



La Dynamique Atlantique



R É G I O N
P O I T O U - C H A R E N T E S

Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998
Convention 98 RPC-R-8 "Génétique"

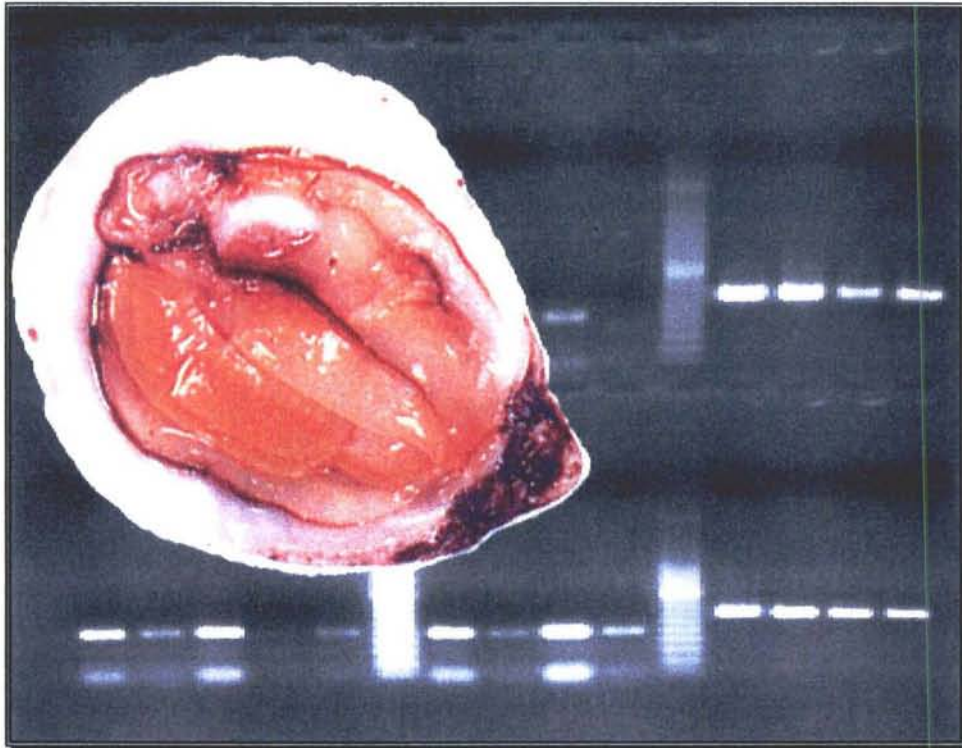
IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Action de recherche 1 :

Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* :
hybridation et conservatoire de souches

Synthèse finale

P. Boudry, S. Heurtebise, A. Huvet, B. Chollet, C. Ledu, P. Phélipot, A. Gérard



Laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie
BP 133 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tel. 05 46 36 98 36

Fax. 05 46 36 37 51

SOMMAIRE

I. ACTIONS MENEES DE 1994 A 1998 AU SEIN DU CONSERVATOIRE DE SOUCHES.....	4
1. Résultats des importations, acclimatation et hybridation.....	4
a) Rappel des conditions d'introduction de nouvelles souches	4
b) Fiches synthétiques des différentes espèces importées au sein du conservatoire de souches (extrait du rapport 1994).....	5
c) Principales importations réalisées depuis 1994	19
d) Contrôles sanitaires avant et après importations	20
e) Croisements réalisés au cours des 5 années	23
f) Comparaison des taux de fécondation inter-spécifiques.....	26
g) Inventaire du conservatoire en fin de saison 1998.....	29
h) Conclusions	29
II. RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES ET DE POPULATIONS	31
1. Objectifs.....	31
2. Méthodologies.....	31
2.1. Matériel biologique.....	31
2.2. Extraction de l'ADN.....	33
2.3. Amplification PCR.....	33
2.3.1 Marqueurs mitochondriaux.....	33
2.3.2 Marqueurs microsatellites.....	34
2.4. Digestions par des enzymes de restriction	34
2.5. Electrophorèse.....	35
2.5.1 Fragments mitochondriaux.....	35
2.5.2 Microsatellites.....	35
3. Résultats.....	35
3.1. Marqueurs mitochondriaux	35
3.1.1 Amplification	35
3.1.2 Polymorphisme de longueur de fragments de restriction.....	36
3.2. Marqueurs microsatellites	41
3.2.1 Polymorphisme et hétérozygotie	41
3.2.2 Variabilité inter-populations	42
3.2.3 Différentiation <i>Crassostrea Gigas</i> – <i>Crassostrea Angulata</i>	43
4. Applications et transferts envisageables.....	44
5. Conclusion.....	45
III. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES LIEES A CETTE ACTION DE RECHERCHE.....	47
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	48

Introduction : rappel du contexte professionnel et des objectifs scientifiques du programme

L'histoire de l'ostréiculture est émaillée, en France ainsi que dans de nombreux autres pays, d'une succession de phases de développement, de surexploitation et d'apparition de maladies qui perturbent fortement les productions et conduisent parfois à adapter de nouvelles techniques d'élevage après introduction d'espèces non-indigènes. Ces événements historiques montrent la nécessité d'aménager les bassins conchylicoles afin d'éviter à la fois la surexploitation et la fragilisation des cheptels vis à vis des agents pathogènes.

Depuis la disparition massive de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, victime entre 1969 et 1971 d'une épidémie virale, et de l'effondrement de l'élevage de l'huître plate, *Ostrea edulis*, l'ostréiculture française connaît actuellement une situation de monoculture de l'huître *Crassostrea gigas*, suite à l'introduction massive de l'espèce entre 1971 et 1975 (Grizel et Héral, 1991). Or, en Amérique du Nord deux maladies ont déjà été identifiées sur *C. gigas* : le *Mikrocytos mackini* (protozoaire) et l'O.V.V.D. (Oyster Velar Virus Disease, virus s'attaquant uniquement aux larves) (Elston et Wilkinson, 1985). Ces maladies n'ont pour l'instant pas été signalées en France, mais leur introduction accidentelle pourrait avoir des conséquences catastrophiques sur l'ostréiculture française. Cette situation serait d'autant plus grave que la situation de monoculture, les fortes densités d'élevage couramment pratiquées, ainsi que les transferts fréquents d'une région ostréicole à l'autre, provoqueraient une extension fulgurante de la maladie.

Face à ce danger potentiel, trois attitudes prévalent:

1. Le contrôle zoosanitaire des importations (objet des directives européennes et mission des services vétérinaires).
2. La recherche d'outils de diagnostic adaptés pour effectuer des contrôles zoosanitaires fiables.
3. La recherche de nouvelles "souches" ou d'espèces de remplacement dans le cas d'une éventuelle épizootie grave sur l'huître creuse *C. gigas*.

Le laboratoire IFREMER "Génétique et Pathologie" (LGP, La Tremblade) a donc entrepris des actions de recherche sur ces différents points. Le LGP en collaboration avec tous les membres du Réseau Génétique Mollusques (REGEMO), a axé une partie de ses travaux sur l'acclimatation et l'hybridation de différentes espèces du genre *Crassostrea*. Ces recherches ont débuté avec le soutien du Conseil Général de Charente-Maritime depuis 1992 sur des essais d'acclimatation de *C. virginica*, l'huître creuse américaine. En prolongement de cette étude, le LGP a proposé à la région Poitou-Charentes un programme de recherche plus vaste sur l'ensemble des espèces d'huîtres creuses.

Dans cette optique, nous proposons de réaliser au cours des 5 années du programme :

Une revue bibliographique des différentes espèces d'huîtres creuses vivant dans le monde et leurs potentialités en terme de diversification des productions locales. Cette revue a été présentée dans le rapport 1994 sous forme de fiches synthétiques, présentant les principales caractéristiques biologiques et écologiques des espèces,

leurs distributions géographiques, les formes d'exploitation commerciale, les possibilités de croisements inter-spécifiques et les maladies identifiées.

Des essais d'acclimatation de quelques espèces choisies en fonction de cette recherche bibliographique et des possibilités d'importation d'huîtres indemnes de tout agent pathogène. Ceci suppose des examens pathologiques préalables, qui ont été pris en charge par le LGP de La Tremblade, conformément aux recommandations d'importation du C.I.E.M (Conseil International d'exploitation de la Mer).

Des croisements intra-spécifiques et des élevages comparatifs réalisés en milieu fermé (salle de quarantaine avec stérilisation des eaux de rejet) dans l'optique d'identifier les espèces susceptibles d'être acclimatées aux conditions d'élevage en métropole.

Des croisements inter-spécifiques visant à contrôler le confinement génétique des nouvelles espèces acclimatées, ainsi que les performances (croissance, fertilité) des hybrides éventuellement obtenus.

Une étude génétique des populations naturelles et cultivées de *C. gigas* visant à définir la structuration génétique de ces populations et la différenciation des stocks, et de tester certaines populations pour rechercher des caractéristiques originales susceptibles d'améliorer les performances d'élevage de *C. gigas* en France. A plus long terme, ces informations permettront de définir une politique de gestion des ressources génétiques de l'espèce.

Une recherche de marqueurs moléculaires pour caractériser les populations et les espèces. Il s'agit de marqueurs de l'ADN nucléaire hyper-variables (de type microsatellite) pour la discrimination fine des populations, ou de l'ADN mitochondrial pour la distinction entre espèces.

I. ACTIONS MENEES DE 1994 A 1998 AU SEIN DU CONSERVATOIRE DE SOUCHES

1. Résultats des importations, acclimatation et hybridation.

a) Rappel des conditions d'introduction de nouvelles souches.

L'importation de toute espèce est conditionnée par les résultats d'une enquête préliminaire dont l'objet est de rechercher les exigences écologiques de l'espèce et la situation épidémiologique dans son milieu d'origine.

Le travail du LGP et de ses partenaires a été partagé en différentes actions :

1. Recherche de contacts dans divers pays étrangers, en vue de l'importation d'huîtres présentant des caractéristiques intéressantes.
2. Importation : L'importation se fait selon les normes du CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer) : contrôles pathologiques sur les lots d'animaux importés, confinement en salle de quarantaine des géniteurs avec stérilisation systématique des eaux de rejet, sacrifice des géniteurs après la production de la première génération.
3. Production d'une première descendance : La ponte est également réalisée en salle de quarantaine. Des contrôles pathologiques auront lieu tout au long de l'élevage.
4. Contrôle des performances : ils se font, dans un premier temps, **uniquement au laboratoire avec stérilisation des eaux de rejet**. Cette caractérisation intègre différentes approches : résistance aux parasites présents dans le milieu français, caractères quantitatifs (poids, taille, rendement, vitesse de croissance), polymorphisme enzymatique ou ADN, tests physiologiques (mesure de la respiration, du rendement d'assimilation...).
5. Hybridation : Des hybridations entre espèces ont été tentées, avec contrôle par marqueurs génétiques.
6. Conservatoire de souches : Les générations F1 des différentes espèces ont systématiquement été conservées. Une salle a été spécialement équipée au LGP dans cet objectif.

b) Fiches synthétiques des différentes espèces importées au sein du conservatoire de souches (extrait du rapport 1994).

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *angulata* (Lamarck, 1819)

Synonymes : *C. gigas* (voir Mathers et al. 1974; Buroker et al. 1979)

Distribution géographique : Portugal, sud de l'Espagne, introduite en France accidentellement en 1868.

Exploitation commerciale : importante jusqu'à l'infestation de l'espèce par un iridovirus (début des années 1970).

Maladies : Iridovirus

Croisements inter-spécifiques : inter-fertilité complète avec *C. gigas*.

Remarques : Le statut d'espèce de *C. angulata* reste incertain en raison de son inter-fertilité complète avec *C. gigas*.

Références bibliographiques :

Boudry P., S. Heurtebise, B. Collet, F. Cornette & A. Gérard (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **226**: 279-291.

Bougrier S., G. Raguene, E. Bachère, G. Tige & H. Grizel (1986). Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata* - *C. gigas*. International Council for the Exploration of the Sea. Comité Mariculture : F: 38.

Buroker NE., WK. Hershberger & KK. Chew (1979). Population genetics of the family *Ostreidae*. II. interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine Biology* **54**: 171-184.

Comps M., JR. Bonami, C. Vago & A. Campillo (1976). Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci., Paris, Sciences de la vie* **282**: 1991-1993.

Michinina SR. & L. Rebordinos (1997). Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **154**: 167-174.

Mathers NF., NP. Wilkins & PR. Walne (1974). Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem. syst. Ecol.* **2** : 93-96.

Menzel RW. (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board Canada* **31**: 453-455.

O'Foighil D., PM. Gaffney, AE. Wilbur & TJ. Hilbish (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.* **131**: 497-503.

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gasar* (Adanson)

Synonymes : *Gryphea gasar* (Adanson), *C. tulipa* (?)

Distribution géographique : Afrique occidentale : Sénégal, Gambie, Gabon, Guinée, Sierra Leone, Dahomey...

Exploitation commerciale : Sénégal

Maladies : Polydora...

Remarques : *C. tulipa* est parfois considérée comme synonyme de *C. gasar* (Afrique de l'ouest) et parfois de *C. rhizophorae* (Golf du Mexique).

Références bibliographiques :

- Afinowi MA.** (1976). The biology of *Anadara sebsilis* and *Gryphaea gasar* (= *Crassostrea gasar*) in west african waters. *Comm. Inland Fish. Afr., Tech Rep. 4* (1): 386-406.
- Ajana A.** (1979). Preliminary investigation into some factors affecting the settlement of the larvae of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* (Adanson) in the Lagos lagoon. *Malacologia* **18**: 271-275.
- Blanc C.** (1962). Etude de l'huître des paletiviers (*Gryphaea gasar* Adanson). *Oceanogr. Peches Mar. Min. Dev. Rural, Repub. Senegal, docu. serv. 76* pp.
- Blanc C.** (1970). Rapport sur la situation de l'ostreiculture au seuil du III plan et sur l'huître des palétuviers. *Oceanogr. Peches Mar. Min. Dev. Rural, Repub. Senegal, docu. serv. 31* pp.
- Demarcq H. & G. Demarcq** (1992). The *Crassostrea gasar* (Bivalvia) Biostrome of the Holocene from THE HOLOCENE FROM Sine-Saloum (Sénégal) – New data and ecostratigraphical interpretation. *Geobios* **25**(2): 225-250.
- Gilles S.** (1992). Observations sur le captage et la croissance de l'huître creuse ouest-africaine, *Crassostrea gasar*, en Casamance, Sénégal. In : Les mollusques marins, biologie et aquaculture. IFREMER, Actes de colloques **14**: 71-88.
- Kamara AB.** (1982). Preliminary studies to culture mangrove oysters, *Crassostrea tulipa*, in Sierra Leon. *Aquaculture* **27**: 285-294.
- More P, MT. More, MR. Monnet & J. Poisbeau** (1971). Electrophorese en gel de polyacrylamide des protéines solubles de la partie transparente du muscle aducteur de cinq especes d'ostreidae. interet taxonomique. *C.R. acad. Sci. Paris, ser. D vol. 273*: 222-225.
- Sandison EE.** (1966). The effect of salinity fluctuations on the life cycle of *Gryphaea gasar* in Lagos harbor, Nigeria. *J. Anim. Ecol.* **35**: 379-389.

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gigas* (Thunberg, 1793)

Noms vernaculaires : Pacific oyster, huître japonaise

Synonymes : *C. angulata* (Lamarck, 1819) (voir Mathers et al. 1974; Buroker et al. 1979); *O. gigas*; *O. laperousi*; *O. talienwhanensis*, *C. laperousii* (Schrenck).

Distribution géographique : distribution naturelle : Japon (de Hokkaido à Kyushu : 30-45° de latitude Nord); "présente" (naturelle ou naturalisée ?) le long des côtes de Primorsky Kraï à la péninsule de Corée, la Chine et le sud-est asiatique; importée puis naturalisée dans de très nombreuses régions du monde.

Exploitation commerciale : très importante

Caractéristiques biologiques :

- **Conditions de maturation** (°C) : 18-20 (16-22)
- **Taille des œufs** (µm) : 55
- **Stade/taille** (µm) **larvaire à la ponte** : 55
- **Durée de la phase planctonique** : 20 jours à 25 °C
- **Taille larvaire à la fixation** (µm) : 300
- **Taille maximale adulte** (mm) : 300

Caractéristiques écologiques :

- **Salinité** (ppm) : 10-42 (35)
- **Température** (°C) : 3-35 (optimal : 11-34)
- **Profondeur** : intertidale à subtidale.
- **Turbidité** : supporte des turbidités relativement fortes.

Maladies : virus : Oyster Velar Virus, Disease (OVVD), herpes virus-like, Nocardia (bactérie), riketsioses...

Croisements inter-spécifiques : croisements possibles avec *C. sikamea*, *C. rivularis*. Inter-fertilité complète avec *C. angulata*.

Références bibliographiques :

- Barille I, J. Prou, M. Heral & S. Bourgrier.** No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1993 vol.171(1): 91-106.
- Buroker NE, WK. Hershberger & KK. Chew** (1979). Population genetics of the family Ostreidae. II. interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.* Vol. 54: 171-184.
- Mathers NF., NP. Wilkins & PR. Walne** (1974). Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem. syst. Ecol.* vol. 2 : 93-96.

- Orlenko AN.** (1994). The acclimatization of giant oyster *crassostrea-gigas* (*bivalvia*, *mytiliformes*, *crassostreidae*) and the principal stages of its introduction in the black-sea. *Zoologichesky zhurnal* vol.**73** (1): 51-54
- Raillard O, JM. Deslouspaoli, M. Heral & D. Razet** (1993). Modeling growth and feeding of the japanese oyster *crassostrea-gigas* in marennes-oleron bay (france). *Oceanologica acta* 1993 vol.**16** (1): 73-82
- E. His & MNL. Seaman** (1992). Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.* vol.**114** (2): 277-279
- E. His & D. Maurer** (1988). Shell growth and gross biochemical-composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture* vol.**69** (1-2): 185-194.
- Nell JA. & JE. Holliday** (1988). Effects of salinity on the growth and survival of sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture* vol.**68** (1): 39-44.
- Dinamani P.** (1987). Gametogenic patterns in populations of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in northland, new-zealand. *Aquaculture* 1987 vol.**64** (1): 65-76.
- Dolgov LV.** (1984). Sex determination in juveniles of pacific oyster *crassostrea-gigas* thunberg from pioneer and quasistationary populations. *Biol. Morya* 1984 **4**: 45.
- Seaman MNL.** (1991). Survival and aspects of metabolism in oysters, *crassostrea-gigas*, during and after prolonged air storage. *Aquaculture* 1991 vol.**93** (4): 389-395.
- Gerdes D.** (1983). The pacific oyster *crassostrea-gigas* .2. Oxygen-consumption of larvae and adults. *Aquaculture* 1983 vol.**31** (2-4): 221-231.
- Gerdes D.** (1983). The pacific oyster *crassostrea-gigas* .1. Feeding-behavior of larvae and adults. *Aquaculture* 1983 vol.**31** (2-4): 195-219.
- Buroker NE.** (1983). Sexuality with respect to shell length and group-size in the japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* vol.**23** (2): 271-279.

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *rhizophorae* (Guilding, 1928)

Nom vernaculaire : Mangrove oyster, Purto Rican oyster

Synonymes : *C. brasiliensis*

Distribution géographique : Mer des Caraïbes (Iles et côtes de l'Amérique du Sud : Martinique, Jamaïque, Haïti, Cuba...)

Exploitation commerciale : populations naturelles, aquaculture (Cuba)

Caractéristiques biologiques :

- **Conditions de maturation** (°C) : 25°C; mâle : 10 mm; femelle : 25 mm.
 - **Croissance** : 50 à 80 mm en 5 à 6 mois
 - **Taille maximale adulte** (mm) : 60-80 (une des plus petites huîtres du genre *Crassostrea*)
- Hermaphrodite protandre; ovipare.

Caractéristiques écologiques :

- **Salinité** (ppm) : 5-20; 18-32; 22-40; 27-47 (pH : 7,7 à 8,3)
- **Température** (°C) : 23-29.
- **Profondeur** : intertidale (attachée aux racines des mangroves)

Maladies : *Chicoreus breviformis*, *Thais haemastoma*, *Cymatium* (= *Monoplex*) *parthenopneum*...

Croisements inter-spécifiques : croisements avec *C. virginica*, espèce considérée comme très proche (Menzel, 1969). Croisements avec *C. gigas* ? (Menzel, 1969).

Tentatives d'introduction en France en 1976 (ISTPM : La Trinité-sur-mer, la Tremblade, Arcachon) : Mortalité totale en hiver, apparemment due aux températures trop basses pour l'espèce (Maurin et Gras, 1979) .

Références bibliographiques :

Castro EM., JA. Montoya, RQ. Quesada, OP. Urpi & EZ. Madriz (1985). Population-structure and size distribution of the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*, guilding 1828) in limon, costa-rica. *Revista de biologia tropical* 1985, **33** (1): 61-62.

Castro EM., OP. Urpi, EZ. Madriz, RQ. Quesada & JA. Montoya (1985). Filtration-rates in the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*, guilding 1828), at different salinities and temperatures. *Revista de biologia tropical* 1985, **33** (1): 77-79.

Fernandes MEB. (1991). Tool use and predation of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) by the tufted capuchin, *cebus apella apella*, in brackish water mangrove swamp. *Primates* 1991, **32** (4): 529-531.

- Lemos MBN., IA. Nascimento, MMS. Dearaujo, SA. Pereira, I. Bahia & DH. Smith** (1994). The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *J. shellfish Res.* 1994, **13** (1): 187-192.
- Littlewood DTJ.** (1989). Predation on cultivated *Crassostrea rhizophorae* (goulding) by the gastropod *Cymatium pileare (linnaeus)*. *Journal of molluscan studies* 1989, **55** (Feb): 125-127
- Mandelli E. & A. Acuna** (1975). The culture of the mussel, *Perna perna*, and the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in venezuela, *Mar. Fish. Rev.* **37**: 15.
- Mattox WT.** (1949). Studies on the biology of the edible oyster *Ostrea rhizophorae* (goulding) in puerto rico. *Ecol. Monogr.*, **19**: 339.
- Maurin C. & P. Gras** (1979). Experiments on the growth of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* in france. *In: exotic species in mariculture*, Mann R.(ed.). Mit press, Cambridge, Ma USA..123-128.
- Montoya JA., RQ. Quesaada, EZ. Madriz, EM. Castro & OP. Urpi.** (1985). Comparative-analysis of substrates for collection of mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*, goulding 1828) spat in estero Vizcaya, Limon, Costa-Rica. *Revista de biologia tropical* 1985 , **33** (1): 1-6.
- Menzel RW.** (1969). Cytotaxonomy of clams (*Mercenaria*) and oysters (*Crassostrea*). Symposium on mollusca, marine biology association, india pt. 1, 75-84.
- Pena JC, EZ. Madriz & OP. Urpi.** Marketable size of the raft-cultured mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* (goulding, 1828) in estero Viscaya, Limon, Costa-Rica. *Revista de biologia tropical* 1983, **31** (2): 257-261.
- Quesada RQ, EM. Castro, JA. Montoya, OP. Urpi & EZ. Madriz** (1985). Growth and survival of the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*, goulding 1828) transferred from estero Vizcaya, (Caribbean coast) to shrimp culture tanks in chomes (pacific coast), Costa-Rica. *Revista de biologia tropical*, **33** (1): 7-12.

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *rivularis*

Noms vernaculaires : Sumino oyster

Synonymes : *O. discoidea* (Awiti et Rai, 1931), *O. rivularis*, *C. discoidea*, *C. ariakensis* (Fujita).

Distribution géographique : Inde (Kutch creek, Aramda creek, Poshetra point, Port Okha, Gujarat, Maharashtra), Côtes du Pakistan, Chine, Japon (Cahn, 1950; Imai, 1977); Nouvelles Hébrides, Phillipines, Bornéo, Java, Ile Maurice.

Exploitation commerciale : Tentatives d'élevage en Malaisie; production commerciale en Chine : région de Guangdong).

Caractéristiques biologiques :

- Taille maximale adulte (mm) : 150 (cf. Rao)

Croisements inter-spécifiques : avec *C. gigas* : 1,2 à 7,2 % de fertilisation mais pas de larves viables (Imai et Sakai, 1961), confirmation d'obtention d'hybrides *C. gigas* (femelle) x *C. rivularis* (mâle) par marqueurs enzymatiques, le croisement réciproque ne donnant pas de larves viables (Allen & Gaffney, 1993).

Références bibliographiques :

Allen SK. & PM. Gaffney (1993). Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (thunberg) and *Crassostrea rivularis* (gould). *Aquaculture* **113**(4): 291-300.

Amemiya I. (1928). Ecological studies of japanese oysters with special reference to the salinity of their habitats. *J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo* vol. **9**: 333-382.

Ahmed M. (1971). Oyster species of west pakistan. *Pak. J. Zool.* Vol. **3**: 229-236.

Asi M. (1979). Hermaphroditism and sex reversal in the four common oviparous species of oysters from the coast of karachi. *Hydrobiologia* vol. **66**: 49-55.

Bresse WP. & RE. Malouf (1977). Hatchery rearing techniques for the oyster *Crassostrea rivularis* gould. *Aquaculture* vol. **12**: 123-126.

Cahn AC. (1950). Oyster culture in japan. Publ by gen. H.q. Supreme commandezr for the allied forces nat. *Ressourc. Sect. Rept.* **134**: 80, Tokyo.

Gaffney P.M. & SK. Allen (1993). Hybridization among *Crassostrea* species - a review. *Aquaculture* **116**(1): 1-13.

Imai T. (1977). Chapt. I. Biological research on the oyster. In : aquaculture in shallow seas : progress in shallow sea culture. Translated from japanese, oxford & i bh publishing co., *New dehli*, pp. 125-126.

- Ieyama H. (1975). Chromosome numbers of three species in three families of Pteriomorpha (bivalvia). *Venus* vol. **34** : 26-32.
- Imai T. & S. Sakai. 1961. Study of breeding of japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Tooku j. Agric. Res.*, **12** : 125-171.
- Perdue JA. & G. Erickson (1984). A comparison of the gametogenic cycle between the pacific oyster *Crassostrea -gigas* and the suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington state. *Aquaculture* 1984 , **37** (3): 231-237
- Scarpa J. & SK. Allen. Comparative kinetics of meiosis in hybrid crosses of pacific oyster *Crassostrea gigas* and suminoe oyster *C. rivularis* with the american oyster *C. virginica*. *J. Exp. Zool.* 1992, **263** (3): 316-322

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *sikamea* (Amemiya 1928)

Distribution géographique : Japon (Hedgecock et al. 1999).

Exploitation commerciale : Côte Ouest des USA

Croisements inter-spécifiques : Croisement possible de *C. gigas* (male) x *C. sikamea* (femelle), le croisement réciproque ne donnant pas d'embryons viables (Banks et al. 1993).

Remarques : Il est possible de distinguer *C. gigas* de *C. sikamea* par l'utilisation de marqueurs de l'ADN mitochondrial (Hedgecock et al. 1993).

Références bibliographiques :

Banks MA., DJ. Mcgoldinck, W. Borgeson & D. Hedgecock (1993). Gametic incompatibility and genetic divergence of pacific and kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* (thunberg) and *Crassostrea sikamea* (amemiya). *Mar. Biol.*, **121** (1) : 127-135.

Hedgecock D. & AM. Robinson (1992). Report of the kumamoto brood stock workshop. Oregon sae grant report, oresu-w-92-002.

Hedgecock D., MA. Banks & DJ. Mcgoldrick (1993). The status of the kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (amemiya 1928) in United-States commercial brood stocks. *J. Shellfish Res.*, **12** (2): 215-221

Hedgecock D., G. Li., MA. Banks & Z. Kain (1999). Occurrence of the kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the ariake sea, japan. *Mar. Biol.* **133**: 65-68.

Woelke CE. (1955). Introduction of the kumamoto oyster *ostrea (Crassostrea) gigas* to the pacific coast. *Fish. Res. Papers, wash. Dept. Fish.*, **1** : 41-50.

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *virginica* (Gmelin, 1792)

Noms vernaculaires : Huître américaine, Virginian oyster, Eastern oyster, Atlantic oyster

Distribution géographique : Côte atlantique de l'Amérique du Nord : du Golf du St Laurent au Golf du Mexique

Exploitation commerciale : importante : Canada, U.S.A.

Caractéristiques biologiques :

- **Conditions de maturation** (°C) : > 20 °C (voir 25°C)
- **Taille des oeufs** (µm) : 50
- **Durée de la phase planctonique** : 10 jours à 25°C (en éclosion).
- **Taille maximale adulte** (mm) : 360

Caractéristiques écologiques :

- **Salinité** (ppm) : 3-12 (Mexique, DeBuen 1957); 22-32 (Hawaï, Sakuda, 1966); 5-10 (Chesapeake Bay, Canda).
- **Température** (°C) : 20-30 (Mexique, De Bruen 1957); 21-27 (Hawaï, Sakuda, 1966).

Maladies : Haplosporidium nelsoni ("MSX"), Perkinsus marinus ("Dermo")

Croisements inter-spécifiques : Les hybrides avec *C. gigas* et *C. rivularis* ne sont pas viables : mortalité totale 1 semaine après fécondation (Allen et al. 1993).

Remarques : Des essais d'introduction sur la côte nord-ouest des U.S.A et en Europe ont échoué "faute de reproduction en climat trop frais". (introduite à : Hawaii, Australie, Angleterre, Japon... mais jamais avec succès).

Références bibliographiques :

- Allen SK., PM. Gaffney, J. Scapa & Bushek D. (1993). Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, **13** : 269-289.
- Barber BJ., RB. Carnegie, CV. Davis & W. Mook (1996). Effect of timing of seed deployment on growth and mortality of oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease (jod). *J. World Aquac. Society* **27**(4):443-448.
- Foltz DW. (1986). Segregation and linkage studies of allozyme loci in pair crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. *Biochem. Genet.* **24**(11-1):941-956.
- Foltz DW. & YP. Hu (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) .2. heterozygote deficiency and gametic disequilibrium in natural-population samples. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **5**(2):130-137.

- Hu YP. & DW. Foltz** (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) .1. characterizing the inheritance of polymorphisms in controlled crosses. *Mol.Mar.Biol.Biotech.* **5**(2):123-129.
- Kennedy VS.** (1996). The ecological role of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, with remarks on disease. *J. Shellfish. Res.* **15**(1):177-183.
- Lewis EJ., CA. Farley, EB. Small & AM. Baya** (1996). A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Liv. Res.* **9**(2):169-178.
- Mcdonald JH., BC. Verrelli & LB. Geyer** (1996). Lack of geographic-variation in anonymous nuclear polymorphisms in the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Mol. Biol. Evol.* **13**(8):1114-1118.
- Galtsoff PS.** (1964). The american Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). U.S. Fish Wildl. Serv. Fish. Bull, **64**.
- Sakuda HM.** (1966). Condition of American Oyster '*Crassostrea virgigina*' in west Loch, pearl Harbor, Hawaiï. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **95** (2) : 216-218.

Genre : *Saccostrea*

Espèce : *commercialis* (Iredale & Roughley)

Noms vernaculaires : Sydney rock oyster, mangrove oyster, rock oyster, commercial oyster, huître capuchon d'Australie

Synonymes : *O. subtrigona*; sous espèce de *C. cucullata* (Ahmad, 1977); variant de *S. mytuloides* (Namibu, 1977); *C. commercialis* (Iredale & Roughley), *Saxostrea commercialis* (Iredale 1939)...

Distribution géographique : du Sud Australie (de Wingan Inlet au nord du Queensland) à la Thaïlande.

Exploitation commerciale : Production commerciale importante en Australie (notamment Nouvelle Galles du Sud), introduite à Hawaï; Thaïlande.

Caractéristiques biologiques : pour une description morphologique détaillée voir Thomson (1954)

- **Taille maximale adulte** (mm) : 250 (taille commune : 80-120)

Caractéristiques écologiques : principalement en estuaires, parfois sur côtes rocheuses

Maladies : *Marteilioides branchialis* (Anderson et Lester, 1992), *Marteilia sydneyi* (Roubal et al. 1989).

Références bibliographiques :

Anderson TJ. & RJG. Lester (1992). Sporulation of *marteilioides-branchialis* n-sp (paramyxea) in the sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* - an electron-microscope study. *J. Protozool.*, **39** (4) : 502-508.

Buroker NE., WK. Hershberger & KK. Chew (1979). Population genetics of the family *ostreidea*. I. Intraspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.*, **54** : 171-184.

Holliday JE., GL. Allan & JA. Nell (1993). Effects of stocking density on juvenile sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (iredale and roughley), in cylinders. *Aquaculture*, **109** (1) : 13-26

Holliday JE., GB. Maguire & JA. Nell (1991). Optimum stocking density for nursery culture of sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Aquaculture* 1991, **96** (1) : 7-16

Morton B. (1991). Do the bivalvia demonstrate environment-specific sexual strategies - a hong-kong model. *J. Zool.*, **.223** (jan) : 131-142

Roubal FR., J. masel & RJG. Lester (1989). Studies on *marteilia-sydneyi*, agent of qx disease in the sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life-cycle. *Aus. J. Mar. Fresh. Res.*, **40** (2) : 155-167

Nell JA. & JE. Holliday (1988). Effects of salinity on the growth and survival of sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, **68** (1) : 39-44.

Thomson JM. (1954). The genera of oysters and the australian species. *Aus. J. Mar. Fresh. Res.*, **5** : 132-179.

c) Principales importations réalisées depuis 1994

1. *Crassostrea virginica*

En 1994, le laboratoire a importé 50 huîtres *C. virginica* en provenance du Canada (Shippagan, New-Brunswick).

2. *Crassostrea rivularis*

Des huîtres de l'espèce *Crassostrea rivularis* âgées d'un an ont été obtenues en provenance du New Jersey par l'intermédiaire du Dr. S.K. Allen Jr. La morphologie (coquille proche de l'huître plate), le potentiel de croissance ainsi que la possibilité d'hybridation avec *C. gigas* rendent cette espèce particulièrement intéressante.

Année 1995

1. *Crassostrea angulata* : 89 individus en provenance d'Espagne (Chiclana, province de Cadiz). Réception le 4/7/95 après examen histologique sur 30 individus.
2. *Crassostrea angulata* : 81 individus en provenance du Portugal (baie de Setubal). Réception le 18/01/96 avec examen.
3. *Crassostrea sikamea* : 180 individus en provenance de Californie (Bodega Bay, Californie). Réception le 10/09/95 ,après examen histologique sur 30 individus.
4. *Crassostrea gigas* : 150 individus en provenance de Corée du sud (NFRDA, Pusan). Réception le 3/06/95 avec examen .

Les importations de *C. angulata* et de *C. sikamea* se sont réalisées dans de bonnes conditions et peu de mortalités ont été observées suite au transfert.

Par contre l'importation de *C. gigas* en provenance de Corée a été un échec ,certains animaux étant porteurs du parasite *Martelioides* sp. Toutes les huîtres ont été détruites .

Année 1996

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.
2. *Crassostrea rivularis* : 99 individus en provenance des USA New Jersey et produits en écloserie
3. *Crassostrea gasar* : 30 individus issus de population naturelle en provenance du Sénégal (Casamance, huîtres de palétuviers) . Réception avec examen histologique le 15/12/96.
4. *Crassostrea rhizophorae* : 40 individus de population naturelle en provenance de Guyane (Mont Sinery, huîtres de palétuviers). Réception avec examen histologique le 15/01/97.

Les différentes importations se sont déroulées dans des conditions suffisamment favorables puisqu'aucune mortalité significative n'a été enregistrée dans les mois qui ont suivi.

Année 1997

1. ***Crassostrea rhizophorae*** : 40 individus de population naturelle en provenance de Guyane (Mont Sinery, huîtres de palétuviers). Réception avec examen histologique le 15/01/97.
2. ***Crassostrea gigas*** : 100 individus en provenance de Boryung et Hwaseong – Ouest de la Corée du Sud (sur la Mer Jaune). Réception 05/12/97.
3. ***Tiostrea chilensis*** : 25 individus en provenance de Bangor, Pays de Galles. Cette espèce d'huître plate est originaire de Nouvelle Zélande.

Des mortalités successives ont touché la population de *Crassostrea gigas* originaire de Corée du Sud, sans qu'aucun agent pathogène ne soit détecté sur ces animaux. Le lot a été détruit.

Année 1998

1. ***Crassostrea gigas*** : 100 individus en provenance de Taïwan (Tungkang). Réception en janvier 1998 avec examen histologique. L'arrivée de ces animaux a été suivie d'une mortalité rapide de nombreux individus qui ont vraisemblablement mal supporté le changement d'environnement. Une partie de ces animaux a servi à la reproduction en 1998.
2. ***Crassostrea gigas*** : 200 individus en provenance du Japon (Hiroshima) qui se sont toujours bien comportés et se sont reproduits cette année.
3. ***Crassostrea angulata*** : 200 individus en provenance d'Espagne (Canio Sancti Piétri). Aucune mortalité constatée sur ce lot qui a participé aux croisements intra- et inter-spécifique réalisés avec *C. gigas*.
4. ***Crassostrea gasar*** : 20 individus en provenance du Sénégal (Dakar, Pointe des Almadies). Quelques mortalités suite au transport.
5. ***Crassostrea sp.*** : des huîtres creuses du Brésil (Baie de Paranagua). Espèce en cours de détermination.

d) Contrôles sanitaires avant et après importations

3 types d'échantillons peuvent être distingués :

- les échantillons reçus fixés (animaux fixés en "Carson"), pour contrôle avant importation.

- les échantillons prélevés sur animaux vivants (individus sacrifiés à leur arrivée pour contrôle sanitaire, notamment en cas d'importation sans contrôle préalable).
- les échantillons prélevés sur animaux morts au sein du conservatoire pour rechercher la cause de ces mortalités.

Les résultats des différents examens sont présentés sous forme de tableaux.

Année 1995

Un total de 321 individus originaires de divers pays ont fait l'objet d'une analyse en microscopie photonique. Ces analyses ont concerné 4 espèces différentes.

Pour les *C. gigas* importées de Corée, un contrôle sanitaire préalable n'a pu être effectué, le parasite *Martelioïdes* a été repéré sur seulement 3 individus sur un total de 149, suite à des mortalités qui auraient pu être considérées comme "normales" quelques jours après l'arrivée du lot au sein du conservatoire. L'ensemble du lot a été détruit pour éviter tout risque de contamination. Ceci souligne donc la nécessité d'un suivi très strict des lots importés.

Tableau 1: Bilan des examens zoosanitaires réalisés en 1995

Espèce	Origine	Nombre D'analyses	Résultats
<i>C. gigas</i>	Irlande	70	-3 animaux à suspicion d'herpes virus -2 animaux avec des corpuscules éosinophiles. -3 animaux avec des ciliés -2 animaux avec une hypertrophie de certains diverticules digestifs.
<i>C. gigas</i>	Corée du Sud	149 (après importation) : 7 Ax histo 142 ax frottis	-3 animaux avec des parasites de type <i>Martelioïdes</i> . -2 animaux avec des ciliés.
<i>C. angulata</i>	Espagne	30(avant importation)	-10 animaux présentant des images de type kystique d'origine indéterminée, dans la glande digestive.
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	20 (avant importation)	-2 animaux avec une prolifération de cellules brunes. -5 animaux avec des ciliés. -1 animal avec des rickettsies.
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	12 (après importation)	-3 animaux avec des corpuscules éosinophiles.
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	40 (après importation)	-3 animaux présentant de parasites de types <i>Bonamia</i>

Lexique :

- Martelioïdes* : Protozoaire parasite de la gonade de l'huître creuse.
- Rickettsies : Bactéries intracellulaires.

Année 1996

Un total de 125 individus, de 8 espèces différentes, a été analysé en microscopie photonique (Tableau 2).

D'autre part, les mortalités observées en 1995 chez *C. rivularis* ont permis de mettre en évidence pour la première fois la susceptibilité de cette espèce d'huître creuse à un parasite du genre *Bonamia*, qui affecte habituellement les huîtres plates. Ces résultats ont été valorisé sous forme de publication :

Cochennec N., T. Renault, P. Boudry, B. Cholet & A. Gerard (1998). Bonamia-like in the suminoe oyster, *Crassostrea rivularis* (Gould) reared in France. *Dis. Aquat. Org.* **34**: 193-197.

Tableau 2 : Bilan des examens zoosanitaires réalisées en 1996

Espèce	Origine	Nombre D'analyses	Résultats
<i>C. angulata</i>	Portugal	4	Rien à signaler
<i>C. rhizophorae</i>	Nouvelle-calédonie	30	3 animaux avec des noyaux hypertrophiés
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	4	3 animaux présentant des parasites de type <i>Bonamia</i>
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	15	3 animaux présentant des images de phagocytose dans les épithélium digestifs.
<i>C. rivularis</i>	Canada	3	3 animaux présentant des anomalies de nature non déterminée dans le sang.
<i>C. gasar</i>	Sénégal	28	1 animal avec des ciliés
<i>S. commercialis</i>	Australie	20	1 animal avec des métazoaires dans la gonade.
<i>C. gigas</i>	Taiïwan	30	30 animaux avec des inflammations de différents tissus dont la cause est indéterminée.

Année 1997

107 animaux de 6 espèces différentes ont été contrôlés :

Tableau 3 : Bilan des examens zoosanitaires réalisées en 1997

Espèces	Origine	Nb. Analyses	Résultats
<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	3 (histo)	Rien à signaler
<i>C.gigas</i> X <i>C.angulata</i>	Production conservatoire 1996	30 (PCR)	Rien à signaler
<i>T. lutaria</i>		2 (histo)	Rien à signaler
<i>T. chilensis</i>	Pays de Galles	6 (histo)	Rien à signaler
<i>C.gigas</i>	Taiwan	29 (histo) 1(MET) 17(histo) 2(MET)	6/29 avec 1 métazoaire dans le tube digestif. 1/29 avec 1 colonie de rickettsie dans 1 diverticule digestif 1/29 présente 1 importante dégradation des épithéliums digestifs aucun agent observé 2/17 suspicions d'herpès aucun agent observé
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	18(histo) 6(histo)	1/18 avec 1 colonie de rickettsie dans 1 diverticule 1/6 suspicion d'herpès.
<i>C. gigas</i>	Corée	1 (hybridation in situ) 1(histo)	Rien à signaler aucun agent observé

Année 1998

90 animaux ont été analysés :

Tableau 4 : Bilan des examens zoosanitaires réalisées en 1998

Espèces	origine	Nb. Analyses	Résultats
<i>C.gigas</i>	japon	30 (histo)	3/30 <i>Mytilicola</i> 1/30 <i>Myticola</i> 2/30 ciliés
<i>C. angulata</i>	Production conservatoire 1998	30 (histo)	Rien à signaler
<i>C. angulata</i> x <i>C.gigas</i>	Production conservatoire 1998	30 (histo)	Rien à signaler

e) Croisements réalisés au cours des 5 années.

Les animaux présents au sein du conservatoire de souches ont permis de réaliser des croisements intra- et inter-spécifiques. L'ensemble des croisements a été obtenu par "stripping" de la partie gonadique, afin d'éviter les risques de fécondations incontrôlées liés à la technique d'induction de la ponte par choc thermique.

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau récapitulatif suivant :

Tableau 5 : Elevages réalisés de 1994 à 1998

DATE	Elevage	Objectif	Résultats
3/04/94	CGCR9427	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. rivularis</i>	Pas de fécondation inter-spécifique. Mortalité totale à J12 en intra-spécifique
15/06/95	RSGR9525	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. rivularis</i>	Pas de femelle <i>C. rivularis</i> Fixation d'un lot témoin <i>C. gigas</i> et d'un lot hybride <i>C.g x C.r.</i>
4/07/95	RSGR9526	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. rivularis</i>	Pas de femelle <i>C. rivularis</i> Fécondation sans développement larvaire .
22/08/95	RSGX9538	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> , <i>C. rivularis</i> , <i>C. angulata</i> et <i>C. sikamea</i> .	Obtention de larves viables Mortalité de tous les lots de J6 à J15.
12/09/95	RSGX9541	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> , <i>C. rivularis</i> , <i>C. angulata</i> et <i>C. sikamea</i> .	Fixation d'un lot <i>C.s x C.a</i> et d'un lot <i>C.s x C.s</i> . Mortalité entre J1 et J22 des autres croisements.
14/09/95	RSCA9542	Reproduction de <i>C. angulata</i> .	Mortalité des larves de J13 à J15.
21/09/95	RSCA9543	Reproduction de <i>C. angulata</i>	Mortalité des larves à J10.
18/04/96	RSGR9615	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. rivularis</i>	Fixation du croisement <i>C.g x C.r</i> à J22. Mortalité totale du lot témoin <i>C.g x C.g</i> à J7.
22/04/96	RSVV9617	Reproduction de <i>C. virginica</i> avec témoin <i>C.gigas</i>	Larves 100% normales. Fixation des croisements <i>Cg x C.g</i> et <i>C.v x C.v</i> à J18.
10/07/96	RSGX9627	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C.gigas</i> , <i>C.angulata</i> et <i>C.sikamea</i> .	Fixation des croisements : <i>C.a x C.g</i> , <i>C.s x C.g</i> et <i>C.a x C.a</i>
8/08/96	RSGX9632	reproduction inter et intra-spécifique de <i>C.gigas</i> , <i>C.angulata</i> et <i>C.sikamea</i> .	Mortalité totale des croisements entre J1 et J19.
24/06/97	CGCA9714	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. angulata</i> .	Mortalité totale des croisements entre J15 et J17.
3/07/97	RSGX9715	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> , <i>C. angulata</i> et <i>C.sikamea</i> .	Fixation des croisements : <i>C.g x C.g</i> , <i>C.g x C.r</i> , et <i>C.g x C.s</i>
19/08/97	RSGX9719	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. angulata</i> ..	Fixation des croisements : <i>C.g x C.g</i> , <i>C.g x C.a</i> , <i>C.a x C.g</i> et <i>C.a x C.a</i> .
29/07/98	RSGR9814	Reproduction inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. rivularis</i>	Pas de femelle <i>C. rivularis</i> Fixation des croisements : <i>C.g x C.g</i> et <i>C.g x C.r</i> .
14/04/98	RSGA9807	Reproductions inter et intra-spécifique de <i>C. gigas</i> et <i>C. angulata</i>	Obtention d'animaux pour les différents croisements. Fixation et suivi sur estran par le laboratoire LCPC.
12/05/98	RSGJ9809	Reproduction intra-spécifique de <i>C. gigas</i> du japon et de Taiwan et d'un témoin <i>C. gigas</i> local.	Obtention d'animaux pour les différents croisements. Fixation et suivi sur estran par le laboratoire LCPC.

Jusqu'à présent, 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 que l'on souhaite reproduire ou hybrider. En effet, les conditions requises diffèrent pour chaque espèce, d'où la difficulté d'assurer les reproductions et les hybridations.

L'extension des bâtiments de la station IFREMER à Ronce les bains, devrait permettre à moyen terme de résoudre ce problème technique en permettant un contrôle plus précis des conditions de maturation dans un nouveau conservatoire de souches.

Principaux résultats obtenus :

1. Obtention en 1995, 1996, 1997 et 1998 d'animaux issus des croisements intra- et inter-spécifiques de *C. gigas* et *C. rivularis*. Cependant, il s'est avéré impossible de maintenir une sex-ratio équilibrée dans la population de *C. rivularis* représentée à 95% par des animaux femelles, et de ce fait de réaliser des hybridations dans les deux sens, à savoir femelle *C. gigas* x mâle *C. rivularis* et femelle *C. rivularis* x mâle *C. gigas*. Seul le premier croisement a pu être obtenu.

De même, la production d'une première génération issue de la population *Crassostrea rivularis* importée n'a pas été possible en raison du déficit en géniteurs *Crassostrea rivularis* de sexe femelle et des mortalités enregistrées en élevages larvaires après 10 jours de développement normal.

Cependant, les animaux produits en 1995 et issus du croisement RSGR9525 *C. gigas* x *C. rivularis*, présentaient pour 40 d'entre eux une morphologie bien distincte du lot témoin *C. gigas* x *C. gigas* et très proche de celle des géniteurs *C. rivularis*, les autres individus étant vraisemblablement des contaminations de *C. gigas* "pure" avec une morphologie identique en tout point à celle de *C. gigas*.

La mise au point de marqueurs d'espèces en biologie moléculaire (PCR-RFLP) a permis ensuite d'étudier l'état d'hybridation des 40 individus (*C. gigas* x *C. rivularis*) et de confirmer leur statut "hybrides".

Les élevages expérimentaux sur ces deux mêmes espèces réalisés en 1996 et 1997 n'ont pas permis d'obtenir à nouveau des hybrides, et les animaux issus des croisements de 1998 n'ont pas atteint une taille suffisante pour être analysés à l'aide des différents marqueurs moléculaires disponibles au Laboratoire.

2. Obtention en 1995, d'animaux issus du croisement RSGX9541 d'hybridation *Crassostrea sikamea* et *Crassostrea angulata*. Quelques individus sont encore présents au sein du conservatoire.

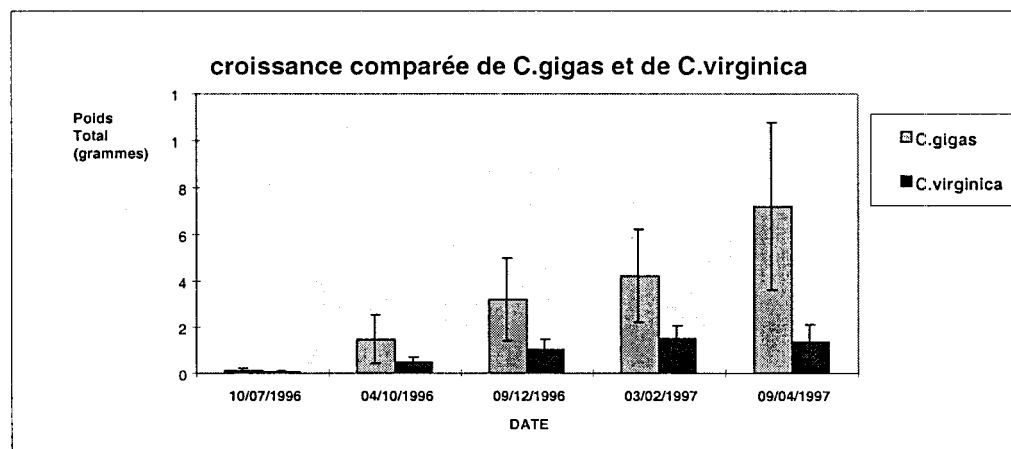
3. Obtention en 1995, d'une première génération de *Crassostrea sikamea* à partir des géniteurs importés de Californie.

4. Obtention en 1996 d'une première génération de *Crassostrea virginica* (RSVV9627) à partir des géniteurs importés du Canada. Simultanément un lot témoin de *Crassostrea gigas* a été produit afin de réaliser entre les deux élevages un suivi des performances de croissance. Les résultats de ce suivi poursuivi jusqu'en 1998 figurent dans le graphique ci-dessous et montrent que la croissance de *C. gigas* est significativement supérieure à celle de *C. virginica* dans les conditions d'environnement trophique du

conservatoire de souches.

Un épisode important de mortalité a touché les deux lots en expérimentation en juillet 1996, et a entraîné la disparition de 85% du lot témoin *C. gigas* et seulement 10% du lot *C. virginica*. Depuis aucune mortalité significative n'a été enregistrée sur ce dernier lot qui semble donc présenter un intérêt en terme de "résistance" par rapport au lot témoin *C. gigas*.

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



5. Après plusieurs épisodes de mortalités en 1995, 1996 et 1997 sur des croisements intra et inter-spécifique d'animaux issus de populations de *C. gigas* et *C. angulata*, il a été possible en 1998 de produire suffisamment d'animaux pour envisager de réaliser des suivis de comparaisons de croissance à plus grande échelle. Ces expérimentations terrain sont réalisées par le laboratoire Conchylicole Poitou-Charentes (LCPC), le CREA, et le Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL) de l'IFREMER.

6. D'autres part, en 1998, différents lots de *C. gigas* ont été produits en intra-spécifique à partir de géniteurs de populations originaires de Taiwan et du Japon importées au sein du conservatoire de souches. Ces différentes productions seront comparées en terme de croissance et de mortalité à une descendance témoin obtenue à partir de géniteurs de Marennes-Oléron.

f) Comparaison des taux de fécondation inter-spécifiques.

La comparaison des taux de fécondation obtenus pour les différents taxons pour les deux tentatives d'hybridations réalisées en 1995 (RSGX9538 et RSGX9541) fournit des résultats qu'il faut prendre avec réserve. En effet, la qualité des gamètes utilisés étant inégale entre espèces, les taux d'éclosion sont parfois plus élevés dans les croisements inter-spécifiques que dans les croisements intra-spécifiques. Les tableaux suivants donnent le détail de ces taux de fécondation absolus ou relatifs (par rapport au taux observé en intra-spécifique).

RSGX9538

Tableau 6 : Pourcentage d'éclosion = (larves comptées à J1/ovules à J0) x 100

Mâles femelles	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)	16.4	22.5	6.1	0.05
<i>C. angulata</i> (2)	18.3	15	4.6	2.5
<i>C. sikamea</i> (7)	1.5	0.3	3.8	0.1
<i>C. rivularis</i> (2)	0.3	3.8	1.2	30.7

Tableau 7 : Pourcentage d'éclosion en considérant les performances des mâles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation/ pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les mâles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en colonne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

mâles femelles	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)	100	137	37	0.3
<i>C. angulata</i> (2)	122	100	31	17
<i>C. sikamea</i> (7)	39	8	100	3
<i>C. rivularis</i> (2)	1	12	4	100

Tableau 8 : Pourcentage d'éclosion en considérant les performances des femelles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation/ pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les femelles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en ligne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

mâles femelles	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)	100	150	161	0.1
<i>C. angulata</i> (2)	111	100	121	8
<i>C. sikamea</i> (7)	9	2	100	0.3
<i>C. rivularis</i> (2)	2	25	31	100

On remarque qu'il n'existe pas de différences majeures selon le sens du croisement, à l'exception de *C. sikamea*, dont la compatibilité avec *C. gigas* et *C. angulata* est clairement supérieure pour les mâles (6.1 et 4.6) que pour les femelles (1.5 et 0.3 %).

On peut également remarquer la différence de performance entre *C. angulata* et *C. gigas* sur *C. rivularis* (en moyenne 21 contre 1.2)

Ces résultats peuvent donc être globalement résumés par le tableau suivant :

Tableau 9 : Résumé des pourcentages relatifs d'éclosion : (moyenne mâle + moyenne femelle)/2

mâles femelles	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. rivularis</i>
<i>C. gigas</i>	100	121	23	1.2
<i>C. angulata</i>		100	17	21
<i>C. sikamea</i>			100	16
<i>C. rivularis</i>				100

RSGX9541

Tableau 10 : Pourcentage d'éclosion = (larves comptées à J1 / ovules à J0) x100

Mâles Femelles	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. rivularis</i>
	(2)	(2)	(2)	(3)
<i>C. gigas</i> (3)	34.9	25.1	0.2	0
<i>C. sikamea</i> (2)	12.5	14.2	15.6	0.7

Tableau 11 : Pourcentage d'éclosion en considérant les performances des mâles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation/ pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les mâles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en colonne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

Mâles Femelles	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. rivularis</i>
	(2)	(2)	(2)	(3)
<i>C. gigas</i> (3)	100	/	1	/
<i>C. sikamea</i> (2)	36	/	100	/

Tableau 12 : Pourcentage d'éclosion en considérant les performances des femelles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation/ pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les femelles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en colonne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

Mâles Femelles	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. rivularis</i>
	(2)	(2)	(2)	(3)
<i>C. gigas</i> (3)	100	72	0.5	0
<i>C. sikamea</i> (2)	80	91	100	4.5

Cette seconde expérience est moins complète que la précédente en raison de l'absence de femelles *C. rivularis* et de la contamination des lots ayant comme parent femelle *C. angulata*. On remarque des résultats inverses de ceux de l'expérience précédente en ce qui concerne *C. sikamea*, dont la compatibilité avec *C. gigas* et *C.*

angulata est cette fois supérieure pour les femelles (80 et 91%) que pour les mâles (0.5%).

g) Inventaire du conservatoire en fin de saison 1998

Tableau 13

espèces	Origine	Génération/année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. gigas</i>	Taiwan	G0/1998	100
<i>C. gigas</i>	Japon	G0/1998	200
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G0/1995	57
<i>C. sikamea x C. sikamea</i>	Conservatoire de souche	G1/1995	23
<i>C. angulata x C. sikamea</i>	Conservatoire de souche	G1/1995	20
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	G0/1996	12
<i>C. gigas x C. rivularis</i>	Conservatoire de souche	G1/1997	200
<i>C. gigas x C. rivularis</i>	Conservatoire de souche	G1/1998	500
<i>C. angulata</i>	Espagne	G0/1998	50
<i>C. virginica</i>	Conservatoire de souche	G1/1996	400
<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	GO/1997	20
<i>C. rhizophorae</i>	Martinique	GO/1997	20
' <i>C. rhizophorae</i> '	Brésil	GO/1998	15
<i>C. gasar</i>	Sénégal	G0/1996	13
' <i>C. gasar</i> '	Sénégal	G0/1998	15

h) Conclusions

La création d'un conservatoire de souches d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* au sein de la station IFREMER de La Tremblade a permis de réaliser dans des conditions de sécurité zoosanitaires fiables, notamment par la mise en place d'un système de traitement des eaux de rejet par ozonation, l'importation d'espèces de diverses origines géographiques. Une vingtaine de populations d'huîtres de provenance différente ont ainsi été introduites depuis 1992.

L'acclimatation des espèces importées s'est déroulée dans des conditions favorables qui ont permis d'envisager pour plusieurs d'entre elles leurs reproductions afin d'obtenir une première descendance viable. Ainsi, des premières générations de *Crassostrea angulata*, *Crassostrea sikamea* et *Crassostrea virginica* ont été produites, testées et conservées. Pour les autres, les conditions d'environnement trophique que présente la salle du conservatoire de souches ne correspondent pas aux exigences de ces espèces en terme de maturation. Leur reproduction ne sera donc envisageable qu'en testant et en modifiant leur conditionnement dans la nouvelle salle qui sera opérationnelle en cours d'année 1999.

Les croisements d'hybridations réalisés depuis 5 ans, ont permis d'obtenir des développements embryonnaires parfois viables et de produire aussi des descendance qui ont survécu pour certains croisements entre des espèces telles que *C. rivularis* et *C. gigas*, *C. sikamea* et *C. angulata*, mais surtout *C. angulata* et *C. gigas*.

Les principaux problèmes rencontrés sont liés aux mortalités massives qui ont touché les élevages larvaires depuis la création du conservatoire des souches et qui ont limité les suivis de comparaison de croissance aux premiers stades de développement.

Dans le cadre de l'extension de la station IFREMER de La Tremblade, la création d'une nouvelle salle "conservatoire de souches" devrait permettre d'améliorer les conditions de reproductions.

II. RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES D'ESPECES ET DE POPULATIONS

1. Objectifs

La recherche de marqueurs moléculaires chez les huîtres creuses répond à deux objectifs principaux :

- La recherche de marqueurs diagnostiques des différentes espèces présentes au sein des deux genres d'huîtres creuses : *Crassostrea* et *Saccostrea*.
- La recherche de marqueurs de populations au sein de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, principale espèce d'huître produite en France et dans le monde.

2. Méthodologies

Les techniques qui ont été privilégiées reposent sur l'**amplification *in vitro* de l'ADN** (PCR) et la recherche de polymorphisme de fragments de restriction (**PCR-RFLP**) ou de longueur (**microsatellites**). Cette approche a été notamment choisie pour les raisons suivantes:

- La technique est relativement légère à mettre en œuvre (comparativement aux RFLP sur ADN mitochondrial purifié par exemple), donc applicable à de grands échantillons (études "en population", contrôles d'importations...),
- La "compatibilité" entre les deux techniques, celles-ci utilisant les mêmes échantillons (collections d'ADN génomique),
- La possibilité de séquencer ultérieurement ces fragments (par séquençage direct des produits des PCR) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces.

2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique analysé peut être de 2 types :

- des huîtres vivantes, comme celles présentes au sein du conservatoire de souches de La Tremblade. Les prélèvements de tissus sont réalisés par biopsie,
- des échantillons conservés dans l'alcool ou au congélateur.

Les tableaux 3, 4 et 5 présentent les taxons et populations étudiés pour les marqueurs mitochondriaux (16S et COI) et 4 locus microsatellites.

Comparativement aux marqueurs allozymiques, les marqueurs basés sur la technique de la PCR présentent 2 avantages :

- la collecte et la conservation des échantillons est plus facile car la congélation n'est

pas nécessaire,

- la quantité de tissu nécessaire à l'extraction d'ADN (environ 1 mm²) permet d'étudier les animaux de manière non destructive, ce qui est impossible pour les allozymes.

Tableau 14 : Huîtres creuses étudiées en PCR-RFLP des fragments mitochondriaux 16S.

Espèce	Origine/Descriptif
<i>C. echinata</i>	Nouvelle Calédonie- Huîtres de rocher - population naturelle
<i>C. rivularis</i>	USA – population d'écloserie, introduite du Japon
<i>C. belcheria</i>	Thaïlande - population naturelle
<i>C. virginica</i>	Canada – population naturelle
<i>C. iredalei</i>	Thaïlande - population naturelle
<i>C. sikamea</i>	USA - population d'écloserie, introduite du Japon
<i>C. margaritacea</i>	Madagascar - population naturelle
<i>C. gasar</i>	Sénégal; huîtres de palétuvier, population naturelle
<i>C. angulata</i>	Espagne, population naturelle
<i>C. gasar</i>	Côte d'Ivoire - population naturelle
<i>C. gigas</i>	Estuaire de la Seudre – population introduite du Japon

Tableau 15 : Populations de *C. gigas* et *C. angulata* échantillonnées pour l'étude en PCR-RFLP du le fragment mitochondrial COI.

Origine (pays)	Abréviation	Taxa	Status	Effectif
Estuaire de la Seudre (France)	SEU	<i>C. gigas</i>	captage naturel	20
Bonne Anse (France)	BON	<i>C. gigas</i>	captage naturel	9
Estuaire de la Charente (France)	CHA	<i>C. gigas</i>	captage naturel	15
Arcachon (France)	ARC	<i>C. gigas</i>	captage naturel	15
Rade de Brest (France)	BRE	<i>C. gigas</i>	captage naturel	24
Gravelines (France)	GRA	<i>C. gigas</i>	captage naturel	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>	captage naturel	11
Nouvelle-Zélande	NEW	<i>C. gigas</i>	?	12
Chungmu (Corée du sud)	CHU	<i>C. gigas</i>	captage naturel	14
Keelung (Taiwan)	KEE	<i>C. gigas</i>	captage naturel	23
Ria Formosa (Portugal)	RFG	<i>C. gigas</i>	captage naturel	11
Ria Formosa (Portugal)	RFA	<i>C. angulata</i>	captage naturel	11
Setubal (Portugal)	SET	<i>C. angulata</i>	captage naturel	13
Cadiz (Espagne)	CAD	<i>C. angulata</i>	captage naturel	26

Tableau 16: Populations de *C. gigas* et *C. angulata* échantillonnées pour l'étude basée sur les marqueurs microsatellites.

Population	Taxon prédéterminé	Descriptif (lieu de prélèvement)	Effectif
RFA, RFG	Ca / Cg	Faro, 1 population présentant un mélange de <i>C.gigas</i> et <i>C.angulata</i> , 200 km au sud de Lisbonne, Portugal	35
CAD	Ca	Cadix, Chiclana de la Frontera, 150 km au sud de Faro, Espagne	50
SET	Ca	Setubal, 20 km au sud de Lisbonne, Portugal	13
TAH	Ca	Tahaddart, 340 km au nord de Casablanca, Maroc	16
KEE	Cg	Keelung, Sud de Taiwan	30
CHU	Cg	Chungmu, Corée du Sud	50
OUA	Cg	Lagune de Oualidia, 175 km au sud de Casablanca, Maroc	45
VEN	Cg	Venise, Italie	39
BAN	Cg	Bangor, Pays de Galle, GB (population d'écloserie)	41
ROZ	Cg	Anse du Roz, Rade de Brest, France	50
ARC	Cg	Arcachon, France	50
SEU	Cg	Anse de la Seudre, La Tremblade, France	49

Cg = *Crassostrea gigas*

Ca = *Crassostrea angulata*

2.2. Extraction de l'ADN

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 Proteinase K (55°C toute la nuit) puis extraction "classique" au phénol-chloroforme. 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 (surtout pour les marqueurs microsatellites). Le tableau 17 compare ces deux méthodes d'extraction de l'ADN.

Tableau 17: Avantages et inconvénients des deux méthodes d'extraction.

Méthode d'extraction	Phénol/Chloroforme	Chélex 5% (Estoup <i>et al.</i> , 1996)
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • fiabilité proche de 100% • obtention de grandes concentrations de matériel de bonne qualité • utilisation de petites quantités d'ADN dans un protocole PCR (la moitié de celles utilisées à partir d'ADN extrait au chélex) 	<ul style="list-style-type: none"> • protocole rapide • produits non toxiques
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • protocole lourd • produits utilisés toxiques 	<ul style="list-style-type: none"> • fiabilité voisine de 70-80% chez <i>Crassostrea gigas</i> • obtention de faibles concentrations de matériel de qualité moyenne • utilisation de grandes quantités d'ADN dans le protocole PCR

2.3. Amplification PCR

2.3.1. Marqueurs mitochondriaux

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial a été menée à partir des données disponibles dans la littérature (tab. 18).

Tableau 18. Amorces utilisées et fragments mitochondriaux correspondants.

Fragment amplifié et taille du fragment	Références et espèces concernées	Amorces
12S : 450 bp	Mokady <i>et al.</i> (1994): Litophaga spp., Mytilus edulis	12SBR: 5'-TTTCCCGCGAGCGACGGGCG 12SAR : 5'-GAAACCAGGATTAGATACCC
16S : 570 bp	Banks <i>et al.</i> (1993) : O'foighil <i>et al.</i> (1995) Crassostrea spp.	16SBR : 5'-GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 16SAR : 5'-CTGTTTATCAAAAACTA
COI : 710 bp	Folmer <i>et al.</i> (1994): 80 espèces d'invertébrés	LCO1490 : GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198 : 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

2.3.2. Marqueurs microsatellites

L'examen des individus a été réalisé au premier abord avec 3 marqueurs microsatellites (CG44, CG49, CG108) mis au point par l'équipe grecque de E. Zouros (Institute of Marine Biology of Creete). A cela s'ajoutent les essais de mise au point de 5 nouveaux marqueurs L8, L10, L16, L32, L48 (dont les séquences sont fournies par l'équipe de F. Bonhomme, laboratoire Génome et Populations). Une fois la mise au point accomplie, un des nouveaux marqueurs (L10) a pu être utilisé sur l'ensemble des individus. Les autres serviront dans l'avenir à la compléter et l'affiner.

L'étude a donc été effectuée avec 4 loci microsatellites dont les caractéristiques essentielles sont données dans le tableau 19.

Tableau 19. Amorces utilisées et marqueurs microsatellites correspondants.

locus (code Genbank)	séquence répétée	amorces	Tm	taille du fragment cloné
CG 44 (Y12085)	(CA) ₁₃	S : GAAGAATGTCATAGATTGATGG AS : CATGCCTGTTTACCAGTATTC	53°C	391 pb
CG 49 (Y12086)	(CA) ₃₅	S : CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC AS : CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	53°C	194 pb
CG 108 (Y12087)	(CA) ₁₈	S : ATATGTAATGATTACGAAACT AS : GTATGAGATTTGGTTCCACC	55°C	228 pb
L 10	(AG) ₂₆	confidentiel	55°C	330 pb

amorce S = sens, amorce AS = anti-sens.

2.4. Digestions par des enzymes de restriction

Les produits d'amplification des fragments mitochondriaux 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 s'est porté principalement sur des enzymes à 4 paires de bases afin de maximiser la probabilité de sites de coupure (tab. 20).

Tableau 20. Caractéristiques des 9 enzymes de restriction utilisées.

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance (5' - 3')	Température optimale d'activité
<i>TaqI</i>	TCGA	65°C
<i>Sau3A</i>	GATC	37°C
<i>AccI</i>	CCGC	37°C
<i>MseI</i>	TTAA	37°C
<i>HhaI</i>	GCGC	37°C
<i>HaeIII</i>	GGCC	37°C
<i>RsaI</i>	GTAC	37°C
<i>HindIII</i>	AAGCTT	37°C
<i>SacI</i>	GAGCTC	37°C

2.5. Electrophorèse

2.5.1. Fragments mitochondriaux

Le contrôle des amplifications PCR ainsi que la séparation des fragments digérés sont réalisés sur gel d'agarose à 1% horizontal. Les fragments sont visualisés sur table U.V. après coloration au bromure d'ethidium.

2.5.2. Microsatellites

La séparation des fragments d'ADN de chaque individu est réalisée sur un gel d'acrylamide à 8% vertical. Cela permet une résolution fine des fragments de 60 à 400 paires de bases avec la discrimination de fragments ayant 1 paire de bases de différence. Les migrations se font à puissance constante (50 watts) sous voltage et intensité non limitants pendant 2 à 5 heures en fonction de la taille du locus analysé.

Les allèles sont numérotés à partir de 1 pour l'allèle le plus haut avec un incrément de 2 paires de bases soit un motif de répétition. Les allèles les plus hauts correspondent à ceux ayant la migration la plus réduite et sont donc les plus grands. Inversement, les allèles les plus bas sont les plus petits.

Tous les homozygotes et les individus sans résultat d'amplification ont été analysés deux et parfois trois fois. L'utilisation d'un témoin (mélange de plusieurs individus) permet les recouplements entre gels.

3. Résultats

3.1. Marqueurs mitochondriaux

3.1.1. Amplification

La mise au point des amplifications PCR a été réalisée dans un premier temps sur 6 individus "test", représentant 6 taxons. 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. 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 surprenante car les amorces en question ont été décrites comme amplifiant ce gène avec succès chez un très grand nombre d'espèces 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 MgCl₂. 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) , nous en concluons 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.

3.1.2. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

3.1.2.1. Fragment 16S

Les profils de restriction observés pour les différents taxons ou populations analysées sont présentés dans les tableaux 21 et 22. 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 2, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

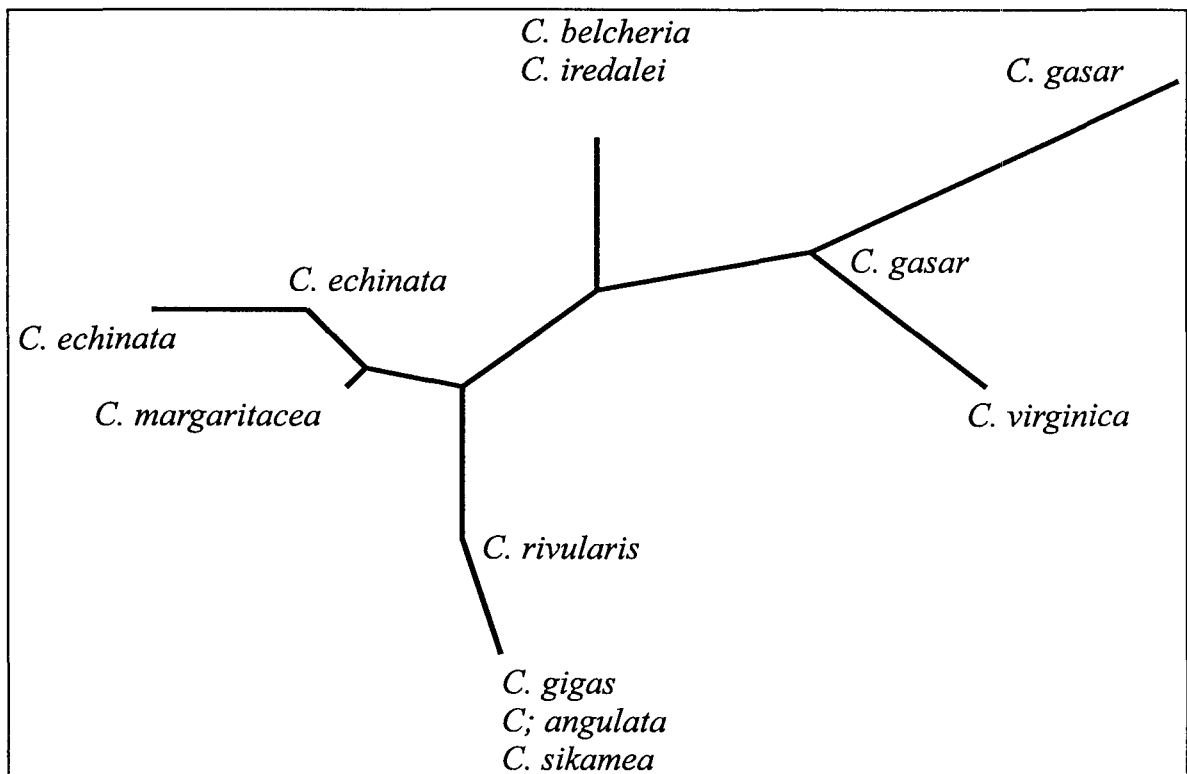
Tableau 21 : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment 16S. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

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>C. angulata</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. gigas</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. rivularis</i>	a	a	a	a	a	a	a	b	II
<i>C. sikamea</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. virginica</i>	a	a	a	b	b	a	b	a	III
<i>C. iredalei</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>C. belcheria</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>C. echinata</i>	b	a	a	e	b	b	a	b	V
<i>C. margaritacea</i>	b	a	b	e	a	b	a	b	VI
<i>C. gasar</i> (Côte d'Ivoire)	a	b	a	e	b	a	b	a	VII
<i>C. sp.</i> (Guyane)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>C. gasar</i> (Sénégal)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>C. 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 22 : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment 16S sur les différents taxons 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. iredalei</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

Figure 2 : 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.



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

3.1.2.2. Fragment COI

Ce fragment n'a pu être amplifié chez certaines espèces (*C. margaritacea*, *C. echinata*, et *C. gasar*). Pour les autres taxons, les tableaux 12 et 13 résument les résultats observés. Neuf haplotypes sont ainsi différenciés. Certains taxons, qui n'étaient pas différenciés par les profils de restriction sur le fragment 16S peuvent cette fois être distingués (par exemple *C. sikamea* / *C. gigas*).

Tableau 23 : 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	COI									Haplo-type
	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AclI	RsaI	HindIII	HaeIII	SacI	
<i>C. angulata</i>	c	c	a	b	b	c	a	c	a	A
	c	d	a	b	b	c	a	c	a	B
<i>C. 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>C. rivularis</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	H
<i>C. sikamea</i>	b	b	b	a	b	c	a	b	a	S
<i>C. 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 24 : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment COI sur les différents taxons 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

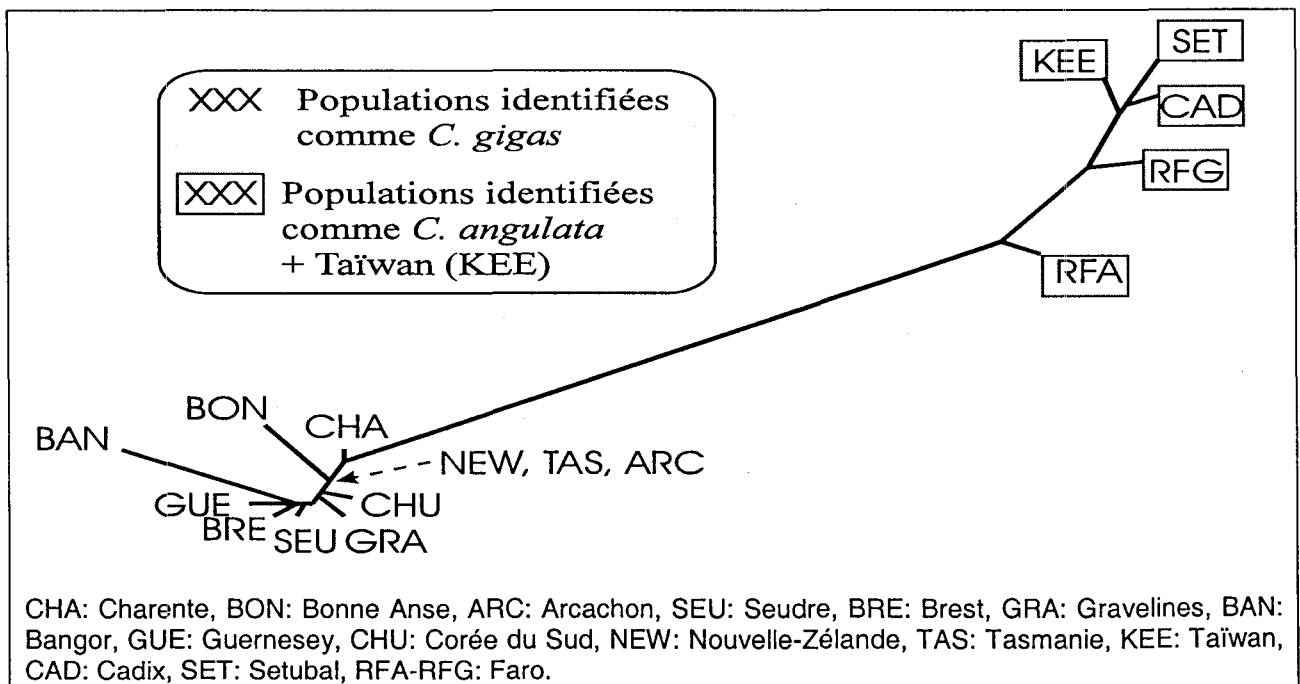
Une étude au niveau intra-spécifique a été réalisée sur les populations présentées dans le tableau 15. Il s'agit de populations qui ont été identifiées comme *C. angulata* (en provenance du Portugal et d'Espagne) ou *C. gigas*. Comme pour le fragment 16S, les relations entre haplotypes ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al*, 1991). Les fréquences des différents haplotypes dans les populations étudiées sont présentées dans le tableau 25. Une matrice de distances entre populations a servi de base à la construction de l'arbre présenté en figure 3, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993). La figure 3 montre une différenciation très nette entre les populations identifiées comme *C. angulata* (SET, CAD, RFA) et les populations identifiées comme *C. gigas* originaires de France, Grande Bretagne, Corée du sud, Australie, Nouvelle Zélande.... 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 auraient peut-être été importées d'Asie lors des premiers échanges commerciaux. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse en identifiant Taiwan comme origine de *C. angulata*. Ces résultats sont publiés dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

Tableau 25 : Fréquences des haplotypes dans les populations d'huîtres portugaises et japonaises étudiées. 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.

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	Tasmanie	<i>C. gigas</i>	11			1			
Nouvelle Zélande		<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				

Figure 3: Arbre construit par "neighbor-joining", illustrant les relations génétiques entre les populations à partir de données obtenues en PCR-RFLP sur le fragment mitochondrial COI.



3.2. Marqueurs microsatellites

3.2.1. Polymorphisme et hétérozygotie

L'hétérozygotie globale à chaque locus est obtenue en divisant le nombre d'individus hétérozygotes au locus considéré par le nombre total d'individus analysés à ce même locus. Ces valeurs supposent l'état à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour l'ensemble des populations à chaque locus et correspondent aux valeurs nécessaires au calcul du Fit. On constate une grande variabilité (tab. 15) puisque le nombre d'allèles dépasse 50 à tous les locus. Le nombre moyen d'allèles par locus est de 53,25 avec un minimum de 52 aux loci CG44 et CG108 et un maximum de 56 au locus L10.

Tableau 26: Résultats propres aux microsatellites

locus	nb d'ind. analysés	nb d'ind. non amplifiés	nb d'ind. hétérozygotes	Hétérozygotie observée	Hétérozygotie attendue	Nb total d'allèles
CG 44	468	12	312	0.68	0.97	52
CG 49	468	15	322	0.71	0.973	53
CG 108	468	8	380	0.83	0.969	52
L 10	468	3	422	0.90	0.97	56

Le tableau 16 représente le polymorphisme intra-population suivant les 4 loci considérés avec le nombre moyen d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée et attendue. Le niveau de variabilité observé est très élevé. He (mesure de la diversité génique) donne des valeurs fortes (0,944 pour la population KEE au locus CG44 ; 0,962 pour SEU au locus L10). Chaque population présente à tous les loci un nombre conséquent d'allèles. Le nombre moyen d'allèles par locus et par population est de 27 avec un minimum de 23 (CG 44) et un maximum de 31 (L10). La population CHU présente un faible nombre d'allèles, environ deux fois moins que les populations présentant le même effectif (exemple : CHU et ARC présentent respectivement 15 et 30 allèles au locus CG49).

Tableau 27: Polymorphisme intra-population pour les 4 marqueurs microsatellites.

pop	CG44			CG108			CG49			L10		
	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He
RFAG	24	0,857	0,942	23	0,823	0,935	25	0,411	0,939	27	0,971	0,947
CAD	21	0,54	0,906	28	0,8	0,948	33	0,96	0,957	33	0,857	0,954
SET	12	0,692	0,896	13	0,769	0,887	11	0,545	0,892	17	1	0,914
KEE	26	0,766	0,944	26	0,966	0,943	26	0,666	0,942	30	0,896	0,948
TAH	27	0,875	0,908	32	0,937	0,918	33	0,4	0,904	37	1	0,933
OUA	14	0,571	0,942	15	0,822	0,955	30	0,727	0,956	27	1	0,962
BAN	26	0,658	0,879	33	0,756	0,887	33	0,575	0,937	38	0,951	0,945
ROZ	30	0,7	0,943	28	0,791	0,948	36	0,775	0,963	35	0,755	0,961
VEN	23	0,631	0,949	38	0,891	0,947	30	0,714	0,949	37	0,871	0,945
ARC	27	0,88	0,943	27	0,8	0,954	30	0,836	0,938	31	0,98	0,962
CHU	15	0,38	0,904	16	0,869	0,960	15	0,765	0,951	20	0,84	0,957
SEU	30	0,791	0,943	34	0,755	0,955	35	0,652	0,948	40	0,918	0,962

nb all = nombre total d'allèles par population et par locus,

Ho = hétérozygotie observée

He = hétérozygotie attendue

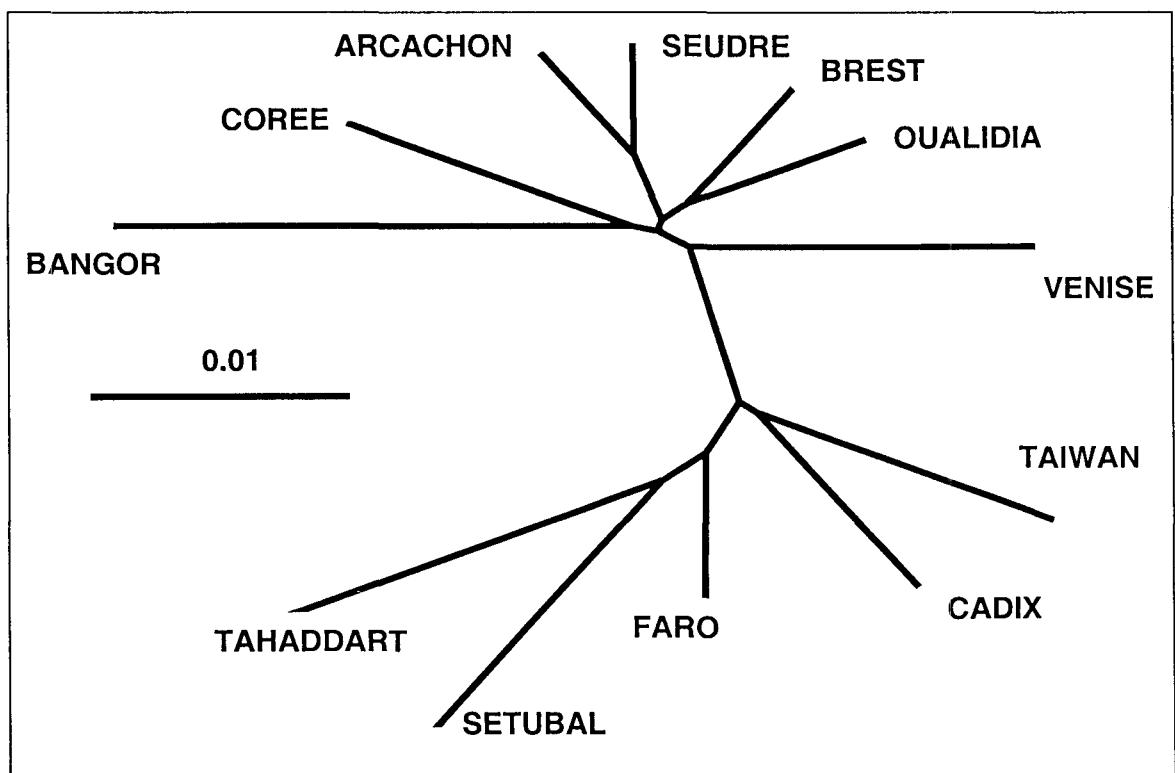
3.2.2. Variabilité inter-populations

La variabilité génétique entre populations est estimée au niveau multilocus par les calculs des indices F_{st} de Wright (1951). La différenciation observée entre paires de populations est faible avec un F_{st} de l'ordre de 0,001 à 0,04. Les F_{st} entre populations *Crassostrea gigas* (sans KEE) et *Crassostrea angulata* sont tous significatifs. Les populations européennes de *Crassostrea angulata* et Taïwan présentent pour la plupart des valeurs soit faiblement significatives (Faro/Taiwan et Cadix/Setubal) soit non significatives. C'est le cas des paires de populations suivantes : Faro avec Tahaddart ; Setubal avec Tahaddart, Faro et Taïwan.

Les F_{st} sont significatifs entre toutes les paires de populations *Crassostrea gigas* à l'exception de deux populations françaises Arcachon et Seudre seulement séparées d'une centaine de kilomètres ainsi que les populations Oualidia (OUA) avec Brest (ROZ) présentant une valeur quasi-nulle, résultat surprenant étant donné la situation des deux populations.

Une distance génétique quantifie le degré de divergence génétique entre unités taxonomiques (populations, espèces) prises deux à deux. Une matrice de distance de Cavalli-Sforza a été calculée sur ces populations à partir du logiciel Genetix et a permis la réalisation d'un arbre de distances par neighbor-joining (fig. 4).

Figure 4: Arbre construit par "neighbor-joining", illustrant les relations génétiques entre les populations à partir de données microsatellites.

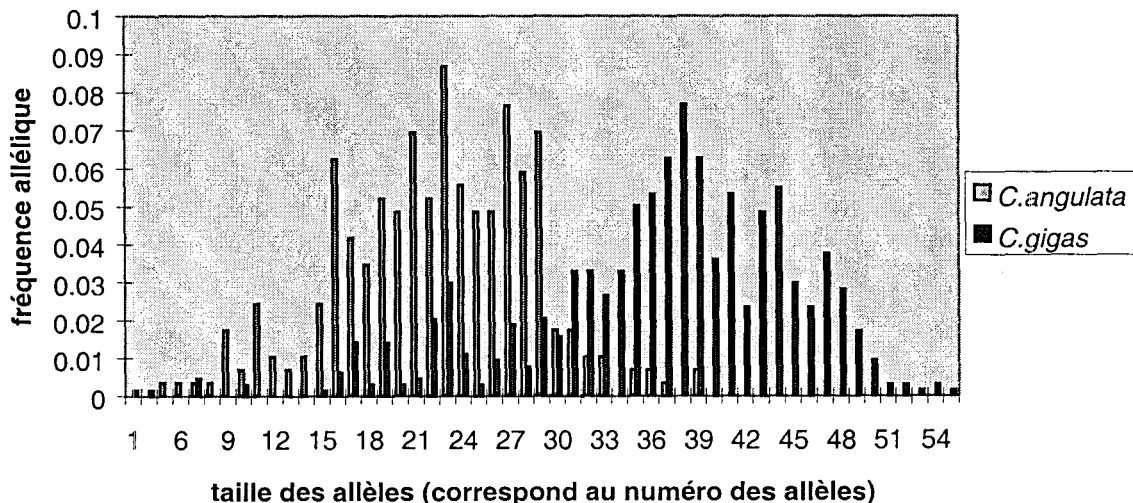


3.2.3. Différenciation *Crassostrea gigas* - *Crassostrea angulata* :

L'étude des fréquences alléliques à chaque locus chez *C. gigas* puis *C. angulata* amène à la réalisation d'histogrammes exprimant la fréquence des allèles en fonction de leur taille respective. L'exemple du locus CG44 est donné en figure 5.

Pour ce faire, toutes les populations, au sein de chaque taxon, sont groupées en une seule afin de procéder au calcul des fréquences alléliques dans deux pôles distincts et les comparer. Au vu des résultats (figures 2 et 3), la population KEE (Taiwan) est insérée dans le regroupement *C. angulata*. On constate que sur un loci (CG 44) une nette différenciation dans la taille des allèles apparaît entre les deux taxons : 38% des allèles présents chez *C. gigas* sont absents chez *C. angulata* et 15% dans le sens inverse. *C. angulata* ne présente que des allèles grands comparativement à *C. gigas* dont les allèles se répartissent sur toute la courbe avec une prédominance au niveau des petites tailles alléliques. Sur le locus CG 108, les résultats vont dans le même sens avec 24% des allèles présents chez *C. gigas* et absents chez *C. angulata*. Par contre sur les deux autres loci, à savoir CG 49 et L10, les allèles sont présents sur à peu près toute la distribution des tailles. Le pourcentage d'allèles présents chez l'un des deux taxons et absents chez l'autre ne dépasse pas 11%.

Figure 5: Répartition des fréquences alléliques au locus CG44 en fonction de la taille des allèles.



Le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé pour tester l'homogénéité des distributions aux deux taxons. Les résultats obtenus sont :

CG44	19,70	*** / Très significatif
CG108	13,40	*** / Très significatif
CG49	8,55	*** / Très significatif
L10	1,13	Non Significatif

La distribution des allèles est bien significativement différente entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* aux loci CG44, CG108 et CG49 (mais pas au locus L10).

4. Applications et transferts envisageables

Les possibilités d'application des marqueurs développés dans le cadre de ce programme sont nombreuses.

Les **marqueurs mitochondriaux** permettent de distinguer les différentes espèces d'huîtres, de manière fiable et non destructive. Cette distinction permet, par comparaison avec les profils observés pour les différents spécimens déjà étudiés, de déterminer des échantillons d'espèce indéterminée ou litigieuse. Ce contrôle peut être réalisé en cas d'importations d'huîtres en provenance de l'étranger afin de déterminer leur espèce. Notre étude nous permet notamment de distinguer *C. gigas* et *C. angulata*, taxons conspécifiques qui étaient jusqu'à présent indistinguables.

Ces techniques, basées sur l'amplification PCR peuvent être mises en œuvre dans tout laboratoire disposant des équipements suivants :

- centrifugeuse (extraction d'ADN)
- bain thermostaté (extraction d'ADN et restriction)
- thermocycleur (amplification de l'ADN par PCR)
- générateur et cuve d'électrophorèse horizontale (migration des fragments)
- table UV (visualisation des fragments d'ADN)

Les **marqueurs microsatellites**, beaucoup plus variables que les marqueurs mitochondriaux, ouvrent d'autres applications. En effet, les 4 locus utilisés sont spécifiques de l'espèce *C. gigas*. Les possibilités d'amplification de ces locus pour d'autres espèces n'ont pas encore été étudiées. Le très fort niveau de variabilité observé (plus de 50 allèles par locus) permet d'utiliser ces marqueurs pour des études de recherche de parenté (pour des lots produits en éclosion). Une autre application envisageable est la comparaison de lots (en cas de vol ou de litige concernant le statut d'un lot par rapport à un autre).

5. Conclusion

Des **marqueurs diagnostiques des différentes espèces** présentes au sein des deux genres d'huîtres creuses (*Crassostrea* et *Saccostrea*) ont été développés. Ces marqueurs du génome mitochondrial sont utilisables pour des contrôles d'échantillons dont l'espèce est incertaine ou douteuse. Ce travail se poursuit au laboratoire, en fonction de l'arrivée de nouveaux échantillons et fera l'objet d'une publication de synthèse dans l'avenir.

Des **marqueurs de populations** au sein de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont disponibles. Les 4 locus microsatellites révèlent un faible niveau de différenciation entre populations, résultat concordant avec la récente introduction de l'espèce en Europe et les importants flux liés aux activités ostréicoles. Ce faible niveau de différenciation ne permet pas de distinguer de manière suffisamment nette les différents stocks pour permettre une identification claire.

Bibliographie

- Banks MA., D. Hedgecock & C. Waters** (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 129-136.
- Boudry P., S. Heurtebise, B. Collet, F. Cornette & A. Gérard** (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **226**: 279-291.
- Bougrier S., G. Ragueneas, E. Bachere, G. Tige & H. Grizel** (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.
- Comps M., JR. Bonami, C. Vago & A. Campillo** (1976). Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci. 3 Sci. Vie* **282**: 1991-1993.
- Estoup A., CR. Largiader, E. Perrot & D. Chourrout** (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**: 295-298.
- Felsenstein J.** (1993). PHYLIP (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Department of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.

- Folmer O., WH. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294-299.
- Grizel H. & M. Héral** (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer* **47**: 399-403.
- Héral M.** (1986). Traditional oyster culture in France. In: G. Barnabé (ed.) *Aquaculture*. Ellis Horwood Limited, pp. 345-390.
- McElroy D., P. Moran, E. Bermingham & I. Kornfield** (1991). REAP. The restriction Enzyme Analyses Package. Version 4.0. Department of Zoology, Migratory Fish Research Institute and Center for Marine Studies, University of Maine, Orono, USA
- Menzel RW.** (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**: 453-455.
- Mokady O., S. Rozenblatt, D. Graur & Y. Loya** (1994). Coral-host specificity of Red Sea *Lithophaga* bivalves: interspecific and intraspecific variation in 12S mitochondrial ribosomal DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 158-164.
- O'Foighil D., PM. Gaffney & TJ. Hilbish** (1995). Differences in mitochondrial 16s ribosomal gene-sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmeiin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **192**: 211-220.
- Smith P. J., H. Ozaki & Y. Fujio** (1986). No evidence for reduced genetic-variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New-Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **20**: 569-574.

III – PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES LIEES A CETTE ACTION DE RECHERCHE :

- Boudry P., M. Barré & A. Gérard** (1998). Genetic improvement and selection in shellfish: a review based on oyster research and production. Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM). Zaragoza, Spain, April 28-30, 1997. pp 61-75.
- Boudry P., S. Heurtebise, B. Collet, F. Cornette & A. Gérard** (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**: 279-291.
- Cochennec N., T. Renault, P. Boudry, B. Cholet & A. Gérard** (1998). Bonamia-like in the Suminoe oyster, *Crassostrea rivularis* (Gould) reared in France. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**:193-197.
- Leitao A., P. Boudry, JP. Labat, C. Thiriote-Quévieux** (1999). Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* **41**: 175-186.
- Leitao A., C. Thiriote-Quévieux, P. Boudry, IG. Malheiro** -chromosome banding study of three species of cupped oysters. Soumis à Genetics, Selection and Evolution.

IV – CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De 1994 à 1998, l'action de recherche "Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souches" a permis l'acquisition de connaissances dans plusieurs domaines :

1- La **revue bibliographique** (rapport 1994) sur les espèces d'huîtres creuses a montré la grande diversité des espèces existantes et le peu d'informations disponibles sur de très nombreuses espèces "mineures", car peu ou non exploitées. Ces espèces représentent néanmoins une source de variabilité potentielle importante et elles nécessitent d'être mieux connues : répartition géographique, caractéristiques biologiques et écologiques. Les fiches descriptives de chaque espèce seront réactualisées régulièrement.

2- Les essais d'acclimatation ont été nombreux, mais les tentatives de reproductions ont souvent été rendues difficiles par le confinement indispensable aux espèces introduites. Des **croisements inter-spécifiques** ont pu être réalisés et ont permis de confirmer les possibilités d'hybridations de certaines espèces avec *C. gigas*. Compte tenu des risques liés à l'introduction de nouvelles espèces dans le milieu naturel, ces espèces restent confinées au sein du conservatoire de souche, ce qui limite les possibilités de testage à des expérimentations de laboratoire (résistance à des maladies, physiologie...). Par contre, le testage à plus grande échelle (milieu extérieur) de souches de *C. gigas* en provenance de divers pays est possible. Les actions initiées en 1998 (avec notamment les souches de Taiwan et sud du Japon) devraient apporter des résultats applicables à plus court terme.

3- Le développement de marqueurs moléculaires (ADN mitochondrial) permettant de distinguer différentes espèces d'huîtres creuses a été réalisé avec succès. Ces marqueurs peuvent être utilisés afin de contrôler des lots dont la spécificité est douteuse (par exemple en cas d'importation illégale). Les marqueurs microsatellites permettent des études plus fines au sein de l'espèce *C. gigas*. Les populations locales montrent des niveaux de variabilité équivalents aux populations asiatiques dont elles sont issues.