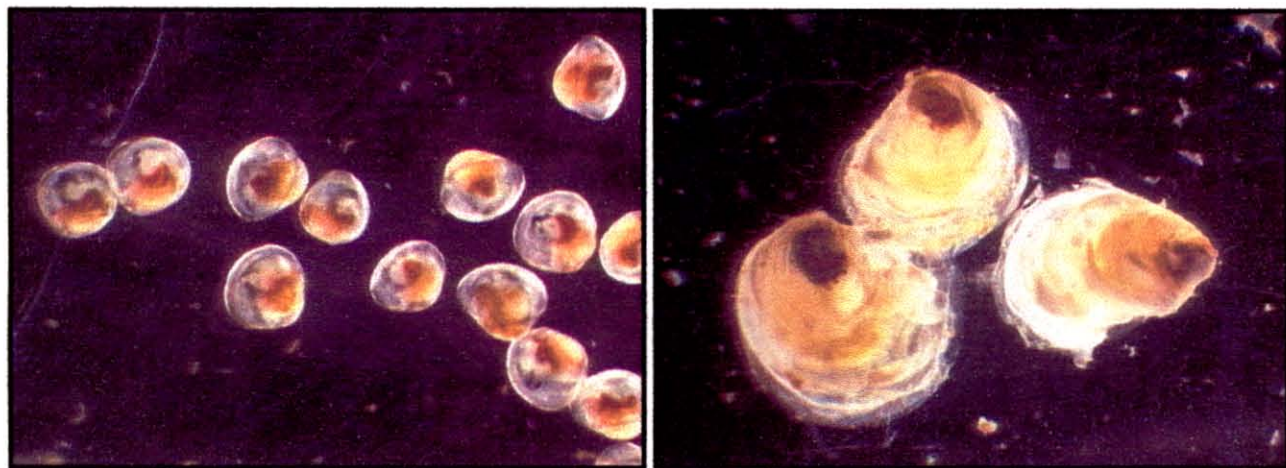


Université de POITIERS  
MAÎTRISE « Biologie des Populations et des Ecosystèmes »  
Année universitaire 1996-1997

**Xavier MINGUEZ**

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

**Suivi de croissance d'une génération  
d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*  
dans le cadre du programme  
« Genephys 1996-2000 »**



70882  
E400.MIN.S.  
788

Dates : 1er Mai - 31 juillet 1997  
Maître de stage : Pierre Boudry  
Responsable du laboratoire : André Gérard

Laboratoire IFREMER Génétique, Aquaculture et Pathologie  
Unité de recherche en Génétique  
B.P. 133-17390 La Tremblade



## Remerciements

Après 3 mois passés au laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de La Tremblade, je tiens tout d'abord à en remercier le directeur, André Gérard, pour son accueil chaleureux, sa présence constante et l'intérêt qu'il porte aux stagiaires.

Je n'oublie pas Jean-Pierre Flassch, directeur de la station.

Je remercie également Pierre, mon maître de stage, pour l'encadrement dont j'ai pu bénéficier.

Je suis très reconnaissant envers Pascal pour les nombreuses connaissances qu'il m'a apportées. L'entente fut d'autant plus rapide que nous partageons la même passion-poissons !

Je tiens par ailleurs à saluer Serge, Bertrand, Catherine, Florence, Sophie, Emmanuel, Marc, Stéphane et Pierre-Yves qui ont contribué à la bonne ambiance générale.

Un grand merci à toute l'équipe Pathologie et plus particulièrement à Tristan pour sa bonne humeur. Bisous à la petite JuJu !

Enfin et surtout je ne peux pas oublier Christophe, Arnaud, Nicolas, Hélène, Cécile ainsi qu'Isabelle avec lesquels j'ai passé un été qui en appelle d'autres...



## **Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de La Tremblade**



# SOMMAIRE

I. INTRODUCTION .....	1
<b>A. PRESENTATION D'IFREMER.....</b>	<b>2</b>
<b>B. PRESENTATION DU PROGRAMME « GENEPHYS 1996-2000 ».....</b>	<b>7</b>
II. MATERIEL ET METHODES .....	8
<b>A. MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>8</b>
1. Classification: .....	8
2. Biologie:.....	8
<b>B. METHODES.....</b>	<b>10</b>
1. Obtention de la G <sub>2</sub> test (Arcachon): .....	10
2. Obtention de la G <sub>2</sub> (Bonne Anse): .....	11
3. Elevage larvaire: .....	11
4. Fixation: .....	12
III. RESULTATS .....	16
<b>A. CROISEMENTS.....</b>	<b>16</b>
1. G <sub>2</sub> test (Arcachon): .....	16
2. G <sub>2</sub> (Bonne Anse): .....	17
3. Comptage des gamètes:.....	18
<b>B. EVALUATION DU TAUX DE FECONDATION.....</b>	<b>18</b>
1. Génération G <sub>2</sub> d'Arcachon:.....	20
2. Génération G <sub>2</sub> de Bonne Anse: .....	21
<b>C. EVALUATION DU POURCENTAGE D'ECLOSION.....</b>	<b>22</b>
1. Génération G <sub>2</sub> d'Arcachon: .....	22
2. Génération G <sub>2</sub> de Bonne Anse: .....	23
<b>D. SUIVI DE CROISSANCE DES DEUX GENERATIONS DE G<sub>2</sub>.....</b>	<b>24</b>
1. G <sub>2</sub> d'Arcachon:.....	24
2. G <sub>2</sub> de Bonne Anse:.....	24
<b>E. CINETIQUES DE CROISSANCE.....</b>	<b>25</b>
1. Croissance moyenne de la G <sub>2</sub> d'Arcachon:.....	25
2. Croissance moyenne de la G <sub>2</sub> de Bonne Anse: .....	25
3. Cinétique de croissance des lots d'Arcachon:.....	25
4. Cinétique de croissance des lots de Bonne Anse: .....	25
<b>F. PROBLEMES SANITAIRES LIES ESSENTIELLEMENT AU VIRUS DE TYPE HERPES.....</b>	<b>30</b>
1. Structure commune aux Herpesviridae: .....	30
2. Cycle viral des Herpesviridae: .....	31
3. Aspects épidémiologiques: .....	31
4. Symptômes et lésions:.....	32
5. Diagnostic: .....	32
IV. INTERPRETATION ET DISCUSSION .....	33
V. CONCLUSION ET BILAN PERSONNEL.....	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
ANNEXES	



# INTRODUCTION

## I. INTRODUCTION

L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* a été introduite en Europe au début des années soixante-dix afin de palier aux problèmes d'épizooties que l'on rencontrait sur l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata*. En effet, cette espèce a été décimée par l'iridovirose (affection parasitaire des branchies). Il s'en est suivi une importation de géniteurs de *Crassostrea gigas* provenant de Colombie Britannique (Canada) et de naissain de la préfecture de Miyagi au Japon. Les huîtres du Canada provenant de la même préfecture, le gisement français est constitué de la « race Miyagi » (Moraga, 1989; Grizel, 1988; Ozaki et Fujio, 1985).

Depuis, cette espèce s'est largement répandue dans les bassins ostréicoles et son importance économique est grandissante. En effet, la production d'huître creuse a atteint 150.000 tonnes en 1995, loin devant l'huître plate *Ostrea edulis* (2.300 tonnes).

Les scientifiques de l'IFREMER ont donc entrepris de vérifier si parmi ces animaux, certains possédaient de meilleurs rendements concernant des caractères comme la nutrition ou la respiration.

C'est dans ce cadre que le programme « Genephys 1996-2000 », soutenu par l'Union Européenne, cofinancé par la région Poitou-Charentes et coordonné par la station d'IFREMER La Tremblade a été mis en place.

Il vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance et leurs bases génétiques. L'objectif final étant d'évaluer les possibilités de sélectionner des huîtres creuses possédant de meilleurs rendements métaboliques.

Le projet a donc été défini pour mettre en évidence la variabilité de croissance à partir d'un lot de différentes origines (Arcachon, Bonne Anse, Port des Barques et la Seudre) correspondant à la génération «  $G_0$  » et représentant les populations naturelles des principaux lieux de naissain de captage en France.

Cette première génération a été obtenue en conservant une base génétique la plus large possible pour pouvoir ensuite évaluer le potentiel de sélection dans l'espèce à partir des générations suivantes. On obtient donc, après croisement des géniteurs, une génération «  $G_1$  » à partir de laquelle on sélectionnera les individus les plus contrastés pour les croiser et ainsi aboutir à la génération «  $G_2$  ».

Durant ce stage, deux axes principaux ont été développés avec tout d'abord la reproduction et le suivi d'une deuxième génération d'huître, puis un aspect sanitaire avec le problème lié à un virus de type Herpès affectant les élevages larvaires et le naissain d'huîtres.

En effet, une première tentative de croisement d'une population «  $G_1$  » de Bonne Anse n'avait pu être menée à bien à cause de ce même type de virus (Lemery, 1997).

L'objectif d'un deuxième croisement d'huîtres provenant de Bonne Anse étant d'effectuer un suivi de croissance du stade larvaire jusqu'à la post-fixation sur ces animaux en tentant d'expliquer l'hétérogénéité de croissance entre les lots.



## A. Présentation d'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) est l'organisme français de recherche et de technologie marines, né en 1984 de la fusion du CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans) et de l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes).

C'est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) qui regroupe 1200 personnes sur une trentaine de sites géographiques. Le budget global d'IFREMER approche le milliard de francs.

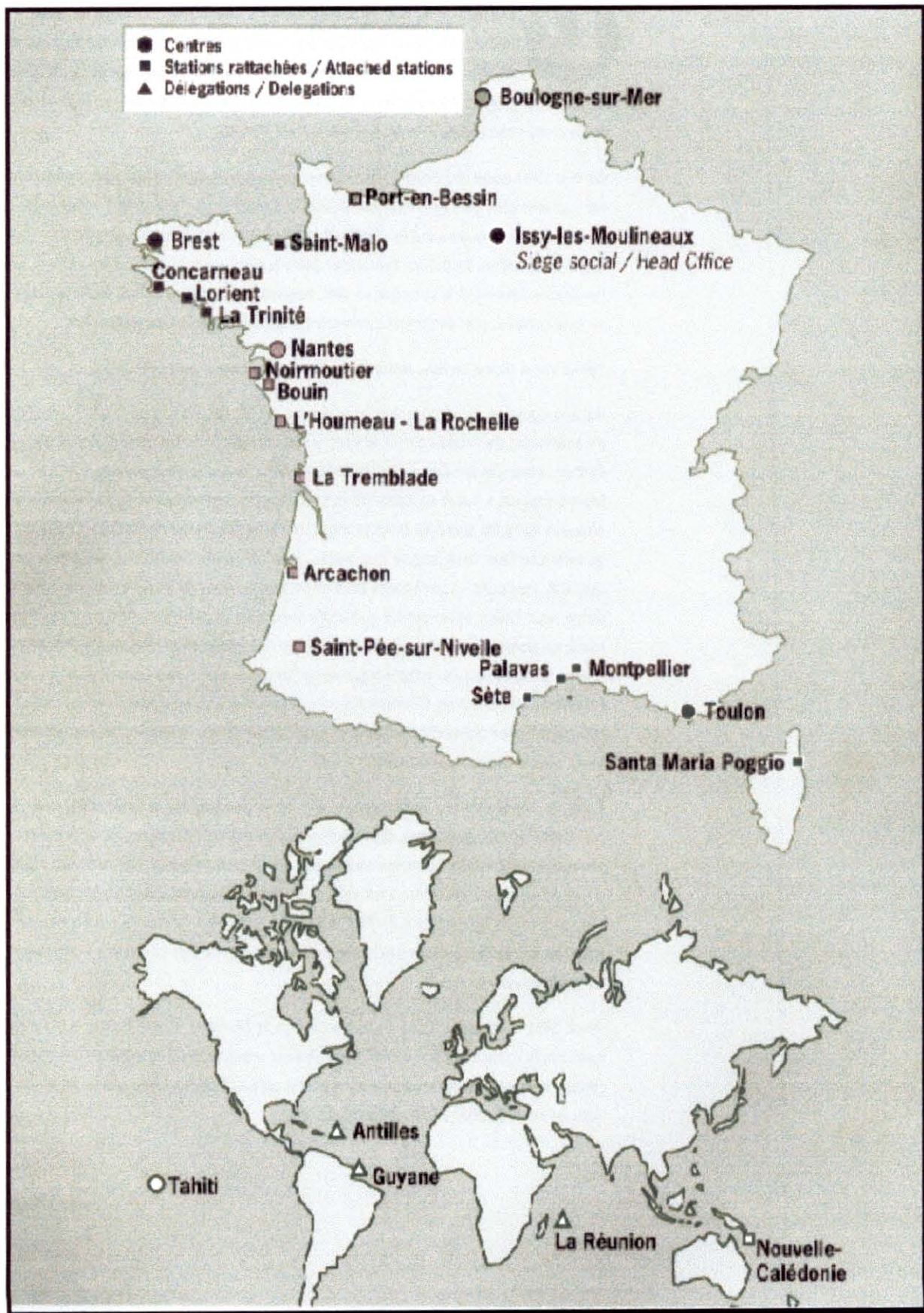
Le dénominateur commun des activités d'IFREMER est le milieu marin.

Les thèmes peuvent être regroupés en quatre catégories-types :

- la recherche fondamentale, souvent menée en collaboration avec des universités ou d'autres organismes publics, couvre des domaines très variés allant des géosciences à la biologie des organismes marins en passant par de nombreuses autres spécialités liées à la mer.
- les développements en technologies marines couvrent des besoins internes ou de la communauté scientifique et industrielle, pour promouvoir de nouvelles techniques dans les industries de la mer.
- le suivi des ressources halieutiques et aquacoles, et la surveillance de l'environnement marin permettent d'établir des diagnostics fondés dans ces domaines.
- la mise à la disposition de la communauté scientifique d'une flotte océanographique hauturière et de moyens à la mer performants.

Ces moyens et le savoir-faire IFREMER peuvent éventuellement être l'objet de prestations commerciales.

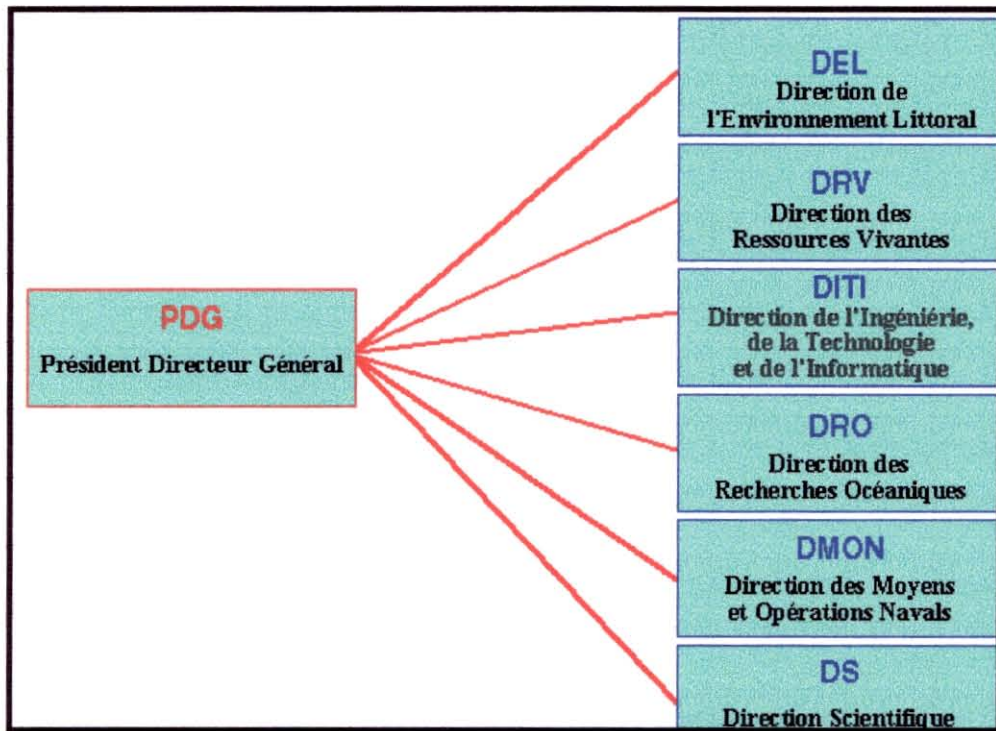
## Implantation d'IFREMER





## Organisation générale d'IFREMER

L'organigramme décrit ci-dessous les 6 principales directions de l'Institut jouant un rôle opérationnel dans le domaine scientifique et/ou technique.



Comme son nom l'indique, les activités de la DRV couvrent l'étude de toutes les espèces vivantes de la mer, faune et flore, ainsi que l'exploitation qui en est faite.

Le secteur économique de la pêche et de l'aquaculture est important, et la Direction des Ressources Vivantes travaille en concertation avec les professionnels, les administrations en charge de ce secteur, qu'elles soient nationales ou européennes.

La DRV se compose de trois départements et un service:

- le Département des Ressources Halieutiques (RH),
- le Département des Ressources Aquacoles (RA),
- le Département "Valorisation des Produits" (VP),
- le Service d'économie Maritime (SEM).

## Station de La Tremblade

Le laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie (GAP) fait partie de la Direction des Ressources Vivantes. Il a été créé à la fin de l'année 1994, suite à une réorganisation de l'ancien laboratoire des Ressources Aquacoles de La Tremblade, puis remanié en 1996. Initialement composé de quatre unités de recherche :

- l'Unité de Recherche en Génétique (URGE),
- l'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (URAPC),
- l'Unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (URAPL),
- l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG),

le laboratoire est désormais éclaté en trois laboratoires distincts :

- le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP), sous la direction d'André GERARD,
- le laboratoire Régional Conchylicole de Poitou-Charentes (RCPC), sous la direction de Philippe GOULLETQUER,
- le laboratoire Régional Conchylicole des Pays de Loire (RCPL), sous la direction de Jean-Pierre BAUD.

Outre le développement de programmes thématiques spécifiques à la génétique et à la pathologie générale, l'association au sein d'un même laboratoire de pathologistes et de généticiens, relève de particularités des maladies infectieuses chez les invertébrés marins, et plus particulièrement des moyens de lutte contre ces dernières.

Les principaux objectifs du GAP, visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de:

- la pathologie :

Surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle, étude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par les mollusques dans certaines maladies.

- la génétique :

Obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions; création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques.



## Matériel de laboratoire

Le laboratoire GAP (Génétique Aquaculture et Pathologie) de la Tremblade est divisé en deux bâtiments principaux.

Le premier est réservé à la pathologie et est constitué de:

- 7 pièces réparties en salle des centrifugeuses, salle d'histologie, salle de préparation pour la microscopie électronique, salle de culture cellulaire, de bactériologie et d'électrophorèse enfin 2 salles pour la biologie moléculaire.
- 1 salle de manipulation de radioéléments.
- 1 salle climatisée pour le microscope électronique à transmission.
- 1 laboratoire photo, 1 salle de rangement, 1 laverie.
- 8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

Le deuxième bâtiment est réservé à la génétique et contient:

- 7 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Conservatoire de souche, Elevage larvaire, Physiologie, Manipulation des agents pathogènes des mollusques sans rejet en mer.
- 2 salles de production de phytoplancton et 1 laverie.-
- 1 laboratoire de biométrie et 1 salle informatique.
- 8 annexes techniques.

Il faut ajouter 4 bassins de 300 m<sup>3</sup> de réserve d'eau de mer, 23 pompes de 10 à 300 m<sup>3</sup>/h, de kilomètres de tuyauterie, une station de stérilisation au chlore des eaux de rejet, 4 bassins de 20 m<sup>3</sup> pour la production de phytoplancton.

Le matériel principal est constitué de:

- 9 microscopes dont 2 équipés en épifluorescence.
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers un ordinateur pour les mesures de croissance larvaire.
- 1 analyseur d'image SAMBA™ 2005 d'Alcatel TITN ANSWARE avec un logiciel pour la l'analyse de la ploïdie
- 1 dispositif vidéo couleur composé d'une caméra 3-CCD, d'un moniteur haute résolution, d'une imprimante vidéo couleur UP-5000, d'un enregistreur photo MAVICA et d'un magnétoscope médical SONY SVO-9500 MDP. Ce matériel permet entre autre l'archivage d'images comme des développements embryonnaires, des élevages larvaires...
- 1 congélateur -80°C.
- 1 étuve CO<sub>2</sub> FORMA SCIENTIFIC.

## B. Présentation du programme « GENEPHYS 1996-2000 ».

Ce programme établi sur une durée de 5 ans est coordonné par La Tremblade.

### \* Les intervenants français.

- IFREMER La Tremblade (GAP).
- IFREMER Bouin.
- IFREMER Brest.
- IFREMER Palavas.
- CREMA l'Houmeau.
- Laboratoire Génome et Population, Montpellier, CNRS.
- Observatoire Océanologique de Villefranche/mer, CNRS.

### \* Les intervenants étrangers.

- Institute of Marine Biology of Crete, Crète, Grèce.
- University College of Galway, Galway, Irlande.
- Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, Angleterre.

### \* Les objectifs.

Mettre en évidence, sur plusieurs générations, des relations entre certains caractères physiologiques comme la respiration, la digestion, l'excrétion et leurs bases génétiques (variabilité intra et inter-population).

### \* Les différentes étapes.

- Constitution de la  $G_0$

4 populations naturelles provenant de l'estuaire de la Seudre, du bassin d'Arcachon, de l'estuaire de la Charente et de la baie de Bonne Anse ont été recueillies. Elles constitueront la génération  $G_0$  de départ.

- Constitution de la  $G_1$  : le 15 avril 1996

A partir de la  $G_0$ , 5 mâles et 5 femelles par population seront tirés au sort pour être croisés avec les autres géniteurs selon tous les arrangements possibles. La génération  $G_1$  est donc obtenue avec 400 croisements (20 x 20). Pour conserver le maximum de variabilité, notamment au niveau croissance, plusieurs cohortes de fixation (pseudo-cohortes) seront effectuées afin de garder tous les individus avec leurs variations. On aura ainsi une tête et une queue de lot selon que les animaux sont précoces ou tardifs lors de la fixation.

- Constitution de la  $G_2$  : à partir du 10 avril 1997

On croise une des 4 populations  $G_1$  constituée de géniteurs sélectionnés (marqués) et non sélectionnés (non marqués) par un mâle ou une femelle testeur d'une autre population. Les individus sélectionnés de même sexe sont croisés par le même géniteur.



**MATERIELS  
ET  
METHODES**

## II. MATERIELS ET METHODES

### A. Matériel biologique.

#### 1. **Classification:**

Embranchement : Mollusques  
Classe : Bivalves Lamellibranches  
Ordre : Filibranches  
Sous-ordre : Anisomyaria  
Super-famille : Oestreioidae  
Famille : Oestreidae  
Genre : *Crassostrea*  
Espèce : *Gigas*

#### 2. **Biologie:**

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est une espèce vivant au niveau de l'infralittoral jusqu'à - 15 mètres, fixée sur des fonds meubles ou durs.

La fécondation est externe avec un mode de reproduction hermaphrodite alternatif, les animaux changeant de sexe d'une année sur l'autre.

Le nombre d'oeufs varie entre 20 millions et 100 millions par ponte.

Le premier stade larvaire est atteint après 6 à 8 heures, c'est la larve trochophore.

On parle ensuite de larve véligère (larve D) à 24 heures.

C'est au niveau du 20<sup>ième</sup> jour que l'on observe des tâches oculaires et un peu plus tard un pied, c'est le stade pédivéligère (apparition du pied pour la fixation).

La métamorphose suit la fixation et l'on parle de naissain après 1 ou 2 mois.

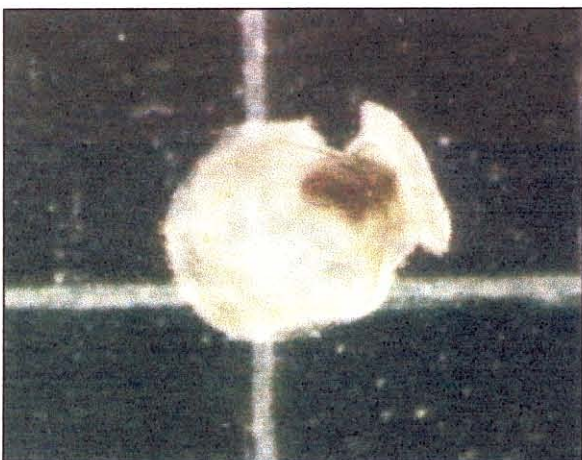




Larves véligères (larves D)



Larve pédivéligère



Larve fixée sur microbrisures

## B. Méthodes.

Après la perte de la première génération de G<sub>2</sub> de Bonne Anse infectées par l'Herpès virus, un vide sanitaire a été organisé afin de réduire au maximum les risques de contamination d'un élevage à l'autre. Ensuite, avant de relancer un deuxième élevage de G<sub>2</sub> de Bonne Anse, une population d'huîtres creuses d'Arcachon a été croisée pour vérifier que les conditions d'élevage ne posaient plus de problème.

Ce croisement a été appelé G<sub>2</sub> test Arcachon.

### 1. **Obtention de la G<sub>2</sub> test (Arcachon):**

#### \* Choix des géniteurs:

9 géniteurs marqués provenant de la population d'Arcachon sont croisés par deux testeurs mâle et femelle provenant de gisement naturel. En parallèle, 30 individus non marqués (non sélectionnés) sont également croisés par ces mêmes testeurs.

#### \* Croisement:

Après sexage des individus marqués, on a identifié 3 mâles et 6 femelles. Pour les 30 animaux non marqués la proportion de mâle et de femelle est respectivement de 14 et 15.

Il est à noter que l'on a rencontré un individu hermaphrodite. On procède ensuite à la scarification des gonades (stripping) sur tous les animaux sauf l'hermaphrodite qui n'a pas été utilisé dans le croisement pour des raisons évidentes de contrôle de la fécondation.

Un comptage des ovocytes et des spermatozoïdes est effectué sur des cellules de Malassez et de Thoma afin de déterminer le nombre de gamètes par millilitre (Annexe 1). On en déduit alors le nombre de millilitre qu'il faut utiliser par géniteur pour chaque fécondation. Chaque croisement est placé dans une cuve de 30 litres, les individus non marqués sont regroupés en 4 lots mâles et 4 lots femelles. Un croisement entre les deux testeurs est pratiqué pour vérifier le pouvoir fécondant des gamètes de chacun.

On aura au total 18 lots répartis de la manière suivante:

- 9 lots de géniteurs marqués (6 femelles + 3 mâles).
- 8 lots d'individus non marqués (4 femelles + 4 mâles).
- 1 lot testeur mâle par testeur femelle: TM x TF

	09C1	09A7	09F1	07G1	09G2	07E6	NS	NS	NS	NS
TM	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10

	09E4	09H5	07H4	NS	NS	NS	NS
TF	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14	Lot 15	Lot 16	Lot 17



## 2. Obtention de la G2 (Bonne Anse):

\* Choix des géniteurs:

24 individus marqués provenant de Bonne Anse et ayant été suivis régulièrement sont croisés par deux animaux testeurs prélevés sur un gisement naturel. De même 25 individus non sélectionnés sont croisés par les mêmes testeurs.

\* Croisement:

Une fois le sexage effectué on a identifié 13 mâles et 11 femelles parmi les individus marqués, 9 mâles et 16 femelles parmi les individus non marqués. De la même manière que pour la G<sub>2</sub> test on procède à la scarification, au comptage des ovocytes et des spermatozoïdes, puis à la fécondation en ne faisant qu'un lot de non sélectionnés mâles et un lot de non sélectionnées femelles.

Au total on a 26 lots répartis dans autant de 30 litres. Les différents lots sont les suivants:

- 24 lots de géniteurs marqués (13 mâles + 11 femelles).
- 2 lots d'individus non sélectionnés (1 mâle + 1 femelle).

	13D6	13E6	13F4	14A4	14F7	14G3	15A5	15A8	15G5	15B7	15B8	15G3	17B8	NS
TM	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14

	13H7	13G4	15C5	15B1	13H2	15E1	13H8	15G6	13E7	14G5	14F8	NS
TF	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12

## 3. Elevage larvaire:

Les lots sont donc dans des jarres de 30 litres contenant de l'eau de mer filtrée à 2µm, situées dans une pièce à température régulée, la salinité est également contrôlée et un bullage est mis en place dans chaque cuve. La nourriture quotidienne est constituée d'algues phytoplanctoniques (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*).

Toutes les 48 heures une filtration sur des tamis adéquats est effectuée afin de recueillir les larves pour les dénombrer et les mesurer. Trois prélèvements de 100µl déposés sur une cellule quadrillée sont suffisants pour l'observation du niveau de développement et de l'état de santé des larves. Après avoir formolé les 3 échantillons, l'estimation du nombre de larves est réalisée en faisant la moyenne du nombre de larves obtenu dans chaque prélèvement de 100 µl. Le nombre d'individus obtenus par goutte est ensuite rapporté au volume dans lequel se trouve l'ensemble des larves. On a ainsi une bonne évaluation de la quantité de larves dans chaque lot.

Les mesures se font ensuite au projecteur de profil relié au logiciel Quattro Pro. 30 larves sont mesurées pour obtenir une bonne estimation de la moyenne et de l'écart type. On note ainsi tous les 2 jours la croissance moyenne de chaque lot avec une augmentation de la taille en µ/jour.

#### 4. **Fixation:**

A partir du 20<sup>ième</sup> jour environ, les larves commencent à être oeillées et à rechercher un lieu de fixation pour la métamorphose (larves pédivéligères). Elles sont alors transférées dans des tamis de 150 $\mu$ m avec de la microbrisure pour permettre aux animaux de se fixer.

On met un maximum de 50.000 individus par tamis afin d'éviter les problèmes de densité.

Le diamètre des mailles est ensuite augmenté au fur et à mesure de la croissance.





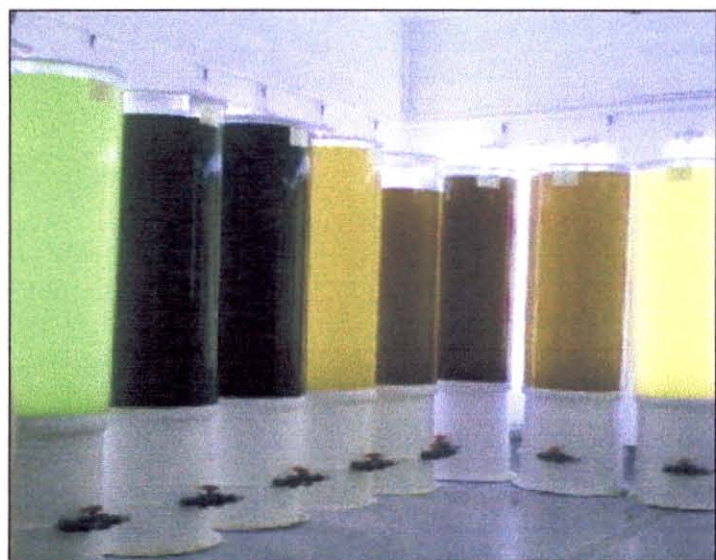
Projecteur de profil V-2A NIKON



Dispositif vidéo couleur.

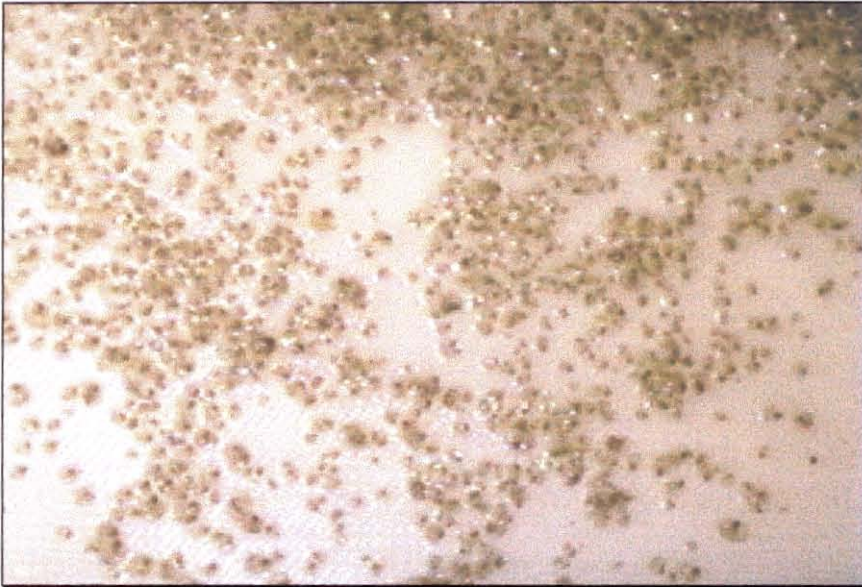


Salle d'élevage larvaire.



Salle de Phytoplancton.





Fixation sur tamis  
de 350 µm.



Larves sur tamis (1 à 2 mm.)

## RESULTATS



### III. RESULTATS

#### A. Croisements.

##### 1. **G<sub>2</sub> test (Arcachon):**

Le tableau représente le croisement des individus sélectionnés (marqués) et des individus non sélectionnés (NS) avec le testeur mâle (M) et le testeur femelle (F).

Lot numéro	Géniteurs	Testeurs
1	09C1	M
2	09A7	M
3	09F1	M
4	07G1	M
5	09G2	M
6	07E6	M
7	09E4	F
8	09H5	F
9	07H4	F
10	NS	F
11	NS	F
12	NS	F
13	NS	F
14	NS	M
15	NS	M
16	NS	M
17	NS	M
18	Testeur M	Testeur F

## 2. G<sub>2</sub> (Bonne Anse):

Le tableau ci-dessous représente le croisement des 24 individus sélectionnés par les testeurs mâle (M) et femelle (F) ainsi que les animaux non sélectionnés (NS) croisés par ces mêmes testeurs.

Lot numéro	Géniteurs	Testeurs
1	13D6	M
2	13E6	M
3	13F4	M
4	14A4	M
5	14F7	M
6	14G3	M
7	15A5	M
8	15A8	M
9	15G5	M
10	15B7	M
11	15B8	M
12	15G3	M
13	17B8	M
14	13H7	F
15	13G4	F
16	15C5	F
17	15B1	F
18	13H2	F
19	15E1	F
20	13H8	F
21	15G6	F
22	13E7	F
23	14G5	F
24	14F8	F
25	NS	F
26	NS	M



### 3. **Comptage des gamètes:**

Grâce à l'analyseur d'image SAMBA™ 2005 d'Alcatel TITN ANSWARE et le logiciel de traitement des données, un comptage des gamètes est possible.

On peut ainsi déterminer le nombre d'ovocytes sur une cellule de Malassez et de spermatozoïdes sur une cellule de Thoma. Ensuite, on calculera la quantité qu'il faut utiliser pour avoir le même nombre de gamètes pour chaque géniteur.

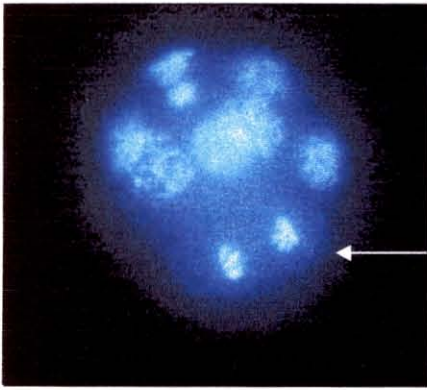
Pour le croisement de la génération G<sub>2</sub> d'Arcachon on a utilisé un maximum de 1.100.000 ovocytes et 110.000.000 de spermatozoïdes. En ce qui concerne la génération G<sub>2</sub> de Bonne Anse la quantité de gamètes s'élevait à 2.000.000 d'ovocytes et 200.000.000 de spermatozoïdes. La proportion d'un ovocyte pour 100 spermatozoïdes assure une bonne capacité de fécondation.

#### B. **Evaluation du taux de fécondation.**

Grâce aux prélèvements effectués 4 heures après la fécondation, la détermination du pourcentage d'oeufs fécondés va pouvoir se faire.

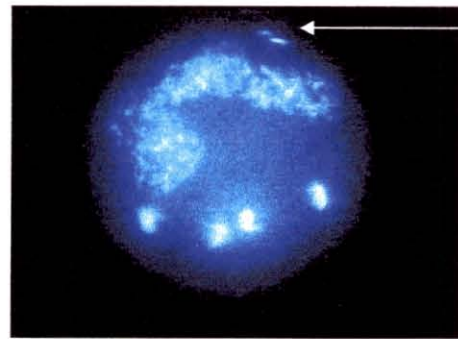
Pour cela les cellules sont colorées au Hoeschst et on les visualise au microscope à épifluorescence (Annexe 2). Le taux de fécondation correspond au nombre de cellules fécondées et développées sur 100 cellules observées.

Les photographies de la page suivante représentent des ovocytes aux différents stades: fécondés, non fécondés et fécondés mais non développés.



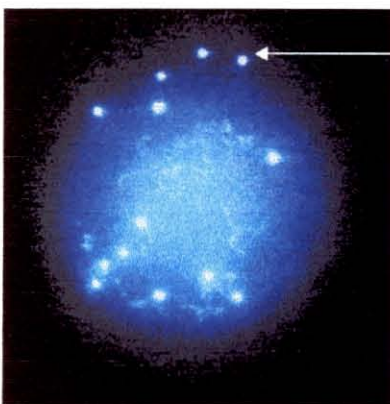
Cellules en division

**Ovocyte fécondé et développé**  
(grossissement x4000)



Globule polaire

**Ovocyte fécondé mais non développé**  
(grossissement x4000)



Spermatozoïdes

**Ovocyte non fécondé**  
(grossissement x 4000)



Voici les tableaux représentant les taux de fécondation pour les deux générations de  $G_2$ .

1. **Génération  $G_2$  d'Arcachon:**

Lot numéro	Géniteurs	% de fécondation
1	09C1	90
2	09A7	86
3	09F1	97
4	07G1	98
5	09G2	88
6	07E6	92
7	09E4	90
8	09H5	92
9	07H4	56
10	NS	0
11	NS	0
12	NS	0
13	NS	0
14	NS	95
15	NS	0
16	NS	0
17	NS	0
18	Testeur M	96

On remarque tout de suite l'absence de fécondation dans les lots impliquant les individus NS qu'il soient mâles ou femelles, sauf le lot 14 qui a un taux de fécondation très important. Pour le reste des lots, les pourcentages sont très satisfaisants.

## 2. Génération G<sub>2</sub> de Bonne Anse:

Lot numéro	Géniteurs	% de fécondation
1	13D6	90
2	13E6	98
3	13F4	94
4	14A4	91
5	14F7	90
6	14G3	89
7	15A5	98
8	15A8	88
9	15G5	99
10	15B7	89
11	15B8	95
12	15G3	93
13	17B8	87
14	13H7	94
15	13G4	97
16	15C5	97
17	15B1	96
18	13H2	82
19	15E1	86
20	13H8	94
21	15G6	88
22	13E7	86
23	14G5	98
24	14F8	96
25	NS	96
26	NS	87

Le taux de fécondation de l'ensemble des lots est supérieur à 80%. La fécondation s'est déroulée sans problème apparent.



### C. Evaluation du pourcentage d'éclosion.

Le pourcentage d'éclosion correspond au nombre de larves normales à J1 sur le nombre d'ovocyte au départ (1.500.000). On a ainsi les tableaux suivant pour chaque génération G<sub>2</sub> d'Arcachon et de Bonne Anse.

#### 1. **Génération G<sub>2</sub> d'Arcachon:**

Lot numéro	Géniteurs	Nombre Ovocytes	Nombre de Larves à J1	% d'éclosion
1	09C1	1100000	396600	36
2	09A7	1100000	662500	60
3	09F1	1100000	500000	45
4	07G1	1100000	700000	64
5	09G2	1100000	478000	43
6	07E6	1100000	338000	31
7	09E4	1100000	325000	30
8	09H5	1100000	188300	17
9	07H4	1100000	rares	
10	NS	1100000	0	0
11	NS	1100000	0	0
12	NS	1100000	0	0
13	NS	1100000	0	0
14	NS	1100000	196000	18
15	NS	1100000	0	0
16	NS	1100000	0	0
17	NS	1100000	0	0
18	T M	1100000	200000	18

Mis à part les lots où il n'y a pas eu de fécondation, on peut estimer que le taux d'éclosion est suffisant pour la suite de l'étude.

2. **Génération G<sub>2</sub> de Bonne Anse:**

Lot numéro	Géniteurs	Nombre Ovocytes	Nombre de larves à J1	% d'éclosion
1	13D6	2000000	945000	47
2	13E6	2000000	805000	40
3	13F4	2000000	600000	30
4	14A4	2000000	1275000	64
5	14F7	2000000	1250000	63
6	14G3	2000000	1450000	73
7	15A5	2000000	2000000	100
8	15A8	2000000	1320000	66
9	15G5	2000000	2000000	100
10	15B7	2000000	1095000	55
11	15B8	2000000	850000	43
12	15G3	2000000	1700000	85
13	17B8	2000000	1355000	68
14	13H7	2000000	1230000	62
15	13G4	2000000	1100000	55
16	15C5	2000000	875000	44
17	15B1	2000000	1000000	50
18	13H2	2000000	1380000	69
19	15E1	2000000	1410000	71
20	13H8	2000000	1310000	66
21	15G6	2000000	1300000	65
22	13E7	2000000	1200000	60
23	14G5	2000000	1180000	59
24	14F8	2000000	1155000	58
25	NS	2000000	1105000	55
26	NS	2000000	1330000	67

Dans cette génération, le pourcentage d'éclosion est nettement supérieur à celui d'Arcachon.



D. Suivi de croissance des deux générations de G<sub>2</sub>.

1. **G<sub>2</sub> d'Arcachon:**

Lot N°	Géniteurs	J 1	J 4	J 6	J 8	J 11	J 13	J 15	J 18	J 20	J 22	J 25
1	09C1	74	85	95	rare		168		190	260	300	
2	09A7	74	90	95	114	151	181	192	228	234	260	274
3	09F1	74	82	90	rare			150	250		240	
4	07G1	76	90	96	115	139	159	178	204	208	240	272
5	09G2	75	92	97	113	153	175	188	234	264	276	262
6	07E6	74	91	101	119	156	181	194	231	223	249	272
7	09E4	75	93	99	117	162	183	202	238	248	281	282
8	09H5	75	90	98	121	161	179	202	263	282	300	305
9	07H4	rare			rare							
14	NS	68	86	106	103	1650	178	198	250	267	281	291
15	T M x T F		83	102	102	125	149	200	190	240	300	

Le lot 18 étant renommé lot 15

2. **G<sub>2</sub> de Bonne Anse:**

Lot N°	Géniteurs	J 2	J 5	J 7	J 9	J 12	J 14	J 16	J 19	J 21	J 23
1	13D6	70	83	93	104	156	190	229	270	272	310
2	13E6	73	85	90	94	141	154	164	200	290	307
3	13F4	71	81	93	94	153	166				
4	14A4	71	83	91	94	130					
5	14F7	76	81								
6	14G3	72	84	93	95	120					
7	15A5	72	89	103	112	147	161				
8	15A8	72	88	101	114	132					
9	15G5	72	87	95	111	169	164				
10	15B7	71	84	94	104	161	135				
11	15B8	70	82	88	100	140	150				
12	15G3	72	86	93	99	165	157				
13	17B8	72	81	98	86	109	152	172			
14	13H7	75	93	110	126	179	166				
15	13G4	73	89	105	122	164	155				
16	15C5	76	93	109	119	168	173	185			
17	15B1	74	90	104	110						
18	13H2	73	93	108	125	174	187				
19	15E1	75	95	103	122	162	164				
20	13H8	74	92	103	121	168	172	179	210	254	290
21	15G6	76	93	111	125	163					
22	13E7	75	94	102	131	169	163				
23	14G5	75	93	103	123	179	191				
24	14F8	75	91	103	120	166	179				
25	NS	75	90	106	120	179	168				
26	NS	71	84	93	104	175	193	205	250	290	314

E. Cinétiques de croissance.

1. **Croissance moyenne de la G<sub>2</sub> d’Arcachon:**

Graphique 1

2. **Croissance moyenne de la G<sub>2</sub> de Bonne Anse:**

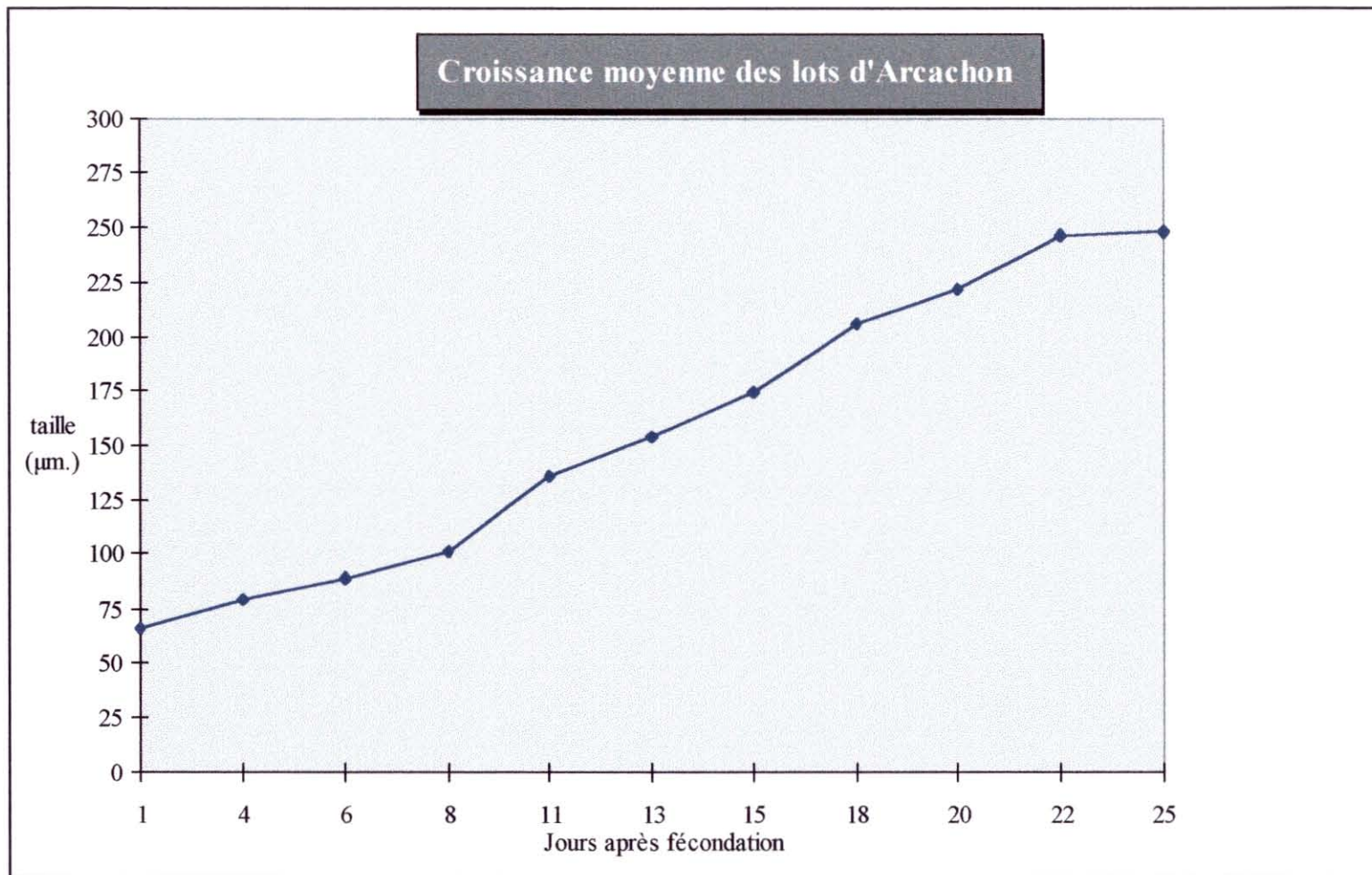
Graphique 2

3. **Cinétique de croissance des lots d’Arcachon:**

Graphique 3

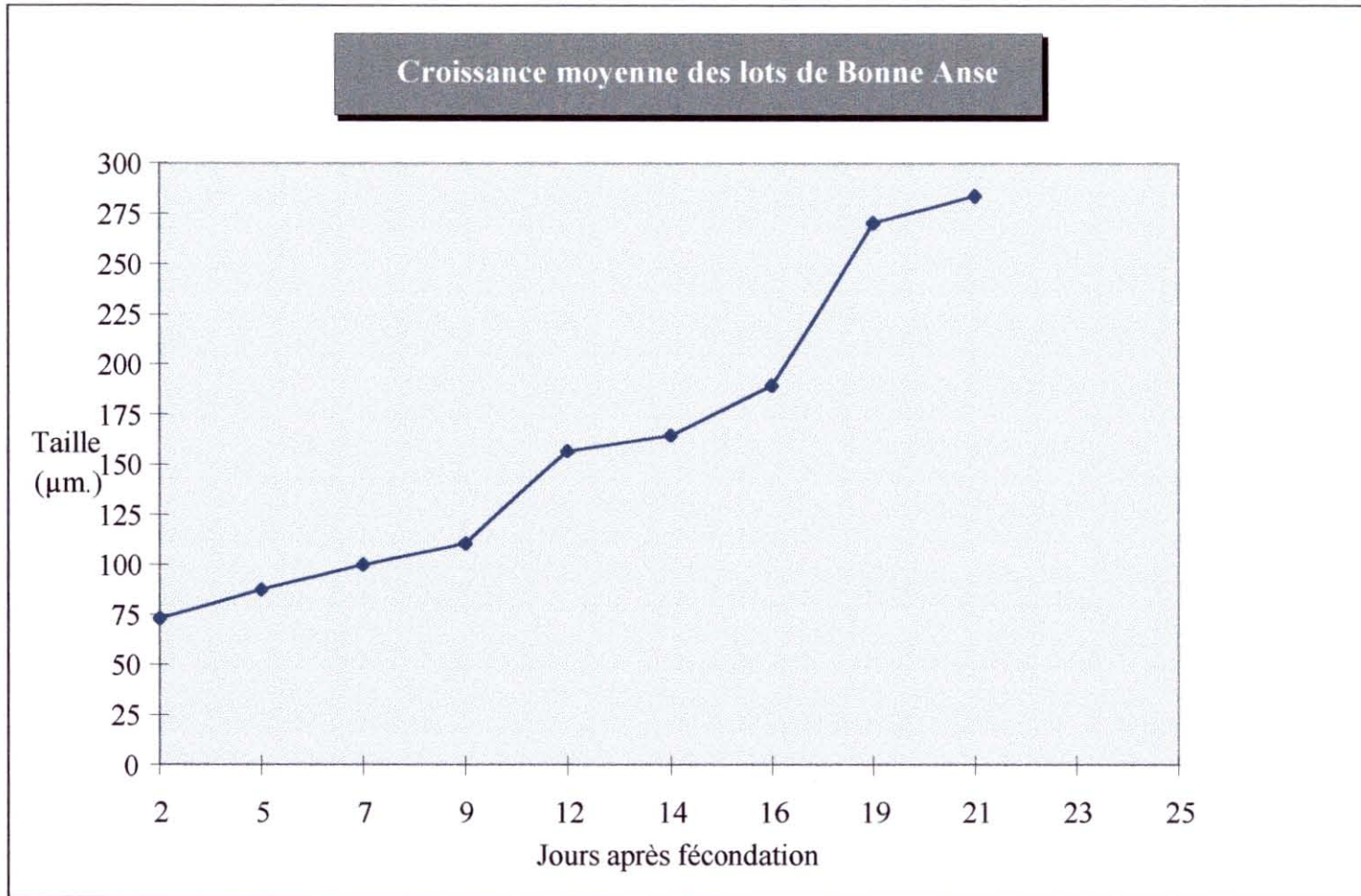
4. **Cinétique de croissance des lots de Bonne Anse:**

Graphique 4

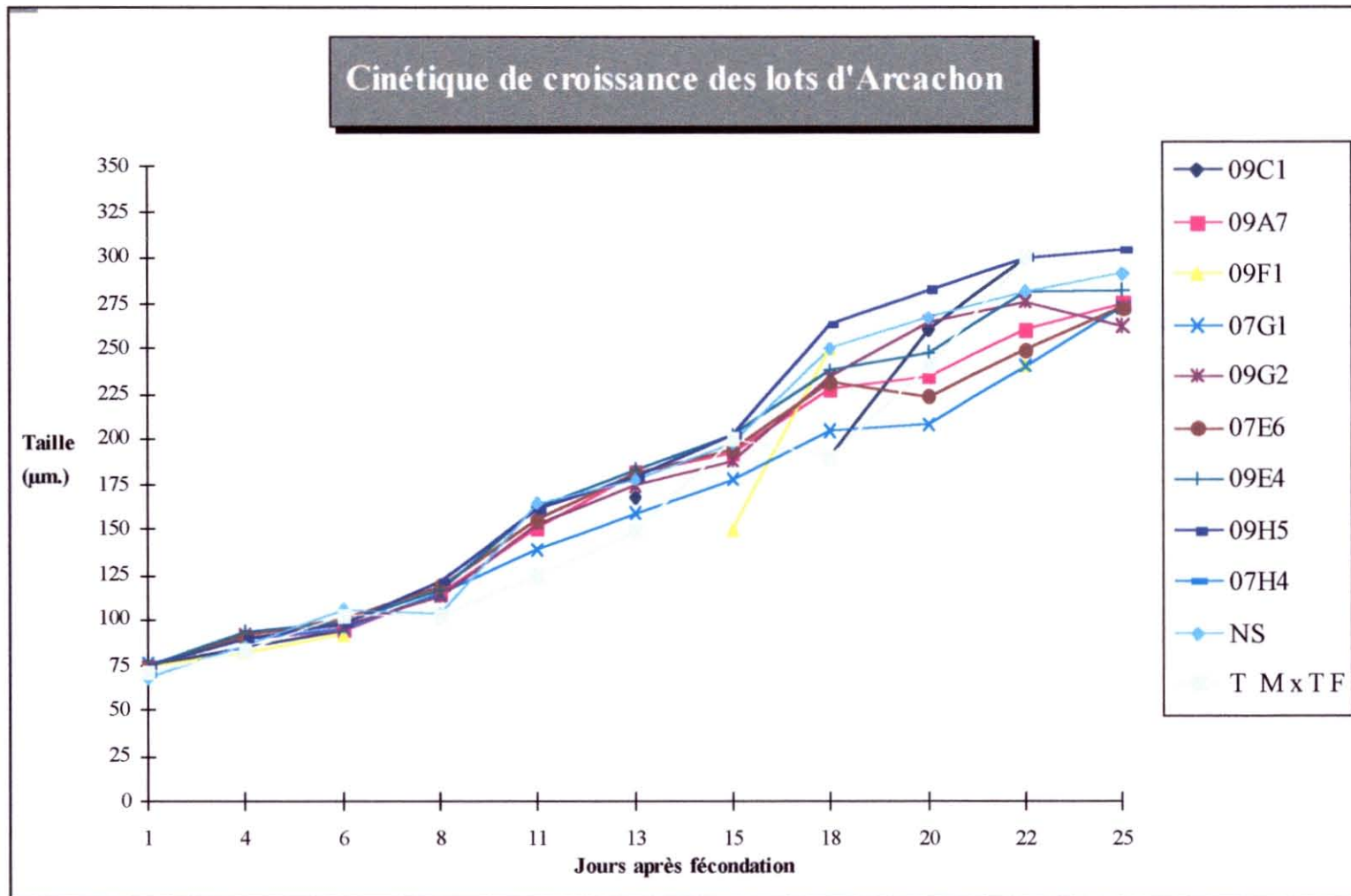


Graphique 1

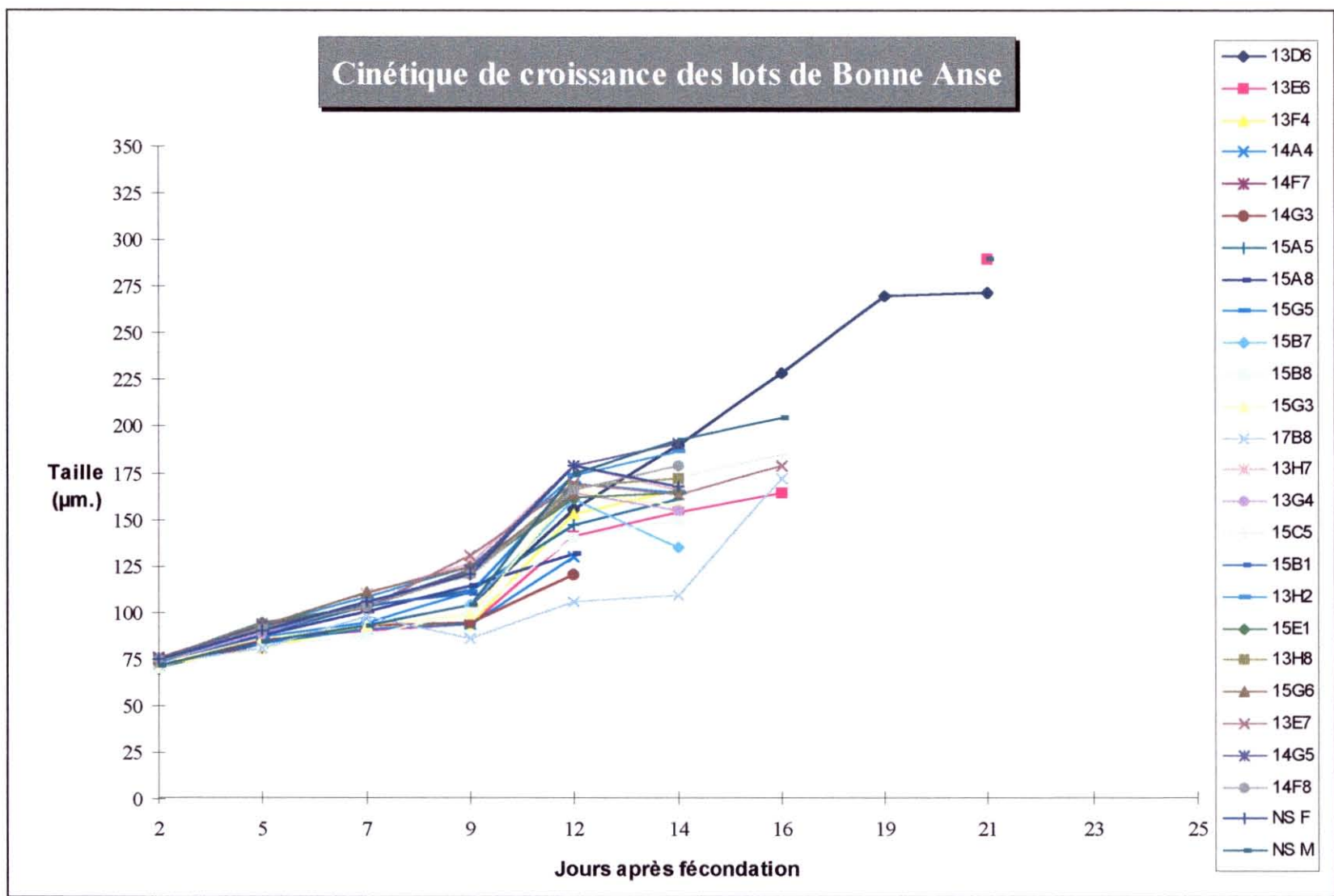




Graphique 2



Graphique 3



Graphique 4



## F. Problèmes sanitaires liés essentiellement au virus de type Herpès

Des mortalités successives durant toutes les tentatives d'élevage larvaires n'ont pas permis une étude approfondie et un suivi rigoureux des différents lots ainsi que de leur relation avec les géniteurs.

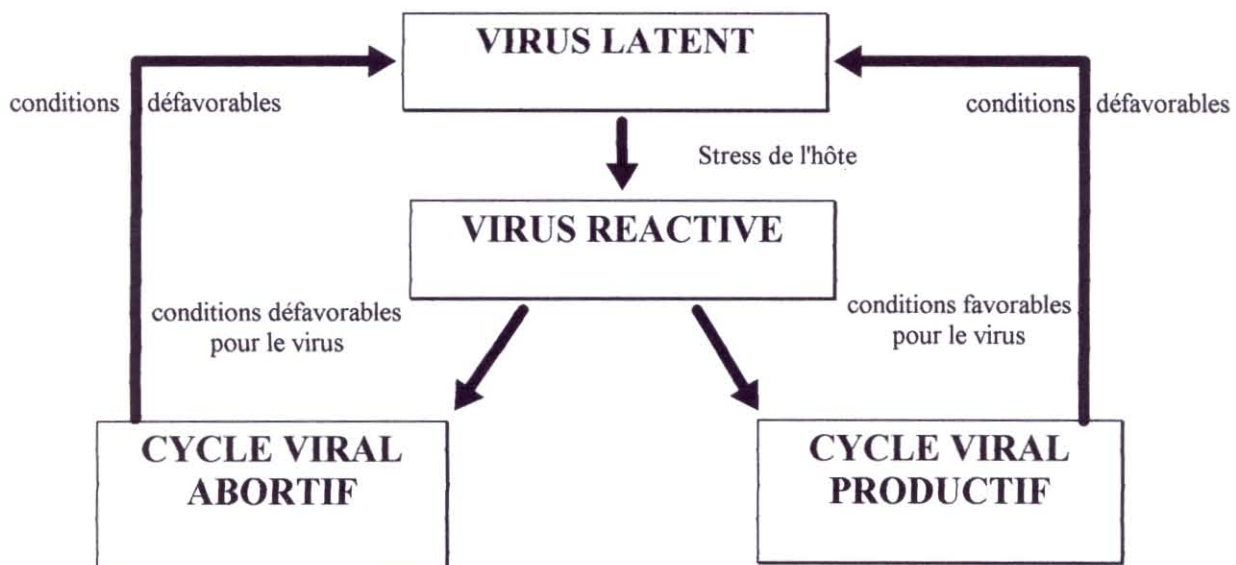
La cause principale semble être le virus de type Herpès (Comps, M. et Duthoit, J.L., 1979.). En effet, la plupart des échantillons de larves a été diagnostiqué comme porteur de l'Herpès virus par l'équipe de pathologistes.

Il existe plus de 80 virus apparentés aux Herpesviridae. De nombreuses espèces animales sont infectées, des mollusques bivalves marins à l'homme.

On considère trois sous-familles d'Herpesviridae selon leurs propriétés biologiques: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae et Gammaherpesvirinae.

### 1. **Structure commune aux Herpesviridae:**

- Le nucléoïde:  
correspond à l'assemblage de l'ADN viral et de protéines.  
L'ADN est double brin et linéaire, sa taille est comprise entre 120kb et 220kb.
- La capside:  
contient le nucléoïde. Elle est constituée de 162 capsomères et présente une symétrie isocaédrique.
- Le tégment:  
correspond à la structure fibreuse située entre la capside et l'enveloppe.
- L'enveloppe:  
indispensable à l'infectuosité des particules virales, elle confère une morphologie sphérique et dérive de membranes cellulaires modifiées par l'insertion de protéines virales ainsi que de lipides.



Les virus de la famille des herpesviridae ont la capacité de persister sous forme latente pendant toute la vie de l'hôte.

Il y a alors absence de production de particules virales par ce dernier et l'ADN viral est soit intégré au génome de la cellule hôte, soit présent sous formes circulaires libres dans le noyau. Le virus peut être réactivé sous l'effet d'un stress ou suite à l'action de composés chimiques, d'hormones ou des molécules biologiques.

## 2. **Cycle viral des Herpesviridae:**

### a) *Entrée du virus dans la cellule:*

Attachement virus-récepteurs cellulaires, suivi d'une fusion des membranes cellulaires et virales. Ceci permet l'entrée des nucléocapsides dans le cytoplasme puis le transport jusqu'aux pores nucléaires, l'ADN viral pénètre dans le noyau par phénomènes actifs.

### b) *Synthèses virales:*

Transcription de l'ADN viral dans le noyau par l'ARN polymérase II, synthèse de protéines virales à partir d'ADN viraux dans le cytoplasme de la cellule hôte. Expression des gènes viraux en cascade, réplication précoce de l'ADN viral dans le noyau des cellules infectées.

### c) *Assemblage et libération des particules filles:*

Assemblage et accumulation des capsides dans le noyau. Encapsidation de l'ADN dans le noyau, attachement des nucléocapsides à des zones particulières de la surface interne de la membrane interne du noyau. Passage dans le cytoplasme. Libération des particules à partir de la cellule infectée.

## 3. **Aspects épidémiologiques:**

Chez les mollusques bivalves marins, plusieurs cas d'infection par des virus de type Herpès ont été observés sur des adultes de *Crassostrea virginica* (Farley *et al.*, 1972), sur des larves et du naissain de *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*. Il est difficile d'affirmer qu'il ne s'agit que d'un seul et même virus.

Les mortalités massives et brutales de larves et de naissain apparaissent pendant les périodes chaudes de l'année ou en eau chauffée (23-27°C) (Le Deuff *et al.*, 1996).

Il a été démontré qu'il existait bien une transmission horizontale d'une part entre larves de *Crassostrea gigas* et d'autre part entre larves de *Crassostrea gigas* et d'*Ostrea edulis* (Le Deuff *et al.*, 1996).

L'existence d'une transmission verticale est fortement suspectée (Le Deuff *et al.*, 1996).

#### 4. **Symptômes et lésions:**

Les larves virosées cessent de se nourrir et de nager, des mortalités significatives sont observées au 6<sup>ème</sup> jour après la ponte. 100% de mortalité sont généralement atteints entre le 8<sup>ème</sup> jour et le 10<sup>ème</sup> jour, voire dès le 4<sup>ème</sup> jour.

Les larves présentent d'importantes lésions du vélum qui apparaît nécrosé sur un grand nombre d'individus, des cellules hypertrophiées se détachent des animaux.

Les lésions sont principalement localisées au niveau du tissu conjonctif et plus rarement au niveau de l'épithélium du vélum et du manteau.

#### 5. **Diagnostic:**

La difficulté de l'étude de ce virus réside dans l'impossibilité de le cultiver in vitro.

En effet, aucune lignée de mollusques bivalves n'est aujourd'hui disponible. De plus les Herpesviridae peuvent exister sous diverses formes dans la cellule hôte: forme latente, peu productive, infection aiguë.

Le diagnostic de l'infection à herpès virus chez l'huître repose sur la microscopie électronique à transmission et sur la PCR en utilisant des sondes nucléiques spécifiques. Il a été mis au point par l'équipe de pathologistes de La Tremblade (Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T. et Cochenec, N., 1994).



INTERPRETATION  
ET  
DISCUSSION



#### IV. INTERPRETATION ET DISCUSSION

L'étude s'est portée exclusivement sur la génération  $G_2$  d'Arcachon, les individus de Bonne Anse étant presque tous morts avant la fixation.

Dès J1 on a constaté l'absence de larves dans les 4 lots de 30 litres correspondant aux croisements Testeur Femelle (TF) par Mâle non sélectionnés (NS).

Le problème se situe donc au niveau de la fécondation. Le testeur femelle ne peut être mis en cause car le taux de fécondation et le pourcentage d'éclosion sont normaux pour les lots 7, 8 et 9 avec le même testeur. Un très faible pouvoir fécondant des différents mâles utilisés pour les croisements peut être à l'origine de ce problème, mais il est peu probable que parmi les 25 individus utilisés il n'y en ait pas un qui féconde les ovocytes. Cependant, on admet en général que tous les parents ne produisent pas la même quantité de gamètes et tous les mâles n'ont pas les mêmes pouvoirs fécondants (Gaffney, 1991). Malgré cela, l'erreur de manipulation est l'hypothèse la plus vraisemblable d'autant plus qu'aucun oeuf même non fécondé n'a été retrouvé après le premier jour d'élevage. En règle générale une filtration sur  $45\mu\text{m}$  permet de garder tous les ovocytes.

L'autre problème a été la perte de trois des quatre lots contenant les oeufs des femelles NS (lots 15, 16 et 17). Cette fois-ci la cause de cette mortalité n'est pas évidente car les quatre lots sont identiques au point de vue croisement, et ni le Testeur Mâle (TM) ni les différentes femelles utilisées ne peuvent être mis en cause. En effet le pouvoir fécondant du mâle apparaît satisfaisant au niveau des femelles sélectionnées et le pool d'ovocytes des femelles non sélectionnées utilisées pour cette fécondation ne pose pas de problème pour le seul lot viable (lot 14).

A cause de ces deux résultats, une étude comparative entre individus suivis (marqués) et individus non sélectionnés n'est plus possible, la plupart des témoins étant morts.

L'intérêt principal réside dans l'élaboration de familles de pleins frères que seront les lots 1 à 9. Deux individus pleins frères ont même origine parentale, ils pourront donc être utilisés comme base pour des croisements ultérieurs.

Cependant il reste le suivi de croissance de ces différents lots.

On note en premier lieu que la courbe exprimant la croissance moyenne des lots a une allure assez caractéristique que l'on retrouve sur celle de Bonne Anse (Graphiques 1 et 2). Cette courbe sigmoïde démarre avec une pente qui reste constante jusqu'à J8 ou J9, puis la croissance s'accélère jusqu'à J19 pour retrouver un plateau qui annonce l'approche de la fixation.

Sur le Graphique 3 illustrant la croissance comparée des individus d'Arcachon, on remarque une certaine homogénéité en taille jusqu'à J8. Puis des écarts de croissance sont visibles surtout à partir du 15<sup>ème</sup> jour après fécondation, les tailles variant de  $175\mu\text{m}$  à  $200\mu\text{m}$ . C'est le cas pour les lots 8 (09H5 x TF) et 14 (NS x TM) où les larves ont des tailles supérieures à la moyenne. Au contraire, dans le lot 4 (07G1 x TM) la croissance des individus est plus faible jusqu'à la fixation. Les métabolismes étant très différents entre mâles et femelles, la comparaison entre ces deux parents (09H5 et 07G1) n'est pas possible, on ne peut donc rien en conclure sur cette différence de cinétique de croissance. Il faut pour cela isoler deux courbes de croissance d'individus de même sexe. Comme il ne reste plus que 2 descendance issues de mâles marqués, il est plus facile de comparer 2 des 6 lots issus de femelles marquées et présentes jusqu'à la fixation. Or il existe une différence de taille à partir de J8 entre les larves des lots 4 et 5.

En effet, les larves issues de la femelle 09G2 sont en moyenne plus grandes que celles de la femelle 07G1. On peut alors émettre l'hypothèse que cette différence dans la cinétique de croissance entre ces larves est due à la variabilité des capacités de croissance des géniteurs et de leurs potentiels



On peut alors émettre l'hypothèse que cette différence dans la cinétique de croissance entre ces larves est due à la variabilité des capacités de croissance des géniteurs et de leurs potentiels génétiques.

Il ne faut cependant pas oublier qu'entre aussi en compte l'état de maturation de la gonade de chaque femelle, c'est-à-dire la qualité des ses ovocytes ainsi que de ses réserves glucidiques. De plus, si l'on compare cette cinétique de croissance avec celle des géniteurs (Annexe 3), on ne remarque pas de relation. Au contraire, en ce qui concerne les mâles 09H5 et 09E4, on observe une grande différence de croissance en faveur du premier (en poids total) alors que cette différence ne se retrouve pas au niveau de leurs larves (en longueur). C'est donc après la fixation que doit se faire cet écart, les animaux n'ayant sans doute pas les mêmes métabolismes ou ne monopolisant pas les mêmes réserves en même temps.

L'autre possibilité qu'il ne faut pas négliger est la différence qu'il peut exister entre les bacs. Ce phénomène appelé « effet jarre » met en cause le bac en lui-même avec toute son installation et non les larves qui s'y trouvent.

Plusieurs hypothèses peuvent être mises en avant pour tenter de comprendre pourquoi le système d'élevage peut être à l'origine de ces différences.

Tout d'abord le principal problème semble se situer au niveau du comptage des larves.

En effet les erreurs engendrées ne sont pas négligeables et il s'en suit une variation du nombre d'individus qui peut être importante, surtout après la dilution entre le bécher d'un litre contenant l'ensemble des larves et les trois dépôts de 100µl nécessaires au comptage.

L'erreur se situe donc sur le nombre réel de larves présentes dans chaque bac d'élevage.

Il faut ensuite parler de la nourriture qui est distribuée quotidiennement et dont la quantité est fonction du volume des bacs. Une surestimation du nombre d'individus dans un 30 litres peut augmenter la charge en phytoplancton en ainsi privilégier le développement de bactéries et autres ciliés. Une autre différence qui peut entrer en compte entre les bacs est le bullage avec un brassage qui peut être moins uniforme dans l'un ou l'autre.

Il faut ajouter que ce type même d'élevage qui consiste, par un passage moins rapide au tamis supérieur, à garder le maximum d'individus afin d'avoir le plus d'hétérogénéité possible à l'intérieur des lots ne favorise pas la salubrité des lots.

On a ensuite une différence de densité dans chaque bac de 30 litres, différence qui est non seulement due à l'erreur lors du comptage mais aussi lors du rééquilibrage à J1 pour garder une certaine homogénéité dans la quantité de larves. De plus, les mortalités qui se produisent pendant toute la durée de l'élevage larvaire ne font qu'augmenter les différences de densité entre les lots. En fin d'élevage on a des lots avec 150.000 animaux et d'autres avec seulement 1000, le tout dans le même volume. Ceci peut donc expliquer en partie les écarts de taille entre les lots.

Cependant on se rend aussi compte que si la densité est plus forte dans certains bacs c'est sans doute que les animaux y sont plus performants et plus résistants, ce qui est dû au patrimoine génétique hérité des parents. Donc certaines femelles et certains mâles sélectionnés ont un meilleur potentiel de croissance et sont moins affectés par la densité et les problèmes qui en découlent.

L'autre facteur qui peut être mis en évidence sur les courbes de cinétique de croissance est ce que l'on pourrait appeler " l'effet week-end ". Il est évident que la manipulation des larves tous les 48 heures pour le comptage et les mesures est une obligation pour un suivi rigoureux et une bonne estimation de la croissance. Cependant, le fait que les animaux soient filtrés puis remis en eau après une période plus ou moins longue dans un bécher ne peut qu'augmenter les risques de stress et donc réduire la croissance des larves.



Or l'élevage larvaire se faisant les Lundi, Mercredi et Vendredi, durant les week-end les animaux restent 24 heures de plus sans être manipulés. Sur les courbes de croissance moyenne des lots d'Arcachon et de Bonne Anse, on note que c'est justement après ces périodes que les pentes augmentent, donc que les croissances s'accélèrent. C'est le cas pour Arcachon entre J8 et J11 et entre J15 et J18 et pour Bonne Anse entre J9 et J12, entre J16 et J19. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait élever en parallèle des lots en conditions "normales" et des lots filtrés toutes les 48 heures, dimanches inclus, en décalant ensuite d'un jour par semaine ( Dimanche, Mardi, Jeudi, Samedi, Lundi...).

**CONCLUSION  
ET  
BILAN PERSONNEL**

## V. CONCLUSION ET BILAN PERSONNEL

Le croisement consistait, à travers le programme européen « GENNEPHYS 1996-2000 », à obtenir une nouvelle génération  $G_2$  d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* à partir de la première génération  $G_1$ . Le principal but étant d'étudier les relations pouvant exister entre la croissance des descendants et les caractéristiques génétiques des parents.

Or le croisement impliquant les individus de Bonne Anse n'a pu être mis en fixation.

En effet la cause principale étant un virus de type Herpès.

Les seules larves fixées sont celles d'Arcachon. Elles pourront être utilisées comme pleins frères pour des croisements ultérieurs. Ceci représentait en effet une partie des buts prédéfinis et permettra ainsi la poursuite du programme.

A la suite des mortalités enregistrées lors de l'élevage des  $G_2$  de Bonne Anse, un autre vide sanitaire a été mis en place. Ces pertes massives ont néanmoins permis d'apprécier la relative difficulté pour amener un élevage larvaire jusqu'à la fixation, surtout durant l'été.

Une restructuration de la salle d'élevage larvaire a été décidée et sera mise en oeuvre prochainement afin d'en améliorer l'état sanitaire.

Il a été décidé de renouveler la génération  $G_1$  en partant d'un croisement entre des animaux provenant d'un gisement naturel situé au Vieux Boucau.

Ainsi on minimise les risques de contamination par l'Herpès virus. En effet les animaux élevés dans les parcs conchylicoles ont plus tendance à être porteurs de ce virus.

Ce croisement a donc eu lieu le 17 juillet 1997 et le début de la fixation le 4 Août 1997.

Le bilan personnel est quant à lui très positif puisque ce stage m'a permis de suivre un élevage larvaire de mollusques de la fécondation jusqu'à sa fixation.

Je me suis familiarisé avec les différentes techniques utilisées en éclosion, que ce soit la maturation des huîtres, la reproduction par scarification des gonades, la filtration par tamisage et le suivi du naissain.

De plus j'ai pris conscience des nombreux écueils à éviter en zootechnie.

Je me suis perfectionné dans l'utilisation de logiciels comme Word 6.0, Excel 5.0, Quattro Pro 5.0, ainsi que des méthodes de traitement d'image.

J'ajouterai que j'ai découvert le travail en équipe et profité des connaissances de chacun en essayant de m'intégrer le plus souvent possible aux différents programmes en cours.

Ce fut le cas notamment pour:

- la constitution de la nouvelle génération  $G_0$  du programme « Genephys »,
- la production d'huîtres triploïdes,
- l'essai d'obtention d'huîtres tétraploïdes,
- les croisements intra et interspécifiques du conservatoire de souches.



REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMKEWICZ**, L.S., Taub, R. and Wall, J.R., 1984a. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. I. Mendelian inheritance of allozyme variation. *Biochemical Genetics*, 212 (3/4): 215-219.
- ADAMKEWICZ**, L.S., Taub, R. and Wall, J.R., 1984a. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacologia*, 25 (2) : 525-533.
- BARBIN**, V., Schein, E., Roux, M., Decrouez, D., Ramseyer, K., 1991. Stries de croissance révélées par cathodoluminescence dans la coquille de *Pecten maximus* (L.) récent de la rade de Brest (Pectinidae, Bivalvia). *Geobios*, 24 (1) : 65-70.
- BARNABE**, G., 1986. Aquaculture, volume 1. Lavoisier. 1115 pp.
- BAUD**, J.P. et al. 1991 Adaptation de la technique du télécapage de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) aux conditions d'élevage de la baie de Bourgneuf. Rapport interne IFREMER.
- BUROKER**, N.E., 1984. Gene flow in mainland and insular populations of *Crassostrea gigas* (Mollusca). *Biological bulletin*, 166 : 550-557.
- COMPS**, M. et Duthoit, J.L., 1979. Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *Crassostrea gigas* (Th). *Haliotis*, 8(1977) : 301-308.
- COMPS**, M., 1983b. Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea*. *Rapp. P.-v. Réunion. Cons. int. Explor. Mer*, 182 : 137-139.
- CREAA**, 1991. Rapport 1991.
- FARLEY**, C.A., Banfield W.G., Kasnic JR.G. et Foster W.S., 1972. Oyster herpes-type virus. *Science*, Wash.D.C. 178 : 759-760.
- FARLEY**, C.A. 1978. Viruses and virus-like lesions in marine molluscs. *Mar. Fish. Rev.*40 : 18-20.
- FOLTZ**, D. W., and Zouros E. 1984. Enzyme heterozygosity in the scallop *Plactopecten magellanicus* (GMELIN) in relation to age and size. *Marine Biology Letters*, 5 : 255-263
- FUJIO**, Y., 1979. Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural research*, 30 (1) : 32-42.
- GAFFNEY**, P.M., Davis, C.V. and Hawes, R.O. 1992. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 105 : 1-20.



**GERARD, A., BOUDRY, P., NACIRI, Y., HEURTEBISE, S., DELSERT, C., LEDU, C., PHELIPOT, P., CHOLLE, B. et COCHENNEC, N., 1995.** Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea*: hybridations et conservation de souches. Rapport IFREMER, 95/RPC-R-57 « Génétique », 20 pp.

**HALEY, L.E., and Newkirk, G.F., 1978.** Selecting oyster for rapid growth. Proceedings of the World Mariculture Society, 8 : 557-565.

**LE DEUFF, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T. et Cochenec, N., 1994.** Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Fish. Pathol., 14(2) : 69-71.

**LEMERY, N., Etude de la croissance d'une population d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, 1997**

**LONGWELL, A.C. et S.S.Stiles, 1970.** Système génétique et potentiel de reproduction de l'huître commerciale américaine. Endeavour, 29 : 94-99.

**LOSEE, E., 1979 b.** Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*). Aquaculture, 16 : 123-126.

**MORAGA, D., Osada, M., Lucas, A., and Nomura, T., 1989.** Génétique biochimique des populations de *Crassostrea gigas* en France (côte Atlantique) et au Japon (Miyagi). Aquatic Living Resources, 2 : 135-143.

**NICOLAS, J.L., Comps M. et Cochenec N., 1992.** Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 12(1) : 11-13.

**RENAULT, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.M. et Chollet, B., 1994a.** Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 14(2) : in press.

**RENAULT, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N. et Maffart, P., 1994b.** Herpes-virus associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France- Comparative study. Revue Med. Vét., 145(10) : 735-742.

**SINGH, S.M., and Zouros, E., 1978.** Genetics variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). Evolution, 37 (2) : 342-353

**THIRIOT-QUIEVREUX, C., Pogson, G.H., and Zouros, E., 1992.** Genetics of growth rate variation in bivalves : aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. Genome, 35 : 39-45.

**ZOUROS, E. And Pogson, G.H., 1994.** The present status of the relationship between heterozygosity and heterosis In Genetics and evolution of Aquatic Organisms. Ed. A.R. Beaumont, Chapman and Hall, London : 133-146.



# ANNEXES

## ANNEXE 1

### **Comptage des gamètes.**

#### **Comptage des Ovocytes:**

- Déposer 100µl. du volume total d'ovocytes sur une cellule de Malassez.
- Comptage automatique du nombre de cellules par l'analyseur d'image SAMBA™ 2005 d'Alcatel TITN ANSWARE et son logiciel correspondant.

#### **Comptage des Spermatozoïdes:**

- Ajouter 100µl. de sperme à 200µl. d'éosine.
- Ajuster à 1 ml. Avec de l'eau de mer filtrée.
- Déposer 100µl. du mélange sur une cellule de Thoma.  
Comptage automatique du nombre de cellules par l'analyseur d'image SAMBA™ 2005 d'Alcatel TITN ANSWARE et son logiciel correspondant.

## ANNEXE 2

### **Coloration des cellules au Hoeschst (observation au microscope à épifluorescence) Coloration "in vitro":**

- Fixer les cellules pendant 60 mn. dans le tampon GA + Formol 6%: 1 volume d'ovocytes + 1 volume de tampon fixateur (GA + Formol 6%).
- Enlever le tampon fixateur par aspiration grâce à une trompe à vide.
- Laver 60 mn. dans la tampon GA (2 lavages de 30mn.).
- Colorer 60 mn. dans le tampon GA + Hoeschst (1 $\mu$ l. de solution stock pour 1 ml. d'oeufs).
- Laver 60 mn. dans la tampon GA (2 lavages de 30mn.).
- Observer au microscope à épifluorescence.

**Solution stock** (Hoeschst): préparer à 0.5 mg./ml.

### **Tampon GA:**

<u>Produit</u>	<u>Molarité</u>	<u>Grammes/L. de solution</u>
N-Méthylglucamine	250 milliMolaire	48.8 g.
K-Gluconate	250 milliMolaire	58.6 g.
Hepes	50 milliMolaire	13.0 g.
EGTA	10 milliMolaire	3.8g.

Ajuster à pH 7.4 avec de l'acide Acétique glacial.

### **Tampon de fixation:**

Exemple: préparation de 500 ml.:

79 ml. de Formaldéhyde 38%, compléter à 500 ml. avec le tampon GA.



### ANNEXE 3

## Cinétique de croissance des géniteurs d'Arcachon

