

Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture
Contribution of a genetic program to aquaculture : the example of the shellfishery

Sylvie Lapègue¹, Edouard Bédier², Emmanuel Goyard³, Lionel Dégremont¹, Jean-Pierre Baud⁴, André Gérard⁴, Philippe Gouletquer¹, Pierre Boudry¹

1 Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ronces-les-bains, 17390 La Tremblade

2 Laboratoire Conchylicole de Bretagne, BP 86, 56470 La Trinité-sur-mer

3 Laboratoire d'Aquaculture de Calédonie, BP 2059, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

4 Département Ressources Aquacoles, BP21105, 44311 Nantes Cedex 03

Résumé / Abstract

Deux espèces d'huîtres sont aujourd'hui présentes sur les côtes françaises : l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), indigène, et l'huître creuse du Pacifique (*Crassostrea gigas*), introduite du Japon dans le début des années 1970. L'huître plate a subi coup sur coup, dans les années 1960, deux maladies dues à des protozoaires parasites et sa production est ainsi passée de 20 000 t/an dans les années 1960 à 1500 t/an aujourd'hui en France. Il en résulte que la filière ostréicole française repose quasiment exclusivement (99%) sur la production de l'huître creuse, *C. gigas*, avec 150 000 tonnes en 2000 dont environ 90% est issu du captage naturel. Cependant, la reproduction de cette espèce en éclosérie est actuellement en expansion avec une estimation de 400 à 800 millions de naissains commercialisés en 2002. Des rapports renforcés entre l'IFREMER et les cinq écloséries françaises de la filière ostréicole, qui adhèrent toutes au SYSAAF (SYndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français), permettent désormais d'envisager le développement de nouveaux programmes d'amélioration génétique.

A la fin des années 1980, un programme de sélection pour la résistance de l'huître plate à la bonamiose a été initié au sein de l'IFREMER, et a permis d'obtenir des souches plus tolérantes à cette maladie. Après deux générations en sélection massale, les marqueurs moléculaires avaient mis en évidence une base génétique réduite au sein de ce programme qui s'était alors orienté vers une sélection intra-familiale. Devant la lourdeur zootechnique d'un tel schéma, un compromis a été trouvé en réalisant une sélection au sein de cohortes de familles biparentales, la gestion de ces cohortes étant permise par les analyses moléculaires. Le programme est maintenant dans sa phase de transfert, avec des expérimentations à plus grande échelle en partenariat avec la profession.

En ce qui concerne l'huître creuse, et en parallèle de l'obtention et l'étude de polyploïdes, les performances de différentes souches d'huîtres creuses provenant d'Asie ont été comparées à celles de la souche introduite en France il y a trente ans, sujette à des mortalités estivales. La souche locale présente de meilleures performances, vraisemblablement grâce à une adaptation bien réalisée. Par ailleurs, bien que l'amélioration de la croissance jusqu'à la taille commerciale s'avère possible par une sélection précoce au stade larvaire, le critère de croissance n'est pas nécessairement à privilégier dans le contexte d'un bassin ostréicole disposant de ressources trophiques limitées. En revanche, les importantes mortalités rencontrées par le naissain en périodes estivales constituent le sujet d'étude prioritaire sur lequel se sont penchées de nombreuses équipes (génétique, physiologie, pathologie, écologie, ...) dans le cadre du grand défi MOREST. Les premiers résultats ont mis en évidence de fortes différences de survie entre des familles biparentales d'animaux indiquant un déterminisme génétique du caractère « survie », et encourageant dans la voie d'une sélection pour ce caractère.

Two oyster species are currently present along the French coasts : the indigenous European flat oyster (*Ostrea edulis*), and the Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*), that has been introduced from Japan since the beginning of the 70ies. The flat oyster successively suffered from two protozoan diseases during the 60ies and its production decreased from 20 000 tons/year by that time to 1 500 tons/year nowadays. Consequently, the oyster production is principally (99%) based upon the Pacific oyster species with approximately 150 000 tons/year among which 90% are grown from the natural spat. However, the hatchery production of this species is developing and was estimated to 400 to 800 millions spat in 2002. Moreover, strengthened

relationships between IFREMER and the 5 commercial hatcheries, that all joined the SYSAAF (Union of the French poultry, shellfish and fish farming selectors), allow to plan for new genetic breeding programs.

At the end of the 80ies, IFREMER initiated a genetic breeding program for the resistance of the European flat oyster to the bonamiosis, and obtained strains more tolerant to this disease. After two generations of massal selection, molecular markers had identified a reduced genetic basis in this program. It was then reoriented to an intra-familial selection. However, we were confronted to a zootechnic problem to manage such a scheme and we compromised by an intra-cohorts of families selection scheme managed using molecular markers. The program has now reached the transfer level with experimentation at a professional scale.

Concerning the Pacific cupped oyster, and in parallel with the obtaining and the study of polyploids, performance of different Asian cupped oyster strains were compared to the one introduced in France thirty years ago and currently suffering from summer mortalities. The local strain exhibited better performance, certainly based upon a good local adaptation. In other respects, although early growth is a relevant criteria for selection for growth to commercial stage, it is not to be privileged in the context of an oyster producing region with a limited food availability. Contrary, the spat summer mortality became a priority for numerous teams (genetic, physiology, pathology, ecology,...) joined in the MOREST program. The first results showed important survival differences between fullsib and halsib families. They indicate a genetic determinism to this character "survival" and promote for its selection.

L'amélioration de la résistance à la bonamiose chez l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* représente l'espèce d'huître indigène européenne. Présente de la Scandinavie au Maroc, et jusqu'à la Mer Noire, cette espèce a été traditionnellement cultivée en Europe et en France depuis l'Antiquité. Victime vraisemblablement d'une surexploitation dans les années 20, voire de la concurrence de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* dans certaines régions de production, l'huître plate a vu ensuite sa production se rétablir avant d'être successivement touchée par deux épizooties. La première, due à *Marteilia refringens*, a touché les exploitants des zones intertidales à la fin des années 60; la seconde, due au parasite *Bonamia ostreae* a affecté dès 1979 les zones sub- et intertidales. Ces deux maladies ont affecté de manière pérenne la production d'*Ostrea edulis* qui, de 20000 tonnes environ, s'est stabilisée actuellement aux alentours de 1500 tonnes par an (Gouletquer et Héral, 1997). Cette production est essentiellement localisée en région Bretagne, selon une technique de semis en eau profonde, dans des zones peu propices au développement de *Marteilia refringens*. Les survies à taille commerciale sont de l'ordre de 5 à 10 %. Dans le même temps, et après la quasi-disparition de l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* dans les années 70 suite à l'épizootie d'iridovirus, l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, introduite pour pallier la disparition de l'huître portugaise, a atteint un stade de quasi-monoculture avec plus de 99% de la production conchylicole française. Ce chiffre est à rapprocher des 97% que représente la production de cette espèce à l'échelle mondiale. Cette situation de monoculture dans laquelle se trouve la conchyliculture française est une donnée inquiétante pour la durabilité de la filière, et les efforts menés pour tenter de rétablir la filière huître plate vont dans le sens d'une diversification de cette activité, et de sa durabilité.

Pour combattre l'impact des agents pathogènes affectant les cultures de Bivalves, les moyens de lutte sont réduits et se limitent au contrôle de la dissémination du matériel vivant d'une part ; à l'amélioration génétique des cheptels pour une meilleure tolérance aux maladies d'autre part. L'absence de réponses immunitaires spécifiques rend en effet inefficaces les traitements de type vaccination, et l'élevage en milieu ouvert empêche l'application de traitements médicamenteux. La complexité du cycle de *Marteilia refringens*, parasite à plusieurs hôtes, n'est encore que partiellement élucidée, et sa présence est *a priori* limitée aux eaux peu profondes de la zone intertidale. En revanche, *Bonamia ostreae* présente un cycle court à un seul hôte, et est présent dans l'ensemble des profondeurs exploitables. Les études pour tenter d'éradiquer ou de limiter l'impact de ces épizooties ont porté essentiellement sur ce dernier parasite.

Les mortalités dues à *Bonamia ostreae* affectent peu ou prou l'ensemble des côtes européennes (France, Irlande, Espagne, Angleterre, Pays-Bas, Danemark) et dans tous les cas où elles ont eu lieu, les tentatives d'éradication de la maladie se sont

montrées largement infructueuses. Seule la réduction de la densité des huîtres en élevage a permis dans certains cas de réduire les mortalités, sans pour autant faire disparaître le parasite. L'introduction de naissain "sain" a également été récemment tentée, sous l'impulsion de certains pays indemnes de *Bonamia ostreae* comme la Norvège, qui jouent sur la confusion entre absence de parasite et résistance de l'hôte. Les suivis effectués sur les premières importations de ce naissain montrent une infestation rapide en zones contaminées.

La sélection génétique d'animaux résistants à la maladie apparaît donc comme une alternative possible pour lutter contre ces mortalités. L'existence au niveau individuel, chez les huîtres en zones contaminées, d'une résistance naturelle a été en effet montrée depuis longtemps (Elston *et al.*, 1986) et suggère la possibilité d'une amélioration génétique. Au niveau de la population en revanche, les dynamiques des cycles tant de l'hôte (pontes possibles dès la deuxième année) que du parasite (induction des mortalités en troisième année) font que les stocks naturels ne subissent pas dans le milieu une pression de sélection suffisante pour induire une résistance significative. Même si le terme "résistance" est habituellement employé, on doit plutôt parler de meilleure tolérance de l'hôte au parasite, cette tolérance permettant à l'huître d'atteindre sa taille commerciale avant qu'apparaissent des mortalités significatives. Des programmes d'amélioration génétique pour des animaux plus résistants aux maladies ont été menés chez les Mollusques essentiellement chez *Crassostrea virginica*, chez *Saccostrea commercialis* et chez *Ostrea edulis*. Chez *Crassostrea virginica*, une amélioration croissante de la survie à *Haplosporidium nelsoni* (MSX) a été observée sur 7 générations de sélection produites en écloserie (Haskin et Ford, 1979 ; Ford et Haskin, 1987; Kennedy et Roberts, 1999). Chez la même espèce, une sélection contre la Juvenile Oyster Disease a montré des augmentations de survie après 4 générations de sélection (Farley, 1997). Plus récemment, un programme de sélection aux parasites *Mikrocytos rougbleyi* et *Marteilia sydneyi* a été initié en Australie chez *Saccostrea commercialis*, et a montré des gains de survie en faveur des huîtres sélectionnées dès la première génération (Nell *et al.*, 2000). Ces données montrent que la sélection génétique pour une meilleure résistance aux maladies est possible chez les Mollusques Bivalves. Plusieurs programmes de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour une meilleure tolérance à *Bonamia ostreae* ont été démarrés en Europe, en particulier en Irlande et en France. Un projet CRAFT (regroupant le Royaume Uni, l'Irlande, la Norvège, les Pays-Bas et certains privés français) a fonctionné de 1998 à 2000 de manière à vérifier le développement de la résistance chez certaines souches irlandaises. Des mortalités et des taux de prévalence moindres ont été observées chez les huîtres sélectionnées par rapport aux témoins, mais ceux-ci provenaient de gisements indemnes de bonamiose ce qui est à même de biaiser les résultats obtenus (Culloty *et al.*, 2001).

En France, Ifremer s'est lancé dès 1985 sur le problème de l'amélioration génétique de la tolérance à *Bonamia ostreae*, parallèlement aux études pathologiques menées sur le parasite. La purification de ce dernier, obtenue en 1988 a permis de recourir à des surinfections expérimentales, et de soumettre les huîtres à une pression de sélection mieux contrôlée que celle obtenue en conditions naturelles. Le programme a évolué d'une sélection massale à une sélection intrafamiliale. La gestion de la diversité génétique des lignées utilisées dans ce programme, et les suivis terrain d'une durée de 3 ans expliquent la longueur de ce programme dont on ne retiendra que les principales étapes :

- En 1995, la comparaison des performances d'huîtres de 3ème génération montrait un gain significatif par rapport au contrôle sauvage (59% de survie contre 13%), alors que les croisements entre ces animaux et le contrôle sauvage laissaient suggérer un déterminisme génétique susceptible d'être sélectionné (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Le protocole de croisement massal a été parallèlement modifié en croisements biparentaux de manière à diminuer les effets potentiels de consanguinité.

- De 1997 à 2000, des animaux sélectionnés issus de ce nouveau protocole ont montré des gains significatifs de performances par rapport aux deux cohortes de naissain naturel captées dans les deux années encadrant leur production en écloserie (61% de survie contre 46 et 13%).

- De 1998 à 2000, le même gain de performances a été montré entre des animaux sélectionnés produits de manière familiale et les contrôles sauvages (83% de survie contre 8% en deuxième année) (Figure 1). Ce dernier résultat est à rapprocher du chiffre de 5% habituellement avancé pour les résultats de survie "commerciaux".

Dans tous les cas, les taux de survie apparaissent corrélés aux taux de prévalence en *Bonamia*. Les résultats expérimentaux disponibles à l'heure actuelle sont donc prometteurs, et laissent penser à une tolérance accrue et transmissible des souches développées par Ifremer. Cependant les expériences ont été jusqu'à présent menées, pour des raisons pratiques d'accès aux animaux et d'acquisition des données, en conditions expérimentales (lots de taille limitée, élevage en poches ostréicoles), non transposables au niveau de la production.

Une validation en conditions d'exploitation, c'est-à-dire avec un ou plusieurs millions de bêtes semées sur plus d'un hectare en eau profonde selon la technique classiquement utilisée par les ostréiculteurs est actuellement en cours de réalisation dans le cadre du projet OFISTREA soutenue par l'OFIMER (Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture), et s'avère être un préalable au transfert vers le secteur professionnel. Cependant, ce transfert implique un changement à la fois d'échelle et de stratégie dans la production du naissain d'huîtres plates. La demande actuelle est assurée par le captage de naissain naturel, essentiellement en Bretagne Sud, pour un semis en eau profonde au printemps de l'année suivant ce captage. Comme tout produit issu de la sélection génétique, les souches sélectionnées proviennent de croisements contrôlés qui ne sont réalisables qu'au sein d'écloseries. Incorporer ces dernières dans les filières de production est donc incontournable dès lors que l'on désire faire profiter les professionnels des acquis de la sélection. Dans certains cas, comme en Australie par exemple, la culture de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est entièrement basée sur la production de naissain d'écloserie. Les programmes de sélection mis en place pour améliorer la compétitivité de la filière peuvent donc s'intégrer sans rupture dans cette dernière. En France, l'activité conchylicole repose majoritairement sur le captage naturel, que ce soit pour l'huître creuse ou pour l'huître plate. L'écloserie expérimentale Ifremer de La Tremblade a développé pour ce programme de sélection un savoir-faire à l'échelle de la production de quelques centaines de milliers de naissain. L'implication des écloseries privées est incontournable pour un transfert de ces lignées vers le milieu professionnel.

Diversité génétique et amélioration par la sélection chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Durant plus d'un siècle, la production d'huître creuse en France a reposé sur l'espèce *Crassostrea angulata*, introduite du Portugal en 1868. Suite aux mortalités massives observées à la fin des années 1960, *Crassostrea gigas* fut introduite en provenance du Japon (Préfecture de Myagi) et de Colombie Britannique (Canada). Cette introduction fut un succès et la production d'huîtres creuses fut rapidement relancée grâce à la reproduction spontanée de *C. gigas*, principalement dans les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron (Grizel et Héral, 1991). Parallèlement au captage naturel, la maîtrise de la reproduction de cette espèce en écloserie, a permis d'étudier la possibilité d'amélioration génétique de cette espèce. La triploïdie, obtenue initialement par rétention d'un des globules polaires au moment de la fécondation (voir pour revue Beaumont et Fairbrother, 1991 ; Gérard et al., 1999) puis par simple croisement entre géniteurs diploïdes et tetraploïdes (Guo *et al.*, 1996), constitue une composante majeure des apports de la génétique aux productions d'huîtres creuses (voir pour revue Nell, 2002).

Parallèlement à ces travaux en cytogénétique et à leurs applications, des études ont été menées pour déterminer si les huîtres creuses actuellement cultivées en France sont bien adaptées à leur environnement ou si des populations de *C. gigas* ou de *C. angulata* d'autres origines pouvaient s'avérer plus intéressantes pour l'ostréiculture. Des expérimentations en milieu contrôlé et en conditions de production ont donc été réalisées. Pour des raisons zoosanitaires et afin d'éviter des biais liés à des différences d'âge ou de conditions environnementales, ces travaux ont été réalisés sur les descendants de géniteurs prélevés dans les populations testées. Ces géniteurs ont été maintenus en quarantaine, conditionnés et reproduits en écloserie. Une telle démarche permet de limiter au maximum les risques zoosanitaires et les biais évoqués ci-dessus, mais les lots testés ne sont pas forcément toujours représentatifs des populations d'origine.

Dans un premier temps, des travaux ont été menés sur la consommation en oxygène (indicateur physiologique du coût énergétique de maintenance résultant du catabolisme) de naissain (0,25 à 0,4 mg) dont les parents étaient originaires de France et du Japon (*C. gigas*); d'Espagne et de Taiwan (*C. angulata*). Les taux de respiration ont été mesurés individuellement à 20°C au

moyen d'un respiromètre volumétrique. Les résultats ont montré que les souches d'origine française et japonaise (*C. gigas*) ont un taux de respiration plus élevé que les souches d'origine espagnole et taiwanaise (*C. angulata*) (Gouletquer *et al.*, 1999). Dans un second temps, ces travaux se sont poursuivis sur des individus de plus grande taille, permettant d'établir un bilan physiologique (taux de filtration, d'ingestion, d'absorption et de respiration) permettant de déterminer une estimation du SFG (« Scope For Growth ») pour chaque individu étudié. De plus, le suivi en continu de ces paramètres sur des périodes de 3 heures a permis de déterminer la FTA (« Feeding Time Activity ») et la RTA (« Restiratory Time Activity ») et donc d'établir un SFGc (SFG corrigé), tenant compte des temps d'activité des animaux. Les résultats ont montré que les taux moyens de respiration et de filtration ne différaient pas entre les souches, mais que celles-ci présentaient des FTA et donc des SFGc significativement différents (la souche *C. angulata* présentant les valeurs les plus basses) (Haure *et al.*, 2003). Ces résultats sont en concordance avec les données de croissance observées pour ces souches : la souche *C. angulata* présentant des taux de croissance inférieurs à ceux des autres souches testées (Huvet, 2000; Haure *et al.*, 2001).

Parallèlement aux comparaisons réalisées en laboratoire ou bassins expérimentaux, des comparaisons de performances ont été réalisées sur le terrain, dans des conditions proches de celles de production. L'objectif était notamment de confirmer si *C. angulata* présentait des croissances plus faibles, comme établis par les comparaisons à partir des données temporelles (Héral, 1986) et par une observation directe (Bougrier *et al.*, 1986). Quatre souches (deux taxons : *C. gigas* et *C. angulata*) d'origine européenne (France et Espagne) ou Asiatique (Japon et Taïwan) et 2 lots hybrides (*C. gigas* x *C. angulata*) ont été suivis durant 2 années sur le banc de Ronce-Perquis dans le Bassin de Marennes-Oléron. Les résultats montrent des performances de croissance et de survie de *C. gigas* supérieures à celles de *C. angulata* (Soletchnik *et al.*, 2002). De plus, pour chaque taxon, la souche européenne a présenté de meilleures performances que la souche asiatique, laissant supposer une adaptation de ces souches aux conditions locales.

La souche française de *C. gigas* apparaissant, comparativement à d'autres souches, bien adaptée aux conditions locales, les recherches se sont orientées vers l'étude des possibilités de sélection pour des caractères d'intérêt aquacole : survie et croissance à différents stades. Après des études sur la variabilité phénotypique de ces caractères à différents stades (Collet *et al.*, 1999, Boudry *et al.*, sous presse), des estimations de leur l'héritabilité ont été entreprises. Dans un premier temps, 15 familles (5 mâles croisés chacun avec 3 femelles) ont été produites en éclosion afin d'estimer l'héritabilité et les corrélations génétiques entre plusieurs caractères de développement précoce (croissance et survie larvaire, taille et âge à la fixation, taux de fixation, survie et croissance du naissain). Malgré les limitations liées essentiellement aux contraintes expérimentales (nombre de familles, absence de réplicats...), les résultats se sont avérés très intéressants, permettant notamment de déterminer les caractères pour lesquels la variation est significativement héritable (survie larvaire, taux de développement larvaire, taille et succès à la fixation) et de révéler des corrélations génétiques négatives entre certains caractères (taux de développement et taille à la métamorphose, d'une part, et succès à la métamorphose, d'autre part) (Ernande *et al.*, 2003). Ces résultats montrent l'intérêt des approches multi-caractères, particulièrement quand ceux-ci sont liés à l'allocation d'une même ressource.

Un deuxième ensemble de travaux s'intègre dans le défi « MOREST », projet multidisciplinaire coordonné par IFREMER ayant pour objectif de comprendre et proposer des solutions face aux mortalités estivales. 45 familles de plein-frères, soit 17 familles de demi-frères, issues de 3 séries de croisements (chaque série étant constituée comme précédemment) ont été produites avec pour objectif principal d'étudier la possibilité de sélectionner pour une meilleure survie du naissain au cours de la période estivale. Les résultats obtenus (testage des 45 familles sur 3 sites : Marennes-Oléron, La Trinité-sur-Mer, Port-en-Bessin) ont montré une forte variabilité entre familles de demi-frères (Figure 2), confirmant les valeurs élevées de l'héritabilité de la survie (0.81 ± 0.29) et plus faible pour la croissance (Dégremont *et al.*, 2002; Dégremont *et al.*, in prep). Une seconde génération, obtenue par sélection divergente des meilleures et des moins bonnes familles (pour la survie) au sein de la première génération (croisements consanguins et non consanguins) a permis d'estimer l'héritabilité réalisée du caractère et l'absence de corrélations génétiques significatives entre croissance et survie. Les valeurs obtenues (0.75 pour la lignée « haute » et 0.71 pour la lignée « basse ») confirment la forte héritabilité du caractère et donc la possibilité de sélectionner pour améliorer la survie (Figure 3) (Dégremont *et al.*, 2003, Dégremont *et al.*, in prep). Le transfert et l'intégration de ces résultats devrait contribuer à la mise en place de programmes de

sélection pour ce caractère avec les écloséries d'huître en France, désormais adhérentes du SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français).

Aujourd'hui, les recherches s'orientent vers le développement de marqueurs génétiques qui permettront d'assister et, à terme, d'optimiser la sélection. Deux approches sont notamment développées : (1) analyses de parentés par marqueurs microsatellites afin de suivre la diversité (ex. Boudry *et al.*, 2002) et donc minimiser la consanguinité (projet en cours avec le soutien du BRG (Bureau des Ressources Génétiques)) ; (2) recherche de marqueurs de polymorphisme de gènes d'intérêt (ex. Sellos *et al.*, 2003). La cartographie du génome et les développements scientifiques et méthodologiques dans le domaine de la génomique (ex. Gueguen *et al.*, 2003) ouvrent également de nombreuses perspectives dans ce domaine.

Légende des figures

FIGURE 1. Survie des familles sélectionnées en 1998.

FIGURE 2: Variabilité de la mortalité estivale (moyenne inter-sites) entre les 17 familles de demi-frères de la première génération MOREST ($P < 0.001$).

FIGURE 3: Variabilité de la mortalité estivale (site de La Trinité-sur-Mer) entre les familles (sélection divergente non consanguine) de seconde génération MOREST ($P < 0.001$).



