

Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998

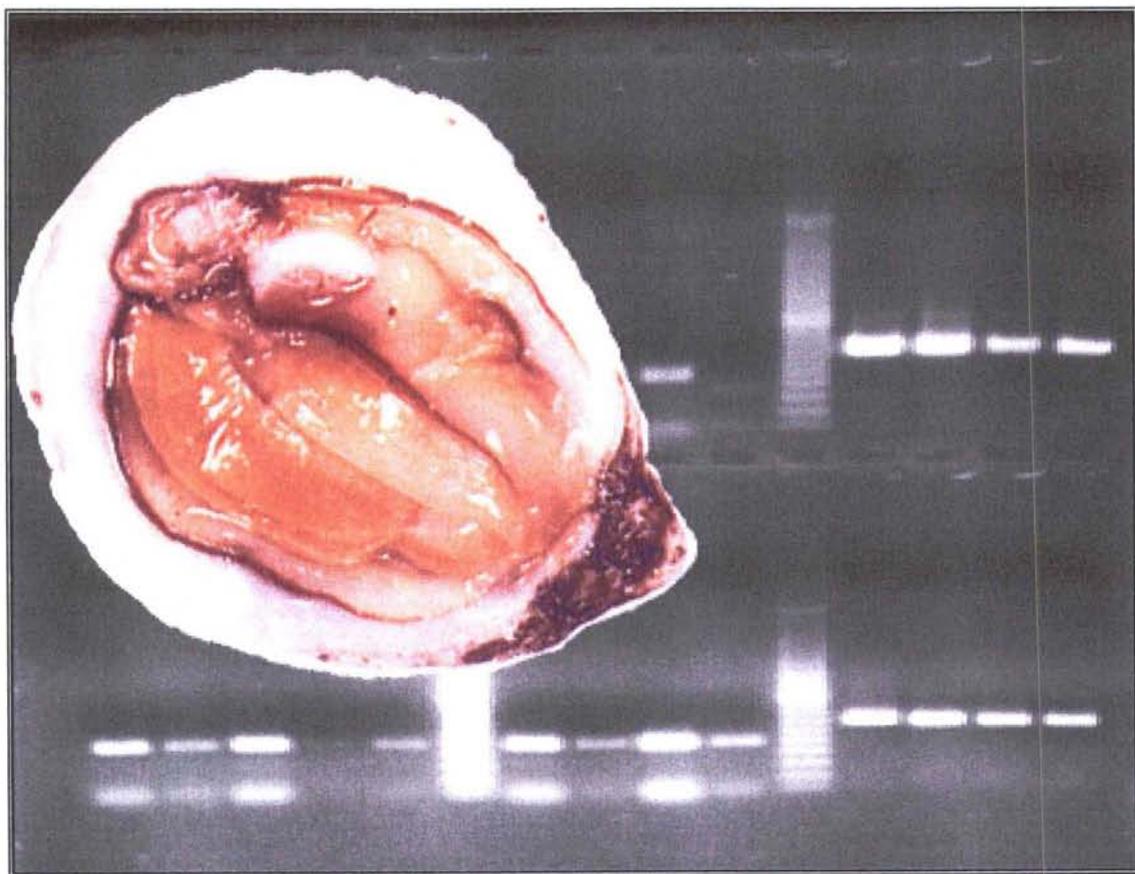
Convention 96 RPC-R-65 "Génétique"

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

**ACCLIMATATION DE NOUVELLES ESPECES D'HUITRES CREUSES DU  
GENRE CRASSOSTREA : HYBRIDATION ET CONSERVATOIRE DE SOUCHES**

**AMELIORATION DE LA QUALITE CHEZ L'HUITRE CREUSE CRASSOSTREA  
GIGAS PAR SELECTION DE SOUCHES PERFORMANTES**

Rapport année 1996



Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie  
BP 133 17390 La Tremblade (FRANCE)  
Tel. 05 46 36 98 36  
Fax. 05 46 36 37 51

 **IFREMER**

## SOMMAIRE

### ACTION DE RECHERCHE 1 : ACCLIMATATION DE NOUVELLES ESPECES D'HUITRES CREUSES DU GENRE CRASSOSTREA : HYBRIDATION ET CONSERVATOIRE DE SOUCHES

<b>I - INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>II - ACTIONS MENEES POUR L'ANNEE 1996 AU SEIN DU CONSERVATOIRE DE SOUCHES</b>	<b>7</b>
1. INVENTAIRE DE DEBUT DE SAISON	7
2. IMPORTATIONS REALISEES	7
3. CONTROLES SANITAIRES AVANT ET APRES IMPORTATIONS	8
4. CROISEMENTS EFFECTUES A L'ECLOSERIE	8
5. SUIVI DE CROISSANCE COMPAREE DES LOTS ISSUS DE CROISEMENTS INTRA-SPECIFIQUES.	11
6. INVENTAIRE DU CONSERVATOIRE EN FIN DE SAISON	11
<b>III - DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DE MARQUEURS "PCR-RFLP" MITOCHONDRIAUX CHEZ LES HUITRES CREUSES DU GENRE CRASSOSTREA</b>	<b>12</b>
1. OBJECTIFS	12
2. MATERIEL ET METHODES	13
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	13
2.2. EXTRACTION DE L'ADN TOTAL	13
2.3. AMPLIFICATION PCR	14
2.4. DIGESTIONS PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION	14
2.5. ELECTROPHORESE	14
3. RESULTATS	15
3.1. AMPLIFICATIONS	15
3.2. POLYMORPHISME DE LONGUEUR DE FRAGMENTS DE RESTRICTION	15

## II - ACTIONS MENEES POUR L'ANNEE 1996 AU SEIN DU CONSERVA-TOIRE DE SOUCHES

### 1. INVENTAIRE DE DEBUT DE SAISON

L'inventaire des animaux du conservatoire de souches au début 1996 est présenté dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Inventaire des animaux au début 1996.

Espèce	Origine	Génération / année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. virginica</i>	Canada	G0 / 1994	62
<i>C. virginica</i>	Pays de galles	G1 / 1992	91
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	G0 diploïdes /1994	12
<i>C. gigas x C. rivularis</i>	Conservatoire de souches	hybrides G1/1995	40 + un lot témoin <i>C. gigas</i>
<i>C. angulata</i>	Espagne	G0/1995	74
<i>C. angulata</i>	Portugal	G0/1996	75
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G0/1995	136
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G1/1995	100
<i>C. sikamea x C. angulata</i>	U.S.A	hybrides G1/1995	75

Les objectifs pour l'année 1996 étaient les suivants :

- Poursuivre les premières reproductions des espèces pour lesquelles nous disposons de géniteurs G0. L'objectif est toujours de limiter le stockage d'animaux importés en produisant une descendance simultanément à des témoins *C. gigas* qui serviront de comparaison.
- Tenter des hybridations inter-spécifiques des différents taxons présents au sein du conservatoire en fonction des connaissances disponibles dans la littérature sur ce sujet (voir pour revue Gaffney et Allen, 1993).
- Importer de nouvelles souches ou espèces. Elargir la gamme des espèces présentes au sein du conservatoire de souches (les capacités d'accueil de la salle de quarantaine étant limitée).

### 2. IMPORTATIONS REALISEES

Au cours de l'année 1996, les importations suivantes ont été réalisées :

1. *Saccostrea commercialis* : 100 individus issus de captage naturel en provenance d'Australie (Port Stephens, New South Wales) Réception avec examen histologique le 15/02/96.

**Tableau 3 : Elevages larvaires réalisés en 1995 pour le Conservatoire de Souches**

Date	Elevage/Lots	Femelles (nombre de géniteurs)	Mâles (nombre de géniteurs)	Résultats/ Observations
18/04/96	RSGR9615			
	Lot 1:	<i>C. gigas</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (1)	Lot témoin Cg x Cg supprimé à J7
	Lot 2:	<i>C. gigas</i> (2)	<i>C. gigas</i> (1)	Lot 100% normal mis à fixer à J22
22/04/96	RSVV9617			
	Lot 1:	<i>C. gigas</i> (6)	<i>C. gigas</i> (6)	Lot fixé à J18 100% normal
	Lot 2:	<i>C. virginica</i> (14)	<i>C. virginica</i> (16)	Lot fixé à J18 100% normal
10/07/96	RSGX 9627	<i>C. gigas</i>	<i>C. gigas</i>	Jeté à J7 (anormales).
	Lot1:	<i>C. angulata</i>	<i>C. gigas</i>	Fixé à J21
	Lot2:	<i>C. sikamea</i>	<i>C. gigas</i>	Fixé à J23
	Lot3:	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	Jeté à J1
	Lot4:	<i>C. angulata</i>	<i>C. angulata</i>	Fixé à J23
	Lot5:	<i>C. sikamea</i>	<i>C. angulata</i>	Jeté à J9
	Lot6:	<i>C. gigas</i>	<i>C. sikamea</i>	Jeté à J1
	Lot7:	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	Jeté à J1
	Lot8:	<i>C. sikamea</i>	<i>C. sikamea</i>	Jeté à J1
	Lot9:	<i>C. gigas</i>	<i>C. gigas</i>	Jeté à J2
	Lot10:	<i>C. angulata</i>	<i>C. gigas</i>	Fixé à J23
	Lot11:	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	Jeté à J1
	Lot12:	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	Jeté à J5
	Lot13:	<i>C. angulata</i>	<i>C. angulata</i>	Fixé à J23
	Lot14:	<i>C. gigas</i>	<i>C. sikamea</i>	Jeté à J1
	Lot15:			
8/08/96	RSGX9632			
	Lot1:	<i>C. gigas</i> (5)	<i>C. gigas</i> (12)	Jeté à J1
	Lot2:	<i>C. gigas</i> (5)	<i>C. angulata</i> (3)	Jeté à J5
	Lot3:	<i>C. gigas</i> (5)	<i>C. sikamea</i> (7)	Jeté à J5
	Lot4:	<i>C. angulata</i> (10)	<i>C. gigas</i> (12)	Jeté à J16
	Lot5:	<i>C. angulata</i> (10)	<i>C. angulata</i> (3)	Jeté à J19
	Lot6:	<i>C. angulata</i> (10)	<i>C. sikamea</i> (7)	Jeté à J1
	Lot7:	<i>C. sikamea</i> (1)	<i>C. gigas</i> (12)	Jeté à J5
	Lot8:	<i>C. sikamea</i> (1)	<i>C. angulata</i> (3)	Jeté à J19
	Lot9:	<i>C. sikamea</i> (1)	<i>C. sikamea</i> (7)	Jeté à J1

Actuellement, le mode de fonctionnement de la salle de quarantaine du conservatoire de souches ne permet pas de réaliser dans des conditions idéales une maturation synchrone des géniteurs des différentes espèces présentes que l'on souhaite reproduire ou hybrider. En effet, les conditions requises pour assurer la maturation de ces espèces ne sont pas identiques, tout au moins pour certaines d'entre elles. Quant à la difficulté technique à maintenir constamment des températures différentes de maturation, elle provient du fonctionnement même de la salle de quarantaine qui repose sur le principe d'un circuit partiellement fermé.

L'extension des bâtiments de la station IFREMER à Ronce les bains, devrait permettre à moyen terme de résoudre ce problème technique en augmentant significativement la surface réservée au conservatoire de souches et d'assurer ainsi des conditions de maturation plus favorables.

Le bilan des croisements réalisés pour l'année 1996 reste assez faible en terme d'élevages et les principaux problèmes rencontrés sont les suivants:

1. Une mortalité significative chez les premiers géniteurs *C. rivularis* importés au conservatoire de souches et maturation trop tardive des géniteurs importés des USA en 1996 pour envisager une reproduction cette même année.
2. Des difficultés pour obtenir une maturation chez *C. sikamea*, ou obtention à 80% d'animaux hermaphrodites, limitant les possibilités de reproduction intra ou inter-spécifiques.
3. Impossibilité de faire se reproduire *S. commercialis* en raison de la taille des animaux importés d'Australie qui ne pourront être utilisés comme géniteurs qu'au printemps 1998.
4. Des mortalités importantes en élevages larvaires dès le mois de juillet, incluant les témoins *C. gigas*.
5. Les très faibles performances de croissance observées chez les hybrides *C. gigas* x *C. rivularis* par rapport au témoin *C. gigas* ont été accompagnées d'une faible survie. Les huîtres restantes ont été finalement sacrifiées afin de pouvoir vérifier leur statut d'hybride par analyses moléculaires.

Actuellement, cinq lots issus cette année des essais de reproduction des espèces importées sont maintenus en salle de quarantaine :

#### RSGX9627

Lot2: *C. angulata* x *C. gigas* représenté par environ 500 individus.

Lot3: *C. sikamea* x *C. gigas* représenté par environ 50 individus.

Lot5: *C. angulata* x *C. angulata* représenté par environ 300 individus.

#### RSVV9617

Lot1: *C. gigas* x *C. gigas* représenté par environ 500 individus.

Lot2: *C. virginica* x *C. virginica* représenté par environ 2000 individus.

Au cours du mois de juillet, les lots 1 et 2 ont été touchés par des épisodes de mortalités qui ont entraînés la disparition de près de 85 % du lot témoin *C. gigas* x *C. gigas*. Seulement, 8 à 10 % des animaux du lot *C. virginica* x *C. virginica* ont été touchés. La cause de ces mortalités n'a pas été identifiée, bien que des examens histologiques aient été pratiqués au laboratoire dès leur apparition.

Les deux lots ayant été soumis aux mêmes conditions de densités et environnementales d'élevage, il s'avère que le lot de première génération de *C. virginica* ait présenté une résistance sensiblement supérieure à cet épisode de mortalité que le lot de *C. gigas* témoin.

Deux autres lots obtenus en 1995 sont aussi en élevage :

#### RSGX9541:

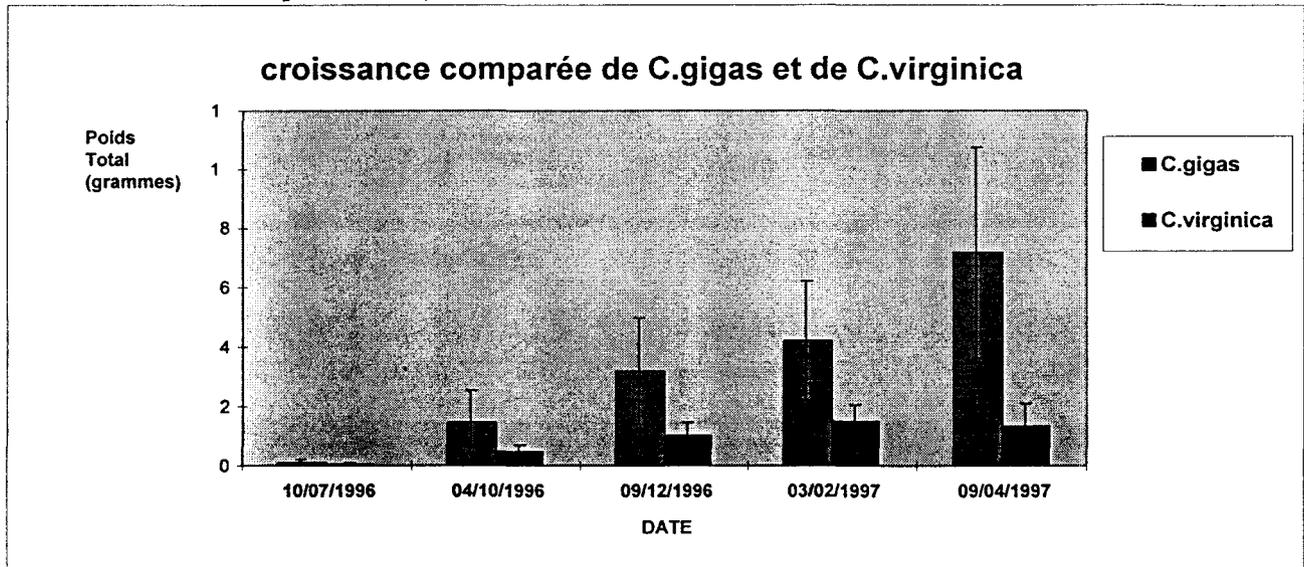
Lot 6: *C. angulata* x *C. sikamea* représenté par environ 40 individus qui présente depuis le début 1996 des mortalités régulières.

Lot 9: *C. sikamea* x *C. sikamea* représenté par environ 100 individus de croissance régulière et homogène sans aucune mortalité

## 5. SUIVI DE CROISSANCE COMPAREE DES LOTS ISSUS DE CROISEMENTS INTRA-SPECIFIQUES.

Les productions RSVV lots 1 et 2 ont été suivies afin de comparer leur performances de croissance au sein même de la salle de quarantaine. La figure 1 présente ces résultats de manière graphique. Il apparaît clairement que les performances de *C. gigas* sont significativement supérieures à celles de *C. virginica*. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues sur parc en 1993.

Figure 1. Comparaison des performances de croissance de *C. gigas* et *C. virginica* (données obtenues en salle de quarantaine).



## 6. INVENTAIRE DU CONSERVATOIRE EN FIN DE SAISON

Le tableau 6 présente l' inventaire des animaux en fin d'année 1996.

Tableau 4 : Inventaire des animaux en fin d'année 1996

Espèce	Origine	Génération/année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. virginica</i>	Canada	G0/1994	44
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	G0/1996	72
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G0/1995	105
<i>C. sikamea</i>	Conservatoire de souche	G1/1995	100
<i>C. sikamea x C. angulata</i>	Conservatoire de souche	hybrides G1/1995	75
<i>C. angulata</i>	Espagne	G0/1995	48
<i>C. angulata</i>	Portugal	G0/1996	35
<i>C. gigas</i>	Espagne	G0/1996	36
<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	G0/1997	34
<i>C. gasar</i>	Sénégal	G0/1996	25
<i>S. commercialis</i>	Australie	G0/1996	100

### III - DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DE MARQUEURS "PCR-RFLP" MITOCHONDRIAUX CHEZ LES HUITRES CREUSES DU GENRE *CRASSOSTREA*

#### 1. OBJECTIFS

L'étude du polymorphisme de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire est un atout considérable dans les différents domaines que sont la recherche de parenté, l'étude des flux de gènes entre et à l'intérieur des populations, l'évaluation de l'importance de la diversité génétique et son maintien, enfin la cartographie génétique.

Pour développer ces marqueurs pour les huîtres dans le cadre des deux actions de recherche présentées dans ce document, notre laboratoire s'est associé au laboratoire Génome et Populations de l'Université de Montpellier II par l'intermédiaire d'un contrat d'incitation.

Dans le cadre du programme conservatoire de souches d'huîtres creuses, les principaux objectifs dans ce domaine sont les suivants :

- L'étude de la différenciation génétique (intra- et inter-spécifique) au sein du genre *Crassostrea*, à l'aide marqueurs génétiques (marqueurs de l'ADN nucléaire et mitochondrial). Ces travaux servent de base à la mise au point de marqueurs diagnostiques d'espèces ou de populations.
- Ces marqueurs sont également souhaités par la profession ostréicole afin de venir en appui en cas d'importations frauduleuses (en lien avec le programme "Qualité" DRV/RA). On peut citer à titre d'exemple les résultats obtenus par Brown et Paynter en 1991, qui montrent une forte différenciation entre populations sauvages et stocks ("domestiqués") dans la baie de Chesapeake, USA.

La stratégie qui a été privilégiée jusqu'à présent repose sur la recherche de polymorphisme de fragments de restriction dans des fragments amplifiés par PCR. Cette méthode a été notamment choisie pour les raisons suivantes:

- La technique est "relativement légère" (comparativement aux RFLP sur ADN mitochondrial purifié comme utilisé par Brown et Paynter en 1991), donc applicable à de grands échantillons (études "en population", contrôles d'importations...),
- La possibilité de mise en oeuvre au sein du laboratoire de biologie moléculaire de La Tremblade,
- La "compatibilité" avec les marqueurs microsatellites (collections d' ADN génomique).
- La possibilité de séquencer ces fragments (séquençage direct des produits des P.C.R.) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces (en lien avec le programme d'hybridations inter-spécifiques).
- La possibilité d'étudier des échantillons anciens conservés dans les collections des Museums.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Le matériel biologique analysé est de 2 types:

- Des individus vivants, présents au sein du conservatoire de souche (les prélèvements de tissus sont réalisés par biopsie). Le tableau 4 présente les animaux actuellement en élevage.
- Des échantillons conservés en alcool ou au congélateur. Le tableau 5 ci-dessous présente l'état des collections.

**Tableau 5 : Echantillons de tissus d'huitres creuses pour extraction d'ADN.**

Espèce	Population	Origine/Descriptif	Effectif
<i>C. gigas</i>	TAS	Tasmanie - Huitres d'écloserie - nombre de parents inconnu	50
<i>C. echinata</i>	ROC	Nouvelle Calédonie- Huitres de rocher - population naturelle	30
<i>S. commercialis</i>	STE	Port Stephens, New South Wales, Australia, captage naturel; Lot vivant au Conservatoire	18
<i>C. gasar</i>	ZIG	Ziguinchor, Sénégal; huitres de palétuvier, population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	ARC	Arcachon, captage Naturel 1993 - (parents Genephy)	20
<i>C. gigas</i>	ROZ	Anse du Roz, Rade de Brest, pop. naturelle	50
<i>C. gigas</i>	GRA	Gravelines Avant Port, prox centrale nucléaire, pop. Nat.	50
<i>C. gigas</i>	KEE	Keelung, Taiwan, population naturelle	30
<i>C. angulata</i>	MUS	Museum de La Rochelle, échantillon datée de 1914	1
<i>C. angulata</i>	PIE	Canio Sancti Pietri; Chiclana de la Frontora, Espagne; population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	ZEL	Nouvelle Zélande via Nouvelle calédonie (commerciales)	50
<i>C. gasar</i>	PAG	Ile Blay, Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire - population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	HUB	Huitres élevées en Irlande - origine présumée Guernesay	20
<i>C. gigas</i>	COR	Chungmu, Corée du Sud - population naturelle	150
<i>C. gasar</i>	NOB	Kafountine, Casamance, Sénégal - huitres de palétuvier - population naturelle	30
<i>C. rhizophorae</i>	SIN	Huitres de paletuviers, Guyane. Mont Sinery	40
<i>C. gasar</i>	PIC	Sénégal	30
<i>C. gigas</i>	SEA	Angleterre - Ecloserie SeaSalter	20
<i>C. gigas</i>	OUA	Lagune de Oualidia - Maroc -175 Km au sud de Casablanca	48
<i>C. angulata ?</i>	TAH	Tahadart - 340 Km au nord de Casablanca - Maroc	16

### 2.2. EXTRACTION DE L'ADN TOTAL

L'ADN de chaque individu est extrait suivant le protocole décrit dans Naciri et al. 1995 : digestion d'un fragment de branchies ou de manteau par de la ProteinaseK (55°C toute la nuit) puis extraction "classique" au phénol-chlorophorme. Cette méthode semble donner toute satisfaction pour l'amplification par PCR de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Des extractions au Chelex sont également réalisées, mais donnent des résultats plus irréguliers (en terme d'amplification PCR).

Les extractions d'AND des échantillons conservés dans le formol (MUS) n'ont à ce jour pas permis d'amplifier les fragments mitochondriaux étudiés. Deux nouveaux protocoles seront testés prochainement.

### 2.3. AMPLIFICATION PCR

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial d'huîtres a été menée à partir des données disponibles dans la littérature (Tableau 6)

Suite à une récente publication de Hare & Avise (1996), nous testerons prochainement une nouvelle paire d'amorces (OY73a et OY73b) décrite comme amplifiant un segment de 800 bp chez *C. virginica*.

**Tableau 6 :** Amorces utilisées et fragments mitochondriaux correspondants.

Fragment mitochondrial amplifié et taille du fragment	Références et espèces concernées	Amorces
12S : 450 bp	Mokady <i>et al.</i> (1994): <i>Litophaga</i> spp., <i>Mytilus edulis</i>	12SBR : 5'-TTTCCCGCGAGCGACGGGCG 12SAR : 5'-GAAACCAGGATTAGATACCC
16S : 570 bp	Banks <i>et al.</i> (1993) : <i>Crassostrea</i> spp. Geller <i>et al.</i> (1993) : <i>Mytilus</i> spp	16SBR : 5'-GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 16SAR : 5'-CTGTTTATCAAAAATA
COI : 710 bp	Folmer <i>et al.</i> (1994): espèces d'invertébrés	80 LCO1490 : 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198 : 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

### 2.4. DIGESTIONS PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION

Les produits d'amplification sont directement digérés par les différentes enzymes de restriction. Un essai a été réalisé pour comparer les profils de restriction après précipitation des produits d'amplification (afin d'éliminer les divers autres composants de la réaction de PCR) à une digestion directe. La digestion directe donne des résultats équivalents ou meilleurs.

Le choix des enzymes de restriction testées c'est porté principalement sur des enzymes à 4 paires de bases afin de maximiser la probabilité de sites de coupure (Tableau 7).

**Tableau 7:** Caractéristiques des 9 enzymes de restriction utilisées.

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance (5' - 3')	Température optimale d'activité
TaqI	TCGA	60°C
Sau3A	GATC	37°C
AciI	CCGC	37°C
MseI	TTAA	37°C
HhaI	GCGC	37°C
HaeIII	GGCC	37°C
RsaI	GTAC	37°C
HindIII	AAGCTT	37°C
SacI	GAGCTC	37°C

### 2.5. ELECTROPHORESE

Le contrôle des amplifications PCR ainsi que les fragments digérés sont migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisé sur table U.V. par coloration au bromure d'ethidium (B.E.T.).

### 3. RESULTATS

#### 3.1. AMPLIFICATIONS

La mise au point des amplifications PCR a été réalisée dans un premier temps sur 6 individus "test", à raison d'un individu par espèce d'huître. De nouvelles espèces ont ensuite été testées en fonction des arrivages de nouveaux échantillons.

L'amplification du fragment 16S a pu être réalisée sur l'ensemble des échantillons (voir Tableau 8). Nous obtenons des fragments du poids moléculaire attendu : 570 pb. Une légère augmentation de la température d'appariement par rapport aux protocoles initiaux a permis de se débarrasser du bruit de fond.

L'amplification du fragment COI a pu être réalisée sur certaines espèces (*C. gigas*, *C. sikamea*, *C. rivularis*, *C. virginica*, *C. belecheria*, *C. iredalei*) mais pas sur d'autres (*C. gasar*, *C. margaritacea*, *C. echinata*). Cette absence de produit d'amplification est surprenant car les amorces en questions ont été décrites comme amplifiant ce gene avec succes chez un très grand nombre d'espèce d'invertébrés (Folmer *et al.*, 1994). Les tentatives de modification des conditions de la réaction de PCR (température d'appariement) n'ont pas donné de résultats positifs pour l'instant.

Le fragment 12S n'a pu être amplifié correctement avec les amorces utilisées malgré les multiples tentatives faisant varier température d'appariement et concentration en  $MgCl_2$ . Afin de vérifier la qualité de ces amorces, nous les avons testées sur la moule *Mytilus edulis*, espèce à partir de laquelle elles avaient été définies par Mokady et al (1994). L'amplification ayant été réalisée avec succès (obtention d'un fragment de la taille attendue: 450 bp) , on en conclut que l'impossibilité d'amplifier le fragment 12S chez les huîtres creuses est sans doute due à un manque d'homologie entre nos amorces et les régions correspondantes du gène 12S chez les huîtres. Il faudra donc sans doute faire appel à d'autres amorces si l'on souhaite amplifier cette région chez les huîtres.

#### 3.2. POLYMORPHISME DE LONGUEUR DE FRAGMENTS DE RESTRICTION

##### 3.2.1. Fragment 16S

Les profils de restriction observés pour les différents taxons ou populations analysés sont présentés dans les tableaux 5 et 6. Ils permettent de différencier 8 haplotypes. Les relations entre haplotypes, en terme de présence/absence de sites de restriction, ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al.* 1991). La matrice de distances (divergence nucléotidique) ainsi obtenue a servi de base à la construction de l'arbre présenté en figure 1, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

Nous disposons ainsi de **marqueurs non destructifs d'espèces**, permettant de distinguer facilement des espèces d'huîtres pour lesquelles les caractères morphologiques diagnostiques sont souvent difficiles à observer (voir inexistantes). La situation intermédiaire des huîtres ouest-africaines (*C. gasar*) entre les huîtres asiatiques (*C. gigas*, *C. sikamea* et *C. rivularis*) est intéressante et devra être confirmée par le séquençage du fragment 16S.

L'impossibilité d'intercroisement entre *C. gigas* et *C. virginica* mène à rechercher "d'espèces ponts" afin de transférer des caractères de résistances à des maladies d'une espèce à l'autre. Cette approche a été menée par S.K. Allen avec *C. rivularis* apparemment sans succès. *C. gasar* pourrait être meilleur candidat.

**Tableau 8** : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment 16S. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

Taxons/populations	16S								Haplo- types
	<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HindIII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>SacI</i>	
<i>Crassostrea angulata</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea gigas</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea rivularis</i>	a	a	a	a	a	a	a	b	II
<i>Crassostrea sikamea</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea virginica</i>	a	a	a	b	b	a	b	a	III
<i>Crassostrea iradalei</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>Crassostrea belcheria</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>Crassostrea echinata</i>	b	a	a	e	b	b	a	b	V
<i>Crassostrea margaritacea</i>	b	a	b	e	a	b	a	b	VI
<i>Crassostrea gasar</i> (Côte d'Ivoire)	a	b	a	e	b	a	b	a	VII
<i>Crassostrea sp.</i> (huîtres de paletuvier, Guyane)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>Crassostrea gasar</i> (Sénégal)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>Crassostrea gasar</i> (Casamance)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
Nb. de profils observés	2	2	2	3	2	2	2	2	

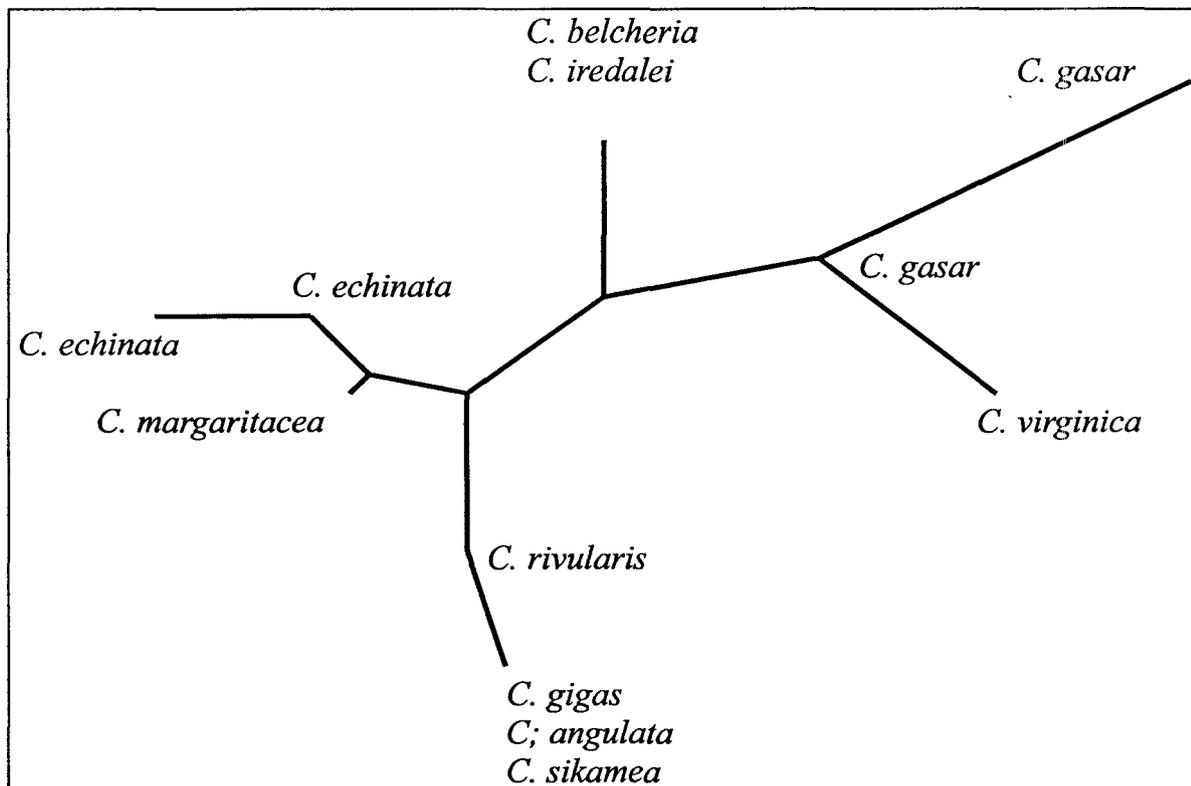
**Tableau 9** : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment 16S sur les différents taxon et populations étudiées.

Taxon	Populations/Origine	Nombre d'individus étudiés	Haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	Espagne, Portugal	5	I
<i>C. gigas</i>	France, Grande-Bretagne...	4	I
<i>C. rivularis</i>	New-Jersey (U.S.A.)	4	II
<i>C. sikamea</i>	Californie (U.S.A.)	4	I
<i>C. virginica</i>	Canada	5	III
<i>C. iradalei</i>	Thaïlande	1	IV
<i>C. belcheria</i>	Thaïlande	1	IV
<i>C. echinata</i>	Nouvelle Calédonie	3	V
<i>C. margaritacea</i>	Madagascar	3	VI
<i>C. sp.</i>	Guyane	8	VIII
<i>C. gasar</i>	Cote d'Ivoire, Sénégal	20	VII, VIII
Tous taxons confondus		58	8

Les profils de restriction observés pour les différents taxons ou populations analysés sont présentés dans les tableaux 5 et 6. Ils permettent de différencier 8 haplotypes. Les relations entre haplotypes, en terme de présence/absence de sites de restriction, ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al.* 1991). La matrice de distances (divergence nucléotidique) ainsi obtenue a servi de base à la construction de l'arbre

présenté en figure 1, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

**Figure 1:** Arbre construit par "neighbor-joining", illustrant les relations génétiques entre les taxons à partir de données obtenues en PCR-RFLP sur le fragment mitochondrial 16S.



### 3.2.2. Fragment COI

Ce fragment n'a pu être amplifié chez *C. margaritacea*, *C. echinata*, et *C. gasar*. Pour les autres taxons, les tableaux 9 et 10 résument les profils observés.

**Tableau 9 :** Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment COI. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

Taxons/populations	16S									Haplo-type
	Taq I	Sau3A	HhaI	Mse I	AcI	RsaI	HindIII	HaeIII	SacI	
<i>Crassostrea angulata</i>	c	c	a	b	b	c	a	c	a	A
	c	d	a	b	b	c	a	c	a	B
<i>Crassostrea gigas</i>	d	c	a	d	b	c	a	c	a	C
	d	c	a	d	b	c	a	c	a	D
	d	c	b	d	b	c	a	c	a	E
	a	c	a	b	b	c	a	c	a	J
<i>Crassostrea rivularis</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	H
<i>Crassostrea sikamea</i>	b	b	b	a	b	c	a	b	a	S
<i>Crassostrea virginica</i>	f	c	a	c	c	c	a	a	a	I
Nb. de profils observés	5	4	2	4	3	2	1	3	1	

**Tableau 10** : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment COI sur les différents taxon et populations étudiées.

Taxon	Populations/Origine	Nombre d'individus étudiés	Haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	Espagne, Portugal	50	A, B, C
<i>C. gigas</i>	France, Grande-Bretagne...	203	A, B,C, D, E, J
<i>C. rivularis</i>	New-Jersey (U.S.A.)	4	H
<i>C. sikamea</i>	Californie (U.S.A.)	4	S
<i>C. virginica</i>	Canada	5	I
Tous taxons confondus		266	9

Neuf haplotypes sont ainsi différenciés. Certains taxons, qui n'étaient pas différenciés par les profils de restriction sur le fragment 16S, peuvent être distingués (par exemple *C. sikamea* / *C. gigas*).

Une étude au niveau intra-spécifique a été réalisée sur les populations présentées dans les tableaux 11 et 12. Il s'agit de populations qui ont été identifiées (par les collègues qui nous les ont fournies) comme *C. angulata* (en provenance du Portugal et d'Espagne) ou *C. gigas*. Comme pour le fragment 16S, les relations entre haplotypes ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al.* 1991). La matrice de distances entre populations a servi de base à la construction de l'arbre présenté en figure 2, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

**Tableau 11** : Populations d'huîtres portugaises et japonaises étudiées.

Origin (country)	Abbreviation	Taxa	Status	N
Seudre Estuary (France)	SEU	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	20
Bonne Anse Bay (France)	BON	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	9
Charente estuary (France)	CHA	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	15
Arcachon bay (France)	ARC	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	15
Rade de Brest (France)	BRE	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	24
Gravelines (France)	GRA	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	23
Guernesey (Angleterre)	GUE	<i>C. gigas</i>	écloserie	16
Bangor (Pays de Galles)	BAN	<i>C. gigas</i>	écloserie	10
Tasmania (Australie)	TAS	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	11
Nouvelle-Zelande	NEW	<i>C. gigas</i>	?	12
Chungmu (South Korea)	CHU	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	14
Keelung (Taiwan)	KEE	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	23
Ria Formosa (Portugal)	RFG	<i>C. gigas</i>	pop. sauvage	11
Ria Formosa (Portugal)	RFA	<i>C. angulata</i>	pop. sauvage	11
Setubal (Portugal)	SET	<i>C. angulata</i>	pop. sauvage	13
Cadiz (Spain)	CAD	<i>C. angulata</i>	pop. sauvage	26

La figure 2 montre une différenciation très nette entre les populations identifiées comme *C. angulata* (SET, CAD, RFA) et les populations identifiées comme *C. gigas* originaire de France, Grande Bretagne, Corée du Sud, Australie, Nouvelle Zelande...). Jusqu'à ces résultats ces deux taxons n'étaient pas distinguables par des critères morphologiques et étaient considérés comme étant la même espèce. Ce dernier point est confirmé par leur proximité génétique, mais ils apparaissent désormais comme deux "races" géographiques distinctes.

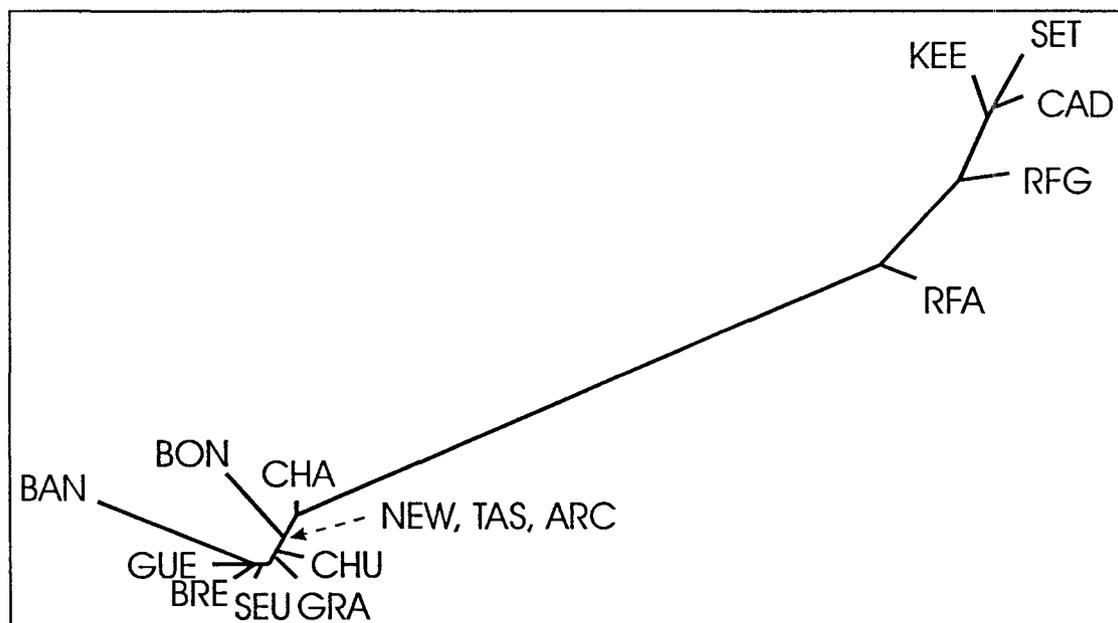
L'origine des huîtres portugaises a été débattue par de nombreux auteurs. En effet, l'absence de divergence morphologique et de barrière à l'hybridation entre les populations de *C. gigas*

d'Asie et les populations de *C. angulata* du Portugal a poussé certains auteurs à supposer que ces dernières avaient peut-être été importées d'Asie lors des premiers échanges commerciaux. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse en identifiant Taïwan comme origine possible de *C. angulata*. Ces résultats sont actuellement soumis pour publication dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

**Tableau 12 :** Fréquences des haplotypes dans les populations d'huitres portugaises et japonaises étudiées.

pays d'origine	Population	Taxon	N	Haplotypes					
				A	B	C	D	E	J
				ccab	cdab	dcad	dcab	dcbd	acab
France	Tremblade	<i>C. gigas</i>	20			0.95		0.05	
	Bonne Anse	<i>C. gigas</i>	9			0.88			0.11
	Charente	<i>C. gigas</i>	15	0.07		0.93			
	Arcachon	<i>C. gigas</i>	15			1			
	Rade de Brest	<i>C. gigas</i>	24			0.92		0.08	
	Gravelines	<i>C. gigas</i>	23			0.91	0.04	0.04	
United-Kingdom	Guernesey	<i>C. gigas</i>	16			0.87		0.12	
United-Kingdom	Bangor	<i>C. gigas</i>	10			0.6		0.4	
Australie	Tasmania	<i>C. gigas</i>	11			1			
Nouvelle Zelande		<i>C. gigas</i>	12			1			
Corée du Sud	Chungmu	<i>C. gigas</i>	14			0.93	0.07		
Taiwan	Keelung	<i>C. gigas</i>	23	0.87	0.04				0.09
Portugal	Ria Formosa	<i>C. gigas</i> ?	11	0.82	0.09	0.09			
	Ria Formosa	<i>C. angulata</i> ?	11	0.82		0.18			
	Setubal	<i>C. angulata</i>	13	0.85	0.15				
Espagne	Cadiz	<i>C. angulata</i>	26	0.92	0.08				

Les haplotypes sont désignés par 4 lettres minuscules correspondant aux profils de restriction pour les enzymes *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI*, *MseI* et par une lettre majuscule.



**Figure 1:** Arbre illustrant les relations observées entre les populations étudiées. Deux groupes se distinguent : *C. angulata* + KEE (Taiwan) d'une part et *C. gigas* d'autre part.

#### IV - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus en 1996 pour ce qui concerne le conservatoire de souche confirment la difficulté d'assurer la maturation puis la reproduction des huîtres maintenues en salle de quarantaine. Les résultats principaux de cette année sont donc les suivants :

1. Malgré les difficultés d'ordre zootechnique, la reproduction de l'huître creuse américaine *C. virginica* a pu être réalisée.
2. La mise en évidence de la sensibilité de *C. rivularis* à un parasite du genre *Bonamia* (Cochennec *et al.* in press).
3. Les hybrides *C. gigas* x *C. rivularis*, produits en 1995, ont montré des performances de croissance et une survie très faible. Ces observations sont confirmées par celles obtenues aux U.S.A par S.K. Allen.
4. Parmi les autres hybrides produits, les hybrides *C. sikamea* x *C. angulata* présentent des taux de survie et de croissance inférieures à ceux du témoin *C. sikamea*.

Les résultats obtenus sur le volet moléculaire de ce programme sont les suivants :

1. Mise au point de marqueurs moléculaires mitochondriaux d'espèces pour 10 espèces d'huîtres creuses
2. Mise en évidence d'une différenciation génétique entre *C. gigas* et *C. angulata*, deux taxons indistinguables jusqu'à présent.

Pour l'année 1997, les travaux s'engagent vers les directions suivantes :

1. Pour le conservatoire de souche, il a été décidé d'orienter les efforts vers la recherche et le testage de populations de *C. gigas* en provenance d'origines bien distinctes. Les origines retenues à ce jour sont notamment le sud du Japon, Taiwan et le Portugal (les populations reconnues comme *C. angulata* étant en fait de l'espèce *C. gigas*). Ce volet du programme a été présenté pour attribution d'une demi bourse de thèse au sein de l'IFREMER (voir annexe ci-jointe). La recherche du co-financement étant en cours.
2. Dans la mesure du possible, les espèces déjà présentes au sein de la salle de quarantaine seront reproduites (en intra-spécifique), mais l'introduction de nouvelles espèces ne sera plus privilégiée.

Les recherches basées sur les marqueurs de l'ADN mitochondrial devraient être complétées par des marqueurs microsatellites pour les taxons *C. angulata* et *C. gigas*. Le séquençage de certains fragments mitochondriaux devrait préciser le statut de certaines espèces et leurs relations phylogénétiques.

## V - ANNEXE : EXPOSE DU PROJET DE RECHERCHE PROPOSE POUR FINANCEMENT DANS LE CADRE D'UNE THESE D'UNIVERSITE

### Contexte du sujet :

L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* a été introduite dans de nombreuses régions du monde (Coleman, 1986; Grizel, 1996) et représente aujourd'hui 86 % de la production mondiale d'huîtres (Données FAO, 1995). Malgré son importance commerciale, elle n'a encore pas été génétiquement améliorée et peut donc être considérée comme "non domestiquée". Alors que des programmes de sélection sont aujourd'hui initiés (ex. le Molluscan Broodstock Program, U.S.A), une étude comparative des stocks des principaux pays producteurs, basée à la fois sur des marqueurs génétiques et des tests de performance, représente un élément essentiel pour la gestion des ressources génétiques et la sélection chez cette espèce.

L'étude de la diversité génétique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* serait abordée sous deux aspects :

- la variabilité observée à l'aide de marqueurs génétiques (allozymes ou ADN) au polymorphisme généralement considéré comme "neutre", c'est-à-dire à priori non directement impliqué dans la valeur sélective et l'adaptation des populations,

- la variabilité mise en évidence par l'étude comparative de différentes populations pour des caractères liés à la valeur sélective des individus et à leurs performances (croissance, fécondité, survie...).

### 1/ Variabilité et structuration des populations à l'aide de marqueurs génétiques :

Une grande majorité des études concernant la variabilité et la structuration des populations d'huîtres sont basées sur des marqueurs allozymiques (pour *C. gigas* : Buroker *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 1995; Mathers *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1986). Celles-ci montrent presque toujours une très faible différenciation entre populations, même très éloignées géographiquement. La mise au point récente de marqueurs de l'ADN nucléaire (Hare *et al.*, 1996; Naciri *et al.*, 1995) ou mitochondrial (Boom *et al.*, 1994; Boudry *et al.*, soumis) et leur utilisation dans l'étude de populations (Hare & Avise, 1996), montrent que les allozymes tendent à sous-estimer la différenciation génétique inter-populations. Ces différences pourraient être liées à l'existence de corrélations positives entre hétérozygotie aux loci enzymatiques et croissance (Marin & Dauphin, 1991; Thiriot-Quievreux *et al.*, 1992; Zouros, 1987), générant un biais qui tend ainsi à sur-estimer le niveau de variabilité génétique et/ou à sous-estimer le niveau de différenciation entre populations. Le récent développement de marqueurs microsatellites (notamment dans le cadre de l'URM 16) permet aujourd'hui d'aborder ces questions avec des marqueurs neutres et beaucoup plus variables que les allozymes.

D'un point de vue pratique, les allozymes nécessitent la conservation des tissus analysés à -20°C, alors que les marqueurs génétiques basés sur la technique de PCR permettent de travailler à partir d'échantillons simplement conservés dans l'alcool. Ceci permet d'obtenir

facilement, par envoi postal, des échantillons collectés par des équipes scientifiques étrangères.

## 2/ Testage de populations :

Les populations aujourd'hui exploitées en France sont issues d'huîtres importées de 1971 à 1975 en provenance du nord du Japon et de Colombie Britannique (Grizel & Heral, 1991). Cette introduction avait pour but de remplacer l'élevage de l'huître portugaise (*C. angulata*), décimée par une maladie virale (Comps *et al.*, 1976). Malgré le succès indéniable de cette introduction, les professionnels s'interrogent sur la bonne adaptation de ces huîtres aux conditions françaises (voir l'article intitulé "Gigas du nord, gigas du sud" paru dans "L'Ostréiculteur Français" en mars-avril 1996). Le but est alors d'identifier des populations présentant des caractéristiques génétiques réellement différentes, alors qu'échanges et mélanges de lots ont été très importants entre les pays producteurs. La forte plasticité phénotypique de l'espèce limite la portée des comparaisons entre populations élevées dans des environnements différents. Le testage de populations issues de géniteurs de différentes origines géographiques en conditions communes d'élevage apporterait des réponses à ces interrogations. Les rares études comparatives disponibles (Bougrier *et al.*, 1986, Jin-Hua Cheng, com. pers.) montrent que de telles différences existent en terme de croissance et de survie.

Ce sujet de thèse se propose donc d'étudier les ressources génétiques de l'huître creuse *Crassostrea gigas* à l'échelle mondiale, en abordant à la fois les informations apportées par des marqueurs génétiques et par le testage de populations de même âge en conditions communes d'élevage. La réalisation d'un tel testage implique le bon état sanitaire initial des populations et un suivi strict des lots.

## **Calendrier proposé :**

### **1997 (en cours)**

- Premières analyses de la différenciation inter-population à l'aide de marqueurs microsatellites sur les échantillons disponibles (Stage de DEA) et comparaison avec les données mitochondriales acquises en 1996.
- Recherche de géniteurs en provenance de populations étrangères identifiées comme potentiellement intéressantes : Sud Japon, Taiwan, Portugal et de 2 populations françaises témoins (Marennes-Oléron et Arcachon).
- Contrôles sanitaires (avant et après importation) puis stockage des huîtres en salle de quarantaine (La Tremblade), conformément aux règles zoosanitaires instituées par le CIEM.

### **1998**

- Elargissement de l'échantillonnage de populations de *C. gigas* en provenance des différentes zones géographiques où l'espèce est présente naturellement ou a été introduite.
- Maturation des géniteurs (en salle de quarantaine pour les populations étrangères).

- Croisements intra- et inter-populations de manière à générer 5 lots intra-population et 8 de lots inter-populations (croisements mâles x femelles et femelles x mâles des différentes populations avec la population de référence : Marennes-Oléron) soit un total de 13 lots (l'ensemble des 20 croisements inter-population ne peut être envisager pour des raisons d'infrastructure d'élevage).

	Japon	Taiwan	Portugal	Marennes-Oléron	Arcachon
Japon	✓			x	
Taiwan		✓		x	
Portugal			✓	x	
Marennes-Oléron	x	x	x	✓	x
Arcachon				x	✓

✓ croisement intra-population

x croisement inter-populations (mâles d'une population x femelles de l'autre population)

- Elevage larvaire et micro-nursage (La Tremblade), nursage (Bouin): suivi de croissance et de survie.

## 1999

- Analyse par marqueurs microsatellites et marqueurs mitochondriaux des populations échantillonnées en 1998.
- Testage en élevage intensif (Bouin) : performances de croissance, en fonction du niveau trophique et de la température, et de résistance à des stress expérimentaux (chocs chauds en cours de mise au point à la Station de Bouin pour la recherche de critères de tri sur la rusticité et la résistance aux mortalités estivales du naissain). La mise en évidence de différences entre lots pourra conduire à étudier plus en détails leurs performances pour des caractères physiologiques liés à la croissance (taux de respiration, d'assimilation).
- Testage en élevage traditionnel en plusieurs sites (réseau des stations cotières dans le cadre de "REGEMO") : croissance, survie (sensibilité aux maladies locales et aux stress environnementaux), indices de condition.

## 2000

- Analyse des données génotypiques (microsatellites et ADN mitochondrial)
- Conclusion et analyses statistiques des expérimentations de testage.
- Rédaction de la thèse et des publications.

### **Equipes associées au projet :**

- Lab. Génome et Populations, Université de Montpellier II, CNRS UPR 9060 (dans le cadre de l'URM 16: "Mise au point et utilisation de marqueurs génétiques hyper-variables chez les espèces marines."),
- Unité de Recherche Aquacole Pays de Loire, Station IFREMER de Bouin,
- Unité de Recherche Aquacole Poitou-Charentes, Station IFREMER de La Tremblade.

### **Résultats attendus :**

1/ Connaissance des ressources génétiques chez une espèce commercialement importante mais non encore génétiquement améliorée. Les résultats obtenus à l'aide des marqueurs génétiques permettront notamment :

- la comparaison des niveaux de variabilité entre populations naturelles et populations introduites. Une restriction de variabilité génétique est possible chez les populations introduites, mais n'a pas été mise en évidence avec les marqueurs allozymiques (ex. (Smith *et al.*, 1986; Child *et al.*, 1995).
- l'estimation des distances génétiques entre populations, permettant d'identifier l'origine et l'évolution des différents stocks exploités dans le monde.

2/ Comparaison des performances des lots testés :

- Comparaisons des lots issus des croisements intra-population, ce qui permettra l'identification de populations pouvant présenter des caractéristiques intéressantes pour l'ostréiculture française.
- Recherche de l'existence d'hétérosis entre populations, par comparaison des performances des lots inter-population avec les lots intra-population, avec un éventuel effet du sens du croisement (Bougrier *et al.*, 1986).

## VI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Boom JDC, Boulding EG, Beckenbach AT (1994). Mitochondrial-DNA variation in introduced populations of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British-Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 1608-1614.
- Bougrier S, Raguene G, Bachere E, Tige G, Grizel H. (1986). Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata* - *C. gigas*. *ICES, C.M. 1986/F* : 38.
- Buroker NE, Hershberger WK, and Chew KK. (1979). Population genetics of the family *Ostreidae*. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Mar. Biol.* 54 : 157-69.
- Child AR, Papageorgiou P, Beaumont AR (1995). Pacific oysters *Crassostrea-gigas* (Thunberg) of possible french origin in natural spat in the british-isles. *Aquatic Conservation - Marine and Freshwater Ecosystem* .5 : 173-177.
- Coleman N (1986). A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. *Technical report N°56*, Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia. 39 pp.
- Comps M, Bonami JR, Vago C, Campillo A. (1976). Une virose de l'huitre portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci. , Paris, Sciences de la vie.* 282 : 1991-1993.
- Grizel H. (1996). Some examples of the introduction and transfer of mollusk populations. *Rev. Sc. Tech. Office Int. Epizooties* 15: 401-408.
- Grizel H and Heral M. (1991). Introduction into France of the japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer* 47 : 399-403.
- Hare MP, Avise JC (1996). Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution* 50 : 2305-2315.
- Hare MP, Karl SA, Avise JC (1996). Anonymous nuclear-dna markers in the american oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol. Biol. Evol.* 13 : 334-345.
- Liu LL, Soong K, and Chen CP. (1995). Allozyme variation in the pacific oyster *Crassostrea gigas* along the coast of Taiwan. *Zool. Stud.* 34 : 177-182.
- Marin F and Dauphin Y. (1991). Diverse alteration in the amino-acid content of the nacreous organic matrices in the black lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in French-Polynesia affected by an epizootic disease. *C. R. Acad. Sci. , Paris, Sciences de la vie.* 312 : 483-488.
- Mathers NF, Wilkins NP, and Walne PR.(1974) Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2 : 93-6.

- Naciri Y, Vigouroux Y, Dallas J, Desmarais E, Delsert C, and Bonhomme F. (1995). Identification and inheritance of (GA/TC) sub(n) and (AC/GT) sub(n) repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4: 83-89.
- Smith PJ, Ozaki H, and Fujio Y. (1986). No evidence for reduced genetic-variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea-gigas* in New-Zealand. *New Zea. J. Mar. Fresh. Res.* 20: 569-574.
- Thiriot-Quievreux C, Pogson GH, and Zouros E. (1992). Genetics of growth-rate variation in bivalves - aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45.
- Zouros E. (1987). On the relationship between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks. *Isozymes: Current Top. Biol. Med. Res.* 15: 255-270.

**ACTION DE RECHERCHE 2 :  
AMELIORATION DE LA QUALITE CHEZ L'HUITRE CREUSE  
CRASSOSTREA GIGAS PAR SELECTION DE SOUCHES PERFORMANTES**

**I- OBJECTIFS DU PROGRAMME.**

Certains bassins ostréicoles, dont le bassin de Marenne-Oléron, présentent une densité très élevée d'huîtres, qui se traduit par une compétition trophique importante et par une dépression générale des performances de croissance. Le but de ce programme est d'étudier les bases physiologiques et génétiques de la croissance, afin d'évaluer les possibilités d'une réponse à ces problèmes par la voie de la sélection de souches présentant une meilleure efficacité d'assimilation. Ses objectifs sont :

- d'étudier les bases physiologiques de la croissance en étudiant la corrélation entre performances de croissance et plusieurs caractères physiologiques (respiration, filtration, excrétion).
- d'étudier la stabilité dans le temps des performances individuelles de croissance et des caractères physiologiques, grâce à plusieurs mesures pendant au moins deux années après fixation.
- d'étudier la relation entre rapidité de croissance ou de développement larvaire et performances de croissance après fixation.
- d'estimer les paramètres génétiques pour la croissance et les caractères physiologiques en étudiant la relation entre les performances d'individus et celles de leur descendance.
- d'étudier la relation hétérozygotie-performances de croissance ou physiologiques en mesurant le taux d'hétérozygotie du génome grâce à des marqueurs microsatellites (supposés sélectivement neutres) ou isoenzymatiques.
- d'étudier les effets du pourcentage de cellules aneuploïdes (auxquelles il manque un ou plusieurs chromosomes) sur les performances de croissance.

**II- MATERIEL BIOLOGIQUE.**

Afin de remplir ces objectifs, le programme s'appuie sur un matériel biologique constitué de quatre populations de captage naturel de la côte Atlantique française (génération G0), et de leurs descendants obtenus et élevés en éclosérie par l'IFREMER (générations G1 et G2).

Les quatre populations ont été choisies pour offrir une base génétique large, et pour représenter les principales zones de captage naturel sur lesquelles s'appuie l'ostréiculture française : bassin d'Arcachon, et bassin de Marenne (Estuaire de la Seudre), Baie de Bonne-Anse et Port des Barques. Le programme prévoit l'étude des performances physiologiques individuelles et de la diversité génétique d'échantillons d'environ 500 huîtres pour chacune des populations de départ.

Cinq individus mâles et cinq individus femelles ont été choisis au hasard dans chacune des populations. Deux types de descendance ont été réalisés à partir de ces géniteurs. La première est une population G1 issue du mélange de tous les croisements possibles entre les 20 mâles et les 20 femelles en proportions équilibrées compte tenu des pourcentages de fécondation pour chacun des 400 croisements biparentaux. Les oeufs mélangés ont été mis en élevage larvaire dans des conditions évitant le plus possible la compétition entre larves de façon à laisser s'exprimer au maximum la diversité génétique pour les performances de croissance larvaire. Quatre "pseudocohortes" de fixation différant pour la rapidité de croissance larvaire ont été obtenues. Les larves ont été fixées sur plaques, ce qui permettait un marquage individuel précoce des animaux, puisqu'ils étaient repérables par leur position sur les plaques. La croissance individuelle a été suivie depuis la fixation jusqu'au détachement à j62 pour 100 individus par pseudocohorte, afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre rapidité de développement larvaire et performances de croissance après métamorphose. Une analyse du taux d'aneuploïdie a été effectuée sur un autre échantillon des quatre pseudocohortes.

Le second type de descendance est constituée de quatre populations G1 issues, pour chacune des populations G0 de départ, du mélange de tous les croisements biparentaux possibles entre les cinq mâles et les cinq femelles choisis. Les larves ont été fixées sur brisure de coquille, ce qui élimine l'étape de détachement, mais ne permet pas de suivi précoce. Un suivi de croissance a été réalisé pour XXX individus de chacune des quatre populations par pesées individuelles hebdomadaires. Le programme prévoit la mesure individuelle des caractères physiologiques et le génotypage microsatellite et isoenzymatique sur le même échantillon, afin de les mettre en relation avec les performances de croissance individuelles. Une analyse du taux d'aneuploïdie est prévue sur un autre échantillon des quatre populations G1.

La génération G2 sera constituée de plusieurs familles issues d'individus des croisements G1 "intra-population" suivis individuellement pour leur croissance et les paramètres physiologiques. En 1997, des individus seront choisis pour leurs performances de croissance, et croisés avec un échantillon du sexe opposé représentatif d'une famille biparentale non apparentée utilisée comme testeur commun. Les familles seront comparées entre elles, au testeur, et à un lot témoin issu du croisement entre le testeur et un échantillon pris au hasard dans la population G1 correspondante. Quinze individus par population seront ainsi testés sur descendance pour trois des quatre populations G1, à cause de contraintes d'écloserie. En 1998, le même protocole sera suivi en choisissant les individus à tester sur descendance pour leurs performances pour les caractères physiologiques étudiés.

Le Tableau 1 indique le calendrier de création et de suivi des différentes populations et familles analysées par ce programme.

### **III- CARACTERISATION DES POPULATIONS G0.**

#### **1- CHOIX DES POPULATIONS.**

Plusieurs populations ont été utilisées comme source de géniteurs afin d'obtenir la base génétique la plus large possible. Les quatre populations choisies représentent les principales zones de captage naturel de la côte Atlantique française (voir Figure 1). Des animaux des quatre origines ont été prélevés chez des ostréiculteurs parmi des lots captés en 1993 et

n'ayant pas subi de tamisage trop sélectif au cours de leur croissance, afin de disposer de toute la variabilité génétique pour les caractères associés à la croissance.

## **2- DISTRIBUTION DES POIDS INDIVIDUELS.**

Les animaux prélevés ont été pesés individuellement, afin d'étudier la distribution des poids individuels au sein de chacune des populations G0 (voir Figure 2 et Tableau 2). Ces distributions sont significativement non-normales à 0.1% ou à 5% (Arcachon). Les distributions s'approchent néanmoins de la distribution normale, sauf pour la population de Bonne Anse, pour laquelle l'hétérogénéité de la courbe pourrait s'expliquer par du surcaptage, et donc la présence de plusieurs années de captage au sein du même lot.

## **3- ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES.**

Les taux de filtration, d'ingestion, d'absorption et d'assimilation ont été mesurés individuellement dans des enceintes avec un flux continu d'eau de mer enrichie en phytoplancton (*Chaetoceros calcitrans*). Le taux de respiration individuel a été mesuré dans une enceinte close par la décroissance de la concentration d'oxygène. Ces mesures ont été corrigées en fonction du poids sec estimé (par l'étude destructive du rapport poids frais/poids sec d'un échantillon des populations), pour tenir compte du grand intervalle des poids représentés. Ceci a permis d'établir la "croissance calculée" pour chacune des huîtres. Le nombre d'individus à tester n'a pas permis de répétitions des mesures.

Les caractéristiques physiologiques ont été mesurées en février 1996 pour 30 individus de chaque population, qui ont ensuite été envoyés à l'écloserie de La Tremblade comme géniteurs. Deux mesures ont été réalisées en Avril et en Juin sur un autre échantillon de 40 individus par population afin d'étudier la stabilité temporelle des caractères étudiés. L'analyse de la stabilité d'une mesure à l'autre est en cours.

Les analyses population par population montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre populations sauf pour le taux de filtration. Dans l'ensemble néanmoins, la population de l'Estuaire de la Seudre semble présenter de meilleures performances physiologiques, en particulier pour le taux d'absorption, sauf pour le taux de respiration. Ceci pourrait provenir de la petite taille moyenne des huîtres de cette population (voir Figure 2), qui seraient en fait âgées d'un an de moins que les huîtres des autres populations.

## **4- GENOTYPAGES ISOENZYMATIQUE ET MICROSATELLITE.**

Le génotype des quarante géniteurs G0 des populations G1 a été déterminé pour dix loci enzymatiques. Le taux d'hétérozygotie moyen est de 0,3 avec en moyenne 2,5 allèles par locus.

Le génotype des quarante géniteurs G0 a également été déterminé pour 3 locus microsateellites. Le nombre d'allèle est très élevé : respectivement 19, 21 et 26 pour les locus Cg44, Cg49 et Cg108. En revanche, on observe un excès en homozygotes très significatif, qui pourrait être expliqué par une structuration des populations (individus voisins apparentés) ou par la présence de nombreux allèles nuls dus à un polymorphisme dans la zone des amorces

PCR utilisées. Néanmoins, la forte diversité génétique au sein du groupe de 40 parents permettra d'identifier les parents de tout individu G1 faisant l'objet d'un suivi particulier.

#### **IV- ETUDE DES QUATRE PSEUDOCOHORTES DE FIXATION G1.**

##### **1- FORMATION DE LA POPULATION G1 D'INTERCROISEMENT INTER-POPULATIONS.**

Cette population provient du mélange après fécondation des oeufs résultant de tous les croisements possibles entre les quarante géniteurs (cinq mâles et cinq femelles de chacune des quatre populations G0). Les gamètes ont été prélevés par scarification de la gonade et leur concentration évaluée par imagerie numérique. Les 400 croisements possibles (20 mâles X 20 femelles) ont été réalisés séparément mais au même moment, par mélange de gamètes mâles et femelles dans une proportion de 100/1 pour éviter la polyspermie. Les taux de fécondation de chacun ont été mesurés par observation microscopique, et les oeufs ont été mélangés dans des proportions identiques.

Les conditions d'élevage ont été modifiées de façon à limiter la compétition entre larves, en abaissant la concentration de 10 à 1 larves/ml en début d'élevage. Contrairement aux pratiques habituelles d'écloserie, il n'y a pas eu de tamisage sélectif au cours de l'élevage larvaire afin de conserver toute la diversité existant pour la rapidité de développement larvaire. A partir de l'apparition des premières larves pédivéligères oeillées, un tamisage sur tamis de 250  $\mu\text{m}$  a été réalisé quatre fois de façon à transférer dans des bacs de fixation les individus de taille supérieure à 315 $\mu\text{m}$ . Ces quatre tamisages ont été réalisés respectivement à j17, j20, j23 et j26, et ont fourni les quatre pseudocohortes de fixation. Chacune rassemble des individus ayant une rapidité de croissance larvaire similaire. On a laissé les larves prélevées sur les tamis dans les bacs de fixation sans limite de durée.

##### **2 - FIXATION SUR PLAQUES ET SUIVI INDIVIDUEL DE CROISSANCE.**

Les larves ont été mises à fixer dans des raceway enduits de parafine, pour éviter la fixation sur les parois du bac, dans lesquelles avaient été placées horizontalement des plaques de PVC enduites de parafine, pour faciliter le détachement ultérieur, puis de gelcoat époxy, pour offrir une surface propice à la fixation. Une fois fixés et métamorphosés sur ces plaques, les individus pouvaient être individualisés par leur position sur la plaque, ce qui a permis, pour 100 animaux par pseudo-cohorte, un suivi individuel hebdomadaire (à partir de j37) de longueur mesurée au pied à coulisse de précision entre la charnière et l'extrémité de la valve supérieure.

Les courbes moyennes de longueur sont significativement différentes lorsqu'elles sont calculées en fonction du temps écoulé après fécondation (voir Figure 3). En revanche, on observe pas de différence significative entre les courbes moyennes calculées en fonction du temps écoulé après fixation (voir Figure 4). Ceci signifie que la rapidité de croissance larvaire n'est pas corrélée aux performances de croissance après fixation. L'analyse des courbes individuelles de croissance en longueur est en cours.

Les animaux suivis ont été détachés à j62 et pesés afin de déterminer la relation d'allométrie longueur/poids. Les coefficients de régression pour les différentes pseudocohortes sont

satisfaisants (voir Tableau 3) : la longueur est un bon estimateur du poids total. Elle est d'autant meilleure que les animaux se sont fixés récemment. Ceci peut être expliqué par le fait qu'au début de la croissance après fixation, le développement se fait le long du support. La croissance en épaisseur ne devient importante que plus tard. Elle n'interfère avec l'estimation du poids par la longueur que pour la pseudocohorte 1 (voir Figure 5).

Un suivi par pesée hebdomadaire de la croissance après détachement était prévu. Il n'a pas pu être réalisé en raison d'importantes mortalités dues au virus herpès survenues à partir de juin 1996.

### **3 - GENOTYPAGE MICROSATELLITE AU STADE LARVAIRE.**

Des échantillons de larves ont été prélevés au moment des quatre tamisages et seront étudiés courant 1997 de façon à déterminer si des différences de fréquences alléliques microsatellites pourraient être associées aux différences de rapidité de croissance larvaire à l'origine des quatre pseudocohortes. Du fait de la très faible quantité d'ADN d'une larve d'huître, un génotypage individuel ne peut être réalisé que grâce aux propriétés amplificatrices d'une réaction PCR, donc grâce aux seuls marqueurs microsatellites. Des études de mise au point de l'amplification d'allèles microsatellites sur larve ont été réalisées au cours de l'année 1996 au laboratoire IFREMER de La Tremblade.

### **4 - TAUX D'ANEUPLOIDIE DES ANIMAUX DES QUATRE PSEUDOCOHORTES DE FIXATION.**

Des fragments de branchies ont été prélevés sur des animaux incubés 6 à 8 heures de nuit dans de l'eau de mer à 0.005% de colchicine. Après fixation sur lame et coloration au Giemsa, le nombre de chromosomes a été compté sur 30 mitoses de chaque animal. Quarante animaux ont été analysés par pseudocohorte, choisis parmi les animaux ne faisant pas l'objet d'un suivi individuel de croissance. Les taux d'aneuploïdie moyens par pseudocohorte sont respectivement de 27, 34, 33 et 28%, ce qui est élevé en comparaison d'autres populations de *Crassostrea gigas* étudiées par ailleurs. Ils sont significativement différents au seuil de 5%, mais ne sont pas classés dans l'ordre des pseudocohortes. Des différences de taux d'aneuploïdie après métamorphose n'expliquent donc pas les différences de rapidité de croissance larvaire à l'origine des pseudocohortes. Il est à noter que tous les animaux présentaient des cellules aneuploïdes, à 19 chromosomes au lieu de 20.

## **V - ETUDE DES QUATRE POPULATIONS G1 D'INTERCROISEMENT INTRA-POPULATION G0.**

### **1 - FORMATION DES QUATRE POPULATIONS G1.**

Chaque population d'origine G0 a fourni cinq géniteurs mâle et cinq géniteurs femelle. Les 25 croisements biparentaux possibles à partir de ces géniteurs ont été réalisés séparément par mélange des gamètes obtenus par scarification de la gonade. Le taux de fécondation a été estimé par observation microscopique, et les oeufs issus des 25 croisements ont ensuite été mélangés en proportions égales. Ainsi, chaque population d'origine G0 est à l'origine d'une population G1, et les quatre populations G1 ont été élevées séparément jusqu'à ce qu'un

marquage individuel par étiquetage soit possible. L'élevage larvaire a été réalisé dans les mêmes conditions que pour l'intercroisement G1 inter-populations (voir ci-dessus). Les larves ont été mises à fixer sur brisures de coquilles. Ce mode de fixation permet d'obtenir des animaux libres, mais ne permet pas de marquage individuel précoce, et donc pas de suivi précoce de croissance. Le jeune naissain a été élevé en raceway sur tamis jusqu'au début des mesures de poids.

## **2 - SUIVIS INDIVIDUELS DE CROISSANCE.**

Les suivis individuels hebdomadaire de croissance par pesée ont commencé à j74, après les épisodes de mortalité massive intervenus à l'écloserie. A cet effet, les animaux choisis ont été placés individuellement dans des logettes en plastique placées sur un tamis dans le raceway d'élevage, jusqu'à ce qu'ils aient atteint une taille suffisante pour être étiquetés individuellement, à j121. Des animaux de la quatrième pseudocohorte fixés sur brisure de coquille à une date similaire ont également été inclus dans ce suivi. En total, sur l'ensemble des cinq lots, le suivi a débuté sur 1215 individus. Compte tenu des mortalités survenues pendant l'été, il restait encore 652 animaux suivis individuellement à j154.

Le taux de croissance calculé entre deux mesures successives a diminué graduellement pour les cinq lots avec le temps (voir Figure 6). Ceci confirme l'importance de disposer de lots ayant exactement le même âge lorsqu'on veut comparer leurs performances de croissance, au moins au stade jeune naissain.

## **3 - CINÉTIQUE DE CROISSANCE PONDERALE.**

Les cinq populations étudiées se classent en deux groupes significativement différents au seuil de 0.1% (voir Figure 7). L'un, à croissance moyenne plus rapide, regroupe les populations G1 de Port des Barques, de Bonne Anse et de l'Estuaire de la Seudre. L'autre regroupe la quatrième pseudocohorte de l'intercroisement inter-populations, et la population G1 d'Arcachon. L'analyse individuelle des courbes de croissance est en cours. Mais les courbes de croissance ont été étudiées par classe de poids final et pour un échantillon provenant du tirage au hasard d'un individu dans chaque classe de poids final. Elles montrent que dans l'ensemble, les courbes de croissance des classes de poids final ne se recoupent pas, non plus que celles d'individus tirés au hasard (voir Figure 8). Les individus les plus gros sont aussi ceux qui poussent le plus vite pendant toute la durée du suivi. Ceci signifie que les classes de poids final découlent de différences de potentiel de croissance plutôt que de différences de poids dues à la variabilité non contrôlée de l'environnement d'élevage avant j74, qui auraient été conservées en l'état après le début du suivi à cause d'un potentiel de croissance identique.

## VI - CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

Les expérimentations menées en 1996 ont répondu aux premières questions qui ont motivé ce programme. Elle ont permis de mettre en évidence l'existence de **variabilité des performances de croissance**, tant au cours de la phase larvaire qu'après fixation, et ont montré que cette variabilité est due à des **différences de potentiel de croissance** entre individus. Il est probable que la variabilité de l'environnement est responsable d'une partie de la variabilité de potentiel de croissance. Mais l'existence de différences significatives et durables entre croisements G1 intra-population (Figure 7) indique que ces différences de potentiel de croissance ont également **une composante génétique**. Ces différences ne sont pas dues à des potentiels de croissance différents entre populations parentales G0, puisque 10 géniteurs ne sauraient donner une représentation convenable de la diversité génétique d'une population sauvage. Elles sont dues aux 10 parents de chaque population : le hasard de l'échantillonnage a entraîné le choix de parents en moyenne moins performants pour la croissance au sein de la diversité présente dans la population d'Arcachon.

Le suivi individuel hebdomadaire de la croissance pondérale de plusieurs centaines d'individus des quatre croisements G1 intra-population et de la quatrième pseudo-cohorte montre, pendant plus de vingt semaines de suivi, la **stabilité des performances de croissance** relatives. Les individus "poussants" et "boudeurs" en début de suivi sont ceux qui seront respectivement "poussants" et "boudeurs" en fin de suivi. Ce résultat est d'une extrême importance pour tout programme de sélection, puisqu'ils signifient que le poids atteint par une huître à taille commerciale peut être **estimé précocement** par les performances de croissance du naissain en quelques mois plutôt qu'en deux à trois ans.

"L'écumage des queues de lot" au cours des tamisages successifs en élevage larvaire est une pratique courante en éclosion commerciale ou expérimentale. Cet écumage pourrait introduire un biais important dans l'estimation ultérieure des performances d'une famille ou d'une population à tester. **L'absence de différences significatives entre les quatre pseudo-cohortes de fixation**, pour les performances de croissance précoces après fixation, indique que cet écumage ne conduit pas à l'élimination des individus les moins poussants, ce qui semblerait indiquer que le biais introduit par cette pratique reste compatible avec les expérimentations.

Le suivi individuel de croissance réalisés hebdomadairement pendant plus de vingt semaines, et qui est poursuivi actuellement, donne **une évaluation précise des performances de croissance** de 652 animaux des quatre croisements G1 intra-population et de la quatrième pseudocohorte. Il est possible de subdiviser cet échantillon en plusieurs lots contenant un éventail de niveaux de performances de croissance, afin de tester leur relation avec des paramètres physiologiques et génétiques. Ces expériences sont prévues en 1997 et en 1998 (cf. Tableau 1) :

- pour trois des cinq populations G1 suivies, plusieurs individus suivis individuellement en croissance en 1996 seront croisés avec un seul individu "testeur" du sexe opposé, pour fournir autant de familles biparentales G2. Les performances de croissance de ces familles seront étudiées et mises en relation avec celles de leur géniteur sélectionné, afin d'évaluer la part génétique, donc transmissible à la descendance, au sein de la variabilité observée.

- pour chaque population, on analysera la physiologie individuelle de plusieurs individus suivis individuellement en croissance en 1996. Les niveaux d'activité physiologique observés à trois reprises au cours de l'année 1997 seront mis en relation avec les performances de croissance. Des géniteurs seront tirés de cet échantillon pour étudier la transmission de leurs performances physiologiques à leur descendance G2.

- le suivi individuel de croissance sera poursuivi une seconde année afin de vérifier la stabilité dans le temps des performances de croissance des individus les uns par rapport aux autres.

Plusieurs centaines d'individus de chaque croisement intra-population G1 ont été maintenues en grossissement à la nurserie de Bouin dans des conditions de faible variabilité environnementale. Leur poids final est donc probablement fortement corrélé à leur potentiel de croissance, comme pour les individus suivis individuellement à La Tremblade. Il est donc également possible d'étudier les bases physiologiques de la croissance à partir de ces individus.

- un échantillon représentant l'ensemble de la variabilité de poids final de trois des quatre croisements G1 intra-population sera réparti dans trois bacs d'élevage recevant la même quantité de phytoplancton et le même débit d'eau neuve, mais contenant trois quantités différentes de compétiteurs trophiques (d'autres huîtres). Cette expérience permettra d'étudier la stabilité des performances de croissance antérieures, estimées par le poids final des individus, en fonction du niveau trophique du milieu.

- Un autre échantillon du même type sera mis en élevage dans l'étang de Thau, dans des conditions de température, de qualité d'eau et de nourriture très différentes de la station de Bouin. Cette expérience permettra d'étudier l'influence sur la croissance d'autres facteurs que le niveau trophique.

	Réalisations 1996.	Prévu en 1997.	Prévu en 1998.
Populations G0 : Arcachon Port des Barques Baie de Bonne Anse Estuaire de la Seudre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtention des populations.</li> <li>- Etude de la distribution des poids.</li> <li>- Choix des géniteurs pour la génération G1.</li> <li>- Performances physiologiques des géniteurs et d'autres individus.</li> <li>- Génotypage microsatellites et isoenzymatique des géniteurs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Génotypage isoenzymatique des autres individus suivis en physiologie.</li> </ul>	
Population G1 issue d'intercroisement :  4 pseudocohortes de fixation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réalisation des 400 croisements et élevage larvaire.</li> <li>- Obtention des 4 pseudocohortes de fixation.</li> <li>- Suivi de croissance individuelle sur plaques après fixation.</li> <li>- Taux d'aneuploïdie des 4 pseudocohortes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse microsatellite des stades larvaires des 4 pseudocohortes.</li> </ul>	
Populations G1 issues de croisements intra-population : Arcachon Port des Barques Baie de Bonne Anse Estuaire de la Seudre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réalisation des 100 croisements et élevage larvaire des quatre populations.</li> <li>- Suivi de croissance individuelle (1ère année) par pesée hebdomadaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse microsatellite et isoenzymatique d'une partie de l'échantillon.</li> <li>- Suivi de croissance individuelle (2d année).</li> <li>- Performances physiologiques des individus suivis en croissance.</li> <li>- Performances de croissance en fonction du niveau d'apport trophique.</li> <li>- Taux d'aneuploïdie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse microsatellite et isoenzymatique d'une partie de l'échantillon.</li> </ul>
Familles G2 issues de géniteurs choisis pour leurs performances de croissance		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Création des familles.</li> <li>- Suivi de croissance familiale (1ère année).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suivi de croissance familiale (2d année).</li> </ul>
Familles G2 issues de géniteurs choisis pour leurs performances physiologiques			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Création des familles.</li> <li>Suivi de croissance familiale (1ère année).</li> </ul>

Tableau 1 : Calendrier du programme et opérations déjà réalisées.

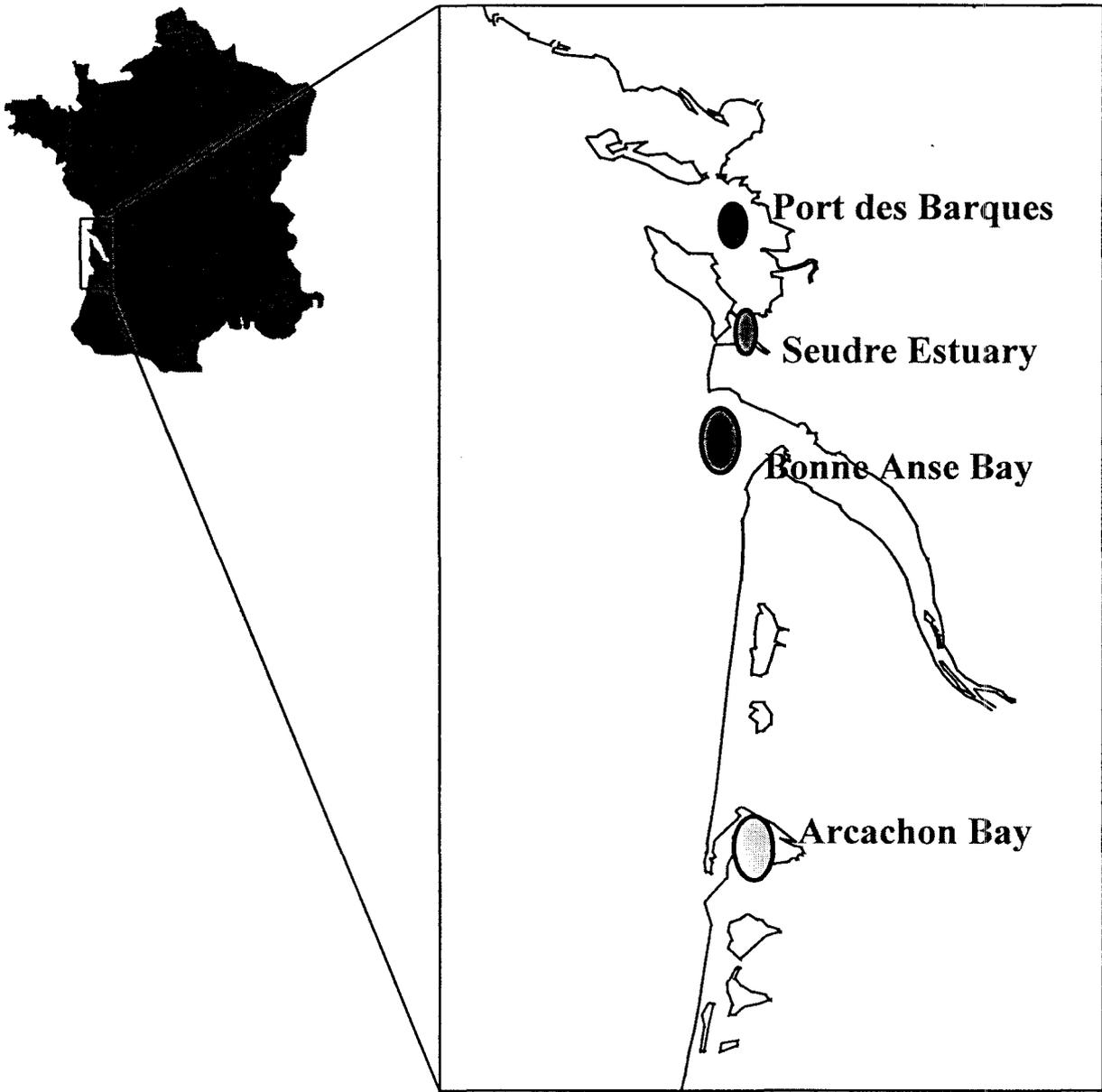


Figure 1 : Origine géographique des quatre populations G0.

population	effectif	poids moyen (g)	écart-type	poids min (g)	poids max (g)	Test de Non Normalité
Seudre	577	34,4	11,2	15	75	0,0001
Port des Barques	586	107,7	13,3	70	185	0,0001
Bonne Anse	501	64,7	22,2	30	145	0,0001
Arcachon	596	87,5	13,2	50	130	0,0422
<b>Total</b>	<b>2260</b>	<b>73,58</b>	<b>14,98</b>	<b>15</b>	<b>185</b>	

Tableau 2 : distribution des poids totaux individuels au sein des quatre populations G0.

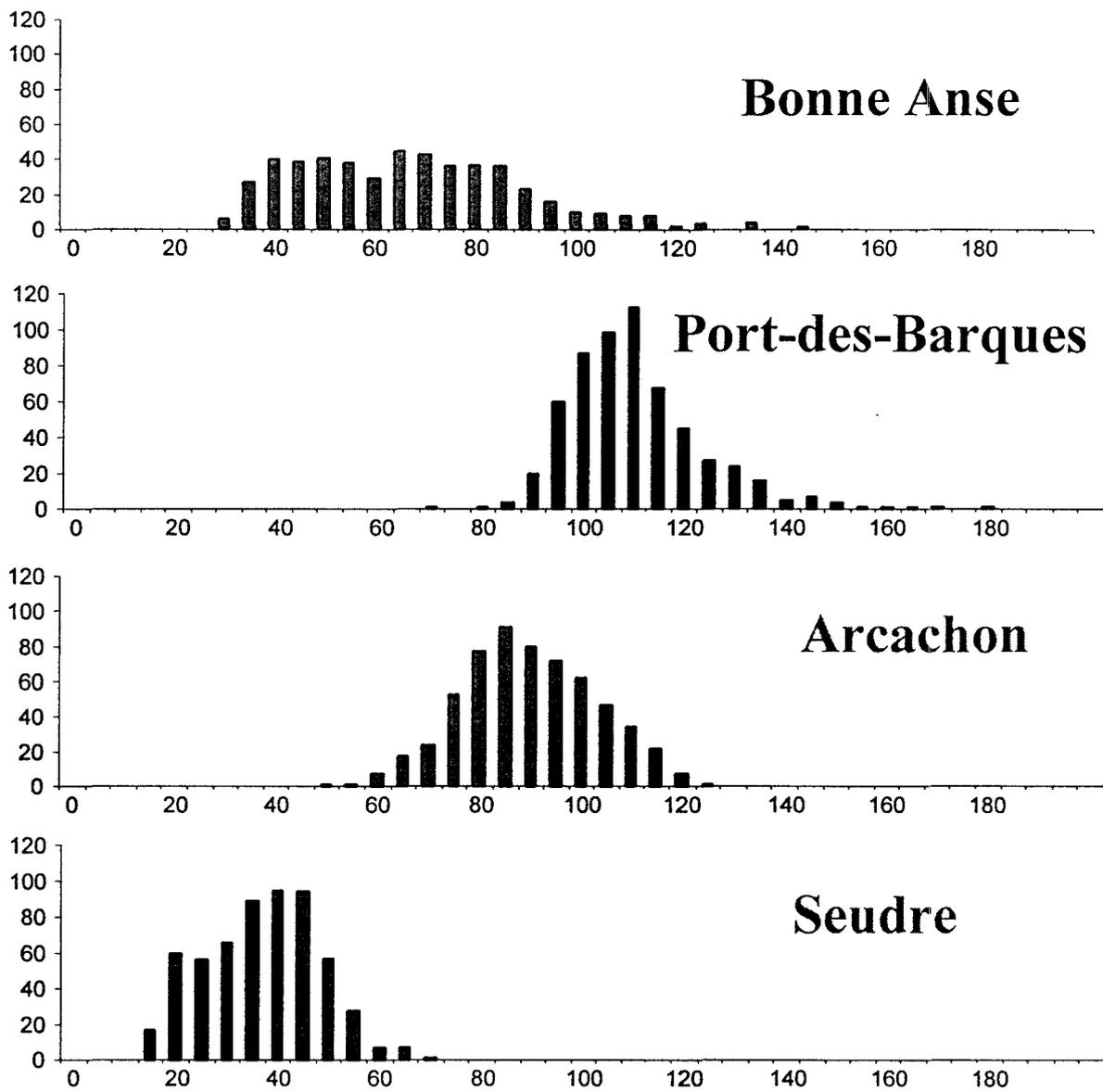


Figure 2 : Histogramme des poids totaux (g) des quatre populations françaises de géniteurs

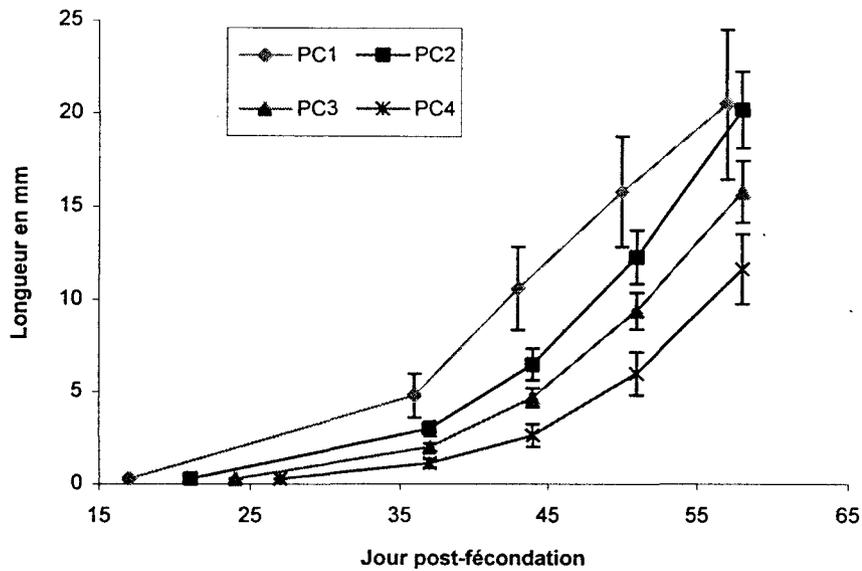


Figure 3 : pseudo-cohortes de fixation : moyenne et écarts-types de la longueur des individus mesurée avant détachement, en fonction du nombre de jours après fécondation.

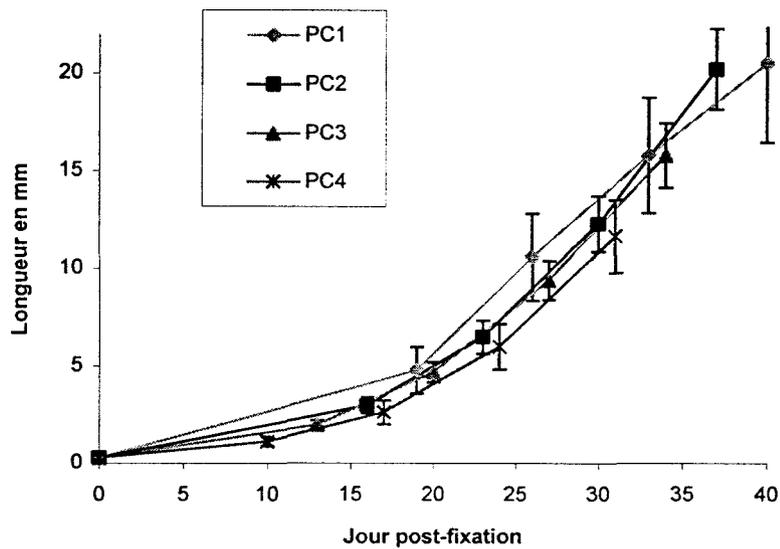


Figure 4 : pseudo-cohortes de fixation : moyenne et écarts-types de la longueur des individus mesurée avant détachement, en fonction du nombre de jours après fixation.

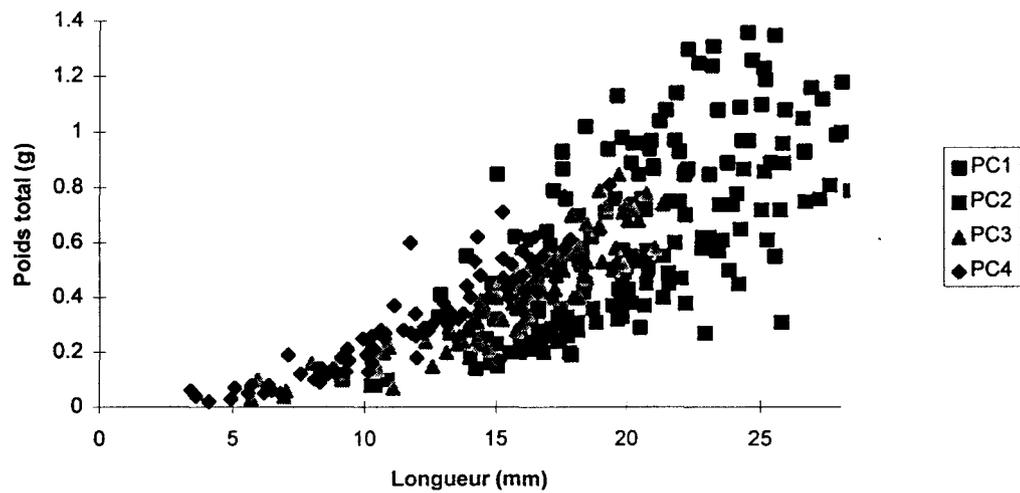


Figure 5 : allométrie longueur-poids total des individus des quatre pseudo-cohorte de fixation à j62.

pseudo-cohorte	R <sup>2</sup>	niveau de significativité	Equation de la courbe
1	0.52	0.0001	$y=0.072 x -0.63$
2	0.77	0.0001	$y=0.050 x -0.56$
3	0.80	0.0001	$y=0.050 x -0.36$
4	0.81	0.0001	$y=0.046 x -0.23$

Tableau 3 : Régression linéaire de l'allométrie longueur-poids total des quatre pseudo-cohortes à j62.

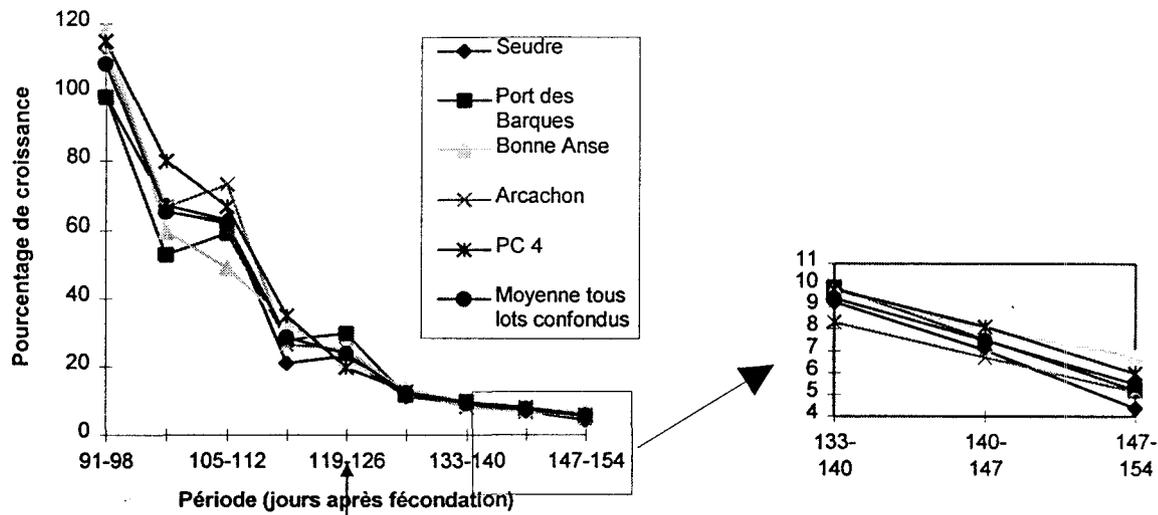


Figure 6 : Taux de croissance moyen entre deux mesures pour les cinq populations étudiées en fonction de leur âge.

### Marquage

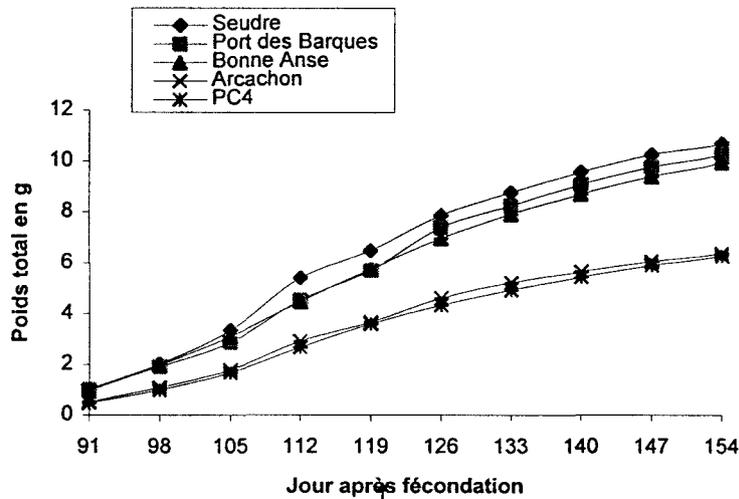
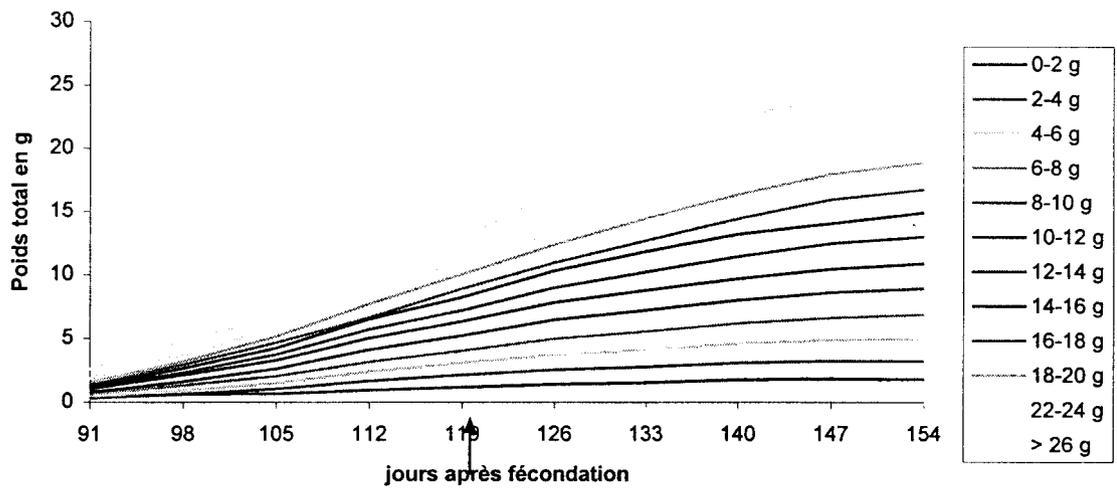
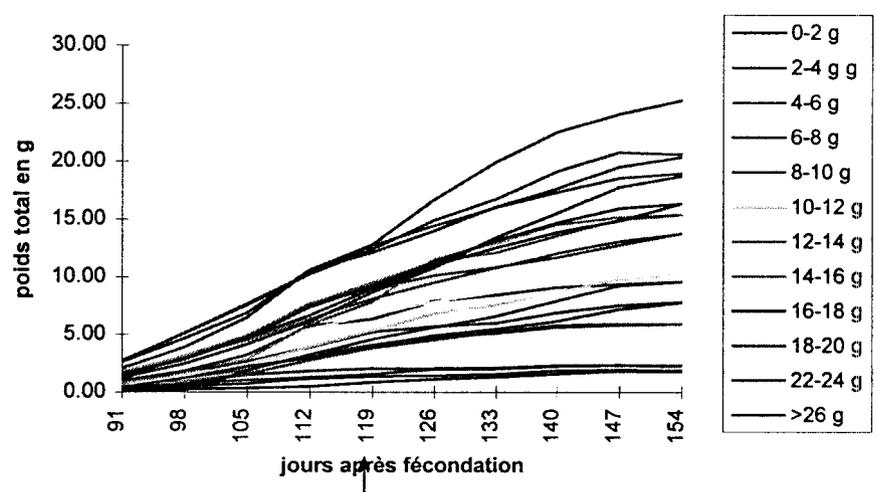


Figure 7 : poids moyen (g) des individus des quatre populations G1 issues de croisements intra-population G0, et de la pseudo-cohorte 4, en fonction du temps.



a- Marquage



b- Marquage

Figure 8 : a- courbe de croissance moyenne des individus appartenant à la même classe de poids total à j154. b- courbe de croissance de quelques individus choisis au hasard au sein de chaque classe de poids total à j154.