

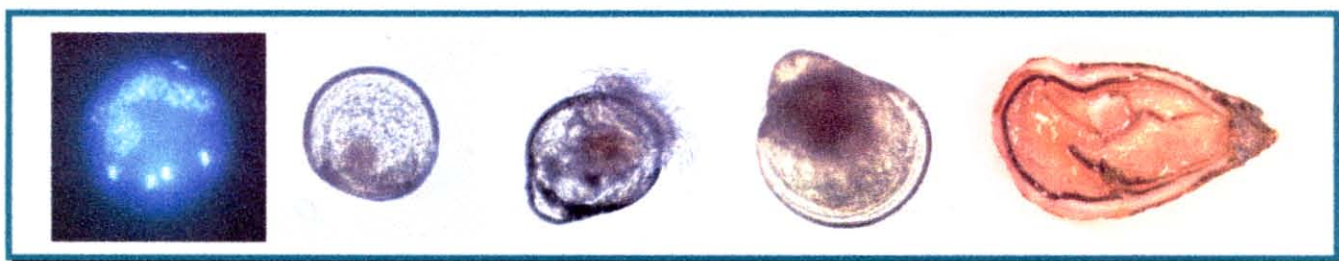
Université de POITIERS
MAÎTRISE " Biologie des Populations et des Ecosystèmes "
Année universitaire 1996-1997

ÉCOO. LEM. E
70860

Nicolas LEMERY

IFREMER
BIBLIOTHÈQUE
LA TREMBLADE

ETUDE DE LA CROISSANCE D'UNE POPULATION D'HUÎTRES CREUSES *CRASSOSTREA GIGAS*



Dates : 1^{er} Avril - 18 Mai 1997
Maître de stage : Docteur Pierre BOUDRY

Laboratoire IFREMER Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Génétique

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 00063



IFREMER

Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion pour moi d'exprimer ma gratitude envers tous ceux qui ont fait que ce stage se déroule dans les meilleures conditions possibles. Le ton quelque peu hétéroclite que peuvent prendre ces remerciements n'est que le reflet d'une franche camaraderie et de sincères amitiés.

Je tiens tout d'abord à remercier André GERARD de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ton intérêt prononcé pour les nouvelles technologies vidéo m'a permis d'agrémenter ce rapport de nombreux clichés de toutes sortes. Et même si ta carrure ne peut qu'inspirer le respect, je dois bien t'avouer tout de même que ton « ion » m'a été bien utile en d'autres circonstances...

Je suis également reconnaissant envers Pierre BOUDRY, mon responsable de stage. Ta faculté d'adaptation lors des manipulations et ton calme olympien en toutes circonstances m'ont appris à toujours aborder le côté positif des événements, quels qu'ils soient!

Merci à toi Marc, et toute ta petite famille, de m'avoir hébergé durant la majeure partie de ce stage.

Tristan, j'ai bien eu conscience de mettre à rude épreuve ta disponibilité qui fut pourtant sans faille! Sincères remerciements à toi qui m'a donné l'occasion de découvrir de nouvelles techniques de visualisations toujours avec gentillesse et dévouement.

Serge, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. Ton humour jamais altéré et ton sérieux dans le travail m'ont fait passer de bons moments en ta compagnie.

Emmanuel, dont le sens de l'organisation m'a fortement impressionné, tes conseils me furent précieux. Bon vent à toi sous d'autres cieux ...

Pascal, ta « mobylette » nécessite, au niveau du pot, une petite révision je pense... Oh! pas grand chose, 50 balles à tout casser...comme d'hab ! "Ce matin, ce sera vingt chopos de larves D". Tu as su instaurer une excellente ambiance durant ces deux mois passés au laboratoire.

Bertrand, Mac Giver a encore quelques leçons à prendre... Tu es le premier que je vois réparer un ordinateur à la scie à métaux, et avec succès!!! Quoi qu'il en soit, la disponibilité et les explications toujours très claires m'ont été d'une grande aide. Encore merci pour ta bonne humeur quotidienne.

Patrick, tu accomplis ton apprentissage de véritable fecti. Tu arrives bientôt au terme de la formation. Que la force soit avec toi...

Sophie, j'ai pu admirer tes capacités de rangement au détour d'une visite impromptue. Je vois que l'on joue dans la même catégorie... Bon courage pour la fin de ta thèse.

Je tiens à remercier les « To be Two », composé de « vanille-fraise-chocolat » qui n'en doutons pas sera « caramel » un jour (demain, c'est sûr !!..) et du seul à connaître la véritable signification de G.A.P. Ils sont assurés d'un grand avenir dans le show-biz inter-iffremerien !!!

Manuella, tu distilles ça et là des esquisses avec lesquelles tu perfectionnes ton français déjà fort bon au demeurant. (Vive le Pictionary!).

Catherine, je distille ça et là des bribes de français, avec lesquelles nous nous sommes bien marrés, pour perfectionner mon anglais fort moyen au demeurant. (J'm totaly bilingue!).

« Un ours et une gorette,
le chat tripote la laine et se lèche
cependant, je ne suis pas sûr que ce soit vrai.
Volutés bleues, spirale verte et scarabée d'or cherchaient toujours en vain.
Ah! gorette, gorette tu te caches et fuis comme
une fille passant par là et éblouissant la journée.
Guitare salée et petits fours étoilés, je tremblais de peur devant tous ces lutins... »

Voilà Isabelle, ça résume très, mais alors très clairement, ces deux semaines passées en ta compagnie; un mélange de chantilly et d'œufs sur le plat. Tu incarnes à toi seule la loi du tout ou rien, et bien souvent tu m'as fait penser à un pop corn que chacun observe et dont on sait qu'il va exploser, mais quand ??? La réponse est le plus souvent : au quart de tour. Merci enfin pour ton aide précieuse dans les tous derniers instants ! Je n'ai pas vu le temps passer...

Maaüüss, mmais, Ahhh noooooon
päääss l'impri mmannte!
Allez BUG soort deee làà...

Angélique, la traîtresse des 300 m³, je t'ai bien rendu la monnaie de ta pièce... Tes malheurs avec tes programmes informatiques n'ont d'égal que ta bonne humeur au quotidien, du matin au soir, mais ne t'en fait pas, TU VA Y ARRIVER, c'est sûr. Bon, maintenant, le mieux c'est vrai, ce serait que tu y arrives avant la fin de ton stage... M'enfin bon, quand on connaît ton magnétisme naturel avec n'importe quel matériel électronique, je n'peux que t'souhaiter bon courage!

Ehh Behh!
Une étagère qui s'écroule toute seule ou presque...
Décidément il se passe des choses bizarres ici.

Cécile, j'ai apprécié ton caractère franc et direct. Le moins que l'on puisse dire c'est qu'avec toi, les choses sont claires : ça passe ou ça casse. Merci pour tes explications très didactiques au travail et ces moments de détente autour d'un bon café. Bonne chance pour la suite de ton cursus.

*Oh! Mais qu'est-ce que c'est là?
On dirait... mais oui... c'est bien une crapule
à patte folle qui rampe trempée
et qui s'étend lamentablement dans le couloir!*

Arnaud, on s'est bien fendu la poire, enfin surtout toi, avec toutes les tuiles qui t'ont arrivées !!! On te plaint pauvre petit. Il me semble bien que tu t'es planté en moto dès le premier jour de mon arrivée. J'étais loin de me douter que ce n'était que le début d'une longue série. Je t remercie, toi l'amateur du shampoing chocolat-banane, pour ton franc parlé, ta grande gueule et tes conseils bien utiles. Bonne chance pour ta thèse...

*Bah! Ça alors, un levrier afghan, ici à IFREMER !
Il doit bien appartenir à quelqu'un.
Y a qui à regarder son tatouage:
« Johnny forever... !!! »*

Xavier, nous ne rappellerons pas ici la particularité anatomique de cet animal... On s'est bien marré pendant ces deux semaines de stage en commun avec ton humour volontairement ressemblant, mais à qui donc ??? Quoi qu'il en soit, je te souhaite d'effectuer un très bon stage au sein de cette équipe de joyeux lurons et te remercie pour ta contribution à ce rapport.

*Un renard qui se retranche dans sa tanière.
Des proies innocentes qui ne voient pas le danger venir.
Il observe, scrute et évalue.
Il juge ses possibilités d'attaque, de riposte, de fuite
Lui seul sait...
L'attaque est vive, brève, intense... très intense!
Puis plus rien, plus rien qu'une proie seule, trempée des pieds à la tête !!!*

J'ai nommé notre maître à tous en la matière : Christophe. J'ai appris très vite, à mes dépens, la règle du jeu. Mais deux mois d'entraînement ne m'ont pas suffi pour esquiver à temps les 4 ou 5 litres d'eau journalièrement distribués. Nous n'étions pas trop de deux pour te faire goûter, à ton tour, les joies de la thalasso... J'ajoute que tes explications limpides et ton sérieux, quand il le faut, lors des manipulations ont fait que ces deux mois se sont déroulés dans un climat vraiment agréable et sympathique.

Enfin, je remercie Franck, Anne, Jean-Pierre, Nathalie, Philippe, Bruno, Martine, Florence, Yvette et Emile pour leur disponibilité et leur gentillesse.

S O M M A I R E

I. INTRODUCTION.....	2
II. MATERIELS ET METHODES.....	4
A. MATERIELS.....	4
1. <i>Le matériel biologique utilisé est l'huître creuse Crassostrea gigas.</i>	4
a) Classification systématique.....	4
b) Répartition géographique mondiale de la Crassostrea gigas.....	4
c) Caractères biologiques.....	5
2. <i>Matériel de laboratoire.</i>	5
B. METHODES.....	7
1. <i>Les croisements.</i>	7
2. <i>Prélèvements pour études génétiques.</i>	8
3. <i>Evaluation du taux de fécondation.</i>	9
4. <i>Elevage larvaire et évaluation du taux de survie.</i>	9
5. <i>Analyses physiologiques.</i>	10
III. RESULTATS.....	11
A. LES CROISEMENTS.....	11
1. <i>le sexage.</i>	11
2. <i>Dénombrement des gamètes.</i>	11
B. EVALUATION DU TAUX DE FECONDATION.....	12
C. ELEVAGE LARVAIRE.....	13
IV. INTERPRETATION ET DISCUSSION.....	17
V. EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE SUR LA QUALITE DES GAMETES D'HERMAPHRODITES.....	19
A. MATERIEL ET METHODES.....	19
1. <i>Croisements d'hermaphrodites.</i>	19
2. <i>Etude au Microscope Electronique à Transmission.</i>	20
B. RESULTATS.....	21
1. <i>Croisements des hermaphrodites.</i>	21
2. <i>Visualisation au M.E.T.</i>	22
C. DISCUSSION ET INTERPRETATION.....	22
VI. CONCLUSION.....	24
VII. BIBLIOGRAPHIE.....	25

I. INTRODUCTION.

Dans le but d'optimiser et développer des productions aquacoles, l'IFREMER (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la MER) travaille notamment sur l'amélioration génétique des espèces aquacoles. Ce programme, cofinancé par la région Poitou-Charentes dans le cadre du plan pour sa partie investissement et par l'Union Européenne dans le cadre du projet "GENEPHYS 1996-2000" pour sa partie fonctionnement, associe des partenaires anglais, irlandais, grecs et français. Ce vaste projet, dont la coordination générale est assurée par La Tremblade, a débuté en janvier 1996. Il vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance (respiration, assimilation, digestion, excrétion, rendement métabolique, etc...) et leurs bases génétiques (déterminisme, viabilité intra et inter-population, hétérozygotie, accidents chromosomiques, etc...). L'objectif final étant d'évaluer les possibilités de sélectionner des huîtres creuses *Crassostrea gigas* possédant de meilleurs rendements métaboliques pour des caractères physiologiques comme la nutrition ou la respiration.

Ce projet repose sur l'étude de deux générations successives d'Huître creuse *Crassostrea gigas* afin de créer une population à base génétique large, condition préalable à toute évaluation du potentiel de sélection dans l'espèce, des géniteurs (populations G_0) de quatre populations naturelles (estuaire de la Charente, estuaire de la Seudre, baie de Bonne Anse et bassin d'Arcachon) ont été collectés. Ces sites constituent la source principale de naissain de captage pour l'Europe. La première génération G_1 a été obtenue le 15 avril 1996 à la suite d'un croisement de type factoriel entre 20 mâles et 20 femelles de ces 4 populations de géniteurs. Des croisements intra-population ont également été réalisés avec les mêmes géniteurs, soit un total de 500 croisements obtenus simultanément. Les élevages larvaires ont été effectués de manière à conserver le maximum de variabilité génétique en évitant toute compétition entre les individus. Afin d'obtenir et suivre la croissance individuelle d'individus ayant en commun leur date de fixation (pseudo-cohorte), des collecteurs en PVC ont été immergés régulièrement dans les bacs de fixation pendant 13 jours. Des fixations classiques sur microbrisures ont également été réalisées afin de disposer d'un matériel biologique suffisant pour les différentes analyses génétiques et physiologiques.

Les élevages et les différentes actions programmés dans GENEPHYS se sont déroulés sans problème jusqu'au 70^{ème} jour. Des mortalités massives ont ensuite été enregistrées, les tests de diagnostic réalisés par les pathologistes du laboratoire ont montré que l'élevage était infecté par l'Herpès-virus et que les géniteurs de la Seudre étaient certainement à l'origine du

développement de la maladie. Ces mortalités qui ont principalement touché les pseudo-cohortes ainsi que le croisement Seudre-Seudre, ne remettent toutefois pas en cause la poursuite du programme. Cette observation permet donc de poursuivre le programme en se basant sur la variabilité intra-population des populations Arcachon, Charente et Bonne Anse, qui n'ont pas ou peu été touchées par les mortalités. Ces 3 populations de G1 permettent donc 3 manipulations différentes dont le lien sera les testeurs issus de plein frères. Ce stage s'inscrit donc dans cette optique en tentant d'expliquer les variations de croissance rencontrées à l'état larvaire principalement (en raison de la durée du stage), selon différents critères qui pourront être physiologiques, héritabilité de la croissance ...

II. MATERIELS ET METHODES

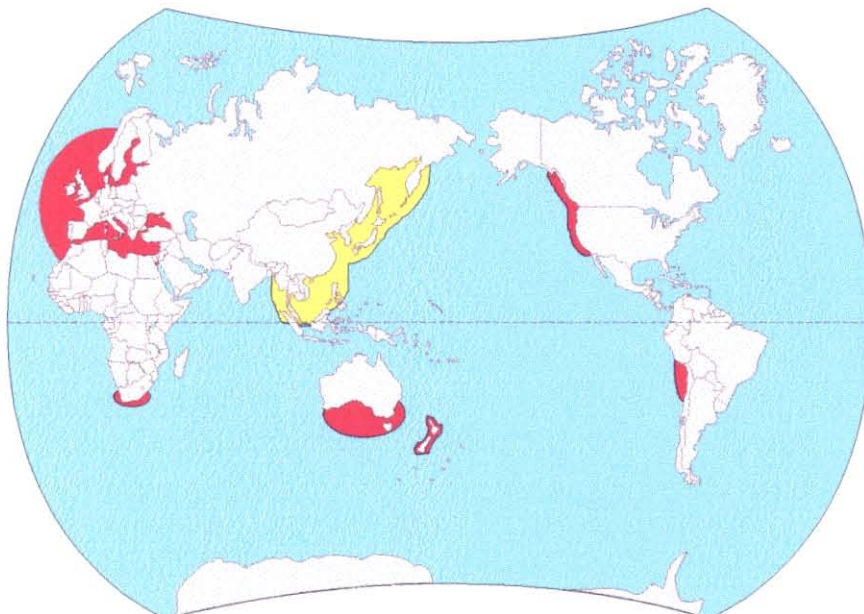
A. Matériels.

1. Le matériel biologique utilisé est l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

a) *Classification systématique.*

- Embranchement: Mollusques
- Classe: Bivalve Lamellibranche
- Ordre: Filibranche
- Sous-ordre: Anisomyaria
- Super-famille: Oestreioidea
- Famille: Crassostreidea
- Genre: *Crassostrea*
- Espèce: *Crassostrea gigas*

b) *Répartition géographique mondiale de la *Crassostrea gigas*.*



Cette carte nous indique en jaune l'origine des huîtres *Crassostrea gigas* qui se situe donc au Japon. En rouge sont représentées les zones où l'huître a été importée. C'est ainsi que l'on

en retrouve en France, une des principales nations exportatrices d'huîtres avec une production annuelle de 120 000 tonnes.

c) Caractères biologiques.

Famille	Crassostreidea
Espèce	<i>Crassostrea gigas</i>
Morphologie (Taille)	Maxi 30 cm
Fécondation	Externe
Reproduction	Hermaphrodisme alternatif Ponte maximale en Juillet
Fécondité moyenne	Plusieurs dizaines de millions d'ovocytes
Habitat	Infralittoral jusqu'à 15 m de profondeur, fixées sur fonds meubles ou durs
Phase larvaire	Ovipare, de 15 à 18 jours
Mode de vie	Sédentaire, fixée
Alimentation	Filtreur

2. Matériel de laboratoire.

L'ensemble du matériel mis à disposition pour le laboratoire GAP (Génétique, Aquaculture et Pathologie) est réparti sur deux bâtiments. Le premier est principalement constitué de 6 salles de laboratoire (avec centrifugeuse, salle d'histologie, d'électrophorèse, de manipulations de radioéléments ...). Le deuxième bâtiment de 1200 m², dans lequel se déroule la très grande majorité de mon stage, est principalement constitué de 7 salles humides (quarantaine, micronurserie, maturation, conservatoire de souches, élevage larvaire, physiologie, manipulation des agents pathogènes des mollusques marins sans rejet en eau de mer pour des raisons évidentes de sécurité); 2 salles de production de phytoplancton et une laverie, un laboratoire de biométrie et une salle informatique. Le laboratoire a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de 4 bassins de 300 m³ de réserve d'eau de mer, 23 pompes de 10 à 300 m³/h, plusieurs kilomètres de tuyauterie, une station de stérilisation au chlore des eaux de rejet, 4 bassins de 20 m³ pour la production de phytoplancton.

Au sein de cette infrastructure, le matériel utilisé est le suivant:

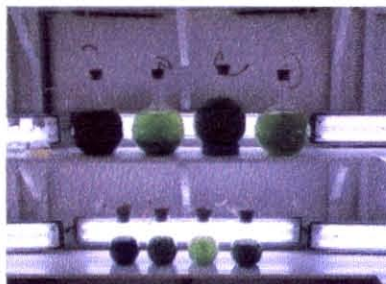
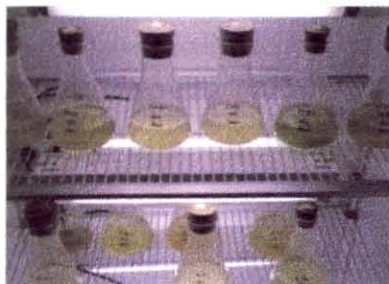
- 9 microscopes dont 2 équipés en épifluorescence.
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers un ordinateur pour les mesures de croissance larvaire.



- 1 dispositif vidéo couleur composé d'une caméra 3-CCD, d'un moniteur haute résolution, d'une imprimante vidéo couleur UP-5000, d'un enregistreur photo MAVICA et d'un magnétoscope médical SONY SVD-9500 MDP (ce matériel facilite grandement l'étude du développement embryonnaire en microscopie à épifluorescence dans le cadre des programmes de cytogénétique. Il permet également l'archivage d'images de toute sorte : développements embryonnaires, élevages larvaires ...).



- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton.



- 1 congélateur -80°C.
- 1 étuve CO₂ FORMA SCIENTIFIC.
- 1 microscope électronique à transmission.

B. METHODES.

1. Les croisements.

Certains individus G₁, provenant de Port-des-Barques, marqués (M) lorsque leur croissance fait l'objet d'un suivi, ou non marqués (NM) lorsqu'ils n'ont pas de suivi de croissance, vont être croisés avec un testeur non sélectionné (T) dont on sait qu'il va assurer aussi une bonne variabilité. Ce testeur étant issu de plein frère, ce sont donc les informations des individus G₁ qui vont être étudiées à travers le suivi des individus G₂.

Il a donc été décidé d'effectuer:

-20 croisements M x T
 - 1 croisements NM x T
 - 1 croisements T x T

Les croisements nécessitent des comptages de gamètes précis aussi bien pour les gamètes mâles, ceci afin d'éviter la polyspermie que pour les gamètes femelles afin d'évaluer le taux de fécondation. Il est donc indispensable de connaître les effectifs gamétiques de chacun des parents. Pour ce faire, un petit programme effectué sur Excel facilite la tâche:

Pour les femelles

Volume total (ml)	500	Lot	Individu	C (n/ml)	Nombre total	Nombre utilisé	Volume utilisé (ml)
		n°	n°	après comptage	Vt*C	maxi 1500000	(Vt*Nu)/Nt
	
	
			Moyenne				

Pour les mâles

Volume total (ml)	500				
Lot	Individu	C (n/ml)	Nombre total	Nombre utilisé	Volume utilisé (ml)
n°	n°	après comptage	Vt*C	100 fois le Nb.ut. de femelles	(Vt*Nu)/Nt
...
...
	Moyenne				

Le planning du croisement, en annexe, doit être respecté car chaque manipulation s'inscrit dans un processus très minuté en raison de l'altération des ovocytes une heure après le stripping. De plus, le nombre élevé de manipulations en un laps de temps relativement court impose une très bonne organisation.

Après sexage des huîtres, nous avons obtenus des gamètes, recueillis par scarification de la gonade (stripping), dont les proportions seront développées dans le chapitre "résultats des croisements". Puis les gamètes mâles sont filtrés sur des tamis de 20 µm et les gamètes femelles sur des tamis de 60 µm, ceci afin d'éliminer les impuretés. Un échantillon de spermatozoïdes est coloré à l'éosine diluée au 10ème, puis le comptage est effectué sur cellule de Malassez par analyse d'images. La même technique est utilisée pour les gamètes femelles. Des prélèvements ont été effectués successivement pour estimer la proportion d'ovocytes non viables, et pour le calcul du taux de fécondation.

2. Prélèvements pour études génétiques.

Afin d'étudier la variabilité génétique des géniteurs, des prélèvements sont effectués sur les individus de cette génération G₁ après le stripping. Pour ce faire, on prélève les branchies que l'on place dans des eppendorfs, numérotés selon l'animal, contenant préalablement de l'alcool qui conserve au mieux les échantillons tissulaires. Sur ces branchies, seront effectuées des extractions d'ADN. Le reste du corps de l'huître est placé dans des sachets, eux aussi numérotés, et d'autres études seront effectuées sur ces prélèvements. Ici, on étudiera les allozymes.

Des analyses seront effectuées ultérieurement et permettront, en corrélation avec des études physiologiques et de croissance, d'évaluer l'héritabilité de ces facteurs.

3. Evaluation du taux de fécondation.

Pour évaluer ce taux de fécondation, il faut attendre 24 heures après le moment où l'on a provoqué la rencontre des deux gamètes. Cette durée permet d'être certain de la fécondation ou non des ovocytes par les spermatozoïdes en raison de l'aspect de la morula. Cependant, en pratique, on peut faire cette étude dès 4 heures après fécondation. En effet, on se situe alors normalement entre le stade 4 cellules et 8 cellules, et on distingue ainsi beaucoup plus nettement les divisions cellulaires, les migrations chromosomiques, et l'on peut repérer déjà s'il y a eu fécondation.

Pour parvenir à détecter si les ovocytes sont fécondés ou pas, on fait une observation au microscope à épifluorescence. Dans ce but, on commence par préparer un tampon GA fait de: N-méthylglucamine (250mM), K-gluconate (250mM), Hepes (50mM), EGTA (10mM). Ce tampon est ajusté à pH 7.4 avec de l'acide acétique glacial.

Ensuite :

- On fixe les cellules pendant 60 mn dans le tampon GA+ formol 6% : 1 volume d'ovocytes + 1 volume de tampon fixateur (GA + formol 6%).
- On enlève le tampon fixateur par aspiration grâce à une trompe vide.
- On lave 60 mn dans le tampon GA (2 lavages de 30 mn).
- On colore 60 mn dans GA + Hoeschst (1µl de solution stock pour 1 ml d'oeufs).
- On lave 60 mn dans le tampon GA (2 lavages de 30 mn).
- Enfin, on observe au microscope à épifluorescence.

4. Elevage larvaire et évaluation du taux de survie.

Après mélange de gamètes, les embryons issus des croisements sont repartis dans des jarres de 30 litres remplies d'eau de mer filtrée à 2 µm dont la température et la salinité ont respectivement varié au cours de l'élevage larvaire de 20.7 à 22.9 °C et de 34.1 à 34.5 ‰.

Toutes les 48 heures, un comptage est effectué par prélèvements sur des cellules quadrillées : pour arriver à une bonne évaluation du nombre d'individus, on prélève trois échantillons de 100 µl ; puis on observe au microscope si les larves se développent normalement ou pas. Ensuite, après avoir versé une goutte de formol sur chaque échantillon afin de tuer les larves,

on les compte, et par un simple rapport de dilution en fonction du volume total, on en déduit la quantité de larves effectivement présentes et viables dans les cuves d'élevage. C'est donc la variation du nombre d'individus comptés toutes les 48 heures qui nous indique le taux de survie d'une manipulation à l'autre.

Aucun tamisage sélectif n'a été effectué en cour d'élevage larvaire, contrairement aux techniques couramment utilisées en éclosion. Il est reconnu que la densité affecte la croissance tant dans le milieu naturel que dans l'élevage. Celle-ci à donc été ajustée et contrôlée durant tout l'élevage larvaire afin de permettre une expression optimale du potentiel de croissance, et de maintenir dans tous les lots des conditions identiques de compétition entre larves.

On profite de cette manipulation pour faire un suivi de la taille de ces larves. Cette fois-ci, on utilise le projecteur de profil V-12A, et sur un échantillon de 30 individus, on évalue la taille moyenne des larves de chaque lot au moment du prélèvement.

5. Analyses physiologiques.

Ce travail vise à étudier la stabilité dans le temps de différentes caractéristiques physiologiques (respiration, assimilation, etc.). Des analyses ont été effectuées sur les géniteurs G_0 quatre fois durant l'année 1996. Les mêmes tests sont prévus sur les individus G_2 adultes. Les différents caractères physiologiques pourront être étudiés en analyses destructives et non-destructives, les animaux sacrifiés étant ensuite utilisés pour étudier le polymorphisme génétique.

III. RESULTATS.

A. Les croisements.

1. le sexage

Lors du sexage, un problème non prévu a été rencontré : l'absence de femelles! En effet, sur les 26 individus Marqués sexés, nous avons obtenu 14 mâles et 12 hermaphrodites. Sur 50 individus Non-Marqués, nous avons obtenu 25 mâles et 25 hermaphrodites.

Pour optimiser le nombre de croisements avec des individus marqués, et pour éviter tout risque d'autofécondation, nous avons décidé de filtrer les gamètes des hermaphrodites marqués et de n'en retenir que les spermatozoïdes faisant alors office de mâle.

En ce qui concerne les 6 Testeurs sexés, nous avons obtenu 2 mâles et 4 hermaphrodites. Nous avons là encore filtrer un seul Testeur hermaphrodite pour n'en retenir que les ovocytes. De ce fait, la femelle testeur est elle-même un hermaphrodite à l'origine.

2. Dénombrement des gamètes.

L'analyseur d'images nous a signalé une concentration de 55.077 ovocytes/ml pour le testeur unique, ce qui, pour 500 ml correspond à 27.538.500 ovocytes disponibles. Nous avons utilisé finalement 1.100.000 ovocytes pour chaque croisement avec les mâles, ou les hermaphrodites, provenant de Port-des-Barques.

Nous avons également ajusté le nombre de spermatozoïdes à 100.000.000 pour chaque croisement afin d'éviter la polyspermie tout en assurant le maximum de fécondation.

code du père	type de gamètes	croisement	code de l'individu de la G 2
06 g8	m âle	m x T	cgge9705 01
04 b9	m âle	m x T	cgge9705 02
06 h7	m âle	m x T	cgge9705 03
06 e4	m âle	m x T	cgge9705 04
17 f7	m âle	m x T	cgge9705 05
17 f1	m âle	m x T	cgge9705 06
05 f4	m âle	m x T	cgge9705 07
04 d3	m âle	m x T	cgge9705 08
04 g4	m âle	m x T	cgge9705 09
05 e7	m âle	m x T	cgge9705 10
06 f9	m âle	m x T	cgge9705 11
06 e2	m âle	m x T	cgge9705 12
04 g3	m âle	m x T	cgge9705 13
17 e8	m âle	m x T	cgge9705 14
04 a1	hermaphrodite	h x T	cgge9706 05
05 e1	hermaphrodite	h x T	cgge9706 06
05 g5	hermaphrodite	h x T	cgge9706 07
06 a3	hermaphrodite	h x T	cgge9706 08
05 a9	hermaphrodite	h x T	cgge9706 09
17 g5	hermaphrodite	h x T	cgge9706 10
nm 1	m âle	m x T	cgge9706 01
nm 2	m âle	m x T	cgge9706 02
nm 3	m âle	m x T	cgge9706 03
nm 4	m âle	m x T	cgge9706 04

B. Evaluation du taux de fécondation.

Pour connaître le taux de fécondation de chaque croisement, il faut distinguer au microscope à épifluorescence les oeufs normalement développés de ceux qui ne le sont pas. Ces clichés ont été pris 4 heures après fécondation :



Ovocyte normal fécondé



Ovocyte fécondé

Ovocyte non fécondé

Ensuite, le taux de fécondation est évalué en effectuant le comptage de 100 ovocytes. On détermine ainsi la proportion de ceux qui sont fécondés et normaux, de ceux qui ne le sont pas.

Taux de fécondation de la génération G2:

mâles M		mâles NM		hermaphrodites	
<u>1</u>	87%	<u>NM1</u>	93%	<u>5</u>	0%
<u>2</u>	92%	<u>NM2</u>	94%	<u>6</u>	0%
<u>3</u>	92%	<u>NM3</u>	90%	<u>7</u>	0%
<u>4</u>	97%	<u>NM4</u>	89%	<u>8</u>	0.5%
<u>5</u>	94%			<u>9</u>	0%
<u>6</u>	93%			<u>10</u>	0%
<u>7</u>	98.6%				
<u>8</u>	93.5%				
<u>9</u>	95%				
<u>10</u>	91.1%				
<u>11</u>	95%				
<u>12</u>	89%				
<u>13</u>	95.8%				
<u>14</u>	92.6%				

C. Elevage larvaire.

Les résultats sont représentés dans le tableau qui suit en ne tenant compte que des survivants, jour après jour. En effet, on remarque que les hermaphrodites sont les premiers à avoir subi des pertes importantes, dès le premier jour de l'élevage larvaire. Les témoins, ensuite, ont déperlé, puis finalement l'ensemble de la génération G₂ de GENEPHYS s'est éteinte le 18^{ème} jour d'élevage.

Dès le 6^{ème} jour, des réajustements ont été effectués à raison de 400.000 larves par cuve de 30 litres, ce qui assure une meilleure homogénéité des lots, de l'ordre de 1,3 larves/ml pour chaque.

Jour d'élevage	lot n°	nb de larves	densité (nb/ml)	taille moyenne (µm)	T (°C)	salinité	nourriture
1	cgge9705 01	712500	2.4	70	22,5	34,5	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	700000	2.3	72			
	cgge9705 03	800000	2.7	71			
	cgge9705 04	770000	2.6	71			
	cgge9705 05	740000	2.5	69			
	cgge9705 06	550000	1.8	71			
	cgge9705 07	745000	2.5	72			
	cgge9705 08	470000	1.6	69			
	cgge9705 09	720000	2.4	72			
	cgge9705 10	645000	2.2	67			
	cgge9705 11	600000	2.0	69			
	cgge9705 12	560000	1.9	66			
	cgge9705 13	743000	2.5	68			
	cgge9705 14	675000	2.3	65			
	cgge9706 01	710000	2.4	70			
	cgge9706 02	587000	2.0	65			
	cgge9706 03	640000	2.1	69			
	cgge9706 04	697000	2.3	69			
	cgge9706 05	0	0	-			
	cgge9706 06	0	0	-			
cgge9706 07	0	0	-				
cgge9706 08	0	0	-				
cgge9706 09	0	0	-				
cgge9706 10	0	0	-				
4	cgge9705 01	550000	1.8	89	20,7	34,4	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	555000	1.9	84			
	cgge9705 03	640000	2.1	86			
	cgge9705 04	380000	1.3	84			
	cgge9705 05	370000	1.2	82			
	cgge9705 06	300000	1.0	81			
	cgge9705 07	730000	2.4	90			
	cgge9705 08	318000	1.1	85			
	cgge9705 09	585000	2.0	88			
	cgge9705 10	575000	1.9	79			
	cgge9705 11	335000	1.1	82			
	cgge9705 12	300000	1.0	81			
	cgge9705 13	440000	1.5	84			
	cgge9705 14	415000	1.4	82			
	cgge9706 01	340000	1.1	79			
	cgge9706 02	505000	1.7	82			
cgge9706 03	395000	1.3	83				
cgge9706 04	520000	1.7	81				
6	cgge9705 01	420000	1.4	90	21	34,4	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	530000	1.8	94			
	cgge9705 03	491000	1.6	92			
	cgge9705 04	515000	1.7	97			
	cgge9705 05	478000	1.6	88			
	cgge9705 06	360000	1.2	93			
	cgge9705 07	494000	1.6	91			
	cgge9705 08	410000	1.4	86			
	cgge9705 09	560000	1.9	89			
	cgge9705 10	505000	1.7	86			
	cgge9705 11	430000	1.4	87			
	cgge9705 12	313000	1.0	88			
	cgge9705 13	325000	1.1	88			
	cgge9705 14	422000	1.4	85			
	cgge9706 01	580000	1.9	82			
	cgge9706 02	560000	1.9	86			
	cgge9706 03	590000	2.0	86			
	cgge9706 04	440000	1.5	87			

Jour d'élevage	lot n°	nb de larves	densité (nb/ml)	taille moyenne (µm)	T (°C)	salinité	nourriture
8	cgge9705 01	383000	1.3	103	22,9	34,1	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	295000	1.0	108			
	cgge9705 03	357000	1.2	102			
	cgge9705 04	356000	1.2	105			
	cgge9705 05	485000	1.6	104			
	cgge9705 06	392000	1.3	105			
	cgge9705 07	277000	0.9	107			
	cgge9705 08	570000	1.9	93			
	cgge9705 09	567000	1.9	104			
	cgge9705 10	370000	1.2	96			
	cgge9705 11	478000	1.6	100			
	cgge9705 12	410000	1.4	104			
	cgge9705 13	360000	1.2	101			
	cgge9705 14	422000	1.4	94			
	cgge9706 01	210000	0.7	82			
	cgge9706 02	100000	0.3	86			
cgge9706 03	420000	1.4	86				
cgge9706 04	300000	1.0	98				
11	cgge9705 01	380000	1.3	137	21,9	34,4	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	350000	1.2	131			
	cgge9705 03	280000	0.9	116			
	cgge9705 04	250000	0.8	136			
	cgge9705 05	290000	1.0	133			
	cgge9705 06	260000	0.9	137			
	cgge9705 07	236000	0.8	119			
	cgge9705 08	180000	0.6	102			
	cgge9705 09	220000	0.7	128			
	cgge9705 10	150000	0.5	96			
	cgge9705 11	230000	0.8	109			
	cgge9705 12	150000	0.5	109			
	cgge9705 13	180000	0.6	105			
	cgge9705 14	100000	0.3	100			
	cgge9706 01	0	0	-			
	cgge9706 02	0	0	-			
cgge9706 03	0	0	-				
cgge9706 04	0	0	-				
13	cgge9705 01	200000	0.7	143	22,5	34,2	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	260000	0.9	171			
	cgge9705 03	0	0	-			
	cgge9705 04	220000	0.7	157			
	cgge9705 05	280000	0.9	154			
	cgge9705 06	260000	0.9	159			
	cgge9705 07	160000	0.5	150			
	cgge9705 08	0	0	-			
	cgge9705 09	0	0	-			
	cgge9705 10	0	0	-			
	cgge9705 11	0	0	-			
	cgge9705 12	0	0	-			
	cgge9705 13	0	0	-			
	cgge9705 14	0	0	-			
15	cgge9705 01	20000	0.1	144	22,4	34,1	Isochrysis galbana
	cgge9705 02	0	0	171			
	cgge9705 04	0	0	157			
	cgge9705 05	28000	0.1	155			
	cgge9705 06	25000	1	161			
	cgge9705 07	0	0	150			
	cgge9705 08	0	0	-			
18	cgge9705 01	0	0	-	21,8	34,4	Isochrysis galbana
	cgge9705 05	0	0	-			
	cgge9705 06	0	0	-			

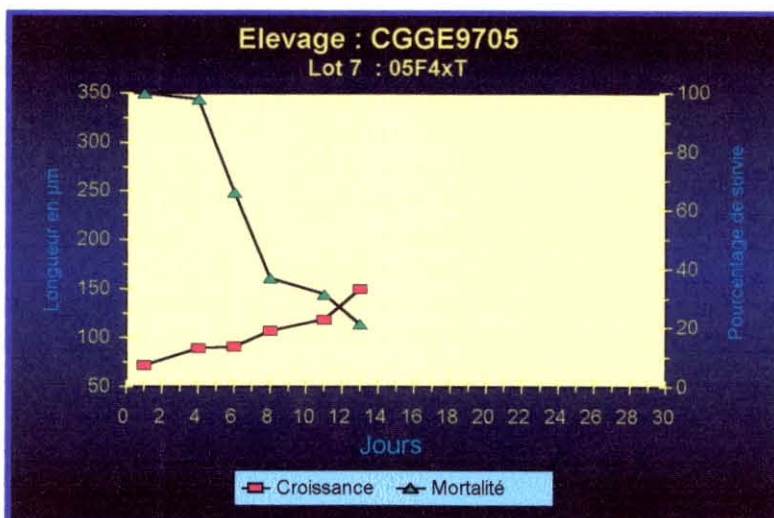
Sachant que l'on est parti de 1.100.000 ovocytes, on peut déterminer le taux d'éclosion si l'on compare ces données entre j.0 et j.1.

TAUX D'ECLOSION (j.1) DE LA GENERATION G2 DU PROGRAMME GENEPHYS

Numéro du lot	nombre d'ovocytes	Nombre de larves à j.1	% éclosion
06 g8	1 100 000	712 500	64.8
04 b9	1 100 000	700 000	63.6
06 h7	1 100 000	800 000	72.7
06 e4	1 100 000	770 000	70.0
17 f7	1 100 000	740 000	67.3
17 f1	1 100 000	550 000	50.0
05 f4	1 100 000	745 000	67.7
04 d3	1 100 000	470 000	42.7
04 g4	1 100 000	720 000	65.5
05 e7	1 100 000	645 000	58.6
06 f9	1 100 000	600 000	54.5
06 e2	1 100 000	560 000	50.9
04 g3	1 100 000	743 000	67.5
17 e8	1 100 000	675 000	61.4
NM1	1 100 000	710 000	64.5
NM2	1 100 000	587 000	53.4
NM3	1 100 000	640 000	58.2
NM4	1 100 000	697 000	63.4
04 a1	1 100 000	0	0.0
05 e1	1 100 000	0	0.0
05 g5	1 100 000	0	0.0
06 a3	1 100 000	0	0.0
05 a9	1 100 000	0	0.0
17 g5	1 100 000	0	0.0

Taux d'éclosion des mâles	61.2
Taux d'éclosion des NM	59.9
Taux d'éclosion des hermaphrodites	0

Un suivi de croissance et de mortalité a été effectué pour chaque lot, mais la mort prématurée de ceux-ci nous empêche d'effectuer toute interprétation. Cependant on peut montrer le lot 7, représentatif de l'ensemble des mâles:



IV. INTERPRETATION ET DISCUSSION.

D'un point de vue strictement expérimental, aucun incident n'a été déploré.

Les taux de fécondations nous indiquent que les mâles ont fécondé de façon tout à fait normale les ovocytes; un taux moyen de 92,8 % s'avère satisfaisant. Par contre, le taux de fécondation des hermaphrodites est quant à lui très faible, environ 0,1 %. Ceci peut être dû au fait que les gamètes mâles des hermaphrodites sont très peu fonctionnels; on peut supposer aussi que certains de ces individus ne soient pas hermaphrodites. En effet, une confusion des spermatozoïdes avec la flore bactérienne environnant les ovocytes est possible étant donné la ressemblance des deux entités. L'expérience complémentaire à ce sujet nous éclairera d'avantage.

Comment donc expliquer que l'ensemble des croisements de la G2 du programme Européen GENEPHYS aient subi de telles pertes, jusqu'à extinction de la totalité des lots? Plusieurs hypothèses sont envisageables :

La première consiste à mettre en avant l'idée selon laquelle un virus aurait contaminé l'ensemble des individus. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis à disposition des pathologistes des échantillons de larves d'huîtres de la G2. Ceux-ci nous ont confirmé la présence de l'herpès virus dans chacun des échantillons. Il est possible qu'un mode de transmission horizontal du virus ait eu lieu pour que chaque mâle soit porteur de l'herpès virus, il est envisageable aussi que le choix de l'unique génitrice pour l'ensemble des croisements est été malheureux et que le mode de transmission du virus soit alors vertical. Quoiqu'il en soit, les nécessités et contraintes d'études génétiques de cette population impliquaient une génitrice unique afin d'étudier au mieux l'effet des pères sur la croissance des jeunes. Pas de regrets à avoir donc quant à la méthode utilisée. C'était sans aucun doute la plus adaptée aux circonstances du moment.

Les résultats de l'élevage larvaire sont finalement relativement compréhensibles. En effet, les croisements « hermaphrodites x testeur » ne donnent lieu à aucune fécondation. Là encore, l'étude spécifique des hermaphrodites nous en apprendra plus et ne fera qu'accentuer nos suppositions sur une possible erreur de détermination qui expliquera un taux d'éclosion nul pour les hermaphrodites. Il est aussi logique que les individus issus du croisement « mâles Non-Marqués x testeur » servant de témoins meurent en même temps malgré 4 cuves distinctes. En effet, il s'agit à l'origine de 25 mâles dont les gamètes ont été mélangés puis répartis en 4 lots. Ceci explique que si l'un des 25 individus initialement choisis est infecté par l'herpès virus, ses gamètes contaminent ainsi par leur simple présence l'ensemble des 4 lots par un mode de transmission horizontal. Enfin, on peut noter que ces individus NM, multiparentaux, ont de fait plus de chance d'avoir été

contaminés par l'herpès virus sur un mode de transmission vertical cette fois-ci. Mais cette première hypothèse n'est peut être pas l'unique cause de la mortalité de la G₂ de GENEPHYS. En effet, lors d'expériences complémentaires permettant d'évaluer le potentiel fécondant des gamètes mâles et femelles d'un hermaphrodite, la première expérience ne donna que des larves anormales, non viables, même en ce qui concerne le croisement témoin mâle par femelle ! Ceci, ajouté au fait que d'autres expériences en cours menées sur des huîtres triploïdes ou sur des huîtres plates aient elles aussi avorté, indique une cause plus grave et plus générale. En effet, la qualité de l'eau est alors mise en cause. Pour s'en assurer, une simple expérience de croisement mâle par femelle dont les larves sont pour partie élevées en eau de mer filtrée et traitée d'une part, et l'autre partie élevée en eau de forage d'autre part, nous révéla effectivement que l'eau de mer filtrée habituellement utilisée provoquait des pertes considérables des larves récoltées. Ces résultats ont amené le Directeur du Laboratoire à prendre de rapides et indispensables décisions pour permettre la survie des individus d'autres expériences, ou même simplement présents dans l'enceinte de l'élevage larvaire. Il fut donc décidé de faire un assainissement de l'ensemble du matériel mis à disposition pour ce type d'élevage, ainsi que la mise en place de nouveaux systèmes de filtration de l'eau de mer. Ces directives indispensables monopolisèrent l'élevage larvaire durant près d'une semaine.

Cette première tentative d'élevage de la G₂ de GENEPHYS a été utile à plus d'un titre:

Tout d'abord, il apparaît que l'assainissement de la salle d'élevage larvaire fut profitable à l'ensemble du laboratoire. De plus un contrôle plus régulier de la qualité de l'eau est maintenant mis en place, ce qui permet d'anticiper des pertes massives et de sauvegarder des individus plus rapidement.

Ensuite, cette expérience a mis en exergue le risque accru de contamination par l'herpès virus de populations provenant de localités différentes. En effet, il apparaît que l'origine diversifiée des individus ne soit pas indispensable, surtout si l'on compare le faible intérêt que procure cette diversité à l'augmentation très importante de chance de contaminer l'ensemble des huîtres par l'herpès virus. Il est donc préférable, lors d'une prochaine tentative d'étude des bases génétiques et de la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance d'utiliser une population sauvage dont on sait que sa localisation est peu propice au virus.

Enfin, lors du sexage des individus, l'étonnante proportion d'hermaphrodites et l'absence totale de femelle nous ont amené à nous intéresser d'avantage à l'hermaphrodisme chez l'huître *Crassostrea gigas*.

V. EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE SUR LA QUALITE DES GAMETES D'HERMAPHRODITES.

Le déroulement de l'expérience de la G_2 de GENEPHYS nous a amené à nous intéresser plus particulièrement au pouvoir fécondant des gamètes mâle et femelle provenant d'un individu hermaphrodite.

A. Materiel et méthodes.

1. Croisements d'hermaphrodites.

Après sexage selon la même technique que lors de la manipulation GENEPHYS, on filtre à 10 μm les gamètes mâles et femelles de 5 hermaphrodites. Lors de cette manipulation, on utilise également un mâle vrai et une femelle vraie. Dans le croisement suivant, « m_n » indique, par exemple, les gamètes mâles de l'hermaphrodite n° , etc. En bleu est indiqué le numéro des béchers où ont lieu les fécondations. Ainsi, on obtient:

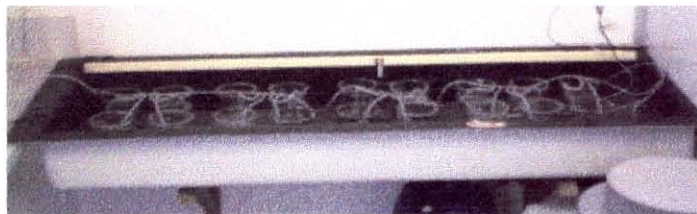
	Mâle(m)	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5
Femelle(f)	<u>17 et 18</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
f_5	<u>6</u>	<u>16</u>				<u>15</u>
f_4	<u>7</u>				<u>14</u>	
f_3	<u>8</u>			<u>13</u>		
f_2	<u>9</u>		<u>12</u>			
f_1	<u>10</u>	<u>11</u>				

De ce fait les béchers 11;12;13;14;15 correspondent à des auto fécondations, et les béchers 17 et 18 servent de témoins.



Cette photo montre les 5 hermaphrodites utilisés ainsi que le vrai mâle et la vraie femelle.

Les 18 béchers ont donc été placés dans des conditions de température et de salinité satisfaisante. De plus, un système de bullage a également été mis en place comme le montre la photo qui suit:



2. Etude au Microscope Electronique à Transmission.

Afin de vérifier le caractère fécondant des spermatozoïdes et des ovocytes d'hermaphrodites, il fut décidé d'analyser au M.E.T ces deux types de gamètes. En effet, une comparaison de ceux-ci avec des observations déjà effectuées et connues de gamètes normaux nous indiquera si il existe ou pas des différences histologiques. Pour ce faire, on filtre les gamètes d'hermaphrodites sur un tamis de 75 μm ce qui laisse passer les spermatozoïdes et les ovocytes mais retient les grosses particules inutiles. La solution obtenue est ensuite centrifugée à 1500 t/m pendant 8 mn dans un tube de 15 ml. On enlève le surnageant et l'on récupère le culot. Ensuite, on effectue:

- **Une fixation.**

- Glutaraldehyde 3%
- Rinçage au tampon cacodylate (3 fois)
- Post-fixation à l'acide osmique à 1%
- Rinçage au tampon cacodylate (2 fois)

- **Une déshydratation.**

- Alcool 70 (1fois 10 mn)
- Alcool 95 (2fois 15 mn)
- Alcool 100 (3 fois 20 mn)

- Oxyde de Propylène (2 fois 15 mn)

- **Une imprégnation.**

- Mélange 50 % Oxyde de Propylène-50% Epon (1 fois 1h)

- Epon (1 fois 1 h)

- **Inclusion.**

- On place à 60° pendant 12 heures

B. Résultats.

1. Croisements des hermaphrodites.

Les premiers résultats sont obtenus 24 heures après fécondation. Toutes les larves sont anormales, difformes, et selon les proportions suivantes:

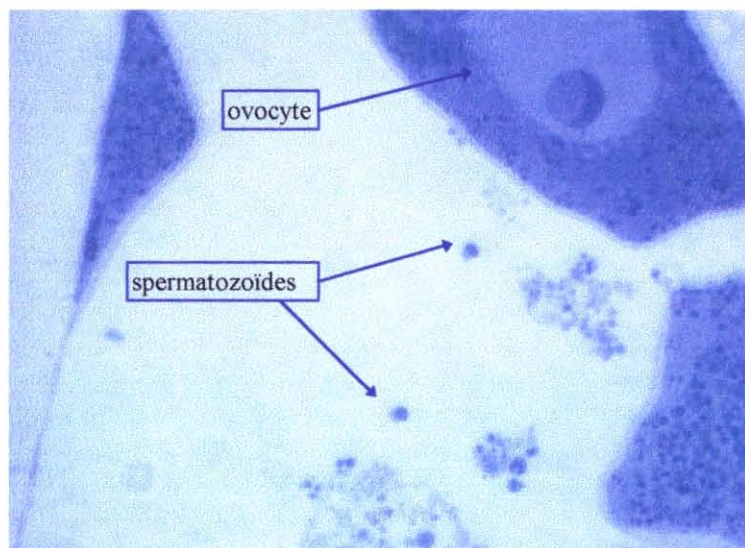
n° LOT	n° goutte prélevée		
	1	2	3
<u>1</u>	0	0	0
<u>2</u>	2	0	0
<u>3</u>	0	0	0
<u>4</u>	0	1	0
<u>5</u>	1	0	0
<u>6</u>	6	1	2
<u>7</u>	4	3	1
<u>8</u>	0	0	0
<u>9</u>	1	0	0
<u>10</u>	3	4	4
<u>11</u>	1	2	0
<u>12</u>	2	0	1
<u>13</u>	0	0	0
<u>14</u>	1	2	2
<u>15</u>	0	1	0
<u>16</u>	0	0	0
<u>17</u>	1	2	2
<u>18</u>	1	3	2

On peut donc classer ces données selon 4 catégories pour obtenir les taux de fécondation suivants:

$f \times m_n$	1.78 %
$f_n \times m$	12.44 %
$f_n \times m_n$	4.45 %
$f \times m$	12.22 %

2. Visualisation au M.E.T.

Cette visualisation a été effectuée dans les tous derniers jours du stage, ce qui ne laissa le temps d'obtenir que des coupes semi-fines qui permettent néanmoins une bonne visualisation des ovocytes et des spermatozoïdes en coupe.



C. Discussion et interprétation.

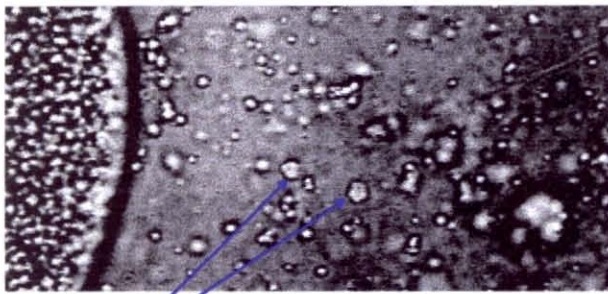
Les croisements d'hermaphrodites ont été réalisés avant l'assainissement de l'ensemble du laboratoire de génétique ce qui explique les taux de fécondation particulièrement faibles. En effet, la qualité de l'eau est probablement à l'origine de l'anormalité des larves ainsi que de leur faible nombre. Cependant, on peut considérer ce « facteur eau » commun à tous les lots. De ce fait, il ne remet pas en cause les comparaisons que l'on peut effectuer entre les différents taux de fécondation.

Nous avons donc obtenu une similitude entre le taux de fécondation de $m \times f$ (12.22%) et de $m_n \times f_n$ (12.44%). Ceci nous montre donc que les gamètes femelle (f_n) d'un hermaphrodite ou d'une vraie femelle (f) ont la même capacité à féconder un spermatozoïde provenant d'un vrai mâle.

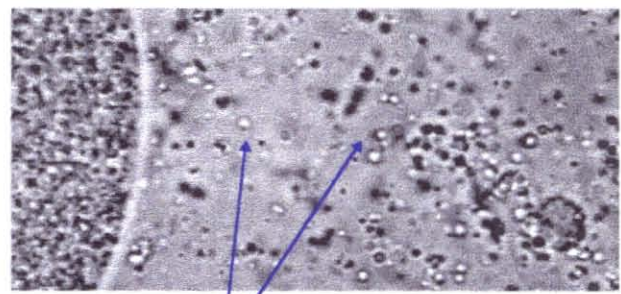
Ceci est confirmé par le fait que le taux de fécondation de $m_n \times f_n$ (4.45%) est lui aussi comparable à $m_n \times f$ (1.78%). En effet, là encore on remarque une similitude fonctionnelle des gamètes femelles d'un hermaphrodite (f_n) et d'une vraie femelle (f).

Par contre, il apparaît une différence marquée entre le taux de fécondation de $m \times f$ (12.22%) et $m_n \times f$ (1.78%). Ceci induit donc une différence de fonctionnalité entre les spermatozoïdes d'hermaphrodite et ceux d'un vrai mâle. Cette différence nous a donc amené à nous intéresser d'avantage à la partie mâle des gamètes d'hermaphrodites. Ainsi, au grossissement $\times 40$, une confusion est tout à fait possible entre des spermatozoïdes et des bactéries. Ceci explique sans doute les résultats étonnants faibles des taux de fécondation des hermaphrodites de la G_2 de GENEPHYS.

Ces deux clichés, pris pourtant au grossissement $\times 100$, montrent bien la difficulté de distinction des deux entités.



Spermatozoïdes



Bactéries

Cette distinction étant délicate, c'est la raison pour laquelle les individus choisis pour l'expérience complémentaire ont été déterminés au grossissement $\times 100$. Ainsi, les résultats de cette expérience sont réellement interprétables et valides.

VI. CONCLUSION.

Le but de ce travail était de contribuer à l'étude des relations existant entre caractères physiologiques, croissance et caractéristiques génétiques de façon à sélectionner les animaux présentant les caractères les plus intéressants en terme de physiologie et de croissance.

Les manipulations du croisement se sont déroulées de façon satisfaisante, mais l'élevage de la deuxième génération du programme Européen GENEPHYS a subi des pertes massives dès le stade larvaire, jusqu'à extinction de la totalité des lots de la G_2 . Ceci anéantit l'utilité du suivi de croissance effectué sur les parents de la G_1 . En effet, il est désormais impossible de corréler l'aspect génétique avec les caractéristiques physiologiques et de croissance.

L'une des solutions envisageables pour effectuer ce suivi génétique consisterait à croiser de nouveaux individus G_1 provenant d'Arcachon ou Bonne Anse, afin d'obtenir une nouvelle G_2 qui permettrait alors une étude complète sur deux générations.

L'autre consisterait à prélever de nouveaux individus pour renouveler la totalité du programme GENEPHYS. Dans ce cas il faudrait s'assurer, lors des croisements, que les individus impliqués soient de vrais mâle ou femelle. De plus, pour ces prélèvements d'huîtres, l'endroit devrait être choisi de telle sorte que l'on ait moins de chance d'avoir des individus contaminés par l'Herpès-virus. Autrement dit, il ne semble pas indispensable d'obtenir une nouvelle G_1 avec des individus provenant d'endroits divers, mais plutôt d'assurer la pérennité de plusieurs générations provenant d'une seule population.

VII. BIBLIOGRAPHIE.

- ADAMKEWICZ**, L.S., Taub, R. and Wall, J.R., 1984a. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. I. Mendelian inheritance of allozyme variation. *Biochemical Genetics*, 212 (3/4) : 215-219.
- ADAMKEWICZ**, L.S., Taub, R. and Wall, J.R., 1984a. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacologia*, 25 (2) : 525-533.
- BARBIN**, V., Schein, E., Roux, M., Decrouez, D., Ramseyer, K., 1991. Stries de croissance révélées par cathodoluminescence dans la coquille de *Pecten maximus* (L.) récent de la rade de Brest (Pectinidae, Bivalvia). *Geobios*, 24 (1) : 65-70.
- BARNABE**, G., 1986. *Aquaculture*, volume 1. Lavoisier. 1115 pp.
- BAUD**, J.P. et al. 1991 Adaptation de la technique du télécapage de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) aux conditions d'élevage de la baie de Bourgneuf. Rapport interne IFREMER.
- BUROKER**, N.E., Hershberger, W.K., 1979. Population genetics of the family Ostreidae. I. Interspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54 : 157-169
- BUROKER**, N.E., 1984. Gene flow in mainland and insular populations of *Crassostrea gigas* (Mollusca). *Biological bulletin*, 166 : 550-557.
- CHANLEY**, P.E., 1961 Inheritance of shell marking and growth in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Proceeding of the National Shellfish Association*, 50 : 163-169.
- CREAA**, 1991. Rapport 1991.
- CRENSHAW**, J.W.Jr., Hefferman, Peter B. and Walker, Randal L., 1991. Heritability of growth rate in the Southern bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say, 1822). *Journal of Shellfish Research*, 1 (10) : 55-63
- ELZIERE POPYANNI**, P., 1993. Coquillages. Informations techniques des Services Vétérinaires français. 509 pp.
- FOLTZ**, D. W., and Zouros E. 1984. Enzyme heterozygosity in the scallop *Plactopecten magellanicus* (GMELIN) in relation to age and size. *Marine Biology Letters*, 5 : 255-263
- FUJIO**, Y., 1979. Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural research*, 30 (1) : 32-42.
- GAFFNEY**, P.M., Davis, C.V. and Hawes, R.O. 1992. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 105 : 1-20.

- GERARD, A., P. BOUDRY, Y. NACIRI, S. HEURTEBISE, C. DELSERT, C. LEDU, P. PHELIPOT, B. CHOLLET et N. COCHENNEC**, 1995. Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridations et conservation de souches. Rapport IFREMER, 95/RPC-R-57 «Génétique», 20 pp.
- HALEY, L.E.**, and Newkirk, G.F., 1978. Selecting oyster for rapid growth. Proceedings of the World Mariculture Society, 8 : 557-565.
- HALEY, L.E.**, and Newkirk, G.F., 1982; The genetics of growth rate of *Crassostrea virginica* and *Ostrea edulis*. Malacologia, 22 (1-2) : 399-401.
- HUVET, A.**, 1997. Structuration génétique des populations de bivalves marins. Rapport bibliographique D.E.A, 16 pp.
- LONGWELL, A.C.** et S.S.Stiles, 1970. Système génétique et potentiel de reproduction de l'huître commerciale américaine. Endeavour, 29 : 94-99.
- LOSEE, E.**, 1979 b. Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*). Aquaculture, 16 : 123-126.
- MORAGA, D.**, Osada, M., Lucas, A., and Nomura, T., 1989. Génétique biochimique des populations de *Crassostrea gigas* en France (côte Atlantique) et au Japon (Miyagi). Aquatic Living Ressources, 2 : 135-143.
- NEWKIRK, G.F.**, Haley L.E., Waugh, D.L., and Doyle, R., 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine biology*, 41 : 49-52.
- REEB, C.A.** and J.C. AVISE, 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species : mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Genetics, 124 : 397-406.
- SINGH, S.M.**, and Zouros, E., 1978. Genetics variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). Evolution, 37 (2) : 342-353
- THIRIOT-QUIEVREUX, C.**, Pogson, G.H., and Zouros, E., 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves : aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. Genome, 35 : 39-45.

annexes

Planning du croisement du mardi 22 Avril

Jour	Heure	Action	Lieu	Matériel à prévoir	personnes
Lundi 21 Avril	Après-midi	Nettoyage des géniteurs	Salle maturation	brosses!	Arnaud
		Mettre à disposition environ 10 litres d'eau de mer filtrée pour les manip.	Elevage larvaire Salle info ou Labo		Pascal
		Préparer le fichier pour les comptages des larves		un ordinateur dispo!	Serge
		Numéroter les 18 bécchers plastique les 12 bechers verre	Labo	18 b. plastique+12 b. verre(500ml)	Nicolas
mardi 22 Avril	8 h 30	Ouverture et sexage des géniteurs	Labo	couteaux à huîtres	Pierre+Serge+Nicolas
	9 h	Pélèvement sur hermaph. pour étude de la proportion mâle/femelle + marquer les 5 hermaph.en fonction des % + prendre des photos types.	Labo	microplaques + tampon GA + dispositif vidéo	Pierre+Christophe+Serge
	9 h 45	Scarification des 5 hermaph.,du mâle, et de la femelle.	Labo	cutters + 5 bécchers plastiques + 2 bécchers verre(500ml)	Pierre+Serge+Nicolas
	10 h 15	Filtration du mâle, de la femelle et des 5 hermaph.	Elevage larvaire	filtre 25µm pour le mâle filtre 60 µm pour la femelle filtre 10 µm pour les 5 hermaph.	Pascal
	11 h 15	Comptage des spz. du mâle, des ov. de la femelle + répartition des gamètes des 5 hermaph. dans 10 bécchers en verre en (partie mâle / partie femelle)	Labo	érosine + analyseur d'images + 10 bécchers en verre(500 ml)	Christophe+Nicolas
	12 h 00	Utilisation du programme fait sur Excel pour le dosage de spz/ov.	Labo	un ordinateur dispo.	Nicolas
	12 h 30	Faire les fécondations selon dosages et plan de croisement	Labo	18 bécchers plastique	Pierre+Serge+Nicolas
mercredi 23 Avril	14 h 00	Début du protocole d'épifluo et stopper au stade de la fixation.	Labo	tampon GA+formol 6%+plaque de 24 puits	Nicolas
	14 h 30	Comptage et mesure des 18 lots de larves D.	Labo	Dispositif vidéo	Serge+Nicolas
Jeudi 24 Avril		Fin du protocole d'épifluo + photos	Labo	colorant Hoeschst+Dispositif vidéo	Christophe

Planning du croisement

Jour	Heure	Action	Lieu	Matériel à prévoir
Mercredi 10 Avril		Nettoyage des géniteurs	Salle de maturation	Des brosses
		Prévoir le remplissage des cuves d'élevage nécessaires	Elevage larvaire	
		Mettre 30 litres d'eau de mer filtrée au frigo pour récupérer le sperme		
		Etiquetter les eppendorfs et les sachets pour les prélèvements		Eppendorfs + sachets
Jeudi 11 Avril	8 h	Entretien des élevages et production de phyto.	Elevage larvaire	
	9 h	Ouverture et sexage des géniteurs	Labo	Couteaux à huîtres
		Prélèvement pour étude de la quantité des gamètes mâles	Labo	Microplaques + tampon GA
	11 h	Scarification des mâles et des hermaphrodites	Labo	Cutters + bechers
	11 h 30	Filtration des hermaphrodites pour n'obtenir que des gamètes mâles ou femelles	Micronuserie	Filtres 10µm
	12 h 00	Comptage des gamètes femelles	Labo	Analyseur d'images
	12 h 15	Prélèvement de branchies et de muscles pour des études génétiques (microsatellite et allozymes)	Labo	Pinces + ciseaux
	12 h 40	D'après le résultat de comptage, répartition des ovules selon le plan de croisement	Labo	Bechers
13 h 30	Début du protocole d'observation au microscope à épifluorescence pour la visualisation du taux de fécondation	Labo	Tampon GA + Formol 6% + le microscope + dispositif vidéo	

