques secondes. Enfin, ils étaient stockés à -80°C.

Pour finir, le phytoplancton apporté le jour même a été prélevé dans trois tubes de 15mL. Les tubes sont ensuite passés à la centrifugeuse à 4 000G pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les tubes sont conservés à -80°C.

Tableau 1- Nombre d'échantillons prélevés pour les essais A3x100 et PA3x100 destinés au metabarcoding 16S

Essais	A3x100			PA3x100		
Date	J1	J7	J14	J1	J7	J14
Compartiment EDM	3	3	3	3	3	3
Compartiment larves	3	3	3	3	3	3
Compartiment phytoplancton	3	3	3	3	3	3
+ EDM contrôle	1	1	1	1	1	1

5. Metabarcoding 16S: extraction d'ADN, PCR et séquençage long-read

Les analyses de metabarcoding n'ont été faites que pour le premier élevage ALADIN.

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit DNeasy PowerWater (QiagenTM) pour les 22 échantillons EDM et avec le kit DNeasy PowerSoil (QiagenTM) pour les 18 échantillons de larves et 9 de phytoplancton en suivant le protocole du fabricant. Un témoin d'extraction était systématiquement effectué lors de chaque extraction. Les concentrations d'ADN résultantes étaient vérifiées au photomètre NanodropTM, pour avoir une approche qualitative, puis au fluorimètre QubitTM, pour avoir une approche quantitative.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) a été réalisée en amplifiant le gène codant pour l'ARNr 16S, commun à l'ensemble des bactéries. En effet, ce gène possède des régions communes à toutes les bactéries, ce qui permet d'y accrocher des amorces universelles, mais également des régions spécifiques permettant de discriminer l'unité taxonomique des bactéries. Etant donné que le séquençage est en long read, l'ensemble du gène, des régions V1-V9, a été amplifié. La PCR a été effectuée dans un volume de 50 µL comprenant : 1 µl d'un couple d'amorces, amorce reverse (CGG-TTA-CCT-TGT-TAC-GAC-TT) et amorce forward (AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG), spécifiques au gène 16S bactérien à amplifier et permettant également de limiter l'amplification du 16S des chloroplastes, très proche du 16S bactérien (Laroche, 2018), 25µL de polymérase LongAmp Taq 2x, 20µL d'eau milliQ autoclavée et 4 µL d'ADN

d'échantillons dilués à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Le programme du thermocycleur était le suivant : 5 mins à 95°C , puis 30 cycles de 20 sec à 95°C , 1min30 à 55°C , 1min30 à 65°C , et une élongation finale à 65°C pendant 5 mins (Figure 3). Chaque PCR incluait un contrôle.

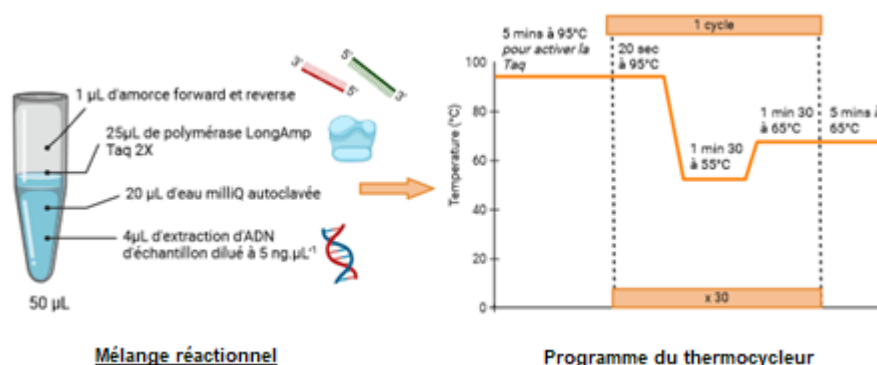


Figure 3 - Etapes du protocole de Polymerase Chain Reaction suivi pendant cette étude

Ensuite pour la préparation au séquençage le kit Native Barcoding 24 V14 (Nanopore™) a été utilisé en suivant le protocole du fabricant. Les produits de PCR, d'environ 1600 paires de bases, ont été purifiés avec les billes AMPureXP (Beckman Coulter™) puis quantifiés au Qubit pour par la suite ajuster la quantité d'amplicons à 20 fmol. Avant d'être regroupé dans un seul et même tube, un barcode est associé à chaque échantillon par une ligase, NEB Blunt/TA Ligase Master Mix. Puis l'adaptateur NA est fixé aux extrémités par la ligase, NEB Ligase T4 Quick, ce qui permet une reconnaissance des séquences par le séquenceur (Figure 4). Enfin, la librairie ainsi formée a été chargée dans une flowcell séquençée avec MINION pendant 72h.

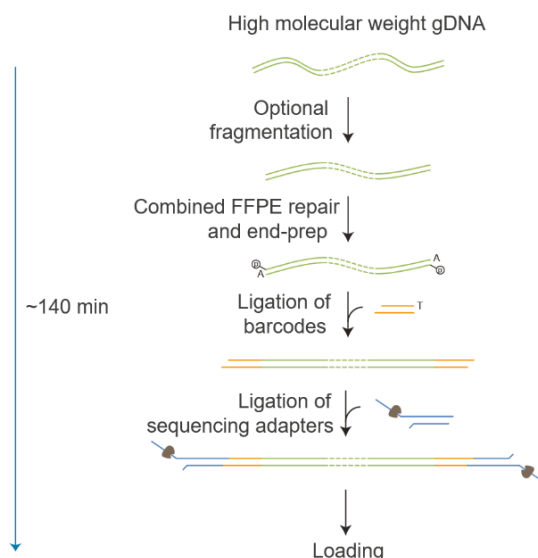


Figure 4 - Protocole SQK NBD 114-24 adapté pour le kit Native Barcoding 24 V14

6. Analyses en bio-informatiques

Les données de séquençage ont été transférées sur le cluster de calcul, DATARMOR, permettant ainsi à l'unité SeBimer de lancer les analyses en bioinformatiques au travers du workflow qu'ils ont développé : SAMBA, Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses workflow. Avant traitement des séquences par SAMBA, les données ont été basecallées et démultiplexées. Pour associer une séquence à un taxon, la base de référence

choisie est SILVA. Elle est préférée aux autres bases car SILVA est plus complète et mise à jour régulièrement. Le workflow a été lancé en paramétrant 3 variables : Antibiotique, Jour d'élevage et Compartiment, pour lesquelles il pourrait y avoir un effet sur la diversité des taxons dans les échantillons.

Après traitement par SAMBA, un tableau de comptage est obtenu qui contient en colonnes les échantillons et en lignes les taxons. Ce tableau est ensuite retraité grâce au package R « microDecon » (McKnight et al., 2018) pour supprimer les contaminants correspondant notamment aux séquences qui sont seulement présentes dans les témoins, témoin d'extraction ou de PCR. Les séquences associées aux chloroplastes ont également été écartées puisqu'elles ne sont pas étudiées ici.

7. Analyses statistiques

a. Données de performances larvaires

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Rstudio en utilisant le package « lme4 » (Bates et al., 2003). Le choix des modèles et des analyses s'est appuyé sur une publication de Ernande et al. utilisant les mêmes indicateurs de performances larvaires (Ernande et al., 2003). Le taux d'éclosion, de survie et de fixation s'apparente à comparer un nombre de larves vivantes à un nombre de larves mortes. Ces données peuvent alors être codées sous forme binaire. Le modèle choisi est donc un modèle de régression logistique binaire. Les paramètres du modèle sont estimés par REML, Maximum de Vraisemblance Restreinte et la fonction de lien est la fonction logit. Les 3 facteurs et leurs interactions, double et triple, ont été inclus en effets fixes dans le modèle et 2 effets aléatoires imbriqués ont été ajoutés : le facteur Replicat et le facteur Comptage. Le facteur Replicat est imbriqué dans l'Essai qui est imbriqué dans l'Effet fixe. Le facteur Comptage est lui imbriqué dans le replicat et correspond au comptage effectué en triplicat pour évaluer les effectifs. Pour optimiser le modèle, l'effet aléatoire est retiré s'il n'explique aucune variance. Le modèle pour le taux d'éclosion ne prend en compte que le facteur Antibiotique en effet fixe étant donné que c'est le seul mis en place pendant les 24 premières d'heures de l'élevage.

En ce qui concerne la croissance, le modèle choisi est un modèle de régression linéaire mixte effectué indépendamment pour les 3 dates de prélèvements. A J1, seul le facteur Antibiotique est pris en compte dans le modèle. Cette fois-ci le seul effet aléatoire sélectionné est l'effet imbriqué du Réplicat dans l'Essai et dans l'Effet fixe. Les paramètres sont également estimés par REML.

Une Analyse de Variance, ANOVA, de type III a été conduite pour déterminer la significativité des facteurs sur la variable dépendante en posant l'hypothèse nulle H_0 , $H_0 =$ « Le facteur X n'a pas d'effet significatif sur la variable Y », qui est rejetée ou non à un niveau de confiance de 95%, niveau de confiance utilisée communément en aquaculture (Knud-Hansen, 1997). L'ANOVA de type III permet de prendre en compte les interactions entre les facteurs. La contrainte « cellule de référence » a été choisie pour comparer la significativité des facteurs par rapport à PA3x100, représentant les conditions d'élevage usuelles. Les hypothèses sur les résidus ont quant à eux été estimées graphiquement.

b. Données de metabarcoding

Les analyses ont été réalisées sur Rstudio principalement avec les packages « phyloseq » (McMurdie & Holmes, 2013) et « metaBmisc » (Noël, 2024). Pour analyser ces données, deux types de diversité ont été étudiées, l'alpha diversité qui rend compte de la diversité au sein d'un échantillon et la beta diversité qui compare la diversité entre les échantillons (Laroche et al., 2018).

Concernant l'alpha diversité, la richesse spécifique a d'abord été étudiée par l'indice Chao1 dont la formule est la suivante :

$$Chao1 = Sobs + \frac{S1^2}{2 \times S2}$$

avec $Sobs$ = richesse spécifique observée

$S1$ = taxons avec une abondance de 1

$S2$ = taxons avec une abondance supérieure à 1

La diversité spécifique a ensuite été étudiée. Comparée à la richesse spécifique qui correspond au nombre de taxons présents dans un échantillon, la diversité spécifique tient compte de l'abondance de chacun de ces taxons. Pour représenter cette diversité, 2 indices complémentaires ont été sélectionnés : l'indice de Shannon (H') et l'indice de Pielou (J').

$$H' = - \sum_{i=1}^S pi \times \log pi$$

avec $pi = \frac{\text{Abondance de taxons}}{\text{Abondance totale des taxons dans l'échantillon}}$

$$J' = \frac{H'}{\ln Sobs}$$

L'indice de Pielou rend compte de l'équitabilité, plus l'indice est proche de 1 plus les abondances entre les taxons sont homogènes (Noël, 2023).

Concernant la beta diversité qui compare la diversité entre les échantillons, la représentation en Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) a été choisie pour explorer les effets du traitement antibiotique et du jour d'élevage. Cette méthode d'ordination permet de représenter les distances entre les échantillons sur un plan en 2D ce qui peut conduire à une légère distorsion des distances. La qualité de l'ajustement du NMDS est évaluée par la mesure du stress : si celui-ci dépasse 0,2, la qualité de la représentation est jugée insuffisante (Noël, 2023). Pour compléter cette représentation, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour chaque compartiment pour visualiser quels taxons expliquent les différences entre les échantillons. Pour la représentation en NMDS, les distances entre les échantillons ont été calculées par la méthode de Bray-Curtis.

$$dij \text{ (Bray Curtis)} = \frac{\sum_{k=1}^p |y_{ik} - y_{jk}|}{y_i + y_j}$$

où y_i et y_j représentent l'abondance totale des sites i et j .

Avant de calculer ces distances, les données ont été normalisées pour les rendre comparables. La normalisation s'est faite par raréfaction, méthode qui consiste à réduire le nombre de

séquences pour chaque échantillon afin qu'il soit équivalent au nombre de séquences de l'échantillon le plus pauvre. 1 000 itérations ont été lancées pour rendre la méthode plus robuste. En plus, la significativité des effets du traitement antibiotique et du jour d'élevage a été testée pour les 3 compartiments par une analyse de variance par permutations (PERMANOVA), test non paramétrique communément utilisé pour les matrices de distance (Anderson, 2017). Cette PERMANOVA a été réalisée sur la matrice de distance de Bray-Curtis mais également sur celle de Jaccard, qui calcule les distances en fonction de la présence/absence des taxons dans chaque échantillon. L'hypothèse H_0 posée est que les centroids des groupes définis par les variables explicatives sont identiques dans l'espace de la distance.

III. Résultats

1. Elevage larvaire n°1 : du 20 février au 8 mars 2024

Le relevé des paramètres physico-chimiques a permis de vérifier que l' O_2 dissous et le pH se trouvaient dans les gammes de tolérance de l'espèce, à savoir respectivement 7,093 mg.L⁻¹ [7,079 ; 7,107] et 8,059 [8,054 ; 8,063]. En effet, l'huître creuse peut supporter un pH compris entre 6,1 et 8,1 et n'est pas limitée par l'oxygène (Corporeau et al., 2019). La salinité a quant à elle fortement fluctué au cours de l'élevage, allant de maximum 31,7 à J5 à 22,9 à J16 (Annexe VIII). L'huître creuse tolère des salinités comprises entre 10 et 35 mais sa croissance est optimale aux alentours de 20 et 25 (Sakai et al., 2001).

a. Effet des trois facteurs sur les performances larvaires

Le taux d'éclosion

Pour ce premier élevage larvaire, le taux d'éclosion moyen était de 26,60 % [25,44 ; 27,77]. A ce stade, il est possible de comparer le taux d'éclosion des larves ayant reçues un traitement antibiotique ($n = 36$) et celles n'en ayant pas reçues ($n = 36$). D'après la Figure 5, les moyennes ne mettent pas en avant de différences significatives, ce qui est confirmé par une ANOVA ($p = 0,72$).

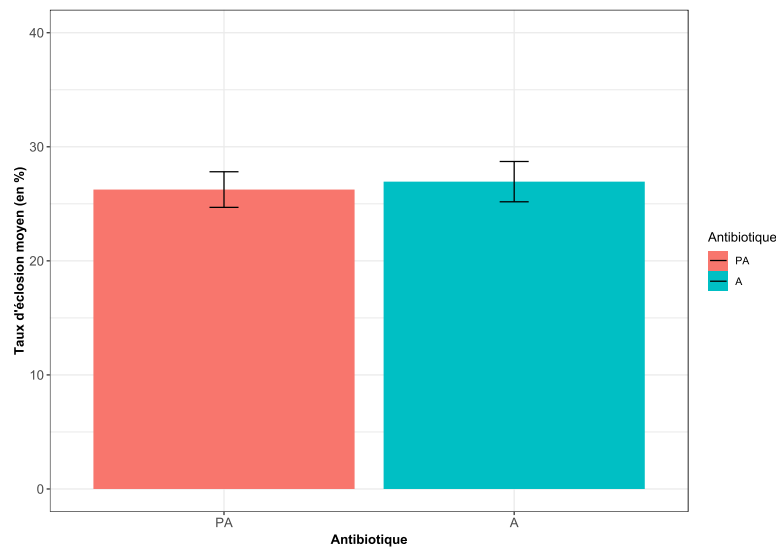


Figure 5 - Moyenne du taux d'éclosion pour la condition avec antibiotiques (A) et sans antibiotiques (PA). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.

Le taux de survie

Le taux de survie moyen pour l'ensemble des bacs est de 43,94 % [38,90 ; 48,99]. La Figure 6 met en évidence de fortes variations entre les différents essais. Un maximum supérieur à 100% est observé pour 2 réplicats sur 3 de l'essai A3x50 et 1 réplicat pour l'essai PA3x50. La survie larvaire est meilleure pour les essais avec une densité réduite de 50% (53,08 % [44,55 ; 61,61]) par rapport à ceux avec une densité de 100% (34,80 [30,96 ; 38,65]). Statistiquement, l'effet du facteur « Densité » est significatif (p -value = 0,012). Une densité réduite favoriserait la survie des larves. Par ailleurs, cet effet est significatif même lorsque les 3 outliers sont retirés du jeu de données. Cependant, le choix de conserver ces outliers a été fait car cette surabondance de larves peut avoir été amenée dans les autres bacs sans pour autant que cela ne soit observable. En effet, lors des remises à densités il est possible que certains bacs ne reçoivent pas exactement la quantité de larves standardisée.

Le changement d'eau quotidien impacte négativement la survie des larves 32,8 % [28,3 ; 37,2] comparé à un changement d'eau tous les 3 fois par semaine 55,11 % [47,4 ; 62,8]. Cependant, le facteur « Changement d'eau » n'est pas significatif statistiquement, malgré les écarts importants entre les moyennes.

Les survies moyennes entre les larves ayant reçues un traitement antibiotique (43,39 % [35,59 ; 51,18]) et celles n'en n'ayant pas reçues (44,50 % [37,68 ; 51,31]) diffèrent très peu. Statistiquement, il n'y a pas non plus d'effet significatif de ce facteur.

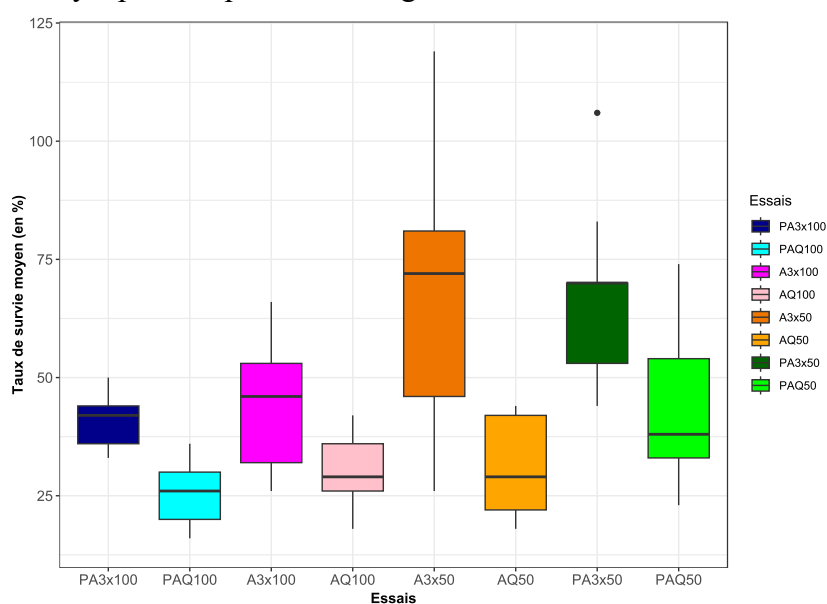


Figure 6 - Taux de survie moyen (en %) par essai pour le premier élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits ($n=9$).

Le taux de fixation

En ce qui concerne le taux de fixation, il est en moyenne de 67,21 % [63,48 ; 70,95]. La Figure 7 montre de fortes variations entre les essais avec une médiane à 82 % pour l'essai AQ50 et une médiane à 44 % pour l'essai A3x50. En moyenne, 73,43 % [67,80 ; 79,06] des larves ayant subi un changement d'eau quotidien se sont fixées à la micro-brisure contre 61,17 % [56,88 ; 65,45] des larves ayant subi un changement d'eau 3 fois par semaine. La densité réduite a également favorisé la fixation puisque le taux de fixation moyen est égal à 71,26 % [64,92 ; 77,59] pour cette modalité contre 63,28 % [59,34 ; 67,21] pour une densité habituelle. Statistiquement, l'interaction entre le changement d'eau quotidien et une densité réduite aurait un effet

significatif positif sur le taux de fixation des larves (p -value = 0,021). Cependant, il est à noter que sur la Figure 7, le taux de fixation des larves est supérieur à 100% pour l'essai PAQ50, et notamment pour 2 comptages des réplicats B et C. Lorsque ces deux comptages sont retirés du jeu de données, l'effet de cette double interaction n'est pas significatif au seuil de 5% (p -value = 0,091). L'effet significatif sera toutefois retenu considérant que les deux valeurs de comptage restent cohérentes par rapport aux deux autres comptages associés respectifs.

Les essais ayant reçu un traitement antibiotique montrent des performances de fixation moins bonnes (61,50 % [56,18 ; 66,82]) que ceux n'ayant pas reçu de traitement (73,03 % [68,38 ; 77,79]). Cependant, le facteur « antibiotique » ne s'est pas révélé significatif (p -value = 0,42).

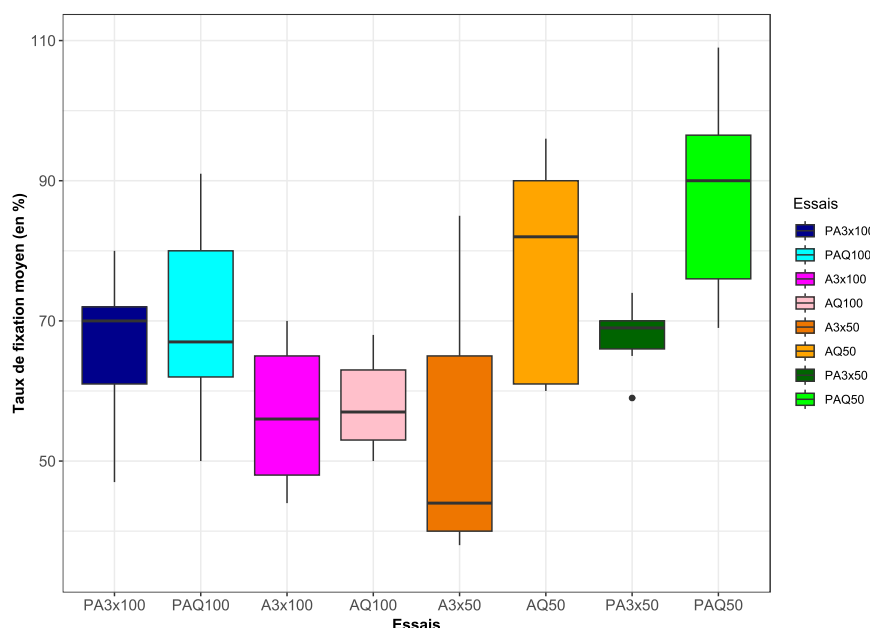


Figure 7 - Taux de fixation moyen (en %) par essai pour le premier élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits ($n=9$).

La croissance

Pour finir, la taille moyenne des larves était de 76,98 μm [75,85 ; 76,11] à J1, de 141,52 μm [140,57 ; 141,47] à J7 et de 280,30 μm [277,72 ; 282,88] à J13. La Figure 8 souligne des variations entre les essais au fur et à mesure du développement de la larve.

Au premier jour d'élevage, aucune différence n'est visible entre les essais. L'antibiotique n'a pas d'effet significatif sur la taille des larves puisque les tailles moyennes ne diffèrent que d'1 μm (A : 76,70 μm [76,54 ; 76,87] et PA : 75,32 μm [75,12 ; 75,52]) (ANOVA, p -value = 0,17).

En revanche, à partir de J7, des disparités significatives se dessinent entre les essais. La taille moyenne des larves provenant des essais où le changement d'eau était effectué quotidiennement est supérieure (145,38 μm [144,64 ; 146,01]) à celles où le changement d'eau était effectué 3 fois par semaine (137,27 μm [136,57 ; 137,97]) (ANOVA, p -value = 0,00073).

A l'inverse, le facteur « Antibiotique » n'a pas d'effet sur la taille des larves (A : 140,75 μm [140,02 ; 141,44] et PA : 141,47 μm [140,70 ; 142,24]), ce qui est confirmé par ANOVA.

Il y a une différence entre les tailles de larves élevées en densité réduite (143,47 μm [142,66 ; 144,28]) et celles élevées en densité habituelle (139,14 μm [138,48 ; 139,80]) mais ce facteur n'est pas significatif.

A partir de J13, les mêmes différences entre les essais sont observées mais les variations entre les essais avec et sans changement d'eau quotidien sont exacerbées. L'effet positif du changement d'eau quotidien est significatif (ANOVA, p-value = 0,037) par rapport à un changement d'eau 3 fois par semaine.

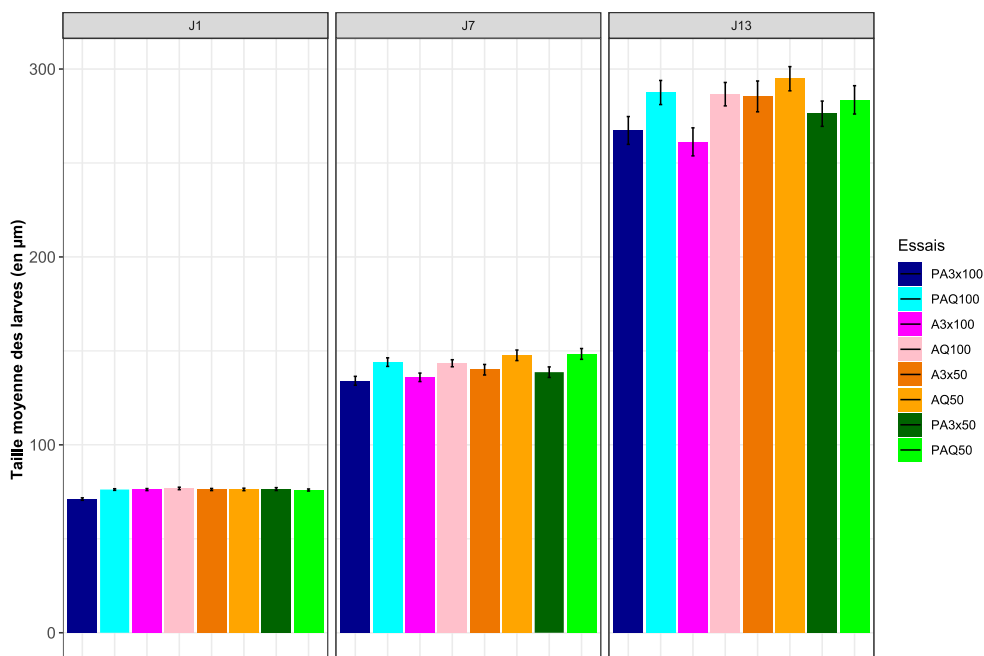


Figure 8 - Taille moyenne des larves (en μm) en fonction du jour d'élevage et des essais. La moyenne a été calculée sur 90 larves, soit 30 larves par réplicat. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%

b. Caractérisation des communautés bactériennes

Les résultats de séquençage ont montré une forte présence de chloroplastes, malgré l'utilisation d'amorces PCR pouvant limiter leurs amplifications. Les chloroplastes ont été amplifiés de manière préférentielle ce qui a pu perturber le reste des analyses. A l'avenir, si les prélèvements du second élevage sont utilisés pour du metabarcoding, il pourra être intéressant d'utiliser d'autres amorces (Laroche et al., 2018).

Entre les compartiments

Au total, 2 942 taxons bactériens ont été identifiés avec un nombre de séquences total de 15 763 011 pour les 3 compartiments. La précision d'identification taxonomique a permis d'aller jusqu'au genre, voire dans certains cas jusqu'à l'espèce. Il est possible d'analyser ces résultats de séquençage au regard de la variable « Compartiment ».

Le compartiment « EDM » a une plus grande richesse spécifique (Chao1 = 779) que les deux autres compartiments malgré un écart type important qui s'explique par la présence des contrôles EDM dans le calcul (Tableau 2). Cependant, en s'intéressant à la diversité spécifique, il est à noter que c'est le compartiment « Larves » qui a le meilleur indice de Shannon ($H' = 3,31$) et que c'est le compartiment « Phytoplancton » qui a la meilleure équitabilité ($J' = 0,71$). Les 5 genres bactériens les plus présents, tous compartiments confondus, sont : *Pseudoalteromonas*, *Nautella*, *Cognatishimia*, *Nioella* et *Fluviicola*

Tableau 2 - Diversité alpha pour les 3 compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton ». Les données entre parenthèses représentent les écarts types à la moyenne.

	Chao1	Shannon (H')	Pielou (J')
EDM	779,74 (+/- 410 ,11)	3,26 (+/- 0,98)	0,52 (+/- 0,12)
Larves	460,53 (+/- 126,71)	3,31 (+/- 0,39)	0,56 (+/- 0,06)
Phytoplancton	100,54 (+/- 15,25)	3,16 (+/- 0,31)	0,71 (+/- 0,06)

D'après la Figure 9, les échantillons provenant d'un même compartiment sont proches en distance et forment des groupes. 3 échantillons EDM sont plus éloignés des autres échantillons du même compartiment, ils correspondent aux 3 contrôles (E07, E14, E21) de la qualité de l'eau de mer entrante en salle d'élevage larvaire aux trois dates de prélèvements. Le compartiment « EDM » partage certains taxons avec le compartiment « Larves » et « Phytoplancton », tandis que les compartiments « Larves » et « Phytoplancton » sont aux opposés sur le premier axe. Statistiquement, les centroids des groupes sont distincts (p-value = 0,001), la variable « Compartiment » a un effet sur la composition des communautés bactériennes.

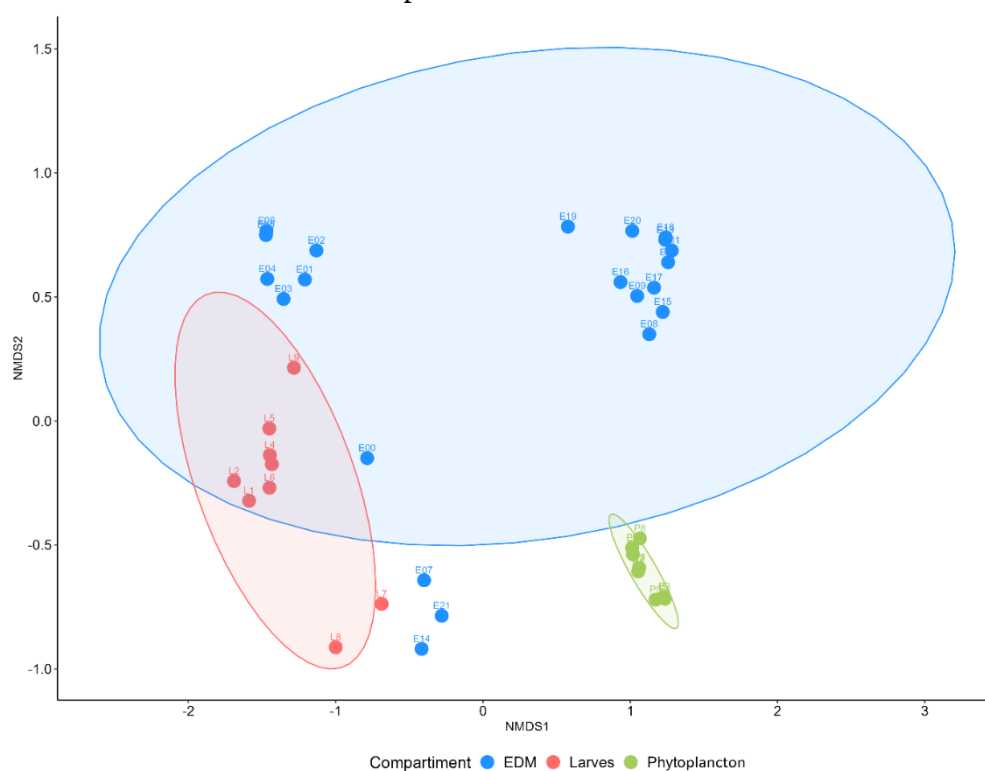


Figure 9 - Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) représentant les distances de Bray-Curtis entre 36 échantillons selon la variable « Compartiment ».

Au sein de chaque compartiment

Pour les compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton », 2 677, 1 156 et 140 taxons bactériens ont été respectivement identifiés.

Selon le Tableau 3, la richesse spécifique de l'EDM du milieu d'élevage décline plus l'élevage se poursuit. La même chose est observée pour le compartiment « Larves » mais seulement lorsqu'un traitement antibiotique est appliqué. En effet, lorsqu'il n'y a pas de traitement antibiotique, la richesse spécifique est supérieure à J7 (511,07) par rapport à J1 (439,63).

La richesse spécifique et la diversité sont favorisées par une absence d'antibiotiques pour les deux compartiments, « EDM » et « Larves ». En effet, la richesse spécifique est de 859,30 à J1 pour un traitement antibiotique contre 1 053,93 à J1 sans traitement pour le compartiment « EDM ». Un autre exemple, pour le compartiment « Larves », la diversité est de 2,59 à J14 avec traitement contre 2,94 sans traitement pour l'indice de Shannon et de 0,45 contre 0,51 pour l'indice de Pielou.

Pour le compartiment « EDM », en se focalisant sur les échantillons ayant reçu un traitement antibiotique, la diversité (H' et J') augmente entre J1 et J7 tandis que la richesse spécifique diminue.

Il est à noter que les richesses spécifiques et les diversités les plus fortes sont observées dans l'EDM entrant dans la salle d'élevage (Contrôle).

Pour le compartiment « Phytoplancton », le jour d'élevage ne fait pas varier les résultats de richesse spécifique ou de diversité.

Tableau 3 - Diversité alpha en fonction des variables « Antibiotique » et « Jour d'élevage » au sein des trois compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton ». Les données entre parenthèses représentent les écarts types à la moyenne.

		<i>Chao1</i>	<i>Shannon (H')</i>	<i>Pielou (J')</i>
EDM				
<i>Antibiotiques</i>	<i>J1</i>	859,30 (+/-160,16)	2,46 (+/-0,16)	0,38 (+/-0,02)
	<i>J7</i>	553,44 (+/-208,32)	2,70 (+/-0,09)	0,55 (+/-0,17)
	<i>J14</i>	418,11 (+/-53,84)	2,59 (+/-0,17)	0,45 (+/-0,02)
<i>Pas d'antibiotiques</i>	<i>J1</i>	1053,93 (+/-161,84)	3,19 (+/-0,05)	0,48 (+/-0,01)
	<i>J7</i>	694,83 (+/-286,46)	3,14 (+/-0,04)	0,55 (+/-0,01)
	<i>J14</i>	448,42 (+/-140,02)	2,94 (+/-0,26)	0,51 (+/-0,04)
<i>Contrôle</i>	<i>J1</i>	1865,84	5,28	0,71
	<i>J7</i>	1023,43	5,43	0,80
	<i>J14</i>	1579,04	5,05	0,70
Larves				
<i>Antibiotiques</i>	<i>J1</i>	482,58 (+/-7,61)	3,18 (+/-0,40)	0,52 (+/-0,07)
	<i>J7</i>	284,60	2,76	0,50
<i>Pas d'antibiotiques</i>	<i>J1</i>	439,63 (+/-45,02)	3,66 (+/-0,11)	0,62 (+/-0,02)
	<i>J7</i>	511,07 (+/-206,58)	3,40 (+/-0,36)	0,56 (+/-0,06)
Phytoplancton				
	<i>J1</i>	110,44 (+/-9,87)	3,23 (+/-0,29)	0,71 (+/-0,06)
	<i>J7</i>	106,79 (+/-11,47)	3,27 (+/-0,44)	0,73 (+/-0,08)
	<i>J14</i>	84,39 (+/-10,24)	2,98 (+/-0,17)	0,69 (+/-0,02)

Pour la beta diversité, les représentations NMDS manquent de clarté, de ce fait seuls les résultats de PERMANOVA seront présentés ainsi qu'une ACP pour compléter les analyses. Cependant toutes les figures de beta diversité sont disponibles en annexe IX, X et XI.

Concernant le compartiment « EDM », les deux axes de l'ACP comptent pour 82,8 % de la variabilité des données (Figure 10). Les échantillons d'EDM du milieu d'élevage prélevées le même jour sont proches en distance et forment des groupes. Le premier axe permet de discriminer les échantillons en fonction des communautés bactériennes propres au jour d'élevage. L'EDM prélevée dans les bacs d'élevage à J1 contient plus de bactéries du genre

Pseudoalteromonas et *Nautella* qu'à J7 et J14. Les échantillons prélevés à J7 et J14 contiennent plus de bactéries du genre *Cognatishimia*, *Nioella* et de la famille des Cryomorphaceae (*uncultured*). L'effet du jour d'élevage sur les compositions bactériennes est significatif (PERMANOVA, p-value = 0,001), que ce soit avec les distances de Bray-Curtis ou celles de Jaccard.

Le deuxième axe pourrait discriminer les échantillons ayant reçu un traitement antibiotique et ceux n'en n'ayant pas reçu. L'effet de cette variable n'est pas visible sur cette représentation puisque les échantillons sont proches au regard des distances euclidiennes. L'effet du traitement antibiotique sur les compositions bactériennes n'est pas significatif (PERMANOVA, p-value = 0,19) pour les distances de Bray-Curtis mais est significatif (PERMANOVA, p-value = 0,039) pour les distances de Jaccard.

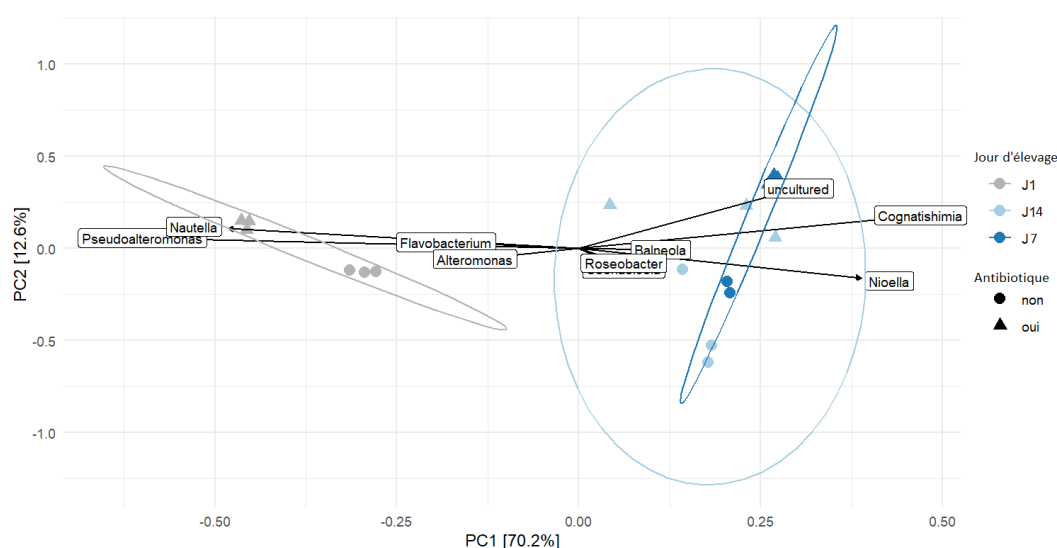


Figure 10 – ACP des 17 échantillons d'EDM en fonction des variables « Antibiotique » et « Jour d'élevage ». Les 10 genres les plus corrélés avec les axes sont représentés sur le cercle des corrélations.

Pour le compartiment « Phytoplancton », les deux axes de l'ACP comptent pour 95,8 % de la variabilité des données (Figure 12). Les échantillons prélevés au même jour ne forment pas de groupes contrairement aux échantillons EDM. Cela s'explique par le fait que peu importe le jour d'élevage, la composition bactérienne des échantillons de phytoplancton est très proche, comme cela a pu être observé pour l'alpha diversité. Certaines tendances ressortent tout de même de la figure. Les échantillons situés à gauche du premier axe ont une composition bactérienne plus abondante en *Oceanicaulis*, *Rhodopirellula* et *Candidatus Phaeomarinobacter*, tandis que les échantillons de droite ont plus de bactéries du genre *Fluviicola*, *Hyphobacterium* et *Cryomorphaceae* (*uncultured*). Comme suggéré graphiquement, l'effet du jour d'élevage n'est pas significatif sur la composition bactérienne du phytoplancton pour les distances de Bray-Curtis (PERMANOVA, p-value = 0,195) comme pour celles de Jaccard (PERMANOVA, p-value = 0,225).

2. Elevage larvaire n°2 : du 15 avril au 3 mai 2024

Le relevé des paramètres physico-chimiques a permis de vérifier que l'O₂ dissous et le pH se trouvaient dans les gammes de tolérance de l'espèce, à savoir respectivement 7,241 mg.L⁻¹ [7,225 ; 7,257] et 8,078 [8,069 ; 8,087]. La salinité a quant à elle varié de 24,8 à J5 à 31,6 à J9 (Annexe VIII).

a. Effet des 3 facteurs sur les performances larvaires

Le taux d'éclosion

Le taux d'éclosion moyen était de 21,58 % [20,37 ; 22,79] en prenant en compte l'ensemble des bacs et des comptages (n = 72). La Figure 13 met en avant un taux d'éclosion moyen supérieur pour les larves ayant eu un traitement antibiotique. En effet, les larves ayant reçu de l'antibiotique ont un taux d'éclosion moyen de 22,80 % [21,00 ; 24,61] contre 20,36 % [18,76 ; 21,96] pour les larves n'en n'ayant pas reçu. Cependant, il n'y a pas de différence significative (ANOVA, p-value = 0.122) entre ces deux modalités.

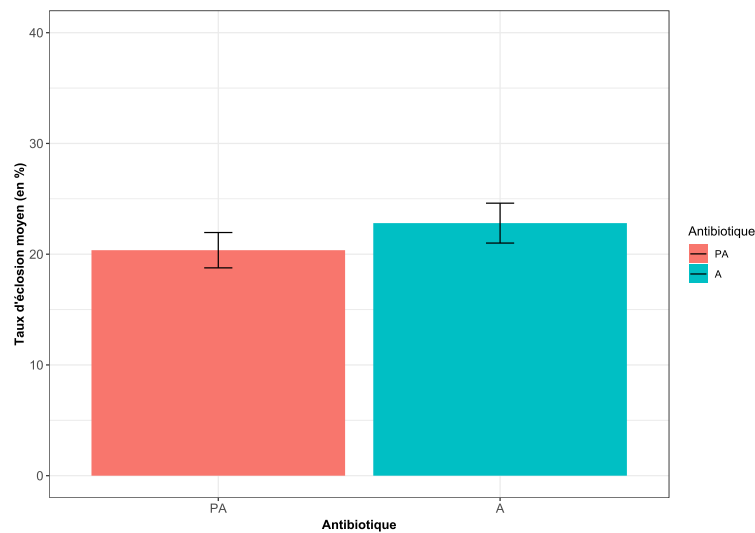


Figure 13 - Taux d'éclosion moyen pour la condition avec antibiotiques (A) et sans antibiotiques (PA). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.

Le taux de survie

En ce qui concerne le taux de survie, sa moyenne est de 14,26 % [11,50 ; 17,03]. D'après la Figure 14, les essais dont la densité était réduite de 50 % ont un meilleur taux de survie (19,89 % [15,34 ; 24,44]) que ceux avec une densité de 100 % (8,64 % [6,64 ; 10,63]). Les essais pour lesquels le changement d'eau était quotidien ont une survie amoindrie (9,86 % [7,25 ; 12,47]) comparés à ceux ayant eu un changement d'eau 3 fois par semaine (18,67 % [14,11 ; 23,22]). Il n'y a pas de différences entre les essais avec antibiotiques (13,42 % [9,72 ; 17,10]) et sans antibiotiques (15,11 % [10,82 ; 19,40]). Il est à noter qu'en comparaison avec le premier élevage les boxplots sont moins étalés et par conséquent que la variabilité entre les réplicats et les comptages d'un même essai est minimisée. C'est également pour cette raison que certaines valeurs ressortent du boxplot pour les essais AQ100 et PAQ50, alors que celles-ci sont pourtant très proches des autres résultats des essais correspondants. Ces valeurs ne sont pour autant pas aberrantes et sont conservées dans le jeu de données.

La triple interaction entre les facteurs « Changement d'eau », « Densité » et « Antibiotique » est significative (ANOVA, p-value = 0,042). En découpant cette triple interaction, c'est-à-dire en étudiant la double interaction entre deux facteurs selon les modalités d'un troisième facteur, 2 doubles interactions sont significatives. La première est l'interaction entre les facteurs « Densité » et « Changement d'eau » lorsque le facteur « Antibiotique » à la modalité « Antibiotique » (ANOVA, p-value = 0,016). Précisément, lorsqu'il y aurait une réduction de densité et un changement d'eau quotidien la survie larvaire serait négativement impactée dans les bacs ayant reçus de l'antibiotique. La deuxième interaction significative est entre les facteurs « Antibiotique » et « Densité » lorsque le facteur « Changement d'eau » prend la modalité « Quotidien ». Donc lorsqu'il y aurait une réduction de densité et un ajout d'antibiotique la survie larvaire serait positivement impactée dans les bacs avec un changement d'eau quotidien.

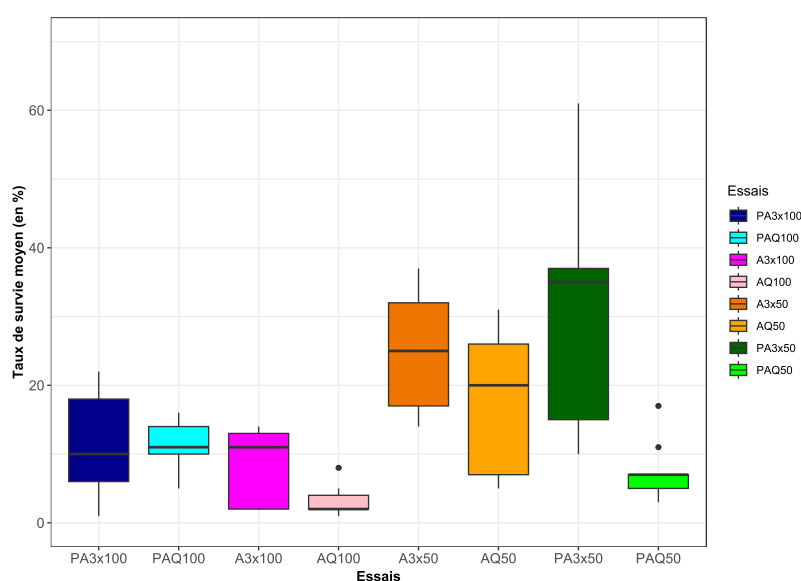


Figure 14 - Taux de survie moyen (en %) par essai pour le second élevage larvaire. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9).

Le taux de fixation

Le taux de fixation moyen est de 38,58 % [35,21 ; 41,95]. Il est à noter que le nombre maximum de larves à envoyer en fixation, à savoir 20 000, n'a pas été atteint pour tous les réplicats des essais A3x100 et AQ100, et pour un réplicat des essais PA3x50, PAQ100, AQ50 et PA3x100. Seul l'essai A3x50 a atteint ce maximum pour ses 3 réplicats. En effet, les larves n'avaient pas toutes atteint le stade pédivéligné, reconnaissable au microscope par le développement d'un pied, elles n'étaient donc pas encore compétentes à la fixation. Selon la Figure 15 a), certains boxplots montrent un meilleur taux de fixation des larves lorsque le changement d'eau en élevage larvaire a été réalisé quotidiennement (Q : 43,5 % [39,87 ; 47,13] et 3x : 33,67 % [28,3 % ; 39,03]), notamment pour les essais PAQ100 et PAQ50.

Les essais pour lesquels la densité a été réduite ont un meilleur taux de fixation (44,67 % [40,69 ; 48,64]) que ceux avec une densité habituelle (32,5 % [27,69 ; 37,37]). La densité réduite a un effet significatif (ANOVA, p-value = 0,024) positif sur le taux de fixation.

Les larves ayant reçues un traitement antibiotique ont un meilleur taux de fixation (42,05 % [37,32 ; 46,79]) que celles n'en ayant pas reçues (35,11 % [30,37 ; 39,82]). En croisant graphiquement les facteurs « Changement d'eau » et « Antibiotique », une interaction est visible entre ces deux facteurs. La Figure 15 b) peut être décrite de la manière suivante. Le

changement d'eau quotidien améliore le taux de fixation quand il n'y a pas de traitement antibiotique, et le changement d'eau 3 fois par semaine améliore le taux de fixation quand il y a un traitement antibiotique. La significativité de cette interaction entre les facteurs « Changement d'eau » et « Antibiotique » est prouvée par ANOVA (p-value = 0,016). Précisément, le changement d'eau quotidien croisé à un traitement antibiotique aurait un effet significatif négatif sur le taux de fixation.

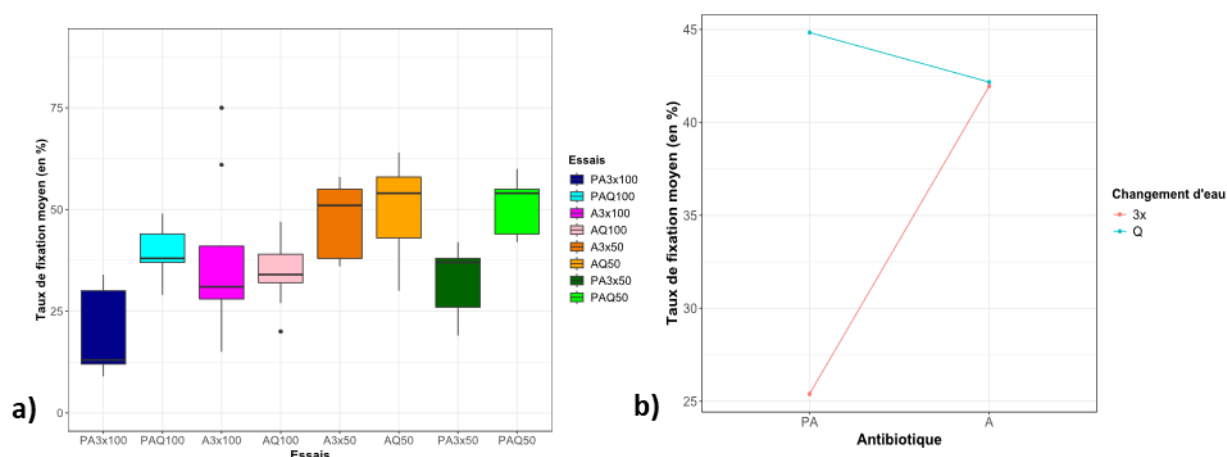


Figure 15 - a) Taux de fixation moyen (en %) par essai. Chaque boxplot correspond à 3 réplicats pour lesquels 3 comptages ont été faits (n=9). b) Taux de fixation moyen (en %) en fonction de l'interaction entre le facteur « Antibiotique » (n = 36) et le facteur « Changement d'eau » (n = 36)

La croissance

La taille moyenne des larves à J1 était de 72,80 μm [72,56 ; 73,04], à J7 de 119,77 μm [119,24 ; 120,29] et à J13 de 233,46 μm [230,30 ; 236,63].

D'après la Figure 16, lors du premier jour d'élevage, il n'y a pas de différences entre les essais avec et sans antibiotiques (A : 73,43 μm [73,24 ; 73,62] et PA : 72,37 [72,19 ; 72,56]). L'antibiotique étant le seul facteur en place à cette période de l'élevage.

A partir de J7, de légères différences commencent à être observables entre les essais. Les essais pour lesquels le changement d'eau a été quotidien (121,20 μm [120,71 ; 121,59]) ont des tailles supérieures à ceux dont le changement d'eau a été 3 fois par semaine (117,23 μm [116,83 ; 117,64]). Les essais où la densité a été réduite de moitié (120,99 μm [120,47 ; 121,51]) montre également des différences avec ceux dont la densité était à 100% (117,21 μm [117,31 ; 118,11]). Statistiquement, une de ces deux observations se vérifie. L'effet du facteur « Densité » est significatif (p-value = 0,031). Une densité réduite favoriserait la croissance des larves. Cependant, l'effet du changement d'eau n'est lui pas significatif au seuil de 5% mais a une p-value notable de 0,059.

Les larves ayant reçu un traitement antibiotique (118,36 μm [117,94 ; 118,79]) ne présentent pas de différences de taille avec celles n'en n'ayant pas reçu (119,83 μm [119,43 ; 120,43]), ce qui est confirmé par ANOVA.

A J14, les différences entre les essais sont exacerbées. L'essai pour lequel les larves ont la meilleure croissance est le lot AQ50. Il y a de nouveau une différence entre les essais qui ont subi un changement d'eau quotidien (244,22 μm [240,84 ; 247,60]) et ceux qui ont subi un changement d'eau trois fois par semaine (224,50 μm [220,98 ; 228,02]). Les essais avec une densité réduite de larves (246,71 μm [243,39 ; 250,04]) ont une taille moyenne plus grande que

ceux dont la densité est à 100% (222,41 μm [218,95 ; 225,87]). Ces données sont vérifiées statistiquement. Le changement d'eau quotidien a un effet significatif (p-value = 0,00041) positif sur la taille des larves et la densité réduite a également un effet significatif (p-value = 0,0054) positif. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été observé en élevage larvaire. En effet, les essais dont les larves étaient prêtes à se métamorphoser étaient les essais pour lesquels la densité était réduite à 50% ou ceux dont le changement d'eau était quotidien.

Les larves ayant reçu un traitement antibiotique (236,61 μm [233,01 ; 240,22]) ne présentent pas de différences de taille avec celles n'en n'ayant pas reçu (232,74 μm [229,25 ; 234,23]), ce qui est confirmé par ANOVA.

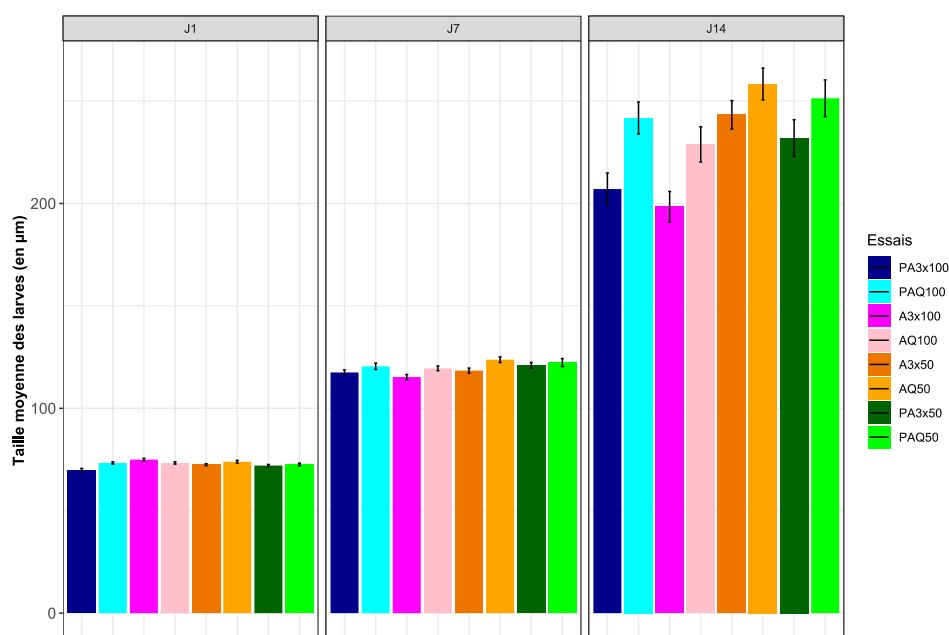


Figure 16 - Taille moyenne des larves (en μm) en fonction du jour d'élevage et des essais. La moyenne a été calculée sur 90 larves, soit 30 larves par réplicat. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à la moyenne à 95%.

IV. Discussion

1. Les facteurs influençant les différences de survie et d'éclosion entre les élevages larvaires

De manière générale, les deux élevages larvaires ALADIN ont montré de meilleures performances que lors de précédents élevages ayant conduit à l'analyse des causes évoquée antérieurement (Tableau 4). Cette analyse des causes comportait des données issues des élevages réalisées de février à juin 2022 (Morin et al., 2023). Il y avait été rapporté un taux d'éclosion moyen de 10 %. En appliquant les mêmes facteurs d'élevage (conditions PA3x100), le taux d'éclosion moyen a été de 26 % pour le premier élevage ALADIN et de 18% pour le deuxième. Quant au taux de survie moyen, il était de 10,6 % en 2022, soit 4 fois moins de survie que pour les bacs en conditions habituelles (40,5 %), PA3x100, du premier élevage ALADIN. Ainsi, même sans modifications zootechniques, le premier élevage ALADIN s'est mieux passé que ceux de 2022. En revanche, pour le second élevage ALADIN un taux de survie moyen de 12 % a été observé dans les conditions d'élevage habituelles (PA3x100), soit un taux similaire aux mauvaises performances de 2022. Les données larvaires de 2022 sont qualifiées de

mauvaises puisque en 2021 le taux d'éclosion était de 63 % et la survie larvaire de 43%. De ce fait, ces variations de performances peuvent être le fruit de différents paramètres, dont certains non étudiés lors du projet.

Tableau 4 - Performances larvaires d'élevages conduits à la PMMLT entre 2021 et 2024

	Taux d'éclosion moyen	Taux de survie moyen
Eleveage 2021	63 %	43%
Eleveage 2022	10 %	10,6 %
ALADIN EL1 2024 (PA3x100)	26 %	40,5 %
ALADIN EL2 2024 (PA3x100)	18 %	12 %

Tout d'abord, il est possible que des **communautés bactériennes pathogènes** soient à l'origine des mauvaises performances larvaires observées en 2022. Lors des élevages ALADIN, l'absence de significativité du facteur « antibiotique », a prouvé qu'avec ou sans l'élevage se portait de la même façon. De plus, malgré les espèces pathogènes du genre *Vibrio* présentes dans certains échantillons de larves, peu de larves malformées, observable par un velum désorganisé et une perte de motilité, et peu de mortalités brutales ont été observés (Ushijima et al., 2018). La dose de phytoplancton n'a pas été revue à la baisse au cours de l'élevage indiquant que les larves n'ont pas diminué leur activité de nourrissage. La diminution de l'activité de nourrissage étant un indicateur de l'exposition des larves aux bactéries pathogènes selon une publication de Genard en 2011. De plus, entre 2022 et 2024 certains paramètres d'élevage ont fait l'objet de modification, dont la température de la salle qui est passée de 28°C à 24°C. Ce changement n'est pas anodin puisqu'il a été démontré que la virulence de certaines souches de *Vibrio* était favorisée par des températures d'eau supérieures à 27°C (Ushijima et al., 2018). La gamme de salinité observée lors de l'élevage peut aussi avoir favorisée ou non certaines espèces de *Vibrio*.

Il serait intéressant d'effectuer du metabarcoding 16S sur les prélèvements effectués lors du deuxième élevage ALADIN pour vérifier que des pathogènes ne sont pas responsables des moins bonnes performances que le premier. De plus, il est possible que l'antibiotique administré ne cible pas certaines bactéries pathogènes ou bien qu'elles soient résistantes, et par conséquent, qu'elles soient tout de même responsables des mortalités observées.

Un facteur exogène à noter et qui a varié lors des élevages est la **salinité** de l'eau. Pendant les 17 jours du premier et du second élevage, respectivement 123,1 mm et 52,3 mm de pluie ont été enregistrées à la station météorologique la plus proche, Royan-Medis, tandis que 73,6 mm ont été enregistrées entre février et mars 2022 (MétéoFrance, 2024). Le pompage de l'eau de mer de la station se faisant en sortie de l'estuaire de la Seudre, la qualité de l'eau est influencée par les apports fluviaux de celle-ci mais également par ceux de la Charente et de la Gironde en raison de la courantologie. Ainsi, cette pluviométrie explique les variations de salinité observée. Dans leur guide pratique décrivant les méthodes de conduite d'une éclosérie de bivalves, Helm & al. ont rapporté que la croissance des larves de *M.gigas* était maximale à une salinité de 25. D'après la revue bibliographique élaborée par Antonio et al. en 2009, une salinité inférieure à celle du milieu marin, comprise entre 31 et 38, optimiserait la survie et la croissance des larves pour 8 espèces d'huîtres dont l'huître creuse. La salinité pourrait donc expliquer en partie la meilleure survie larvaire obtenue en 2024 à la même période mais elle n'expliquerait pas le déclin de survie observé en 2022. En revanche, ces faibles salinités pourraient impacter

négalement le taux d'éclosion, puisque dans le milieu naturel, les huîtres se reproduisent en été, lorsque la salinité est à son maximum.

La maturation des géniteurs et notamment la **qualité des ovocytes** et des spermatozoïdes qu'ils vont produire est également un facteur à prendre en compte lors des analyses puisqu'elle a été identifiée comme en partie responsable des fluctuations des performances larvaires (Bayne, 2017, Boulais et al., 2015, Helm et al., 2004). Cette qualité est étudiée au regard de la composition biochimique de l'ovocyte et par conséquent de l'investissement maternel apporté pendant la vitellogenèse (Bayne, 2017). Le géniteur va accumuler du glycogène qui va permettre de synthétiser de novo les lipides. Une corrélation positive entre les taux de glycogènes dans les tissus et la production de gamètes a mis en évidence l'importance du glycogène dans la réussite de la reproduction (Deslous-Paoli and Heral, 1988). Les lipides sont également utilisés pendant l'embryogénèse et particulièrement les acides gras insaturés et polyinsaturés (Deslous-Paoli & Heral, 1988). Le guide pratique d'élevage des bivalves rédigé par Helm et al. en 2004 a montré qu'il existait une corrélation positive entre le pourcentage total de lipides du poids sec de l'ovocyte et le pourcentage de larves-D formé. Les acides gras essentiels étant peu synthétisés chez les bivalves, il est nécessaire d'avoir un apport en phytoplanctons pour combler les besoins nutritionnels (Da Costa et al., 2015).

Ainsi, l'alimentation apportée aux géniteurs en maturation est en grande partie responsable de la qualité de l'ovocyte et par conséquent, du taux d'éclosion. Il est alors recommandé de diversifier l'alimentation des géniteurs en apportant 2 à 3 espèces différentes de phytoplancton (Utting & Millican, 1997).

La mobilité des spermatozoïdes est également un facteur important lors de la fécondation et par conséquent pour le taux d'éclosion (Bayne, 2017).

Un autre facteur à l'origine des variations dans les résultats d'éclosion et de survie est le facteur **génétique**. L'huître creuse est une espèce suivant la stratégie de type « r », c'est-à-dire que sa descendance sera très nombreuse avec une forte mortalité pour pallier l'instabilité du milieu marin. Du fait de cette stratégie, il a été montré que les huîtres avaient un fardeau génétique important, possédant de nombreuses mutations récessives délétères (Launey & Hedgecock, 2001). Il faudrait alors une majorité d'hétérozygotes pour ne pas que ces mutations s'expriment. De plus, une autre hypothèse appelée « Sweepstakes Reproduction Success » (SRS) suggère que seulement une partie aléatoire d'une population adulte réussit à participer à la reproduction ce qui entraîne une faible diversité génétique (Hedgecock & Pudovkin, 2011). Ainsi, ce facteur génétique est difficilement contrôlable mais peut être optimisé par sélection génétique en exploitant notamment l'hétérozygote. Cette sélection est d'autant plus cruciale que la survie larvaire et le succès à la fixation sont des traits héréditaires, soulignant donc l'effet génétique des géniteurs sur les premiers stades de vie de l'huître (Ernande, 2003).

Enfin, les différentes causes de mortalités et malformations larvaires évoquées dans la partie I.b peuvent également être responsables des mauvaises performances larvaires observées en 2022 et lors du deuxième élevage ALADIN. En effet, lors du projet Emergent'Sea recherchant des substances d'intérêt pour décrire l'état écologique des masses d'eau en milieu marin, du boscalid, fongicide liposoluble, a été retrouvé dans des huîtres creuses de l'estuaire de la Seudre, à hauteur de 0,03 mg.kg⁻¹ (Amouroux, 2020 ; Ifremer, 2022). Le boscalid a déjà été identifié comme une substance toxique provoquant des malformations larvaires (Bringer et al.,

2021). En revanche, lors du suivi annuel des contaminants chimiques effectué par l'Ifremer, aucun des contaminants métalliques ou organiques ciblés n'a été détecté au-delà du seuil EAC (Environmental Assessment Criteria) dans les huîtres creuses au point de suivi de l'estuaire de la Seudre depuis 2020 (Le Fur, 2024). Le seuil EAC, défini par la Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est, correspond à un critère d'écotoxicologie. Il est égal à la teneur maximum associée à aucun effet chronique sur les espèces marines.

Le système de traitement de l'eau à la PMMLT ne permettant pas d'éliminer les contaminants chimiques comme les pesticides et les ETM, ces substances peuvent contaminer les élevages lorsqu'elles sont présentes dans le milieu en fortes concentrations. Lors d'une thèse soutenue en 2023, les procédés d'élimination de micropolluants organiques (pesticides, molécules pharmaceutiques, ...) en eau de mer ont été étudiés (Couleaud, 2023). Des procédés par charbon actif et ultrafiltration ont été testés à la PMMLT. Leurs impacts sur les performances larvaires de *M.gigas* ont également été étudiés. Lors de cette étude, il a été rapporté qu'un système comportant une filtration mécanique, une filtration UV-C, une ultrafiltration puis une filtration sur charbon actif n'avait pas d'effet sur l'éclosion des larves et était délétère pour la survie, la croissance et la fixation. Ces procédés très utilisés en potabilisation purifient peut-être de manière excessive l'EDM et rendent sa composition très différente de celle retrouvée dans le milieu naturel ce qui peut perturber les larves. Des optimisations de ce système restent encore à être faites pour qu'il soit intéressant à utiliser en écloséries.

2. L'analyse des performances larvaires pour les 2 élevages

a. Le taux d'éclosion

Le traitement antibiotique n'a eu aucun effet significatif, ni positif ni négatif, sur l'embryogénèse des larves dans les deux élevages larvaires ALADIN. Pour le premier élevage, aucune population bactérienne pathogène n'a été identifiée au premier jour d'élevage, confirmant ainsi que l'utilisation d'antibiotiques à ce stade n'est pas nécessaire. Pour le second élevage, les analyses de metabarcoding n'ont pas été réalisées, ce qui ne permet pas d'exclure totalement la possibilité d'un développement de pathogènes. Il est également possible que certaines de ces bactéries pathogènes ne soient pas ciblées ou bien qu'elles soient résistantes à l'antibiotique, et par conséquent, qu'elles soient tout de même responsables des mortalités observées lors du second élevage.

b. La survie larvaire

La **survie larvaire** a été favorisée par une réduction de densité des larves dans les bacs. Cet effet de la densité a déjà été observé chez d'autres espèces du genre *Crassostrea* comme *C.angulata* (Tan et al., 2023) ou *C.rhizophorae* (Antonio et al., 2009). La publication d'Antonio et al., en 2009 recommandaient 12 larves-D.mL⁻¹, plus grande densité testée, puis 2 larves umbonées.mL⁻¹, plus petite densité testée. Ainsi, leurs résultats indiquaient que la densité réduite favorisait la survie des larves seulement à un stade larvaire plus avancé. Ce résultat ne s'est pas vérifié lors du premier élevage ALADIN, puisque les survies séquentielles, entre J1 et J7 puis entre J7 et Jfin, ne montraient pas d'effet significatif de la densité. Alors, l'effet de la densité réduite est avérée seulement si l'ensemble de la période d'élevage est pris en compte. Ainsi, une densité de 5 larves-D.mL⁻¹ puis de 2 larves umbonées.mL⁻¹ serait la plus adaptée.

Le deuxième élevage présente des résultats différents et plus complexes à analyser puisque la triple interaction entre les facteurs est significative. La triple interaction a été découpée en doubles interactions en fonction des modalités d'un troisième facteur, 2 se sont montrées significatives. Pour les 2 doubles interactions les modalités « antibiotique », « quotidien » et « densité réduite » sont en jeu.

Concernant la première interaction, si l'on s'intéresse à tous les bacs ayant reçu un traitement antibiotique alors seulement l'ajout des conditions de densité réduite et de changement d'eau quotidien serait négatif pour la survie des larves. Dans le cas, où un traitement antibiotique est appliqué, il ne faudrait donc pas combiner une réduction de densité et un changement d'eau quotidien.

Concernant la deuxième interaction, si l'on s'intéresse à tous les bacs ayant reçu un changement d'eau quotidien, alors seulement l'ajout des conditions de densité réduite et de traitement antibiotique serait positif pour les larves. Dans le cas, où un changement d'eau quotidien est appliqué, il serait donc bénéfique pour la survie des larves d'appliquer un traitement antibiotique combiné à une densité réduite.

Il est à noter que même si le facteur « changement d'eau » n'était pas significatif pour la survie larvaire lors des deux élevages, la survie moyenne des larves ayant subi un changement d'eau quotidien est inférieure à celle ayant subi un changement d'eau 3 fois par semaine, malgré une meilleure croissance. Les mortalités observées peuvent être associées aux manipulations plus fréquentes lorsque l'eau est changée tous les jours. Le protocole fourni en annexe indique la manière dont les changements d'eau ont été opérés. Lorsque les bacs d'élevage sont vidés, les larves sont récupérées sur des tamis de mailles croissantes à la période de l'élevage. De nombreux éléments ont pu perturber les larves. Tout d'abord, les périodes d'assez dans les tamis, même si réduite au maximum, ont pu entraîner du stress chez les larves. Un autre facteur de stress lors du passage sur le tamis peut venir du jet d'eau utilisé pour concentrer les larves dans un coin et dont la puissance peut endommager le bivalve. Cette hypothèse a également été avancée par une publication d'Antonio et al. lors de leurs élevages conduits en 2009. Ensuite, certaines mailles des tamis ne sont pas complètement homogènes, entraînant ainsi une perte des plus petites larves. Enfin, malgré les précautions prises par l'éleveur, il est possible que des pertes soient observées lors des manipulations et notamment lorsque les larves sont transférées du tamis à un pot.

En conclusion, les résultats entre les deux élevages étant divergents il est difficile de tirer des pistes d'optimisation claires sur la survie larvaire. Cependant, il est à noter qu'un traitement antibiotique seul n'a pas eu d'effet, que ce soit positif ou négatif, sur la survie. **De ce fait, il est préconisé de ne pas utiliser d'antibiotiques en préventif pour les futurs élevages.**

c. La croissance

Les valeurs moyennes obtenues lors des deux élevages sont cohérentes à celles trouvées dans la littérature. En effet, le guide pratique d'élevage rédigé par Helm et al. indiquent des tailles allant de 80 à 100 μm pour une larve-D, 140 à 160 μm pour une larve umbonée et 260 à 320 μm pour une larve pédivéligère.

La **taille des larves** a été favorisée par le changement d'eau quotidien à J13 pour les 2 élevages larvaires mais également à J7 pour le premier. En effet, ce changement d'eau renouvelle l'apport en nutriments, en ions et en acides aminés présents naturellement dans l'eau de mer.

La larve, grâce à son velum, est capable d'accumuler les acides aminés et les ions et de les transporter dans l'ensemble de ses tissus (Manahan & Crisp, 1983). Pour former sa coquille, la larve a besoin des ions carbonate et calcium qui seront précipités sous forme d'aragonite (après métamorphose majoritairement sous forme de calcite) (Lee et al., 2006). Ainsi, la disponibilité de ces ions dans le milieu d'élevage peut rendre la formation de la coquille plus rapide et donc augmenter la taille des larves. De plus, les acides aminés identifiés comme l'alanine, la glutamine, l'arginine, la glycine ou encore la taurine sont également susceptibles de stimuler la croissance (Bayne, 2017).

De plus, changer l'eau fréquemment permettrait de limiter le développement de bactéries pathogènes puisque celles-ci se propagent notamment en utilisant les larves en décomposition comme substrat (Genard, 2011) ou bien le phytoplancton non consommé.

Pour le second élevage larvaire, la densité réduite favorisait également la croissance des larves à J7 et à J13, la compétition pour l'espace étant amoindrie. La croissance plus véloce de ces larves réduit le temps d'élevage larvaire puisqu'elles atteignent plus rapidement le stade pédivéligère et la capacité de métamorphose. Cela a notamment été observé lors du deuxième élevage ALADIN, pendant lequel au premier jour de l'envoi en fixation, seules les larves ayant été élevées dans des conditions de densité réduite ou de changement d'eau quotidien étaient prêtes à fixer.

d. La fixation

Les facteurs ayant des effets sur le taux de fixation sont très différents entre les deux élevages. Pour le premier, un changement d'eau quotidien croisé à une densité réduite en élevage larvaire favoriserait la fixation des larves à la micro-brisure. Il est possible que les larves provenant des bacs avec ces deux modalités réunies aient un meilleur taux de fixation puisqu'elles ont une taille moyenne supérieure aux autres essais. De ce fait, ces larves pourraient être plus en capacité d'effectuer la fixation puisqu'elles seraient plus développées. Cela a été confirmé par une publication de Coon et al. en 1990 lors de laquelle ils ont observé une corrélation entre la fixation et la taille des larves.

En ce qui concerne le deuxième élevage, une densité réduite améliorerait le taux de fixation. La densité réduite favorisant également la croissance des larves, la même hypothèse peut alors être émise que pour le premier élevage, à savoir que la taille des larves est corrélée positivement à la fixation.

Par ailleurs, un changement d'eau quotidien croisé à un traitement antibiotique serait néfaste pour la fixation des larves. En effet, les larves élevées dans ces conditions recevaient un traitement antibiotique à chaque changement d'eau puisque celui-ci est apporté dans le milieu d'élevage. Il peut alors être supposé que de cette façon l'antibiotique a plus d'impact sur les larves et leur microbiome. Or, il a été rapporté que la fixation pouvait être stimulée par les bactéries. Dans leur publication, Fitt et al. ont démontré que la fixation des larves de *M. gigas* pouvait être induite par l'ajout de surnageant de culture de 2 bactéries, *Alteromonas colwelliana* et *Vibrio cholerae* (Fitt et al., 1990). Ce sont un ou plusieurs composés chimiques dissous dans le surnageant qui participeraient à l'induction de la fixation. L'ammoniaque (NH_3), notamment excrété par les bactéries, a plus tard été identifié comme un autre élément pouvant déclencher la fixation (Coon et al., 1990, a.). **De ce fait, une utilisation quotidienne d'antibiotiques en élevage larvaire aurait l'effet inverse de celui escompté.**

3. Caractérisation des communautés bactériennes

Les résultats de metabarcoding ont mis en évidence la grande diversité de taxons bactériens présents en élevage larvaire d'huîtres creuses. Chaque compartiment est composé de taxons spécifiques, dont certains sont communs entre les échantillons d'EDM et de larves.

Malgré les traitements de filtration par UV, il reste une forte charge bactérienne qui entre en élevage larvaire (alpha diversité). Une fois que cette EDM est dans le milieu d'élevage, la charge bactérienne est presque divisée par deux, impliquant donc un processus de sélection des bactéries en fonction des ressources à leur disposition pour se développer et de la compétition. Au fur et à mesure que l'élevage se poursuit, la richesse spécifique et la diversité diminuent dans tous les compartiments, induisant que les taxons les plus compétitifs deviennent plus abondants au cours du temps mais également que la composition de l'EDM pompée dans le milieu naturel varie en fonction des conditions environnementales.

Le traitement antibiotique n'a pas eu d'effet significatif sur les communautés bactériennes des différents compartiments au regard des distances de Bray-Curtis. En revanche, il existe un effet significatif du traitement antibiotique sur les bactéries du compartiment « EDM » au regard des distances de Jaccard. Les résultats suggèrent que le traitement antibiotique a eu un impact sur la présence/absence des taxons mais n'a pas affecté les abondances de manière significative. L'antibiotique a donc un effet plus important sur des espèces cibles. Cela se confirme en analysant l'alpha diversité, il semble y avoir un effet sélectif sur le compartiment « EDM », conduisant à une diminution du nombre total d'espèces (richesse spécifique) et une augmentation de la diversité et de l'équitabilité entre les espèces restantes. Cela peut être interprété comme une élimination des espèces dominantes ou sensibles aux antibiotiques, laissant place à une communauté microbienne plus équilibrée parmi les espèces résistantes ou moins affectées.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont très abondantes dans le compartiment « Larves », notamment à J8, avec ou sans traitement antibiotique. Parmi les bactéries identifiées, les espèces *V.coralliilyticus* et *V.splendidus* sont les plus abondantes. Or, ces espèces ont déjà été identifiées comme pathogènes en élevage larvaire d'huîtres creuses. Elles sont apportées en partie par l'EDM entrant dans l'élevage et peut-être par le microbiome des géniteurs puisque les larves héritent d'une partie du microbiome des parents (Scanes et al., 2023). L'échantillon d'embryons n'ayant pas pu être séquencé, il n'est pas possible d'accepter ou de rejeter cette deuxième théorie. Pour autant, les résultats de performance larvaires sont positifs, les bactéries séquencées n'ont alors pas eu d'impact négatif sur le développement larvaire. Elles ont même pu être bénéfique en favorisant la fixation (Fitt et al., 1990) ou en constituant une part de l'alimentation des larves (Genard, 2011). L'efficacité de l'antibiotique utilisé peut être remise en question puisqu'il ne semble pas cibler les principales bactéries pathogènes.

Plusieurs études se sont déjà intéressées au microbiome des larves d'huîtres et à la composition bactérienne de l'EDM d'élevage. La publication d'Asmani et al., en 2016 a rapporté des compositions proches de celles identifiées lors du projet ALADIN. Dans le compartiment « Larves » de l'étude, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* et *Vibrio* étaient très présentes, tout comme dans les échantillons du projet. Contrairement à la publication, les bactéries de la famille des Rhodobacteraceae, symbiontes présumés des huîtres (Scanes et al.,

2023), ne sont pas les plus abondantes dans les échantillons du projet. Trois genres présents dans les résultats n'ont pas été identifiés dans la publication : *Oceanobacter*, *Brevundimonas* et *Marinifilum*.

En ce qui concerne le compartiment « EDM », les familles bactériennes les plus abondantes sont les mêmes entre les deux études, à savoir des Rhodobacteraceae, des Cryomorphaceae et des Pseudoalteromonadaceae. Les Cryomorphaceae apparaissant à partir de J7 et étant présents dans le compartiment « Phytoplancton », elles doivent être apportées par celui-ci.

Certaines souches du genre *Pseudoalteromonas* et *Alteromonas* sont utilisées comme probiotiques pour leurs effets bactéricides sur des pathogènes marins comme *V.splendidus* (Dantan, 2023 ; Kesarcodi-Watson et al., 2012). Cependant, la présence de ces deux genres ainsi que des bactéries pathogènes du genre *Vibrio* indique que les souches avec un effet bactéricide n'étaient pas présentes.

4. Voies d'optimisation et implications pour la PMMLT

a. Par les facteurs fixés étudiés

Effectuer un traitement antibiotique n'a eu aucun impact sur tous les indicateurs de performances étudiés au cours des deux élevages larvaires et sur les communautés bactériennes du premier élevage. Le traitement a même pu se révéler négatif lorsqu'il était combiné avec un autre facteur. De plus, pour le premier élevage larvaire, même si son utilisation a réduit l'abondance de bactéries du genre *Vibrio*, il n'a pas permis de complètement éliminer les espèces pathogènes. Ainsi, il ne semble pas nécessaire d'utiliser de traitement antibiotique, sauf en cas de mortalités avérées par des bactéries pathogènes. L'impact de l'écloserie sur l'environnement sera alors réduit et le budget alloué à leur achat également. En effet, au cours des deux élevages ALADIN, 1 407 mL d'antibiotique G4 a été utilisé ce qui représente ¼ de la consommation des élevages larvaires 2024 de la PMMLT. Le budget antibiotique pour ce volet du projet est alors de 354 €. Pour l'ensemble des élevages larvaires, l'utilisation en préventif a été majoritaire (87 utilisations/93), représentant 3 510 mL soit 885 €. Ainsi, une utilisation seulement en curatif diminuerait le budget alloué aux antibiotiques. De plus, étant donné que l'efficacité de la gentamicine (G4) a été remise en cause lors du projet, des antibiogrammes pourraient être effectués pour vérifier que cet antibiotique est toujours le plus approprié pour l'écloserie.

Changer l'eau de manière quotidienne a été identifiée comme un moyen de favoriser la croissance lors des deux élevages. Cependant, la survie a été négativement impactée. Ainsi, pour avoir les avantages du renouvellement d'eau quotidien et s'affranchir des inconvénients, le développement d'un système d'élevage en flux continu pourrait être mis en place. De cette façon, la croissance des larves serait favorisée et la fréquence des manipulations serait réduite. Avant même de mettre en place ce système, il pourrait être intéressant de laisser les tamis constamment en eau lors des manipulations pour vérifier si la survie larvaire est de cette façon moins impactée. En revanche, cette méthode ne bénéficie pas des avantages du changement d'eau quotidien.

Réduire la densité d'élevage a également été identifiée comme un moyen d'améliorer la croissance, la survie et la fixation. Ce changement impliquera pour la PMMLT une diminution du besoin en phytoplanctons, réduisant ainsi le temps que passe les agents de la PMMLT à la gestion des souches de phytoplanctons destinées à l'élevage larvaire et permettra également de

libérer de l'espace pour cultiver d'autres souches. En effet, lors des élevages ALADIN, la consommation de phytoplancton de *Tisochrysis lutea* était de 6 ballons de 10L pour une densité à 100% contre 3 ballons de 10L pour une densité réduite de 50 %.

De plus, les élevages étant expérimentaux et non à vocation commerciale, la quantité de larves produite à densité réduite est suffisante.

b. Par d'autres facteurs non contrôlés

La **salinité** peut être contrôlée en élevage larvaire pour optimiser les performances. Comme expliqué précédemment, une salinité de 25 pour les huîtres du genre *Crassostrea* (Helm et al., 2004, Antonio et al., 2009) est optimale. Cependant fixer la salinité à 25 (+/- 1) est impossible si le système en flux continu est également mis en place. Puisque les effets d'un renouvellement d'eau quotidien ont été démontrés dans cette étude, la mise en place du système en flux continu sera préférée au contrôle de la salinité. Cependant, il est possible d'étudier en parallèle l'effet de la salinité en élevage larvaire statique pour vérifier que les résultats concordent avec ceux de la littérature. L'étude pourrait se faire en fixant 3 salinités (25, 28 et 31) et en étudiant l'effet de ces salinités sur les indicateurs de performances larvaires. La conduite d'élevage suivrait le protocole standardisé tout en prenant en compte les préconisations fournies par la présente étude.

La **qualité des ovocytes** peut être améliorée en passant d'une alimentation monospécifique à polyspécifique ce qui conduirait à une amélioration du taux d'éclosion. En effet, à la PMMLT, les géniteurs sont principalement alimentés en *Skeletonema marinoï*, riche en EPA (C20:5) et DHA (C22:6), deux acides gras polyinsaturés essentiels pour les bivalves (Da Costa et al., 2015). Compléter l'alimentation avec une autre souche riche en glucides pourrait permettre de remplir tous les besoins des géniteurs. *Dunaliella tertiolecta* a été identifiée par Utting et Millican en 1997 comme une souche permettant aux bivalves de construire des réserves en glycogène. Cependant, cette souche est déficiente en acides gras polyinsaturés (Helm et al., 2004). Le guide pratique d'élevage des bivalves rédigé par Helm et al. indique que les souches du genre *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Thalassiosira*, *Chaetoceros* ou encore *Pavlova* peuvent être utilisées pour nourrir les géniteurs en maturation. Les 4 premiers genres mentionnés sont déjà produites à la PMMLT ce qui faciliterait leur ajout à la ration des géniteurs.

Conclusion, perspectives et limites de l'étude

La problématique de l'étude était la suivante : **Optimiser l'élevage larvaire expérimental d'huître creuse, *Magallana* (ex *Crassostrea*) *gigas*, en vue de limiter le développement de communautés bactériennes pathogènes.**

La principale limite de l'étude réside dans le plan d'échantillonnage mis en place. En effet, celui-ci ne permet pas de confirmer que les optimisations zootechniques ont permis de limiter les communautés bactériennes pathogènes puisque leurs compositions n'ont pas été étudiées pour les bacs associés. Malgré cette limite, l'étude a permis de répondre aux objectifs de la problématique, notamment concernant l'utilisation des antibiotiques.

La conduite des deux élevages larvaires a mis en avant l'effet des pratiques zootechniques sur les performances larvaires. Lors des deux élevages, l'optimisation des pratiques d'élevage (changement d'eau quotidien et densité réduite) a amélioré les performances larvaires, comme supposé au début de l'étude. En revanche, l'utilisation d'antibiotiques en préventif s'est révélée infructueuse. De plus, bien que les élevages aient été conduits en suivant un protocole standardisé, ils ont montré des performances différentes soulignant l'effet de paramètres non contrôlés, comme la salinité ou encore la qualité des ovocytes.

Les analyses de metabarcoding ont mis en évidence une composition bactérienne distincte entre les compartiments « EDM », « Larves » et « Phytoplancton », malgré des taxons communs entre les compartiments « EDM » et « Larves ». Le traitement antibiotique a eu un effet significatif sur la présence/absence de certains taxons dans l'EDM du milieu d'élevage mais les bactéries pathogènes du genre *Vibrio* sont toujours présentes après son application. L'efficacité de l'antibiotique utilisé semble alors questionnable. Ces pathogènes peuvent venir de l'EDM entrant en salle d'élevage ou bien d'une partie du microbiome transmis par les parents. Pour autant, ces bactéries n'ont pas eu d'impact négatif clair sur les performances larvaires.

Ainsi pour les futures larves produites à la PMMLT, les optimisations zootechniques suivantes peuvent être mises en place :

- Une densité de 5 larves-D.mL⁻¹ à J1 puis de 2 larves umbonées.mL⁻¹ à partir de J7 (alors que précédemment 10 larves.mL⁻¹ à J1 et 4 larves.mL⁻¹ à partir de J7)
- Pas d'utilisation d'antibiotiques en préventif, mais seulement en curatif lorsque des bactéries pathogènes sont identifiées.
- Le développement d'un système en flux continu pour renouveler régulièrement la qualité de l'eau et s'affranchir de trop manipuler les larves.
- Diversifier l'alimentation des animaux en maturation en passant d'une alimentation monospécifique à polyspécifique.

Grâce aux optimisations préconisées, les performances de survie, croissance et fixation pourraient être améliorées.

Bibliographie

Articles

- Akcha, F., Coquillé, N., Sussarellu, R., Rouxel, J., Chauvelon, T., Gonzalez, P., Legeay, A., Bruzac, S., Sireau, T., Gonzalez, J.-L., Gourves, P.-Y., Godfrin, Y., Buchet, V., & Stachowski-Haberkorn, S. (2022). Trophic transfer of copper decreases the condition index in *Crassostrea gigas* spat in concomitance with a change in the microalgal fatty acid profile and enhanced oyster energy demand. *Science of The Total Environment*, 824, 17p. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153841>
- Antonio, I., Guimaraes, I., Peixoto, S., & Olivera, A. (2009). The combined effects of salinity, stocking density and frequency of water exchange on the growth and survival of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) larvae. *Arquivos de ciencias do mar*, 42(2), p.74-80. https://www.researchgate.net/publication/283970710_The_combined_effects_of_salinity_stocking_density_and_frequency_of_water_exchange_on_the_growth_and_survival_of_mangrove_oyster_Crassostrea_rhizophorae_Guilding_1828_larvae
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R., & Nicolas, J.-L. (2016). Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 464, p.434-444. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.020>
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., & Benabdelmouna, A. (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology*, 146, p.93-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.032>
- Boulais Myrina, Corporeau Charlotte, Huvet Arnaud, Bernard Ismaël, Quere Claudie, Quillien Virgile, Fabioux Caroline, & Suquet Marc. (2015). Assessment of oocyte and trochophore

- quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 437, p.201-207.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.025>
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Pageaud, M., & Cachot, J. (2021). Toxicity and risk assessment of six widely used pesticides on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 779(146343), 11p. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146343>
- Clerissi, C., De Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., & Toulza, E. (2020). Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Frontiers in Microbiology*, 11(311), 11p. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00311>
- Coon, S. L., Fitt, W. K., & Bonar, D. B. (1990). Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 106(3), p.379-387.
<https://doi.org/10.1007/BF01344316>
- Coon, S. L., Walch, M., Fitt, W. K., Weiner, R. M., & Bonar, D. B. (1990). Ammonia Induces Settlement Behavior in Oyster Larvae. *The Biological Bulletin*, 179(3), p.297-303.
<https://doi.org/10.2307/1542321>
- Corporeau, C., Huvet, A., Pichereau, V., Delisle, L., Quéré, C., Dubreuil, C., Artigaud, S., Brenner, C., Meyenberg Cunha-De Padua, M., & Mazure, N. (2019). *Crassostrea gigas*, une huître au service de la recherche sur le cancer. *médecine/sciences*, 35(5), p.463-466.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2019079>
- Da Costa, F., Robert, R., Quéré, C., Wikfors, G. H., & Soudant, P. (2015). Essential Fatty Acid Assimilation and Synthesis in Larvae of the Bivalve *Crassostrea gigas*. *Lipids*, 50(5), p.503-511. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4006-z>

- Deslous-Paoli, J.-M., & Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources*, 1(4), p.239-249. <https://doi.org/10.1051/alr:1988024>
- Elston, R., Hasegawa, H., Humphrey, K., Polyak, I., & Häse, C. (2008). Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82, p.119-134. <https://doi.org/10.3354/dao01982>
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., & Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9(12), p.1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>
- Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H., & Boudry, P. (2003). Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), p.399-414. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00543.x>
- Estes, R., Friedman, C., Elston, R., & Herwig, R. (2004). Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, p.223-230. <https://doi.org/10.3354/dao058223>
- Fitt, W. K., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M., Colwell, R. R., & Bonar, D. B. (1990). Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Marine Biology*, 106(3), p.389-394. <https://doi.org/10.1007/BF01344317>
- Grizel, H., & Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science*, 47(3), p.399-403. <https://doi.org/10.1093/icesjms/47.3.399>

- Hedgecock, D., & Pudovkin, A. I. (2011). Sweepstakes Reproductive Success in Highly Fecund Marine Fish and Shellfish: A Review and Commentary. *Bulletin of Marine Science*, 87(4), p.971-1002. <https://doi.org/10.5343/bms.2010.1051>
- Helm, M. M., & Millican, P. F. (1977). Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 11(1), p.1-12. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90149-1)
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., & Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture*, 344-349, p.29-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029>
- Lafargue, I., Balan, S., Bonotaux, J., & Guicheney, H. (2019). Analyse & Résultats. *Agreste Nouvelle-Aquitaine*, 72, 7p. ISSN : 2551-1114
- Laroche, O., Symonds, J. E., Smith, K. F., Banks, J. C., Mae, H., Bowman, J. P., & Pochon, X. (2018). Understanding bacterial communities for informed biosecurity and improved larval survival in Pacific oysters. *Aquaculture*, 497, p.164-173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.052>
- Launey, S., & Hedgecock, D. (2001). High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159(1), p.255-265. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.1.255>
- Lee, S. W., Hong, S. M., & Choi, C. S. (2006). Characteristics of calcification processes in embryos and larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Marine Science*, 78(2), p.309-317. https://www.researchgate.net/publication/292134590_Characteristics_of_calcification_processes_in_embryos_and_larvae_of_the_Pacific_oyster_Crassostrea_gigas
- Le Fur, I. (2024). Qualité du Milieu Marin Littoral. Bulletin de la surveillance 2023. Départements de Charente-Maritime et de Vendée (sud). En cours de publication

- Manahan, D. T., & Crisp, D. J. (1983). Autoradiographic studies on the uptake of dissolved amino acids from sea water by bivalve larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 63(3), p.673-682. <https://doi.org/10.1017/S0025315400070983>
- Pernet, F., Bricelj, V. M., & Cartier, S. (2006). Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 329(2), p.265-280. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.09.008>
- Prost, C. (2021). Enquête Aquaculture 2020. *Chiffres et données - Agreste*, 16, 65p. https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/Chd2116/cd2021-16_Aqua2020.pdf
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N., & Maffart, P. (1994). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue de Medecine Veterinaire*, 145(10), p.735-742. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2898/>
- Rodgers, C., Arzul, I., Carrasco, N., & Furones Nozal, D. (2019). A literature review as an aid to identify strategies for mitigating ostreid herpesvirus 1 in *Crassostrea gigas* hatchery and nursery systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), p.565-585. <https://doi.org/10.1111/raq.12246>
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C., McCauley, D. E., O'Neil, P., Parker, I. M., Thompson, J. N., & Weller, S. G. (2001). The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), p.305-332. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037>
- Scanes, E., Ross, P. M., Seymour, J. R., Siboni, N., Dove, M. C., O'Connor, W. A., Dittes, C., & Parker, L. M. (2023). Transgenerational transfer of the microbiome is altered by ocean acidification in oyster larvae. *Aquaculture*, 565(739153), 8p. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739153>

- Sol Dourdin, T., Rivière, G., Cormier, A., Di Poi, C., Guyomard, K., Rabiller, M., Akcha, F., Bah Sadialiou, T., Le Monier, P., & Sussarellu, R. (2023). Molecular and phenotypic effects of early exposure to an environmentally relevant pesticide mixture in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 326(121472), p.15. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121472>
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D., & Muroga, K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33, p.111-118. <https://doi.org/10.3354/dao033111>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), p.1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Tan, K., Zhai, Y., Zhang, H., Zeng, Z., Ning, Y., & Zheng, H. (2023). Effects of culture conditions (stocking density, water depth and aquaculture gear) on the aquaculture performance of a new *Crassostrea angulata* variety “Golden oyster#1”. *Aquaculture*, 564(739054), 8p. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739054>
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E., & Leifson, E. (1965). Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology. *Journal of Bacteriology*, 90(4), p.1036-1044. <https://doi.org/10.1128/jb.90.4.1036-1044.1965>
- Ushijima, B., Richards, G. P., Watson, M. A., Schubiger, C. B., & Häse, C. C. (2018). Factors affecting infection of corals and larval oysters by *Vibrio coralliilyticus*. *PLOS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199475>
- Utting, S. D., & Millican, P. F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155(1-4), p.45-54. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00108-7)

- Utting, S., & Spencer, B. (1991). The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. *Laboratory leaflet*, 68, 31p. <https://www.cefas.co.uk/data-and-publications/publications/search/#/results?f=0;q=;h=0;t=j=0;r=a=1;w=spencer;p=1>
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.-L., Marissal, É., & Berthe, F. (2002). Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus. Biologies*, 325(3), p.231-238. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(02\)01428-2](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01428-2)
- Wallace, R. K., Waters, P., & Scott Rikard, F. (2008). Oyster Hatchery Techniques. *Southern Regional Aquaculture Center*, 4302, 6p. https://www.researchgate.net/publication/242715990_Oyster_Hatchery_Techniques

Documents internes

- Akcha, F., Rouxel, J., Menard, D., Potier, J., & Sussarellu, R. (2014). Utilisation d'Incubateurs in Situ pour l'Évaluation de la qualité chimique des eaux côtières et de son Impact sur le développement et la survie des huîtres (INSEV3I), *Ifremer Centre Atlantique*, Document interne (document interne)
- François, et al., (2023). Analyse des causes et plan d'actions. *Ifremer Centre Atlantique* (document interne)
- Girardin, F., & Morin, D. (2020). Manuel technique et organisationnel plateforme expérimentale mollusques marins de la Tremblade, *Ifremer Centre Atlantique* (document interne), 30p
- Morin, D., Girardin, F., & Stravrakakis, C. (2023). Analyse des causes et plan d'actions : Performance des élevages larvaires de février-juin 2022. *Ifremer Centre Atlantique* (document interne), 18p
- Noël, C. (2023). Metabarcoding: a tool for assessing community biodiversity. Document interne
- Stravrakakis, C. (2024). Dossier de candidature - Appel à projets génériques. *Ifremer Centre Nantes* (document interne), 8p

Livres

- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) in R [en ligne]. S. Kenett, N. T. Longford, W. W. Piegorsch, & F. Ruggeri (Éds.), *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (1^{re} éd), p.1-15. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat07841> (Consulté le 02 mai 2024)
- Bayne, B. L. (2017). *Biology of oysters*. Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Boucher, J., & Friot, D. (2017). Primary microplastics in the oceans: A global evaluation of sources [en ligne]. *IUCN International Union for Conservation of Nature.*, 31p. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.01.en> (Consulté le 15 avril 2024)
- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A., Bourne, N., & FAO (Éds.). (2004). *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Knud-Hansen, C. (1997). Experimental Design and Analysis in Aquaculture [en ligne]. In *Dynamics of Pond Aquaculture*, p.325-375. https://books.google.fr/books?id=m_EczUbFnDMC&pg=PA183&lpg=PA183&dq=0-56670-274-7&source=bl&ots=dfKv42lbek&sig=ACfU3U3SN9jKjCLLsd9NC0q4GZq9WWDw6g&hl=f r&sa=X&ved=2ahUKEwixgLvmjquHAXVncaQEHTyGDakQ6AF6BAGIEAM#v=onepage&q=0-56670-274-7&f=false (Consulté le 20 mai 2024)

Packages R

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2003). lme4: Linear Mixed-Effects Models using « Eigen » and S4. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.lme4>

- McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarkopf, L., Alford, R. A., & Zenger, K. R. (2018). microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies. <https://github.com/donaldtmcknight/microDecon>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Noël, C. (2024). metaBmisc: miscellaneous functions for metabarcoding analysis. <https://gitlab.ifremer.fr/cn7ab95/metabmisc>

Rapports

- Amouroux, I. (2020). Emergent'Sea Recherche de Substances d'intérêt Emergent en Milieu Marin. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00704/81569/>
- Delorme, A. (2024). Chiffres et données - Enquête Aquaculture 2022. *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*, 68p. <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Chd2403/detail/>

Sites web

- Ifremer. (s. d.). Surval - Accès aux données d'environnement marin et littoral. <https://surval.ifremer.fr/Donnees/Graphes-30140#/sensor/32071102>
- Ifremer. (2020). Envlit - Environnement littoral. <https://envlit.ifremer.fr/Surveillance-du-littoral/Hydrologie/Parametres-suivis>
- Ifremer. (2023, février 3). Présentation - EMMA. <https://emma.ifremer.fr/L-unite-EMMA/Presentation>
- Ifremer. (2024a, février 9). Recherche - CCEM. <https://ccem.ifremer.fr/Recherche>
- Ifremer. (2024b, décembre 1). Présentation - ASIM. <https://asim.ifremer.fr/Presentation>

MétéoFrance. (2024). Données climatologiques de base - quotidiennes
<https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/r/71ec691d-6903-473f-ae66-b1e388ce5994>

Règlement 2019/6 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE, No. 2019/6, 125 (2018). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006>

VIDAL. (2016). Substance active gentamicine.
<https://www.vidal.fr/medicaments/substances/gentamicine-1610.html>

Thèses

Ben Kheder, R. (2007). Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité. Thèse de doctorat en Océanologie Biologique [Université de Bretagne Occidentale], 241p.
<https://archimer.ifremer.fr/doc/00033/14450/>

Bringer, A. (2021). Environnement et conchyliculture : Etude des effets des microplastiques et pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des Pertuis Charentais. Thèse CIFRE de doctorat [Université de La Rochelle et de Bordeaux], 286p. tel-03623085

Couleaud, J. (2023). Procédés d'élimination de micropolluants organiques en eau de mer : applications aux éclosiers conchylicoles. Thèse de doctorat en Sciences de la Matière, des Molécules et Matériaux [ENSCR], 354p. <https://theses.hal.science/tel-04426659>

Dantan, L. (2023). Caractérisation des effets bénéfiques de la microflore naturelle de l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* en vue d'applications en conchyliculture. Thèse de doctorat en Energie Environnement [Université de Perpignan], 279p. <https://theses.hal.science/tel-04382801/>

Genard, B. (2011). Mortalité de masse et infection bactérienne chez les bivalves : liens avec la physiologie larvaire et l'environnement bactérien chez deux espèces d'huîtres commerciales. Thèse de doctorat en Océanographie [Université du Québec], 259p. <https://library->

archives.canada.ca/eng/services/services-

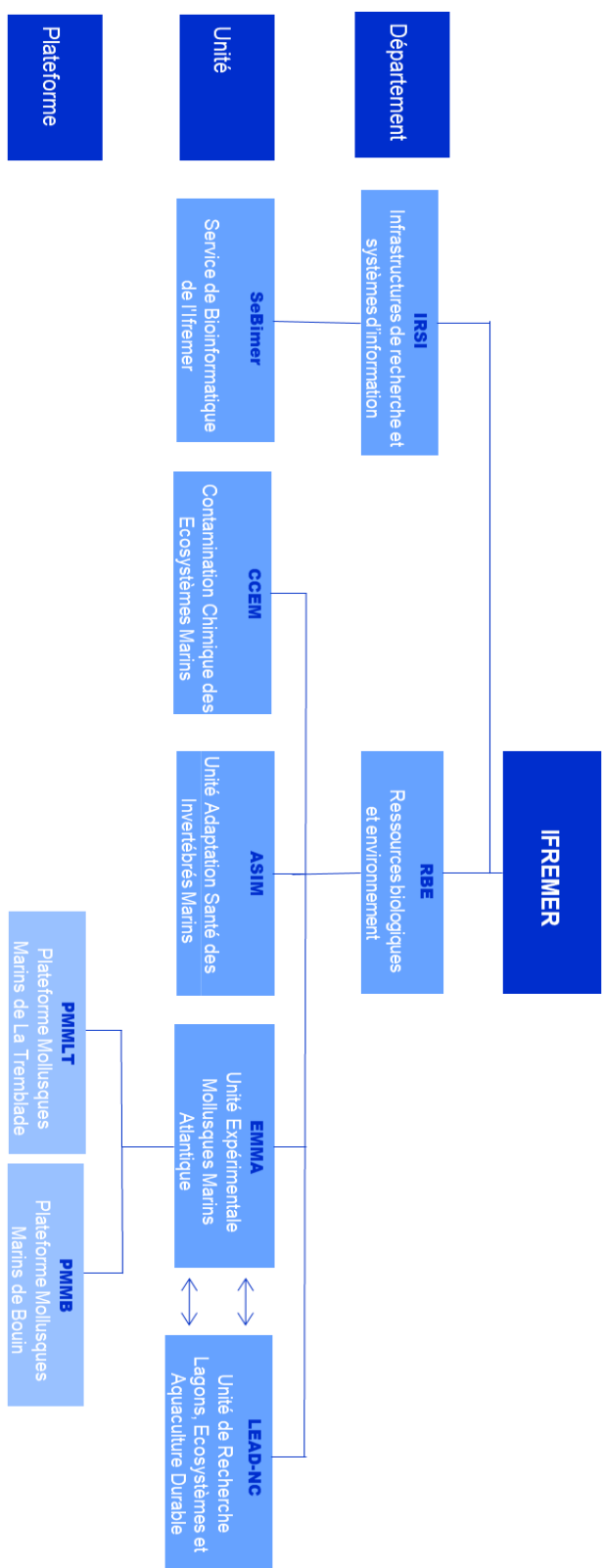
[libraries/theses/Pages/item.aspx?idNumber=1019467460](https://libraries.theses/Pages/item.aspx?idNumber=1019467460)

Levallois, A. (2023). Evaluation des effets biologiques d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les organismes marins. Thèse de doctorat en Biologie moléculaire [Université de Caen Normandie], 310p. <https://theses.hal.science/tel-04104705>

Rico Villa, B. (2009). Les besoins écophysiologiques des larves d'huître creuse *Crassostrea gigas* en conditions contrôlées : effet de la température, de la nourriture et modélisation de la croissance. Thèse de doctorat en Océanologie Biologique [Université de Brest], 180p. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00012/12308/9102.pdf>

Annexes

Annexe I - Organigramme des unités impliquées dans le projet ALADIN

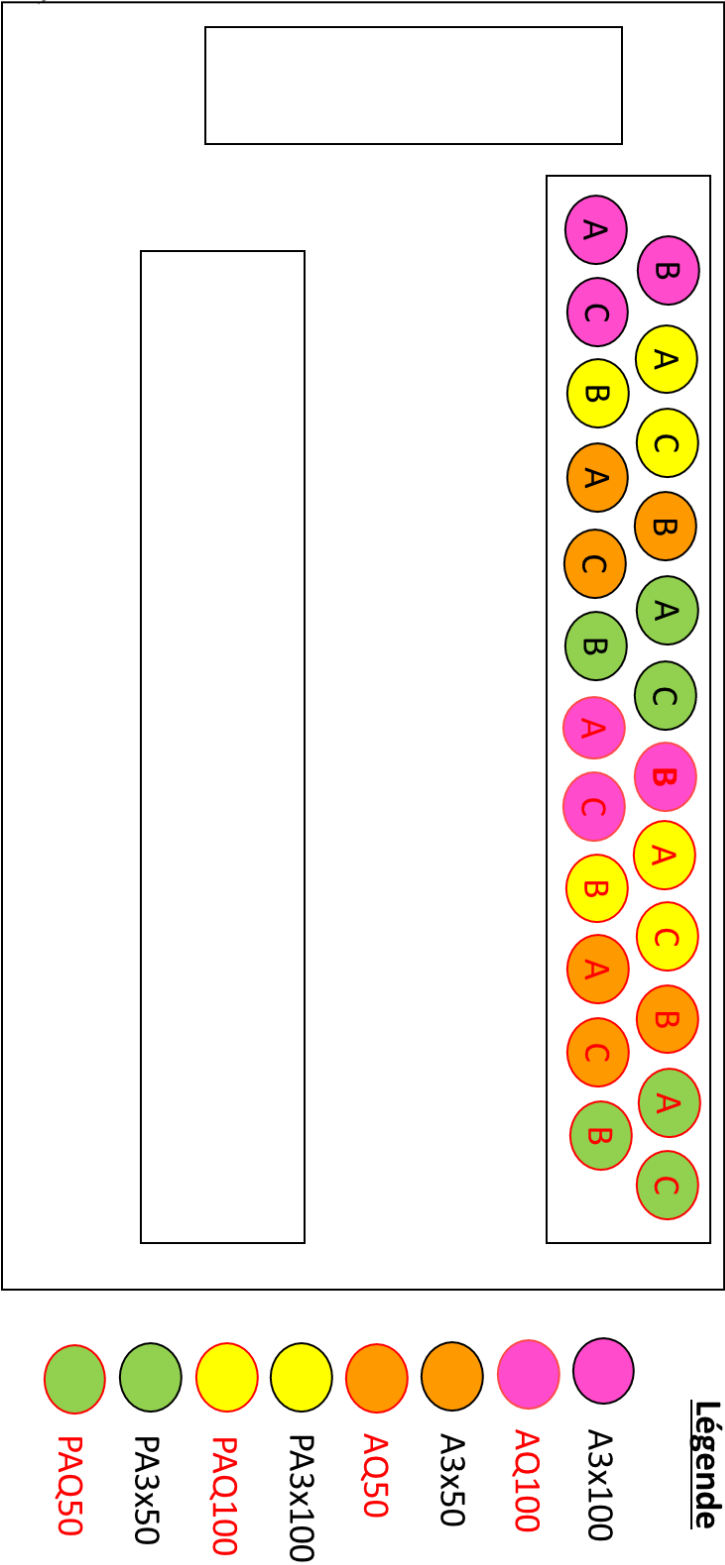


Annexe II – Ration de phytoplanctons distribuée lors du premier (EL1) et du deuxième élevage (EL2) larvaire

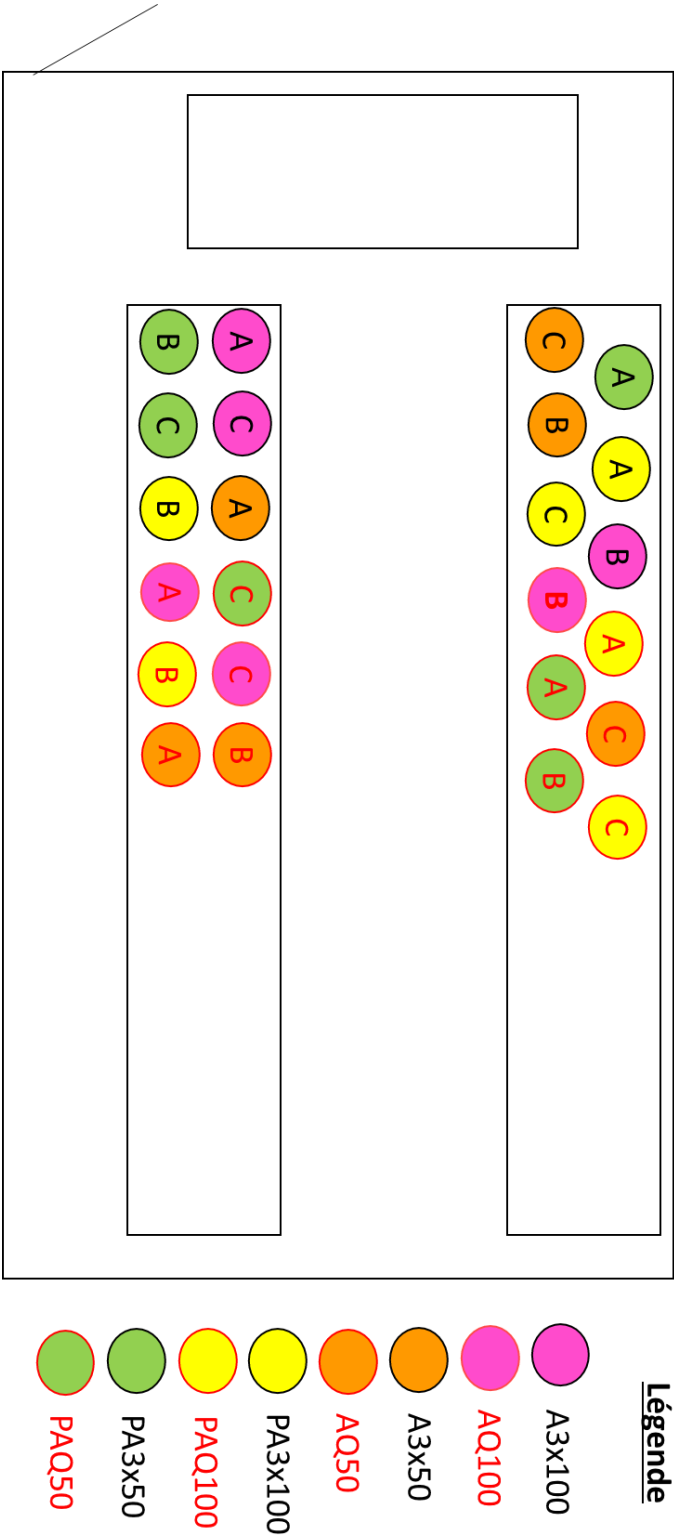
	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	% de la ration ajouté ou diminué	Nombre total de cellules par μL d'élevage larvaire
EL1				
J1	100%	0%	+30%	30
J2	100%	0%	+30%	30
J3	100%	0%	+30%	40
J4	100%	0%	+30%	40
J5	100%	0%	+30%	40
J6	90%	10%	+30%	50
J7	90%	10%	+30%	50
J8	90%	10%	+30%	60
J9	90%	10%	+10%	60
J10	90%	10%	+10%	70
J11	90%	10%	+10%	70
J12	90%	10%	+10%	80
J13	80%	20%	+10%	80
J14	80%	20%	+10%	100
J15	80%	20%	-20%	100
J16	80%	20%	-20%	110

	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	% de la ration ajouté ou diminué	Nombre total de cellules par μL d'élevage larvaire
EL2				
J1	100%	0%	0%	30
J2	100%	0%	0%	30
J3	100%	0%	0%	40
J4	100%	0%	0%	40
J5	90%	10%	0%	40
J6	90%	10%	0%	50
J7	90%	10%	0%	50
J8	90%	10%	0%	60
J9	90%	10%	-15%	60
J10	90%	10%	0%	70
J11	90%	10%	0%	70
J12	90%	10%	0%	80
J13	90%	10%	0%	80
J14	90%	10%	0%	100
J15	85%	15%	-20%	100
J16	85%	15%	-20%	110
J17	85%	15%	-30%	110

Annexe III – Plan de la salle pour le premier élevage larvaire



Annexe IV – Plan de la salle pour le second élevage larvaire



Annexe V – Maille des tamis utilisés lors du premier (EL1) et du deuxième (EL2) élevage larvaire

Jour d' élevage	Maille des tamis (µm)
EL1	
J1~J2	45
J3~J5	60
J6~J9	85
J10~J12	100
J13~J14	220/125
J15~J17	220/150

Jour d' élevage	Maille des tamis (µm)
EL2	
J1~J3	45
J4~J6	60
J7~J10	85
J11~J13	100
J14~J15	220/125
J16~J17	220/150
J18	200/150

Annexe VI – Protocole de production de larves de *Magallana gigas* en conditions contrôlées



Protocole de production de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) en conditions contrôlées



Instruction PMMLT : I.DX.5.13_V1 du 25/07/2024

Date de mise en application : 25/07/2024

Document rédigé par : S.LE GALL :		
 Vérifier le 25/07/24 : D. MORIN	Approuvé par : Frederic Girardin, Responsable de la PMMLT le 25/07/2024 	



La version électronique fait foi



Sommaire

1. Objet et domaine d'application.....	3
2. Le cycle larvaire de <i>Crassostrea (Magallana) gigas</i> et ses besoins physiologiques.....	3
3. Organisation des salles larvaires.....	5
3.1. Salle d'élevage larvaire 1.....	5
3.2. Salle d'élevage larvaire 2.....	6
4. Conduite d'une éclosure, de la maturation à la fixation.....	7
4.1. Prophylaxie.....	7
4.2. La maturation.....	7
4.3. L'élevage larvaire.....	8
4.3.1. Mise en place de la salle larvaire.....	8
4.3.2. Sexage par stripping.....	9
4.3.3. Fécondation.....	10
4.3.4. Sous-tirage.....	11
4.3.4.1. Cas particulier : Remise à densité.....	13
4.3.4.2. Cas particulier : Envoi en fixation.....	14
4.3.5. Suivi de l'élevage en dehors des jours de sous-tirage.....	15
4.3.6. Apport de phytoplancton.....	15
4.3.7. Nettoyage des salles larvaires.....	16
4.4. La micro-nurserie.....	17
4.5. Suivi des futurs naissains.....	17
Bibliographie.....	19



1. Objet et domaine d'application

Le présent protocole décrit les étapes à suivre pour conduire un élevage larvaire d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) de l'étape de la maturation jusqu'à la fixation.

A la suite du projet ALADIN (Amélioration des performances en élevages larvaires d'invertébrés marins), il a été montré qu'une réduction de densité favorise la survie larvaire ainsi que la croissance, et parfois la fixation. De ce fait, les densités indiquées dans ce protocole correspondent aux réductions appliquées lors des élevages ALADIN. De plus, lors de ce même projet, l'utilisation d'antibiotiques n'a pas montré d'effet négatif ou positif sur les larves. Leurs modes d'utilisation sera évoqué, même si leurs utilisations ne doivent pas être systématique.

2. Le cycle larvaire de *Crassostrea (Magallana) gigas* et ses besoins physiologiques

L'huître creuse *Crassostrea (Magallana) gigas* est hermaphrodite alternative protandre. Elle commence généralement sa première maturité sexuelle en tant que mâle. Puis, au cours de sa vie, un changement de sexe pourra avoir lieu, passant de mâle à femelle. De cette façon, en fonction de la longévité de la population, le sex-ratio va évoluer et la proportion de femelles deviendra plus importante (Bayne, 2017). « De vrais hermaphrodites peuvent subsister après le stade juvénile mais ils sont rares » (Marteil, 1976).

L'huître creuse étant ovipare, la fécondation se fait de manière externe. Les adultes matures vont libérer leurs gamètes sous l'influence de stimuli extérieurs et les ovocytes vont alors être fécondés par les spermatozoïdes dans l'environnement extérieur. Au bout de quelques heures, un embryon est formé. A ce stade, l'embryon ne s'alimente que de manière endogène par les réserves vitellines (Bayne, 2017). Ainsi, l'embryon est dépendant de la qualité du phytoplancton qui a été ingéré par les géniteurs. Après 1 jour, l'embryon atteint le stade Prodissoconque 1, autrement appelé larve D en raison de sa forme (figure 1). Le vélum, organe cillé, va alors se former et permettre à la larve de nager dans la colonne d'eau et de s'alimenter en phytoplancton (Helm et al., 2004). Au bout d'une semaine, la protubérance de la coquille s'accroît et la larve devient umbonnée. Une semaine plus tard, la larve approche la maturité et commence à vouloir se fixer à un substrat grâce au développement d'un pied (Rico Villa, 2009). Elle devient alors compétente à la métamorphose (Ben Kheder, 2017). Quand la larve a trouvé le support adapté, la métamorphose peut commencer (Helm et al., 2004). Celle-ci conduit à une modification du système d'alimentation de la larve, le vélum est remplacé par les branchies (Bayne, 2017). La larve fixée perd alors son pied et devient une post-larve ou naissain.



Protocole de production de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*)
en conditions contrôlées

Réf. I.DX.5.13_Version 1 du 25/07/2024

Date d'application : 25/07/2024

3/19



EMMA
Unité Expérimentale
Mollusques Marins
Atlantique de l'Armor

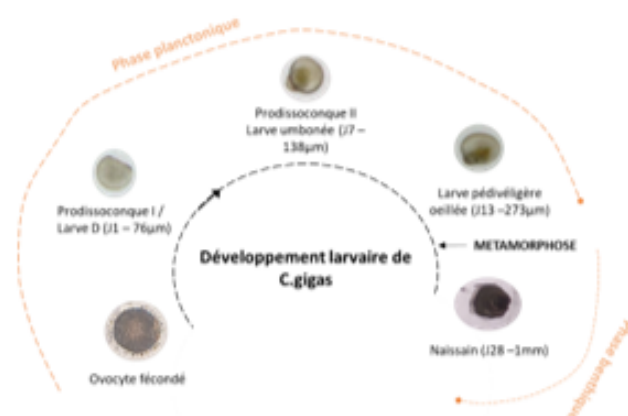


Figure 1 - Cycle de larvaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (données de taille issues des élevages réalisés à la PAMMLT)

Les changements de stades de la larve la rendent plus sensible aux variations du milieu et peuvent conduire à des fortes mortalités lors de ces changements. Ainsi, en éclosérie, une attention particulière est portée à l'optimisation et au maintien des paramètres physico-chimiques et aux facteurs influençant la croissance et la survie des larves.

De ce fait, en étudiant les besoins physiologiques des larves, les paramètres suivants ont été contrôlés :

- Température : l'eau de mer alimentant les bacs d'élevage est chauffée à 25°C et elle s'ajuste progressivement à la température de la salle qui est de 24°C. Dans la littérature, il a été montré que la larve élevée pouvait supporter des températures allant de 17°C à 32°C, mais que la température optimale était comprise entre 24° et 28°C (Helm et al., 2004 ; Rico Villa, 2009).
- pH : le pH varie très peu au cours de l'élevage et en général proche de 8,1 +/- 0,1. La larve tolère des pH allant de 7,5 à 8,5 dans le milieu naturel.
- O₂ : l'O₂ est contrôlé par un système de bullage d'air dans les bacs pour obtenir entre 6,5 et 7,5 mg/L d'oxygène dissous (Helm et al., 2004).

La salinité n'est pas contrôlée, elle varie au sein des bacs en fonction de la salinité du milieu. Le pompage d'eau de mer se faisant en embouchure de l'estuaire de la Seudre, ainsi la pluviométrie influence fortement cette salinité, notamment lors de l'ouverture des écluses des bassins versants. De plus, considérant la courantologie, le lieu est également sous influence des panaches fluviaux de la Gironde et de la Charente. Ainsi, au cours d'un même élevage larvaire, des variations allant de 23 à 31,7 ont été observées. Or, plusieurs publications ont rapporté que la croissance était maximisée à une salinité de 25 (Helm et al., 2004 ; Utting & Spencer, 1991). Cependant, la larve reste tolérante à des salinités comprises entre 10 et 35.

3. Organisation des salles larvaires



Figure 2 - Modélisation de la plateforme expérimentale avec un focus sur les salles d'élevage larvaire

3.1. Salle d'élevage larvaire 1

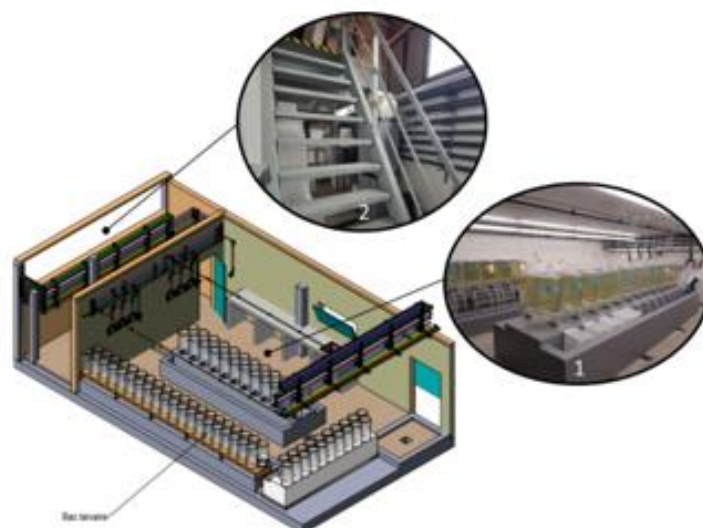


Figure 3 - Organisation de la salle larvaire 1

La salle d'élevage larvaire 1 est divisée en deux zones : une première zone dans laquelle l'élevage va se dérouler et une seconde zone dite de « rangement », séparée par un mur, qui sert de zone de stockage du matériel et qui contient, entre autres, les vannes pour contrôler l'arrivée d'eau dans la salle (figure 3).

La deuxième zone contient l'arrivée des tuyaux EDM BT (Eau De Mer Basse Température, 10°C), MT (Moyenne Température, 21°C), HT (Haute Température, 24°C) et AIR du réseau principal. L'EDM HT a un raccordement qui permet de faire passer l'eau par un filtre à UV-C, radiation à 254 nm, à une dose de 33 mJ.cm⁻² avant de ressortir dans la première zone d'élevage. Ce système de filtration UV est un système secondaire, mis en place en cas de panne du système de filtration UV primaire en entrée de la plateforme expérimentale. Le système UV primaire comporte deux réacteurs UV-C à 6 lampes organisées en parallèle dont la dose de traitement est de 80 mJ.cm⁻². En fonction de la dose UV-C, les micro-organismes ciblés ne seront pas les mêmes. Par exemple, dans la publication de Morga et al. en 2024 il a été montré qu'une dose minimum de 37 mJ.cm⁻² inactivait le virus OsHV-1. L'efficacité des UV dépend de plusieurs facteurs dont la transmittance de l'eau de mer et la présence de Fer ou de Manganèse le cas échéant, qui adhère à la gaine de quartz qui protège la lampe et empêche ainsi les radiations de passer. De plus, une filtration mécanique est le plus souvent faite en amont de la stérilisation pour débarrasser l'eau des matières en suspension pouvant absorber les rayonnements UV et ainsi réduire l'efficacité du traitement. La zone permet également d'entreposer les tamis et les poches et cartouches des systèmes de filtration mécanique utilisés dans les salles larvaires 1 et 2.

Les 3 tuyaux EDM de la deuxième zone ressortent dans la première zone d'élevage et passent par deux filtres mécaniques, un filtre à poche à 1 µm puis un filtre à cartouche 1 µm. Deux filtres à poches et deux filtres à cartouche sont présents pour pouvoir lors des élevages utiliser deux tuyaux. Le tuyau AIR passe au-dessus des 70 bacs cylindro-coniques de 30L. Le système de bullage de chaque bac est connecté à une sortie du tuyau AIR. Une paille comportant une loupe binoculaire et du matériel de comptage (cellule de Sedgewick Rafter, béchers, pots) est située à côté des bacs.

3.2. Salle d'élevage larvaire 2

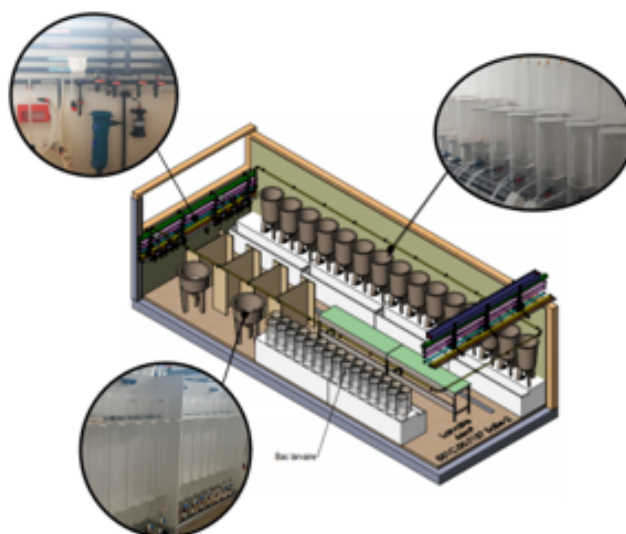


Figure 4 - Salle d'élevage larvaire 2

Contrairement à la salle larvaire 1, la salle larvaire 2 comporte qu'une seule pièce regroupant les systèmes de filtration et les infrastructures d'élevages. Depuis la première modélisation de la salle en 2021, des changements de matériel ont eu lieu dans la salle et ceux-ci ont été mis en avant

grâce aux photos sur la figure 4. Les salles larvaires 1 et 2 fonctionnent de la même façon, c'est pourquoi seules les différences avec la salle 1 seront présentées.

En ce qui concerne les systèmes de filtration, cette fois-ci le filtre UV-C a été placé en aval de la filtration mécanique, par poche puis par cartouche. 64 bacs cylindro-coniques de 30L sont à disposition mais également 88 bacs en système d'élevage en flux dynamique.

4. Conduite d'une éclosérie, de la maturation à la fixation

4.1. Prophylaxie

Avant d'entrer dans les salles, l'utilisateur doit se munir de bottes pour se protéger (EPI – Equipement de protection individuel) mais aussi pour éviter de contaminer les salles. Les salles sont fermées par des portes à fermeture automatique. En entrant dans la salle, l'utilisateur doit passer par un pédiluve rempli de Virkon S, désinfectant ayant un large spectre d'action sur plus de 350 souches de bactéries, virus et levures. Ce pédiluve est changé 1 fois par semaine par les utilisateurs.

Avant qu'un nouvel élevage commence, les bacs et les tuyaux sont nettoyés avec un détartrant détergent et les sols sont rincés plusieurs fois à l'eau sanitaire chaude.

Lors des élevages un tablier est fourni pour protéger l'utilisateur des projections, et notamment des potentielles projections d'hypochlorite de sodium (javel). En effet, de l'hypochlorite de sodium à 13% est utilisé pour nettoyer les bacs. Ce nettoyage se fait à l'aide d'une éponge, des gants et des lunettes de protection sont fournis en EPI.

4.2. La maturation

En éclosérie, la salle de maturation permet d'accélérer la gamétogénèse des adultes en les conditionnant à 20°C. Dans le milieu naturel, chez l'huître creuse, la gamétogénèse commence à des températures supérieures à 8°C. Il faut à l'huître une certaine quantité de degré-jours pour qu'elles libèrent ses gamètes. Les huîtres en maturation peuvent alors être utilisées en tant que géniteurs à partir 45 jours d'élevage à 18-20°C. Le processus de maturation se déroule de la manière suivante :

- Avant d'entrer en salle de maturation, les huîtres, et particulièrement les huîtres sauvages, ont leurs coquilles brossées pour retirer les épibiontes et ainsi ne pas contaminer le milieu d'élevage
- Ensuite, elles sont stockées dans des clayettes placées dans des auges de 250L à flux ouvert.
- Pour que les huîtres s'acclimatent au changement de température, la montée en température à 20°C se fait progressivement, en une semaine environ, puis elle est stabilisée
- Pendant toute la maturation, un apport quotidien en *Skeletonema marinoi* (RCC 75) est effectué.



4.3. L'élevage larvaire

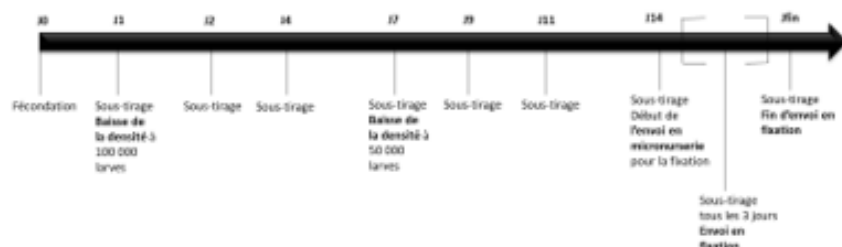


Figure 5 - Chronologie d'un élevage larvaire à la PMMLT (en effectuant la fécondation un lundi)

L'élevage larvaire à la PMMLT se déroule selon la figure 5. Lors de l'élevage il y a trois périodes clés correspondant aux périodes des 3 grands stades larvaires présentés à la figure 1 :

- Une première remise à densité à 100 000 larves à J1 car les larves ont atteint le stade de larves D
- Une deuxième remise à densité à 50 000 larves car les larves ont atteint le stade de larves umbonées.
- Le début de l'envoi en micronurserie lorsque les larves ont atteint le stade pédivéligère oeilé et qu'elles sont prêtes à se fixer à un substrat, la microbrisure.

Entre chaque remise à densité, tous les lundis, mercredis et vendredis, une vidange des bacs (ou sous-triage) est effectuée pour renouveler le milieu et pour éliminer la queue de lot, les larves mortes ou étant trop petites. L'élevage prend fin lorsque la quantité de larves nécessaires a été envoyées en micronurserie. Ce nombre peut varier en fonction des objectifs du projet en cours.

A noter que les jours indiqués sur la figure 5 varient légèrement en fonction du jour de la fécondation (lundi, mardi, ...).

4.3.1. Mise en place de la salle larvaire

La première étape de l'élevage consiste à ouvrir les vannes et à mettre en place les systèmes de filtration d'eau pour ne pas contaminer les larves.

- Avant toute chose, aller dans la zone de « rangement » et reproduire le placement des vannes de la figure 6. De cette façon, l'eau qui rentre dans la salle passe bien par l'UV. En parallèle, rebrancher l'UV 20 mins avant utilisation, temps de chauffe nécessaire avant d'obtenir la capacité de désinfection.



Figure 6 - Mise en place dans la zone de rangement

- Dans la salle principale, ouvrir les vannes de l'eau chaude « HT », à 24°C, et laisser couler l'eau avant de commencer à l'utiliser. En effet, la première eau peut être turbide, il faut donc patienter avant de l'utiliser.

- Une fois ce temps passé, monter les 2 filtres mécaniques. Pour monter le filtre à poche, insérer une poche de 1 ou 3 μm (trouvable dans la zone de rangement) dans la structure principale. Refermer le couvercle en le vissant.
- Pour monter le filtre à cartouche de 1 μm , placer la cartouche dans le tube et le visser à la structure principale.
- Puis brancher le tuyau le plus court de la sortie « EDM HT » à l'entrée du filtre à poche et brancher le tuyau le plus long à la sortie du filtre à cartouche (figure 7). De cette façon l'eau qui sort du tuyau le plus long passe bien par les deux filtres. Enfin, refermer la vanne d'évacuation en bas du filtre à poche, de cette façon l'eau sortira bien du tuyau. Si nécessaire, évacuer la pression contenue dans le filtre à poche en ouvrant la vanne blanche.
- Avant de commencer à remplir les jarres qui vont être utilisées pour l'élevage, préparer un seau de javel diluée. Pour cela, utiliser le bidon jaune d'hypochlorite de sodium à 13% et verser doucement à l'aide du tuyau un filet de javel dans le seau rempli avec 4 litres d'eau sanitaire chaude.
- Une fois tout cela fini, remplir les jarres de 30L d'eau de mer à l'aide de l'embout courbé de sorte à ce que le niveau de l'eau se situe juste en dessous du numéro associé à la jarre. Fermer complètement la vanne en bas de la jarre pour ne pas que l'eau sorte (figure 8).
- Puis définir le bullage en réglant la molette jaune. Le bullage doit être léger pour ne pas abîmer les larves.

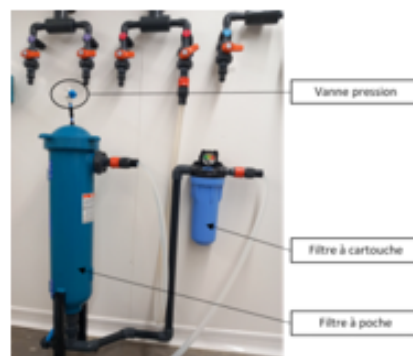


Figure 7 - Branchement des tuyaux



Figure 8 - Système de bullage et de vidange d'un bac

4.3.2. Sexage par stripping

- Eliminer les épibiontes en frottant la coquilles des huîtres issues de la maturation avec une brosse.
- La première étape du sexage consiste à distinguer les mâles des femelles à l'œil nu. Pour différencier les mâles des femelles, faire une première observation de la gonade à l'œil nu en ouvrant l'huître. Chez la femelle, la gonade va être plus jaune que chez le mâle qui aura une gonade plus terne.
- Pour confirmer la première sélection, effectuer une incision à l'aide d'un scalpel au niveau de la gonade. Prélever des échantillons de laitance (ovocytes ou spermatozoïdes), par exemple avec une allumette, de chaque huître et déposer ce prélèvement sur une lame. Observer au microscope au grossissement x400 et x100. Les spermatozoïdes doivent être motiles et les ovocytes doivent être en forme de poire. Une fois réhydratés les ovocytes reprennent une forme ronde (Helm et al. 2004). Les individus hermaphrodites sont écartés.
- Ensuite, commencer par stripper les femelles, car un comptage des ovocytes sera nécessaire par la suite, puis stripper les mâles. Le stripping s'effectue de la manière suivante : à l'aide d'une pissette d'eau de mer filtrée à 1 μm éliminer les débris présents dans l'huître. Ensuite faire plusieurs incisions légères sur la gonade pour libérer les gamètes tout en étant précautionneux pour ne pas abîmer la glande digestive qui se situe

juste en dessous. Si des morceaux de glande digestive sont récupérés, les gamètes peuvent être contaminés par des tissus ou des micro-organismes (Helm et al. 2004).

- Regrouper tous les gamètes femelles dans un même b cher (pool)
- Si l levage s int resse aux croisements entre familles alors déposer les spermatozoïdes de chaque individu dans un b cher séparé. De cette façon, la contribution de chaque m le à la fécondation sera connue. Sinon, il est possible de pooler tous les spermatozoïdes.

!!\ Le remplissage des pissettes doit se faire à l'extérieur de la paillasse, sans contact avec celle-ci, pour éviter les contaminations entre lots.

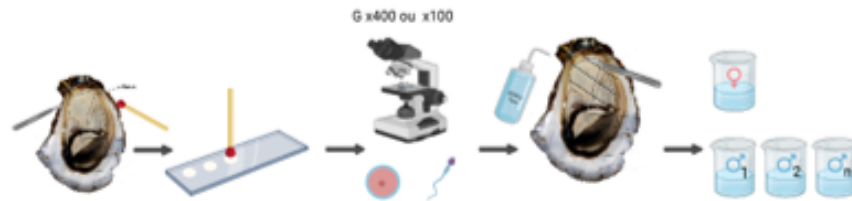


Figure D - Principales étapes du sexage (crée avec BioRender)

4.3.3. Fécondation

- Avant d'effectuer la fécondation, passer les gamètes femelles séparément sur deux tamis imbriqués : un de 100  m, pour retenir les potentiels déchets de glandes digestives ou de coquilles, et un de 20  m pour retenir les gamètes femelles.
- Les gamètes femelles tamis es sont r cup r es dans un b cher rempli d'eau de mer filtr e pouvant aller de 2L   5L en fonction de la quantité d'ovocytes pr lev e.
- Les gamètes mâles sont également récupérés dans un b cher rempli d'eau de mer filtr e

L'objectif de la fécondation est d'obtenir 3 000 000 d'ovocytes par bac d'élevage. Pour être sûr de la quantité d'ovocytes amen e par bac, il faut alors déterminer la quantité d'ovocytes au sein du b cher de 2L. Pour cela :

- Faire une dilution par 100 puis prélever 50 L de cette solution dilu e et déposer-en 3 exemplaires dans une chambre de numération Sedgewick Rafter (grille de 1mL subdivisant 1mL dans 1000 L).
- Compter le nombre d'ovocytes dans chaque goutte d pos e puis faire la moyenne pour obtenir le nombre d'ovocytes dans 50 L (figure 10 a). En fonction du nombre d'ovocytes dénombrés, prélever un volume à diluer dans un plus grand volume d'eau de mer selon la méthode de la figure 10 b
- Effectuer un produit en croix pour déterminer le volume à apporter par bac pour avoir 3 000 000 d'ovocytes.

- Les spermatozoïdes ne sont pas comptés mais leurs quantités est appréciée à l'œil. La qualité des spermatozoïdes est cependant vérifiée lors du sexage en observant leur motilité.
- Ensuite, répartir le contenu du béccher d'ovocytes dans n bécchers, n étant le nombre d'individus mâles. Ajouter les spermatozoïdes, remis en suspension pour avoir les individus les plus motiles en surface, directement dans les bécchers contenant les ovocytes. Il faut environ 100 fois plus de spermatozoïdes que d'ovocytes. De nouveau si les familles n'ont pas d'importance alors ajouter les spermatozoïdes poolés au ovocytes poolées.
- Attendre une demie heure que la fécondation se fasse et vérifier au microscope que les ovocytes ont été fécondés et qu'il y a donc suffisamment de spermatozoïdes (Ovocyte fécondé en figure 1).
- Puis, ajouter le volume précédemment calculé à chaque bac.
- Pour finir, identifier clairement les bacs pour ne pas confondre les lots.

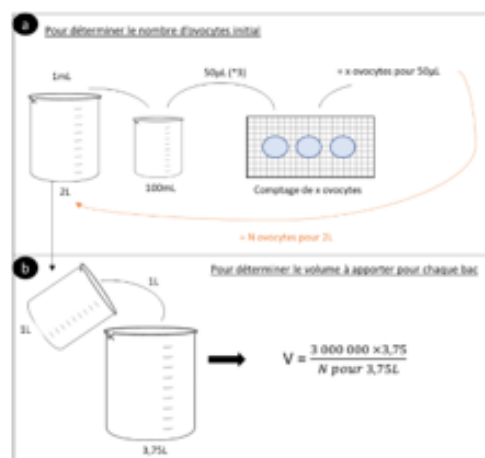


Figure 10 - Etapes pour obtenir le volume d'ovocytes à apporter par bac

4.3.4. Sous-tirage

Au cours d'un élevage, les larves ne se développent pas à la même vitesse. On observe, une tête, un corps et une queue de lot. La tête de lot est la proportion des larves qui se sont le mieux développées. A l'inverse, la queue de lot représente celles qui sont le moins performantes en termes de croissance. Le corps correspond à la partie intermédiaire qui est généralement la plus nombreuse. Ainsi, pour optimiser le développement, les densités sont ajustées tout au long de l'élevage. Le sous-tirage a lieu dès le premier stade larvaire atteint. Il consiste à vider chaque bac, le nettoyer et le re remplir d'eau de mer pour renouveler la qualité d'eau. Lors de cette étape, les larves sont récupérées sur des tamis dont la maille est adaptée au jour d'élevage et à la taille qu'elles devraient avoir. Ainsi, le tableau 1 reprend les mailles de tamis associées au jour d'élevage pour le deuxième élevage ALADIN.

Tableau 1 - Mailles associées au jour d'élevage lors du deuxième élevage ALADIN. La taille minimum se calcule par la diagonale de la maille, $d=L \times \sqrt{2}$.

Jour d'élevage	Maille du tamis (en μm)	Taille minimum à partir de laquelle la larve est retenue (en μm)
J1 à J3	45	65
J4 à J6	60	85
J7 à J10	85	120
J11 à J13	100	140

J14 à J15	220/125	285/175
J16 à Jfin	220/125	285/175

Les mailles utilisées varient selon la vitesse de croissance des larves. Ainsi, pour déterminer la maille à utiliser, il faut prendre deux tamis de mailles de tailles proches mais différentes. Placer le tamis avec la maille la plus grande au-dessus du premier. Sous-tirer le bac et observer quel tamis contient le plus de larves. Celui contenant le plus de larves sera celui à utiliser pour la suite des sous-tirages du jour.

Pour réaliser le sous-tirage des bacs, procéder de la manière suivante :

- Récupérer les tamis dans la zone de rangement et vérifier que la maille n'est pas endommagée ce qui risquerait d'entraîner des pertes de larves.
- Rincer au jet d'eau chaude sanitaire les parois et la maille des tamis. Puis rincer une deuxième fois avec le tuyau d'EDM chaude.
- Placer les tamis dans la rigole de sorte à ce qu'il soit en biais et donc que la maille ne soit pas directement en contact avec la surface pour éviter les contaminations (figure 11 a).
- Mettre le tuyau de vidange du bac dans le tamis mais éviter que celui-ci touche les parois ou la maille pour ne pas que les larves soient écrasées contre lorsque les vannes seront ouvertes.
- Vider les bacs, en ouvrant la vanne située à la base des bacs cylindro-coniques au 3/4, trois par trois pour ne pas que les larves soient trop longtemps assec sur les tamis.
- Dès que le bac est vide, prendre un pot de 400mL et le passer à l'eau de mer.
- Prendre un des post-it du bac vidé pour le coller sur le pot et ainsi ne pas confondre les lots.
- Poser le pot sur une surface plane et sèche pour éviter qu'il glisse et procéder au transfert des larves du tamis vers le pot
- Pour cela, passer d'abord le jet d'eau de mer sur les parois du tamis pour récupérer toutes les larves et pencher le tamis de sorte à les regrouper dans un coin.
- Placer ensuite le tamis juste au-dessus du pot, sans qu'il soit directement en contact avec celui-ci, et passer le jet, avec une pression très modérée, à proximité du coin où se trouve les larves. Pencher légèrement le tamis en même temps pour que l'eau et les larves puissent couler doucement dans le pot (figure 11 b)).
- Une fois que toutes les larves ont été transférées dans le pot. Passer de nouveau le jet sur les parois du tamis et réitérer l'étape précédente pour s'assurer qu'il ne reste aucune larve dans le tamis.
- Mettre le pot de côté le temps de remettre les bacs en eau mais ne pas le laisser trop longtemps car les larves sont contenues dans un tout petit volume d'eau.
- Entre chaque bac, rincer le tamis à l'eau chaude sanitaire puis à l'EDM chaude pour ne pas avoir de contaminations entre les lots

Avant de remettre les bacs, il faut procéder à leur nettoyage. Pour se faire :

- Passer le jet d'eau sanitaire chaude sur les parois intérieures des bacs.
- Puis laver les bacs à l'aide d'une éponge de javel diluée préalablement préparée.
- Laisser agir le temps de passer la javel dans les autres bacs.
- Ensuite, rincer les bacs à l'aide du jet d'eau sanitaire chaude et rincer également les deux côtés des couvercles.
- Remplir les bacs avec le tuyau d'EDM chaude et brancher un embout courbé sur le tuyau pour faciliter le remplissage. Ouvrir et fermer successivement 3 fois la vanne du bac pour

décrocher les larves pouvant être coincées dans le coude du tuyau. Arrêter le remplissage lorsque l'eau arrive juste en-dessous du numéro du bac.

Une fois les bacs remplis, les larves peuvent être recoulées. Pour cela, avant de verser le contenu du pot dans le bac, s'assurer que le post-it du pot correspond bien à celui du bac et le recoller sur le bac. Puis, verser le contenu du pot dans le bac en vérifiant qu'il ne reste pas de larves dans le pot (figure 11 c)).

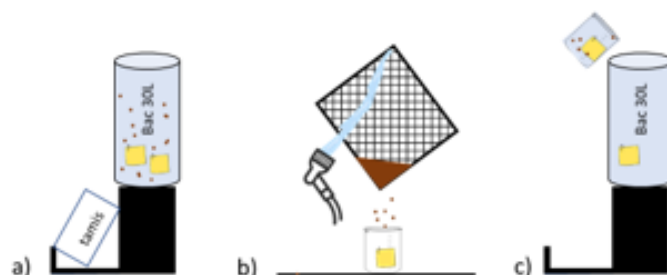


Figure 11 - Les étapes du changement d'eau a) sous-tirage du bac b) transfert des larves du tamis au pot c) recoulage des larves

Une fois les larves recoulées, procéder au nourrissage des bacs, dont la composition de la ration est précisée en partie 4.3.6. Il suffit de verser le contenu du pot de phytoplanctons dans chaque bac en prenant garde à ne pas directement mettre en contact le pot et le milieu d'élevage, étant donné que le même pot est utilisé pour le nourrissage de chaque bac.

Si un épisode brutal de mortalité est constaté, un traitement antibiotique est généralement appliqué. Aucun traitement ne peut être fait en préventif depuis l'entrée en vigueur en janvier 2022 du règlement 2019/6, sauf dans des cas exceptionnels. L'antibiotique prescrit par le vétérinaire référent est Gentamicine 4% du laboratoire Virbac. En fonction de la situation, le vétérinaire va indiquer le temps de traitement et la quantité d'antibiotique à administrer. Pour cela :

- Récupérer le flacon dans le frigo de la salle phytoplanctons ainsi que la fiche de suivi associée
- A l'aide de la seringue, injecter dans chaque bac la quantité prescrite. Ne pas mettre directement en contact la seringue et le milieu d'élevage.
- Puis, compléter la fiche de traçabilité

4.3.4.1. Cas particulier : Remise à densité

En ce qui concerne les remises à densité, au lieu de recouler directement les larves dans les bacs, celles-ci vont être comptées pour déterminer la quantité qui doit être conservée. Pour cela, utiliser la loupe binoculaire présente sur la paillasse de la salle.

- Remettre en suspension les larves à l'aide d'une cuillère propre. Faire des mouvements verticaux de gauche à droite pour avoir une répartition homogène des larves.
- Préparer une micropipette en coupant le bout du cône et en élargissant le diamètre au fur et à mesure que les larves se

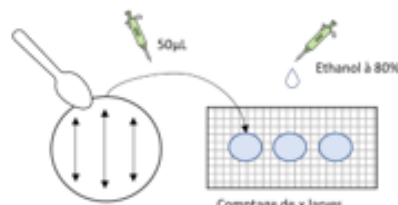


Figure 12 - Préparation d'une lame pour le comptage des larves lors de la remise à densité

développent pour ne pas biaiser les résultats.

- Tout en mélangeant, prélever 50µL du pot à la micropipette et déposer les au centre à gauche d'une lame quadrillée en faisant en sorte de laisser de la place pour 2 autres dépôts (Figure 12).
- Recommencer 2 fois en décalant les dépôts vers la droite puis placer la lamelle.
- Placer la lame sous la loupe binoculaire et observer la motilité des larves, révélatrice de l'état physiologique des larves. Puis si les larves sont trop mobiles, ajouter une goutte d'éthanol à 80% à chaque dépôt pour les fixer.
- Ensuite compter le nombre de larves vivantes (ni mortes, ni anormales) par dépôt.
- Faire la moyenne des 3 comptages et rapporter cette moyenne au proportion initiale pour obtenir le nombre total de larves, soit $N_{tot} = \frac{\mu \times V_{pot}}{50}$.
- Recouler le volume nécessaire pour la quantité de larves associée à la remise à densité, 150 000 ou 50 000. Par exemple, $V_{remis} = \frac{300\,000 \times V_{pot}}{N_{tot}}$.

4.3.4.2. Cas particulier : Envoi en fixation

Lors de l'envoi en fixation, 2 tamis de deux mailles différentes sont systématiquement utilisés. Les larves retenues sur la maille la plus grande iront en fixation tandis que les larves retenues sur la maille la plus petite seront remises en élevage larvaire. Les larves partant en fixation doivent alors être comptées pour ne pas dépasser le seuil fixé en début d'élevage. La larve prête à être envoyée en fixation à développer un pied qui lui permettra de se fixer à un support adapté et de commencer son cycle de vie benthique.

- Prendre le pot avec les larves retenues sur le tamis le plus grand et remettre en suspension les larves à l'aide d'une cuillère propre. Faire des mouvements verticaux de gauche à droite pour avoir une répartition homogène des larves.
- Tout en mélangeant, prélever 200µL du pot et déposer les dans le coin à gauche d'une lame quadrillée en faisant en sorte de laisser de la place pour 2 autres dépôts.
- Recommencer 2 fois en décalant les dépôts vers la droite. A ce stade, il n'est pas nécessaire de placer la lamelle.
- Placer la lame sous la loupe binoculaire et compter le nombre de larves vivantes (ni mortes, ni anormales) par goutte.
- Faire la moyenne des 3 comptages et rapporter cette moyenne au proportion initiale pour obtenir le nombre total de larves, soit $N_{tot} = \frac{\mu \times V_{pot}}{200}$.
- Envoyer le volume nécessaire pour la quantité de larves associée à l'envoi en fixation, N_{max} . Par exemple, $V_{remis} = \frac{N_{max} \times V_{pot}}{N_{tot}}$.
- Si la quantité max est atteinte pour chaque lot, alors l'élevage prend fin. En revanche, si certains lots n'ont pas leur quota de larves à envoyer en fixation, alors l'élevage continue. Dans ce cas, les bacs comportant les lots ayant atteints le maximum de fixation seront tout de même comptés pour connaître la survie larvaire, mais elles seront directement jetées par la suite.
- En ce qui concerne les larves retenues sur la plus petite maille, à la fin de l'élevage elles sont également comptées puis jetées pour estimer la survie larvaire.

4.3.5. Suivi de l'élevage en dehors des jours de sous-tirage

En dehors des jours de sous-tirage, le bon déroulement de l'élevage doit être vérifié.



- Vérifier visuellement que les larves se sont bien alimentées en observant la différence de coloration de l'eau d'élevage entre la veille, juste après le nourrissage, et aujourd'hui. Par rapport à un apport de phytoplancton récent, la couleur de l'eau d'élevage doit être plus claire témoignant d'une consommation du phytoplancton par les larves.
- Observer la motilité des larves dans les bacs d'élevage à l'aide d'une source lumineuse. Puis prélever aléatoirement des larves dans 3 bacs pour vérifier leurs motilités et s'il y a la présence de nombreuses larves mortes ou s'il y a des larves malformées (figure 13)
- Comme énoncé dans la partie 4.3.4, si un épisode de fortes mortalités est observé il est possible d'appliquer un traitement antibiotique avant que les bactéries mises en cause déciment l'entièreté du cheptel.

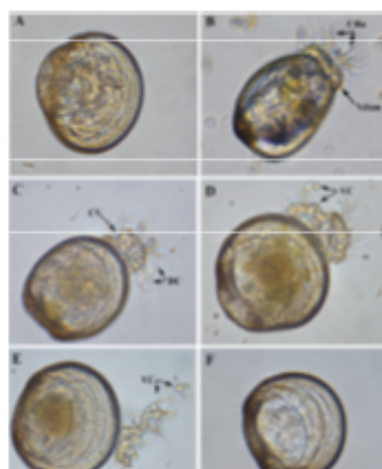


Figure 13 – Larves d'huître creuse avant et après infection à une souche de *Vibrio*. (A) et (B) larves en bonne santé (C), (D) et (E) larves malformées (F) larve morte (Ushijima, 2018)

4.3.6. Apport de phytoplancton

Le nourrissage commence à J1, à partir du moment où le système digestif de la larve s'est développé. Plus l'élevage avance dans le temps et plus la larve aura des besoins en phytoplanctons importants et variés. Classiquement, le rationnement se fait selon le tableau 2.

Tableau 2-Tableau de rationnement du phytoplancton apporté en élevage larvaire

	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Nombre total de cellules de phytoplancton par μL d'élevage larvaire
J1~J2	100%	0%	30
J3~J4	100%	0%	40
J5~J6	90%	10%	40
J7~J8	90%	10%	50
J9~J10	90%	10%	60
J11~J12	90%	10%	70
J13~J14	90%	10%	80
J15~J16	85%	15%	100
J17~J18	85%	15%	110
J18~Jfin	85%	15%	120



Cependant, les rations sont le plus souvent adaptées en fonction de la densité des larves lors des élevages et de la consommation partielle ou totale du phytoplancton (coloration de l'eau de mer).

4.3.7. Nettoyage des salles larvaires

A la fin de chaque journée d'élevage, il est indispensable de ranger et de nettoyer la salle larvaire. Pour cela, dans un ordre quelconque :

- Rincer les pots et les cuillères à l'eau chaude sanitaire.
- Vider le seau de javel et le rincer à l'eau chaude sanitaire ainsi que l'éponge
- Rincer les tuyaux et embouts utilisés en les branchant quelques secondes sur le réseau d'eau sanitaire.
- Couper la vanne d'eau de mer chaude de la première zone et ouvrir la vanne de vidange située en bas du filtre à poche. Dévisser le filtre à cartouche et retirer la cartouche pour la rincer au jet d'eau chaude sanitaire. Puis retirer le filtre à poche et déposer la poche sur le support prévu à cet effet. Passer le jet sur l'ensemble de la poche jusqu'à ce que l'eau qui coule de la poche devienne claire (figure 14).
- Débrancher l'UV situé dans la zone de rangement.
- Vider puis enrouler les tuyaux sur les portoirs associés.
- Rincer les tamis à l'eau chaude sanitaire et les ranger dans la zone de stockage.



Figure 14 - Quelques étapes du nettoyage

4.4. La micro-nurserie

Les pots contenant les larves prêtes à fixer sont amenées en micro-nurserie. Au préalable, préparer la salle de la manière suivante :

- Vérifier puis rincer les tamis de 150µm à l'eau sanitaire chaude.
- Annoter le tamis au nom du lot dans lequel sera coulé les larves.
- Placer le tamis dans une des auges de la salle sous une des sorties d'eau.
- Puis, remplir un pot de 400mL au ¼ de micro-brisures (quantité pour environ 1 tamis).
- Verser la micro-brisure de manière homogène pour recouvrir la maille sans la colmater.
- Vérifier que le niveau d'eau se situe à seulement quelques centimètres de la maille. Si le niveau d'eau est trop élevé, les larves se fixeront sur les parois du tamis et non sur la micro-brisure.
- Enfin, couler les larves en les répartissant dans le tamis.

4.5. Suivi des futurs naissains

En salle de micro-nurserie, lorsque les larves sont fixées et qu'elles ont atteint 2 à 3 mm, il faut enlever la microbrisure pour ne récupérer que le naissain. Un comptage du nombre de naissains est également effectué pour connaître le taux de fixation, le nombre de larves ayant fixé par rapport au nombre qui a été envoyé.

- En procédant bac par bac, passer les naissains sur un tamis de 350 µm à l'aide d'un jet d'eau. La micro-brisure n'ayant pas servi de support de fixation aux larves passera à travers la maille tandis que les naissains resteront au-dessus (figure 15).
- Retransférer les naissains tamisés dans leur tamis de 150µm pour ne pas confondre les lots.



Figure 15 - Naissains après avoir retiré la microbrisure

Pour déterminer le taux de fixation :

- Préparer sur la paillasse de la salle de micro-nurserie : une loupe binoculaire, une balance, 2 boîtes de pétri quadrillées, une cuillère et une pince.
- Peser une boîte de pétri sur la balance et la tarer.
- Prélever à l'aide d'une cuillère toutes les larves du tamis et les déposer dans la boîte de pétri tarée pour connaître le **poids humide total** des naissains.
- Échantillonner une petite quantité de naissains pour estimer la quantité totale. Pour cela, peser une nouvelle boîte de pétri et la tarer. Puis à l'aide d'une cuillère prélever une petite quantité de naissains et déposer-la dans la boîte de pétri. Pour faciliter le futur comptage, prélever entre 0,10 et 0,20 gramme (**poids humide par échantillon**).
- Ajouter dans cette boîte de pétri, une petite quantité d'eau de mer de sorte à recouvrir l'ensemble de la surface. Puis à l'aide d'une pince répartir les naissains dans la boîte de pétri pour faciliter le **comptage de l'échantillon** (figure 16).
- Faire 3 échantillons par lot pour réduire les risques d'erreur.
- Il se peut que des naissains se soient fixés aux parois du tamis. Dans ce cas, il faut ajouter au comptage précédent une **estimation** du nombre de naissains ayant fixé aux parois.

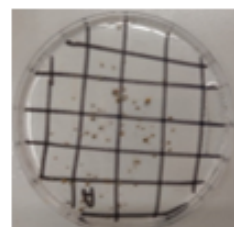


Figure 16 - Comptage du nombre de naissains échantillonnés dans une boîte de pétri quadrillée

Finalement, le taux de fixation peut être calculé :

$$Tx_{fixation} = \frac{\text{Nombre total de naissains}}{\text{Nombre de larves envoyées en fixation}}$$

$$\text{Avec Nombre total de naissains} = \frac{(\text{Nombre de naissains par échantillon} + \text{Nombre estimé}) \times \text{Poids humide total}}{\text{Poids humide par échantillon}}$$

Transférer ensuite la totalité des naissains dans des tamis de 150 µm pour qu'ils continuent leur développement en micro-nurseries. Par la suite, au fur et à mesure de leur croissance, les naissains seront transférés dans des tamis de 350 µm, 500 µm et enfin 1000 µm. Les tamis ne contenant plus de larves sont mis à tremper dans une cuve remplie de peroxyde d'hydrogène pour désinfecter les tamis et décoller les naissains potentiellement restés sur les parois.



Bibliographie

- Bayne, B. L. (2017). *Biology of oysters*. Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Ben Kheder, R. (2007). *Étude sur le développement larvaire de Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité* [Université de Bretagne Occidentale]. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00033/14450/>
- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A., Bourne, N., & FAO (Éds.). (2004). *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Marteil, L. (1978). La conchyliculture française partie 2 : Biologie de l'huître et de la moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 40(2), 149-348. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1796/1428>
- Rico Villa, B. (2009). *Les besoins écophysologiques des larves d'huître creuse Crassostrea gigas en conditions contrôlées : effet de la température, de la nourriture et modélisation de la croissance* [Université de Brest]. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00012/12308/9102.pdf>
- Ushijima, B., Richards, G. P., Watson, M. A., Schubiger, C. B., & Häse, C. C. (2018). Factors affecting infection of corals and larval oysters by *Vibrio coralliilyticus*. *PLOS ONE*, 13(6), 21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199475>
- Utting, S., & Spencer, B. (1991). The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. *Laboratory leaflet*, 68, 31. <https://www.cefas.co.uk/data-and-publications/publications/search/#/results:f=0;q=h=0;t=j=0;r=a=1;w=spencer;p=1>

Fin du document



Protocole de production de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*)
en conditions contrôlées
Réf. I.DX.5.13_Version 1 du 25/07/2024

Date d'application : 25/07/2024

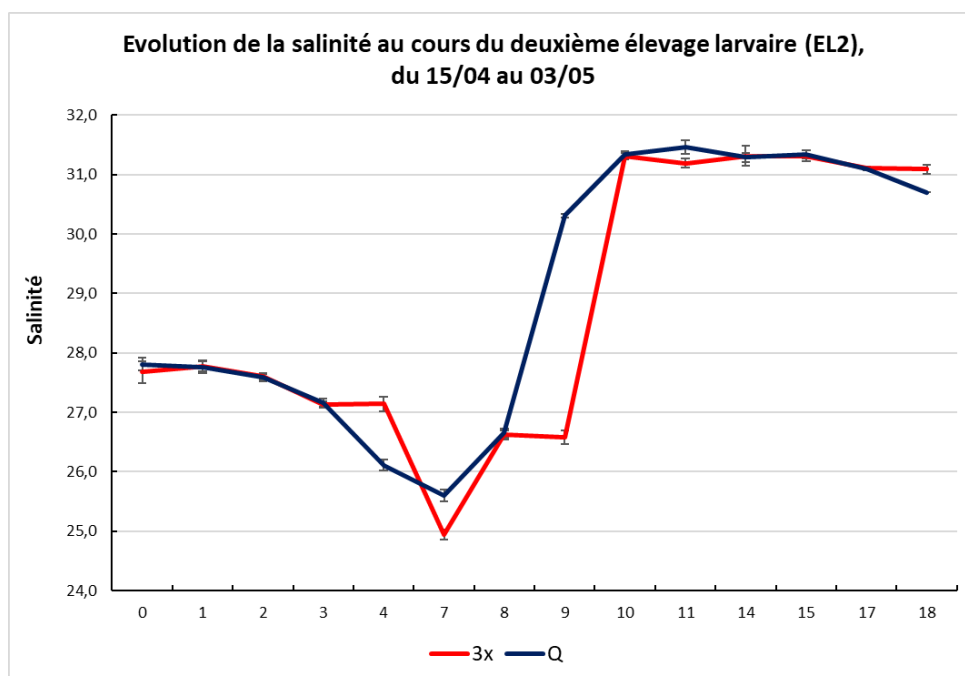
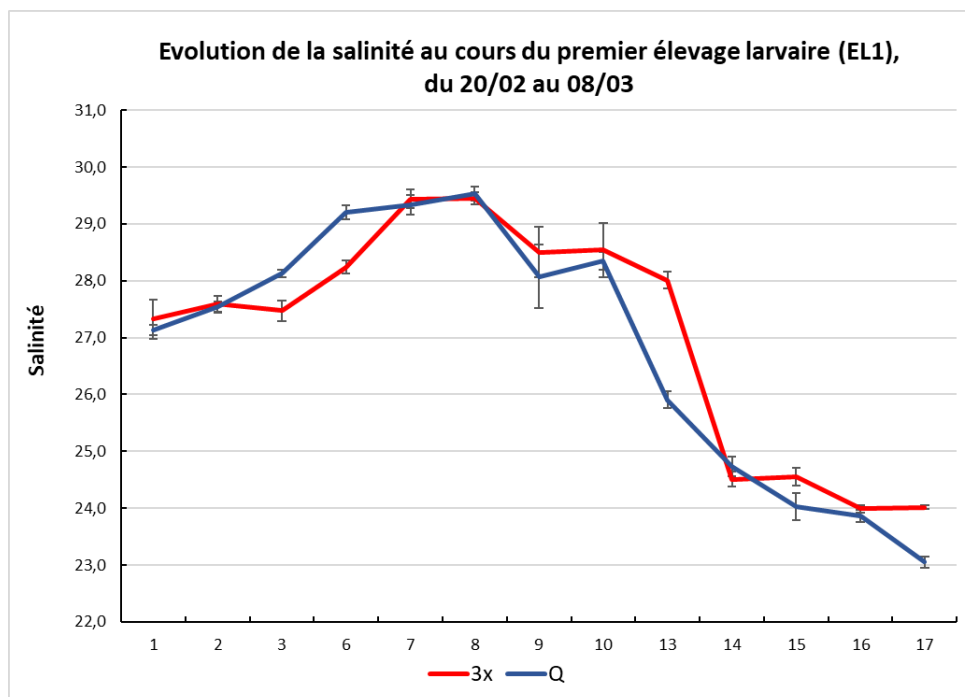
19/19



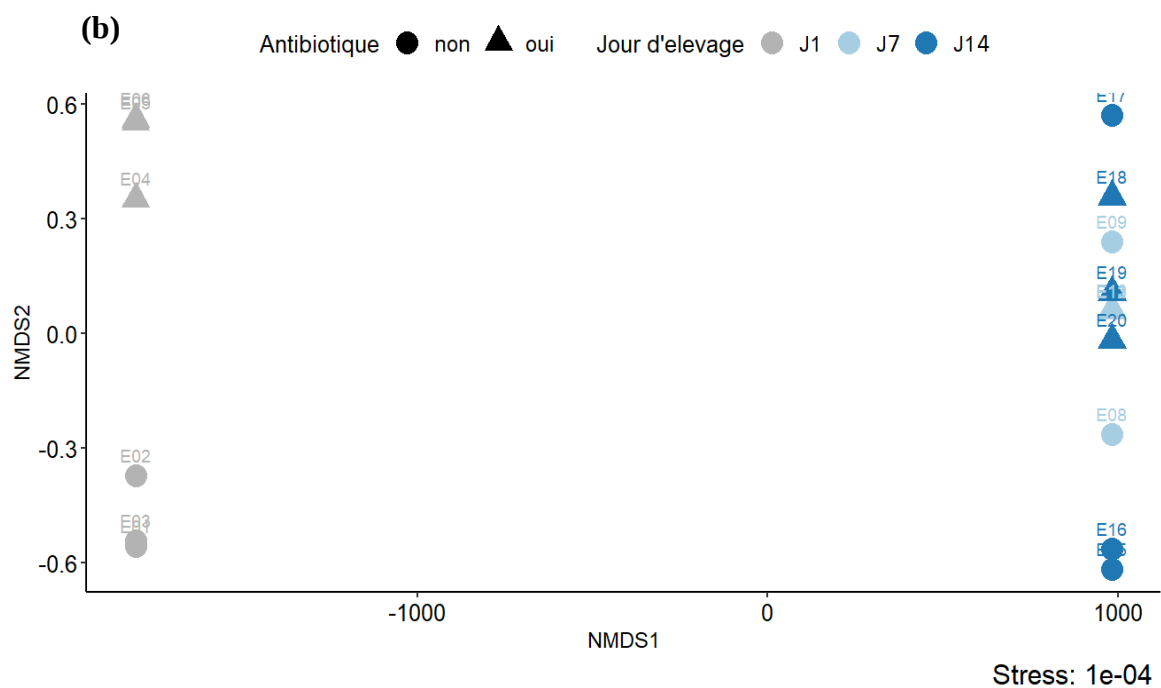
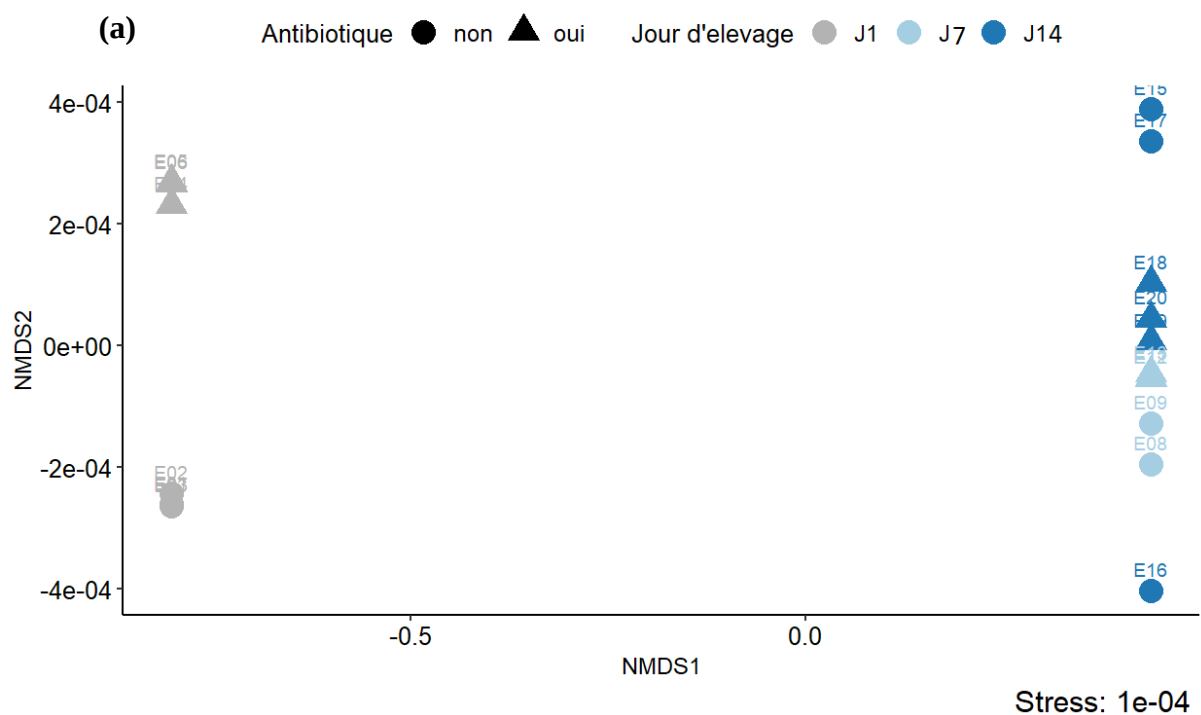
Annexe VII – Exemple de macro sur ImageJ utilisée pour les larves à J14 lors du premier élevage. Les lignes en rouges sont celles faisant l’objet de modifications en fonction de l’échelle de la photo et de la taille et forme des larves étudiées (Degremont).

```
run("8-bit");
run("Set Scale...", "distance=0.324 known=1 unit=um");
//run("Brightness/Contrast...");
run("Apply LUT");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
//setThreshold(0, 150);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area mean perimeter shape feret's median skewness kurtosis
area_fraction display redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=20000-80000 circularity=0.5-1.00 display exclude include
summarize add");
```

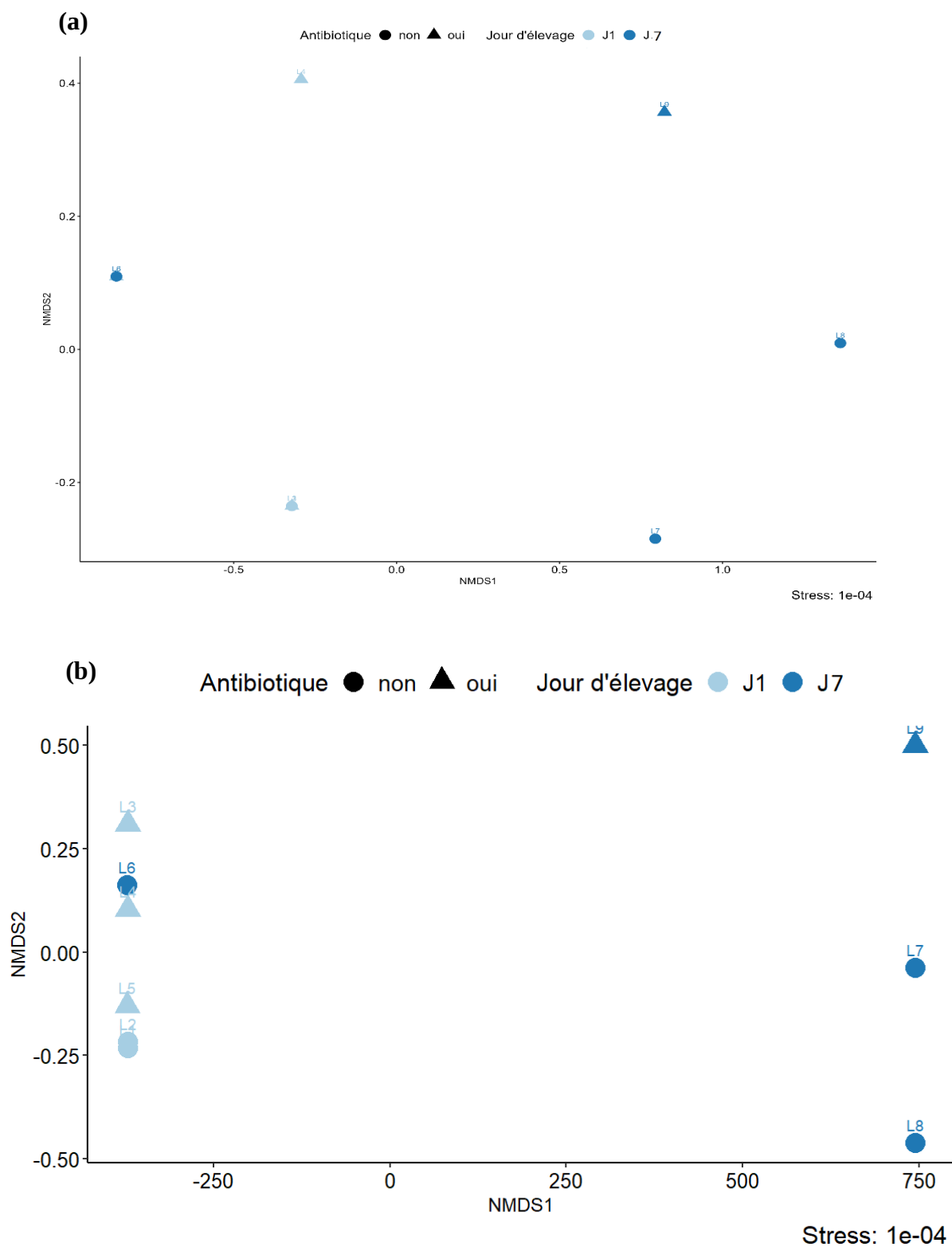
Annexe VIII – Evolution de la salinité dans les bacs d'élevage au cours du premier élevage (EL1) et du deuxième élevage (EL2). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type à la moyenne.



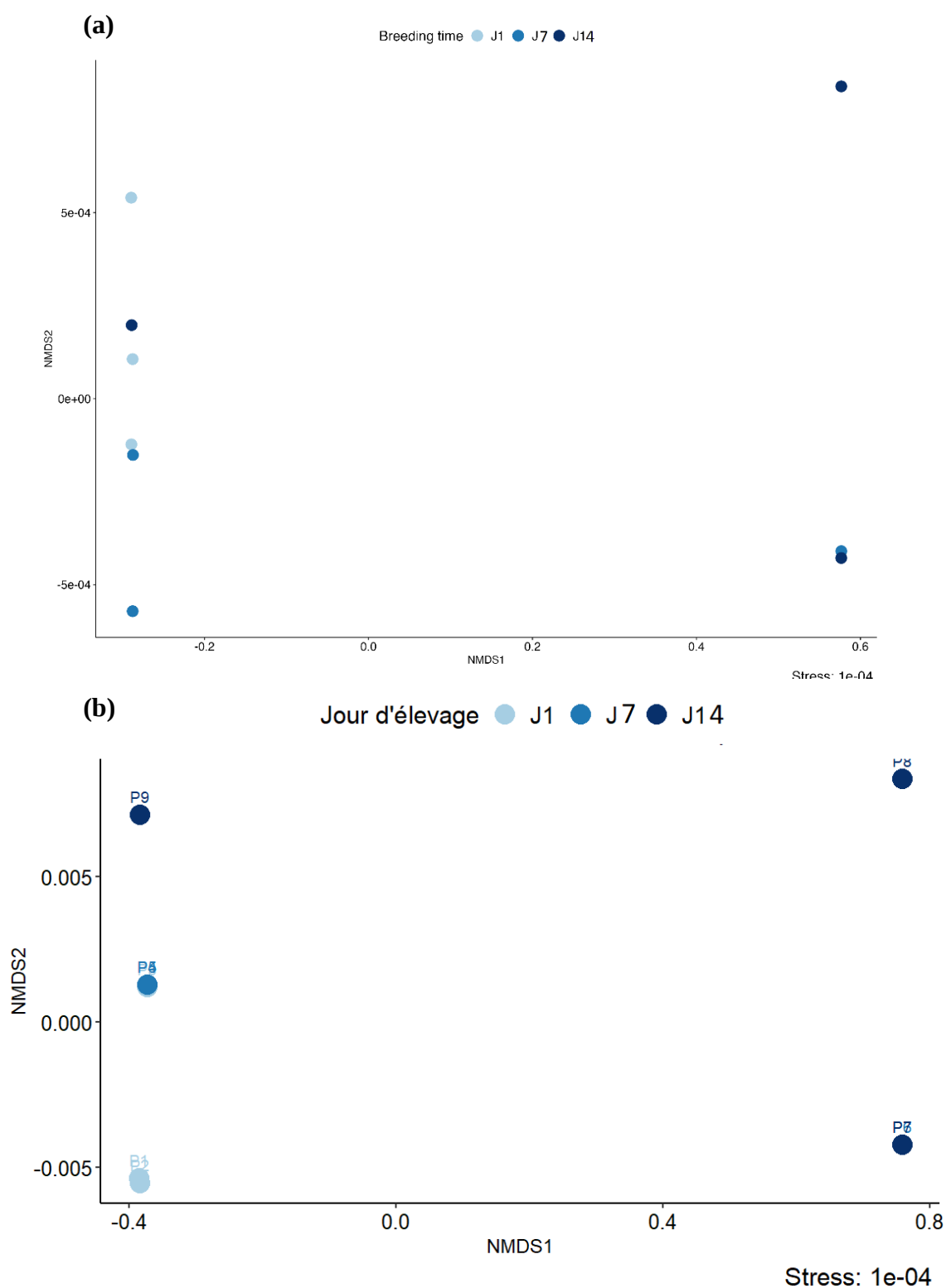
Annexe IX – Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) basé sur les distances de Bray-Curtis (a) et les distances de Jaccard (b) pour le compartiment « EDM »



Annexe X – Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) basé sur les distances de Bray-Curtis (a) et les distances de Jaccard (b) pour le compartiment « Larves »



Annexe XI – Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) basé sur les distances de Bray-Curtis (a) et les distances de Jaccard (b) pour le compartiment « Phytoplancton »



	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Ingénieur agronome Spécialisation / option : Sciences halieutiques et aquacoles / option Aquaculture Enseignant référent : Hervé LE BRIS	
Auteure : Sarah Le Gall		Organisme d'accueil : Station Ifremer de la Tremblade Adresse : Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade Maître de stage : Dimitri MORIN
Date de naissance : 13/04/2000		
Nb pages : 56 Annexes : 29		
Année de soutenance : 2024		
Titre français : Optimisation de l'élevage larvaire expérimental d'huîtres creuses, <i>Magallana</i> (ex <i>Crassostrea</i>) <i>gigas</i> , en vue de limiter le développement de communautés bactériennes pathogènes Titre anglais : Optimization of experimental larval rearing of the Pacific oyster, <i>Magallana</i> (ex <i>Crassostrea</i>) <i>gigas</i> , in order to reduce the development of pathogenic bacterial communities.		
Résumé : En écloséries expérimentales et commerciales d'huîtres creuses <i>Magallana gigas</i> , des mortalités récurrentes sont observées, pouvant être le fruit d'une multitude de facteurs. De ce fait, l'Ifremer a monté le projet « Amélioration des performances en élevages larvaires d'invertébrés marins » (ALADIN) dans lequel s'intègre la présente publication. Ce mémoire, mené à la Plateforme Mollusques Marins de La Tremblade, a pour objectif de limiter les communautés bactériennes pathogènes en optimisant la zootechnie plutôt que d'avoir recours systématiquement à des antibiotiques. Un élevage larvaire statique d'huîtres creuses a été mené, de la reproduction jusqu'à la fixation, afin d'évaluer l'impact des pratiques d'élevage telles que le changement d'eau des bacs, la densité larvaire et le traitement antibiotique sur les performances larvaires. Les communautés bactériennes présentes dans les compartiments eau de mer, larves et phytoplancton ont également été identifiées par metabarcoding 16S. Cette étude a montré que l'utilisation d'antibiotiques n'a aucun effet sur les performances larvaires tandis que le changement d'eau quotidien favorise la croissance et la fixation des larves et que la densité d'élevage favorise la survie, la croissance et la fixation. De plus, des bactéries pathogènes du genre <i>Vibrio</i> ont été identifiées, et ce malgré l'utilisation d'antibiotiques. Ainsi, en optimisant les paramètres zootechniques et utilisant un antibiotique seulement en curatif, les performances peuvent être améliorées.		
Abstract: In commercial and experimental Pacific oysters, <i>Magallana gigas</i> , hatcheries, recurring mortalities have been observed, which can be caused by various factors. Therefore, Ifremer has created the project ALADIN, “Amélioration des performances en élevages larvaires d'invertébrés marins”, of which this publication is a part. The main goal of this study, which took place at the PMMLT, “Plateforme Mollusques Marins de La Tremblade”, is to reduce pathogenic bacterial communities by optimizing zootechny rather than routinely using antibiotics. To assess the impact of rearing practices, such as water changes, larval densities and antibiotic use, on larval performances, a static larval rearing of <i>M.gigas</i> was conducted. Bacterial communities in seawater, larvae and phytoplankton compartments were identified with metabarcoding 16S. The results suggest that antibiotics don't have any effect on larval performances, whereas daily water changes improve larval growth and fixation and reduced larval densities improve larval survival, growth and fixation. Furthermore, pathogenic bacteria from <i>Vibrio</i> genus were identified, despite the use of antibiotics. To conclude, optimizing zootechny and using antibiotics only as a curative measure, could improve larval performances.		
Mots-clés : bactéries, <i>Magallana gigas</i> , zootechnie, éclosérie, metarcoding 16S Key Words : bacteria, <i>Magallana gigas</i> , husbandry, hatchery, metarcoding 16S		