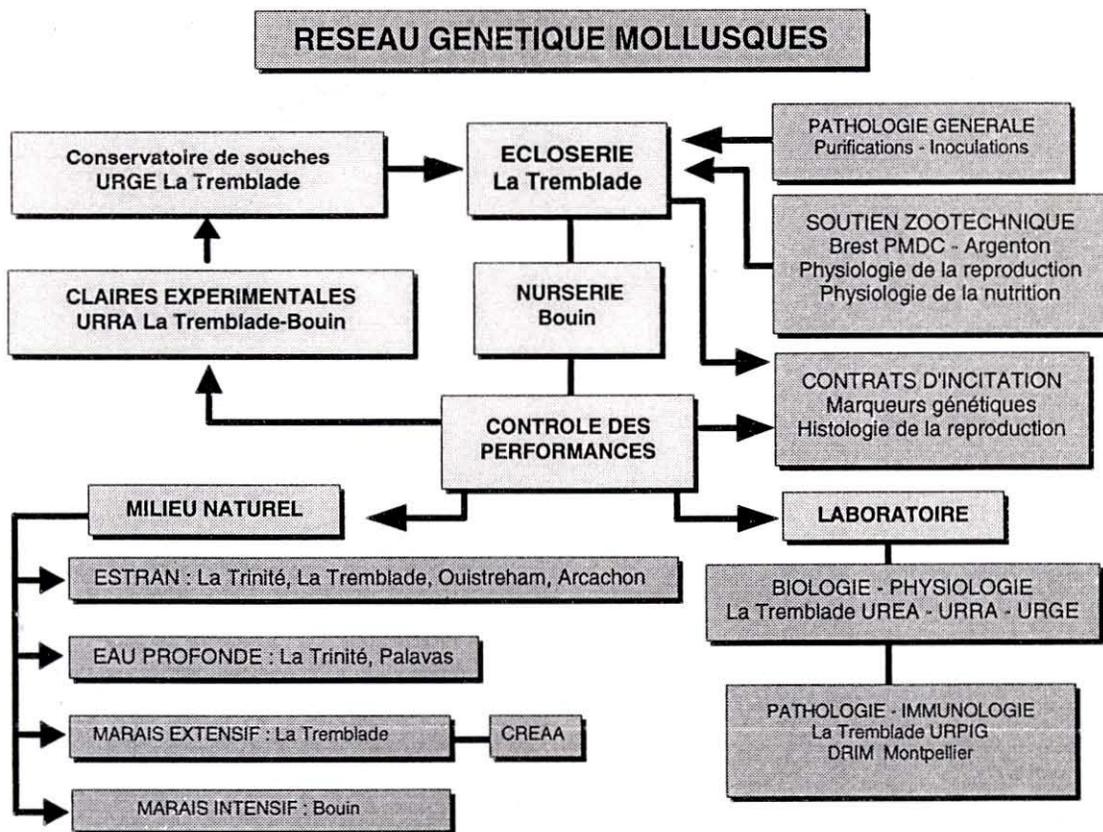


# REGEMIO

## Réseau Génétique Mollusques

Compte rendu de la réunion des 13 et 14 décembre 1993  
Nantes



## COMPTE-RENDU DE LA REUNION

Cette réunion des membres du Réseau Génétique Mollusques avait pour objet de faire un bilan provisoire des actions en cours et surtout de mettre en place les protocoles et les calendriers du début de l'année 1994. Je tiens particulièrement à remercier l'équipe DEL d'Arcachon pour sa contribution au programme de contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes et pour sa participation à cette réunion.

La première demi-journée a été réservée à un exposé de Yamama NACIRI sur les bases de la Génétique Quantitative et ses applications dans le cadre des programmes de sélection des mollusques. Afin de conserver une trace de ce "magistral" exposé, les photocopies des transparents vous sont fournies en annexe I.

La deuxième demi-journée a été consacrée au bilan des actions de 1993. Les représentants de chaque site, intervenant dans une opération du réseau en 1993, ont fait une présentation orale de leurs résultats. Un résumé de chaque intervention vous est fourni dans ce document. Il est important de souligner que tous ces bilans sont provisoires, en premier lieu parce que toutes les analyses biochimiques et les contrôles de ploïdie par imagerie numérique ne sont pas achevés, et que d'autre part, les contrôles des performances des populations diploïdes et triploïdes doivent se poursuivre en 1994. En conséquence, il serait hasardeux de statuer sur les avantages ou les inconvénients de la triploïdie sans avoir un suivi complet sur deux années. Actuellement seul le site d'Arcachon, où l'impact de la reproduction a été le plus fort, présente dès la première année des différences significatives entre diploïdes et triploïdes. Ces observations ne sont pas surprenantes puisque les performances des triploïdes ne deviennent théoriquement supérieures à celles des diploïdes, qu'après une réelle période de reproduction. Rappelons que selon Héral & Deslous-Paoli (1989), le poids des gamètes représente 7% de celui de la chair pour l'huître de 1 an, 60% pour celle de 2 ans et 80% à 3 ans.

Les présentations ont portées sur:

### URGE La Tremblade :

- Bilan des expériences réalisées dans le cadre du programme sélection huître plate *Ostrea edulis*.
- Bilan des expériences réalisées dans le cadre du programme CEE-AIR1 sur l'induction de la triploïdie par rétention du premier ou du deuxième globule polaire.
- Recherche de marqueurs génétiques :
  - ⇒ Clonage et identification de marqueurs génétiques hypervariables (microsatellites) chez *Ostrea edulis*.
  - ⇒ Déterminisme génétique du polymorphisme de la pigmentation chez *Ruditapes philippinarum*.
- Bilan de l'acclimatation et des essais d'hybridation de *Crassostrea virginica*.

#### URRA-Bouin :

- Le prégrossissement de juvéniles en nurserie intensive.
- Bilan de l'acclimatation et des essais d'hybridation de *Crassostrea virginica*.
- L'influence de la polyploïdisation sur les performances de l'huître creuse élevée à différents niveaux trophiques.

#### UDC-Palavas :

- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître plate *Ostrea edulis* en site profond.
- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* en site profond.

#### DEL-Arcachon :

- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* sur estran.

#### URRA-La Tremblade :

- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* en claire et sur estran.

#### RA-La Trinité sur mer :

- Bilan des expériences réalisées dans le cadre du programme sélection huître plate *Ostrea edulis*.
- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître plate *Ostrea edulis* en site profond.

#### Port en Bessin :

- Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* sur estran.

Après un tour de table destiné à faire le bilan du matériel biologique encore vivant dans chaque site, la troisième demi-journée a été consacrée à l'élaboration du calendrier et des protocoles pour l'année 1994. Ils vous sont fournis plus loin dans ce document. Ont également été présentées et discutées les nouvelles actions liées au contrat de plan Etat-Régions et à la possible venue de S.K. ALLEN à La Tremblade.

Les programmes de génétique présentés dans le cadre du XI<sup>ème</sup> plan vous sont fournis en annexe II. Le calendrier et les protocoles ne seront discutés que lorsque l'acceptation officielle nous sera fournie. Toutefois il faut garder en mémoire que ces nouvelles actions sont susceptibles de démarrer dans le courant de l'année 1994. Ces deux programmes ont déjà reçu un accueil favorable de la part de la Région Poitou-Charentes et de la part de la SRC de Marennes-Oléron.

Le projet d'accueil de S.K. ALLEN pour une durée de 7 mois (juin à décembre 1994), un des plus grands spécialistes de la cytogénétique des mollusques a été proposé à la DRV et à la Direction Scientifique d'IFREMER en Octobre 1993, sous la forme d'un projet de séjour post-doctoral (programme scientifique fourni en annexe III). Le Comité de Direction de l'IFREMER qui s'est réuni le 2 novembre a jugé recevable notre demande. Une aide financière

exceptionnelle de 50KF destinée à la location d'un logement a été demandée par le Directeur du Centre de Nantes à la région Poitou-Charentes. A ce jour ( rédaction de ce rapport le 10/02/94 ), cette région bien que fortement séduite par le projet ne s'est toujours pas engagée. En conséquence, la Direction Scientifique qui attend cette engagement, ne nous a toujours pas fourni d'avis officiel pour accueillir S.K. ALLEN. Celui-ci ne pouvant pas organiser son départ auprès des autorités américaines, ce projet qui était jugé particulièrement intéressant par toutes les personnes contactées, risque de ne pas aboutir.

L'importance de la valorisation des résultats a une nouvelle fois été soulignée. L'absence de Philippe GOULLETQUER, notre nouveau responsable des publications de la DRV/RA a été regretté à ce point de la discussion. Néanmoins, il a été rappelé que chaque responsable de site doit valoriser les résultats obtenus localement dans le cadre de rapports internes, de communications à des congrès, ou dans des publications nationales ou internationales. Les premiers résultats de Port-en-Bessin ont fait l'objet d'une communication au CIEM à Dublin en septembre 1993 et d'une publication qui a été soumise à "Aquaculture". Les articles de synthèse seront réalisés par La Tremblade, en associant au maximum les participants du REGEMO.

Avant de se quitter, il a été décidé que la prochaine réunion du réseau serait programmée au cours du deuxième trimestre. Elle aura surtout pour objet de présenter en détail et par site les résultats de 1993 après l'achèvement des dernières analyses (biométriques, biochimiques et analyses d'images). Si nos collègues de Palavas sont toujours d'accord pour nous accueillir, cette réunion se déroulera dans leurs murs.

André GERARD

**BILAN PROVISOIRE DES EXPÉRIMENTATIONS 1993  
EFFECTUÉES DANS LE CADRE DU  
RÉSEAU GÉNÉTIQUE MOLLUSQUES**

URGE - La Tremblade

URRA - Bouin

RA - Palavas

DEL - Arcachon

URRA - La Tremblade

RA - La Trinité sur Mer

RA - Port-en-Bessin

BILAN DES ACTIONS DE RECHERCHES MENEES EN 1993  
A L'UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE.

URGE LA TREMBLADE

André GERARD

Yamama NACIRI

Jean Marie PEIGNON

Christophe LEDU

Pascal PHELIPOT

IFREMER - URGE

BP 133

17390 La Tremblade

# BILAN DES ACTIONS DE RECHERCHES MENEES EN 1993 A L'UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE. URGE LA TREMBLADE

## Sélection d'huîtres plates résistantes à la bonamiose.

Suite à la refonte du programme de sélection en 1992 (voir compte-rendu de la réunion REGEMO du 22/12/92), l'année 1993 a été consacrée à la production d'une génération de mixage selon de nouvelles modalités (croisements contrôlés, introduction de variabilité nouvelle). Le but est de limiter les risques liés à la consanguinité et de créer des populations structurées susceptibles de permettre une évaluation de l'héritabilité de la résistance et des composantes de la variance génétique de caractères quantitatifs mesurés (croissance...). Une génération de rétrocroisement a également été produite qui devrait permettre, après inoculation du parasite, de confirmer les progrès réalisés en résistance, avant la refonte du programme. Au total, ce sont 20 élevages qui ont été réalisés et tous menés à terme. Ces huîtres ont été transférées à partir du mois de Mai à Bouin pour leur suivi en nurserie, puis en juin à La Trinité sur Mer pour la phase d'élevage en mer.

## Polyploïdisation.

Le programme de polyploïdisation s'est poursuivi, dans le cadre d'un contrat CEE-AIR1, par des essais d'induction de triploïdes chez *Crassostrea gigas* selon deux modalités différentes : rétention du premier (GP1) ou du second globule polaire (GP2). L'obtention de triploïdes par rétention du premier globule polaire s'est révélée beaucoup plus difficile que prévue (20% de succès au maximum contre 90% environ pour le second globule polaire) et la déclaration d'une infection virale dans l'écloserie à partir de Juin 93 (Herpès virus induisant la mortalité des larves dès l'âge de 4 jours) n'a pas permis de mener à terme les élevages de triploïdes. Néanmoins les techniques mises en jeu (imagerie numérique et épifluorescence) pour réaliser les quinze expérimentations de l'année 1993 ont permis une avancée déterminante dans la compréhension des processus de l'embryogenèse précoce. Un rapport CEE présentant le bilan de ces expériences a été rédigé en fin d'année. Il est confidentiel mais peut être consulté à La Tremblade. Toutefois, afin d'illustrer ce document, nous vous présentons dans les figures 1, 2 et 3, les développements embryonnaires précoces d'un diploïde, d'un triploïde de méiose I, et d'un triploïde de méiose II, et, en figure 4 une planche de développements anormaux.

A la suite d'une réunion de tous les partenaires du programme à Plymouth en octobre 1993, il a été décidé de reprendre ces essais en 1994 non seulement sur *Crassostrea gigas*, mais également sur *Ostrea edulis*. Lors d'essais préliminaires, cette dernière espèce avait donné de meilleurs résultats dans la rétention du premier globule polaire. Ces huîtres plates transportées à Plymouth en octobre 1992, ont permis de mettre en évidence des caractéristiques physiologiques fondamentalement différentes entre les triploïdes obtenus par rétention du GP1 et ceux obtenus par rétention du GP2. Ces résultats sont en cours de publication (JEMBE).

### **Recherche de marqueurs génétiques.**

L'étude du déterminisme génétique de la pigmentation de *Ruditapes philippinarum* s'est principalement effectuée en 1993 par l'analyse des ségrégations pour ce caractère, dans 34 descendance issues de 4 plans de croisements différents. Les premiers résultats laissent supposer l'intervention d'au moins deux gènes distincts.

La recherche de marqueurs génétiques neutres hypervariables (microsatellites) peut apporter des solutions aux lourdeurs des expérimentations lors de l'évaluation des paramètres génétiques. Ces marqueurs sont en effet de bons traceurs en généalogie et permettraient de rassembler des familles différentes dans une même structure avec identification à posteriori. On peut également envisager leur utilisation comme marqueur de caractères ou comme aide à la sélection. Pour réaliser ce projet, l'URGE s'est associé au laboratoire Génome et Populations de Montpellier et au laboratoire d'Aquaculture Tropicale (IFREMER-COP), pour mettre au point la technique d'obtention de marqueurs hypervariables sur un modèle mollusque (*Ostrea edulis*) et sur un modèle crustacé. Ce programme est réalisé dans le cadre des appels d'offres IFREMER en biotechnologies (voir document en annexe IV).

### **Acclimatation d'espèces non-indigènes et production d'hybrides.**

L'introduction de l'huître américaine *Crassostrea virginica* en France a été effectuée en Avril 1992, à partir d'une souche en cours d'étude en Grande-Bretagne. L'hybridation *gigas* x *virginica* s'est avérée impossible, et ces résultats ont été confirmés au même moment par une équipe de recherche américaine. Des naissains de *gigas* et de *virginica* ont été obtenus dans les mêmes conditions et suivis en 3 sites pour comparer leurs croissances respectives. Au bout d'un an de contrôle, il est d'ores et déjà possible d'affirmer que la souche anglaise étudiée ne présente pas de caractéristiques de croissance susceptibles de la rendre compétitive par rapport au témoin *gigas*. En conséquence toutes les populations de *virginica* restantes en mer ont été détruites, les géniteurs et une petite partie de la descendance sont conservés dans la salle de quarantaine de La Tremblade. L'origine de la souche pouvant être suspectée dans cette mauvaise adaptation, des pourparlers sont en cours pour introduire une souche canadienne de l'espèce.

## **Figure 1 : Embryonic development for a normal diploid.**

**1-Unfertilized ovum with non-decondensate chromosomes inside the germinal vesicular.**

**2-Spermatozoon (SPZ) entry and chromosomes condensation.**

**3-Telophasis of meiosis I.**

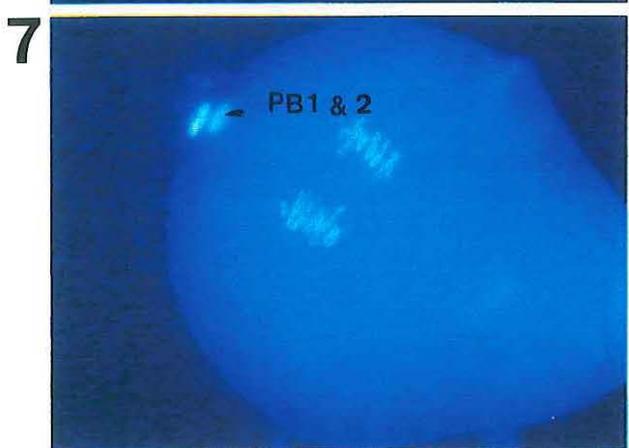
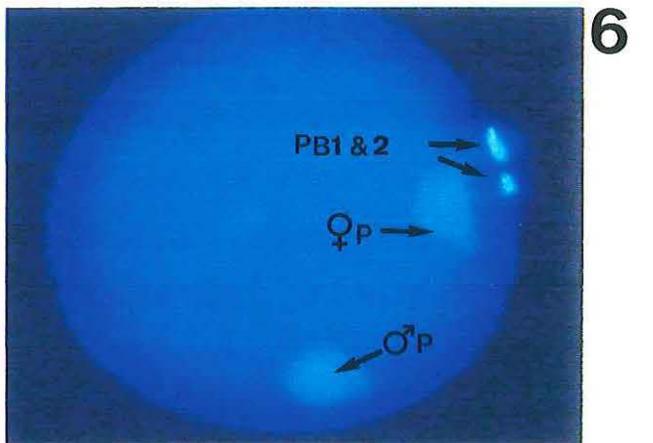
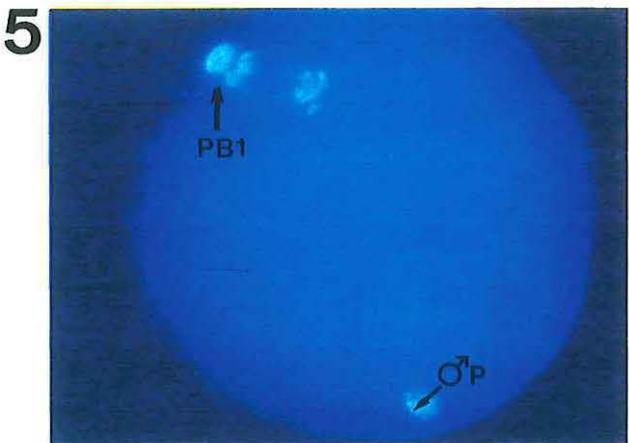
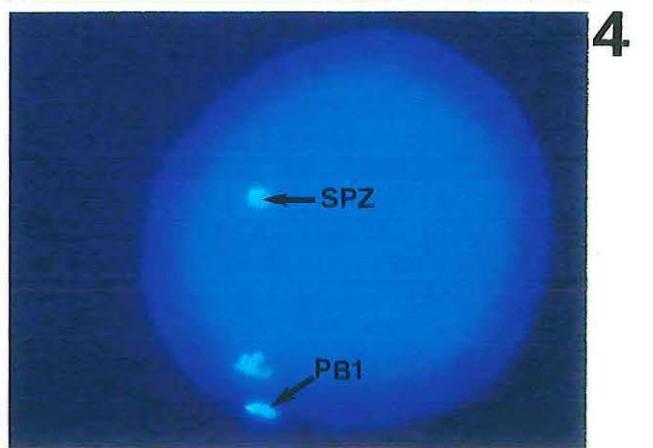
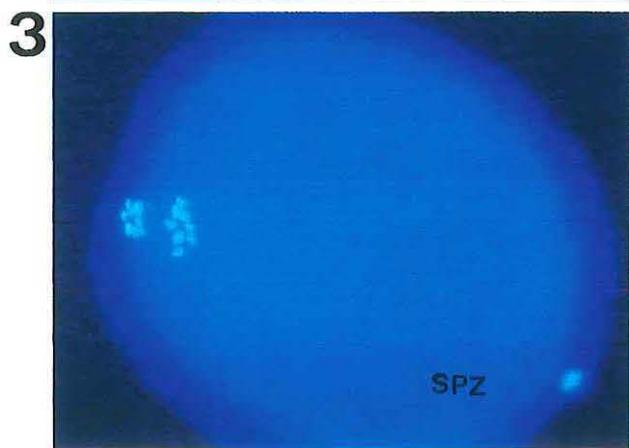
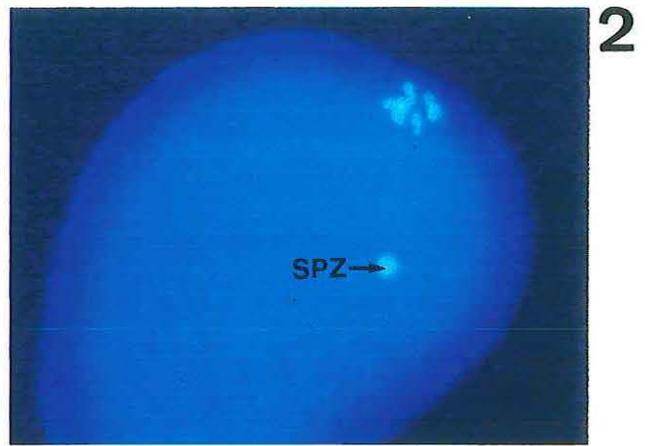
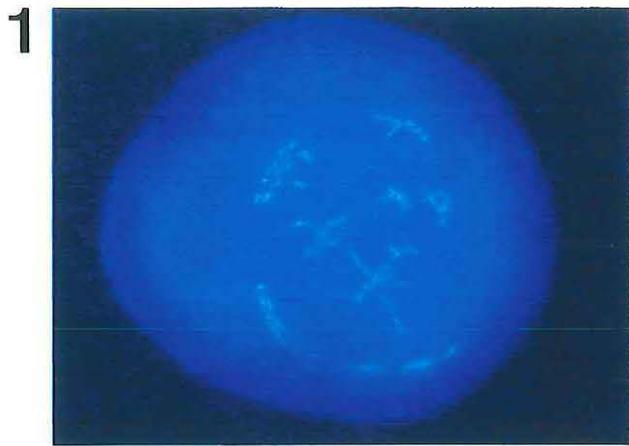
**4-Extrusion of the first Polar Body (PB1).**

**5-Telophasis of meiosis II.**

**6-Extrusion of the second polar body (PB2) and decondensation of the two pronuclei (♂ P and ♀ P).**

**7-Anaphasis of the first mitosis.**

**8-Two cells stage.**



## **Figure 2 : Embryonic development for a meiosis I triploid.**

**1-Entry of the spermatozoon (SPZ) in the ovum.**

**2-Chromosomes decondensation during the 6-DMAP treatment which inhibites the first polar body extrusion.**

**3 and 4-Chromosome recondensation after 6-DMAP rinsing and second polar body extrusion (PB2).**

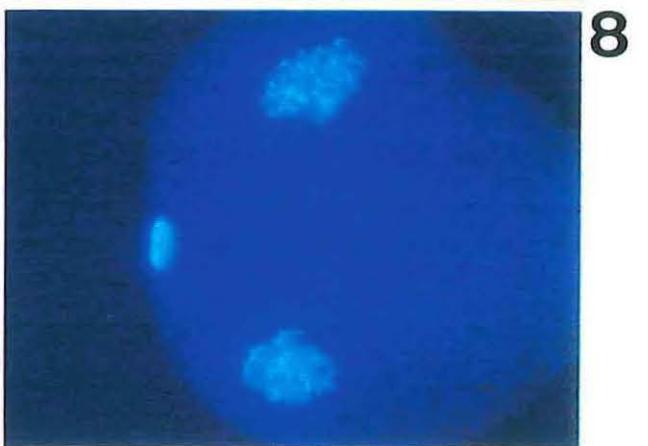
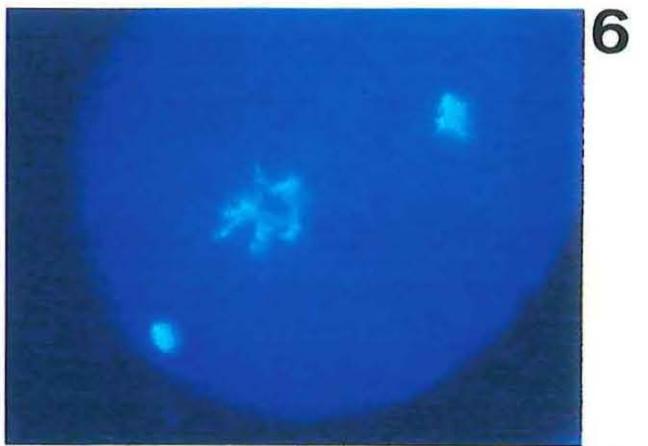
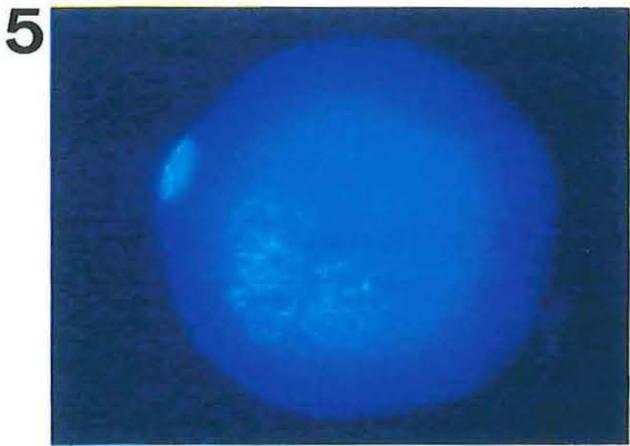
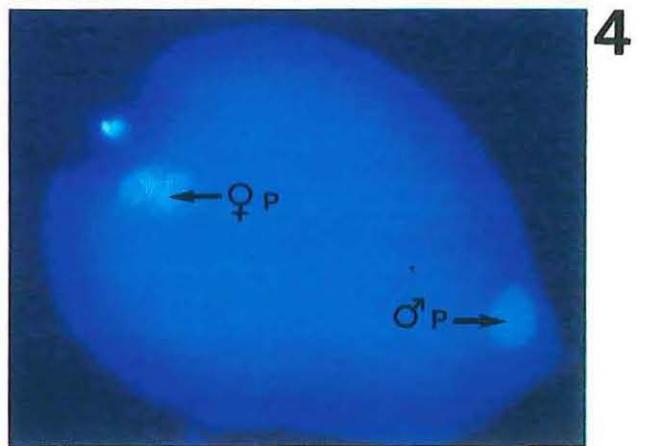
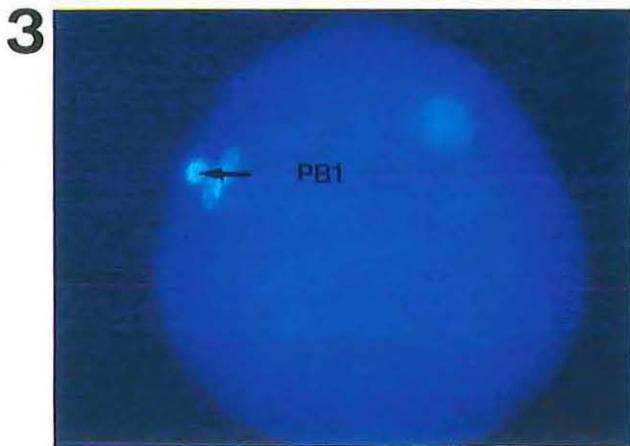
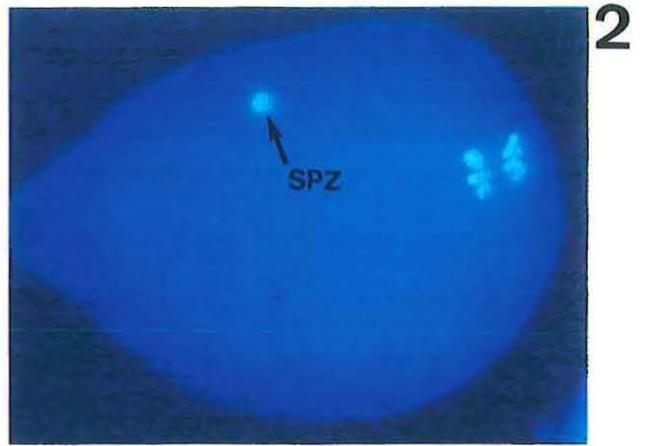
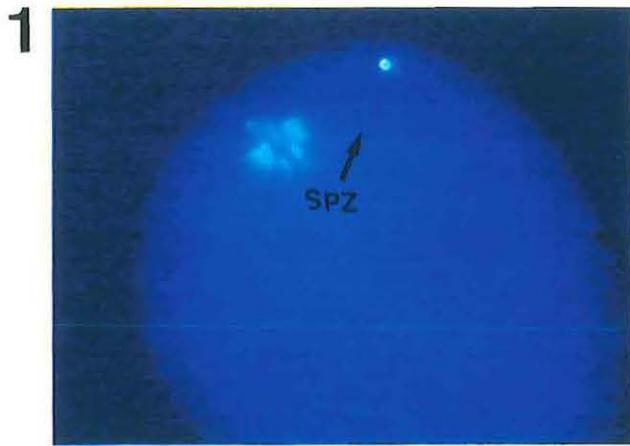
**4-Extrusion of the second Polar Body (PB2) and decondensation of the two pronuclei ( ♂ P and ♀ P).**

**5-Caryomixy.**

**6-Anaphasis of the first mitosis.**

**7-Two cells stage.**

**8-Four cells stage.**



### **Figure 3 : Embryonic development for a meiosis II triploid.**

**1-Spermatozoon (SPZ) entry in the ovum.**

**2-Telophasis of meiosis I.**

**3-Extrusion of the first polar body (PB1).**

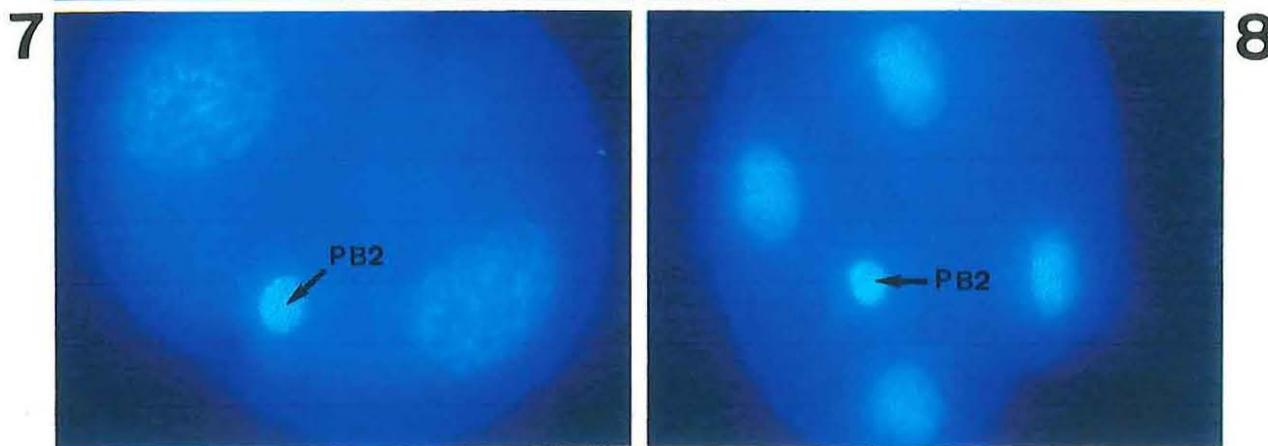
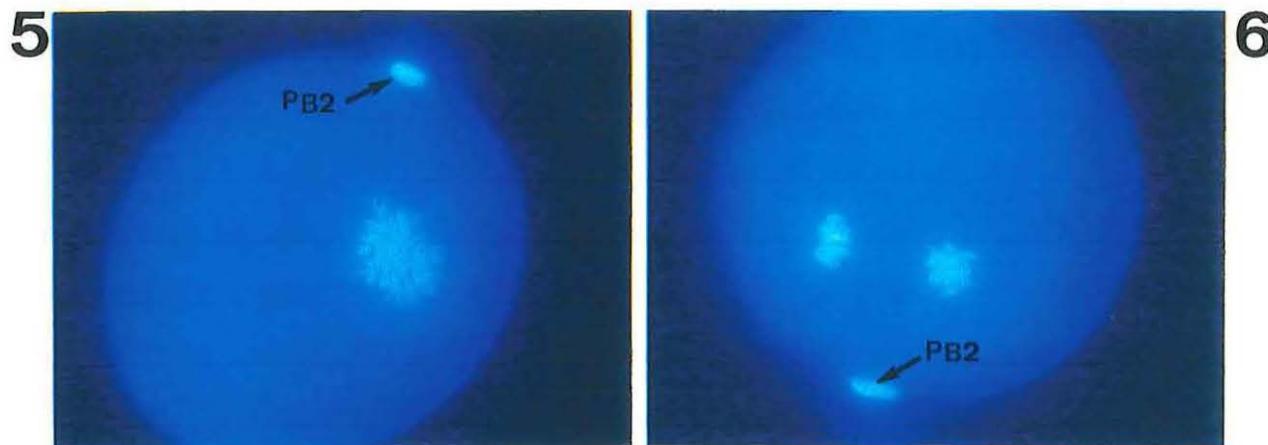
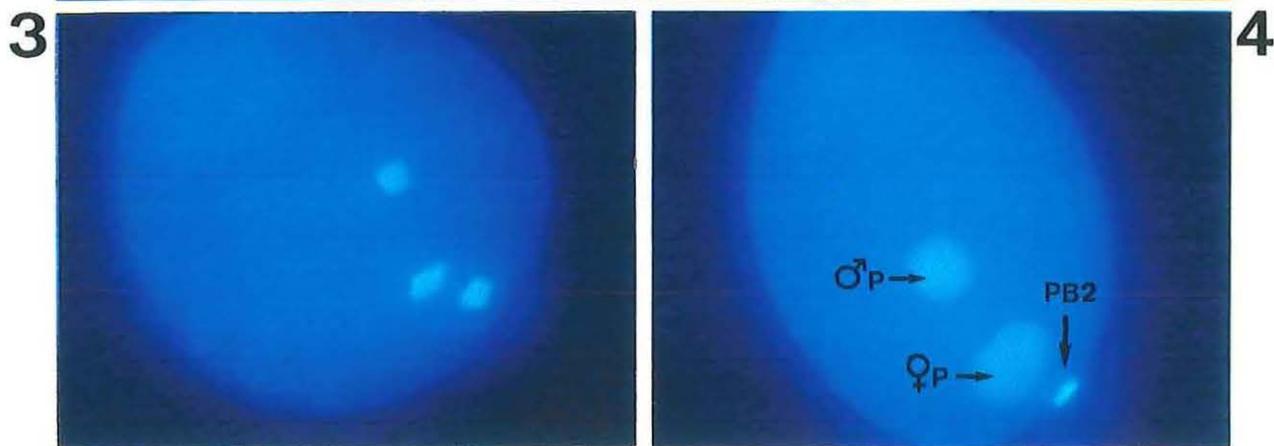
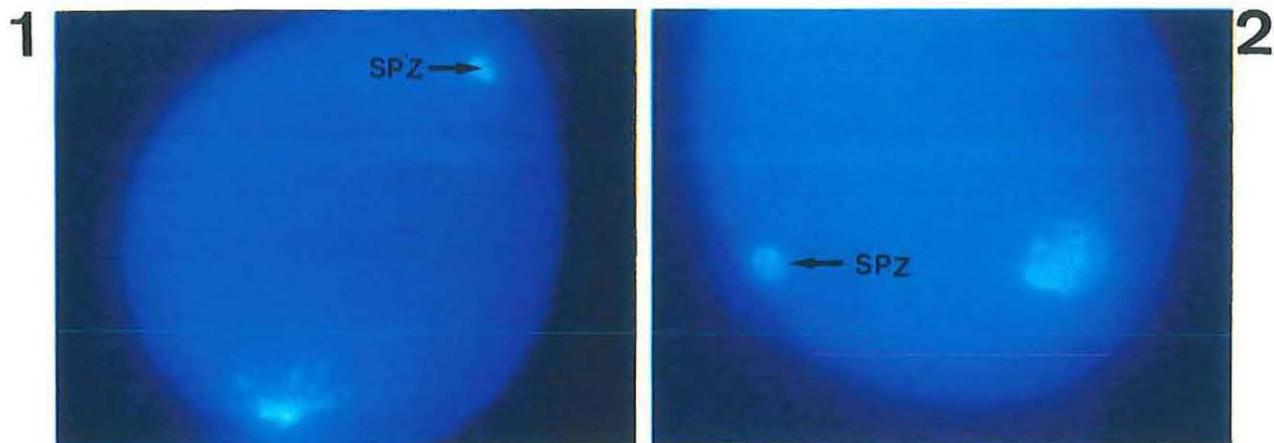
**4-Decondensation of the two pronuclei (♂ P and ♀ P).**

**5-Chromosome decondensation during the 6-DMAP treatment.**

**6-Recondensation of the two pronuclei (♂ P and ♀ P) and extrusion of the second polar body (PB2) after 6-DMAP rinsing.**

**7-Metaphasis of the first mitosis.**

**8-Two cells stage.**



## **Figure 4 : Abnormal development and chromosome damages.**

**1-Polyspermic ovum.**

**2-Polyspermic ovum with metaphasic plates.**

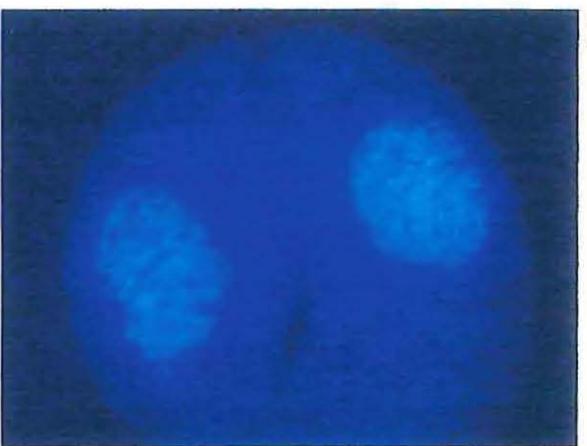
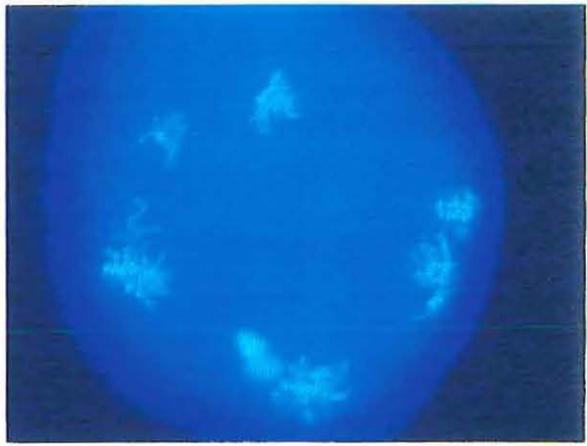
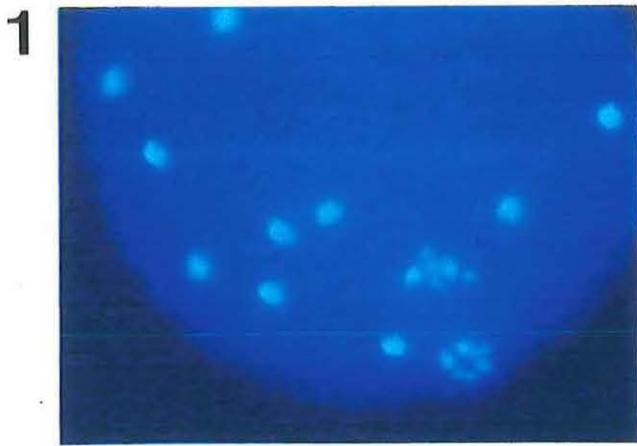
**3-Telophasis of abnormal mitotic division for a possible pentaploid embryo with no polar body extruded**

**4 & 5-Telophasis of abnormal mitotic division for a triploid embryo.**

**6-Mitotic division for a possible pentaploid embryo with no polar body extruded.**

**7-Abnormal mitotic division for a possible pentaploid with no polar body extruded.**

**8-Fertilized ovum with no subsequent development (typical confinement of the maternal chromosomes at one of the ovum pole).**



**BILAN PROVISOIRE DES EXPÉRIMENTATIONS 1993 EFFECTUÉES  
DANS LE CADRE DU RÉSEAU GÉNÉTIQUE A LA STATION**

**IFREMER/URRA de BOUIN.**

**Jean-Pierre BAUD**

**Max NOURRY**

**Joël HAURE.**

**IFREMER -URRA**

**Polder des Champs**

**85230 BOUIN**

# BILAN PROVISOIRE DES EXPÉRIMENTATIONS 1993 EFFECTUÉES DANS LE CADRE DU RÉSEAU GÉNÉTIQUE A LA STATION IFREMER/URRA DE BOUIN.

## 1. Prégrossissement de juvéniles en nurserie intensive

### 1.1 Programme sélection d'huîtres plates résistantes à *Bonamia*

#### 1.1.1 Expérience "mixage"

Le prégrossissement de 4 lots différents a été réalisé du 15 Avril 1993 jusqu'au 7 Juillet 1993. Les différents lots sont répartis de la manière suivante :

- lot témoin dont les géniteurs sont issus de méditerranée (Palavas) avec deux lots identifiés : 93-01, lots 1 et 2.
- lot témoin dont les géniteurs sont issus de Bretagne (Quiberon) avec deux lots identifiés : 93-02, lots 1 et 2.
- lot (93-06) avec mixage de la lignée résistante 89 (F1) et de la nouvelle lignée résistante 93 (FØ), réparti en quatre sous lots identifiés (1,2,3,4) correspondant à des pontes différentes.
- lot (93-07) avec mixage de la lignée résistante 89 (F1) et de la lignée 85 (F2) réparti en 6 lots identifiés (1,2,3,4,5,6) correspondant à des pontes différentes.

Du fait des contraintes biologiques de l'espèce et de la difficulté de programmation des pontes en éclosure, la réception des huîtres s'est étalé du 15 Avril au 2 Juin 1993. Cet étalement dans le temps n'a pas permis de réaliser un suivi biométrique des différents lots.

Certaines tendances peuvent cependant être identifiées :

⇒ - Sur l'ensemble des cohortes étudiées après une bonne croissance printanière, une atténuation sensible de la vitesse de croissance s'est manifestée de fin Juillet jusqu'à fin Août. Une reprise de la croissance à partir de Septembre a été enregistrée.

⇒ - Sur les lots "témoin" le phénotype "couleur" paraît bien différencié entre les deux souches:

- Palavas avec une dominante noire violacée.
- Quiberon avec une dominante jaune sable.

Cette discrimination de couleur s'atténue avec la croissance et le vieillissement des souches élevées.

⇒ Enfin, les lots "résistants" semblent dans l'ensemble moins sensibles sur le plan mortalité et plus performant sur le plan croissance que les témoins.

Après vérification de l'absence de *Bonamia* et de *Martelia* dans les analyses pathologiques réalisées sur 4 échantillons d'huîtres plates, 30 000 individus d'environ 1g (>T14) ont été envoyés pour immersion à La Trinité sur mer le 7 Juillet 1993 à raison de 7500 huîtres par lot.

Dans le même temps environ 20 000 huîtres par lot ont été stockées dans des conditions de densité et de nutrition identiques pour une étude comparée en 1994 de la potentialité de croissance, d'engraissement et de survie de ces différentes souches.

De plus, 14 lots de 250 huîtres ont été réservés pour une étude ultérieure (microsatellite) qui sera effectuée à Ronces les Bains.

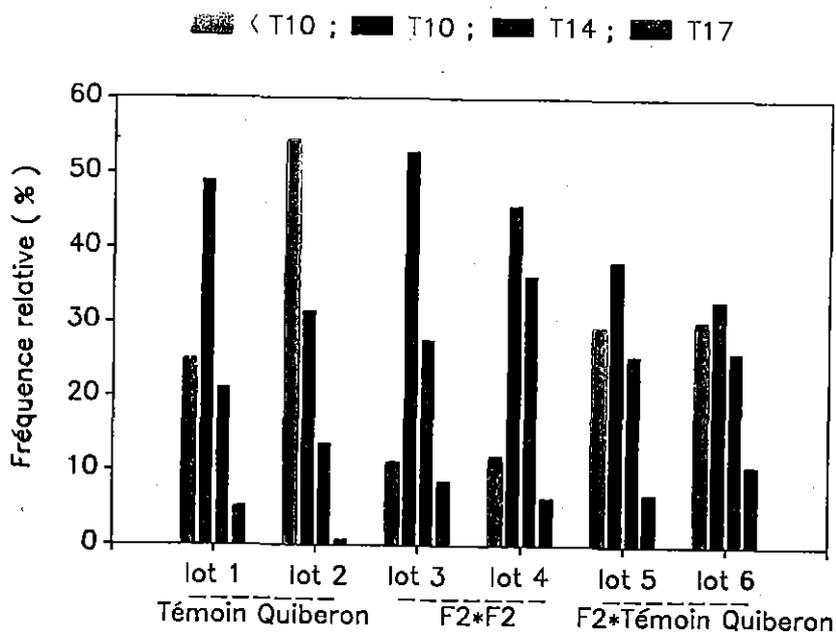
### 1.1.2 Expérience "rétrocroisement" (93.12).

Le prégrossissement de 6 lots différents a été effectué du 17 Mai au 27 Juillet 1993. Ils ont été répartis de la manière suivante :

- ⇒ lots témoins issus de géniteurs provenant de Bretagne (Quiberon), lot 1 et 2.
- ⇒ lots (F2 X F2) issus de la lignée résistante 1985, lot 3 et 4.
- ⇒ lots (F2 X témoin ) avec croisement de la lignée résistante F2- et de géniteurs provenant de Quiberon, lot 5 et 6.

Un suivi final de la répartition en classes de taille de chaque cohorte a été réalisé après 71 jours de prégrossissement. 4 familles par lot ont été identifiées par tamisage selon les normes suivantes :

< T 10 = 0,28g ; T 10 = 0,55g ; T14 = 1,55g et T 17 = 2,03g



**Fig 1** Histogramme de fréquence des classes de taille des différents croisements d'huîtres plates après 71 jours de prégrossissement.

L'histogramme des fréquences des différentes classes de taille (fig 1) montre que pour un croisement donné l'image de la population est identique pour les 2 lots considérés. Cette tendance n'est pas respectée pour le témoin Quiberon où l'on remarque d'une part, qu'il y a entre les 2 témoins inversion de la classe <T10 et T10 et d'autre part, que les classes de taille peu élevées sont prédominantes ce qui tendrait à mettre en évidence une carence du potentiel de croissance pour les lots 1 et 2 par rapport aux autres croisements représentés par les lots 3, 4, 5 et 6.

Après vérification de l'absence de protozoaires pathogènes, 7500 huîtres plates à raison de 2500 huîtres par lot ont été envoyées pour immersion à La Trinité pour étude comparée ultérieure, et 3 lots de 100 huîtres ont été conservés pour l'équipe de l'URGE.

## 1.2 Programmes de cytogénétique

### Prégrossissement des huîtres creuses *Crassostrea gigas* du programme CEE-AIR1

Après les inductions de la triploïdie par rétention du 1<sup>er</sup> globule polaire (GP1) et du 2<sup>ème</sup> globule polaire (GP2) réalisés à l'URGE sur *Crassostrea gigas*, 5 lots ont été envoyés le 15 Juin 1993 à Bouin pour être prégrossis. Parallèlement, des mortalités assez importantes étaient constatées sur tous les lots conservés à Ronces les Bains.

Lors de la réception des individus à la taille voisine de 2mm une mauvaise odeur caractéristique de mortalité de juvéniles avait été constatée. De fait de la fragilité des lots aucun suivi au cours du prégrossissement n'a été effectué. Un point final le 30 Novembre 1993 a cependant permis de comparer les lots, (Tableau 1).

Nature	Témoin	GP1			GP2
lot	L1	L2	L3	L4	L5
Taille (mm)	36,4	37,2	36,5	37,8	34,6
$\sigma$	5,0	4,6	5,6	4,7	4,6
n	30	30	30	30	29
Poids (g)	6,23	6,86	8,09	9,50	6,71

**Tableau 1** : Caractéristiques allométriques moyennes des différents lots de *Crassostrea gigas* après 168 jours de prégrossissement.

Les différents lots ont subis une mortalité qui s'est poursuivie de mi-juin à fin août. Le taux de croissance moyen est dans l'ensemble médiocre par rapport au standard de l'espèce.

Dans ces conditions la comparaison inter-lots semble délicate, surtout si l'on prend en compte les quantités d'individus qui vont de quelques dizaines à plusieurs milliers par lots. Une fois ces conditions posées, il semble qu'à ce stade de l'élevage il n'y ait pas de différence significative en taille moyenne en fonction des différents lots.

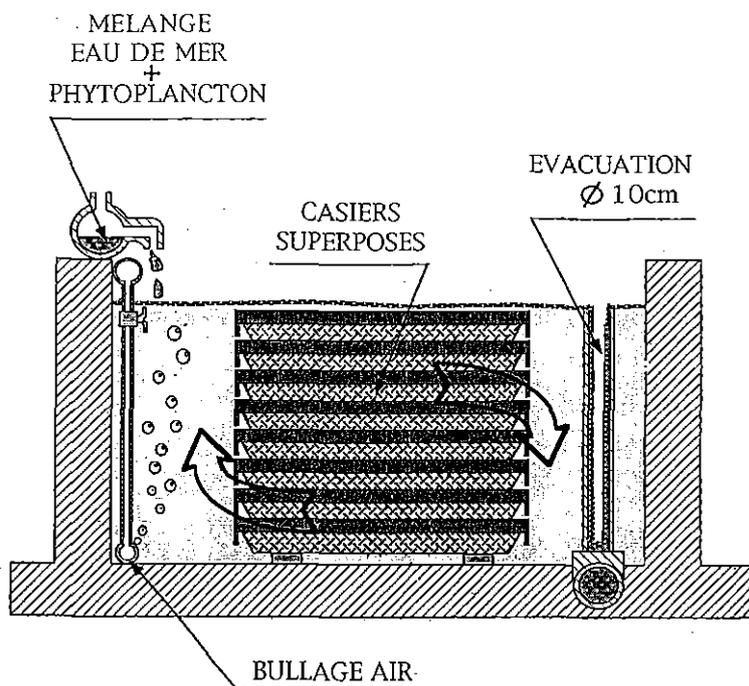
Les huîtres sont actuellement stockées dans des conditions identiques avant d'être envoyés à l'URGE au printemps pour des expériences comparées de reproduction et de croissance.

## 2 Programme d'acclimatation et d'essais d'hybridation interspécifique de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

### ***Comparaison des performances de croissance de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica* en élevage intensif.***

Le prégrossissement intensif des deux espèces du genre *Crassostrea* réalisé de Septembre à Décembre 1992 a mis en évidence un taux de croissance, exprimé en taille et poids, supérieur pour *Crassostrea gigas* par rapport à *Crassostrea virginica*. Les taux de survie étaient sensiblement identiques pour les deux espèces.

Après un stockage hivernal et une nouvelle phase de prégrossissement printanier dans des conditions identiques, une expérience de grossissement intensif a été menée du 18 Mai au 28 Septembre 1993. Les huîtres ont été placées dans des structures expérimentales décrites dans la figure 2.



**Fig.2** Schéma de l'installation d'une enceinte expérimentale d'élevage

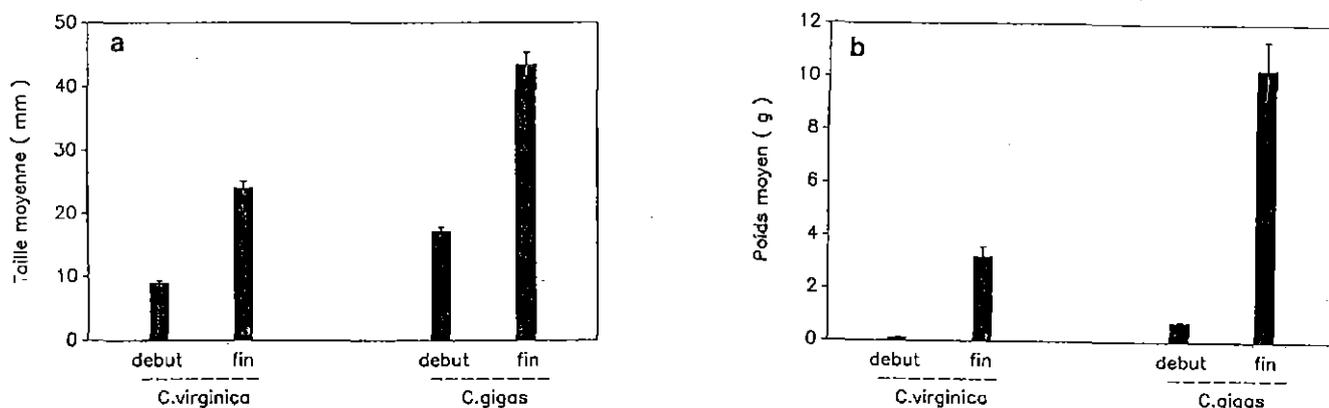
L'enceinte de 1m de longueur, 0,5m de largeur et 1m de hauteur est en béton et contient des casiers en plastique ajourés superposés sur 8 niveaux. Un système de bullage assure l'homogénéisation et l'apport d'oxygène. L'évacuation se fait par une dérivation et permet un maintien constant de la même hauteur d'eau. Un bac contenant le mélange d'eau de mer (87%) et de

phytoplancton (13%) alimente individuellement chaque enceinte, par pompage à raison de 167l d'eau de mer enrichie par heure.

Après tamisage des 2 populations, le corps de lot pour chaque espèce a été isolé et les huîtres ont été placées dans chaque casier à raison de 200 individus. La différence de croissance obtenue lors du prégrossissement a été conservée pour les populations initiales :

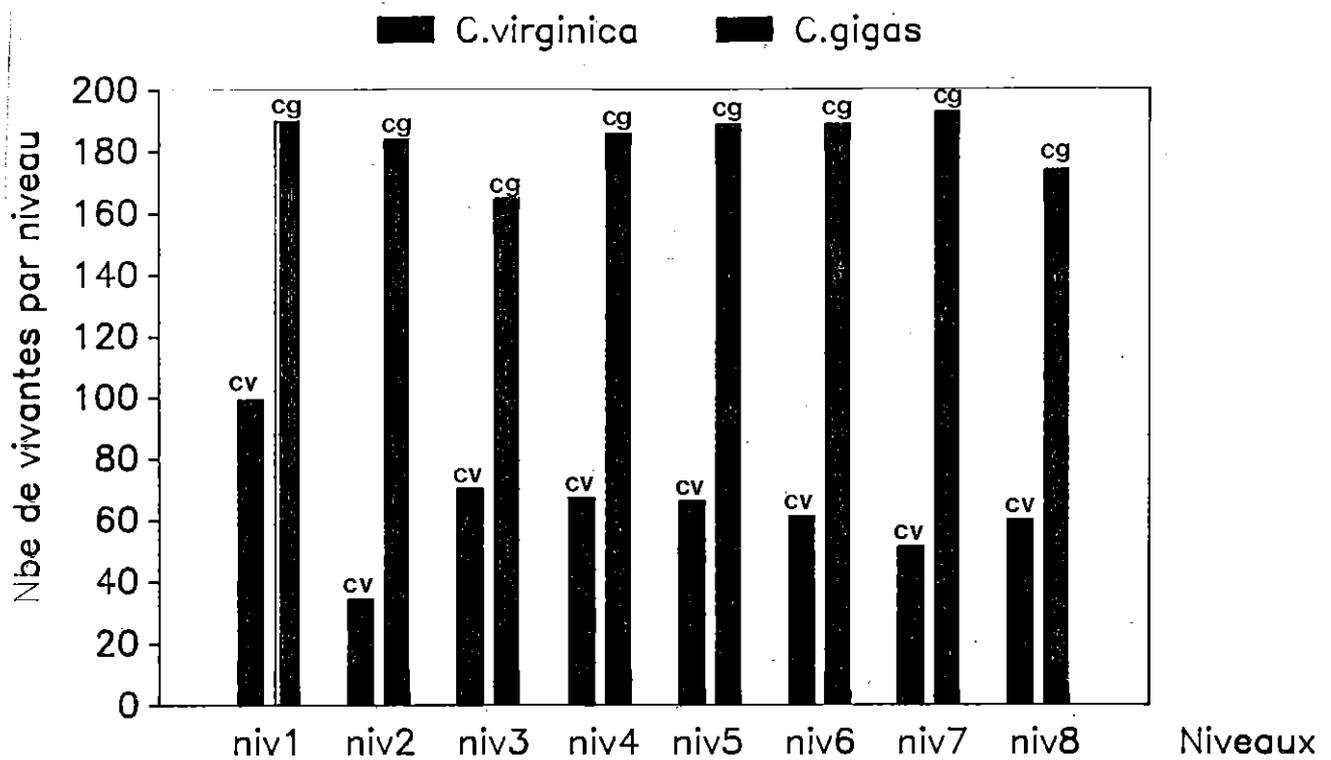
<i>Crassostrea gigas</i> :	Taille = 17,1mm	$\sigma = 2,30$	n = 50
	Poids = 0,74g	$\sigma = 0,22$	n = 50
<i>Crassostrea virginica</i> :	Taille = 9,0 mm	$\sigma = 1,33$	n = 50
	Poids = 0,15g	$\sigma = 0,05$	n = 50

Au terme de 133 jours d'élevage la différence de croissance s'amplifie au bénéfice de l'huître japonaise qui avec 43,3 mm et 10,31 g de poids moyen (fig. 3a et 3b) représente 3 fois le poids de *Crassostrea virginica*.



**Fig 3** Croissance comparée de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica* en taille (a) et poids (b) après 133 jours d'élevage.

Le taux de survie est également meilleur pour l'huître japonaise (92%) avec une mortalité faible répartie de façon aléatoire par niveau d'élevage, (fig.4) par rapport à l'huître américaine (31,5%).



**Fig.4** : Nombre d'huîtres vivantes par espèce et par niveau en fin d'élevage.

Ce bilan provisoire met en évidence une très mauvaise adaptation de la souche *Crassostrea virginica* aux conditions d'élevage intensif. Il faut cependant noter que la croissance de l'huître japonaise dans les mêmes conditions est peu satisfaisante. Il serait intéressant dans un avenir proche de tester une nouvelle souche de *Crassostrea virginica* avec des conditions d'élevage améliorée pour pouvoir tirer des conclusions définitives sur l'acclimatation de cette espèce dans nos eaux.

### 3 Influence de la polyploïdisation sur les performances de l'huître creuse *Crassostrea gigas* élevée à différents niveaux trophiques.

#### 3.1 Introduction

La mise au point d'une technique d'élevage intensif de l'huître plate en bassin a permis de faire croître 800 individus dans 2m<sup>3</sup> d'eau de mer enrichie avec la diatomée *Skeletonema costatum* pour un taux de renouvellement d'environ 200% par jour. Ce procédé (figure 2) autorise la mise en oeuvre d'expérimentations à différents niveaux trophiques avec replicats permettant l'exploitation statistique des résultats.

Ainsi, une étude de l'influence de la polyploïdisation sur les performances de croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas* a pu être réalisée à partir du 15 Mai jusqu'à fin Octobre 1993 selon trois niveaux de nourriture (Ø, 1 et 3). Chaque niveau trophique est dupliqué pour

donner 6 bassins qui comportent chacun 8 casiers superposés dont 4 plateaux d'huîtres diploïdes et 4 plateaux d'huîtres triploïdes à raison de 60 individus par niveau.

### **3.2 Résultats**

Le traitement des résultats n'a pu se faire que jusqu'à fin Juillet. Les analyses manquantes seront faites durant le premier semestre 1994.

L'évolution des paramètres comme la température, la salinité, le pH et l'oxygène ne mettent pas en évidence de facteurs limitants pour la production de l'huître *Crassostrea gigas*.

#### 3.2.1 Caractéristiques nutritionnelles du milieu.

Le flux énergétique d'entrée est en moyenne de :

60 pour N = Ø , 120 pour N = 1 et 180 joules / l pour N = 3.

On enregistre des fluctuations relativement importantes de ce flux qui sont lissées en sortie où la prise est moyenne pour N = Ø et forte pour N = 1. Le niveau de sortie est proche de 40 joules / l pour ces deux niveaux trophiques alors que le flux de sortie suit les fluctuations de l'entrée pour les niveau 3 (fig.5). En conclusion les flux énergétiques N = Ø et 1 semblent correspondre aux besoins des huîtres en élevage alors qu'il est excédentaire pour le niveau 3.

#### 3.2.2 Evolution de la croissance et de la mortalité des huîtres diploïdes et triploïdes

##### ***Mortalité***

La mortalité observée au cours de l'étude est plus élevée chez les individus triploïdes que chez les individus diploïdes quelque soit le niveau de nourriture, (fig.6). Le taux de mortalité est important au début de l'expérience (33%) et se stabilise pour les niveaux de nourriture N = Ø et N = 1. Pour le niveau 3 la mortalité a atteint 83% dès la fin du mois de Juin, c'est pourquoi l'étude de ce niveau trophique a été interrompu à partir de Juillet.

##### ***Croissance pondérale***

Les huîtres diploïdes enregistrent une croissance en poids plus rapide pour le niveau de nourriture N = 1 (11g) que pour le niveau N = Ø (9g). Pour le niveau N = 3 la prise en poids a été rapide dès le début de l'étude et s'est stabilisée mi-juin, fig.7.

Les huîtres triploïdes enregistrent une croissance identique pour les niveaux N = Ø et N = 1 en début de période, par la suite la croissance est plus importante pour le niveau N = Ø (15g) que pour le niveau N = 1 (12g). Pour le niveau N = 3, on constate une perte de poids.

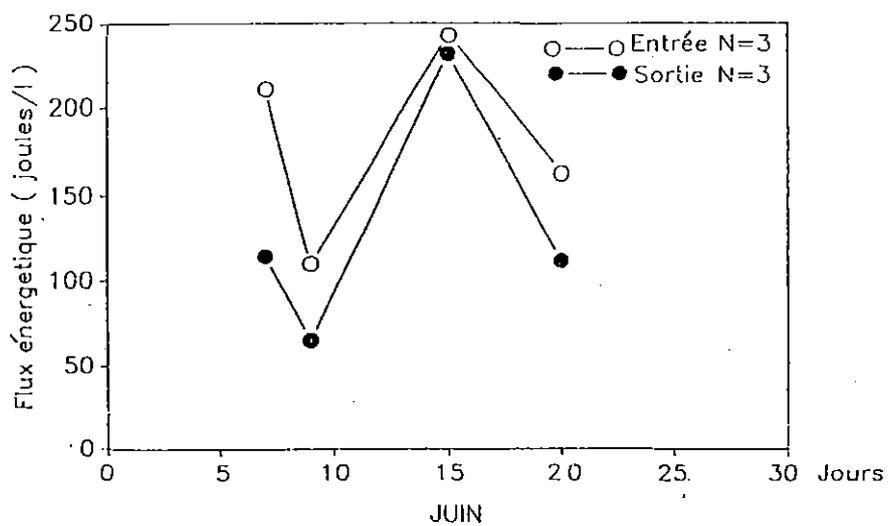
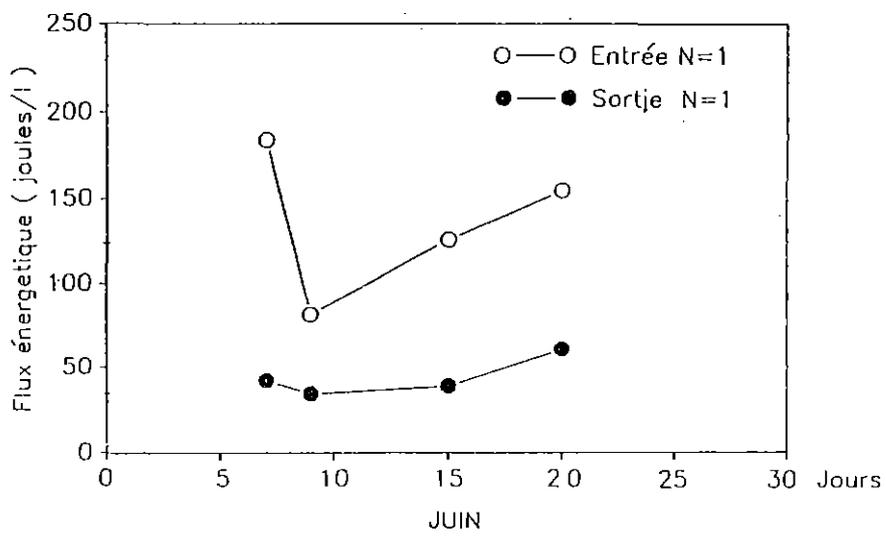
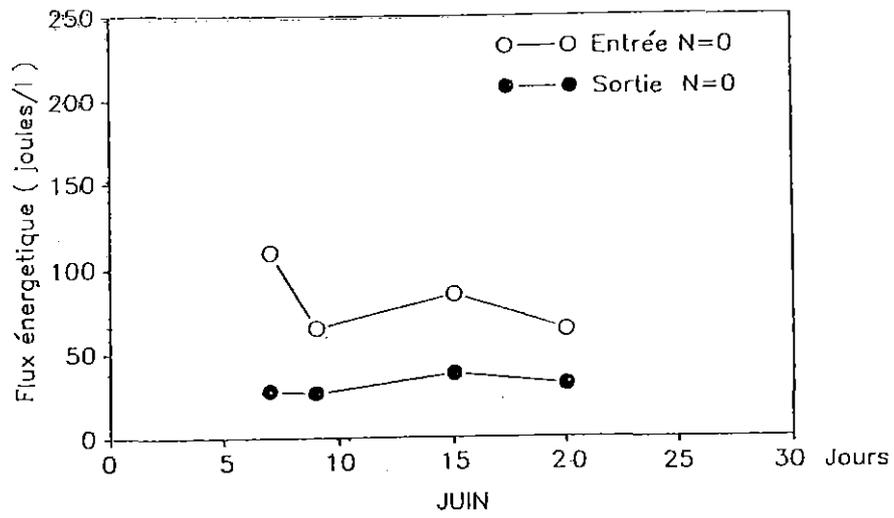
Cependant l'analyse des histogrammes de classes en poids (fig.8) montre que la répartition des classes pour la population triploïde est plus hétérogène (8 classes de 5g) que celle de la population diploïde (3 classes de 5g).

### *Évolution des composés biochimiques.(fig.9)*

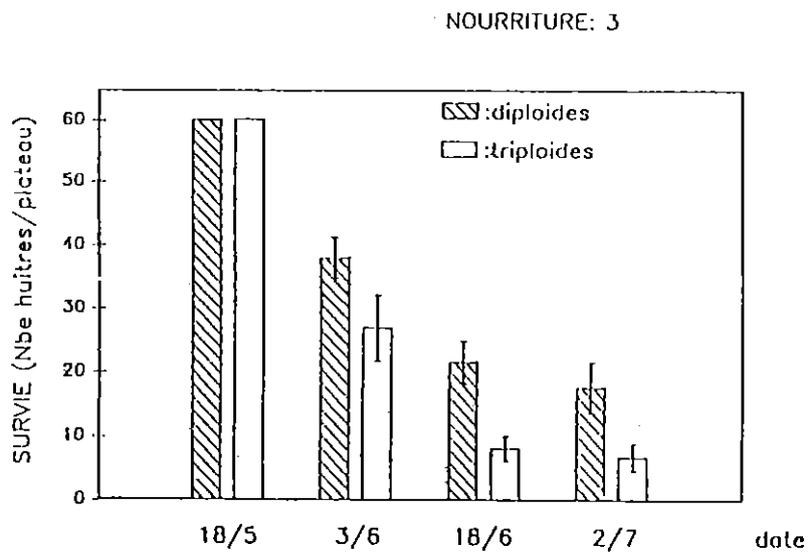
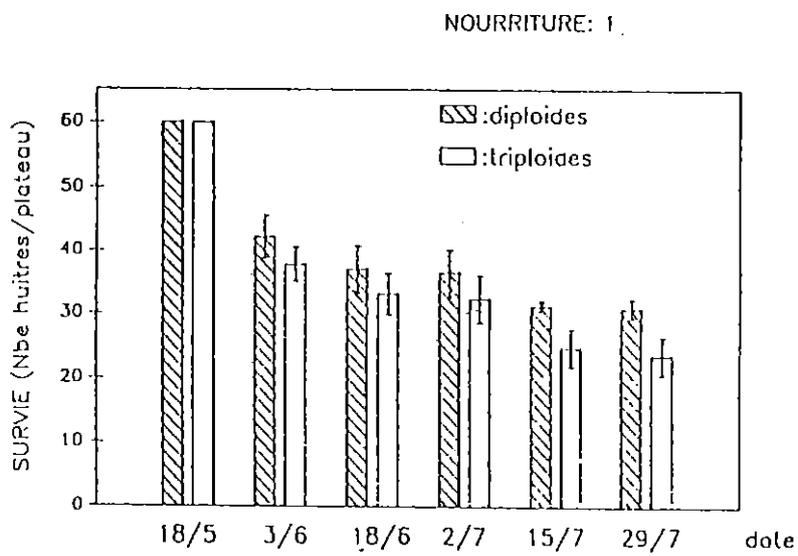
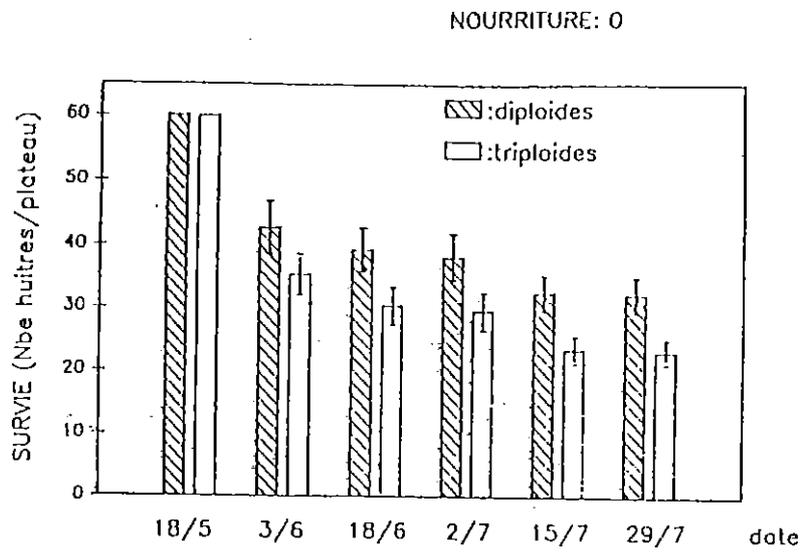
Les protéines, éléments majoritaires, représentent 32% à 40% du poids sec. Après une stabilisation, voir une diminution de leur teneur au début de l'étude, les concentrations réaugmentent jusqu'à la fin de l'expérience. Les sucres totaux sont représentés à plus des 90% par le glycogène. Quelque soit le niveau de nourriture les concentrations glucidiques sont plus importantes pour les huîtres triploïdes que pour les diploïdes. L'évolution des teneurs lipidiques des huîtres triploïdes reste stable alors qu'elle augmente fin Juin pour le niveau 1 chez les diploïdes.

### **3.3 Conclusions**

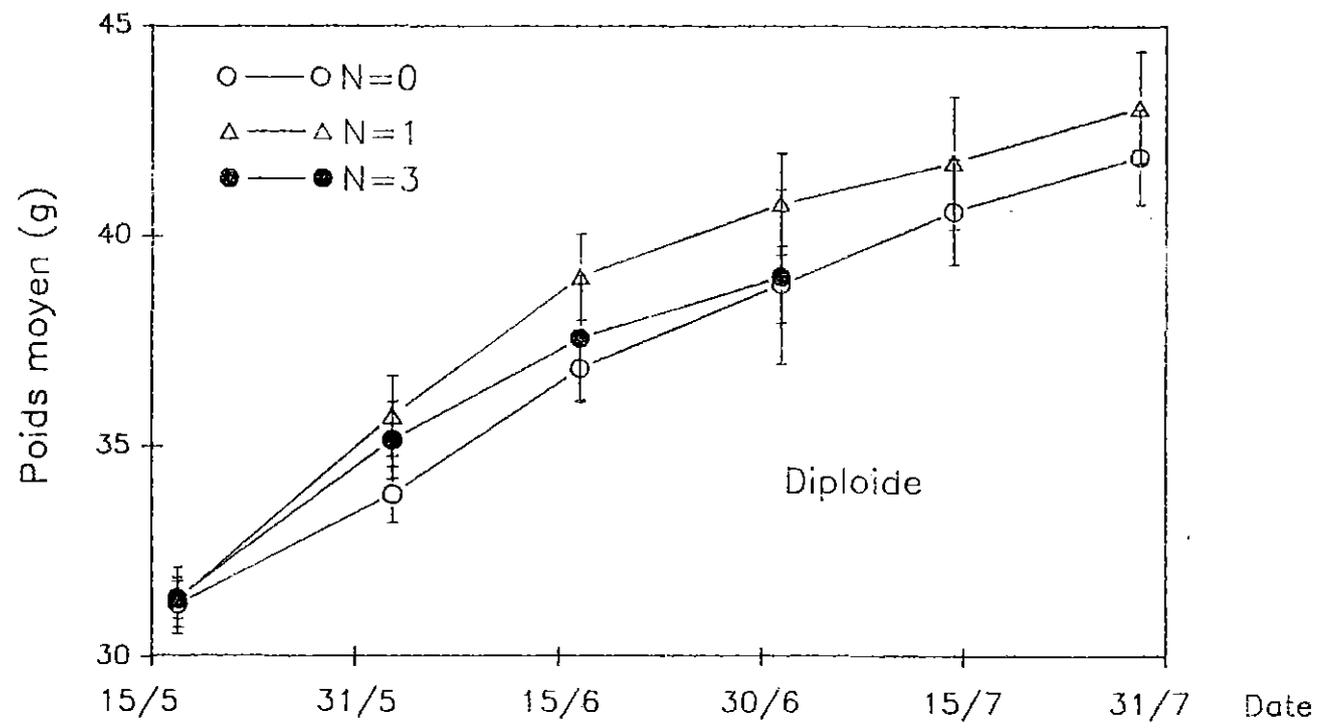
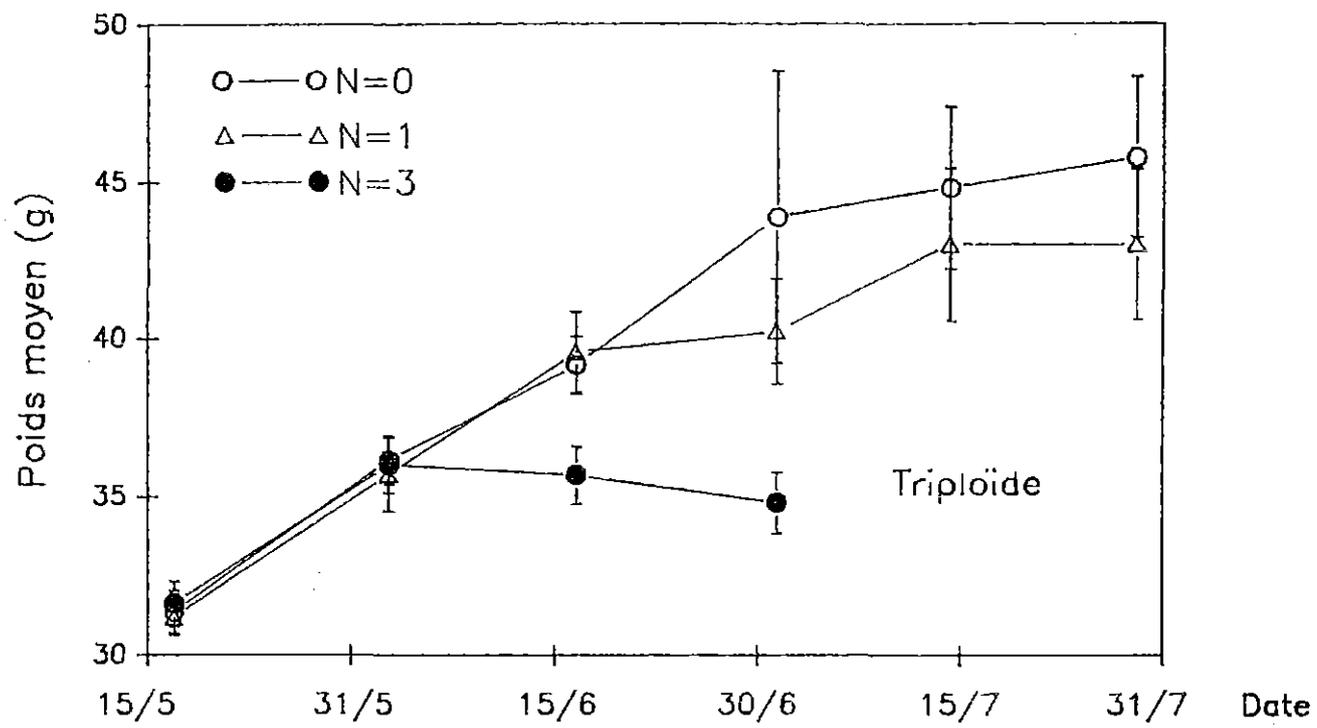
En première analyse, on remarque qu'un excès de nourriture implique une forte mortalité sur l'huître creuse triploïde et diploïde. Les triploïdes semblent être plus fragiles aux facteurs environnementaux et mieux optimiser les niveaux trophiques faibles ( $N = \emptyset$ ) dans notre étude que les diploïdes qui s'accommodent d'un niveau trophique intermédiaire ( $N = 1$ ). Même si la croissance moyenne est légèrement supérieure pour les triploïdes la répartition en classes de poids des deux populations montre une hétérogénéité beaucoup plus grande pour ces derniers par rapport aux diploïdes. Les teneurs en glycogène sont supérieures aux lipides et beaucoup plus stables chez les triploïdes vis à vis des diploïdes.



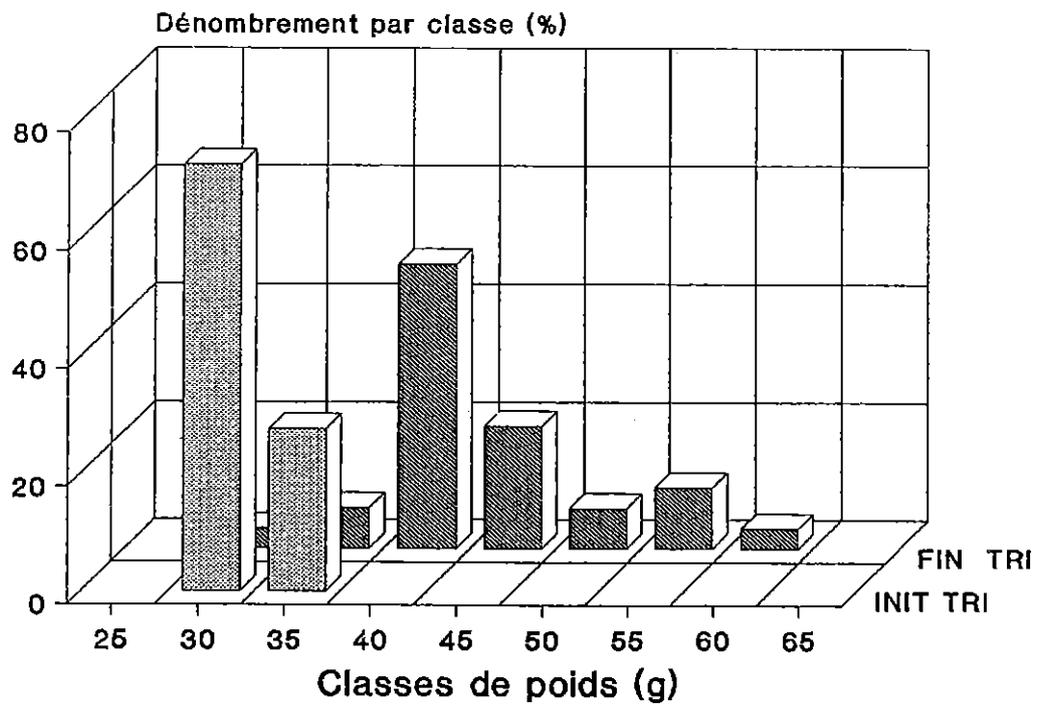
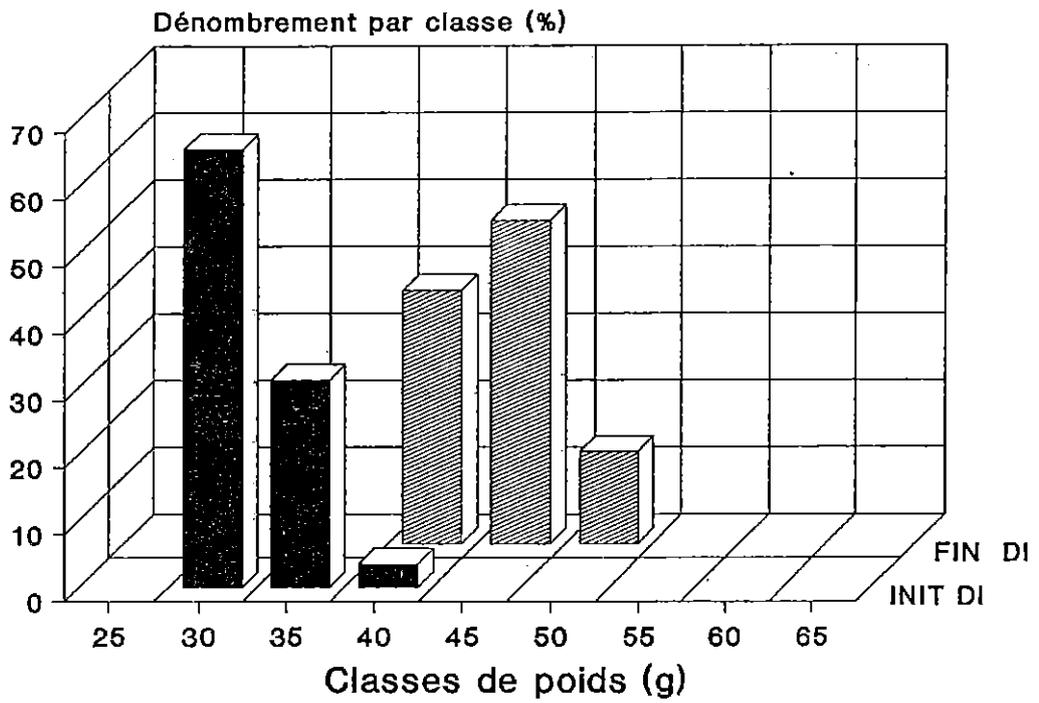
**Fig 5** Evolution des flux nutritifs d'entrée et de sortie des structures d'élevage par niveau de nourriture



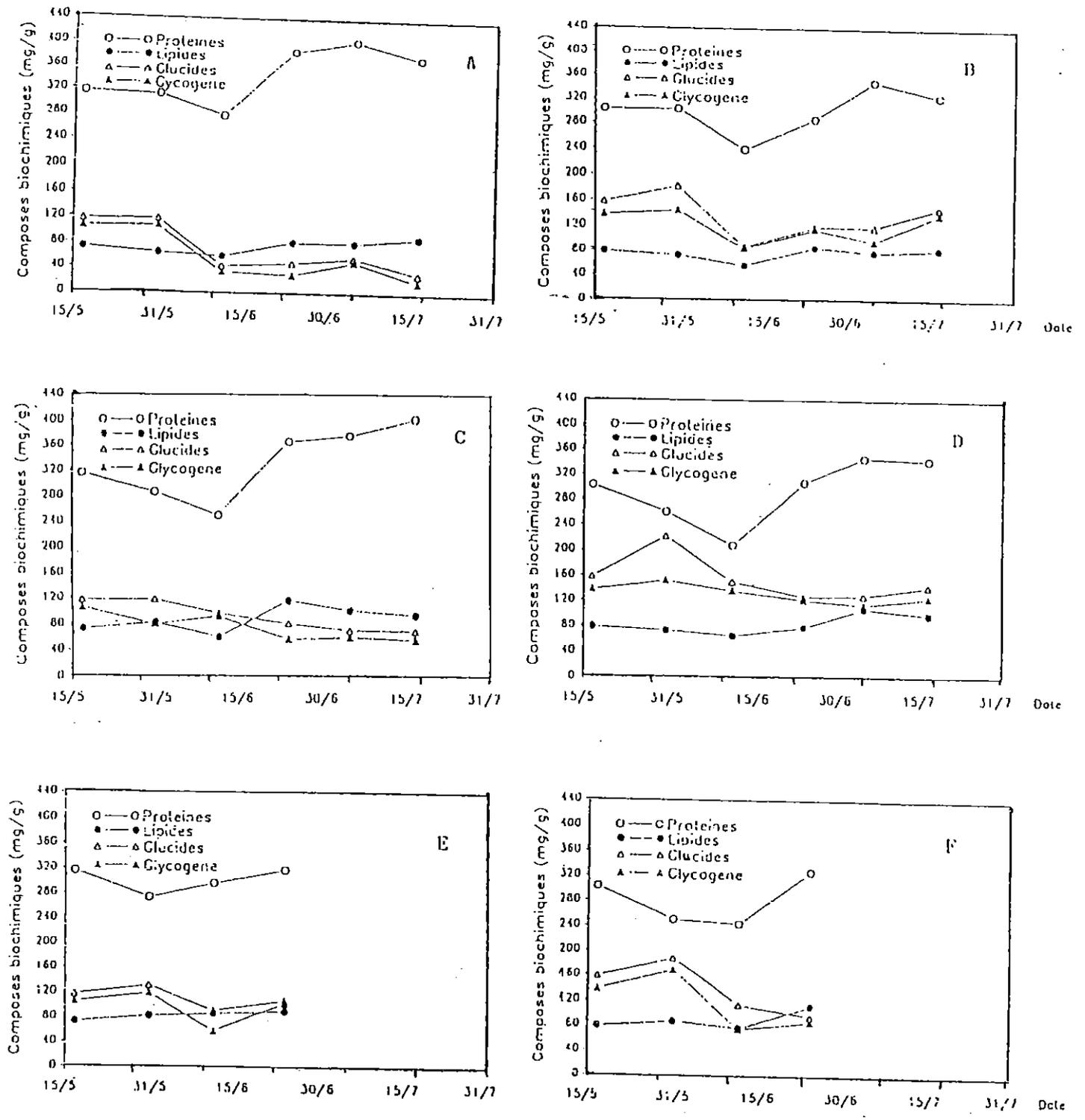
**Fig. 6** Evolution du taux de survie des huîtres diploïdes et triploïdes par niveau de nourriture



**Fig. 7** Evolution du poids moyen des huîtres triploïdes et diploïdes.



**Fig 8** Répartition en classes de poids de la population initiale et finale chez *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes.



**Fig 9** Evolution de la teneur des composés biochimiques de la chair des huîtres diploïdes et triploïdes à différents niveaux de nourriture (diploïdes : A, N=0; B, N=1, C, N=3), (triploïdes : B, N=0; D, N=1; F, N=3)

**BILAN DES ACTIONS DE RECHERCHES MENEES EN 1993  
A L'UNITE DE DIVERSIFICATION CONCHYLICOLE.  
DE PALAVAS**

**Denis COATANEA**

**Jocelyne OHEIX**

**Catherine VERCELLI**

**Jean Michel CHABIRAND**

**IFREMER-Palavas**

**Unité Diversification Conchylicole**

# BILAN PROVISOIRE DU CONTROLE DE PERFORMANCES DE POPULATIONS DE POLYPLOIDES D' *OSTREA EDULIS* ET DE *CRASSOSTREA GIGAS*

## 1. INTRODUCTION

Depuis Mai 1992, la Station de Palavas est impliquée dans le réseau génétique Mollusques avec l'espèce *Ostrea edulis*. En 1993, un autre suivi a été réalisé sur un lot de diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas*.

Les élevages se sont déroulés sur la concession en mer des Aresquiers (Figure 1), par 23 mètres de fond, en poches ostréicoles disposées sur des containers Michel Frères reconditionnés (Figure 2).

Hormis quelques brefs pics estivaux, les conditions de température au voisinage du fond sont demeurées modérées, oscillant entre 8 à 9°C en hiver et 13 à 17°C en été (Figure 3). La fin de l'été et l'automne 1993 ont été marqués par de fortes précipitations, entraînant une forte turbidité sans toutefois modifier sensiblement la salinité des eaux de fond.

## 2. CONTROLE DE PERFORMANCES D'*OSTREA EDULIS*

### 2.1. Matériel et méthodes

Les 2000 huitres en provenance de Ifremer/La Tremblade (3,8 g, 33mm) ont été immergées le 25/05/1992 sur la concession des Aresquiers. Après un changement de poches et dédoublement le 14/08/1992 (huit poches de maille 9 mm à 250/poche), huit points de contrôle ont été effectués en début de mois en novembre 1992 et février, avril, mai, juin, juillet, août et novembre 1993. A partir de juin 1993, la maille des poches a été portée à 14 mm. Au moment des contrôles, la mortalité a été estimée par comptage des deux poches réservées à cet effet, et les prélèvements pour analyses ont été effectués alternativement sur 3 des 6 autres poches.

### 2.2. Résultats

*La survie*, estimée globalement sur la population mélangée 2n-3n, décroît fortement après la mise en élevage au cours de l'été 1992. Elle se stabilise ensuite et atteint 35 % en fin de suivi (Figure 4).

*La croissance*, très rapide de mai à novembre 1992 (3,8 à 19 g), se ralentit par la suite, pour reprendre en novembre 1993. La chute de poids de juillet-août 1993 chez les 2n est

probablement en relation avec les émissions de larves. Le poids moyen atteint après 17 mois d'élevage est de 37 +/- 7 g pour les 2n, et de 44 +/- 6 g pour les 3n (Figure 5). On peut comparer ces résultats à ceux obtenus de mai à novembre 1992 sur l'étang de Thau avec un lot d'huitres plates produites en télécaptage à Ifremer/Palavas en juin 1991 : le poids moyen individuel de ces huitres collées sur cordes est passé de 2,8 g à 42 g, avec une survie de 74 % et un indice de condition Lawrence-Scott de 80.

Les indices de condition Lawrence-Scott, après avoir marqué un maximum autour de 80 de juin à août 1993, diminuent jusqu'en novembre et se situent à 44,4 +/- 2,8 pour les 2n et 52,9 +/- 4,5 pour les 3n (Figure 6).

La répartition de la *ploïdie* est exprimée dans la figure 7, et l'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 1.

### 3. CONTROLE DE PERFORMANCES DE *CRASSOSTREA GIGAS*

#### 3.1. Matériel et méthodes

750 *C. gigas* 2n et 750 3n en provenance de Ifremer/Bouin ont été réparties en 3 poches de chaque catégorie, et immergées sur la concession des Aresquiers le 23/03/1993.

Huit points mensuels, réalisés aux environs du 15 du mois, ont permis de mesurer survie, croissance, indice de condition et *ploïdie* d'avril à novembre inclus.

#### 3.2. Résultats

La survie sur l'ensemble de la période est excellente (97 %) pour les 2n comme pour les 3n (Figure 8).

La croissance, régulière à partir du mois de juin, stagne les deux derniers mois; les 3n atteignent 73 +/- 8g et les 2n 64 +/- 6 g (Figure 9). A titre de comparaison, les huitres du Réseau REMORA élevées dans l'étang de Thau pendant la même période, ont atteint un poids moyen variant de 110 à 150 g selon les zones, à partir d'un poids moyen initial de 25 g, alors que celles élevées en mer en poches ostréicoles sur la concession des Aresquiers n'atteignent que 60 g (Hamon, comm. pers.).

L'indice de condition Lawrence-Scott décroît régulièrement dès l'immersion chez les 3n jusqu'à la valeur de 25 +/- 3 en novembre 1993; chez les 2n, la valeur de l'indice de condition reste stable autour de 60 jusqu'en juillet, pour diminuer ensuite à 26 +/- 2 en novembre (Figure 10).

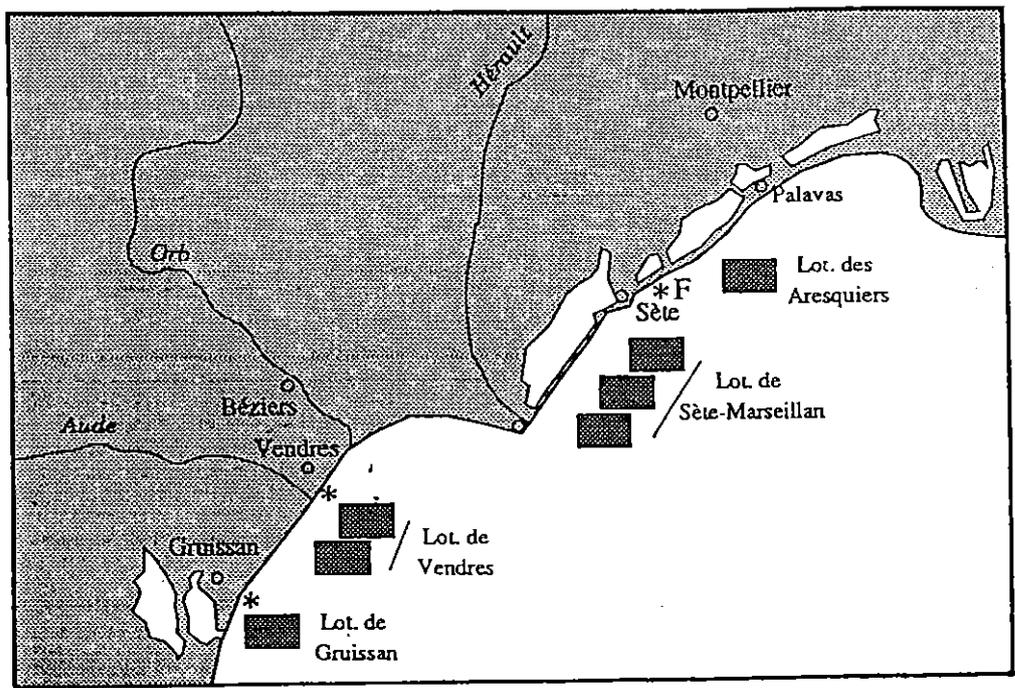
La répartition de la *ploïdie* est indiquée sur la figure 11. En fin d'expérience, toutes les huitres, 2n et 3n, sont fortement atteintes par du *Polydora*, au niveau 3 sur l'échelle de Catherine *et al.*(1990).

Le récapitulatif des résultats apparaît dans le tableau 2.

#### 4. CONCLUSION

Sous réserve d'une confirmation statistique (analyse en attente d'une harmonisation entre les différentes stations de contrôle des performances?), il n'apparaît *a priori* pas de différences entre les populations de 2n et de 3n pour les deux espèces concernées, sauf peut-être pour l'indice de condition d'*O. edulis* au dernier point de contrôle.

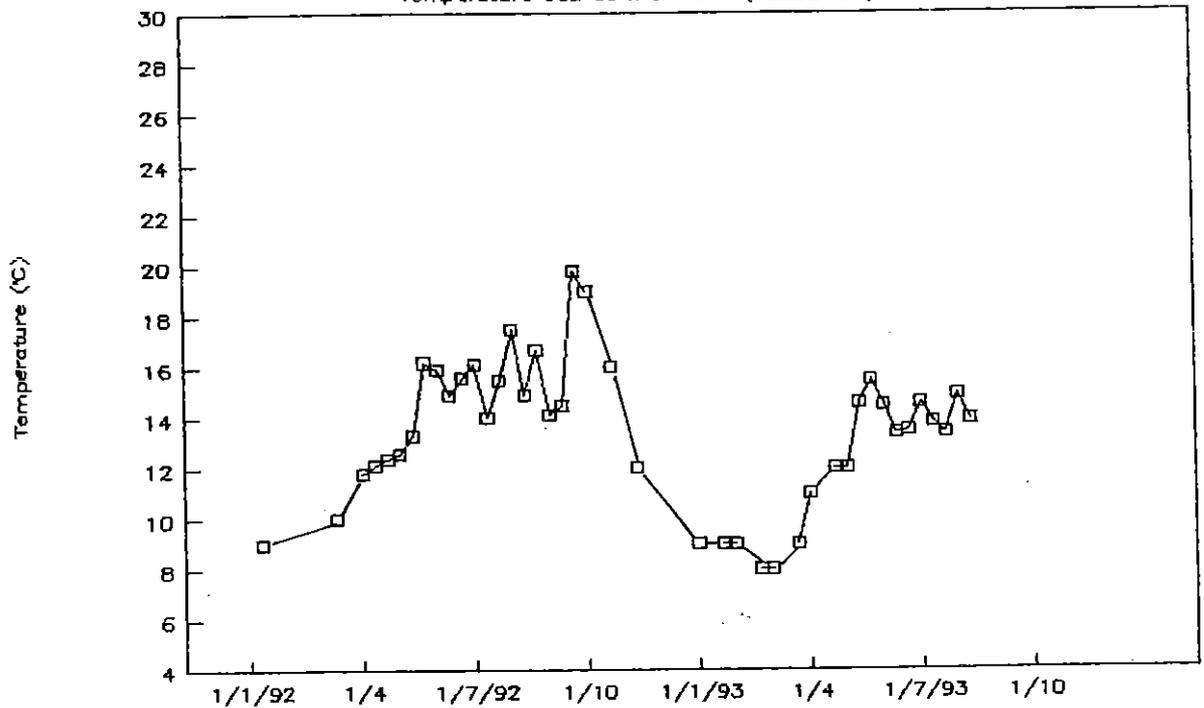
D'une manière générale, les performances de croissance des lots de 2n et de 3n mis en élevage en mer, en poches ostréicoles, sont très inférieures à celles obtenues dans l'étang de Thau en collage sur cordes (références du réseau Remora et des essais sur l'huitre plate réalisés à Palavas), et on peut s'interroger sur l'adéquation du site et de la technique utilisée en mer à la mise en évidence de différences entre populations de diploïdes et de triploïdes.



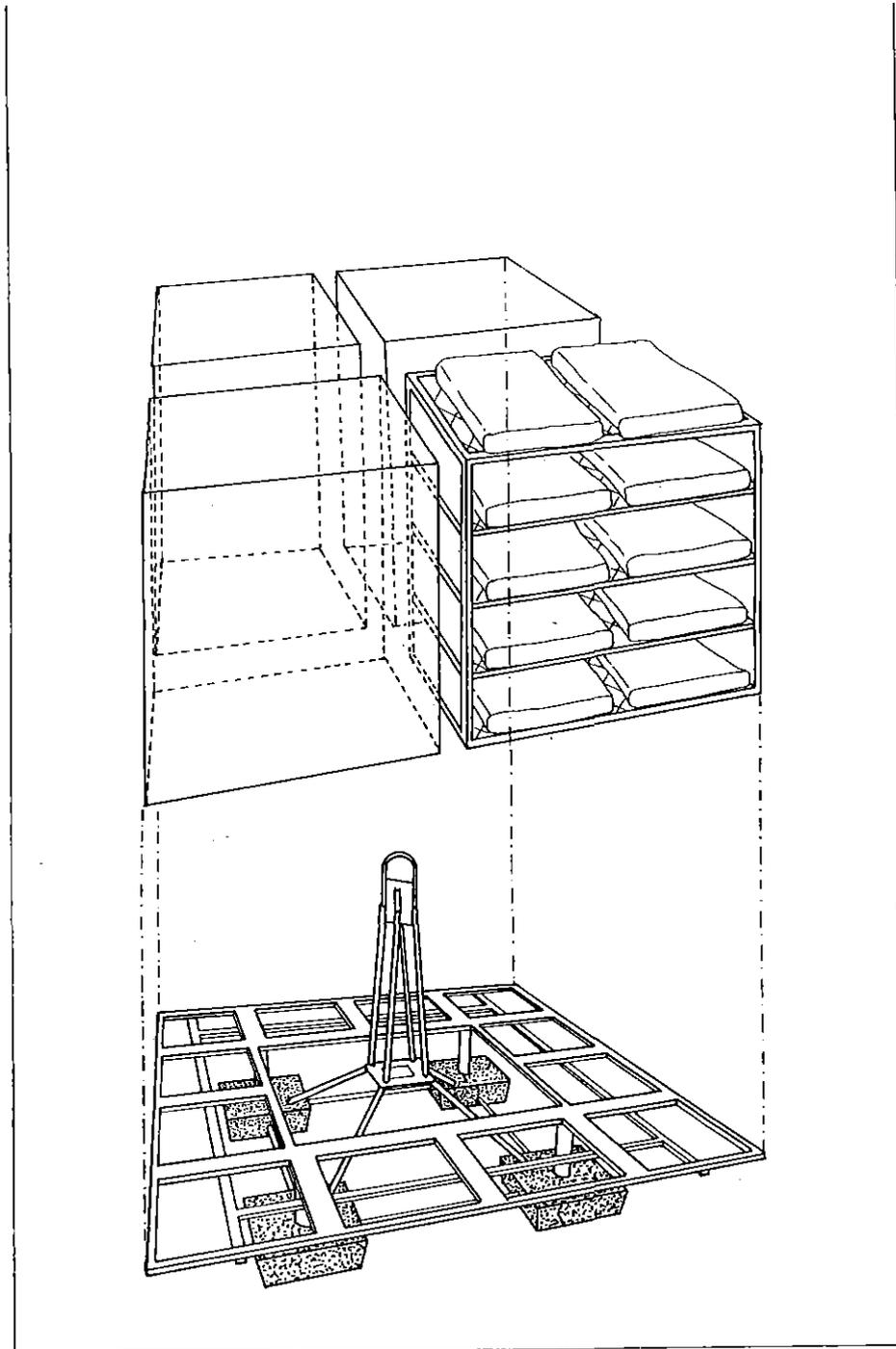
**FIGURE 1 : LA CONCHYLICULTURE DE PLEINE MER EN LANGUEDOC-ROUSSILLON**  
(d'après CEPALMAR 1992)

### Concessions en mer Sète et Aresquiers

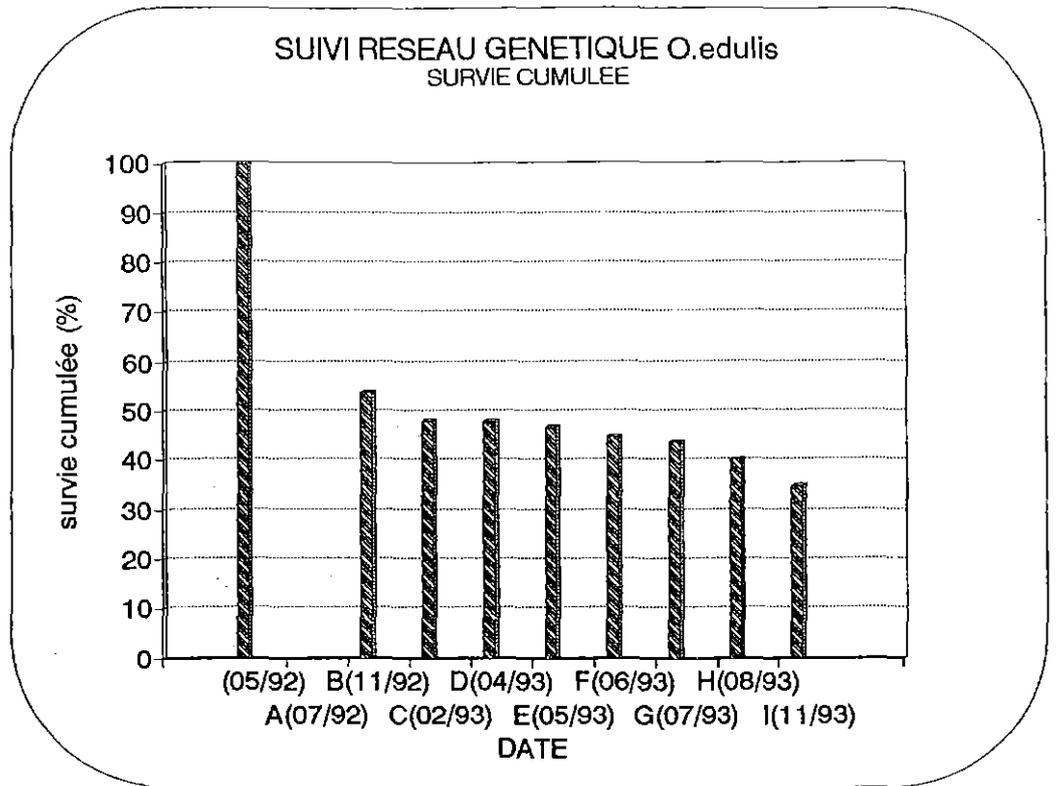
Température eau de mer Fond (REC92-93)



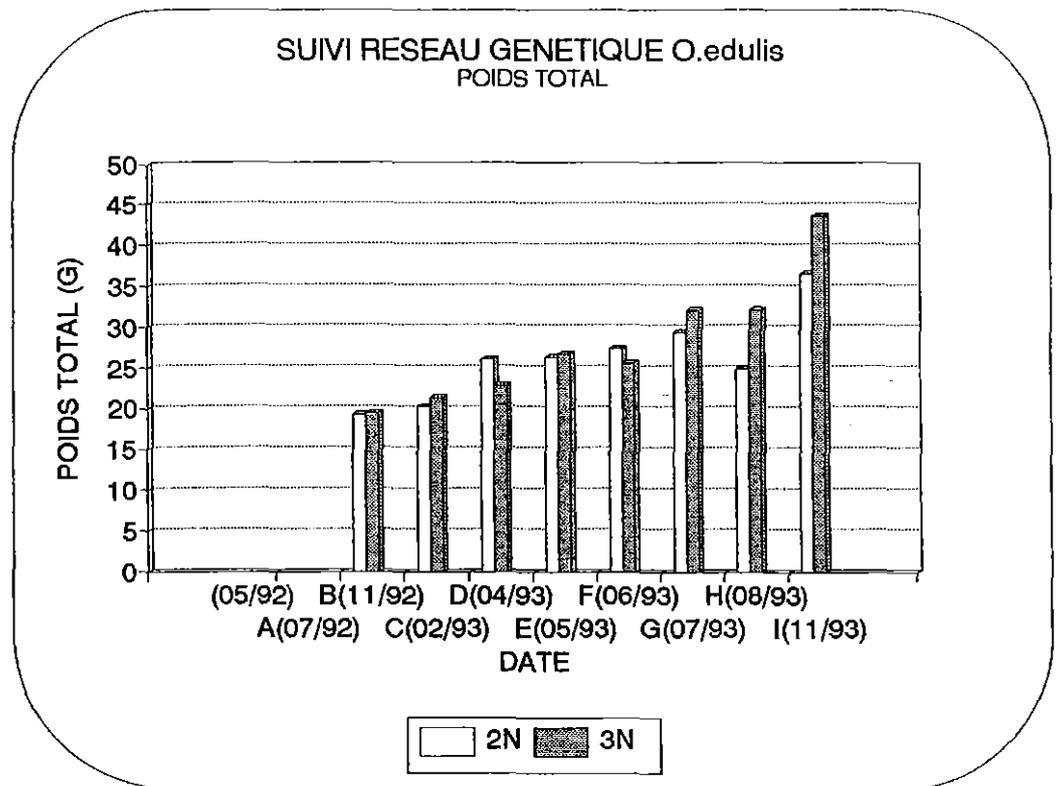
**FIGURE 2 : RELEVÉ DES TEMPÉRATURES DE FOND SUR LA CONCESSION DES ARESQUIERS**



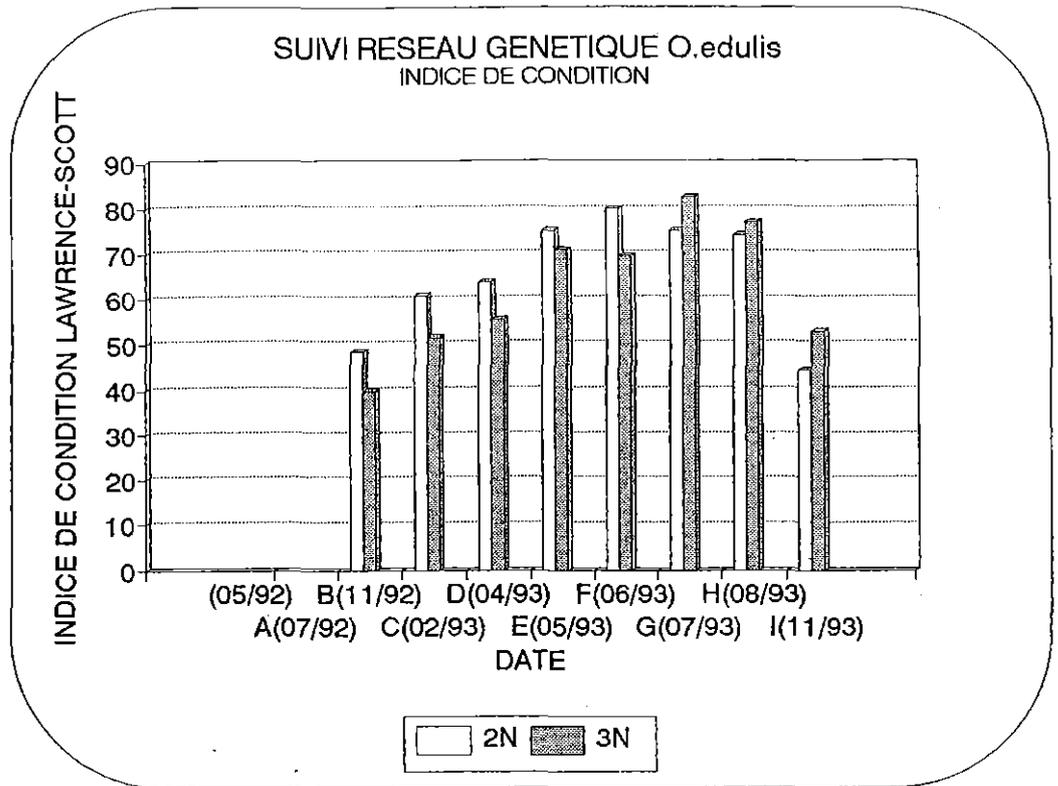
**FIGURE 3 : STRUCTURE EXPERIMENTALE D'ELEVAGE DE TYPE  
CONTAINER MICHEL FRERES MODIFIE**



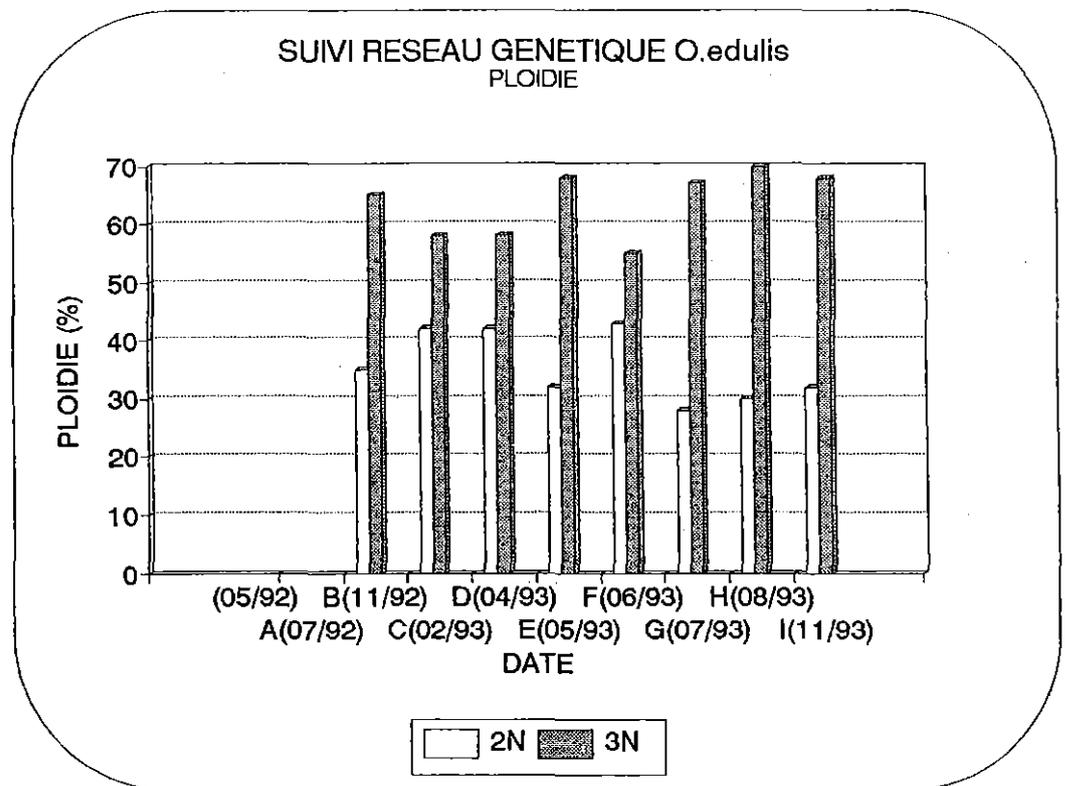
**FIGURE 4**



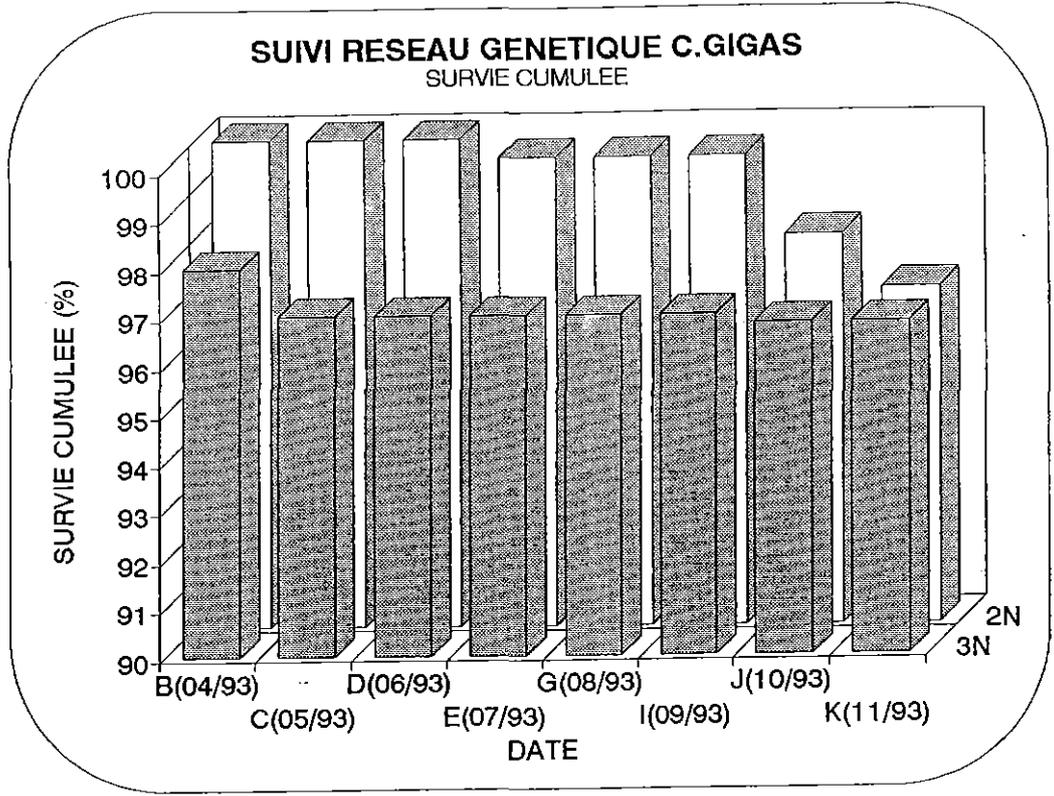
**FIGURE 5**



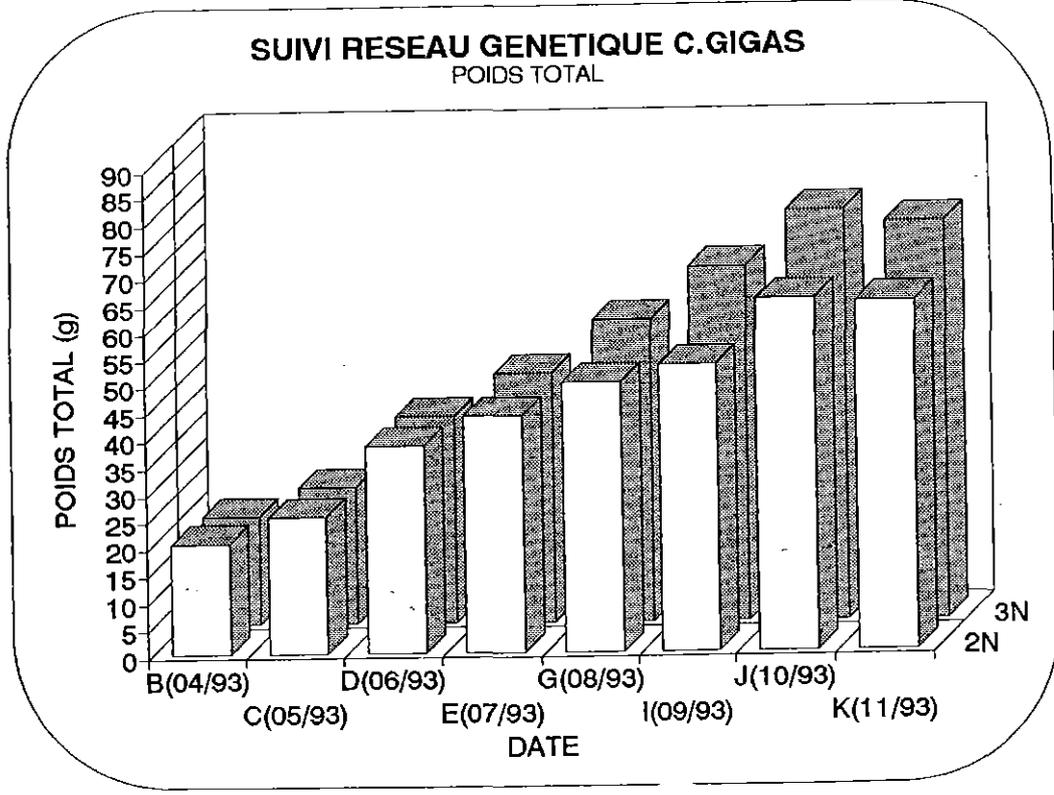
**FIGURE 6**



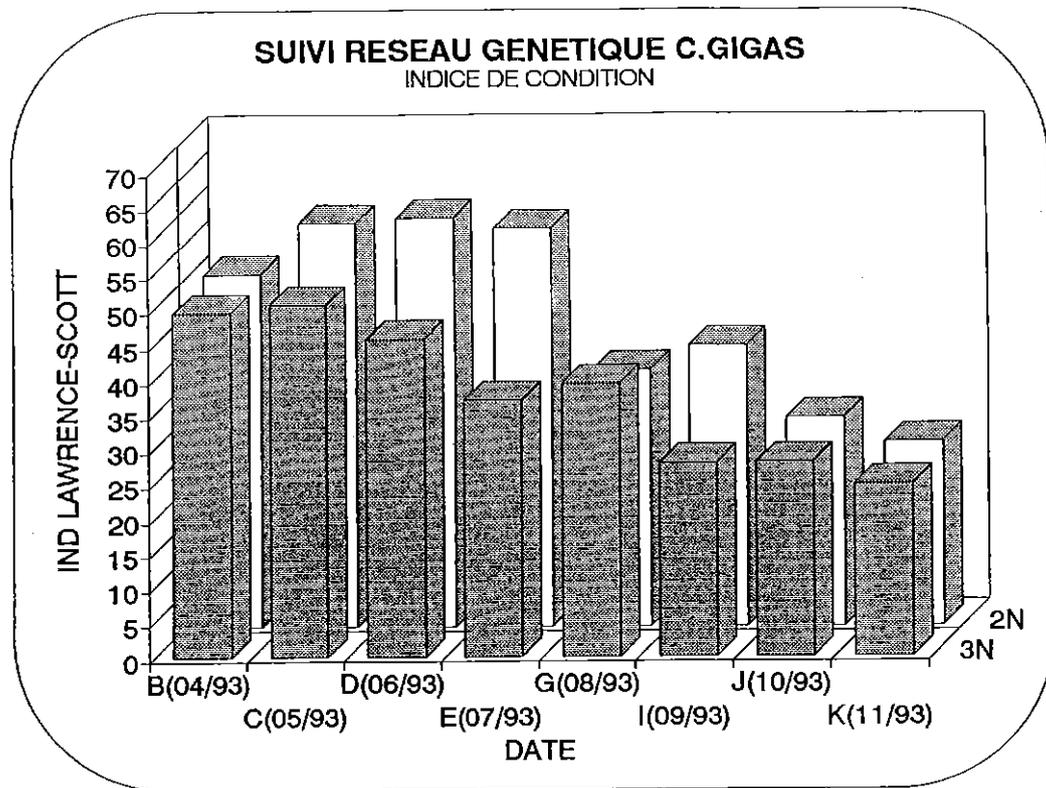
**FIGURE 7**



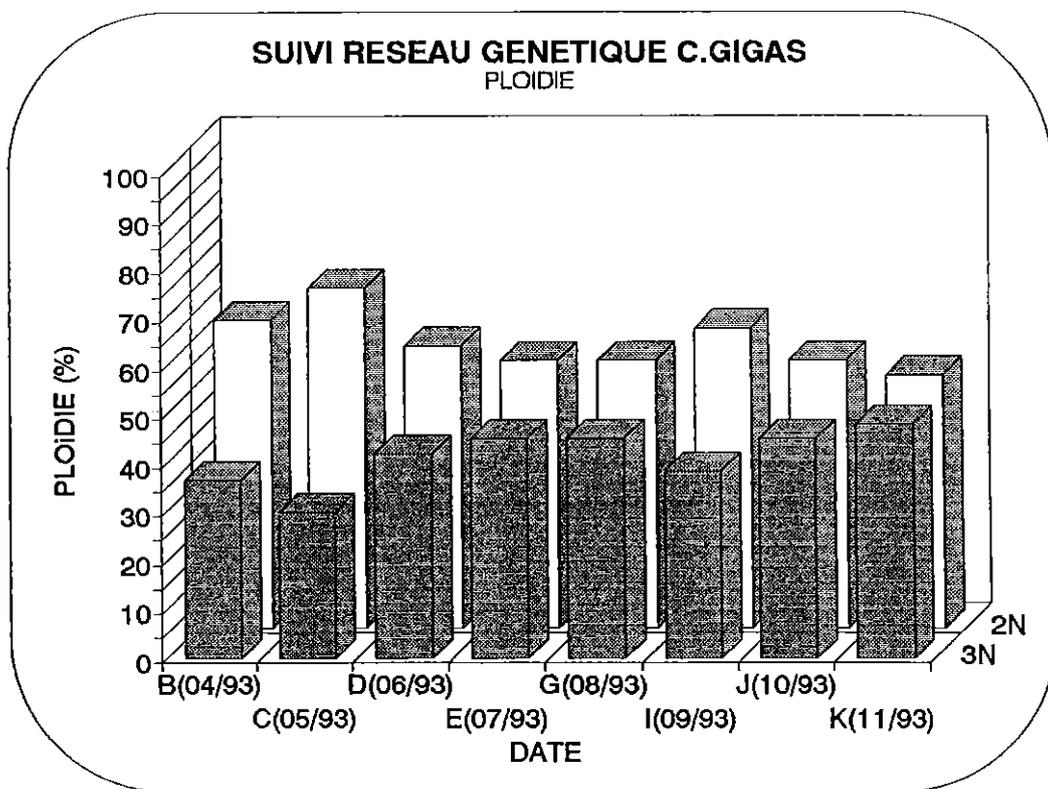
**FIGURE 8**



**FIGURE 9**



**FIGURE 10**



**FIGURE 11**

**TABLEAU 2: RESEAU GENETIQUE CRASSOSTREA GIGAS**

RECAPITULATIF DES RESULTATS

POINT Date	SURVIE CUMULEE		POIDS TOTAL		I.C. (L-Scott)		PLOIDIE	
	2n	3n	2n	3n	2n	3n	2n	3n
<b>B</b> Avr-93	100	98	20.4 <i>(1.2)</i>	19.8 <i>(2.1)</i>	50.8 <i>(3.5)</i>	49.6 <i>(4.3)</i>	63	37
<b>C</b> Mai-93	100	97	25.3 <i>(1.3)</i>	25 <i>(3)</i>	58.2 <i>(3.4)</i>	50.8 <i>(3.4)</i>	70	30
<b>D</b> Juin 93	100	97	38.2 <i>(2.4)</i>	38 <i>(2.3)</i>	58.8 <i>(4.2)</i>	45.9 <i>(4.2)</i>	58	42
<b>E</b> Juil.93	99.6	97	43.6 <i>(4.3)</i>	46 <i>(4.7)</i>	57.3 <i>(3.8)</i>	37 <i>(2.6)</i>	55	45
<b>G</b> Août 93	99.6	97	49.8 <i>(4)</i>	55.7 <i>(5.9)</i>	37 <i>(3.2)</i>	39.3 <i>(3)</i>	55	45
<b>I</b> Sep. 93	99.6	97	52.9 <i>(4.5)</i>	65.3 <i>(7.3)</i>	40.4 <i>(2.8)</i>	27.7 <i>(3.1)</i>	62	38
<b>J</b> Oct 93	98	96.8	65 <i>(6)</i>	75.5 <i>(7.5)</i>	30 <i>(2.6)</i>	27.9 <i>(2.2)</i>	55	45
<b>K</b> Nov 93	96.9	96.8	64.3 <i>(6.2)</i>	73.2 <i>(8.4)</i>	26.4 <i>(1.7)</i>	24.7 <i>(2.7)</i>	52	48

*Valeurs en italiques :  
intervalles de confiance au coefficient de 95 %*

# TABLEAU 1 : RESEAU GENETIQUE OSTREA EDULIS

## RECAPITULATIF DES RESULTATS

POINT Date	SURVIE CUMULEE	POIDS		I.C. (L-Scott)		PLOIDIE	
		2n	TOTAL 3n	2n	3n	2n	3n
<b>Zéro</b> Mai-92	100	3.8					
<b>A</b> Juil 92							
<b>B</b> Nov 92	54	19.6 <i>(2.2)</i>	19.5 <i>(3)</i>	48.4 <i>(5.8)</i>	39.7 <i>(3.1)</i>	35	65
<b>C</b> Fev 93	48	20.3 <i>(3)</i>	21.1 <i>(2.6)</i>	60.8 <i>(5.8)</i>	51.6 <i>(5.9)</i>	42	58
<b>D</b> Avr 93	48	26.2 <i>(4.2)</i>	23 <i>(3.7)</i>	63.7 <i>(6.6)</i>	55.4 <i>(4.8)</i>	42	58
<b>E</b> Mai 93	47	26.4 <i>(5.1)</i>	26.8 <i>(3.9)</i>	75 <i>(8.2)</i>	70.7 <i>(4.3)</i>	32	68
<b>F</b> Juin 93	45	27.5 <i>(3.6)</i>	25.7 <i>(3.9)</i>	79.9 <i>(8)</i>	69.5 <i>(5.1)</i>	43	55
<b>G</b> Juil 93	44	29.4 <i>(5.3)</i>	32.2 <i>(4.6)</i>	75.2 <i>(7.2)</i>	82.5 <i>(3.8)</i>	28	67
<b>H</b> Aout 93	40	25 <i>(5.1)</i>	32.2 <i>(5.8)</i>	74.3 <i>(9.9)</i>	76.9 <i>(4.6)</i>	30	70
<b>I</b> Nov 93	35	36.7 <i>(6.7)</i>	43.8 <i>(5.8)</i>	44.4 <i>(2.8)</i>	52.9 <i>(4.5)</i>	32	68

Valeurs en italiques :  
Intervalles de confiance au coefficient de 95 %

BILAN PROVISOIRE DU CONTROLE DE PERFORMANCES DE  
POPULATIONS TRIPLOÏDES DE *CRASSOSTREA GIGAS* DANS LE  
BASSIN D'ARCACHON

Michel. BOREL

Danièle. MAURER

IFREMER- DEL - Arcachon

# BILAN PROVISOIRE DU CONTROLE DE PERFORMANCES DE POPULATIONS TRIPLOÏDES DE *CRASSOSTREA GIGAS* DANS LE BASSIN D'ARCACHON

## 1. MATERIEL ET METHODES

Deux populations d'huîtres *Crassostrea giga*, 1500 triploïdes et 1500 diploïdes, fournies par la station IFREMER de Bouin, ont été immergées le 22 mars 1993, sur un parc du Tes situé en une zone intermédiaire du Bassin d'Arcachon. Ce secteur est baigné par des eaux néritiques externes, c'est-à-dire plutôt sous influence océanique, et présente des performances de croissance moyennes pour *C. giga*. Le parc découvre environ 2 h par coefficient de marée de 70 et par beau temps.

Les huîtres ont été placées dans des poches ostréicoles de maille 14 mmm, à raison de 250 par poche. Sur les 6 poches par catégorie d'huîtres ainsi constituées, une est réservée au suivi de la mortalité et les 5 autres à l'échantillonnage mensuel (bimensuel au mois d'août) réalisé par prélèvement de 6 huîtres par poche afin d'obtenir un échantillon de 30 individus. Les paramètres suivis sont : poids total, poids frais, poids sec, poids de coquille, indice de condition, stades de maturation, % de sexes déterminés et % de femelles, taux de ploïdie. Ces derniers n'étant pas encore disponibles, les résultats présentés pour les triploïdes concernent l'ensemble du prélèvement, les valeurs concernant les huîtres non triploïdes n'ayant pas été enlevées. L'expérimentation a été menée de mars 1993 à novembre 1993.

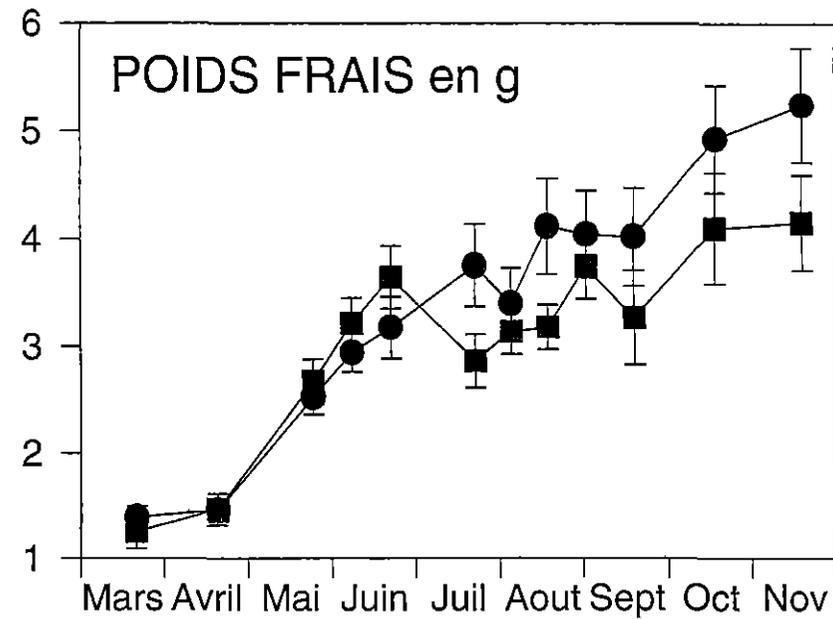
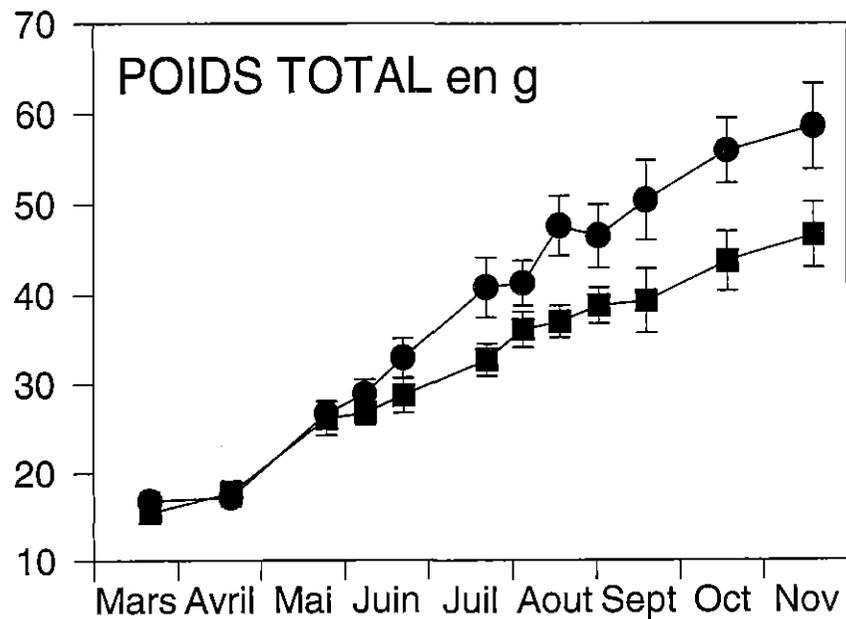
## 2. RESULTATS

### 2.1. Taux de mortalité

Il est de 20 % pour les triploïdes à la fin de l'expérience contre 12 % pour les diploïdes. Pour les premiers, ce taux était déjà de 14 % en avril. Pour les seconds, les mortalités se sont réparties à peu près régulièrement au cours de l'élevage.

### 2.2. Croissance

Les triploïdes présentent une croissance pondérale supérieure à celle des diploïdes, notable dès le mois de juillet, pour l'ensemble des paramètres. En particulier, les poids totaux des huîtres 3n passent de 16.8 g à 58.6 g mi-novembre contre 15.5 g à 46.6 g pour les huîtres 2n,



● triploïdes  
 ■ diploïdes

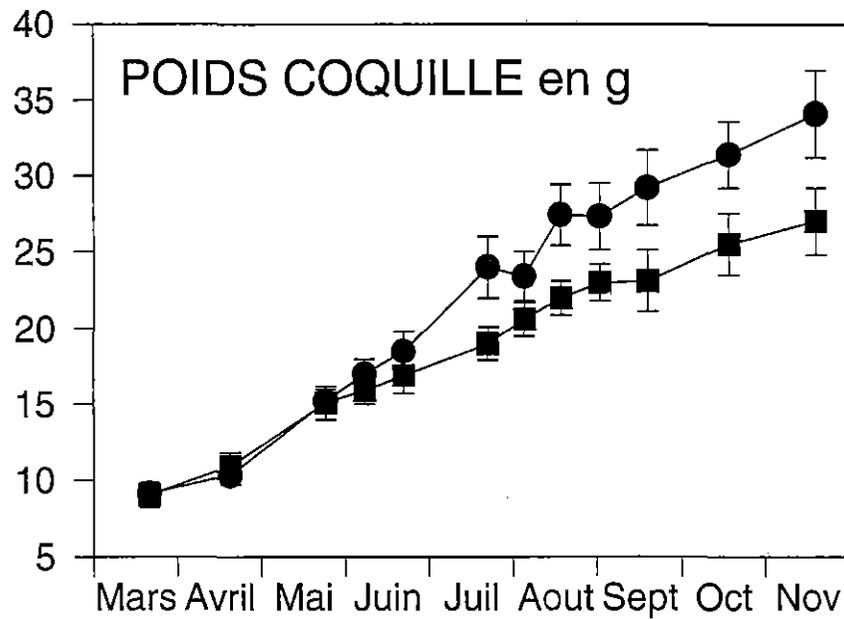
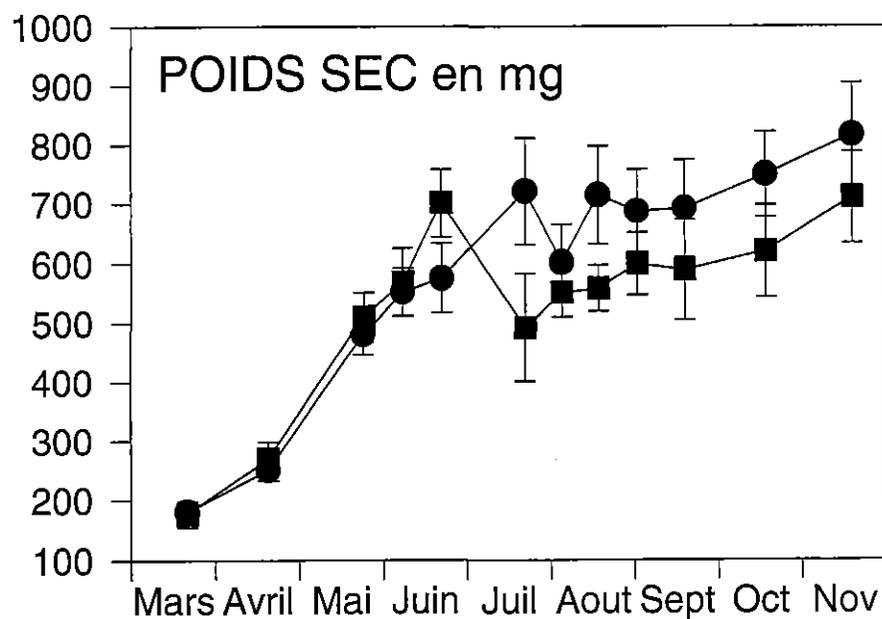


Fig. 1 - Evolution des paramètres pondéraux des populations de *C. gigas*

ces différences étant statistiquement significatives (non-recouvrement des intervalles de confiance sur la moyenne à 95 % de sécurité) (fig. 1). L'histogramme des classes de poids en fin d'élevage (fig.2) montre que la gamme de poids des huîtres 3n n'est pas beaucoup plus étendue que celle des huîtres 2n, compte tenu du poids moyen plus élevé des premières. La population de triploïdes semble présenter deux modes, l'un pour la classe 50-60 g, l'autre moins marqué pour la classe 70-80 g.

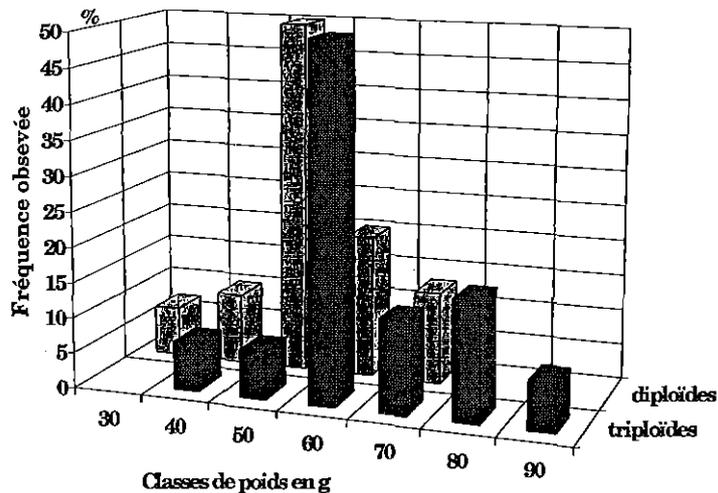
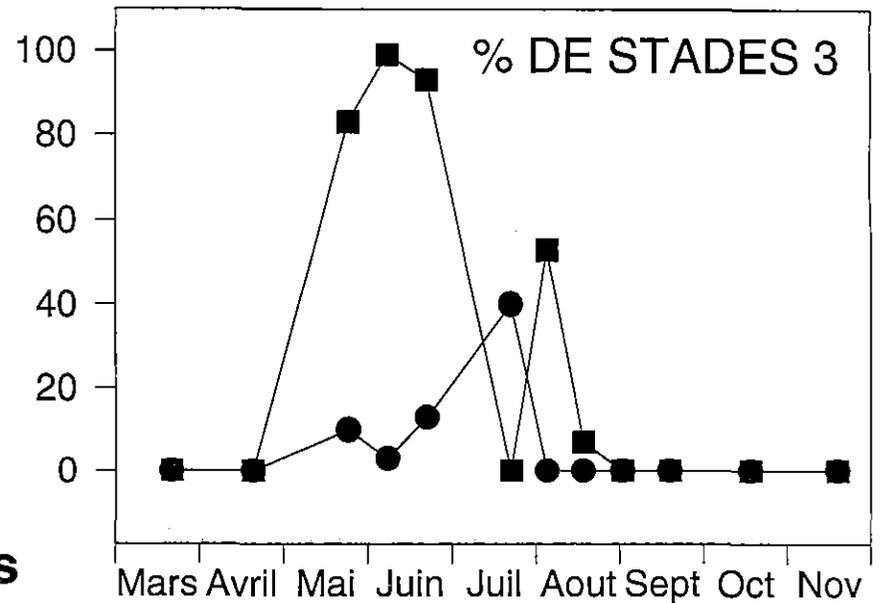
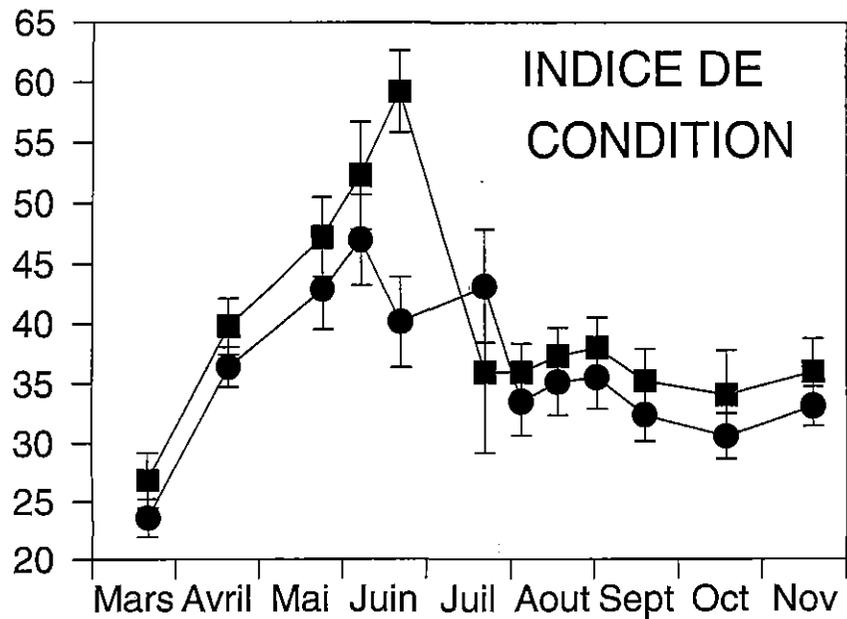


Fig. 2 - Répartition en classes de poids de la population finale de diploïdes et de triploïdes de *Crassostrea gigas*

Les évolutions des poids frais et surtout des poids secs intègrent la perte de matériel due à la ponte. Celle des diploïdes se produit entre fin juin et fin juillet, et celle des triploïdes durant la première quinzaine du mois d'août. Les résultats concernant la ploïdie permettront de mieux cerner l'épisode de la ponte dans cette dernière population, de même que celui de la maturation à travers les paramètres % de stades 3, % de sexes déterminés et % de femelles (fig. 3).

L'indice de condition ne présente pas de valeurs très élevées pour les deux populations, passant d'environ 25 en début d'élevage à 35 en fin d'expérimentation. L'indice des huîtres diploïdes atteint au maximum 60 et celui des triploïdes 45, puis il diminue de façon plus ou moins marquée pour les deux populations au moment de la ponte. Il est remarquable que l'indice des huîtres 3n, dont on attendait qu'il reste élevé à l'issue de l'été, présente une chute semblable à celui des diploïdes.



● triploïdes  
■ diploïdes

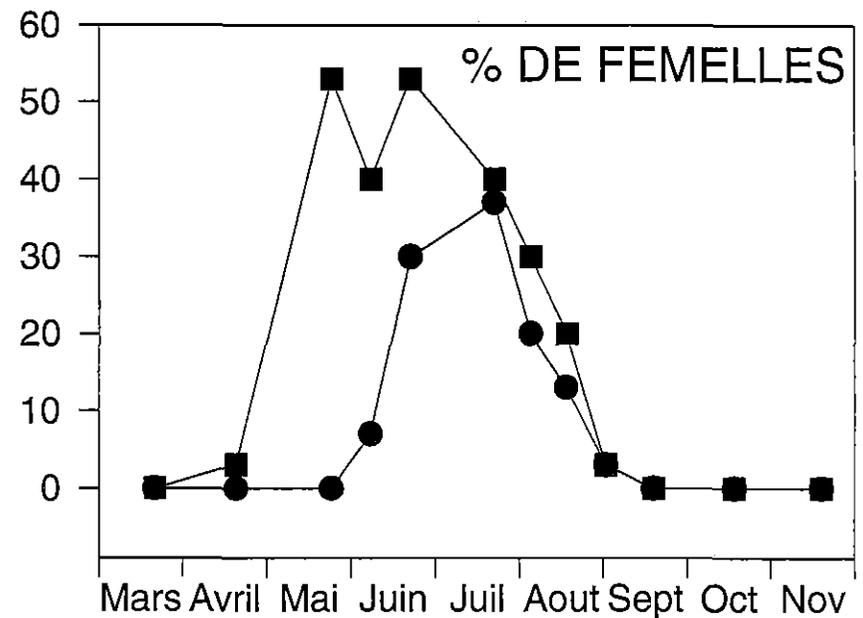
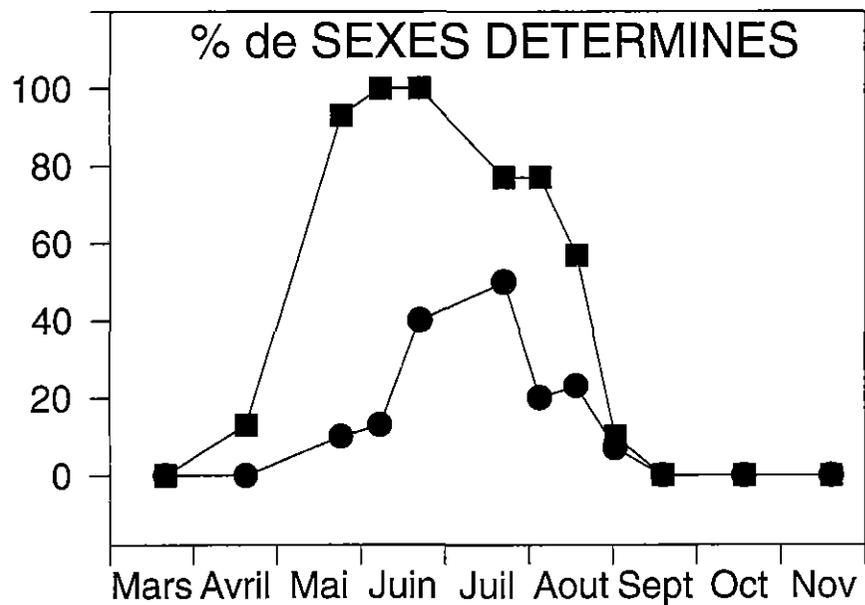


Fig. 3 - Evolutions de l'indice de condition et de la maturation chez *C. gigas*

CONTROLE DES PERFORMANCES SUR LES DIPLOIDES ET  
TRIPLOIDES DE *CRASSOSTREA GIGAS* EN CLAIRE ET SUR  
ESTRAN DANS LE BASSIN DE MARENNES-OLERON EN 1993.

Serge HEURTEBISE

Jacqueline GARNIER

IFREMER- URRRA - La Tremblade

# **CONTROLE DES PERFORMANCES SUR LES DIPLOIDES ET TRIPLOIDES DE *CRASSOSTREA GIGAS* EN CLAIRE ET SUR ESTRAN DANS LE BASSIN DE MARENNES-OLERON EN 1993.**

Les populations d'huîtres diploïdes témoins et triploïdes après un prégrossissement à la station de Bouin, ont été placées en claire dans le marais expérimental de Ronce les Bains et sur estran sur le site de Bourgeois. Les animaux ont été répartis dans cinq poches de 210 individus, une poche réservée à estimer la survie, les quatre autres aux prélèvements (biométrie, biochimie, gamétogenèse).

## **1 . Survie (fig. 2)**

En novembre, les taux de survie constatés en claire étaient de 52,4 % (2NC), 45,7 % (3NC) et sur parc de 71,9 % (2NE) et 76,7 % (3NE).

Les premières mortalités enregistrées fin mai en claire 20 % (2NC) et 26,7 % (3NC), nous ont contraint à transférer l'élevage dans un second marais à l'Eguillate (rive gauche de la Seudre) qui est peu perméable et présente un renouvellement d'eau régulier.

Sur estran, les mortalités enregistrées en période de ponte sont dues en partie à l'entretien de l'élevage rendu indispensable par l'envahissement d'algues et le développement des moules de captage.

## **2 . Résultats de biométrie (fig.3 à fig. 6)**

Les caractéristiques des huîtres triploïdes sont significativement supérieures à celles des diploïdes jusqu'à la fin août pour le poids total et le poids de coquille sèche. A partir de septembre, la croissance des témoins (2NE) sur estran s'arrête, contrairement aux autres lots (3NE, 3NC, 2NC) dont les valeurs de poids total et de coquille sont proches fin novembre.

L'évolution du poids sec moyen est lente en sortie de prégrossissement et montre ensuite une augmentation globalement supérieure chez les diploïdes en raison de la gonadogenèse. Cette tendance se confirme après la ponte de fin juillet, en claire à la période "d'affinage" (novembre). Les pertes de poids successives des triploïdes sur les deux sites laissent supposer plusieurs pontes dont une plus tardive en septembre.

L'indice de condition confirme une gonadogenèse supérieure des diploïdes, avec une maturation moins affirmée en claire que sur estran. On remarque aussi les valeurs basses des indices en octobre et novembre qui traduisent notamment la faible capacité trophique du bassin de Marennes-Oléron sur le site de Bourgeois.

### **3 . Résultats biochimiques (fig. 7 à fig. 10)**

Les variations du taux de protéines suivent le poids sec et sont représentatives de la croissance somatique. Le pic de juillet confirme le développement de la gamétogenèse, la chute des pourcentages traduit la ponte.

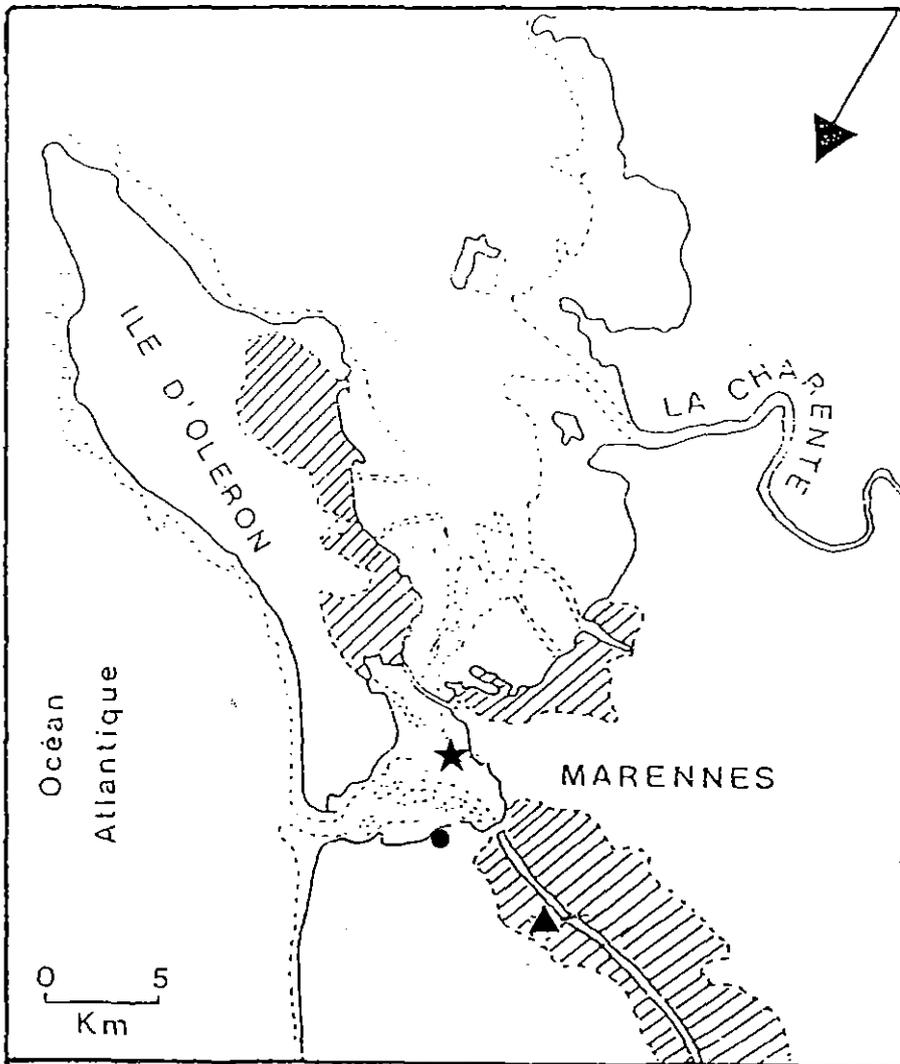
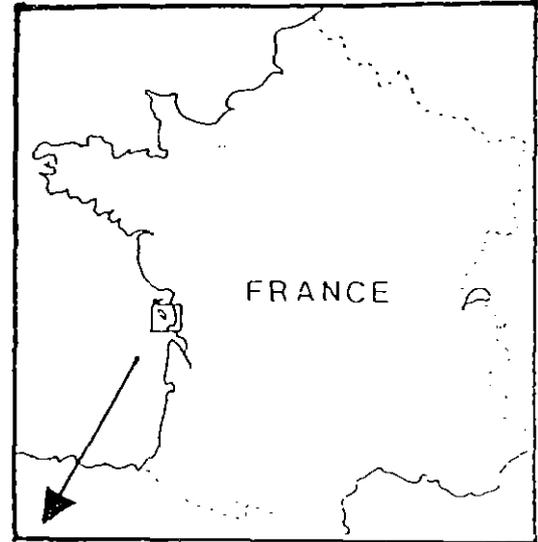
Du début du mois de juin au 20 juillet, les diploïdes épuisent leurs réserves glucidiques parallèlement à l'augmentation du taux de lipides jusqu'à la maturation des produits génitaux. Ce phénomène de gonadogenèse est moins marqué pour les triploïdes.

En fin de suivi, sur estran, les valeurs de 2 % pour les sucres totaux et de 0,3 % pour le glycogène correspondent à une chute brutale des réserves glucidiques qui fait suite au pic automnal et laisse craindre des mortalités en sortie d'hiver. En clair, l'augmentation des taux de sucres totaux parallèlement au poids sec semble la traduction d'un début "d'affinage".

### **4 . Conclusions**

Les résultats de la première année de contrôle de performances ne confirment pas, pour l'instant, les travaux de Allen et Downing (1986) en ce qui concerne l'évolution du poids sec et l'accumulation des réserves glucidiques chez les triploïdes. Toutefois, il faudra attendre la fin de la deuxième année de suivi et l'exploitation des données hydrobiologiques réalisées au cours de l'élevage pour statuer sur l'intérêt de la triploïdie dans le bassin de Marennes-Oléron.

BASSIN DE  
MARENNES - OLERON



- ★ PARC de BOURGEOIS
- ▲ CLAIRE de L'éguillate
- CLAIRE de RONCE

*POLYPLOIDES C.gigas* 1993  
Fig 2

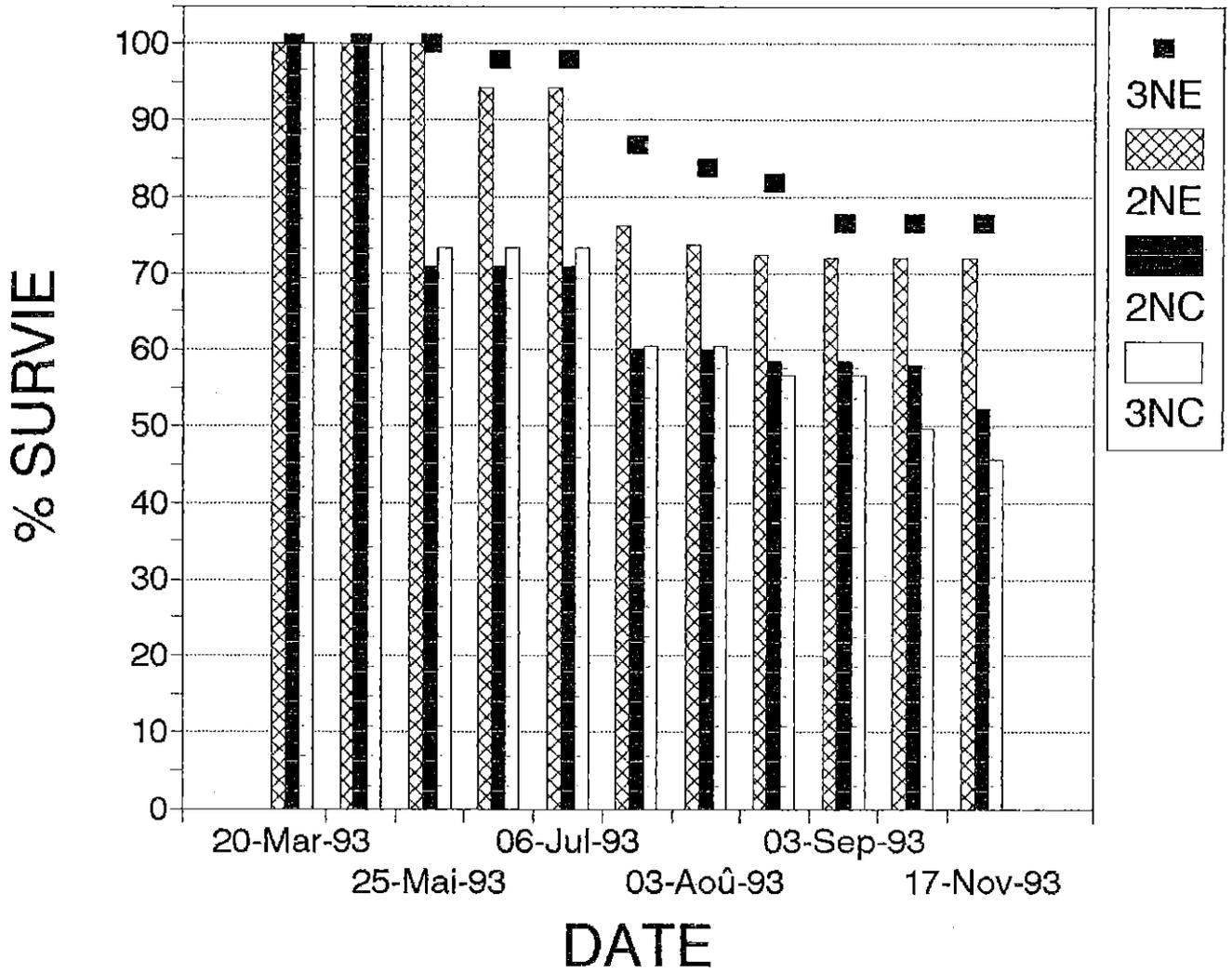


Fig. 3

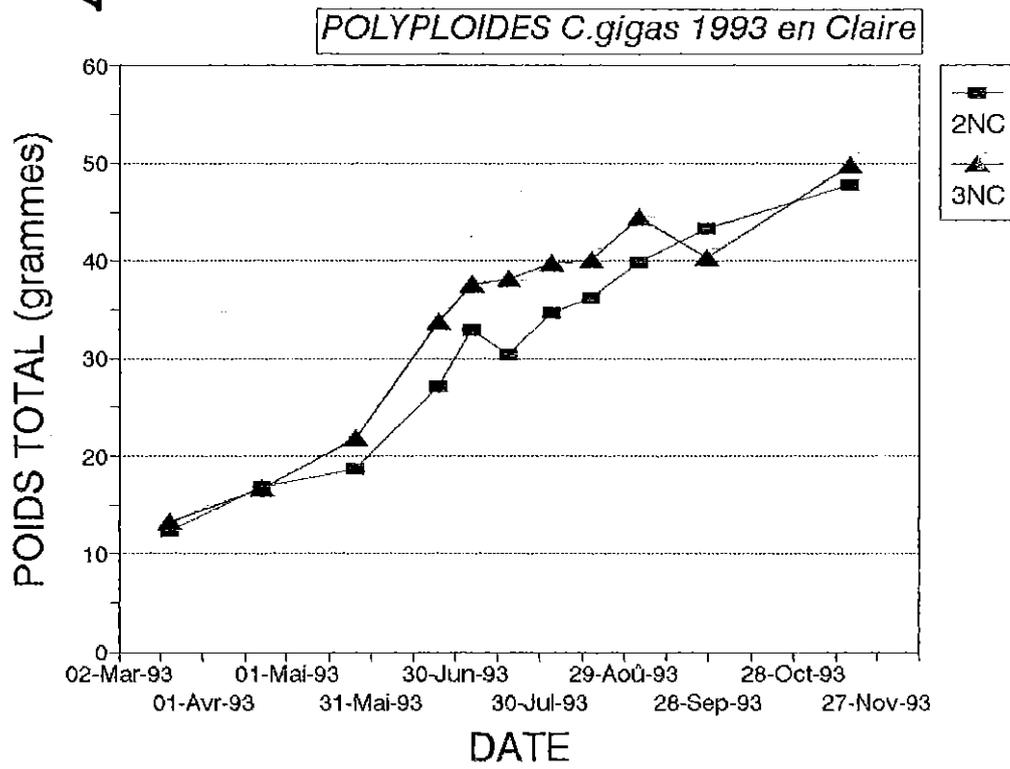


Fig. 3'

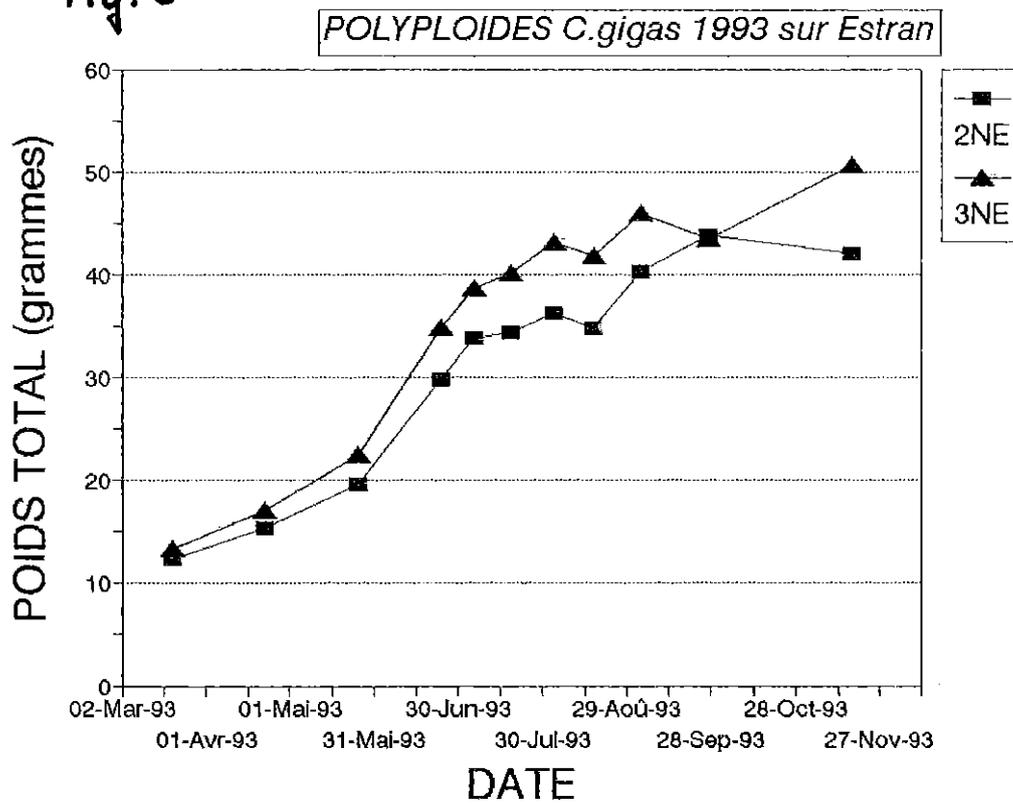


Fig. 4

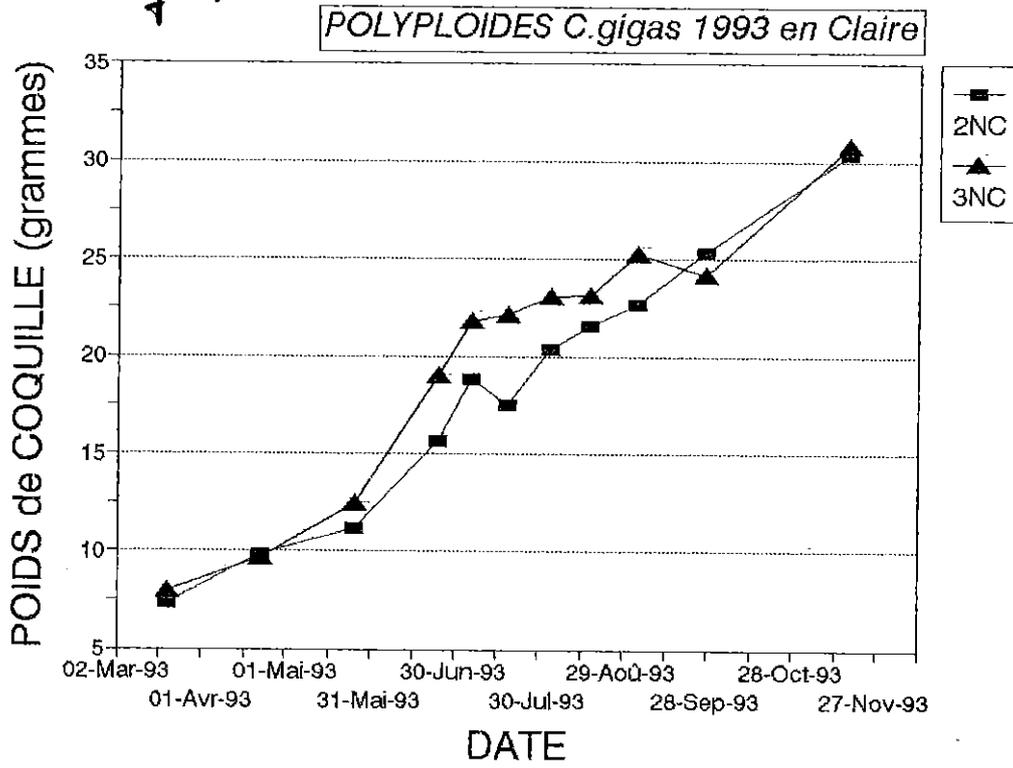


Fig. 4'

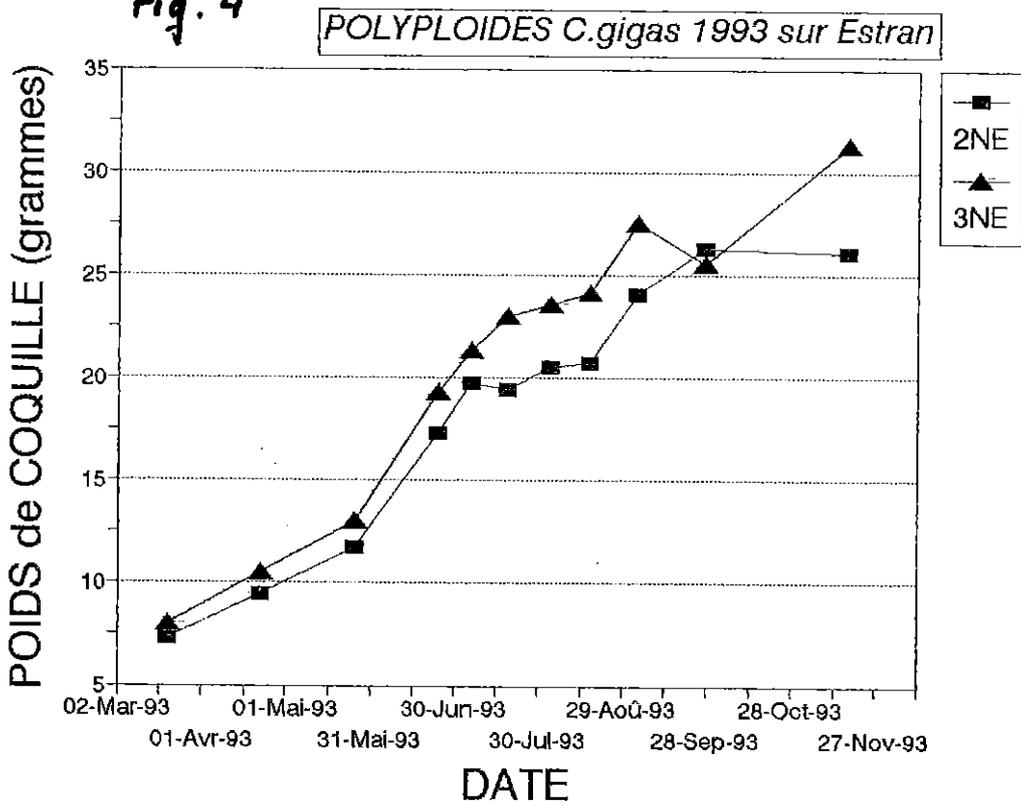


Fig. 5

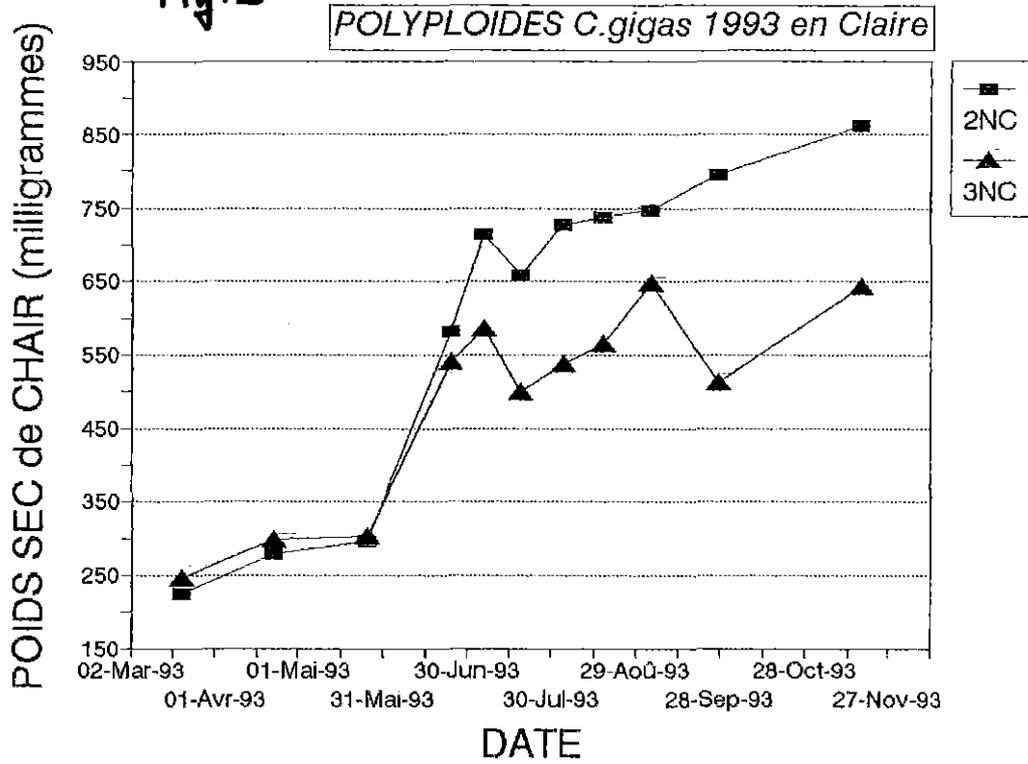


Fig. 5'

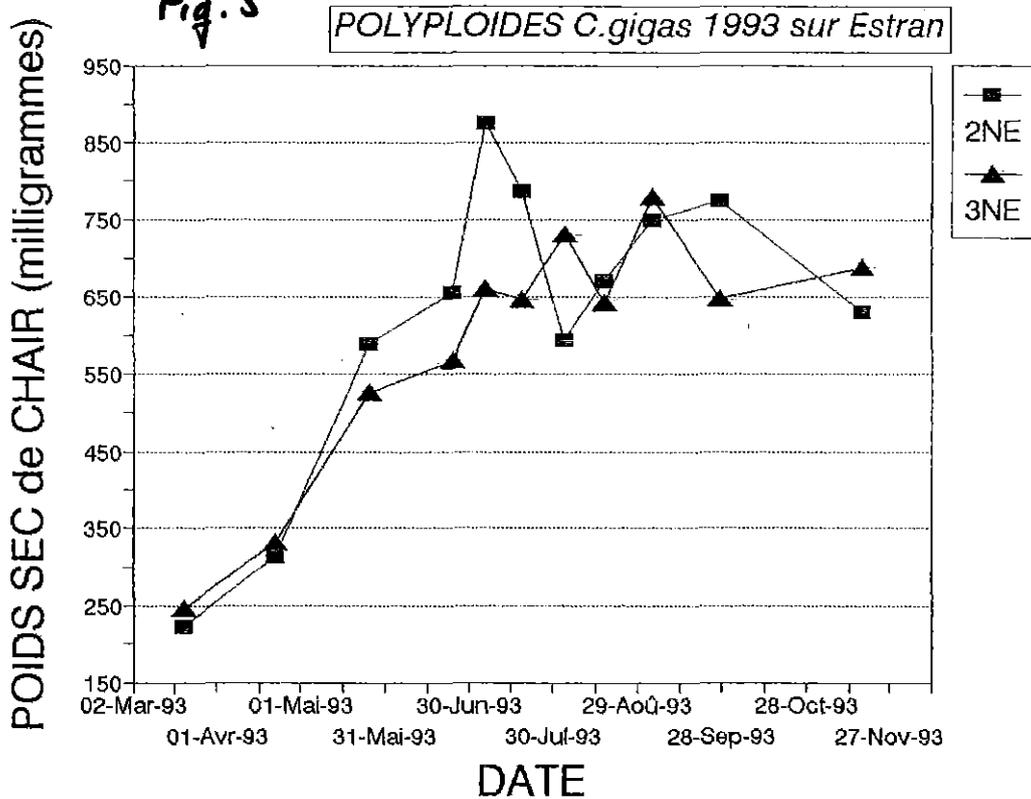


Fig. 6

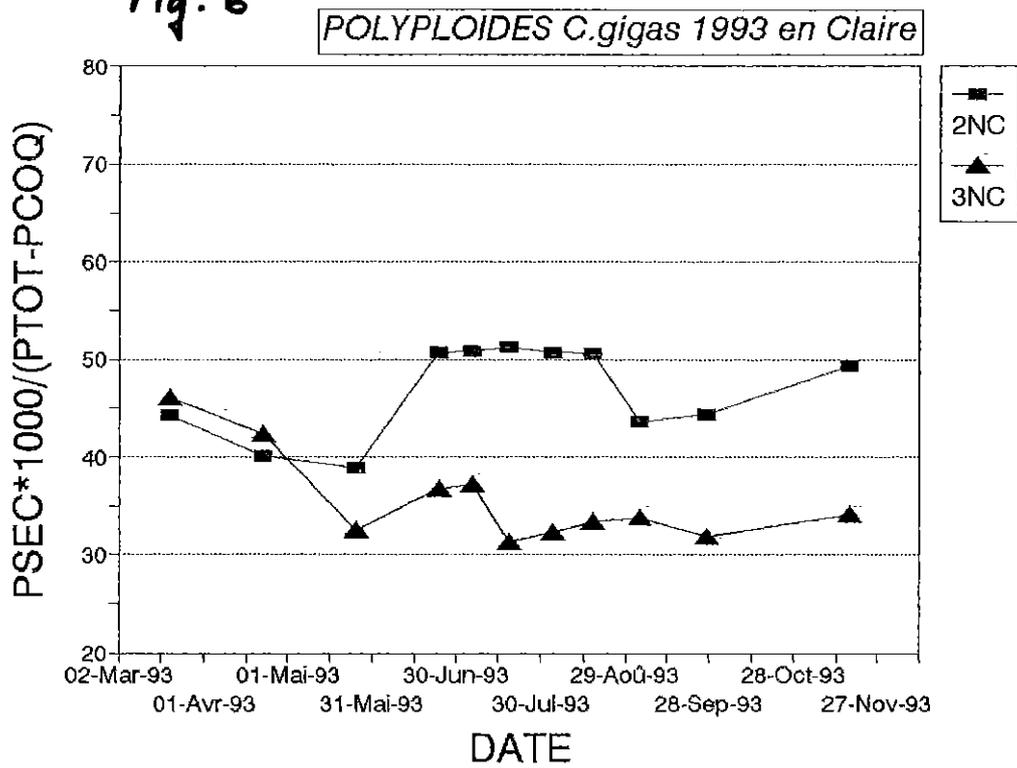


Fig. 6'

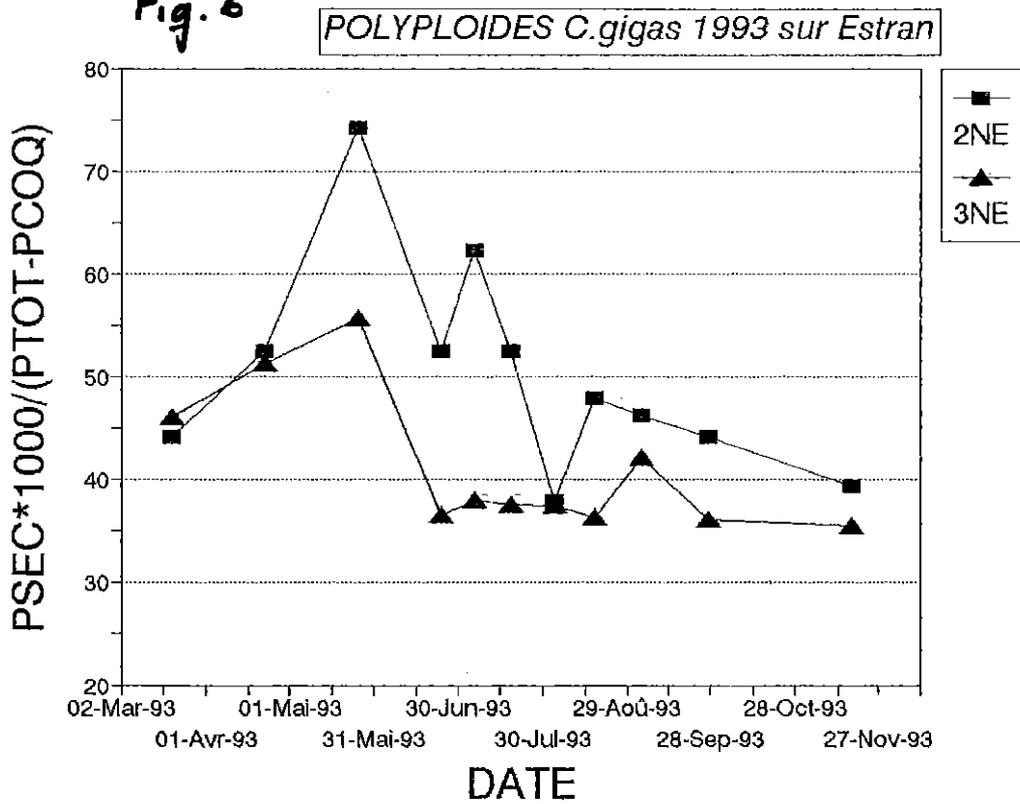


Fig. 7

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Claire

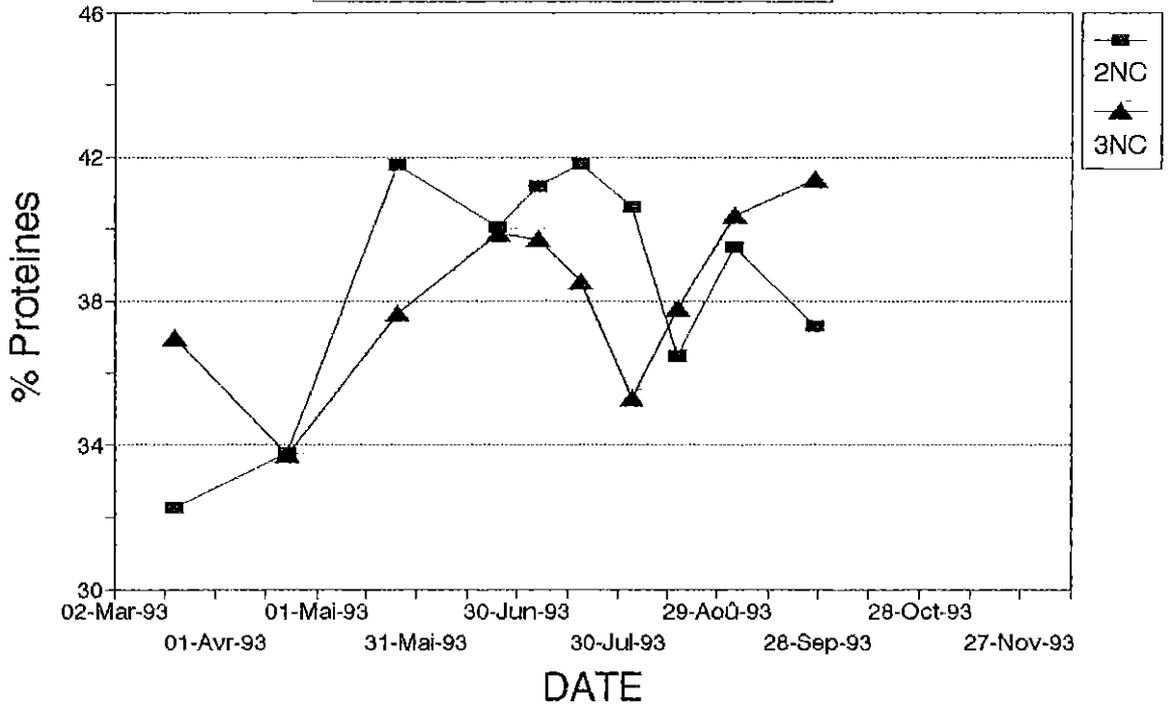


Fig. 7'

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Estran

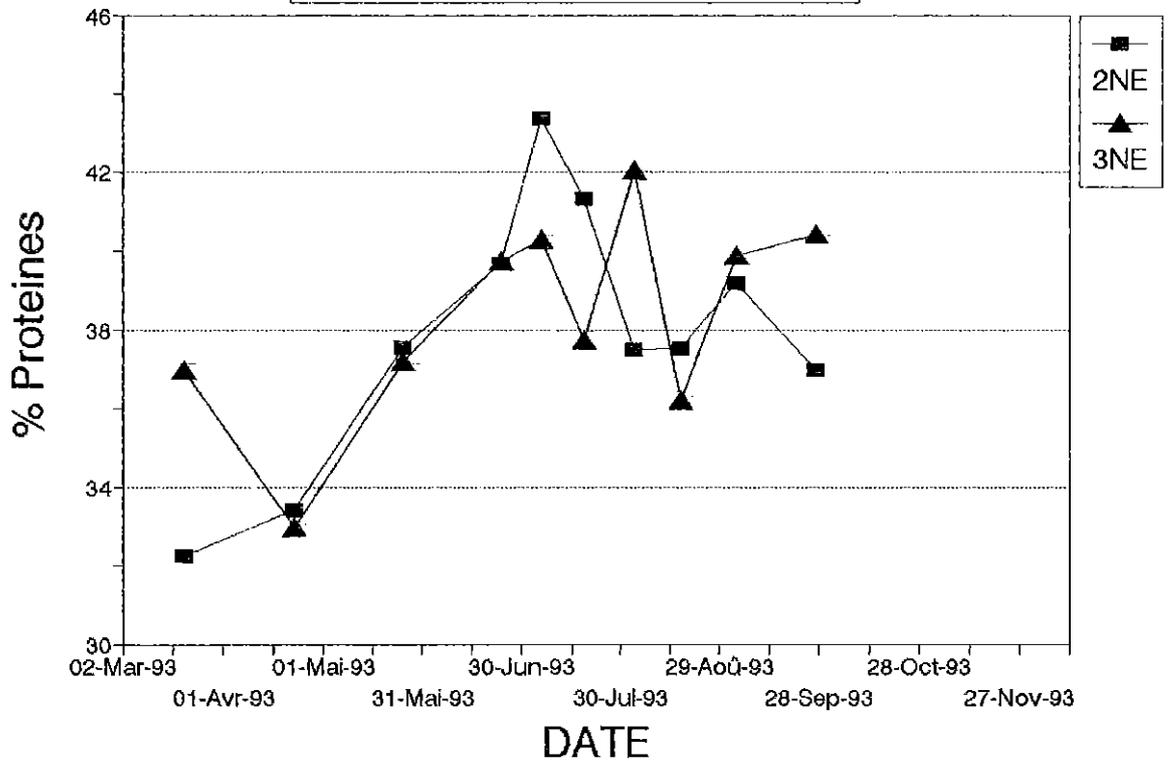


Fig 8

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Claire

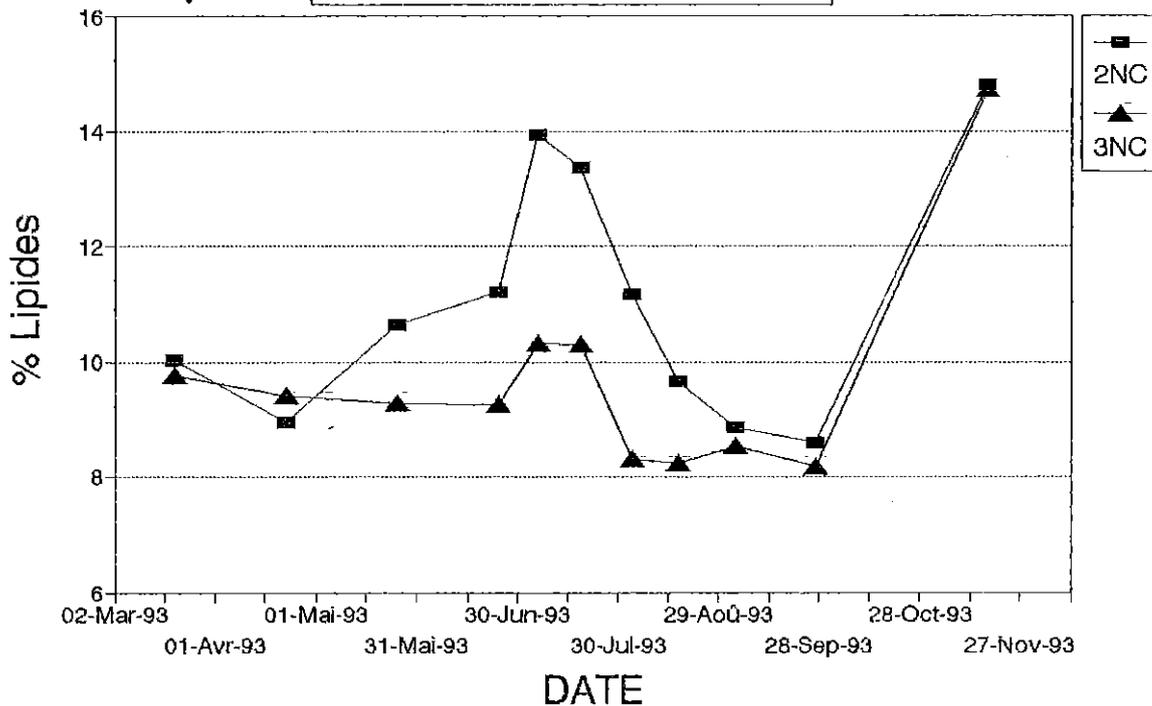


Fig 8'

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Estran

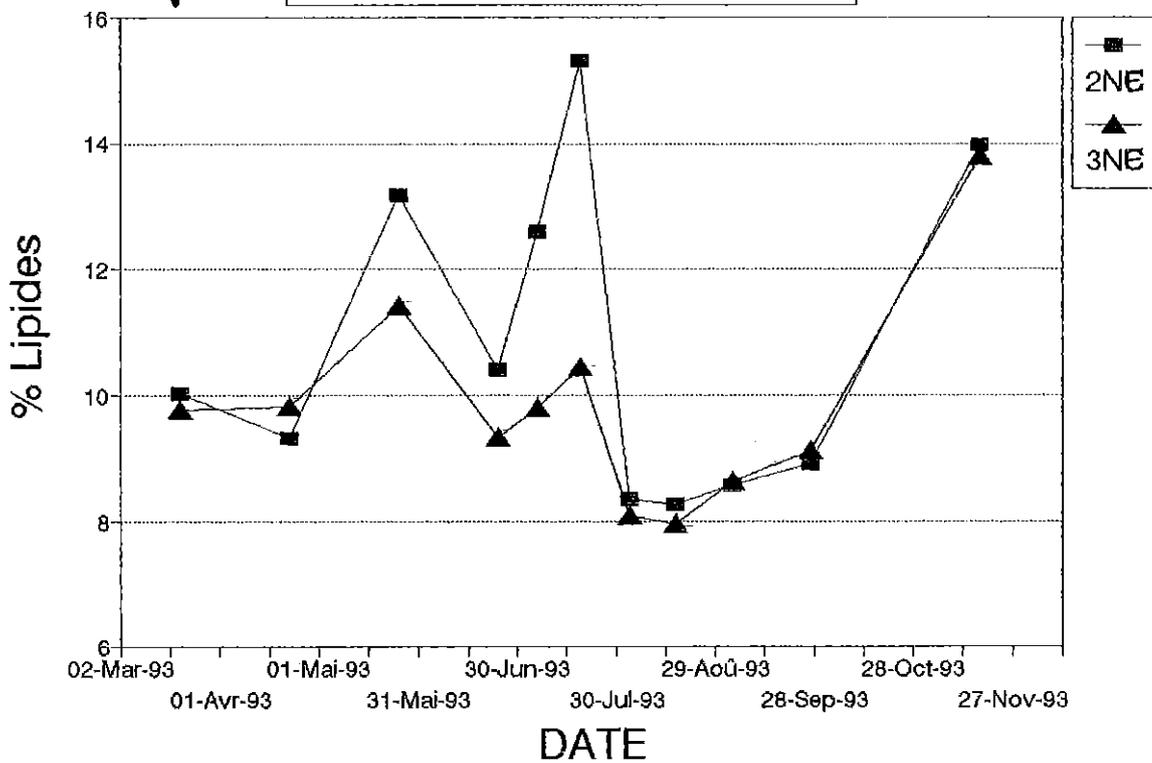


Fig. 9

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Claire

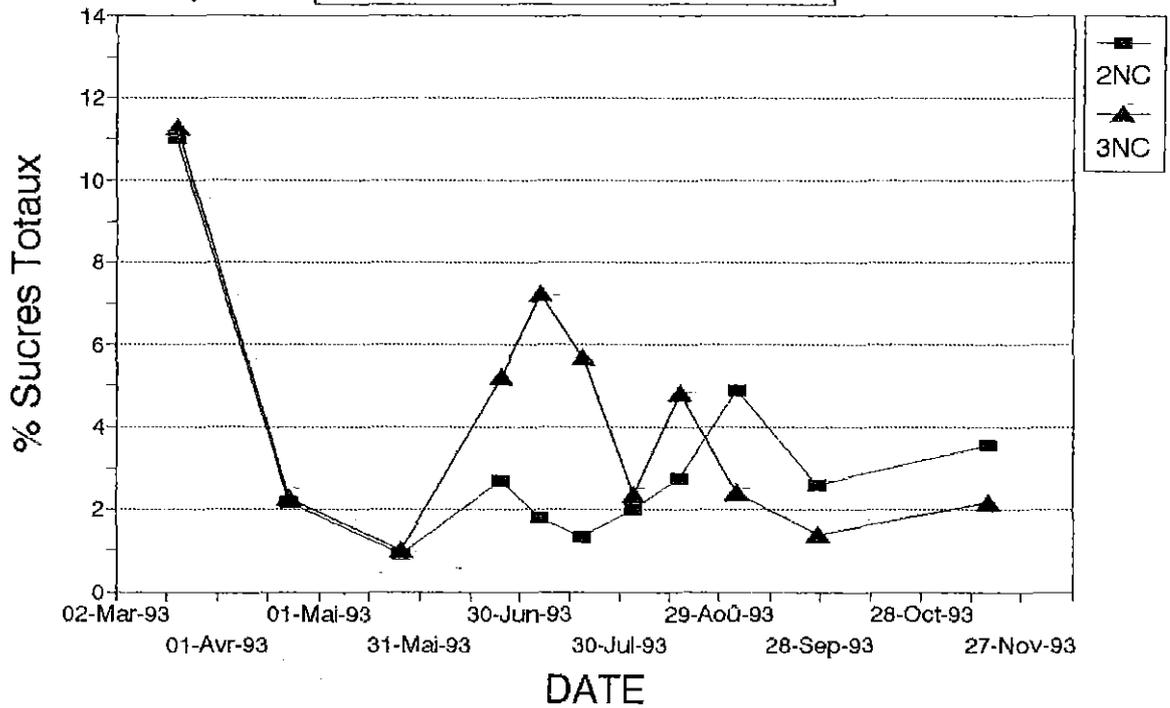


Fig. 9'

POLYPLOIDES *C.gigas* 1993 Estran

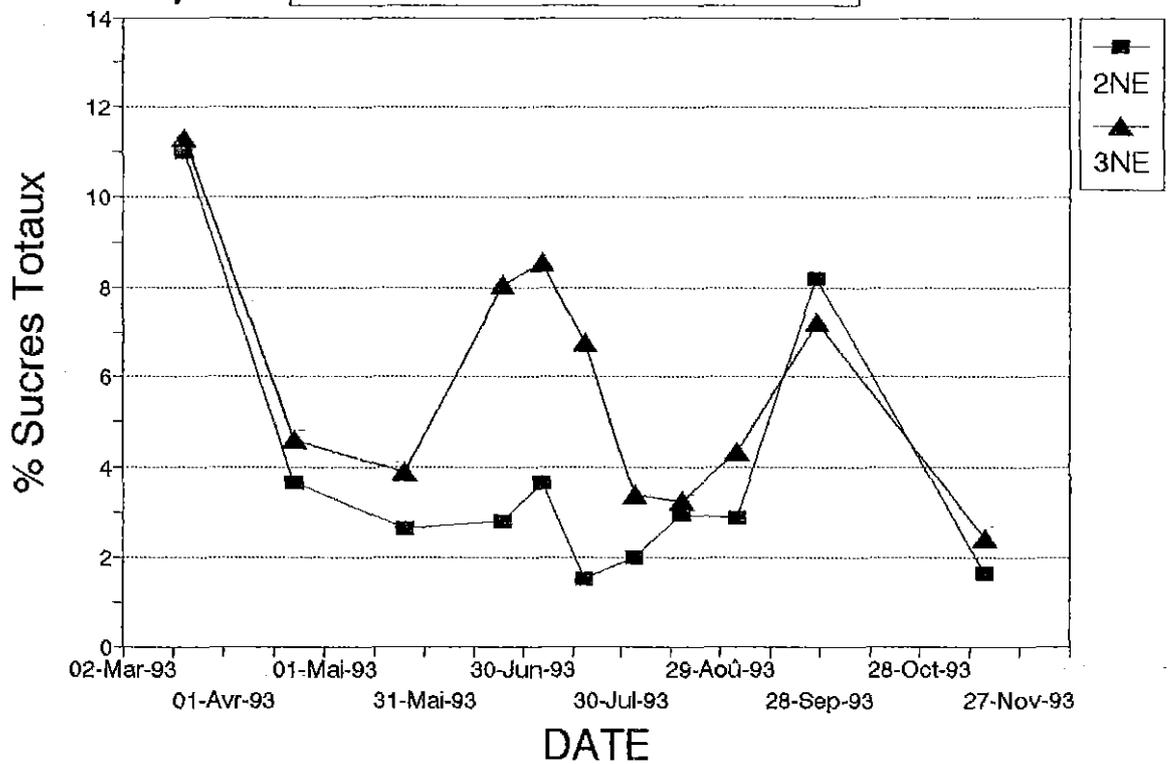


Fig. 10

POLYPLOIDES *C. gigas* 1993 Claire

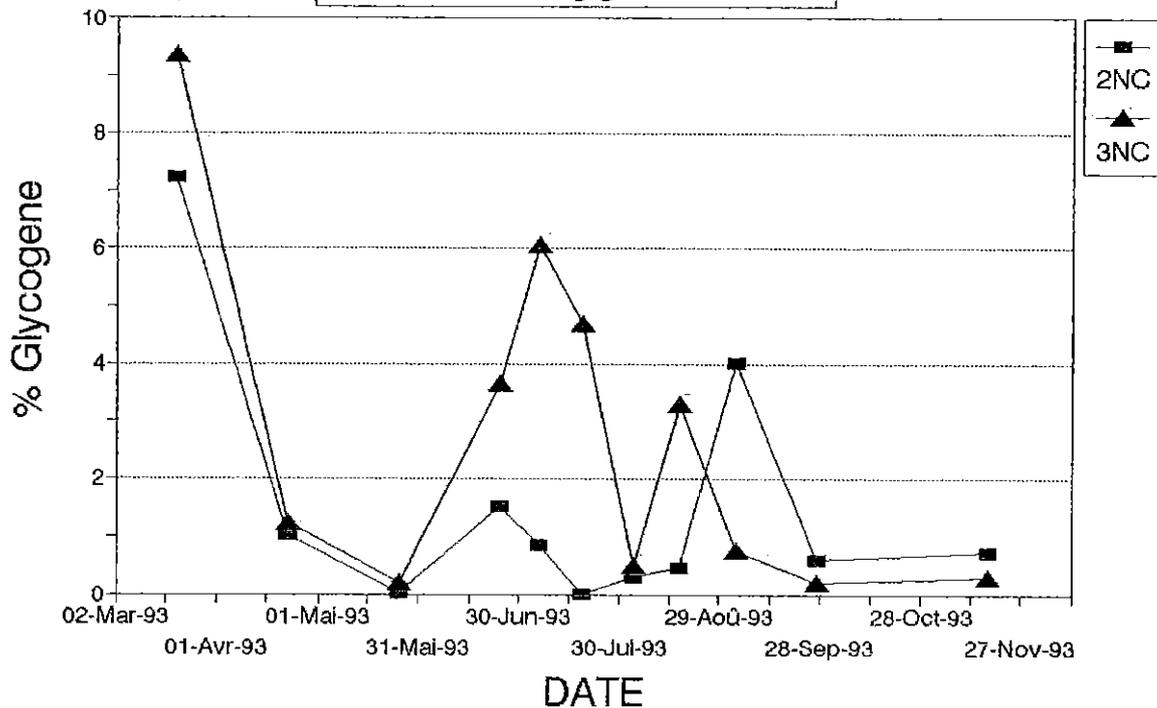
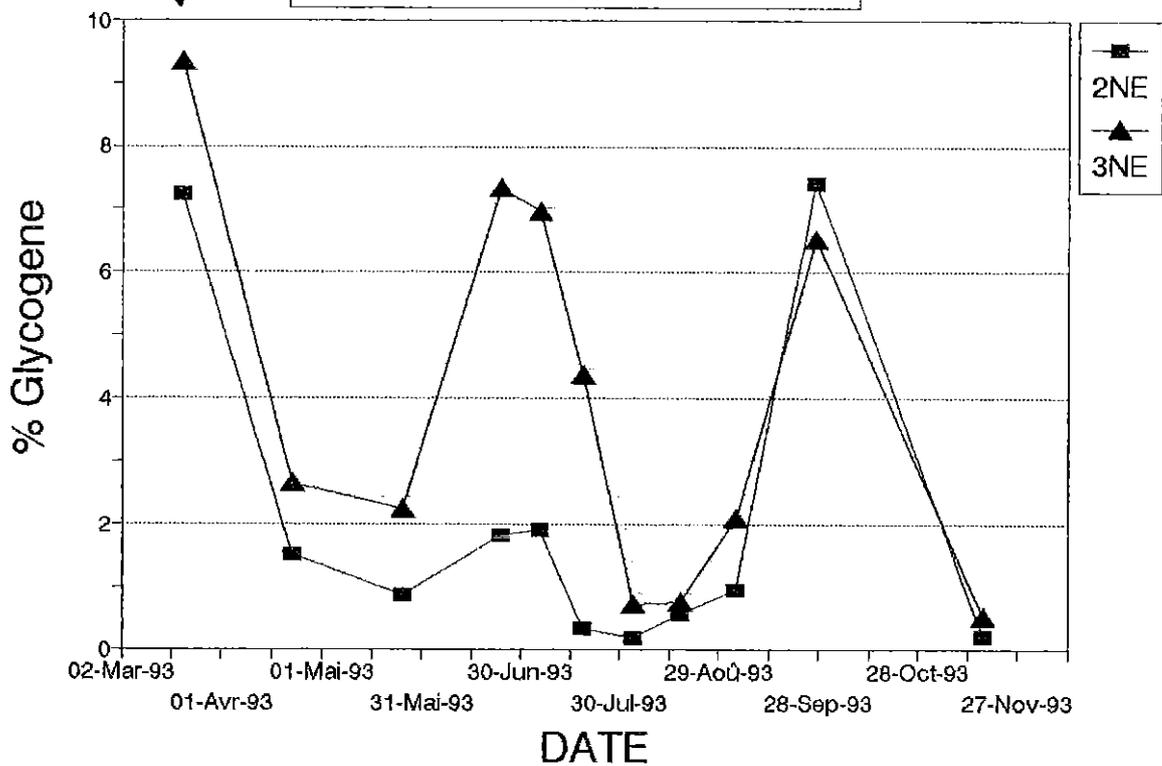


Fig. 10'

POLYPLOIDES *C. gigas* 1993 Estran



RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS GENETIQUES EFFECTUES A  
LA TRINITE/MER EN 1992 ET 1993.

Anne-Geneviève MARTIN

Gilbert TIGE

Joseph MAZURIE

Aimé LANGLADE

Serge CLAUDE

Jean-François BOUGET

Guytaine LE MOUROUX

Yvette LE COGUIC

IFREMER- La Trinité sur Mer  
Laboratoire Ressources Aquacoles

# RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS GENETIQUES EFFECTUES A LA TRINITE/MER EN 1992 ET 1993.

## 1.- TEST DE SOUCHES POLYPLOIDES

### 1.1 Mise en place et protocole

L'espèce *Ostrea edulis* possède génétiquement 10 paires de chromosomes ( $10 \times 2n$ ).

Plusieurs lots d'huîtres triploïdes ( $10 \times 3n$ ) ont été produits à l'écloserie de La Tremblade en juin 1991. ces lots ont été obtenus par traitement des oeufs à la cytochalasine B, juste après la fécondation, selon la méthode décrite par Gendreau et Grizel (1990). Après prégrossissement, deux lots de 2 000 individus ont été mis en élevage en mai 1992, l'un en Baie de Quiberon, l'autre en Méditerranée. Le taux de triploïdie initial est de 70%. Les 30% d'individus diploïdes réfractaires servent de témoin. Un protocole de suivi des performances a été établi. Les paramètres étudiés durant l'expérience sont:

- la mortalité
- la croissance (biométrie)
- la qualité de chair (index de condition et composition biochimique)
- la maturation sexuelle (observation macroscopique)
- le taux d'infestation par *Bonamia ostreae* frottis coeur) et le taux de *Polydora* sp. (observation macroscopique des coquilles)
- le taux de triploïdie (par imagerie numérique, Gérard et coll. 1991)

En ce qui concerne l'essai réalisé en Baie de Quiberon, les 2 000 individus ont été répartis en 4 poches-casiers surélevées de 10 à 12 cm au dessus du sol, et placées sur la concession IFREMER par - 5 m au zéro des cartes. Le calendrier des interventions et prélèvements est le suivant:

- 06 août 1992 :comptage mortalité
- 16 novembre 1992 :dédoublément et prélèvements
- 11 février 1993 :prélèvements
- 20 avril 1993 :prélèvements
- 29 juin 1993 :prélèvements
- 22 juillet 1993 :prélèvements
- 28 septembre 1993 :prélèvements
- 30 novembre 1993 :prélèvements
- Fin 1993 :bilan provisoire
- Septembre 1994 :complément biochimie

Le protocole de suivi prévu durant l'année 1994 est donné ci-après:

fin juin 1994 :comptage poches 1 et 1' prélèvement sur poches 2 et 2'  
traitement sur échantillon de 100  
fusion poches 2 et 2'

fin nov. 1994 :comptage poches 1 et 1'  
prélèvement sur poches 2 et 1'  
Traitement sur échantillon de 100

fin 1994 :2ème bilan

fin 1995 :complément bilan avec biochimie

## 1.2 Premiers résultats

Seulement une partie des prélèvements de 1993 a été analysée.

### 1.2.1 Mortalité et parasitisme

Tableau 1.- Evolution de la mortalité des lots d'huîtres plates depuis la mise en élevage jusqu'au dédoublement (mélange triploïdes - diploïdes)

Date	19 mai 1992	6 août 1992			16 novembre 1992			19 mai au 16 nov		Dédoublement	
Poche	Viv.	Vivantes	Mortalité relative	Mortalité perceur*	Vivantes	Mortalité relative	Mortalité perceur	Mortalité cumulée	Mortalité perceur*		Vivantes
TRP1	540	497	8 %	68 %	390	21.5 %	20 %	27.8 %	35 %	TRP1	195
										TRP1'	195
TRP2	540	516	4.4 %	83 %	422	18.2 %	5 %	21.9 %	27 %	TRP2	201
										TRP2'	201
TRP3	540	514	4.8 %	58 %	396	23.0 %	0 %	26.7 %	8 %	TRP3	188
										TRP3'	188
TRP4	540	489	9.4 %	66 %	381	22.1 %	4 %	29.4 %	22 %	TRP4	180
										TRP4'	181
<b>Moy/P.</b>	<b>540</b>	<b>504</b>	<b>6.7 %</b>	<b>68.8 %</b>	<b>397</b>	<b>21.2 %</b>	<b>7.3 %</b>	<b>26.5 %</b>	<b>23 %</b>	<b>Moy/P</b>	<b>191</b>

\* calculée en pourcentage de la mortalité totale

Tableau 2.- Evolution de la mortalité des lots d'huîtres plates durant l'année suivant le dédoublement (mélange triploïdes - diploïdes)

Date	16 nov 1992	19 avril 1993		29 juin 1993		22 juillet 1993		28 sept. 1993		30 nov. 1993		sur 12 mois
Poche	Viv.	Viv.	Mort. partiel.	Viv.	Mort. partiel.	Viv.	Mort. partiel.	Viv.	Mort. partiel.	Viv.	Mort. partiel.	Mort. Totale
TRP1	195	178	9 %					137	23 %	128	7 %	34 %
TRP1'	195			156	20 %	139	11 %	dt 17%	perceur	109	22 %	44 %

La mortalité consécutive à la mise en élevage est faible (6.6%) et essentiellement due à l'action des bigorneaux perceurs (tableau 1). A partir d'août 1992, la mortalité augmente tout en restant compatible avec les taux observés habituellement. La prédation par perceurs n'en est plus la cause principale. Le taux global en novembre 1992 est de 26.5% dont près d'un quart par perceur.

Après dédoublement, la mortalité sur un an, de novembre 1992 à novembre 1993 est en moyenne de 40% dont la moitié par perceur (tableau 2).

**Au total, depuis la mise en élevage, la mortalité cumulée sur un an et demi, sur la poche 1, est de 56 % (303/540) dont un tiers environ dû aux perceurs.** Les résultats exprimés en survie sont représentés sur la figure 1.

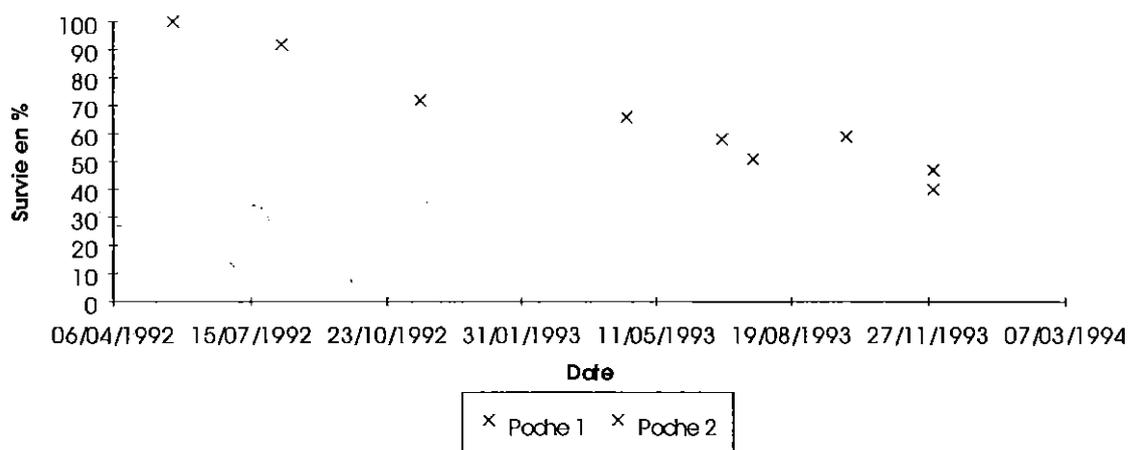


Figure 1.- Courbe de survie du mélange d'huîtres plates triploïdes-diploïdes de mai 1992 à novembre 1993

Ni *Bonamia* ni *Marteilia* n'ont été observés jusqu'en novembre. *Bonamia* a été décelé à faible taux en février (1/20 diploïdes, 0/40 triploïdes). Les analyses des lots suivants sont en cours).

La présence de *Polydora* est par contre non négligeable puisque décelée dès novembre sur 97% des huîtres et confirmée par la suite sur 92 à 98% des huîtres, selon les lots avec 2 à 12% d'individus sérieusement atteints.

### 1.2.2.- Evolution du taux de triploïdie

Le taux de triploïdie est vérifié à partir d'un échantillon de 60 individus (tableau 3).

Tableau 3.- Evolution du taux de triploïdes des échantillons prélevés

Date	19/05/92	17/11/92	12/02/93	19/04/93	29/06/93	2/07/93	28/09/93	30/11/93
Taux de triploïdie	70/100	31/60	40/60	37/60	49/60	44/60	28/56	
	70%	52 %	67 %	62 %	82 %	73 %	50 %	

Les variations importantes observées sur le taux de triploïdie ne sont pas toujours dans le même sens et sont probablement dues à l'échantillonnage. Le fait que le nombre de triploïdes soit variable et souvent nettement supérieur au nombre de diploïdes rend le traitement statistique moins puissant et diminue le degré de signification des différences observées.

### 1.2.3.-Evolution du taux de maturation sexuelle

Le taux de maturation n'est qu'indicatif puisque déterminé par simple observation de produits sexuels sur les frottis destinés à l'examen pathologique (cf échelle de maturation, tableau 4).

Tableau 4.- Echelle macroscopique de maturation des huîtres plates (Marteil et al. 1976).

Stade	0	1	2	3	4	5
Degré	maigre	peu gras	gras	très gras	laiteux	ardoisé

On constate cependant la présence de produits sexuels en formation sur certains des individus triploïdes dès novembre, puis en février et en avril (stade 1). En juin et juillet, on trouve des stades plus évolués de la gamétogénèse, allant jusqu'au stade 3 pour les triploïdes et jusqu'au stade 5 pour les diploïdes (figures 2 et 3). Le taux d'individus en cours de maturation est beaucoup plus élevé pour ces derniers que pour les premiers.

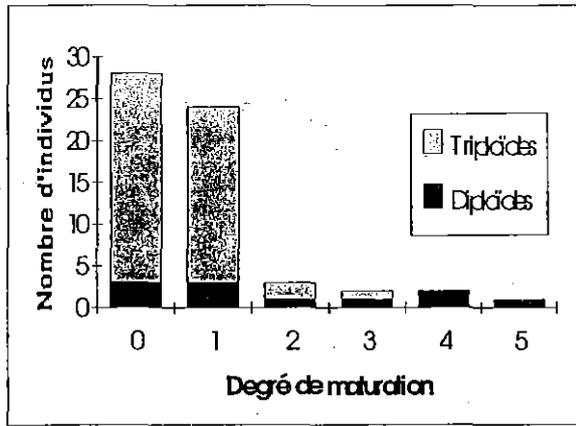


Figure 2.-Histogramme de répartition des individus selon leur degré de maturation au mois de juin.

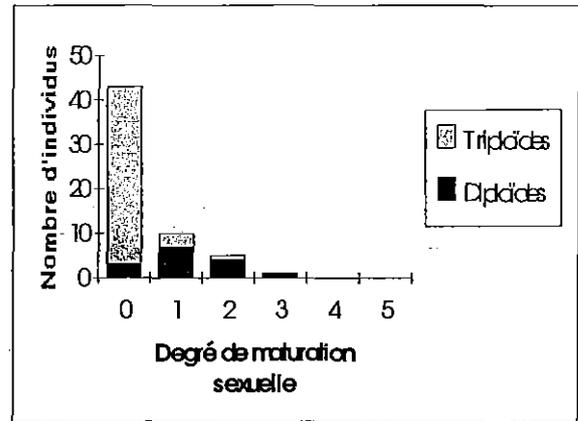


Figure 2.-Histogramme de répartition des individus selon leur degré de maturation au mois de juillet.

#### 1.2.4.- Croissance (figures 3 et 4)

Les individus triploïdes, de poids inférieur aux individus diploïdes en début d'élevage, croissent plus rapidement ensuite pour dépasser les diploïdes. L'inversion de la tendance se faisant fin juin. La variabilité des échantillons (variabilité du nombre de triploïdes dans les échantillons traités et variabilité individuelle) ne permet pas, cependant, de conclure à une différence significative au risque 5%, que ce soit sur le poids total ou sur le poids de chair sèche. Il en est de même pour l'index de condition de Laurence et Scott.

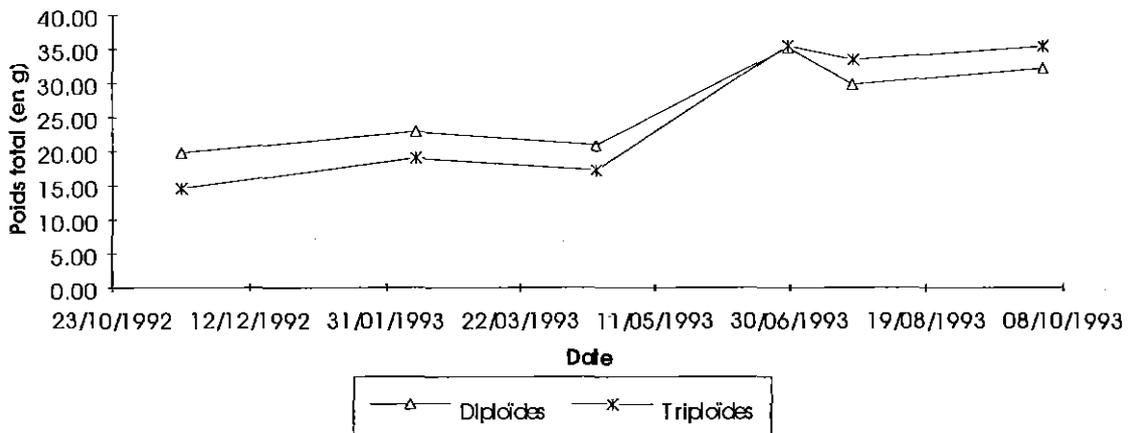


Figure 4.- Croissance simultanée des individus diploïdes et triploïdes exprimée en poids frais total.

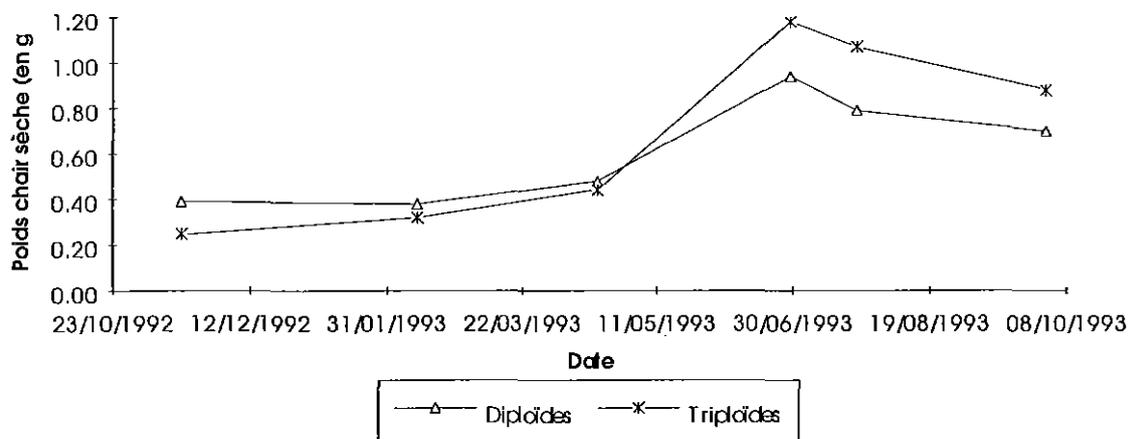


Figure 5.- Croissance simultanée des individus diploïdes et triploïdes exprimée en poids de chair sèche.

### 1.2.5.- Composition biochimique

Les analyses biochimiques seront réalisées d'avril à juillet 1994. Un complément d'interprétation des résultats sera donné ultérieurement.

### **1.3.- Calendrier des opérations**

Le calendrier des différentes opérations décrites est donné en annexe I et I bis.

## **2. Test des huîtres plates résistantes de deuxième génération : Lignée 1985**

Plusieurs lots de F2 avaient été produits, en mars 1990, à partir de différents lots des premières générations de F1 (lignée 1985) ayant subi des pressions de sélection variable: inoculation de *Bonamia* et/ou sélection naturelle dans différents sites, y compris un site parasité par *Marteilia refringens*. Un témoin, issu également d'écloserie à partir de géniteurs de la Baie de Quiberon "tout-venant" leur est opposé. La période de prégrossissement s'est déroulée de juin 1990 à décembre 1991 en Baie de Quiberon (concession IFREMER, -5m) et de juin 1990 à mars 1992 en rivière de Crac'h.

## 2.1.- Baie de Quiberon

Durant la période de prégrossissement, de fortes mortalités ont eu lieu, essentiellement estivales et plus fortes sur les lots F2 que sur le lot témoin. Elles ne peuvent être attribuées au parasite *Bonamia*, le taux d'infestation n'excédant pas 2% en décembre (tableau 5). Elles peuvent être le reflet d'une fragilité du naissain d'écloserie variable selon les lots et la taille de mise en élevage.

Tableau 5.- Taux de mortalité et de parasite observés en Baie de Quiberon durant la période de prégrossissement.

Lot	Juin 90 à nov.90	Juin 90 à juillet 91	Juin 90 à Déc 91	Taux de <i>Bonamia</i>
Témoin	37%	43%	47%	1/50
F2 Paimpol	59%	68%	74%	0/50
F2 Quiberon	48%	56%	61%	1/50
F2 Inoc.	58%	63%	64%	1/50

Des tests par inoculation ont été tentés à l'écloserie de La Tremblade de février à novembre 1992 selon un protocole éprouvé en 1991 sur une F1 de lignée 1989 (Martin et al 1992). Une mortalité accidentelle est intervenue au mois de juin dans les bacs de F2 inoculés. L'analyse des huîtres mortes n'ayant pu être réalisée que dans 13% à 54% des cas, selon, les lots, l'ensemble des résultats est difficilement interprétable.

Une centaine d'huîtres de chaque lot ont été conservées en poche en Baie de Quiberon afin de continuer en parallèle des tests sur le terrain. Les résultats de survie sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6.- Nombre de survivantes observé au cours du test en Baie de Quiberon.

Lot	25/02/92	10/08/92	06/04/93	02/11/93	
Témoin	100	85	54	29	
F2 Paimpol	100	95	85	55	
F2 Quiberon	100	97	85	45	
F2 Inoc.	100	86	62	33	

Le taux de survie des deux lots de F2 issus de sélection naturelle est significativement différent de celui du lot témoin (au risque 5%). Celui du lot F2 sursélectionné par inoculation n'est, par contre, que légèrement supérieur à ce dernier.

Les résultats de survie observés sur les poches mises en réserve confirment les résultats précédents pour les F2 de sélection naturelle. Notons que seules les poches F2 Quiberon peuvent réellement être comparées (densité similaire à celle des poches-témoins). On note cependant une grande variabilité pour les poches de même origine.

Tableau 7.- Nombre de survivantes observé sur les poches mises en réserve en Baie de Quiberon.

DATE:	16/12/91	25/02/92	02/11/93	Survie
Poche	Nb <i>Bonamia</i>	Nb viv.	Nb viv.	sur 20 mois
Témoin	1/50	207	30	14.5%
Témoin	0/50	207	45	21.7%
F2 Paimpol		120	45	37.5%
F2 Paimpol		121	59	48.7%
F2 Quiberon	1/50	200	73	36.5%
F2 Quiberon	1/50	201	130	64.7%

## 2.2.- Rivière de Crac'h

Deux lots avaient été mis en rivière de Crac'h (témoin et F2 de parents F1 sélectionnés dans le Golfe du Morbihan) dans le but de tester la résistance vis à vis des deux parasites, *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*. Ces lots sont restés en prégrossissement de juin 1990 à mars 1992, date à laquelle les huîtres furent triées pour analyse et inoculation.

Dans ce site, les mortalités ont également été très importantes mais plus rapides cependant sur le lot témoin que sur le lot F2 (tableau 8), à l'inverse de l'observation faite en Baie de Quiberon.

Tableau 8.- Survie et taux de parasites observés sur les huîtres placées en rivière de Crac'h pendant le prégrossissement.

Lot	Juin 90 à sept.90	Juin 90 à juin-juill.91	Juin 90 à nov.91	Juin 90 à mars 92	Taux de <i>Bonamia</i>	Taux de <i>Marteilia</i>
survie Témoin	52%	32%	27%	10%	0/50*	20/50
survie F2 Golfe	77%	55%	19%	17%	0/50*	19/50

\* forte présence de *Polydora* sur presque toutes les huîtres

Les taux de *Marteilia* observés sont très élevés et identiques sur les deux lots après 21 mois d'élevage. Le taux de *Polydora* est également très important.

Une partie des huîtres a été inoculée en mars 1992. Les survivantes ont été remises en rivière jusque début mai pour être ensuite envoyées à la Tremblade après traitement contre *Polydora* selon une des méthodes décrites par Catherine et al., 1990 (trempage dans de la saumure à 300g/l pendant 1 minute, après assec de 21h00 et suivi d'un nouvel assec de 9h00).

Tableau 9.- Nombre d'huîtres survivantes observé sur les poches placées en rivière de Crac'h depuis l'inoculation.

	18/03/92 Labo	20/03/92 Nb viv. remises	04/05/92 Nb viv.	SURVIE depuis 20/03/92	01/12/92 Nb viv.	SURVIE depuis 20/03/92	09/12/93 Nb viv.	SURVIE depuis 20/03/92
Témoin inoculé	66	64	38	59%	28	44%	12	19%
Témoin non inoc.	27	26	18	69%			1	4%
F2 Golfe Morbihan inoculé	89	83	57	69%	37	45%	16	19%
F2 Golfe Morbihan non inoc.	106	102	74	73%			4	4%

Aucune différence de taux de survie n'est observée en fin d'essai. L'infestation par *Marteilia*, très importante dès l'âge de 18 mois, a pu masquer une éventuelle résistance à *Bonamia*.

### 2.3 Calendrier des opérations

Le calendrier des différentes opérations décrites est donné en annexe II.

## 3. Test des huîtres plates résistantes de deuxième génération : Lignée 1989

### 3.1 Mise en place

Deux nouvelles générations F2 avaient été produites au cours du printemps 1992, à partir de la F1 de lignée 1989 testée en 1991 : l'une issue de géniteurs F1 inoculés en *Bonamia*, l'autre issue de géniteurs F1 non inoculés. Deux témoins étaient produits dans le même temps: un lot d'huîtres issues de géniteurs "tout-venant" de la Baie de Quiberon et un lot issu de géniteurs méditerranéens.

Les quatre lots ont été mis en pré-grossissement à la nurserie de Bouin. De fortes mortalités se sont produites pendant cette période, essentiellement pour les deux lots témoins (mi-juillet pour le lot Méditerranée, fin juillet pour le lot Quiberon). Aucun parasite n'a été décelé lors du contrôle préalable à la mise en élevage. Les mortalités ont pu être favorisées par de fortes élévations de températures, certaines huîtres montrant déjà une maturité sexuelle avancée.

Les différents lots ont été mis en pré-élevage en Baie de Quiberon (concession IFREMER) au cours de l'été 1992. Le lot témoin Quiberon a été immergé 40 jours après les autres.

Le dispositif expérimental se compose de casiers surélevés testés en 1991 et disposés au sol en filières (figure 6). Chacun des lots F2 et témoins sont répartis dans 15 poches de 500 huîtres disposées selon un plan expérimental en blocs complets à 1 facteur contrôlé et plusieurs facteurs étudiés, avec répétition (Philippeau 1989). Chaque filière représente un bloc de 12 poches à raison de 3 poches (ou répétitions) par lot réparties au hasard sur la ligne selon la figure 12.

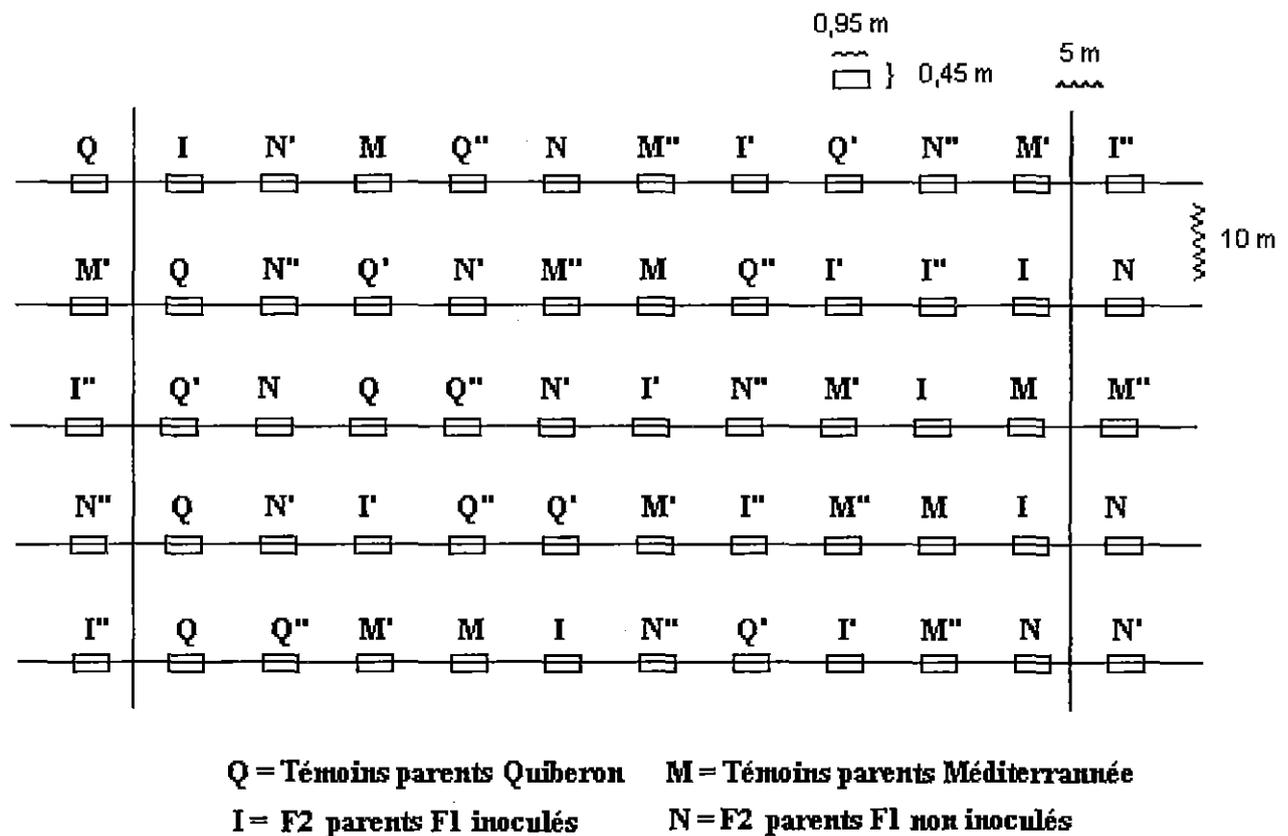


Figure 6.- Plan expérimental utilisé dans le test de sélection de la deuxième génération (lignée 1989)

### 3.2.- Premiers résultats

Deux séries d'interventions ont eu lieu en 1993:

- février 1993 : tri, dédoublement et prélèvement avec remise de 250 huîtres par poche selon le même dispositif
- octobre-novembre 1993: tri et prélèvement.

Les prélèvements sont utilisés pour la biométrie et l'analyse histologique (100/lot).

Tableau 10.- Mortalité et taux de *Bonamia ostreae* observés en 1993 pour les différents lots d'huîtres plates (F2 et témoins) mis en élevage en 1992.

Lot	Février Mortalité*	1993 Tx de <i>Bonamia</i> sur frottis	Oct.nov. Mortalité**	1993 Tx de <i>Bonamia</i> sur frottis
Lignée inoculée	22%	3/100	29%	10/100
Lignée non inoculée	9%	3/90	25%	9/100
Témoin Quiberon	7%	2/90	20%	7/100
Témoin Méditerranée	20%	4/90	63%	28/100

\* 50 à 55% de la mortalité est récente - faible mortalité par perceur.

\*\* Mortalité autre que perceur, la mortalité par perceur étant de 3 à 46% selon les poches.

Le lot Méditerranée a subi une forte mortalité entre février et novembre 1993. Le taux de *Bonamia* est plus élevé sur ce lot que sur les autres, mais le degré d'infestation de chaque huître parasitée est faible pour l'ensemble des lots. Des analyses complémentaires sont en cours.

### 3.3 Suite des opérations

Deux nouvelles séries de prélèvements sont prévues en 1994, avec bilan en fin d'année.

### 3.4 Calendrier des opérations

Le calendrier des différentes opérations décrites est donné en annexe III.

#### **4. Opérations mises en place en 1993 après la refonte du programme "résistance huître plate".**

##### ***4.1 Test de rétrocroisement***

Un test de rétrocroisement, destiné à voir si le caractère de résistance obtenu est bien héréditaire, a été mis en place en Baie de Quiberon, en été 1993, à partir de F2 de la lignée 1989 et de témoins issus de géniteurs Quiberon.

Le calendrier des opérations est donné en annexe IV.

##### ***4.2 Test de résistance des populations obtenues par mixage.***

Plusieurs lignées d'huîtres ayant subi différentes pressions de sélection vis à vis de *Bonamia ostreae* ont été croisées de façon contrôlée, selon un plan préétabli. Deux sous-populations issues de ces croisements ont été mises en élevage en Baie de Quiberon, ainsi que deux lots témoins.

Le calendrier des opérations est donné en annexe V.

ESSAI TRIPLOIDES HUITRES PLATES  
CALENDRIER DES OPERATIONS

PARENTS

230 huîtres de banc naturel Quiberon

NAISSAIN

Production 1991 - Induction triploïdie  
par cytochalazine B (taux mélange 70%)

MISE EN ELEVAGE en Baie de Quiberon  
19 mai 1992

Poches casiers surélevées de 10 à 12 cm  
au sol par - 5 m

INTERVENTIONS :

06 août 1992

Comptage mortalité : faible = 6.6%

16 novembre 1992

dédoublement - prélèvements - mortalité cumulée: 26.5%

11 février 1993

20 avril 1993

29 juin 1993

22 juillet 1993

28 septembre 1993

30 novembre 1993

Fin 1993: mortalité cumulée: 40% dont la moitié par perceur

BILAN provisoire

complément biochimie - septembre 1994

ESSAI TRIPLOIDES HUITRES PLATES  
PROTOCOLE DE SUIVI - ANNEE 1994

- fin juin 1994 : Comptage poches 1 et 1'  
Prélèvement sur poches 2 et 2'  
Traitement sur échantillon de 100  
Fusion poches 2 et 2'
- fin nov. 1994 : Comptage poches 1 et 1'  
Traitement sur échantillon de 100  
(poche 2 et 1' si besoin)
- Fin 1994 2ème BILAN
- Fin 1995 complément bilan avec biochimie

ESSAI HUITRES PLATES RESISTANTES  
de deuxième génération  
Lignée 1985

CALENDRIER DES OPERATIONS

PARENTS  
4 F1 de lignée 1985  
+ tout-venant Quiberon → témoins

NAISSAIN  
Production mars 1990

MISE EN ELEVAGE EN BRETAGNE  
Juin 1990  
Poches sur tables par -5 m → Baie de Quiberon  
Poches sur table coeff.90 → Rivière de Crac'h

PREGROSSISSEMENT

de juin 90 à décembre 91 - février 92

Forte mortalité le premier été  
Survie fin 1991 : 20 à 40% selon les lots F2  
27 à 53% selon témoins

TEST

Inoculation La Tremblade : décembre 91 → septembre 92

stress "eau de javel" avec absence d'analyses sur les huîtres mortes  
dans 13 à 56 % des cas selon les lots => interprétation difficile

Test sur sites bretons : février 92 → novembre 93

BILAN

ESSAI HUITRES PLATES RESISTANTES  
de deuxième génération - Lignée 1989

CALENDRIER DES OPERATIONS

PARENTS

F1 lignées 1989 : inoculée et non inoculée  
+ géniteurs Quiberon et Méditerranée → témoins

NAISSAIN

Production 1992 La Tremblade - Bouin  
forte mortalité en nurserie

MISE EN ELEVAGE EN BAIE de QUIBERON

1 août 1992 (I - NI - M)

10 septembre 1992 (Q)

Poches-casiers surélevées de 10 cm au dessus du sol, par -5 mètres

INTERVENTIONS :

janvier - février 1993: dédoublement

	Mortalité	Taux de <i>Bonamia</i>
Lignée inoculée	22 %	3/100
Lignée non inoculée	9 %	3/90
Témoin Quiberon	7 %	2/90
Témoin Méditerranée	20 %	4/90

**50 à 55% de la mortalité est récente - faible mortalité par perceurs**

octobre-novembre 1993: prélèvements

	Mortalité*	Taux de <i>Bonamia</i>
Lignée inoculée	29 %	
Lignée non inoculée	25 %	
Témoin Quiberon	20 %	
Témoin Méditerranée	63 %	

**mortalité autre que perceurs (3 à 46 % de mortalité par perceurs  
selon poches)**

BILAN FIN 1994





PERFORMANCES DE CROISSANCE D'HUITRES JAPONAISES  
TRIPLOIDES *CRASSOSTREA. GIGAS* EN NORMANDIE (1993)

Jean-Pierre JOLY

Philippe GOULLETQUER

François RUELLE

IFREMER- Port-en-Bessin

## PERFORMANCES DE CROISSANCE D'HUITRES JAPONAISES TRIPLOIDES *CRASSOSTREA. GIGAS* EN NORMANDIE (1993)

Les populations d'huîtres triploïdes et diploïdes témoins ont été mises en élevage le 23.03.93 sur le secteur conchylicole de la Baie des Veys (côte est Cotentin) à raison de quatre poches par modalité contenant chacune 200 animaux. Deux poches supplémentaires (densité: 244 et 249, 3N et 2N respectivement) ont également été déployées pour l'estimation du taux de survie. Une poche de 2N et 3N mélangés a été conservée suite à la réduction de la densité initiale de 240 à 210 individus par poche.

Les dates de prélèvement ont été effectuées selon le protocole initial (i.e., 8/04, 24/05, 21/06, 5/07, 27/07, 3/08, 16/08, 2/09, 14/09, 13/10, 16/11). Seul le taux de survie n'a pas été estimé en août. Ces prélèvements ont été traités selon le protocole biométrique et biochimique défini initialement.

Les principaux résultats sont présentés dans le tableau 1 et les figures de 1 à 7. Au 16.11, les huîtres 3N présentent une croissance supérieure aux diploïdes témoins pour tous les paramètres biométriques suivis (e.g., poids total, 50.2g (3N), 43.3g (2N)). La croissance supérieure des animaux triploïdes est corrélée à une prise de poids de coquille supérieure à celle observée chez les animaux témoins. L'effort de reproduction est observé entre le 16/08 et le 2/09, et atteint respectivement 34.4 et 17.2% de perte de poids de chair sèche chez les diploïdes et triploïdes. L'indice de condition est supérieur chez les animaux diploïdes jusqu'en période d'émission de gamètes (2/09) où la tendance s'inverse. De façon similaire au premier élevage suivi en 1991-1992, le taux de survie chez les triploïdes est inférieure à celui des témoins non traités. On notera que le taux de survie (3N) décroît principalement en période de maturation sexuelle. Le taux de triploïdie reste globalement constant au cours de la période d'échantillonnage pour les animaux traités (83.2 %  $\pm$ 2.69).

Figure 1

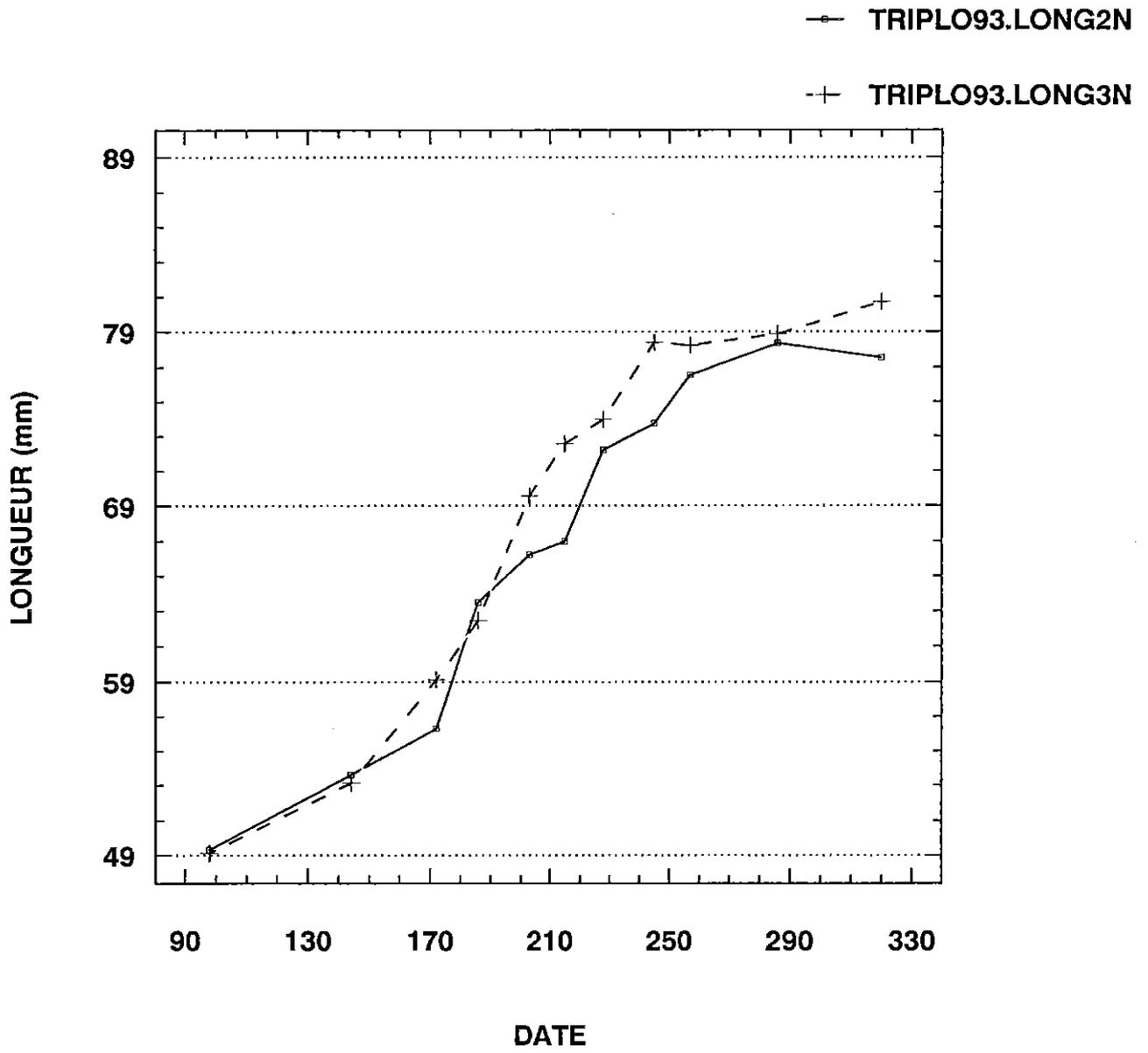


Figure 2

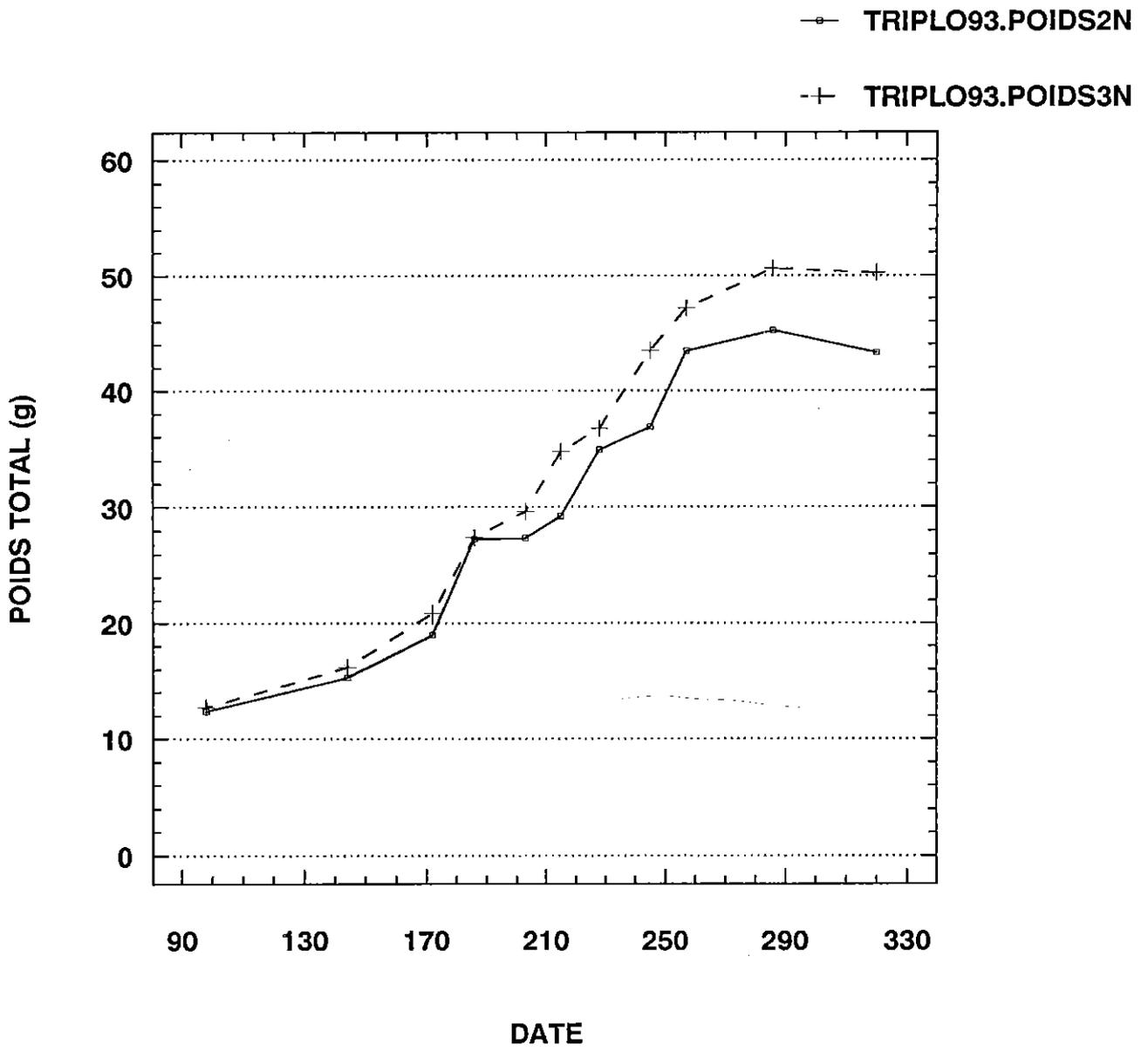


Figure 3

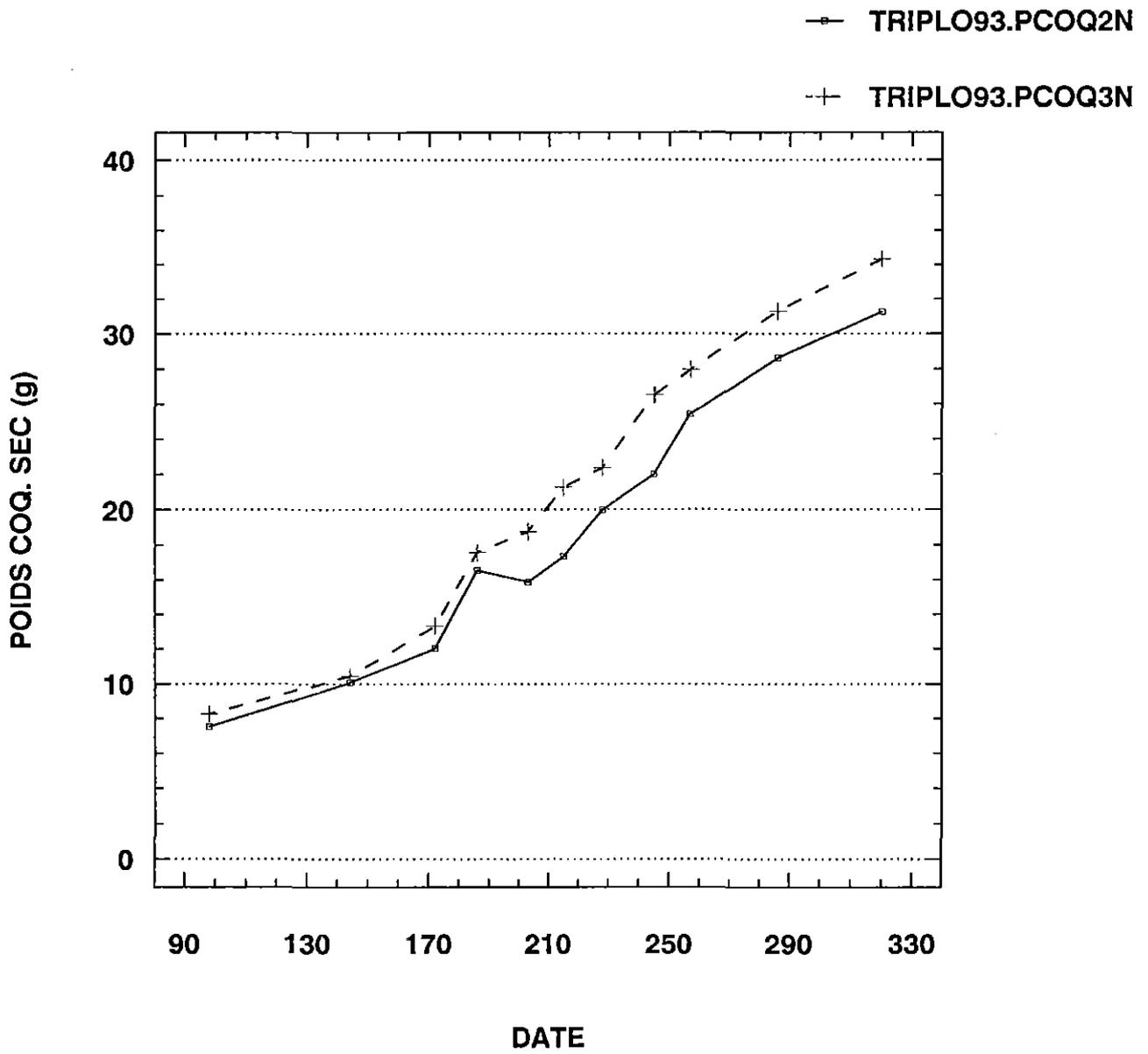


Figure 4

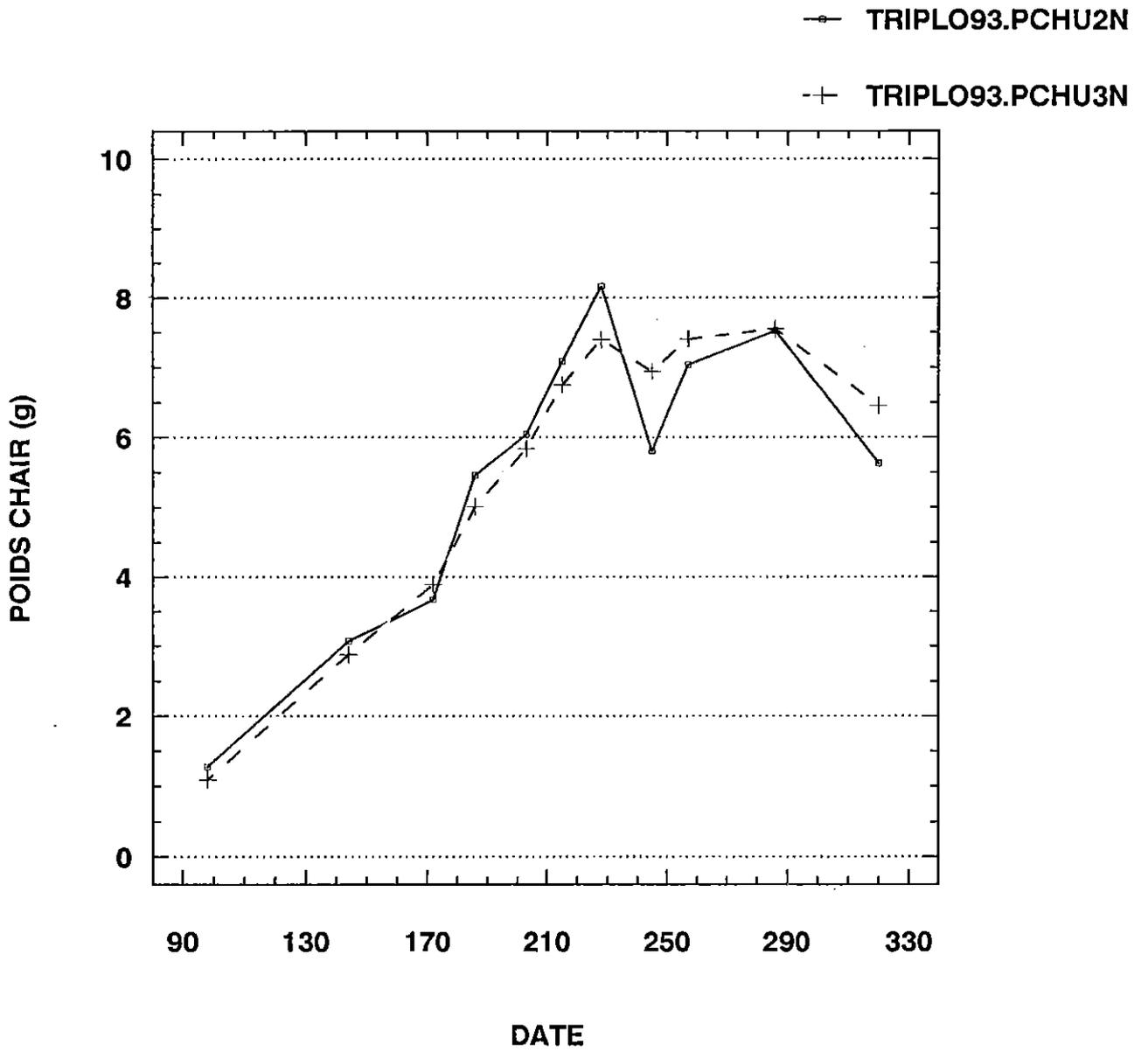


Figure 5

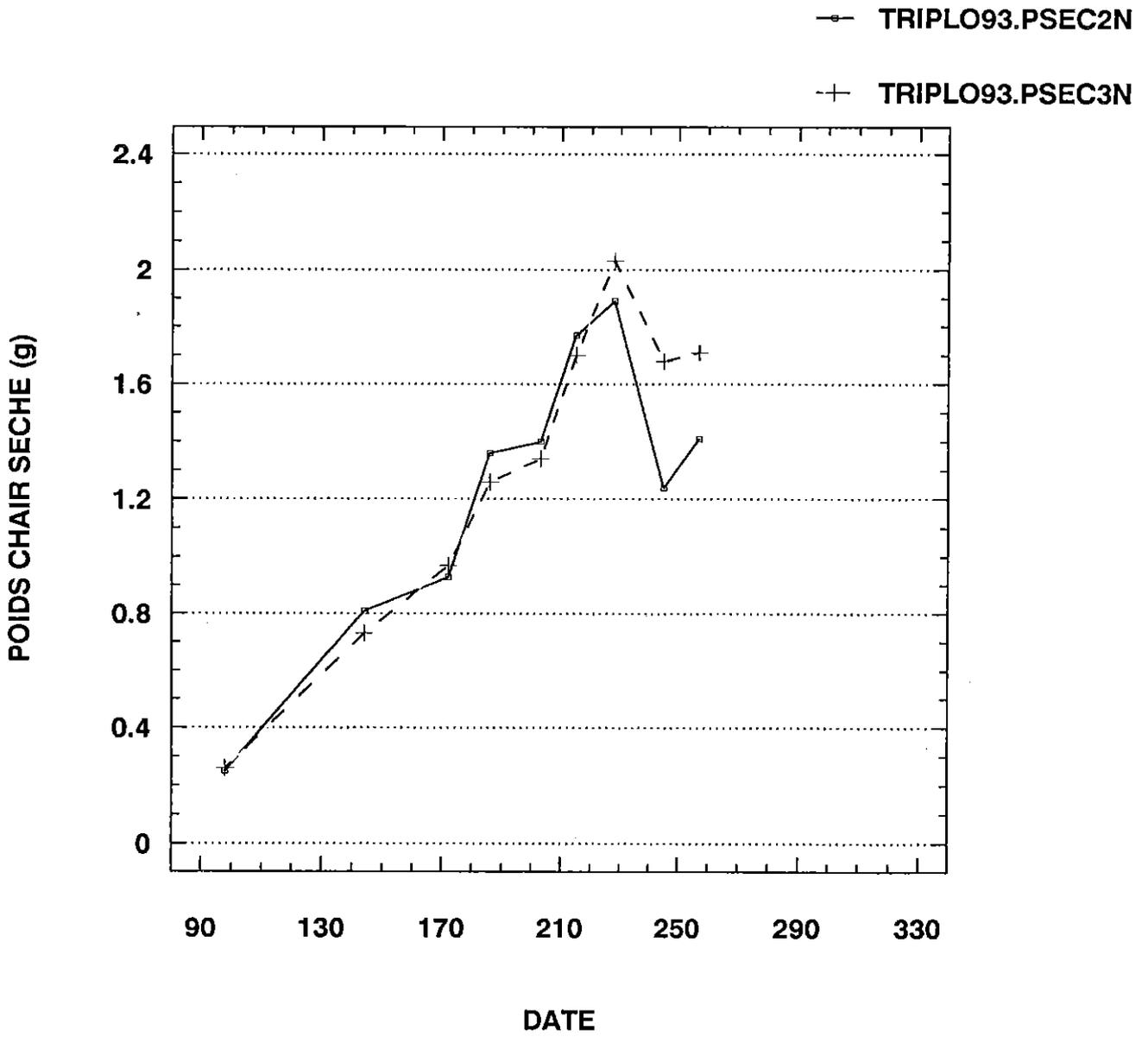


Figure 6

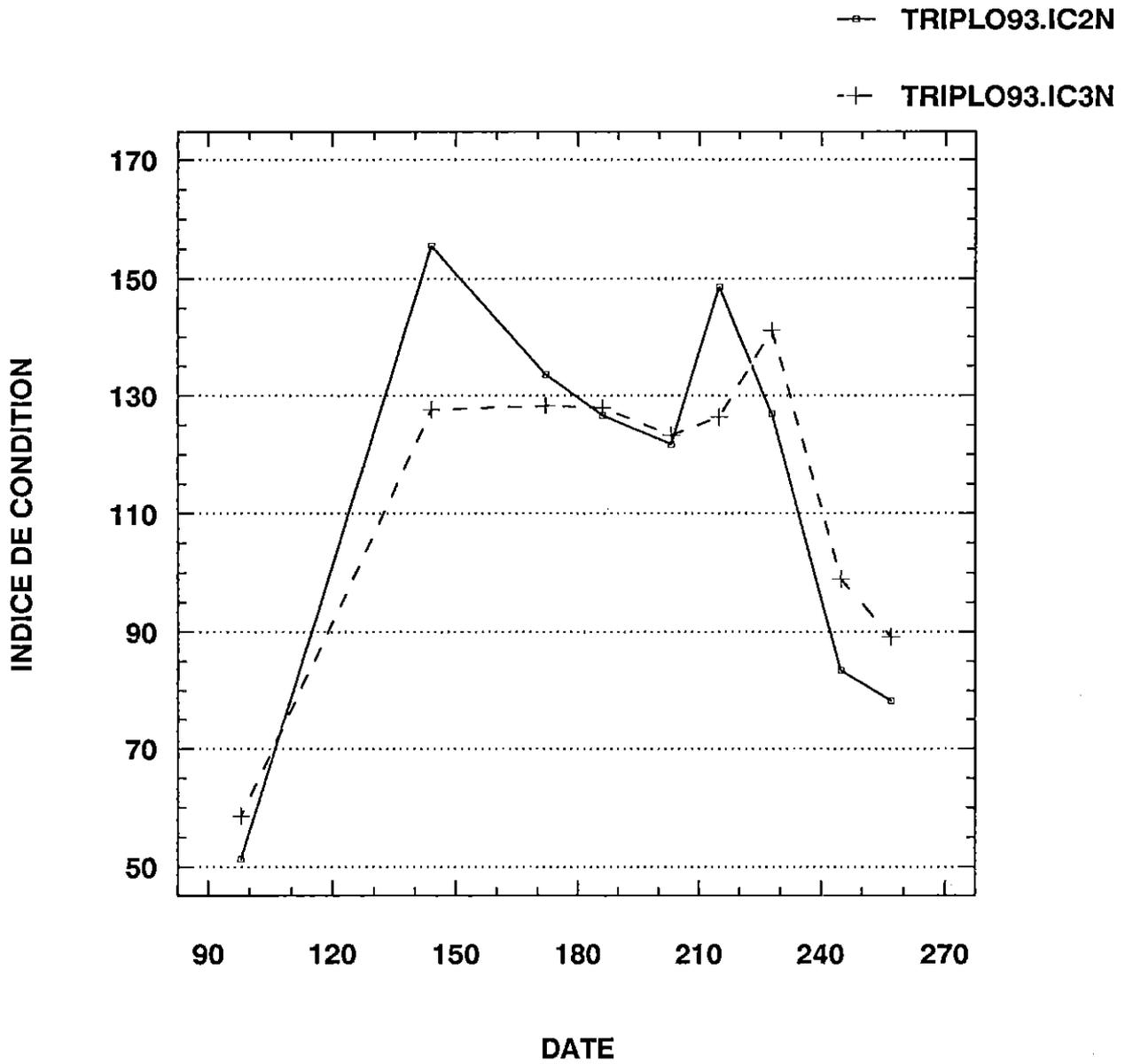


Figure 7

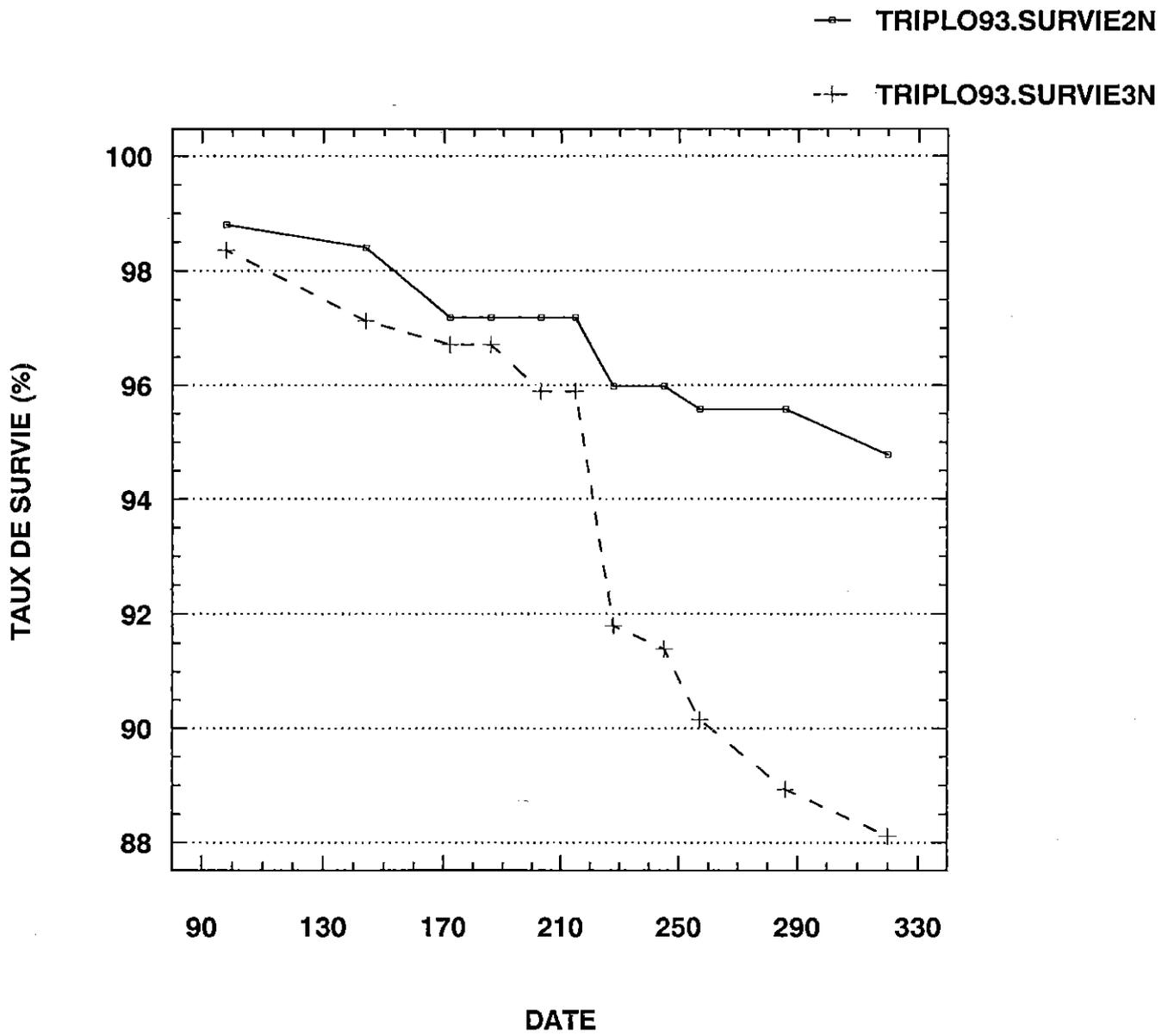


Tableau 1 : Evolution temporelle des principaux paramètres biométriques des populations diploïdes et triploïdes (1993).

DATE	LONGUEUR (mm)				POIDS TOTAL (g)				POIDS CHAIR HUMIDE (g)				NIVEAU DE PLOIDIE (%)
	DIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES	E.T	DIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES	E.T	DIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES
23-Mar					12,41		13,28		1,57		1,45		
8-Avr	49,33	7,53	49,13	6,05	12,40	4,33	12,70	3,22	1,28	0,46	1,09	0,33	87
24-Mai	53,63	7,20	53,13	6,18	15,31	5,25	16,17	3,43	3,08	1,24	2,88	0,57	77
21-Jun	56,28	5,71	59,11	6,20	19,01	4,63	20,89	4,19	3,67	0,97	3,89	0,88	80
5-Jul	63,48	7,34	62,45	7,48	27,30	6,63	27,44	6,87	5,46	1,34	5,01	1,42	83
27-Jul	66,23	7,86	69,55	7,71	27,36	7,26	29,65	6,94	6,04	1,88	5,84	1,66	93
3-Aoû	67,00	7,54	72,55	9,20	29,26	6,17	34,73	9,04	7,09	1,51	6,75	1,88	83
16-Aoû	72,20	9,08	73,98	7,87	34,88	7,32	36,75	7,53	8,16	2,00	7,40	1,95	
2-Sep	73,73	6,80	78,40	8,23	36,88	6,37	43,50	9,74	5,81	1,19	6,94	1,97	
14-Sep	76,55	8,13	78,25	8,03	43,44	7,63	47,14	10,23	7,04	1,25	7,41	1,71	
13-Oct	78,38	10,71	78,88	11,20	45,22	10,57	50,61	15,84	7,53	1,73	7,55	2,88	
16-Nov	77,53	9,43	80,73	9,04	43,31	9,85	50,24	12,22	5,63	1,46	6,45	2,03	

Indice de condition: Pds chair sèche\*1000/(Pds total-Pds coquille sèche) -Lawrence et Scott,1982

DATE	POIDS CHAIR SECHE (g)				POIDS COQUILLE SEC (g)				INDICE DE CONDITION		SURVIE(%)	
	DIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES	E.T	DIPLOIDES	E.T	TRIPLOIDES	E.T	DIPLOIDES	TRIPLOIDES	DIPLOIDES	TRIPLOIDES
23-Mar	0,22		0,25		7,40		7,97		44,51	46,14	100	100
8-Avr	0,25	0,09	0,26	0,08	7,53	2,74	8,26	1,65	51,33	58,56	98,80	98,36
24-Mai	0,81	0,32	0,73	0,19	10,10	3,70	10,45	1,94	155,47	127,62	98,39	97,13
21-Jun	0,93	0,23	0,97	0,22	12,05	2,41	13,33	2,62	133,62	128,31	97,19	96,72
5-Jul	1,36	0,33	1,26	0,35	16,56	3,96	17,59	4,06	126,63	127,92	97,19	96,72
27-Jul	1,40	0,45	1,34	0,44	15,86	4,30	18,78	4,35	121,74	123,28	97,19	95,90
3-Aoû	1,77	0,36	1,70	0,48	17,34	3,78	21,28	5,37	148,49	126,39	97,19	95,90
16-Aoû	1,89	0,51	2,03	0,50	19,99	4,27	22,36	4,64	126,93	141,07	95,98	91,80
2-Sep	1,24	0,22	1,68	0,50	22,02	3,50	26,52	5,15	83,45	98,94	95,98	91,39
14-Sep	1,41	0,28	1,71	0,45	25,42	4,31	27,95	4,79	78,25	89,11	95,58	90,16
13-Oct					28,65	5,90	31,31	8,29			95,58	88,93
16-Nov					31,28	6,34	34,31	8,25			94,78	88,11

**CALENDRIER DES ACTIONS A MENER EN 1994**  
**DANS LE CADRE DU RESEAU GENETIQUE MOLLUSQUES**

# PROGRAMME SELECTION HUITRES PLATES

## CALENDRIER 1994.

### 1 . Programme du DEA-microsatellites (Janvier-Juillet 1994).

- mi Janvier :* ♦ **La Trinité - URGE/La Tremblade :** Réception à la Tremblade de 3000 huîtres issues d'un naissain de 1993 en provenance de la Baie de Quiberon.
- ♦ **URGE/La Tremblade :** Sacrifice d'un échantillon représentatif de la population (100 huîtres de chaque taille parmi les petites et grosses). Sur ces 200 huîtres sacrifiées, seront mesurés individuellement : la taille, le poids total, le poids de coquille sèche, le poids de chair égouttée entre deux morceaux de papier absorbant. La chair des huîtres sacrifiées sera conservée à -80°C en sachets individuels et numérotés (A1 à A100 pour les petites, B1 à B100 pour les grosses) en attendant les analyses de polymorphisme enzymatique et microsatellitaire et de manière à pouvoir affecter à chaque individu, ses profils moléculaire et ses mesures biométriques.
- ♦ **URGE/La Tremblade :** Calibrage, mesures (poids, taille) et marquage de 1000 huîtres (numérotées de 1 à 1000 en système Dymo + Bexane). Ces huîtres marquées seront réparties en 3 bacs de 800 litres, sur 3 plateaux par bac, en trois conditions trophiques différentes. La position des plateaux sera intervertie lors des lavages quotidiens, pour éviter la création d'un effet plateau.
- mi Mars :* ♦ **DEA - URGE/La Tremblade :** Mesures de contrôle sur les huîtres marquées.
- mi Mai :* ♦ **DEA - URGE/La Tremblade :** Mesures de contrôle sur les huîtres marquées.
- mi Juillet* ♦ **DEA - URGE/La Tremblade :** Sacrifice d'un échantillon représentatif des huîtres suivies en croissance. Le même protocole de mesure que celui de Janvier sera utilisé.

### 2 . Programme d'estimation de l'héritabilité (Janvier-Avril 1994).

- début Janvier* ♦ **Palavas - La Trinité - URGE/La Tremblade :** Mise en maturation de 50 huîtres de Méditerranée et de 50 huîtres de Quiberon destinées aux expériences d'induction artificielle de la ponte avec de la sérotonine.
- mi-Janvier* ♦ **La Trinité - URGE/La Tremblade :** Réception de populations issues de sélection : F0 (50 huîtres), F1 (50 huîtres) et F2 (50 F2 Paimpol, 50 F2

Quiberon et 33 F2 Inoc). Stockage en serre dans les deux premiers bacs après identification précise des lots.

- Janv-Février* ♦ **URGE/La Tremblade** : Etude de l'influence d'injection de sérotonine dans la gonade sur l'expulsion des gamètes. Recherche d'une technique d'induction contrôlée de la ponte.
- mi- Février* ♦ **URGE/La Tremblade** : Mise en maturation des populations F0 (50 + 27 huîtres), F1 ( + 55 huîtres) et F2 (133 + 21 huîtres) en HLM.
- Mars* ♦ **URGE/La Tremblade** : Induction et obtention de croisements demi-frères F1 x F0 et F1 x F2 en croisant 1 mâle avec 4 femelles différentes. Création de 24 lots différents à conduire en élevages séparés.
- Mars-Mai* ♦ **URGE/La Tremblade** : Elevages larvaires et micronurserie de l'expérience "familles de demi-frères".
- Mi Mai* ♦ **URGE/La Tremblade - URR/Bouin** : Transfert à Bouin des 24 lots de l'expérience "familles de demi-frères". Ces lots seront suivis uniquement à Bouin, où ils feront en 1995 l'objet d'un suivi en enceintes contrôlées pour l'estimation de l'héritabilité de caractères.

### **3 . Programme d'inoculation et de suivi de la mortalité des lots d'huîtres sélectionnées produites en 1993 (Janvier - Octobre 1994).**

- Janvier* ♦ **La Trinité - URPIG/La Tremblade** : Réception de 200 huîtres contaminées en provenance de la Baie de Quiberon pour préparer les inoculations.
- mi Janvier* ♦ **La Trinité - URGE/La Tremblade**: Envoi de La Trinité à La Tremblade de 150 huîtres par lot produit en 1993.
- mi Février* ♦ **URPIG/La Tremblade - URGE/La Tremblade** : Inoculation de 400 huîtres, 100 par lot expédié.
- ♦ **URGE/La Tremblade** : Prélèvement lors de l'inoculation d'un morceau de branchies à congeler à -80°C en sachets individualisés et référencés pour l'étude du polymorphisme microsatellitaire.
- ♦ **URGE/La Tremblade** : une semaine après l'inoculation, marquage au Dymo de 100 huîtres de chacun de lots produits en 1993 : Témoin Palavas (Rouge 1 à 100), Témoin Quiberon (Vert 1 à 100), F1 x F0 (Noir 1 à 100) et F1 x F2 (Bleu 1 à 100).
- mi Février* ♦ **La Trinité - URPIG/La Tremblade** : Inoculation à La Trinité, de 200 huîtres par lot sélectionné produit en 1993 (F1xF2) & (F1xF0). Ces huîtres seront élevées en eau profonde dans la baie de Quiberon, les survivantes serviront de géniteurs pour les productions de 1995.

*Fév-Oct*

◆ **URGE/La Tremblade:** Mise en élevage en quarantaine à raison de 25 huîtres de chaque lot par bac, soit 4 bacs de 100 individus chacun.

◆ **URGE/La Tremblade:** Le suivi consistera à nettoyer et vider les bacs quotidiennement, à noter le numéro des huîtres mortes et à les transférer à l'URPIG pour analyse.

*Octobre*

◆ **URPIG/La Tremblade - URGE/La Tremblade :** En fin de suivi, les huîtres survivantes seront sacrifiées, une étude de la prévalance sera réalisée et leur chair sera stockée à -80°C pour l'étude du polymorphisme microsatellitaire.

# PROGRAMMES DE CYTOGENETIQUE

## CALENDRIER 1994.

### 1 . Programme de contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* (2ème année)

Les différences de performances biologiques entre les diploïdes et les triploïdes sont peu sensibles dans certains sites (hormis Arcachon). Toutefois ces différences ne devant être perceptible qu'après une réelle phase de reproduction, les résultats sont peut-être faussés par la relative jeunesse des huîtres étudiées (animaux d'un an). Il a donc été décidé qu'en fonction des survies à la fin de l'hiver, une deuxième année de contrôle des performances sera conduite dans chaque site. Le protocole sera allégé, aucun prélèvement ne sera effectué pour l'étude de la gamétogenèse, quant à la mortalité, elle ne sera suivie que par comptage de la totalité des lots diploïdes et triploïdes en début d'année et en fin d'année.

Il reste théoriquement dans chaque site à la mi décembre:

◆ **Port-en-Bessin** : 600 huîtres du lot triploïde et un lot de 240 huîtres d'un mélange de diploïdes et de triploïdes.

◆ **URRA/Bouin** : 240 huîtres du lot triploïde

◆ **URRA/La Tremblade** : 430 huîtres du lot triploïde sur estran, 250 huîtres du lot triploïde suivi en claire et un reliquat de 50 huîtres triploïdes non utilisées par les expériences d'écophysiologie.

◆ **Arcachon** : 650 huîtres du lot triploïde

◆ **Palavas** : expérience terminée.

Pour **Port-en-Bessin**, **URRA/La Tremblade** (uniquement sur estran) et **Arcachon** les contrôles de la deuxième année porteront seulement sur 30 huîtres par lot à chaque échantillonnage, sauf pour le dernier (Novembre) qui devra porter sur 100 individus. Les protocoles en vigueur en 1993 pour les études biométrique et biochimique, et les analyses d'images pour le contrôle de la ploïdie, demeurent inchangés. Six périodes de prélèvement minimum ont été choisies :

fin mars	30 huîtres/niveau de ploïdie
mi juin	30 huîtres/niveau de ploïdie
mi juillet	30 huîtres/niveau de ploïdie
mi Août	30 huîtres/niveau de ploïdie
mi Septembre	30 huîtres/niveau de ploïdie
fin Novembre	100 huîtres/niveau de ploïdie

Chaque responsable de site pourra augmenter ce pas de prélèvement si la quantité d'huîtres le permet, notamment pendant la période estivale de reproduction. Cette décision devra toutefois être prise en concertation avec l'URGE afin d'organiser les contrôles de ploïdie par imagerie numérique.

A **Palavas**, les performances de croissance des lots 2N et 3N enregistrées en eau profonde sont très inférieures à celles obtenues dans l'étang de Thau dans le cadre du REMORA. Il serait souhaitable de réaliser une expérience dans ce dernier site. L'opération devrait pouvoir s'effectuer à partir de lots d'huîtres 2N et 3N produits dans le cadre du programme CEE AIR1 en 1993. Les taux de ploïdie de ces lots doivent être vérifiés par l'URGE pendant l'hiver. S'ils s'avèrent satisfaisants, une opération de contrôle des performances biologiques dans l'étang de Thau pourrait débuter en mars ou avril 1994. Dans le cas contraire, une production de triploïdes sera réalisée à cet effet au printemps 1994, ce qui reportera le test terrain au mois de septembre ou octobre.

Pour **URRA/Bouin**, les lots d'huîtres 2N et 3N qui restent après l'étude des performances à différents niveaux trophiques, serviront en 1994 à une étude d'écophysiologie (taux de consommation et d'assimilation sur des lots de 50 individus)

## 2 . Analyses sensorielles de lots d'huîtres diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas*

Les tests qui ont débuté en 1993, ont du être abandonnés car les huîtres réservées pour ces analyses sensorielles étaient trop petites pour qu'une différence significative puisse être enregistrée. En 1994, l'étude comparative des qualités organoleptiques d'huîtres diploïdes et triploïdes sera reprise avec des animaux âgés de deux ans. Ces tests seront réalisés par la cellule d'Analyses Sensorielles au Centre IFREMER de Nantes sous la responsabilité par Mireille CARDINAL, selon le protocole suivant:

*fin-Janvier* ♦ **Arcachon** : à partir des lots d'huîtres qui restent après le contrôle des performances en 1993 (650 du lot 3N et 890 du lot 2N), 150 huîtres du lot 2N et 150 huîtres du lot 3N seront mises en élevage séparément afin d'assurer la réalisation de ces tests dans de bonnes conditions.

*Avril* ♦ **Arcachon - URGE/La Tremblade - VP/Nantes** : pour chaque test 45  
*Juillet* huîtres de chaque lot seront nécessaires, Arcachon se chargera de transférer  
*Novembre* les huîtres par chronoposte ou par transporteur express vers Nantes. Chaque analyse fera intervenir 30 goûteurs auxquels seront proposées 3 huîtres indifférenciées. Au moment de l'ouverture des huîtres un prélèvement de branchies sera effectué par une personne de l'URGE afin de déterminer à posteriori le degré de ploïdie des huîtres proposées à la dégustation.

## 3 . Programme de contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes de *Ostrea edulis* (2ème année)

*fin-Juin et novembre* ♦ **La Trinité - Palavas** : les contrôles de la deuxième année seront réalisés *fin* sur 60 huîtres à Palavas et sur 100 huîtres à La Trinité et porteront sur les mêmes paramètres qu'en 1993 :

- la mortalité
- la croissance (paramètres biométriques)
- la qualité de la chair (indice de condition et composition biochimique)
- la maturation sexuelle (observation macroscopique)
- le taux d'infestation par *Bonamia ostreae* (frottis de cœur)
- le taux de triploïdie par imagerie numérique (URGE/La Tremblade)

#### 4 . Programme lié à l'accueil probable de S. K. ALLEN (spécialiste mondial en cytogénétique des mollusques) pendant 7 mois à La Tremblade.

de Fév. à Sept. ♦ **Port-en-Bessin - URR/La Tremblade - Arcachon** : un suivi régulier, tous les 15 jours, des paramètres du milieu sera effectué (température, salinité, M.E.S. et chlorophylles).

Janv-Fév. ♦ **Port-en-Bessin** : mettre en élevage séparé un lot de 100 diploïdes et un lot de 100 triploïdes prélevés dans les huîtres en cours de suivi de deuxième année.

♦ **URR/La Tremblade** : transférer les huîtres du suivi en claire de 1993 sur estran, afin de réserver ces huîtres pour le programme "Allen".

♦ **Arcachon - Port-en-Bessin** : transfert d'un lot de 240 huîtres de Port-en-Bessin à Arcachon. Ces huîtres provenant d'un mélange d'un témoin diploïde et de triploïdes seront mises en élevage à Arcachon pour le programme "Allen".

Juin à Sept. ♦ **Port-en-Bessin - URR/La Tremblade - Arcachon - URGE/La Tremblade** : surveillance de la maturation des huîtres triploïdes, quand elles auront atteint leur maturité ces huîtres seront transférées à l'URGE afin de réaliser les différentes expériences et observations prévues dans le "programme Allen".

Les objectifs sont :

1. -d'évaluer l'importance de la stérilité chez les triploïdes de *Crassostrea gigas*, en y incluant des aspects de quantité et de qualité de gamètes formés en relation avec les conditions environnementales dans lesquelles les huîtres sont élevées.

2 -d'estimer la capacité reproductrice fonctionnelle, c'est à dire la fertilité et le développement larvaire.

3 -d'étudier le synchronisme des pontes entre les diploïdes et les triploïdes dans le milieu naturel.

4 -d'étudier le devenir de croisements entre diploïdes et triploïdes de *C.gigas*, le nombre et la ploïdie des naissains obtenus.

5 -de comparer les méthodes d'estimation des taux de ploïdie par cytométrie de flux (en collaboration avec l'UREA/La Tremblade) et par imagerie numérique (à l'URGE/La Tremblade).

#### 5 . Programme CEE AIR1 (2ème année) portant sur l'étude des performances biologiques de triploïdes de méiose 1 et de méiose 2, de diploïdes et des diploïdes réfractaires au traitement d'induction.

L'obtention de triploïdes viables par rétention du premier globule s'est révélée beaucoup plus complexe que prévue chez *Crassostrea gigas*. Cette difficulté d'obtention liée à la biologie de l'espèce étudiée, et les problèmes de pathologie rencontrés dans l'écloserie en 1993, font que le cahier des charges n'a pas été rempli malgré 13 expériences successives.

En commun accord avec les partenaires du programme (**UREA/La Tremblade, le Plymouth Marine Laboratory** et **l'Institut of Marine Biology of Crete**) ces expériences seront reconduites en 1994 à la fois sur *Crassostrea gigas*, mais également sur *Ostrea edulis* puisque sur cette espèce, des triploïdes de méiose 1 et de méiose 2 avaient déjà été obtenus avec succès à l'URGE en 1991.

Ce programme sera un des objectifs majeurs de l'URGE en 1994. Il implique, outre la participation des partenaires officiels du programme, la collaboration de **l'URRA/Bouin** pour une partie du nursage et en fonction du succès des inductions, de **l'URRA/Bouin** et de **La Trinité** pour réaliser des tests terrain.

## **6 . Contrats de plan Etat-Région (XI ème plan)**

Les programmes de génétique proposés à la Région Poitou-Charentes sont fournis en annexe. Les négociations sont en cours, compte tenu du plan de charge de l'écloserie en 1994, aucune action ne sera engagée tant qu'elles n'auront pas aboutie.

## **ANNEXES**

**ANNEXE I**

**INTRODUCTION A LA GENETIQUE QUANTITATIVE**  
**PHOTOCOPIES DES TRANSPARENTS DE L'EXPOSE DE**  
Yamama NACIRI

## QUELQUES DEFINITIONS

Gène: Unité structurale et fonctionnelle de l'hérédité porteuse de l'information de  $G_n$  à  $G_{n+1}$ .

Locus: Emplacement d'un gène sur un chromosome.

Allèle: Une des formes possible d'un gène.

Hétérozygote: Se dit d'un individu portant 2 allèles différents d'un même gène.

Homozygote: Se dit d'un individu portant 2 allèles identiques d'un même gène.

Hétérosis: Supériorité d'un hybride par rapport au meilleur de ses 2 parents.

## QUE FAIT LA GENETIQUE QUANTITATIVE ?

- L'étude des caractères complexes, dont l'hérédité dépend d'un grand nombre de gènes. Ex: taille, poids
- l'évaluation de la part génétique et de la part environnementale de ce qui est mesuré. **G + E(+ GxE)**
- La prédiction du progrès génétique attendu par la sélection.  **$\Delta G$**

# LES OUTILS DE LA GENETIQUE QUANTITATIVE

- Un modèle génétique qui est une description simplifiée du fonctionnement des gènes.
- Une approche statistique qui cherche à ajuster les données au modèle.

Conclusion: La G.Q est une approche modélisatrice considérant les individus comme une " boîte noire ".

## LE MODELE GENETIQUE(1)

→ Modélisation du phénotype:  
On écrira que:

$$P=G+E(+G \times E)$$

→ Cela nécessite de faire varier le milieu de façon contrôlable pour caractériser chaque génotype par sa courbe de réponse.

→ De la même façon, on pourrait caractériser un milieu en faisant «varier» les génotypes.

## LE MODELE GENETIQUE(2)

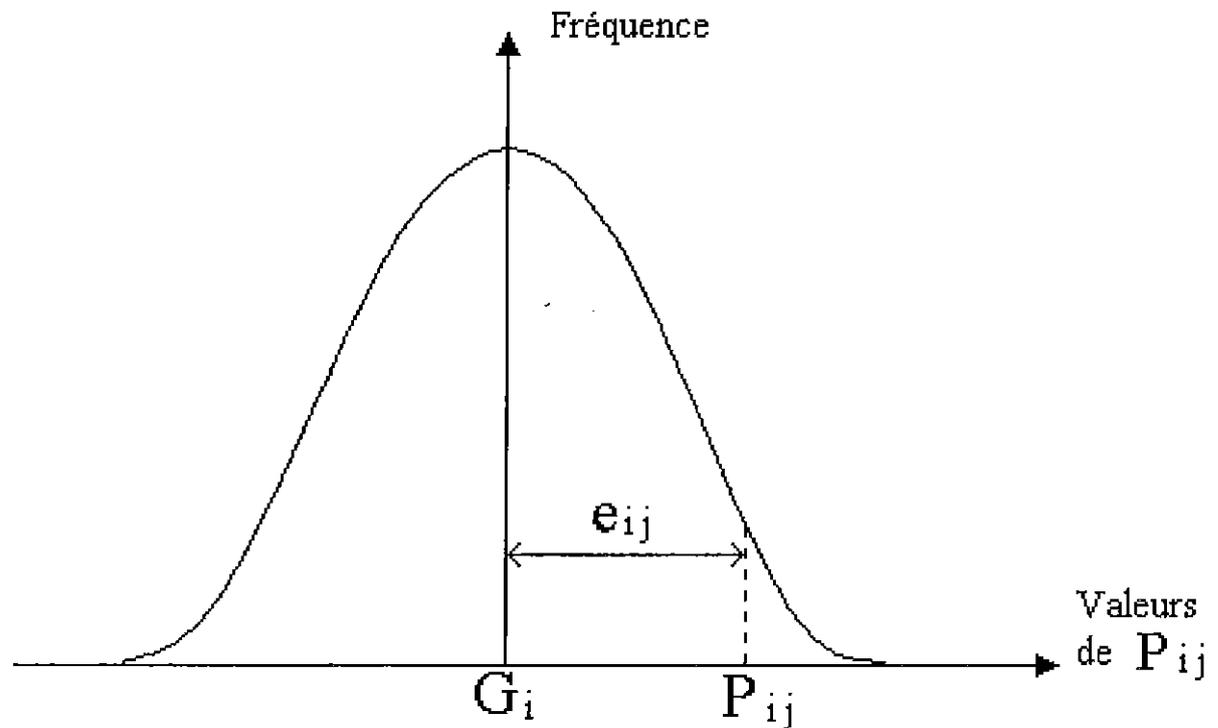
→ La valeur d'un génotype, répété dans un milieu donné présente une variation "normale" due aux variations locales du milieu au niveau de chaque répétition.

→ Ceci s'écrit:

$$P_{ij} = G_i + e_{ij}$$

$G_i$  étant la valeur recherchée du génotype  $i$

## LE MODELE GENETIQUE(3)



$$* P_{ij} = G_i + e_{ij}$$

\*  $\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_e$  en l'absence  
d'interaction génotype x micro milieu  
(←randomisation).

## LE MODELE GENETIQUE(4)

$$P_{ij} = G_i + e_{ij}$$

→ De l'écriture ( $\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_e$ )  
on peut déduire que:

$$\text{cov}(P_{ij}, P_{ij'}) = \sigma^2_G$$

→ La corrélation entre 2 répétitions  
d'un même individu donnée par :

$$\text{cov}(P_{ij}, P_{ij'}) / \sigma^2_P$$

S'écrit aussi:

$$\sigma^2_G / \sigma^2_P = h^2$$

qui est l'héritabilité au sens large du  
caractère.

## LE MODELE GENETIQUE(5)

→ La régression géno-phénotypique va être le moyen d'estimer  $G_i$

→ On écrit le modèle suivant:

$$P_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

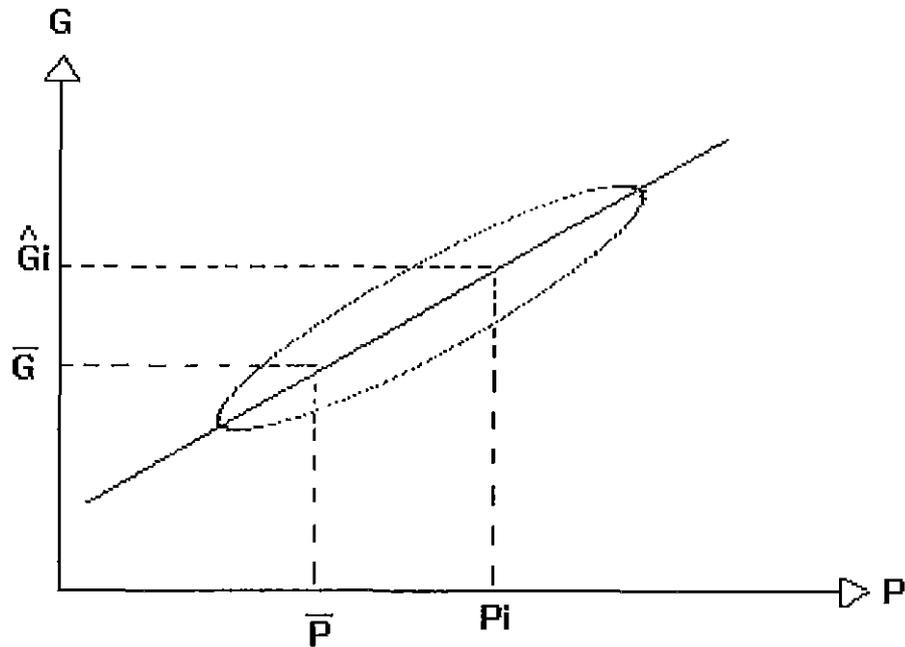
$$\hat{G}_i = \beta(P_{i.} - \mu)$$

$$\hat{G}_i = \frac{\text{cov } G_i P_j}{\sigma_{P_{i.}}^2} (P_{i.} - \mu)$$

$$= \frac{\sigma_G^2}{\sigma_{P_{i.}}^2} (P_{i.} - \mu)$$

Et on a  $\Gamma_{G\hat{G}}^2 = h^2$ ,  $\hat{\mu} = {}_P P_{..} = {}_{\bar{P}} \bar{P}$

# LE MODELE GENETIQUE(6)



$$\hat{G}_i = \bar{G} + \beta(P_i - \bar{P})$$

ou 
$$\beta = \text{cov} \frac{(G_i P_i)}{\sigma_P^2} = h^2$$

## ANOVA

	ddl	CM	E(CM)
Génotype	(g-1)	CM <sub>G</sub>	$\sigma_e^2 + M\sigma_G^2$
Résiduelle	g(n-1)	CM <sub>e</sub>	$\sigma_e^2$

## LE MODELE GENETIQUE(7)

- Le modèle précédent supposait qu'un même génotype existe en plusieurs copies.
- ça n'est pas toujours le cas.
- Nécessité d'une décomposition de la valeur génétique.
- $G_{ij} = \mu + \alpha_i + \alpha_j + \beta_{ij}$
- $G_{ij}$  étant la valeur associée à un génotype  $A_i A_j$

## LES DIFFERENTS TYPES DE SELECTION

→ Existence de 3 opérateurs:

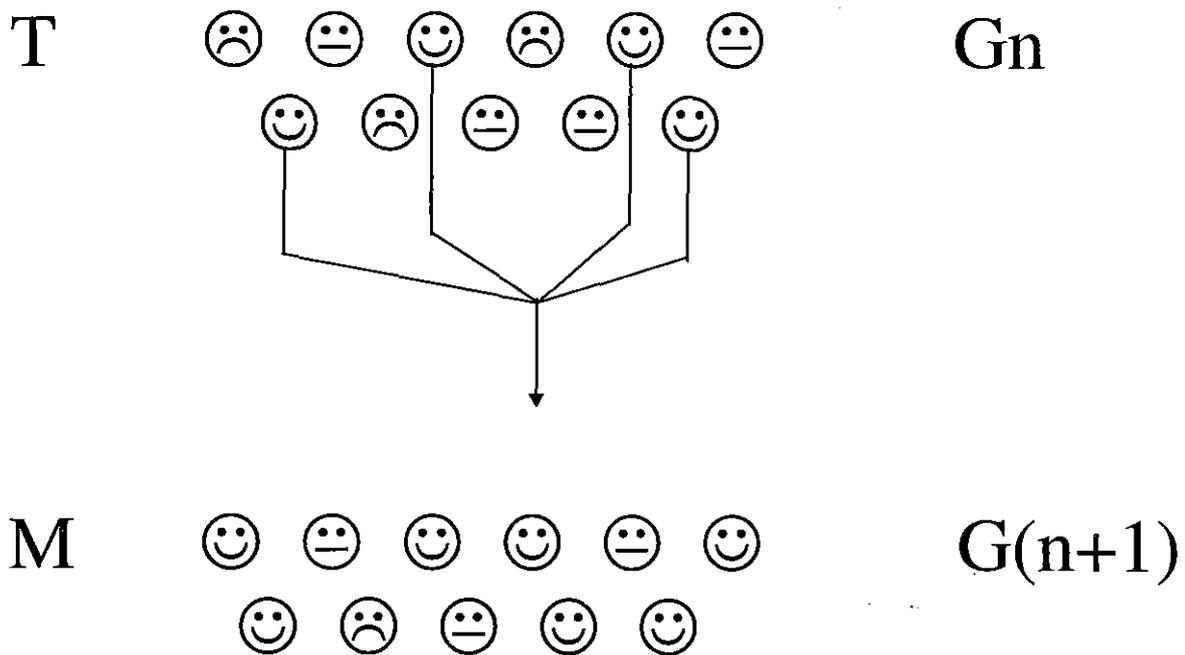
- Opérateur de test. (T)
- Opérateur de sélection. (S)
- Opérateur d'intercroisement.(M)

→ Tous les schémas dérivent de la combinaison des niveaux de ces 3 opérateurs.

Ex: massale, sur descendance, familiale ...

## LES DIFFERENTS TYPES DE SELECTION(2)

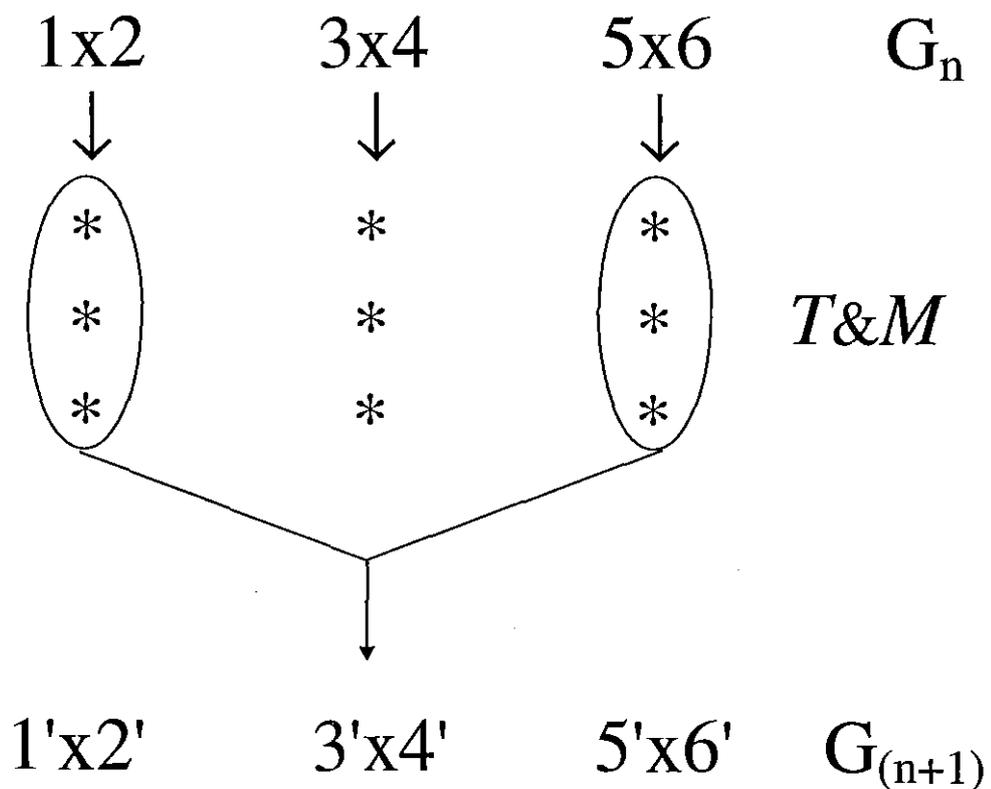
→ La sélection massale



- Durée du cycle: Un cycle de reproduction.
- T: test sur le phénotype.
- M: intercroisement.

## LES DIFFERENTS TYPES DE SELECTION(3)

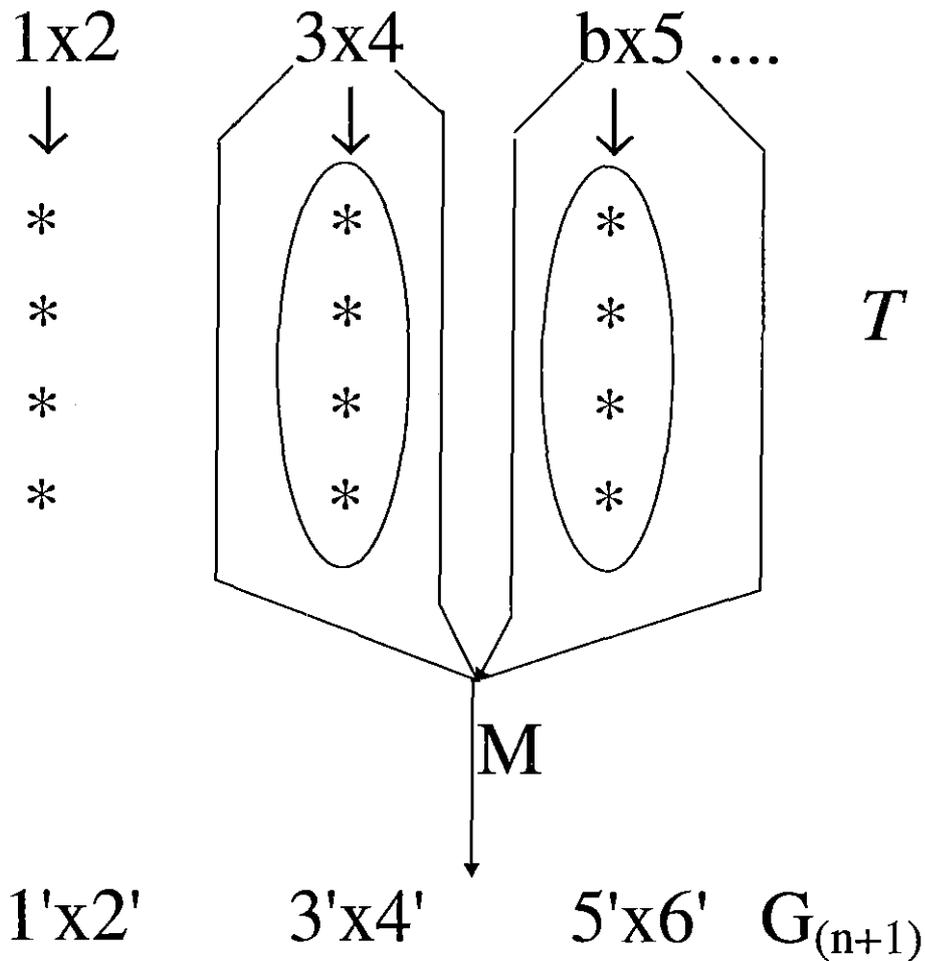
→ La sélection familiale.



- Durée: 1 cycle de reproduction.
- $T$  et  $M$  se font en même temps.

## LES DIFFERENTS TYPES DE SELECTION(4)

→ Sélection sur descendance



- Durée d'un cycle: 2 cycles de reproduction.
- $T$  test sur les descendances.
- $M$  intercroisement des parents sélectionnés.

HISTORIQUE

1985

F1 Quiberon→Lignée 85

1986

1987

Gén. Quiberon→Lignée 89

1988

Inoc

Inoc.

1989

F1

1990

F2

Quiberon

1991

Quiberon

Inoc.\*

1992

Inoc\*

F2

Gén quiberon+  
Huîtres inoc=FO\*

1993

Rétroc.

Inoc.

# REORGANISATION DU PROGRAMME DE SELECTION

## L'Etat des lieux

- \* Quid de la consanguinité ? Pas de contrôle des croisements; taille de la population efficace ?.
- \* La recherche de marqueurs. Risque de n'obtenir que des corrélations statistiques: Nécessité d'un cycle d'intercroisement généralisé
- \* Héritabilité de la "résistance".  
L'estimation nécessite le recours à des structures familiales.

## OBJECTIFS

- \* Quantifier la résistance
  - étude de familles de 1/2 frères
  - Croisements aux témoins
  
- \* Trouver des marqueurs:
  - électrophorèse
  - microsattellites.
  
- \* Choix du matériel d'étude:
  - différent selon les objectifs
    - . sélection
    - . appréciation des résultats obtenus
  
- \* Refonte du schéma de sélection

## PROBLEMES RESULTANTS

- \* Maitrise indispensable des croisements
  - brassage
  - recherche de marqueurs
  
- \* Obtention d'estimations correctes
  - effectifs étudiés
  - compromis à trouver
  
- \* Population de base
  - recherche de variabilité sup.
  
- \* Réflexion menée en fonction des différentes stations.

# PRINCIPES DES FUTURES EXPERIENCES

- \* Contrôle des intercroisements: Système de maturation individuelle en HLM.
- \* Maximisation de la variabilité: Recours à 3 lignées inoculées différentes: Lignée 85(F2), Lignée 89(F1), Témoin inoculé
- \* Intercroisements: Croisements uniparentaux interpopulations: F1xF2, F1xT, F2xT
- \* Inoculation: Pour exercer une pression de sélection suffisamment forte.

## PROGRAMME APRES REFONTE

<b>1993</b>	Mixage des Pop F0, F1 et F2 La tremblade, Bouin, La Trinité	+ Rétrocroisement 85 + Inoc F2 lignée 89
<b>1994</b>	Inoculation des sous-pop Suivis en mer, en quarantaine	Estimation de l'h <sup>2</sup> Croisement ½ frères + rétrocrois <sup>t</sup> lignée 89
<b>1995</b>	Mixage des sous-pop F0xF1, F0xF2, F1xF2	Inoc. des familles
<b>1996</b>	Inoculation des sous-pop	Estimation de l'h <sup>2</sup> Croisement ½ frères  Inoc des familles

## OBJECTIFS

- \* "Quantifier" la résistance ( $h^2$ )  
→ croisement demi-frères
- \* Trouver des marqueurs  
→ électrophorèse, microsatellites
- \* Matériel d'étude ?  
→ sur quelles populations ?

## PROBLEMES

- \* Obtenir une estimation correcte  
→ nbre de blocs, ddl, contrôle exp.
- \* Déviations à la panmixie  
→ corrélations erronées, non  
biologique
- \* En fonction de l'objectif  
→ plan de sélection  
→ estimation d' $h^2$

**ANNEXE II**

**PROGRAMMES DE GENETIQUE MOLLUSQUES**

**PRESENTEES DANS LE CADRE**

**DU XIEME PLAN ETAT-REGIONS**

**PROPOSITION POUR LE CONTRAT DE PLAN ETAT-REGION 1994-1998.  
REGION POITOU-CHARENTES et IFREMER**

**PROGRAMMES GENETIQUES**

**Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE).**  
BP 133, Ronce les Bains, 17 390 La Tremblade.  
Responsable : André GERARD

**1. SITUATION GENERALE ET OBJECTIFS.**

**Action 1 : Amélioration de la qualité chez l'huître *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes.**

Le but de cette première action est de sélectionner une souche d'huître répondant aux critères définis par la profession, les consommateurs et les scientifiques.

**Contexte économique.**

En 1989, la Section Régionale Conchylicole de Marennes-Oléron a mis en place une procédure de labélisation des huîtres, dont l'objectif est de garantir au consommateur une constance de qualité. Après 3 ans d'existence, le "label rouge" a montré son intérêt, et au petit nombre de pionniers ayant initialement relevé le pari, viennent se rajouter maintenant un certain nombre d'ostréiculteurs qui se rallient à la labélisation soit par conviction personnelle, soit parce qu'ils y sont poussés par les distributeurs ou les consommateurs.

Le "label rouge" est décerné uniquement aux huîtres d'élevage ayant été affinées en claires pendant 1 mois au minimum, à une densité maximale de 20/m<sup>2</sup>, et répondant aux critères suivants :

- 1-forme calibrée de la coquille : la coquille ne doit pas être plus de 3 fois plus longue que large ou profonde (inférieure à un indice 3),
- 2-abondance de chair : l'indice de chair doit se rapprocher de celui des huîtres spéciales ( $i > 9$ ),
- 3-verdeur obligatoire des branchies,
- 4-taille minimale : les petites huîtres sont éliminées (5 et 6).
- 5-bon état de la coquille : belle nacre, absence de poche,
- 6-qualités organoleptiques : absence de laitance, présence d'eau dans la coquille, absence d'odeur, goût agréable,
- 7-taux de salinité minimal de 20‰,
- 8-qualité bactériologique : 300 coliformes et 2500 streptocoques pour 100 grammes de chair égouttée au maximum.

**Projet de l'URGE.**

Lors d'une réunion au CREAA, la profession a réclamé un développement des recherches permettant de garantir une qualité minimum en affinage afin de valoriser les produits à travers le "Label Rouge" de Marennes-Oléron. L'étude de la productivité des claires d'affinage devrait faire l'objet d'un nouveau volet du programme "Marais" mené par le CREMA-L'Houmeau. L'URGE (La Tremblade) se propose également de prolonger la démarche engagée par la SRC de Marennes-Oléron en travaillant sur la sélection de souches pour une meilleure qualité générale. Cette proposition s'articule parfaitement avec le programme "Marais" précité dans la mesure où il poursuit un objectif équivalent avec néanmoins des approches et des méthodologies très différentes.

Il s'agirait de définir, en accord avec la profession et au niveau national, des critères de qualité, visuels et organoleptiques, sur lesquels la sélection pourrait avoir prise (forme et couleur de la coquille, présentation de la chair, ...), et de sélectionner de nouvelles souches plus performantes. Le recours à de telles souches pourrait à la fois devenir une condition de labélisation, et une source d'allègement de la charge de travail dans la mesure où un certain nombre de caractères pourrait être génétiquement fixés et où l'élevage de lots plus homogènes permettrait de réduire le nombre de tris nécessaires avant la commercialisation.

Quelques critères ont d'ores et déjà été retenus. Plusieurs discussions avec consommateurs et professionnels ont montré qu'une couleur noire pour la coquille et le rebord du manteau était en générale appréciée. Les bases génétiques éventuelles des variations individuelles constatées au niveau du rendement d'assimilation seront recherchées, en étroite collaboration avec les physiologistes d'IFREMER. Il en sera de même pour les caractères classiquement mesurés tels que le poids, la taille ou la vitesse de croissance. Les résultats de l'actuel contrat de plan Etat-Région portant sur la triploïdie des principales espèces commercialisées de mollusques peuvent également trouver une application dans ce nouveau projet (production d'individus stériles ne produisant pas de laitance).

## **Action 2 : Acclimatation de nouvelles espèces d'huître creuses du genre *Crassostrea* pour l'hybridation et la conservation de souches.**

Il s'agirait de disposer, sur le site de La Tremblade, d'une collection d'espèces ou d'hybrides du genre *Crassostrea* permettant :

- d'entreprendre rapidement des recherches d'animaux résistants en cas d'apparition d'une grave épizootie sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*.
- de mettre à la libre disposition de la profession ostréicole les résultats concernant ces souches ou hybrides, qui pourront à tout moment offrir une source de diversification.

### **Contexte économique.**

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 qui subi l'impact de deux parasitoses la marteilliose et la bonamiose, l'ostréiculture française connaît actuellement une situation de monoculture de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*. Or, en Amérique du Nord, deux maladies ont déjà été identifiées sur *C. gigas* : le *Mikrocytos mackini* (protozoaire) et l'OVVD (Oyster Velar Virus Disease, virus s'attaquant uniquement aux larves). Ces maladies n'ont pour l'instant pas été signalées en France, mais leur introduction accidentelle pourrait avoir des conséquences catastrophiques sur l'économie de la région. Cette situation serait d'une gravité d'autant plus aigüe que la situation de monoculture, les fortes densités d'élevage couramment pratiquées, ainsi que les pratiques culturales consistant à transférer des lots d'une région ostréicole à l'autre (entre Normandie et Bassin de Marennes-Oléron par exemple), provoqueraient une extension fulgurante de la maladie.

Face à ce danger potentiel, trois attitudes prévalent :

- le contrôle zoosanitaire des importations (objet des directives CEE et mission des services vétérinaires),
- la recherche d'outils de diagnostic adaptés pour effectuer des contrôles zoosanitaires fiables,
- la recherche d'une espèce de remplacement dans le cas éventuel d'une épizootie grave sur l'huître creuse. Cette action est du ressort de l'URGE qui se propose de mener un programme de recherche dans ce sens.

### **Projet de l'URGE**

L'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion, en collaboration avec tout les membres du Réseau Génétique Mollusques, envisage de développer un programme d'acclimatation et d'hybridation de différentes espèces du genre *Crassostrea*. Le but est de développer un conservatoire de souches à La Tremblade en important de nouvelles espèces et en les acclimatant au milieu local. Leurs performances seront testées dans le milieu naturel (résistance aux maladies, rendement de croissance) en les comparant à celles de *C. gigas*. Des hybridations éventuelles entre espèces seront tentées, pour essayer de cumuler dans un même génome les avantages respectifs des différentes espèces, en matière de résistance et de dynamique de croissance et d'accumulation de réserves.

Le genre *Crassostrea* est très riche en espèces et certaines d'entre elles ont déjà fait l'objet d'hybridation. Le choix des espèces se fera en fonction des possibilités d'acclimatation et surtout en fonction des critères zoosanitaires. Parmi les espèces qui peuvent être testées, peuvent être citées :

*Crassostrea virginica*, l'huître creuse américaine,  
*Crassostrea rivularis*, originaire du Japon,  
*Crassostrea rhizophorae*, l'huître de palétuvier,  
*Crassostrea commercialis*, l'huître d'Australie ...

Pour les deux dernières espèces et du fait de leur origine tropicale, on ne pourra raisonnablement envisager que l'acclimatation et l'étude des générations issues d'hybridations interspécifiques (avec *Crassostrea gigas* par exemple). Notons également que la première de ces espèces, *Crassostrea virginica*, a déjà été importée en 1992 dans le cadre d'un programme cofinancé par le Conseil Général et la Région Poitou-Charentes.

## **2. CONTENU DES PROGRAMMES POUR LA DUREE DU PLAN.**

### **Action 1 : Amélioration de la qualité chez l'huître *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes.**

Plusieurs études complémentaires sont programmées :

- La sélection de marqueurs qualitatifs (essentiellement la coloration de coquille et de chair), et la sélection pour une amélioration des caractères quantitatifs (vitesse de croissance, accumulation de glycogène...). Ces deux approches utiliseront les outils classiques de la génétique mendélienne (croisements et étude de la ségrégation des caractères dans les descendance) et de la génétique quantitative (étude statistique de la variabilité génétique et estimation du progrès attendu par sélection).

- Une troisième approche se propose de vérifier l'existence, souvent annoncée dans la bibliographie, d'une relation entre hétérozygotie des individus et vitesse de croissance : les animaux présentant des allèles différents pour un maximum de gènes, accuseraient une meilleure croissance. L'étude consisterait donc à comparer les niveaux d'hétérozygotie rencontrés entre lots de tête et lots de queue issus d'un même croisement. L'analyse du polymorphisme se ferait par électrophorèse enzymatique et par l'étude des microsatellites.

- Une dernière approche vise à rechercher si un support génétique gouverne la variabilité inter-individuelle rencontrée dans les rendements d'assimilation (rapport de la matière digérée sur ce qui est ingéré). Dans l'affirmative, une sélection d'individus présentant de forts rendements d'assimilation pourra être entreprise. L'obtention de telles souches permettrait une meilleure utilisation des ressources phytoplanctoniques du bassin.

### **Collaborations envisagées**

**Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA)**  
BP 133, Mus du Loup, 17 390 La Tremblade.

**Unité de Recherche Régional Aquacole (URRA)**  
Polder des Champs, 85 230 Bouin.

**Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA)**  
Prise du Terdoux, 17 480 Le Château d'Oléron.

## **Action 2 : Acclimatation de nouvelles espèces d'huître creuses du genre *Crassostrea* pour l'hybridation et la conservation de souches.**

Le calendrier d'importation n'est actuellement pas défini, hormis pour *C. virginica*, dont l'introduction a déjà été réalisée à partir d'une souche introduite depuis 1984 en Angleterre, selon les règles sanitaires internationales.

Le travail de l'URGE et de ses partenaires se partagera en différentes actions :

1. Importation : L'importation se fera 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.

2. Production d'une première descendance : La ponte se fera également en salle de quarantaine. Un contrôle pathologique aura lieu sur le naissain et tout transfert d'animaux sera précédé d'analyses permettant de vérifier l'état sanitaire du lot.

3. Contrôle des performances : Seule la première génération pourra être étudiée dans le milieu naturel sous réserve qu'elle ne présente pas de signe de contamination ou d'infestation. Cette caractérisation intégrera différentes approches : résistance aux parasites présents dans le milieu français, caractères quantitatifs (poids, taille, rendement, vitesse de croissance), polymorphisme enzymatique ou microsatellitaire, tests physiologiques (mesure de respiration, de rendement d'assimilation...).

4. Hybridation : Des essais d'hybridation entre espèces seront menés. Nous savons d'ores et déjà que l'hybridation entre *C. gigas* et *C. rivularis* est possible et que les hybrides sont viables (travaux d'Allen, Université du New-Jersey, USA). Le succès des hybridations sera contrôlé par électrophorèse enzymatique;

5. Conservatoire de souches : Les générations F1 des différentes espèces seront systématiquement conservées. Une salle a récemment été équipée à l'URGE dans ce but. Dans un objectif à plus long terme il est envisagé d'équiper une structure entièrement indépendante de l'Écloserie de La Tremblade. Le but serait d'éloigner le conservatoire de souches du bassin ostréicole lui-même pour éviter que toute maladie contaminant le bassin ne se propage au conservatoire et ne mette en danger les souches sélectionnées.

### **Collaborations envisagées.**

**Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (URPIG)**  
BP 133, Ronce les Bains, 17 390 La Tremblade.

**Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA)**  
BP 133, Mus du Loup, 17 390 La Tremblade.

**Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA)**  
Polder des Champs, 85 230 Bouin.

**Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA)**  
Prise du Terdoux, 17 480 Le Château d'Oléron

**ANNEXE III**

**PROGRAMME A REALISER DANS LE CADRE  
DU PROJET D'ACCUEIL DE S.K. ALLEN**

## Projet d'accueil du Dr Standish K. ALLEN à l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE) de La Tremblade.

Le Dr S.K. ALLEN est un des plus grands spécialistes de la cytogénétique des mollusques, ses travaux font autorité au niveau international et sont abondamment cités dans toutes les publications scientifiques.

Lors du Congrès "Genetics and Evolution of Aquatic Organisms" à Bangor (GB, Septembre 1993), le Dr S.K. ALLEN a montré un grand intérêt pour les premiers résultats obtenus par l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE) de La Tremblade, notamment ceux concernant la mise au point d'une nouvelle technique d'induction de la triploïdie et d'une technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique. Au cours d'un entretien avec Y. NACIRI, généticienne à l'URGE présente à ce congrès, il a particulièrement apprécié l'organisation du Réseau Génétique Mollusques IFREMER (REGEMO) et les outils techniques et scientifiques qui y sont rattachés. C'est à partir de ce moment que le principe d'une collaboration scientifique et d'un voyage d'étude à La Tremblade a été retenu.

Ce projet se concrétise un an après, avec la présentation de cette proposition de programme de recherche au Conseil d'Administration de l'IFREMER, le Dr S.K. ALLEN pouvant se libérer de ses responsabilités au Haskin Shellfish Research Laboratory entre les mois de juin et décembre 1994.

### JUSTIFICATION DU PROJET ET INTERET POUR L'IFREMER.

On ne peut que souligner l'homologie de programmes entre le Haskin Shellfish Research Laboratory (HSRL) et le Laboratoire IFREMER de la Tremblade. Pour le volet génétique, domaine de recherche de S.K. ALLEN et de l'URGE, les mêmes objectifs sont affichés de part et d'autre :

- sélection pour des résistances aux maladies (sur l'huître plate *Ostrea edulis* à l'URGE, sur l'huître américaine *Crassostrea virginica* au HSRL),
- cytogénétique (gynogenèse, triploïdie, tétraploïdie...),
- hybridation et acclimatation d'espèces non-indigènes.

A l'URGE de nouvelles compétences sont en cours d'acquisition dans le domaine du marquage moléculaire (microsatellites). Au HSRL par contre, une avance certaine a été prise en cytogénétique et plus particulièrement en gynogenèse et tétraploïdie, ainsi que dans les études d'hybridations interspécifiques.

La venue de Standish K. ALLEN à l'URGE permettrait ainsi à l'URGE de progresser en cytogénétique, le programme de recherche envisagé visant à étudier le potentiel reproductif des triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas*.

*Cette demande s'inscrit totalement dans les axes prioritaires définis dans les cahiers d'objectifs de la Direction des Ressources Vivantes.*

**DUREE D'ACCUEIL :** 1er Juin 1994 au 31 Décembre 1994 (7 mois)

### FACILITES DEMANDEES :

Voyage et hébergement de S.K. ALLEN et de sa famille : son épouse et ses deux enfants (6 ans et 2 mois).

Voyage de S.K. ALLEN à Halifax pour participer en Juillet 1994 au congrès "Genetics in Aquaculture".

### PIECES JOINTES :

- Curriculum vitae de S.K. ALLEN.
- Description du laboratoire d'origine (Haskin Shellfish Research Laboratory).
- Description du laboratoire d'accueil (Rapport d'activité 1992 de l'URGE).
- Projet de recherche.
- Publications de l'URGE.

## PROGRAMME DE RECHERCHE : POTENTIEL REPRODUCTIF DE TRIPLOIDES DE *CRASSOSTREA GIGAS*.

### CONTEXTE.

La triploïdie n'est tolérée que chez les animaux inférieurs (amphibiens, poissons et de nombreux invertébrés dont quelques uns sont candidats pour l'aquaculture). Le principal avantage de la triploïdie en aquaculture est une stérilité reproductive (Thorgaard, 1983 ; Allen, 1986). Ceci est particulièrement intéressant chez les mollusques bivalves pour lesquels l'effort de reproduction est prioritaire sur la croissance somatique. Dès le printemps, il monopolise le métabolisme énergétique pour la gamétogenèse induisant ainsi un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (Héral & Deslous-Paoli, 1983). La réduction de la gonadogenèse par induction de la triploïdie devrait permettre de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique. La triploïdisation est une des premières techniques de cytogénétique à déboucher sur des applications aquacoles. Chez les mollusques, les recherches ont surtout été menées aux Etats Unis par Allen et son équipe du HSRL sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981), *C. gigas* (Downing & Allen, 1987 ; Allen & Downing, 1986 ; 1990), *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Haliotis discus* (Arai *et al.*, 1986).

En France, cette technique a surtout été développée dans le domaine piscicole par l'INRA. La production de poissons triploïdes a ainsi permis d'obtenir des gains de croissance (Chourrou, 1989) et une stabilité de la qualité de la chair (Chevassus, 1987) résultant d'une réduction de l'activité gonadique. Chez les mollusques les recherches ont surtout été approfondies depuis la création de l'écloserie de La Tremblade, notamment dans le cadre du contrat Etat-Région Poitou-Charentes (1989-1993) qui prévoyait d'appliquer des techniques de triploïdisation aux principales espèces françaises d'intérêt commercial : l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ledu, 1989 ; Diter, 1990 ; Desrosiers *et al.*, 1993 ; Gérard *et al.*, 1993a), l'huître plate *Ostrea edulis* (Gendreau & Grizel, 1990), la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Dufy, 1988 ; Dufy & Diter, 1990 ; Diter & Dufy, 1990) et la palourde européenne *Ruditapes decussatus* (Noiret, 1991 ; Gérard *et al.*, 1993b).

On peut classer la stérilité dans plusieurs catégories. Chevassus (1983) en distingue trois : gonadique, gamétique et zygotique. Dans la stérilité **gonadique**, les gonades ne se développent pas, comme cela a été démontré chez les amphibiens (Fankhauser, 1945) et la mye *Mya arenaria* (Allen *et al.*, 1986a). Dans la stérilité **zygotique**, les gamètes sont viables et la fécondation est possible mais ne donne que des larves non-viables ou d'autres résultats avortés. Une telle stérilité a été reportée pour des hybrides entre deux espèces de carpes (Bakos *et al.*, 1978) et des triploïdes mâles de truite arc-en-ciel (Lincoln & Scott, 1984). La stérilité **gamétique** est obtenue quand les gamètes sont anormaux, rares ou les deux, comme c'est le plus souvent le cas chez les poissons (Allen & Stanley, 1978 ; Thorgaard, 1983).

Les triploïdes de *Crassostrea gigas* ne se classent pas clairement dans une de ces catégories. Les gonades, bien que réduites (Allen & Downing, 1986), sont présentes chez les triploïdes. Quelques gamètes sont produits chez les mâles triploïdes qui, lorsqu'ils fécondent des oeufs issus de diploïdes, produisent quelques zygotes viables (Allen, 1987). De plus, les femelles triploïdes semblent montrer une stérilité gamétique dans de nombreux cas, alors que ce n'est pas le cas des mâles triploïdes (Allen & Downing, 1990). En fait, dans certaines circonstances, les mâles triploïdes peuvent produire ce que l'on peut appeler des spermatozoïdes. Allen (1987) aurait trouvé des spermatozoïdes haploïdes en cytométrie de flux mais des études plus récentes sur à la fois *Crassostrea virginica* et *Crassostrea gigas* n'ont pas mis en évidence de cellules haploïdes (Hu & Allen, en préparation). Des résultats similaires ont été obtenus en 1993 à l'URGE : des ovules triploïdes ont été observés en épifluorescence et photographiés, et des croisements entre triploïdes ont été tentés qui n'ont donné que des larves anormales non viables.

La quantité de matériel gonadique produit par un triploïde semble dépendant de l'environnement (Allen, 1987 ; données non publiées, REGEMO 1993). Les huîtres étudiées par Allen (1987) à Humboldt Bay, une baie chaude et productive du nord de la Californie, présentaient une bonne croissance et une maturation sexuelle. Par contre aucune cellule haploïde n'a été trouvée dans des animaux mis en maturation dans des eaux plus froides et moins productives de l'Etat de Washington (Puget Sound, K. Cooper, Coast Oyster Company, Quilcene, WA). M. Sphigel (communication personnelle, Israël Oceanographic and Limnological Research Laboratory, Eilat) a observé que des triploïdes de *Crassostrea gigas* conditionnées à de hautes températures produisent apparemment plus de gamètes que des cohortes maturées à faible température, bien que cela n'ait pas été examiné histologiquement ou cytologiquement. Les données de fécondité collectées par le HSRL sur les deux dernières années suggèrent que les femelles triploïdes mûrissant en eaux chaudes (Région centrale de la côte Atlantique des Etats-Unis) sont à peu près dix fois plus fécondes que celles ayant mûri dans les eaux plus froides du nord-ouest du Pacifique (Guo & Allen, données non publiées).

La proportion avec laquelle les triploïdes de *C. gigas* sont stériles est une question relative. D'un point de vue commercial, les triploïdes peuvent certainement être considérés comme stériles : en effet, par rapport aux diploïdes, la fertilité des triploïdes est réduite de 50% chez les mâles et de 75% chez les femelles (Allen & Downing, 1986). Même une fertilité partiellement réduite confère une plus-value au produit (Allen & Downing, 1991). D'un point de vue biologique, spécialement quand cela est proposé comme moyen d'atténuer la reproduction, ou dans un but d'estimation de l'impact de la culture des triploïdes sur les populations endémiques diploïdes, la fertilité réduite n'équivaut pas à une stérilité. En fait, une stérilité absolue des triploïdes n'est pas possible parcequ'il existe une faible, mais certaine, probabilité pour que du sperme haploïde se forme par ségrégation aléatoire à partir de cellules germinales triploïdes. Cette probabilité est estimée à  $0.5^n$  où  $n$  est le nombre chromosomique de base de l'espèce en question ( $n=10$  chez l'huître creuse). Pour la carpe triploïde, cette probabilité est approximativement de  $6 \times 10^{-8}$  (Allen *et al.*, 1986b), pour les huîtres  $9.8 \times 10^{-4}$  (Allen, 1987). Si une stérilité absolue est impossible chez tout triploïde, à quel niveau est-il fertile ? Ce niveau de stérilité est-il acceptable pour prévenir toute reproduction entre triploïdes ? et pour prévenir toute reproduction entre triploïdes et diploïdes endémiques ?

La certitude théorique que les triploïdes produisent des gamètes haploïdes ne veut pas nécessairement dire que la descendance équivaudra, par croisement avec un diploïde, à une descendance de diploïdes. Des croisements entre triploïdes et diploïdes ont donné une descendance non-viable chez les poissons (Lincoln, 1981 ; Lincoln & Scott, 1984). Van Eenennaam *et al.*, (1990) n'ont obtenu que quelques faibles larves en croisant de mâles triploïdes et des femelles diploïdes de carpe *Ctenopharyngodon idella*. Chez les amphibiens, Kawamura (1951a, B) a produit des juvéniles viables de *Triturus pyrogaster* et *Rana nigromaculata* qui étaient aneuploïdes, mais toute la descendance était clairement anormale. De la même façon, des axolotls anormaux ont été obtenus par Frankhauser et Humphrey (1954) en croisant un mâle triploïde et une femelle diploïde. Chez les plantes, des mâles triploïdes croisés à des femelles triploïdes produisent des graines diploïdes mais en nombre nettement moins important qu'à la normale (McClintock, 1929 ; Dermen, 1930 ; Upcott & Philp, 1939 ; Levan, 1942). A partir du faible nombre de données disponibles, les croisements en retour de *C. gigas* sont davantage similaires aux résultats observés chez les plantes que ceux obtenus chez les poissons et les amphibiens. Du naissain diploïde a été trouvé dans 4 des 5 croisements de retour entre des mâles triploïdes de *C. gigas* et des femelles diploïdes (Allen, 1987). Dans tous les cas, la survie larvaire des croisements était inférieure à celle des témoins diploïdes. Des résultats plus récents du laboratoire dirigé par Allen montrent que du naissain peut être obtenu par les deux types de croisements : femelle diploïde x mâle triploïde ou femelle triploïde x mâle diploïde. Ces croisements réciproques ne sont pas équivalents en survie larvaire. La survie des croisements entre triploïdes est extrêmement faible. Cependant un nombre trop réduit de réplicats pour ces différents croisements n'a pas permis d'obtenir une estimation fiable du potentiel reproductif des triploïdes.

Une autre question importante quant à l'estimation du potentiel reproductif des triploïdes consiste à savoir dans quelle mesure la fertilité est compromise par une fonction gonadique retardée ou aberrante. Ce qui revient à se demander si les triploïdes peuvent se développer normalement durant la période de ponte et donner des gamètes qui entreront en concurrence avec ceux issus de diploïdes. A

la différence de l'estimation de la production de gamètes haploïdes chez des triploïdes, cette information ne peut être obtenue qu'empiriquement. Les connaissances actuelles sur ce sujet peuvent être résumées comme suit : les juvéniles triploïdes de *C. gigas* élevées dans la Baie d'Humboldt (CA) ont apparemment pondu après la période habituelle de ponte, mais aucune information ne permet de dire si elles ont pondu avant, après ou en même temps que les diploïdes (Allen & Downing, 1990). Quelques juvéniles triploïdes de *Crassostrea gigas* élevées à Puget Sound (Allen, 1987) ont montré des signes de ponte mais ça n'était le cas pour aucune des triploïdes de *Crassostrea virginica* élevées dans le Maine (Lee, 1988). Des données récentes obtenues au HSRL montrent que les triploïdes n'atteignent leur pic de maturité de façon nettement retardée et qu'elles restent matures longtemps après que les diploïdes aient pondu (Hu & Allen, en préparation).

### **OBJECTIFS.**

Les objectifs globaux de cette étude est d'estimer le potentiel reproductif de triploïdes, entre eux et croisés avec des diploïdes endémiques. Les objectifs spécifiques sont :

- 1-d'évaluer l'importance de la stérilité chez des triploïdes de *C.gigas*, en y incluant des aspects de quantité et de qualité de gamètes formés en relation avec les conditions environnementales dans lesquelles les huîtres sont élevées.
- 2-d'estimer la capacité reproductrice fonctionnelle, c'est-à dire la fertilité et le développement larvaire,
- 3-d'étudier le devenir de croisements entre diploïdes et triploïdes de *C.gigas*, le nombre et la ploïdie des naissains obtenus.

### **RETOMBÉES ET RESULTATS ESCOMPTES.**

Une estimation de la probabilité d'une fonction reproductrice efficace sera effectuée sur des triploïdes de *Crassostrea gigas* par le biais de croisements et par l'utilisation des outils de la cytogénétique. Cette information devrait nous permettre d'estimer le potentiel reproductif des triploïdes et par conséquent d'estimer leur impact sur l'environnement naturel, en milieu d'élevage traditionnel. Cette question peut avoir des répercussions mondiales dans la mesure où l'élevage de triploïdes est soit banalisé, soit en projet dans un nombre important de pays (dont les USA, la France, le Japon).

Les autres retombées intéressantes sont :

- 1-L'étude des triploïdes va accroître la compréhension au niveau de la comparaison des méioses mâles et femelles. Dans la revue bibliographique précédente, il a été souligné que les croisements entre femelles triploïdes et mâles diploïdes ne sont pas équivalents en survie larvaire comme en niveau de ploïdie de la descendance aux croisements entre femelles diploïdes et mâles triploïdes. L'hypothèse selon laquelle la méiose dans les oeufs présente des traits fondamentalement différents de celle des mâles.
- 2-L'étude de descendance de triploïdes devrait donner plus d'information sur l'effet de l'aneuploïdie sur le développement et la croissance, ceci dans la mesure où les gamètes issus de triploïdes sont aneuploïdes.

### **APPROCHE.**

*1-Importance de la stérilité : Quantité et qualité des gamètes formés en relation avec les conditions environnementales du milieu d'élevage.*

Les triploïdes devant servir à cette étude ont été produits en Mai 1992 au laboratoire URGE de l'IFREMER. Les populations diploïdes et triploïdes sont actuellement (Octobre 1993) en phase de contrôle de performances biologiques dans 4 sites différents : Station de Ouistreham, Station de Bouin, Station de La Tremblade et Station d'Arcachon (DEL). Le programme détaillé ci-dessous sera réalisé en deux sites : La Tremblade et Bouin et dans les deux autres sites en fonction des effectifs existants au début de l'année 1994, mortalité et prélèvements déduits. A partir de Février 1994, c'est-à dire avant le début de la maturation gonadique, et si possible tous les 15 jours, un suivi régulier du milieu sera effectué (température, salinité de l'eau, disponibilité en nourriture), et cela jusqu'à ce que les triploïdes soient arrivés à maturation, probablement entre fin Juillet et fin Août.

*Quantité.* Quand les triploïdes auront atteint leur maturité, déterminée par examen morphologique de triploïdes et de diploïdes du même site, la fécondité des mâles et des femelles sera estimée. Les

huîtres seront ouverte et un prélèvement sera effectué pour l'analyse de ploïdie. L'estimation de la fécondité des triploïdes sera exprimée en pourcentage de celle des diploïdes réfractaire (c'est-à dire les diploïdes dans la population de triploïdes, dans la mesure où cette population n'est pas à 100% triploïde). Pour la fécondité femelle, les gamètes seront obtenus à partir de chaque huître par scarification de la gonade, collectés sur un tamis de 25µm et comptés. La condition relative des oeufs sera déterminée qualitativement. On pourra également utilisé une huile rouge O pour la détermination de la qualité des oeufs.

Pour les mâles, la fécondité sera déterminée cytologiquement en cytométrie de flux. Dans cette procédure, la chair de l'huître sera sectionnée le long d'un axe perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur, ventralement aux palpes labiaux. Perdue (1983) a montré que que des coupes croisées effectuées dans la région située à 8-10mm à partir de la base des palpes labiaux donnent les représentations les plus fiables de la gamétogenèse de *C. gigas*. La première coupe obtenue à partir de cette région sera utilisée pour estimer la fécondité. Les tissus obtenus à partir des coupes croisées seront désagrégées mécaniquement. Un aliquote de ces tissus seront utilisés en cytométrie de flux . Le nombre de spermatozoïdes réduits provenant de triploïdes sera estimé par le ratio 1.5 de cellules aneuploïdes par rapport à toutes les autres cellules du prélèvement. De la même façon pour les diploïdes, le nombre de cellules haploïdes en pourcentage du nombre d'autres types de cellules estimera la fécondité des diploïdes. Ces résultats cytogénétiques seront rapportés au poids des animaux. La seconde coupe sera fixée selon les techniques histologiques standard. (Remarque : pour cette étude, nous n'envisageons pas d'utiliser les coupes histologiques pour quantifier la stérilité des triploïdes. Cependant, les lames seront archivées dans l'optique d'une valorisation ultérieure).

*Qualité.* Les gamètes d'huîtres dans chaque site seront utilisés pour des croisements factoriels entre diploïdes et triploïdes. 3 répétitions de ces croisements seront effectués en utilisant à chaque fois un mâle et une femelle de chaque niveau de ploïdie. La fertilité et le développement larvaire seront estimés comme suit.

#### **2-Capacité reproductive fonctionnelle : fertilité et développement larvaire.**

Les gamètes seront obtenus à partir d'huîtres scarifiées individuellement. Avant que les croisements ne soient effectués, un échantillon des gamètes sera prélevé et préparé pour déterminer la ploïdie des gamètes. Tous les croisements seront effectués à partir de paire de parents. . Cette option permettra de contrôler de façon précise le schéma de croisement, avec caractérisation des parents par électrophorèse, et étude des corrélation entre viabilité larvaire et niveau de ploïdie des parents. Si les croisements deux à deux produisent de façon répétée des descendances en nombre important, des croisements en masse seront tentés. Le schéma factoriel de croisement est illustré ci-dessous :

Mâles Femelles	2n	3n
2n	DD	DT
3n	TD	TT

Trois répétitions de ce schéma factoriel seront obtenus en chaque site testé. Ces croisements seront obtenus à partir d'huîtres triploïdes particulièrement matures, c'est-à dire qui ont une bonne qualité de gamètes. Ces réplicats permettront de mieux estimer le devenir de croisements particulier au sein du schéma factoriel, alors que les expériences en chaque site permettront de voir dans quelle mesure l'environnement affecte les capacités reproductives des triploïdes. Pour la seconde analyse, une régression linéaire multifactorielle sera utilisée pour estimer les effets des différents facteurs environnementaux sur la fertilité et le développement larvaire.

Pour chaque croisement, seront estimés : le pourcentage de fécondation, la survie des larves à 48 heures, le nombre de larves à 7 et 14 jours ainsi que l'apparition des premières larves oeillées.

### ***3-Etude de la descendance de croisements entre diploïdes et triploïdes.***

Dans chacun des croisements, le nombre de larves métamorphosées sera compté 2 semaines après la fixation. Pour les croisements produisant du naissain viable, la ploïdie des juvéniles sera déterminée par analyse d'image (Gérard *et al.*, 1993c), cytométrie de flux (Allen *et al.*, 1982) et comptage de chromosomes.

## BIBLIOGRAPHIE.

- Allen, Jr., S.K., 1986. Genetic manipulations : Critical review of methods and performances in shellfish. In K. Tiews (ed.). Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Proceedings of a World Symposium, Schriften des Bundesforschungsanstalt fur Fischerei Hamburg Band 18/19, Berlin.
- Allen, Jr., S.K., 1987. Reproductive sterility in triploid shellfish and fish. Ph.D. Dissertation, University of Washington, 178 pp.
- Allen, Jr., S.K. & Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **102**:197-208.
- Allen, Jr., S.K. & Downing, S.L., 1990. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**:1213-1222.
- Allen, Jr., S.K. & Downing, S.L., 1991. Consumers and "experts" alike prefer the taste of sterile triploid over mature diploid oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Shellfish Research*,
- Allen, Jr., S.K., Gagnon, P.S. & Hidu, H., 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam : cytogenetic and allozyme confirmation. *J. Heredity*, **73**:421-428.
- Allen, Jr., S.K., Hidu, H. & Stanley, J.G., 1986a. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Biol. Bull.*, **170**:198-210.
- Allen, Jr., S.K. & Stanley, J.G., 1978. Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvinus fontinalis*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **107**:473-478.
- Allen, Jr., S.K., Thierry, R.G. & Hagstrom, N.T., 1986b. Cytological evaluation of the likelihood that triploid carp will reproduce. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**:841-848.
- Bakos, J., Krasznai, Z. & Martin, T., 1978. Cross-breeding experiments with carp, tench and Asian phytophagous cyprinids. *Aquacult. Hung. (Szarvas)*, **1**:51-57.
- Chevassus, B., 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture*, **33**:245-262.
- Dermen, H., 1930. Polyploidy in petunia. *Am. J. Bot.*, **18**:250-261.
- Desrosiers, R., Gérard, A., Peignon, J.-M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phélipot P., Guerrier P. & Dubé F., 1993. A novel method to produce triploid embryos in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **170**:29-43.
- Fankhauser, G., 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Q. Rev. Biol.*, **20**:20-78.
- Fankhauser, G. & Humphrey, R.R., 1954. Chromosome number and development of progeny of triploid axolotl males crossed with diploid females. *J. Exp. Zool.*, **126**:33-58.
- Gérard, A., Naciri, Y., Peignon, J.-M., Ledu, C. & Phélipot P. (in press). Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Accepted dans *Aquaculture and Fisheries Management*. Mars 1993

- Gérard, A., Naciri, Y., Peignon, J.-M., Ledu, C., Pélipot, P., Noiret, C., Peudenier, I. & Grizel, H. (in press). Image analysis : A new method for estimating triploidy in commercial bivalves. *Accepté dans Aquaculture and Fisheries Management*. Mars 1993.
- Kawamura, T., 1951a. Reproductive ability of triploid newts with remarks on their offspring. *J. Sci., Hiroshima Univ.*, Series B, Div. 1, **12**:1-10.
- Kawamura, T., 1951b. The offspring of triploid males of the frog, *Rana nigromaculata*. *J. Sci., Hiroshima Univ.*, Series B, Div. 1, **12**:11-20.
- Levan, A., 1942. The effect of chromosomal variations in sugar beets. *Hereditas*, **22**:345-399.
- Lincoln, R.F., 1981. Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. *J. Fish. Biol.*, **19**:415-426.
- Lincoln, R.F. & Scott, A.P., 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *J. Fish. Biol.*, **25**:385-392.
- McClintock, B., 1929. A cytological and genetical study of triploid maize. *Genetics*, **14**:180-222.
- Perdue, J.A., 1983. The relationship between the gametogenic cycle of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the summer mortality phenomenon in strains of selectively bred oysters. Ph.D. Dissertation, University of Washington, 205 pp.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosom set manipulation and sex control in fish. In *Fish Physiology*, Vol IXB, W.S. Hoar et al., eds. Academic Press, NY, pp. 405-434.
- Upcott, M. & Philp, J., 1939. The genetic structure of Tulipa. IV. Balance, selection and fertility. *J. Genet.*, **38**:91-123.
- Van Eenenaam, J.P., Stocker, R.K., Thiery, R.G., Hagstrom, N.T. & Doroshov, S.I., 1990. Egg fertility, early development and survival from crosses of diploid female x triploid male grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, **86**:111-125.

**ANNEXE IV**

**MARQUEURS GENETIQUES**

**PROGRAMME DE CLONAGE ET D'IDENTIFICATION  
DE MICROSATELLITES CHEZ LES MOLLUSQUES.**

**APPEL D'OFFRES IFREMER EN BIOTECHNOLOGIES.**

**CLONAGE ET IDENTIFICATION DE MARQUEURS GENETIQUES  
NEUTRES HYPERVARIABLES (MICROSATELLITES) CHEZ  
L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS* ET LES CREVETTES  
TROPICALES *PENAEUS MONODON* ET *PENAEUS STYLIROSTRIS* :  
APPLICATION AUX PROGRAMMES D'AMELIORATION GENETIQUE.**

**Demandeur principal :** François BONHOMME  
Laboratoire Génome et Populations,  
CNRS URA 1493-Université de Montpellier II,  
Place Eugène Bataillon. Cc63. 34 095 Montpellier Cedex.  
Tel : 67 14 38 87 (32 66)  
Fax : 67 14 45 54

**Partenaires associés :** André GERARD et Yamama NACIRI  
IFREMER, Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie,  
BP 133, Ronce les Bains,  
17 390 La Tremblade.  
Tel : 46 36 30 07  
Fax 46 36 37 51

Edouard BEDIER et Alain DITER  
IFREMER-COP, Laboratoire Aquaculture Tropicale  
Centre de Tahiti,  
Taravao, BP 7004, Tahiti.  
Tel : (689) 57 12 74  
Fax : (689) 57 24 77

## SITUATION ACTUELLE DU SUJET PROPOSE : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ENJEUX.

Les régions répétées de l'ADN, et en particulier les locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) connaissent depuis peu un intérêt considérable de la part des généticiens des populations en raison du polymorphisme important qu'elles révèlent à l'intérieur des populations (Jeffreys *et al.*, 1988). Des techniques telles que les empreintes génétiques ou les RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) ont pour principe l'utilisation de sondes multilocus dans l'analyse du polymorphisme des VNTR. La technique des microsatellites est par contre basée sur l'utilisation de sondes uni locus pour des séquences correspondant à la répétition en tandem, et en  $n$  exemplaires de deux paires de bases (par exemple  $(AC)_n/(TG)_n$ ). L'utilisation conjointe de différents outils classiques de la biologie moléculaire, clonage, amplification, électrophorèse... permet d'identifier les locus porteurs de VNTR et donc d'analyser, par locus, le polymorphisme interindividuel de ces séquences. L'importance de la variation ainsi mise en évidence et sa probable neutralité sélective font de l'étude du polymorphisme microsatellitaire une technique très efficace dans les différents domaines que sont la recherche de parenté, l'étude des flux de gènes entre et à l'intérieur des populations, l'évaluation de l'importance de la diversité génétique et son maintien, enfin la cartographie génétique. Cette dernière application découle du nombre élevé et de la dispersion des VNTR dans l'ensemble du génome, et a été principalement développée chez les mammifères : c'est en particulier le cas de la souris pour laquelle plus de 2000 locus ont d'ores et déjà été recensés (Love *et al.* (1990), Cornall *et al.* (1991), Hearne *et al.* (1991), Montagutelli *et al.* (1991), Dallas (1992)).

La technique des microsatellites est efficace à plus d'un titre : d'une part, les premières données chez les mammifères (Tautz, 1989) montre un polymorphisme moyen par locus très important (10 allèles différents par locus chez l'homme), et d'autre part de telles séquences répétées ont été détectées dans tous les génomes eucaryotes testés jusqu'à présent (Tautz *et al.*, 1986).

Par rapport à d'autres techniques couramment utilisées, l'identification des marqueurs microsatellites présente des avantages certains :

- elle permet d'analyser la variabilité locus par locus par simple visualisation sur gel des produits d'amplification et sans étapes intermédiaires de digestion par des enzymes de restriction. Une fois mise au point (identification des locus et sélection des amorces), cette technique est très facile à mettre en oeuvre en routine et ne nécessite ni un investissement financier important, ni des compétences poussées en biologie moléculaire.

- le recours à l'amplification *in vitro* dite PCR permet de travailler sur de petits échantillons, ce qui fait des microsatellites une technique d'analyse non destructive pour des animaux tels que les huîtres ou les crevettes (Horn *et al.* (1989) ; Litt and Luty (1989)). Ce même recours à la PCR permet également de travailler sur des animaux très petits, par exemple sur les stades larvaires de nombreux organismes.

- le nombre élevé de VNTR détectés dans les organismes jusque-là analysés et leur distribution à l'ensemble du génome ainsi que le degré de polymorphisme attendu permet une caractérisation très fine des individus : l'application est évidente dans les recherches de filiation. Le nombre élevé de microsatellites potentiellement identifiables permet également d'obtenir des cartographies très précises des génomes étudiés, et d'espérer ainsi pouvoir trouver de fortes corrélations entre marqueurs microsatellites et caractères simples (résistance dans le cas qui nous concerne). Ceci représente un net progrès par rapport à d'autres techniques de caractérisation (électrophorèse de protéines par exemple) qui ne rendent compte que d'une très faible fraction du génome et du polymorphisme existant et sont donc inopérantes dans le cas de la recherche de marqueurs spécifiques de certaines fonctions ou caractères.

## DESCRIPTION DU PROJET.

### 1.Objectif général des travaux.

L'objectif global est, pour les trois laboratoires concernés, de mettre au point la technique d'obtention de marqueurs hypervariables, que ce soit sur un modèle de mollusque (l'huître plate *O. edulis*) ou sur un modèle de crustacé (les crevettes, *P. monodon* et *P. stylirostris*).

- Le Laboratoire Génome et Populations a acquis une expertise en matière de microsatellites sur deux organismes, la souris (Dallas, 1992), et le loup (publication en cours). Pour ce laboratoire, l'intérêt du présent projet est double : d'une part appliquer des techniques, jusqu'alors maîtrisées et développées sur les modèles d'animaux vertébrés précités, à des modèles d'animaux invertébrés avec ce que cela suppose de comparaisons possibles entre ces différents modèles (polymorphisme moyen, importance des séquences répétées dans les différents génomes...), et d'autre part posséder un outil performant pour les études de génétique des populations qui pourront être menées ultérieurement sur ces deux nouveaux modèles.
- Pour l'URGE, comme pour le COP-Tahiti, l'acquisition de ces techniques correspondra à un élargissement, à la génétique moléculaire, des compétences de ces deux laboratoires dont les principaux domaines d'action sont actuellement la génétique quantitative et la cytogénétique.

Pour l'URGE, la première application visée sera l'utilisation des microsatellites comme marqueurs associés à la résistance à *Bonamia ostrea*, parasite de l'huître plate *O. edulis*, dans le cadre d'un programme de sélection pour cette résistance. A l'heure actuelle, chaque cycle de sélection se déroule sur deux ans : en effet, l'inoculation du parasite dans le système circulatoire ne peut se faire que sur des animaux d'un an, et l'incubation de la maladie dure une année supplémentaire au terme de laquelle la sélection pour la résistance à la bonamiose consiste à utiliser les animaux survivants comme géniteurs de la génération suivante. Le but de l'utilisation des microsatellites serait d'isoler un marqueur lié au(x) gène(s) de résistance (ou de tolérance), ce qui permettrait d'effectuer une sélection précoce et de réduire la durée des cycles de sélection. Une application non moins importante dans le cadre de ce même programme consistera à suivre et à gérer le polymorphisme au sein des populations sélectionnées (suivi de parenté, minimisation de la consanguinité...). Ce second objectif sera plus facilement atteint que le premier, dans la mesure où il nécessitera l'identification d'un nombre inférieur de marqueurs microsatellites.

Pour le COP-TAHITI, les microsatellites seront avant tout utilisés comme marqueurs de filiation dans le cadre de programmes de cytogénétique (gynogénèse), de sélection et de contrôles de performances. En milieu liquide, l'effet milieu est toujours très important, voire si important qu'il a freiné de façon importante le développement des programmes d'amélioration génétique sur les organismes aquatiques. Dans de tels programmes, le biais introduit par l'effet du milieu sur les résultats mesurés et sur les comparaisons entre lots génétiquement différents peut masquer totalement la variation d'origine génétique. Deux réponses peuvent être apportées à ce problème : la première consiste à dédoubler chacun des lots et à les étudier dans des enceintes séparées constituant autant de répétitions : l'élevage d'un même lot dans différentes enceintes permet de contrôler le milieu et d'extraire son effet des données mesurées par modélisation de celles-ci : c'est tout le propos de la génétique quantitative. La seconde solution consiste à étudier tous les lots dans une même enceinte et donc à les soumettre à un même milieu. La première solution se heurte à l'importance, rapidement exponentielle, des infrastructures nécessaires, dès lors que le nombre de lots devient élevé. La seconde ne peut être envisagée que s'il existe une possibilité de marquage fiable des animaux. C'est à ce niveau que l'utilisation des microsatellites se justifie. Avec de tels marqueurs il sera possible, après avoir étudié les parents des différents lots, de mélanger les descendance dans un même bassin tout en étant sûr, une fois le contrôle de performance terminé, de pouvoir réaffecter chaque animal à son lot d'origine.

## 2. Programme des travaux.

### 2.1. Justification de la voie de travail choisie et répartition des tâches entre chaque partenaire.

Le Laboratoire Génome et Populations est le seul en France à travailler à la fois sur les microsatellites et sur le milieu marin. La compétence acquise par ce laboratoire (Dallas (1992) sur la souris, publication en cours de préparation sur le loup) en fait un partenaire privilégié pour développer ces techniques au sein de l'IFREMER, de même que l'appui de l'IFREMER est nécessaire au LGP pour développer ses recherches dans le domaine marin, notamment dans le cadre du laboratoire en cours d'installation à la Station de Biologie Marine de Sète (structure d'accueil des stagiaires à partir de Septembre 1993) et dirigé par François BONHOMME.

Pour les deux laboratoires IFREMER, l'option d'envoyer en formation un agent du laboratoire a été retenu, le but étant non seulement d'obtenir l'identification de microsatellites mais également d'assurer le transfert des technologies nécessaires vers les laboratoires concernés pour pouvoir assurer l'analyse en routine du polymorphisme microsatellitaire.

Dans le cas de l'URGE, un membre du laboratoire (Y. NACIRI en cas de non-recrutement d'un généticien des populations) effectuera un stage de formation au LGP pour acquérir les techniques, faire avancer le projet et être en mesure d'encadrer un stagiaire. Un étudiant de la CEE est pressenti pour effectuer sa thèse sur ce sujet, sous réserve que sa demande de bourse aboutisse (demande adressée à la CEE dans le cadre du programme Capital Humain et Mobilité). Une demande de bourse de thèse pour 1995 a également été déposée dans le cadre du contrat de plan Etat-Région Poitou-Charentes. En cas de réponse positive, un étudiant en DEA devrait travailler sur le sujet dès Mars 1994. La formation d'un membre du laboratoire se justifie par la nécessité pour l'URGE ne n'être pas seulement commanditaire mais acteur à part entière dans les recherches projetées.

Dans le cas du COP, les travaux sur l'identification de marqueurs microsatellites ont déjà été amorcés en 1993 par le biais d'un financement, accordé par l'IFREMER, à un stagiaire de DEA travaillant sur le sujet au LGP. Dans le cadre de ce contrat, les premiers clones recombinants ont été obtenus au LGP et sont actuellement en cours d'analyse. De ce fait, on peut considérer que le programme "Crevettes" est en avance de quelques mois sur le programme "Huîtres". Un étudiant, actuellement en stage de DEA dans le Laboratoire d'Aquaculture Tropicale et devant effectuer son service militaire en tant que VAT dans ce même laboratoire, aura comme fonction de se former au LGP avant de retourner à Tahiti, pour avancer les recherches et être en mesure de transférer les technologies nécessaires au COP. Compte tenu de l'isolement géographique du laboratoire, la formation d'un de ses membres est également souhaitable pour le suivi des expérimentations *in situ* (stage d'un mois à Sète en 1994 et en 1995 pour un cadre du laboratoire).

### 2.2. Echelonnement et description des travaux.

**URGE :** Octobre-Novembre 1993 : Stage de deux mois d'un membre de l'URGE au LGP.  
Constitution de la banque de clones selon les étapes suivantes :

- Extraction de l'ADN génomique à partir d'huîtres *Ostrea edulis* provenant de deux lignées sélectionnées depuis 1985 et 1989 pour la résistance à la bonamiose.
- Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction : isolation et purifications des fragments selon leur taille, préparation des fragments en vue de leur ligation puis insertion de ces fragments dans un phage et induction de la formation de particules virales infectieuses.
- Titration et amplification de la banque ainsi constituée.
- Synthèse de sondes d'oligonucléotides marqués et hybridation sur les membranes de transfert : sélection des phages recombinants par autoradiographie.

Janvier-Février 1994 : Stage de deux mois du membre de l'URGE au LGP.  
Séquençage des clones et sélection des clones polymorphes selon les étapes suivantes :

- Excision des inserts dans les phages sélectionnés,

- Détermination des séquences flanquantes aux inserts et sélection des amorces appropriées,
- Amplification des inserts (mise au point des paramètres d'amplification),
- Mesure du polymorphisme sur les locus sélectionnés.

Été 1994 : Transfert à l'URGE des jeux d'amorces et testage des lignées pour la recherche de marqueurs.

Année 1995 : Deuxième phase de sélection de clones (en cas de nombre insuffisant de marqueurs microsatellites) et application aux programmes de sélection : suite du testage des lignées et recherche de marqueurs de résistance.

Ce programme est susceptible d'être accéléré avec l'arrivée d'un thésard (dossier en cours pour une inscription en Septembre 1993) ou d'un DEA (à partir de Mars 1994).

**COP :** Septembre-Novembre 1993 : stage au LGP du futur VAT à Tahiti.

La banque de clones ayant déjà été obtenue sur crevette, le stage comprendra l'apprentissage des techniques et la sélection des clones polymorphes selon les étapes suivantes :

- Détermination des séquences flanquantes,
- Choix des amorces,
- Essais d'amplification,
- Mesure du polymorphisme sur les locus sélectionnés.

Décembre 1993-Décembre 1995 : Transfert au COP des jeux d'amorces et testage sur place.

Les objectifs seront plus rapidement atteints dans le cadre du programme "Crevettes" que dans le cadre du programme "Huîtres" pour deux raisons :

- Le programme "Crevettes" est déjà bien avancé et les objectifs fixés (recherche de filiation) ne nécessiteront pas l'identification d'un grand nombre de locus polymorphes : une dizaine de locus microsatellites présentant en moyenne 4 à 5 allèles différents devraient suffire à assurer un bon marquage des animaux ( $15^{10}$  soit environ 577 milliards de combinaisons différentes d'allèles pour 10 locus non liés entre eux avec 5 allèles chacun)
- Pour le programme "Huîtres", les travaux ne sont pas au même stade de développement et ne débuteront qu'à l'automne 1993. Par ailleurs, les objectifs fixés (recherche de marqueurs de résistance) nécessiteront une véritable cartographie du génome. En effet, il s'agira d'identifier suffisamment de locus pour être en mesure d'en trouver un (ou plusieurs) qui soit(ent) suffisamment proche(s) du ou des gènes de résistance pour pouvoir lui ou leur être déclaré(s) lié(s) et constituer ainsi un ou des bon(s) marqueur(s). Empiriquement, l'identification d'un locus tous les 20 centimorgans est considéré comme une proportion satisfaisante pour s'assurer de bonne chance de succès. En l'absence de données sur la taille du génome de l'huître en unité de recombinaison (centimorgan), un chiffre arbitraire de 1 000 centimorgans a été retenu par référence à d'autres espèces plus étudiées (souris : 1 700 centimorgans pour  $2n=20$  chromosomes par exemple). Avec une telle hypothèse, l'identification de 50 locus polymorphes sera au minimum nécessaire pour répondre aux objectifs fixés.

### 3. Conséquences attendues au plan scientifique et économique.

L'identification de marqueurs microsatellites connaît un développement très important depuis deux ans, essentiellement chez les mammifères. Du point de vue fondamental, l'identification de tels marqueurs sur un modèle crustacé et un modèle mollusque devrait constituer des avancées décisives. Pour le LGP, l'étude comparée de représentants de groupes différents (vertébrés et invertébrés) ne peut être que riche d'information (abondance des séquences répétées, polymorphisme moyen...). De plus, la possession de marqueurs génétiques en amplification par PCR permettra d'aborder des problèmes extrêmement intéressants de génétique en phase larvaire, jusque là impossibles à étudier par polymorphisme enzymatique.

D'un point de vue plus appliqué, la caractérisation de marqueurs microsatellites permettra pour les deux laboratoires IFREMER de faciliter la sélection de souches plus performantes et d'améliorer l'efficacité de cette sélection, que ce soit par le contrôle de paternité ou par la recherche de marqueurs associés à des caractères économiquement intéressants. L'intérêt des microsatellites réside également dans leur utilisation possible dans des domaines autres que la cytogénétique et l'amélioration des performances, comme par exemple l'analyse du polymorphisme des populations, ou le suivi de la consanguinité dans ces populations.

D'un point de vue économique, l'identification chez l'huître plate *O. edulis* de marqueurs microsatellites associés à la résistance à la bonamiose permettrait d'accélérer les cycles de sélection et de proposer aux professionnels une souche résistante (ou tolérante) dans des délais plus courts que ceux actuellement prévus. Pour les crevettes *P. stylirostris* et *P. monodon* les retombées économiques attendues sont du même ordre dans la mesure où une efficacité accrue de la sélection pour des souches plus performantes peut également être attendue.

## BIBLIOGRAPHIE.

- Cornall, R.J., Aitman, T.J., Hearne, C.M. and Todd, J.A., 1991. The generation of a library of PCR-analyzed microsatellites variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics*, **10** : 874-881.
- Dallas, J.F., 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, **3**, 452-456.
- Hearne, C.M., McAleer, M.A., Love, J.M., Aitman, T.J., Cornall, R.J., Ghosh, S., Knight, A.M., Prins, J.-B. and Todd, J.A., 1991. Additional microsatellite markers for mouse genome mapping. *Mammalian genome*, **1** : 273-282.
- Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Wilson, V. and Wong, Z., 1988. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, **332** : 278-281.
- Horn, G.T., Richards, B. and Klinger, K.W., 1989. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, **17** : 2140.
- Litt, M. and Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **44** : 397-401.
- Love, J.M., Knight, A.M., McAleer, M.A. and Todd, J.A., 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res.*, **18** : 4123-4130.
- Montagutelli, X., Serikawa, T. and Guénet, J.-L., 1991. PCR-analysed microsatellites : data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. *Mammalian Genome*, **1** : 255-259.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, **17** : 6463-6471.
- Tautz, D., Trick, M. and Dover, G.A., 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, **322** : 652-656.