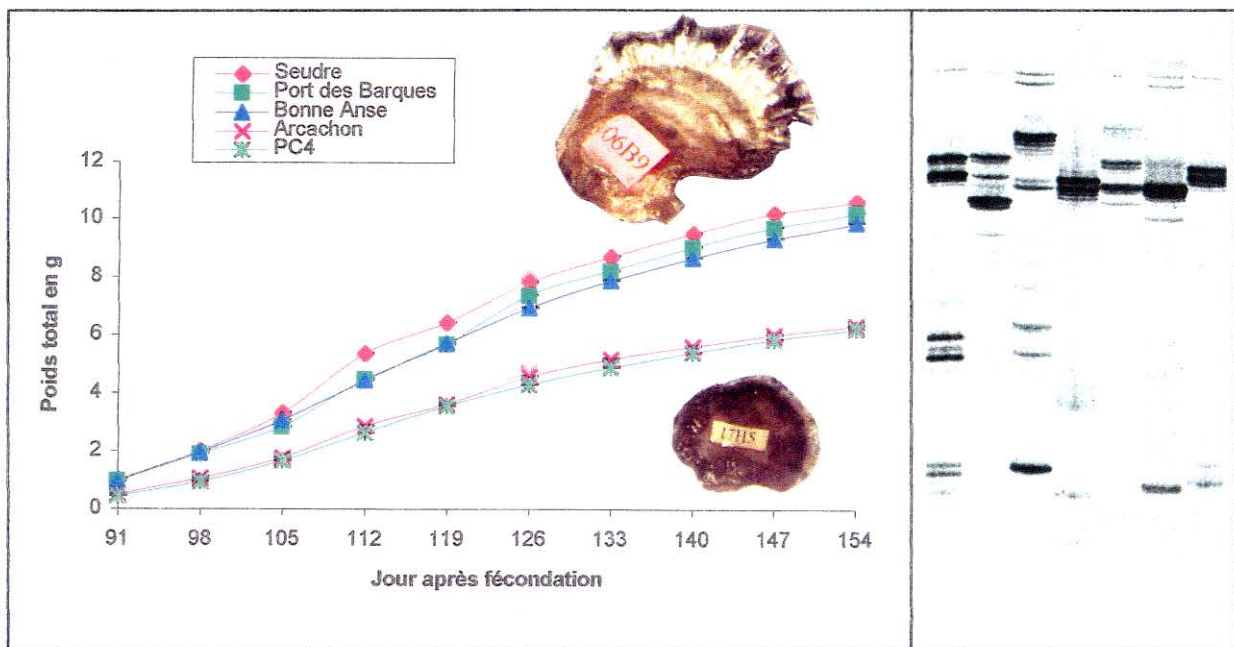


**ETUDE DE LA VARIABILITE DE CROISSANCE  
D'UNE POPULATION D'HUITRES CREUSES  
*CRASSOSTREA GIGAS*  
BASES GENETIQUES**



MORAND Bérénice  
01 Mai - 31 Octobre 1996

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie  
17390 LA TREMBLADE

## REMERCIEMENTS

*Je remercie en tout premier lieu André Gérard de son accueil au sein du laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie qu'il dirige.*

*Ma reconnaissance va à Pierre pour son soutien et ses compétences.*

*Je salue le courage de Bertrand qui m'a supportée avec le sourire durant ces 6 mois, et m'a apporté ses précieuses lumières... et un peu de folie.*

*Je tiens à remercier Serge d'avoir su me communiquer son amour du travail bien fait : apprendre a toujours été un plaisir.*

*Merci à Christophe pour son amitié, son sens de l'esthétique, et surtout ses gâteaux!*

*Merci également à Pascal pour sa bonne humeur, à Sophie d'être toujours là quand on a besoin d'elle, et à Yamama pour sa générosité.*

*Et merci à tous les stagiaires d'avoir été là, tout simplement...*

<b>I INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II IFREMER ET LE LABORATOIRE DE LA TREMBLADE .....</b>	<b>3</b>
1. PRESENTATION DE L'IFREMER.....	3
<i>a-Mission de L'IFREMER.....</i>	3
<i>b-Structure interne de L'IFREMER.....</i>	4
2- LA STATION DE LA TREMBLADE .....	4
<i>a- Le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie.....</i>	5
<i>b-Les objectifs du GAP en génétique .....</i>	5
<b>III PRESENTATION DU PROGRAMME "GENEPHYS 1996-2000" .....</b>	<b>7</b>
1/ LES OBJECTIFS .....	7
2/ LES DIFFERENTES ETAPES .....	7
<i>a- L'établissement de populations de référence.....</i>	7
<i>b- Le déroulement de l'élevage larvaire.....</i>	8
<i>c- Le prégrossissement et le grossissement.....</i>	8
<i>d- La sélection des géniteurs G<sub>1</sub>.....</i>	8
<i>e- Elevage de la génération G<sub>2</sub>.....</i>	8
<i>f- Les suivis de croissance.....</i>	9
<i>g- Les analyses génétiques.....</i>	9
<i>h- Les analyses physiologiques.....</i>	9
3/ LES CROISEMENTS "LINK" .....	9
<b>IV MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>10</b>
1/ ZOOTECHNIE.....	10
<i>a- L'échantillonnage des géniteurs .....</i>	10
<i>b- Les croisements.....</i>	10
<i>c- L'élevage larvaire.....</i>	11
<i>d- Le captage sur plaques : la fixation en pseudo-cohortes .....</i>	12
<i>e- La fixation sur brisure.....</i>	13
<i>f- Le détroquage partiel et l'échantillonnage.....</i>	13
<i>g- Le suivi de croissance en longueur.....</i>	13
<i>h- Le suivi de croissance en poids.....</i>	13
2/ GENETIQUE : MISE AU POINT POUR L'ETUDE DU POLYMORPHISME GRACE AUX MARQUEURS MICROSATELLITES SUR LES ANIMAUX DU PROGRAMME GENEPHYS .....	14
<i>a- Le but de l'étude.....</i>	14
<i>b- L'extraction de l'ADN.....</i>	15
<i>c- Les microsatellites.....</i>	17
<i>d- La PCR.....</i>	17
<i>e- Visualisation des produits d'amplification par électrophorèse .....</i>	19
<i>e-1- Principe.....</i>	19
<i>e-2- Des techniques plus ou moins résolutive.....</i>	19
3/ L'ANALYSE STATISTIQUE.....	21

<b>V RESULTATS .....</b>	<b>22</b>
1/ ZOOTECHNIE.....	22
<i>a- L'échantillonnage des géniteurs</i> .....	22
<i>b- Les croisements</i> .....	24
<i>c- L'élevage larvaire</i> .....	28
<i>d- Le captage sur plaques</i> .....	31
<i>e- Le suivi de croissance en longueur</i> .....	34
<i>f/ Le suivi de croissance en poids</i> .....	38
2- RESULTATS DE L'ETUDE GENETIQUE .....	47
<i>a- Résultats de la mise au point pour l'étude des microsatellites en routine</i> .....	47
<i>b- Proposition d'un protocole pour l'étude des microsatellites en routine chez Crassostrea gigas</i> .....	52
<i>c- Premiers résultats de l'étude génétique</i> .....	54
 <b>VI DISCUSSION .....</b>	 <b>58</b>
1/ ZOOTECHNIE.....	58
<i>a- Les géniteurs</i> .....	58
<i>b- Les croisements</i> .....	59
<i>c- L'élevage larvaire</i> .....	60
<i>d- Le captage</i> .....	61
<i>e- La croissance des animaux fixés sur plaques</i> .....	63
<i>f- Le suivi de croissance des animaux en casiers PVC</i> .....	66
2/ GENETIQUE.....	67
 <b>VII CONCLUSION .....</b>	 <b>71</b>
 <b>VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 <b>72</b>

## L'INTRODUCTION

L'huître creuse *Crassostrea gigas* a pris une importance grandissante en Europe depuis son introduction suite aux épizooties qui ont touché l'huître plate *Ostrea edulis* au début de années soixante-dix. Selon les données officielles, en 1995 l'huître creuse arrivait largement en tête des productions françaises de mollusques avec 150 000 tonnes environ contre 2 300 pour l'huître plate et 65 000 pour la moule *Mytilus edulis*.

L'importance économique des mollusques (plus de 210 000 tonnes produites en France en 1995) en fait un sujet très étudié, et la relation entre les caractères physiologiques de base impliqués dans la croissance et leurs bases génétiques chez les bivalves fait toujours l'objet de nombreuses interrogations.

A ce jour, de multiples études ont été entreprises concernant la relation entre **l'hétérozygotie** du génome et la croissance (Zouros *et al.*, 1980; Koehn *et al.*, 1984; Garton *et al.*, 1984; Foltz et Zouros, 1984). Une corrélation significative a ainsi été trouvée entre hétérozygotie multilocus pour des gènes codant des enzymes et le taux de croissance chez les juvéniles de nombreux bivalves (Gaffney et Scott, 1984; Mallet *et al.*, 1986; Koehn *et al.*, 1988).

D'autres auteurs se sont penchés sur les corrélations existant entre **aneuploïdie** et croissance (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992) ou entre divers **caractères physiologiques et la croissance** (Hawkins *et al.*, 1986; Hawkins *et al.*, 1989; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992), et ce chez de nombreuses espèces de mollusques bivalves.

Cependant, malgré l'importance économique de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, **aucune sélection génétique n'a encore été entreprise** sur cette espèce. De nombreuses études ont pourtant été menées sur l'importance d'un élevage contrôlé en aquaculture de bivalves (Haley et Newkirk, 1982; Newkirk et Haley, 1982; Newkirk et Haley, 1983; Newkirk, 1983; Adamkewickz, 1984a; Adamkewickz, 1984b; Wada, 1986), et Singh et Zouros (1981) ont souligné la contribution primordiale que représenterait la sélection génétique pour l'augmentation du taux de croissance à l'économie de l'huître.

D'autres espèces ont pourtant fait l'objet **d'essais de sélection** dans ce sens, et des réponses positives ont été obtenues à plusieurs reprises. C'est le cas chez *Mercenaria mercenaria* (Chanley, 1961) qui a fait l'objet de la première publication sur ce sujet, mais également chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Newkirk, 1980) ou chez l'huître plate européenne *Ostrea edulis* (Newkirk et Haley, 1982a; Newkirk et Haley, 1983).

**L'importance économique de l'huître creuse *Crassostrea gigas*** en Europe à été largement étudiée (Héral, 1993), mais le problème des **limites trophiques des bassins ostréicoles** se pose aujourd'hui. Cet état de fait a poussé les scientifiques de l'IFREMER à s'interroger sur la possibilité de sélectionner des animaux possédant de meilleurs rendements métaboliques concernant des caractères comme la nutrition ou la respiration par exemple.

C'est sur ces bases que l'IFREMER a décidé d'initier le programme **"Genephys 1996-2000"** visant à établir les "bases génétiques et la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez *Crassostrea gigas*" avec la participation de partenaires scientifiques européens (le Plymouth Marine Laboratory en Grande Bretagne, le Laboratoire d'Océanographie Biochimique et Ecologie de Villefranche-sur-mer, la National University of Ireland à Galway, l'Institute of Marine Biology of Crete en Grèce, le Laboratoire Génome et Population de Montpellier).

C'est dans le cadre de ce projet, co-financé par la CEE, que s'inscrit le présent travail.

Deux aspects ont été abordés durant ces six mois :

### 1° le suivi de croissance

- ◆ d'une première génération d'huîtres issue de 400 croisements entre 20 mâles et 20 femelles de quatre populations naturelles;
- ◆ d'une première génération d'huîtres issue de croisements intrapopulations entre 5 mâles et 5 femelles des quatre origines précédentes auxquelles on a ajouté un lot de géniteurs anglais (soit 5 fois 25 croisements).

2° la **mise au point de l'étude génétique** à partir de trois locus microsatellites séquencés et fournis par l'équipe de Zouros en Grèce. Ce point vise à établir la contribution de chaque population de géniteurs  $G_0$  à la première génération  $G_1$  issue des 400 croisements interpopulations, et à comparer les pseudo-cohortes obtenues après fixation de la  $G_1$ .

**Avertissement** : Des mortalités dues à l'Herpès-virus ont touché les animaux de la première génération. Le suivi de croissance des individus du programme "Genephys" n'a, par conséquent, pu être poursuivi au-delà de 69 jours après fécondation. Le travail présenté ici est donc un peu différent de celui qui avait été prévu au début de ce stage.

## II IFREMER ET LE LABORATOIRE DE LA TREMBLADE

### 1. Présentation de l'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) gère un budget de 993 millions de francs, dont la majeure partie provient de la subvention que lui verse l'Etat, et à laquelle s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC (Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial) lui permet de développer.

Un peu plus de 1 200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER. Le personnel se répartit entre le siège social d'Issy-les-Moulineaux, 5 centres (Boulogne-sur-Mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), 5 délégations Outre-Mer, 15 stations en métropole et plusieurs laboratoires isolés répartis le long du littoral français (Annexe 1).

Mais l'IFREMER, c'est aussi un groupe : en effet à ces 1 200 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales, et dont la vocation est de valoriser la politique de recherche de l'Institut, auprès notamment des professionnels de la mer, et de gérer les moyens de la flotte océanographique.

#### a-Mission de L'IFREMER

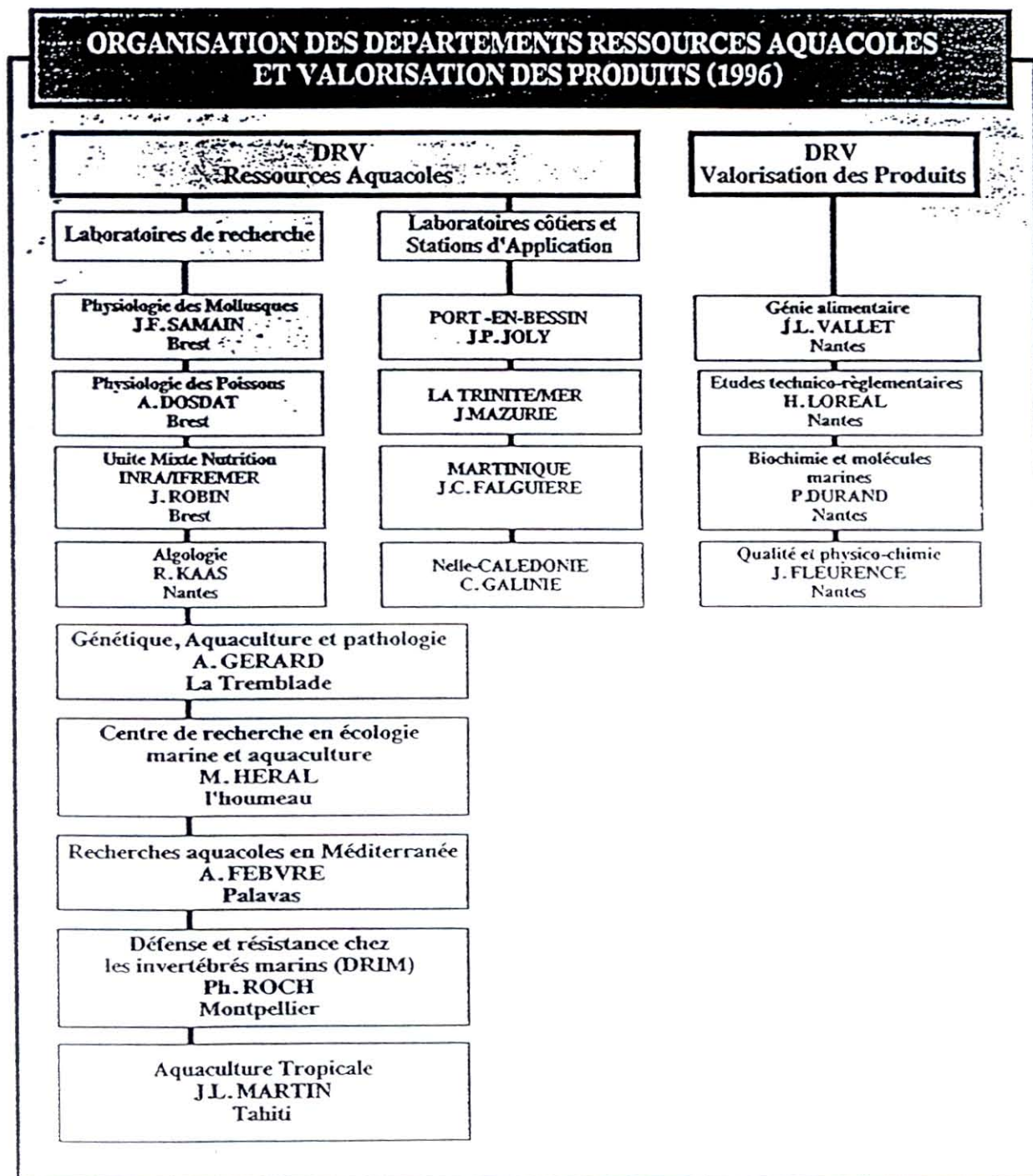
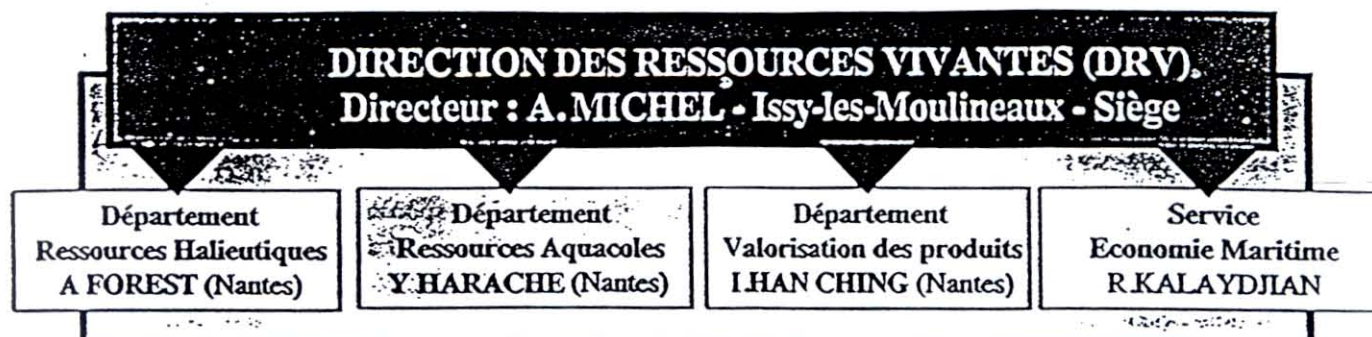
L'IFREMER a reçu des missions multiples par le texte fondateur de l'Institut (décret du 5 juin 1984). Il est le seul organisme de recherche français dont la vocation est exclusivement maritime. C'est une spécificité importante. Dans ce cadre, il exerce cinq missions :

♦ **Organisme de recherche**, il mène ses actions propres dans le domaine des connaissances de base et des technologies liées à de grands enjeux scientifiques et technologiques ou de société (exploitation des ressources de la mer, protection de l'environnement littoral), souvent en collaboration avec d'autres organismes : CNRS, INRA, Universités.

♦ Il doit aussi jouer un rôle d'**agence d'objectifs**, stimulant sur projets et programmes l'action de tous les acteurs de la recherche nationale en s'appuyant sur l'expertise de ses propres laboratoires.

Ces deux missions d'organisme de recherche pluridisciplinaire et d'agence d'objectifs sont complémentaires; elles font de l'IFREMER une force de proposition pour une politique de recherche nationale en liaison avec les ministères chargés de la recherche et de l'espace, de l'environnement et de la défense. Cela constitue aussi un atout pour une politique de coopération internationale, prolongement naturel de sa mission de recherche.

Figure 1 : Organisation générale de la Direction des Ressources Vivantes





◆ **Agence de moyen**, il a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française et des moyens lourds qui y sont associés. Ceux-ci doivent être au service de la communauté scientifique nationale. Par ses actions de recherche technologique, l'Institut contribue à perfectionner et à renouveler les engins et l'instrumentation nécessaires à la recherche océanographique.

◆ L'IFREMER exerce aussi une **mission de service public** par un suivi des ressources de la mer (principalement de la pêche et de la conchyliculture) et la protection de l'environnement littoral, notamment par le contrôle de la qualité des eaux.

◆ En tant qu'EPIC, il a la **mission de valoriser** le résultat de ses travaux dans les entreprises. Il doit donc développer et mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime (industrie, pêche, aquaculture) et leur permettre d'affronter la concurrence internationale. L'IFREMER contribue aussi à la formation par la recherche d'ingénieurs et de techniciens dans le domaine de la technologie maritime.

### *b-Structure interne de L'IFREMER*

L'IFREMER se compose de **cinq directions opérationnelles**:

- ◆ La Direction des Moyens Navals (DMN);
- ◆ La Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI);
- ◆ La Direction de l'Environnement Littoral (DEL);
- ◆ La Direction des Recherches Océaniques (DRO);
- ◆ La Direction des Ressources Vivantes (DRV), dont les activités couvrent l'étude de toutes les espèces vivantes marines, ainsi que l'exploitation qui en est faite. Les secteurs économiques de la pêche et de l'aquaculture sont importants, et la DRV travaille beaucoup en concertation avec les professionnels et les administrations en charge de ce secteur, à la fois au niveau national et européen (figure 1).

### **2- La station de La Tremblade**

La station de La Tremblade est composée de deux laboratoires, l'un dépendant de la DEL et l'autre de la DRV. Ce dernier est spécialisé en Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP) chez les invertébrés et plus particulièrement chez les mollusques bivalves.

### a- Le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie

Ce laboratoire, dont la direction a été confiée il y a quelques années à André Gérard, se composait au début de mon stage de quatre unités de recherche :

- Aquaculture** ♦ l'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (**URAPC**), à La Tremblade sous la responsabilité de Philippe Gouletquer;
- ♦ l'Unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (**URAPL**), à Bouin (Vendée) sous la responsabilité de Jean-Pierre Baud;
- Pathologie** ♦ l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (**URPIG**), à La Tremblade sous la responsabilité de Tristan Renault;
- Génétique** ♦ l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (**URGE**), à La Tremblade sous la responsabilité d'André Gérard.

Le laboratoire est actuellement en cours de réorganisation. Les unités de recherche (URAPC, URAPL, URPIG et URGE) vont devenir des laboratoires autonomes. Les deux dernières ont déjà fusionné en un seul laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP).

### b- Les objectifs du GAP en génétique

En matière de génétique, les principaux objectifs du laboratoire, tels qu'ils ont été définis dans les "cahiers des objectifs" de la DRV/RA, visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique et des ressources génétiques. Ces objectifs sont :

- ♦ d'une part l'obtention de lignées ou de souches présentant des caractères de résistance aux maladies parasitaires et/ou de meilleures performances de croissance et de qualité de chair;
- ♦ d'autre part d'arriver à une diversification de la production.

Pour tenter d'y répondre, tout en tenant compte des moyens matériels et humains à disposition, cinq programmes sont actuellement en cours de réalisation :

- ♦ Sélection de souches d'huître plate *Ostrea edulis* résistantes aux parasitoses;
- ♦ Sélection de souches d'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères physiologiques;
- ♦ Polypléidisation des principales espèces d'intérêt commercial;
- ♦ Obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques;

Figure 2 : Les stations IFREMER en métropole



### b-1- Infrastructures

Le GAP assure la gestion de l'outil éclosier de La Tremblade. Ce bâtiment de 1200 m<sup>2</sup>, est principalement constitué de :

- ◆ 6 *salles humides* ( Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Conservatoire de souches, Elevages larvaires, Physiologie),
- ◆ 2 salles de *production de phytoplancton* et une laverie,
- ◆ 1 laboratoire et une *salle informatique*,

Le laboratoire a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- ◆ 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,
- ◆ plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- ◆ 1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet,
- ◆ 4 bassins de 20m<sup>3</sup> pour la production en masse de phytoplancton.

### b-2- Personnel

Responsable : ◆ André GERARD

Cadres : ◆ Yamama NACIRI  
◆ Pierre BOUDRY  
◆ Marc BARRET  
◆ Tristan RENAULT  
◆ Franck BERTHE  
◆ Anne THEBAULT

Techniciens : ◆ Serge HEURTEBISE  
◆ Christophe LEDU  
◆ Pascal PHELIPOT  
◆ Nathalie COCHENNEC  
◆ Bruno CHOLLET  
◆ Philippe HAFFNER  
◆ Cécile LIPART

Thésards ◆ Sophie LAUNEY  
◆ Bertrand COLLET  
◆ Qinggang XUE

Post-doc ◆ Rose-Marie LE DEUFF

### III PRESENTATION DU PROGRAMME "GENEPHYS 1996-2000"

#### 1/ Les objectifs

Le projet "Genephy 1996-2000", initié par le laboratoire IFREMER de La Tremblade (GAP) et le CREMA (Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture) de l'Houmeau, vise à établir les **relations entre les caractères physiologiques** de base impliqués dans la croissance (respiration, digestion, excrétion...) et **leurs bases génétiques** (déterminisme, variabilité intra et interpopulations...) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Les objectifs principaux sont :

- ◆ d'exprimer le maximum de variabilité de croissance à partir d'un lot de **généiteurs de différentes origines**, tant au stade larvaire qu'au stade adulte;
- ◆ de vérifier la **constance dans le temps** des performances de croissance et des fonctions physiologiques;
- ◆ **d'expliquer le différentiel** de croissance observé par les différentes fonctions physiologiques;
- ◆ d'établir si le différentiel de croissance et les fonctions physiologiques sont associés à une **base génétique**, et ce en utilisant deux types de marqueurs (allozymes et microsatellites) et en les reliant au taux d'aneuploïdie, et éventuellement à l'identité des chromosomes manquants;
- ◆ d'évaluer la **variance génétique et la transmission de l'aneuploïdie** sur cette génération;
- ◆ d'évaluer les **possibilités de sélection** pour un meilleur rendement d'assimilation. Par la mise en place d'un début de carte génétique, lancer les premières bases d'une sélection assistée par marqueurs et de la mise en évidence de QTLs (Quantitative Trait Loci).

La liste des participants et le planning du programme sont présentés en annexes 2 et 3.

#### 2/ Les différentes étapes

##### a- L'établissement de populations de référence

Le projet est basé sur l'étude de deux générations successives d'huître creuse *C. gigas*. Afin de **créer une population à base génétique large**, des généiteurs issus de quatre populations naturelles (estuaire de la Seudre, bassin d'Arcachon, estuaire de la Charente et baie de Bonne Anse) ont été rassemblés. Le choix de ces gisements a été guidé par le fait qu'ils constituent la principale source d'approvisionnement en naissain de captage naturel, à la fois en France et en Europe.

Une cinquième population d'origine anglaise doit permettre de mener en parallèle un programme appelé "Link".

L'objectif est d'obtenir auprès des professionnels cinq cents individus environ pour chacune de ces populations en vue de constituer la population de géniteurs ( $G_0$ ), et d'utiliser cinq mâles et cinq femelles sur les cinq cents animaux pour obtenir la première génération ( $G_1$ ).

Le but étant d'avoir une représentation équivalente de tous les individus de la  $G_0$ , les géniteurs doivent être croisés selon toutes les combinaisons possibles, soit en final **400 croisements**, mélangés une heure après fécondation. On obtient ainsi la  $G_1$ .

#### b- Le déroulement de l'élevage larvaire

En vue de garder le **maximum de variabilité** pour la première génération, il est prévu de conserver même les individus à **croissance lente** tout au long de la période d'élevage larvaire. Le retard de croissance se retrouvant lors de la métamorphose doit permettre de distinguer plusieurs jours de fixation et donc **plusieurs "cohortes de fixation"** appelées "pseudo-cohortes". Le nombre final de pseudo-cohortes dépend donc du temps nécessaire à la fixation de tous les animaux, de la tête de lot, à la fixation précoce jusqu'à la queue de lot, plus tardive.

#### c- Le prégrossissement et le grossissement

L'étape suivante prévoit de transférer les collecteurs en bacs d'élevage en **conditions non limitantes** de nourriture. L'élimination des animaux surnuméraires de façon **aléatoire** et le plus tôt possible doit permettre un suivi de croissance dès les stades précoces.

Le transfert des jeunes huîtres en Méditerranée dans l'étang de Thau, après fixation sur cordes selon la technique locale, est destiné à fournir aux animaux les meilleures conditions trophiques possibles en vue d'obtenir une croissance rapide.

#### d- La sélection des géniteurs $G_1$

L'objectif de cette étape est de trier les individus pour obtenir des géniteurs en vue de **produire une seconde génération**.

Les animaux doivent être choisis de telle façon qu'ils aient un métabolisme le plus contrasté possible et des caractéristiques génétiques très différentes.

L'étape suivante consiste à effectuer des croisements entre **individus à caractéristiques identiques** (ex : fort rendement x fort rendement; faible rendement x faible rendement) et entre **individus à caractères contrastés** (ex : fort rendement x faible rendement).

#### e- Elevage de la génération $G_2$

De même que la  $G_1$ , il est prévu d'élever la  $G_2$  en **conditions non sélectives** (pas de tamisage sélectif en élevage larvaire...) de façon à **limiter l'effet du milieu** sur la croissance et à observer au maximum les différences d'origine génétique. L'élevage de cette seconde génération se fera à la station IFREMER de Bouin (Vendée).

#### f- Les suivis de croissance

Le projet prévoit un **suivi de croissance en longueur** dès l'élevage larvaire pour la G<sub>1</sub>, et seulement après fixation et métamorphose pour la G<sub>2</sub>. Cette étape doit être entamée sous forme de **mesures individuelles** sur la G<sub>1</sub> dès que les animaux pourront être identifiés (soit quelques semaines après leur fixation). Pour chaque pseudo-cohorte, le but est de mesurer régulièrement un nombre déterminé d'animaux.

Le **poids total individuel** doit également être pris en compte aussitôt le détroquage terminé, la dernière pesée devant avoir lieu juste avant le transfert à l'étang de Thau. Là, l'étude de la croissance en taille des animaux fixés sur corde se poursuivra, et la **relation d'allométrie taille/poids** sera déterminée par sacrifice de quelques animaux pour chaque pseudo-cohorte.

#### g- Les analyses génétiques

Diverses méthodes (allozymes, microsatellites, caryologie) doivent être mises en oeuvre afin d'établir une **corrélation** entre **performances physiologiques**, **performances de croissance** et **caractéristiques génétiques**.

L'utilisation des marqueurs allozymiques (Moraga *et al.*, 1989; Buroker *et al.*, 1979) et microsatellites (Naciri *et al.*, 1995), et de la caryologie (Thiriou-Quévrenecq *et al.*, 1982) a pour but d'étudier la relation existant entre la **croissance d'un individu et l'hétérozygotie de son génome**, ou mieux, entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance et ce génome.

#### h- Les analyses physiologiques

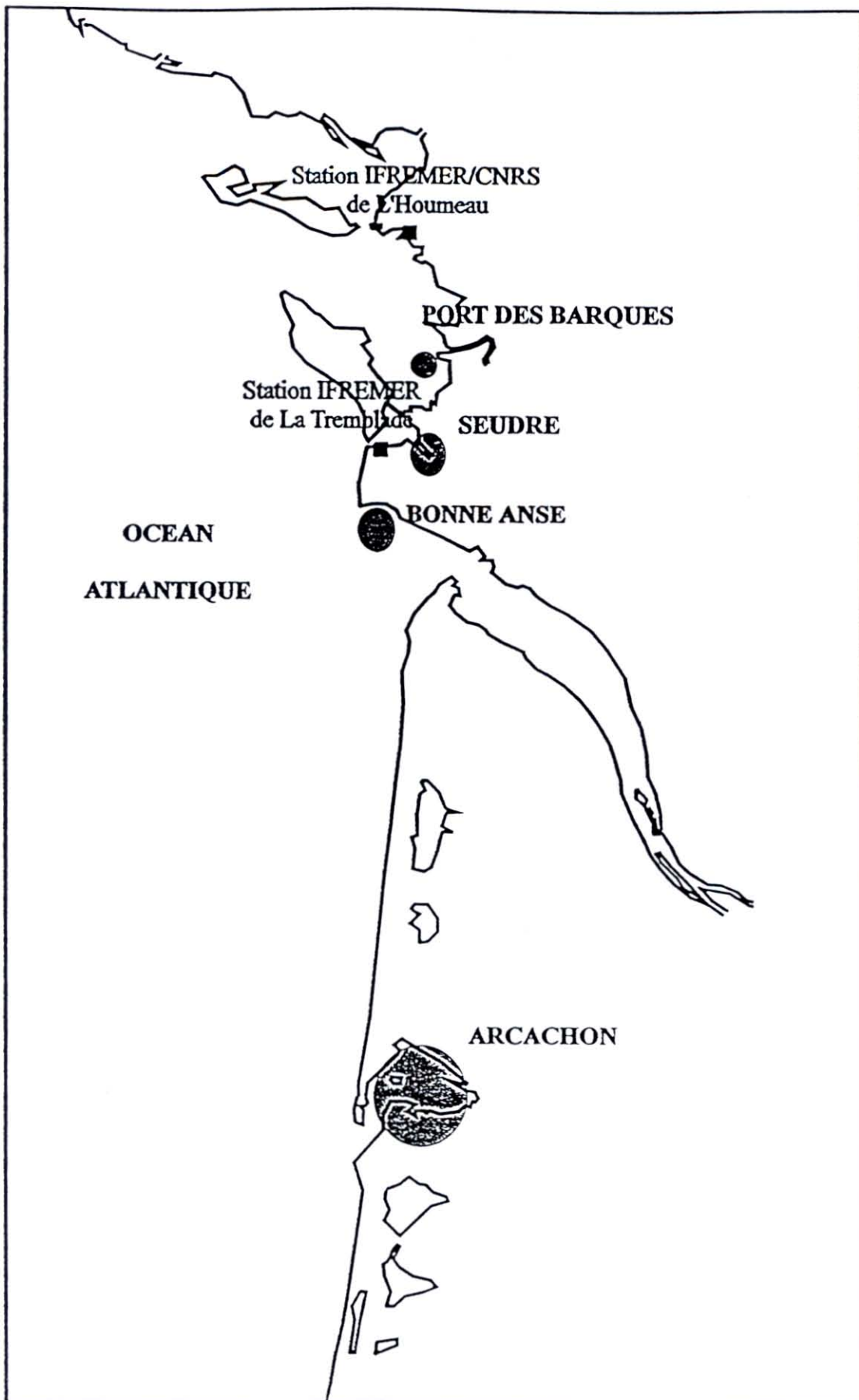
Le dernier travail vise à étudier la **stabilité dans le temps** de différentes caractéristiques physiologiques (respiration, assimilation, turn-over protéique). Des analyses doivent ainsi être effectuées sur les géniteurs G<sub>0</sub> quatre fois durant l'année 1996. Les mêmes tests sont prévus sur les individus G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> adultes. Les différents caractères physiologiques pourront être étudiés en analyses destructives ou non destructives, les animaux sacrifiés étant ensuite utilisés pour étude du polymorphisme génétique.

### 3/ Les croisements "Link"

Comme nous l'avons dit précédemment, des croisements doivent être effectués séparément du programme européen "Genephys", en vue de le compléter. Pour cela, aux populations des estuaires de la Seudre et de la Charente, du bassin d'Arcachon et de la baie de Bonne Anse, sera ajouté un **cinquième lot de géniteurs** en provenance de Conway (Grande-Bretagne).

Pour ce programme, appelé "**Link**", les croisements seront effectués en intrapopulations.

De la même façon que pour "Genephys", un **suivi de croissance** doit être entamé, mais cette fois de façon plus tardive et uniquement par pesées.



**Figure 3 :** Les quatre origines françaises des géniteurs du programme Genephys



## IV MATERIEL ET METHODES

### 1/ Zootechnie

#### a- L'échantillonnage des géniteurs

Des animaux de **quatre origines** (estuaire de la Seudre, bassin d'Arcachon, estuaire de la Charente et baie de Bonne Anse) ont été prélevés chez des ostréiculteurs.

Pour constituer cette population de référence, il a été demandé aux ostréiculteurs des lots captés en 1993 et n'ayant pas subi de tamisage trop sélectif. En outre, ils ont été choisis de telle façon que la **distribution des tailles** à l'intérieur de la  $G_0$  soit **maximale**.

Les poids totaux individuels ont été enregistrés pour tous les animaux.

L'écloserie de Conway a fourni, par l'intermédiaire de T. Hawkins (Plymouth Marine Laboratory en Grande-Bretagne), un lot de géniteurs anglais. Ce dernier provient en fait du croisement de 3 mâles et 3 femelles appartenant à une population  $F_2$  introduite en 1972 au Nord-Ouest des Etats-Unis.

#### b- Les croisements

Pour chaque origine, **5 mâles et 5 femelles** ont été utilisés dans deux types de croisements le 15 avril 1996:

- ◆ un **croisement factoriel 20 x 20** avec les géniteurs des quatre origines françaises dans le cadre du programme européen "Genephy", chaque mâle et chaque femelle étant croisés entre eux;

- ◆ des **croisements factoriels intrapopulations 5 x 5**, incluant, en plus des quatre précédentes, la population anglaise. Ces derniers ont été effectués pour le programme "Link". Les 5 femelles de chaque origine ont été fécondées par les 5 mâles de la même population.

Après sexage des animaux, les gamètes ont été recueillis par **scarification de la gonade** (stripping), et filtrés sur un tamis de 60  $\mu\text{m}$ . Un échantillon de spermatozoïdes a été coloré à l'éosine, puis le dénombrement effectué sur cellule de Thoma par **analyse d'image** (système Alcatel/SAMBA). La même technique a été utilisée pour le dénombrement des gamètes femelles sur cellule de Malassez.

Des volumes et des concentrations identiques d'ovocytes (25 ml à une concentration de 120000 ovocytes par ml) ont été répartis dans des récipients de 400 ml. Les gamètes mâles ont été ajoutés à raison de 100 spermatozoïdes pour un ovule afin d'éviter la polyspermie.

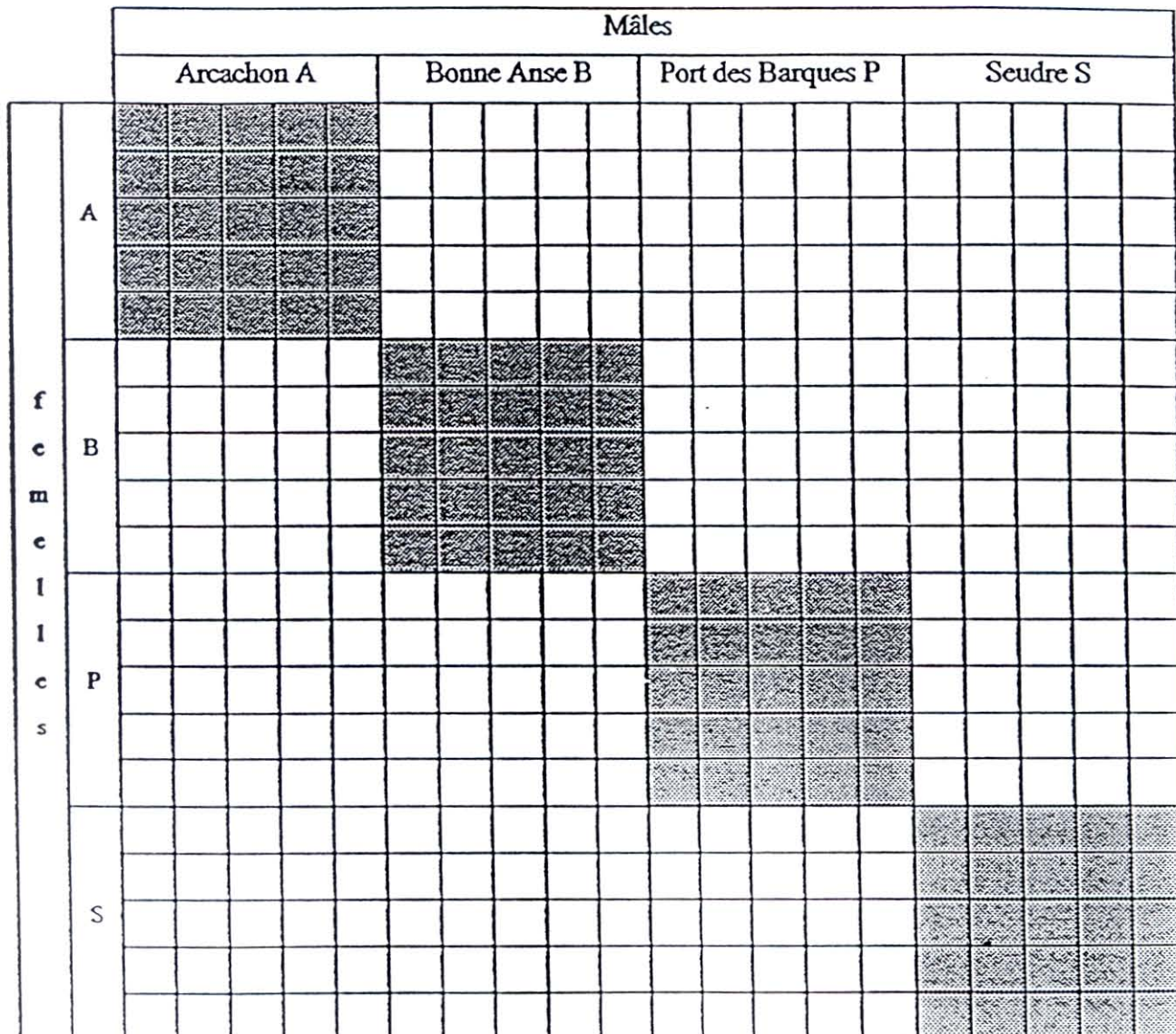
Avant la fécondation, des ovocytes ont été conservés pour étude de l'aneuploïdie des géniteurs par traitement à la colchicine.

**Figure 4 :** Shématisation des croisements "Genephys" et "Link"

**A. "GENEPHYS".**

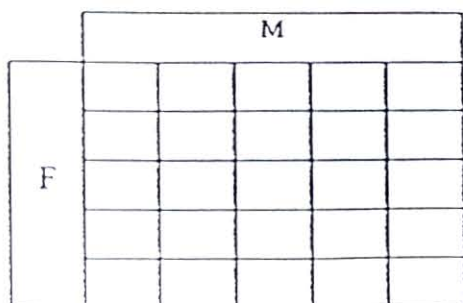
Schématisation du croisement factoriel 20 x 20. Chaque carré correspond à un croisement.

Les carrés grisés correspondent aux croisements intrapopulations



**B. "LINK".**

Croisements intrapopulations pour les géniteurs des 4 origines françaises et de la population anglaise (Conway)



x 5 populations

Des **prélèvements** ont été effectués successivement :

- ♦ afin d'estimer la **proportion d'ovocytes non viables** après coloration au Bleu Trypan. Les résultats ne seront pas présentés pour cause de non-reproductibilité de la méthode.
- ♦ pour le calcul du **taux de fécondation** sur les embryons au stade 16 cellules

Les géniteurs utilisés pour les croisements ont été conservés en vue **d'analyses génétiques** en microsatellites (sur des fragments de branchie) et allozymes (sur des prélèvements de glande digestive et de muscle).

Trois heures après fécondation et juste avant le mélange des 400 croisements, des prélèvements ont été effectués pour estimation du taux de développement en épifluorescence (Annexe 4). Les oeufs ont alors été mis en élevage à **faible densité** afin d'homogénéiser au maximum les conditions de milieu.

Les croisements "Link" ont ensuite été effectués sur les 5 populations.

Les 5 femelles de chaque origine ont été fécondées une à une par chaque mâle de la même population, et les 25 croisements mélangés pour constituer un lot. On obtient donc finalement 5 lots différents numérotés 1 à 5 et représentant respectivement les croisements Seudre x Seudre, Port des Barques x Port des Barques, Bonne Anse x Bonne Anse, Arcachon x Arcachon et Conway x Conway.

### c- L'élevage larvaire

Après mélange, les embryons issus **des 400 croisements** ont été répartis en quatre jarres de 150 litres d'eau de mer filtrée dont la température et la salinité ont varié au cours de l'élevage larvaire respectivement entre 22,0 et 23,2°C. et entre 31,2 et 32,2 ‰ (moyennes : 22,6°C. et 31,7 ‰). Ces 4 lots, théoriquement identiques, ont été numérotés de 1 à 4.

Les produits des croisements "Link" ont été conservés séparément dans cinq jarres de 150 litres dans les mêmes conditions.

Toutes les 48 heures, un **comptage** a été effectué par prélèvements sur cellule quadrillée. Le **pourcentage de larves anormales** a été estimé à j<sub>1</sub>.

Lors de chacune de ces séances, un **échantillon de 30 larves** par lot a été mesuré sur projecteur de profil.

Tous les deux jours également, l'eau d'élevage a été renouvelée et traitée à l'érythromycine. La nourriture quotidienne était principalement constituée **d'*Isochrysis galbana tahiti*** à raison de 500 ml de phytoplancton à environ 21 millions de cellules par ml, pour 150 litres d'eau d'élevage.

Vingt- quatre heures après fécondation, un échantillon de larves a été prélevé et congelé à - 20 °C dans l'éthanol absolu pour analyse des microsatellites et tests de diagnostic en pathologie (détection de l'Herpès-virus par PCR).

**Aucun tamisage sélectif** n'a été effectué en cours d'élevage larvaire, contrairement aux techniques couramment utilisées en éclosion. Ce type de technique a déjà été utilisé de nombreuses fois dans l'étude de l'héritabilité de la croissance (Hadley *et al.*, 1991; Newkirk *et al.*, 1977). De même, comme le font remarquer Rawson *et al.* (1990), il est reconnu que la **densité affecte la croissance** tant dans le milieu naturel qu'en élevage. Celle-ci a donc été ajustée et contrôlée durant tout l'élevage larvaire afin de permettre une **expression génétique maximale** de la croissance, et de maintenir tous les lots dans des conditions identiques.

#### d- Le captage sur plaques : la fixation en pseudo-cohortes

Cette méthode présente un **double avantage** :

- ◆ un **suivi individuel de tailles** est possible par analyse d'image dès les stades précoces;
- ◆ le **détroquage et le marquage** des animaux peuvent se faire très tôt (dès qu'ils ont atteint 1 à 2 cm de long).

La fixation optimale a été obtenue sur **plaques de PVC** (50 cm x 37,5 cm) recouvertes d'une couche de parafine et enduites de résine époxy.

Lors de l'apparition en élevage des premiers stades pédivéligères ocellées, un tamisage des 4 lots "Genephys" a été effectué sur tamis de 225 µm en vue de retenir les individus de taille supérieure à 315 µm. Les larves ainsi récupérées ont été mélangées et mises en fixation. Cette opération a été renouvelée régulièrement jusqu'à épuisement des lots (avec, à chaque fois, récupération des larves les plus grandes).

On a ainsi obtenu **plusieurs "cohortes de fixation" ou pseudo-cohortes**. L'étalement de l'âge à la fixation est dû au fait que l'hétérogénéité des lots d'élevage a été conservée tout au long de l'expérimentation. En effet, comme nous l'avons signalé précédemment, à aucun moment la queue de lot n'a été éliminée.

La technique de fixation en plusieurs cohortes a déjà été utilisée par Newkirk *et al.* (1977), dans leur étude sur la croissance des larves et du naissain chez *Crassostrea virginica*. Le captage avait alors lieu à intervalles réguliers de 2 jours.

A chaque tamisage, les pédivéligères ont été mises en fixation dans des raceways de 150 l où avaient été immergées les **plaques PVC numérotées**, au nombre de quatre par raceway. La température de fixation a été maintenue autour de **25 °C** grâce à des résistances immergées (Hydromatic 300 W), et l'**oxygénation** programmée en alternance pendant 15 minutes toutes les 2 heures.

Les plaques ont été changées régulièrement et stockées en bacs avec renouvellement d'eau. Le nombre de plaques obtenu pour chaque pseudo-cohorte diffère en fonction du nombre de pédivéligères à fixer lors de chaque tamisage.

L'un des avantages de la méthode de fixation est qu'elle a permis de conserver un peu d'enduit sur chaque animal après détroquage et d'y inscrire directement le numéro au marqueur indélébile.

#### e- La fixation sur brisure

Cette technique de captage sur plaques a été utilisée uniquement pour les lots du programme "Genephys". Parallèlement, et pour assurer l'obtention de matériel biologique pour le suivi de croissance en cas d'échec de la fixation sur plaques, une petite partie de chaque pseudo-cohorte a été captée de façon traditionnelle sur brisure en tamis.

Les lots issus des croisements intrapopulations "Link" ont été fixés dans leur intégralité et en une seule fois sur brisure.

#### f- Le détroquage partiel et l'échantillonnage

Dès que les animaux fixés sur plaques ont été assez visibles, un **détroquage partiel** a été entrepris de façon **aléatoire** afin de limiter au maximum l'effet de la densité sur la croissance. Pour chaque pseudo-cohorte de "Genephys", **une centaine d'animaux a été numérotée**. Ces 100 individus ont été **identifiés aléatoirement** de façon à être répartis équitablement sur toutes les plaques de la pseudo-cohorte. On a donc obtenu au final un échantillon destiné aux suivis individuels de croissance en longueur et en poids.

Les plaques ont été stockées verticalement dans des bassins à alimentation en eau, bullage et apport de phytoplancton constants.

#### g- Le suivi de croissance en longueur

**Chaque semaine**, les 100 individus de chaque pseudo-cohorte ont été mesurés un à un au pied à coulisse à affichage digital. La longueur de la charnière à l'extrémité des valves a été relevée avec une précision de 0.01 mm. Ce suivi devait se faire par imagerie numérique, mais des raisons pratiques et de précision des mesures nous ont conduit à préférer le suivi manuel. A l'occasion de ces mesures, des **détroquages partiels** ont été réalisés avec conservation des animaux détroqués en bacs d'eau de mer de 50 l. Cette opération avait pour but de **garantir un développement optimal** de tous les individus, et surtout **d'éviter tout problème de compétition** aux individus marqués utilisés pour le suivi de croissance.

#### h- Le suivi de croissance en poids

##### h-1- Pour les animaux du programme "Genephys"

Un **détroquage final** de tous les animaux a eu lieu lorsque leur taille s'est avérée suffisante pour qu'ils soient numérotés.

Cette phase du travail a eu lieu après une dernière mesure de taille et a été directement suivie d'une pesée des mêmes individus pour chaque pseudo-cohorte. La **relation longueur / poids** a ainsi pu être établie, et les mesures de croissance poursuivies par pesées uniquement.

L'échantillon devait être étendu à tous les individus de toutes les cohortes de fixation pour la suite de l'étude.

Malheureusement, aux alentours de j 70, des **mortalités massives**, à la fois sur les animaux des programmes "Genephys" et "Link", nous ont conduit à abandonner cette phase de l'étude de croissance, faute d'un échantillon suffisant.

## h-2- Pour les animaux du programme "Link".

Les animaux issus des croisements "Link" ont fait l'objet d'un suivi beaucoup plus tardif puisque fixés sur brisure et donc moins faciles à mesurer individuellement.

Des **structures PVC** avec tamis de 9 cases (1 à 9) sur 8 (A à H) ont été conçues pour isoler les animaux. Ces derniers y ont été placés 74 jours après le croisement. Les lots issus des croisements intrapopulations de la Seudre, de la Charente, de Bonne Anse et d'Arcachon ont été répartis dans ces cagettes, le lot anglais ayant été totalement décimé. **243 individus de chaque lot** ont été placés dans les structures. Pour compléter l'étude, des animaux issus de la fixation sur brisure d'une des pseudo-cohortes "Genephys" ont été ajoutés à l'échantillon. On a pris des animaux de la pseudo-cohorte n°4 (PC 4) non seulement parce qu'elle possédait encore assez d'individus survivants, mais également parce que la date de captage des larves était assez proche de celle des lots "Link".

Les pesées n'ont débuté que 13 jours après le remplissage des casiers. En effet, des mortalités ayant toujours lieu, un délai a été jugé nécessaire pour permettre le remplacement des animaux morts par de nouveaux individus. Cependant, une fois les pesées entreprises, les cases vides n'ont plus été complétées.

Les mesures ont été effectuées régulièrement toutes les semaines au 100<sup>ème</sup> de gramme près, après égouttage des animaux. Lorsque la taille des cases s'est avérée limitante pour la croissance, les animaux ont été sortis des structures et **étiquetés** suivant un code : "*n° de cagette à 2 chiffres - lettre - nombre*" (exemple : 01A4 pour l'animal se trouvant dans la structure 1 à la colonne A et à la ligne 4).

## 2/ Génétique : mise au point pour l'étude du polymorphisme grâce aux marqueurs microsatellites sur les animaux du programme Genephys

### a- Le but de l'étude

Une **analyse génétique** a été entreprise sur le programme "Genephys" à partir du 5 juillet 1996. Le laboratoire grec choisi pour mener à bien cette tâche dans le cadre du programme nous a fourni les amorces correspondant aux trois locus microsatellites disponibles.

L'analyse entreprise ici est une étude préliminaire qui devra être complétée par le travail des scientifiques de l'Institut de Biologie Marine de Crète.

Elle a pour but :

- ◆ tout d'abord d'essayer de **différencier les quatre populations** de géniteurs utilisées lors du croisement 20 x 20;
- ◆ puis par analyse de la descendance, de définir la part prise par chaque population dans le croisement;
- ◆ enfin, d'essayer de différencier les pseudo-cohortes à partir de leurs caractéristiques génétiques.

Mais plus qu'une étude proprement dite, ce travail de départ avait pour but **la mise au point d'un protocole "extraction-amplification-visualisation"** le plus fiable possible, et dont la répétabilité permettrait une **étude des microsatellites en routine**.

Pour effectuer ce travail, nous avons utilisé la technique d'amplification de séquences microsatellites par PCR avec visualisation des résultats après électrophorèse sur gels d'agarose et de polyacrylamide.

### b- L'extraction de l'ADN

Classiquement, l'extraction d'ADN des bivalves se fait au **phénol-chloroforme**, méthode relativement lourde et présentant des risques par sa **toxicité**. Nous avons donc choisi une technique plus simple utilisant le **Chélex<sup>®</sup>** (Biorad), adaptée par Lemaire (com. pers.) de Walsh *et al.* (1991).

Le Chélex<sup>®</sup>, résine qui chélate les ions métalliques, est associé dans ce protocole à la protéinase K, dont le rôle est de détruire les protéines cellulaires. Le **degré de pureté** de l'ADN ainsi obtenu est plus faible que celui de l'ADN issu d'une extraction au phénol-chloroforme. Il doit par conséquent être conservé à - 20 °C.

Les principaux avantages de cette technique sont qu'elle est beaucoup moins lourde à mettre en oeuvre que la première, et qu'elle ne nécessite qu'une **très faible quantité de tissus** au départ.

#### b-1- L'extraction de l'ADN des géniteurs

Suite aux croisements effectués pour le programme "Genephys", des **morceaux de tissu** (manteau) ont été prélevés chez les 20 mâles et les 20 femelles de la G<sub>0</sub>. Ils ont été conservés à - 20 °C en vue de leur utilisation ultérieure. Pour l'extraction au Chélex<sup>®</sup>, seul un fragment équivalent à une tête d'épingle a été nécessaire. Les protocoles d'extraction au phénol-chloroforme et au Chélex<sup>®</sup> sont résumés annexes 5 et 6.

#### b-2- L'extraction de l'ADN sur les animaux de la première génération

des échantillons ont été **prélevés sur la G<sub>1</sub> à différents moments** :

- à j<sub>1</sub>,
- lors de la mise en fixation de chacune des pseudo-cohortes,
- et à j<sub>45</sub>.

Ils ont été conservés dans l'éthanol 100 % à - 20 °C.

Seules des études sur les larves prêtes à se métamorphoser et sur les animaux prélevés à j45 ont été entreprises ici.

De nombreuses méthodes ont été testées pour cette étape.

#### b-2-1- Extraction sur les pédivéligères prélevées lors du transfert pour captage

L'étude a débuté par les individus prélevés lors de la mise en fixation.

Les pédivéligères ont été **isolées une à une** de façon aléatoire dans des tubes de 0.5 ml contenant de l'éthanol absolu. Lors de cette étape, chaque individu a été numéroté et sa **taille a été enregistrée** au projecteur de profil. Cette opération a été répétée sur environ 50 larves prêtes à se métamorphoser pour chaque pseudo-cohorte.

Deux méthodes ont été testées avec, pour but final, l'amplification de l'ADN :

- ◆ l'extraction de l'ADN au Chélex® **sur larve entière** après évaporation de l'alcool, suivie d'une amplification par PCR;
- ◆ une amplification directe de l'ADN sur les larves entières **sans extraction préliminaire.**

#### b-2-2- Extraction sur les animaux prélevés 45 jours après fécondation

Après avoir été référencés et mesurés, des individus de chaque pseudo-cohorte captés sur brisure ont été isolés dans l'alcool.

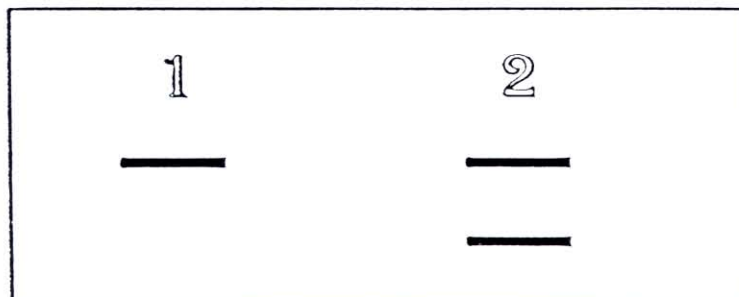
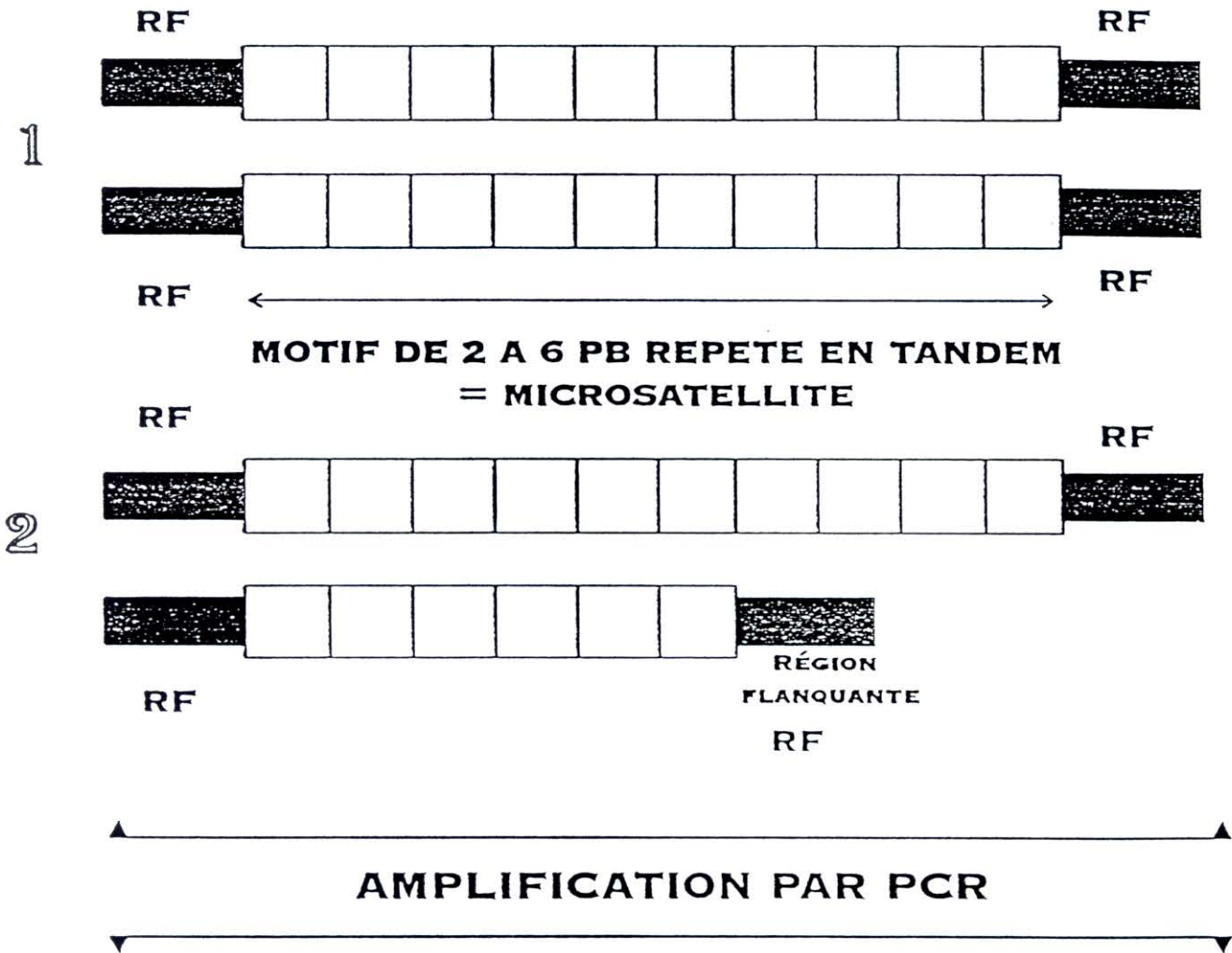
◆ L'extraction a été testée au départ sur les **larves entières**, les animaux étant encore de trop petite taille pour que le tissu puisse être prélevé. Le protocole d'extraction a cependant été légèrement modifié à cette occasion : la quantité de protéinase K a été augmentée étant donné la quantité et la qualité du matériel utilisé (20 µl au lieu de 10). La taille de ces jeunes huîtres, au moins pour ce qui est des 2 premières pseudo-cohortes, a toutefois permis de les transférer dans des tubes secs, limitant ainsi l'étape d'évaporation de l'alcool qui avait été nécessaire pour des animaux plus petits.

- ◆ Une seconde méthode a été testée sur les individus prélevés à j45. Les animaux **ont été broyés** dans l'alcool puis :
  - soit l'alcool a été évaporé et l'extraction effectuée sur le matériel biologique sec;
  - soit un morceau du broyat a été prélevé et stocké dans un tube sec et l'extraction menée tout de suite après.



**Figure 5 : Les marqueurs microsatellites.**

Les individus 1 et 2 se distinguent par le nombre de répétitions du motif. On peut typer ces deux individus par un gel d'agarose et révélation au BET. Ainsi l'individu 1 est homozygote pour le locus microsatellite et l'individu 2 est hétérozygote.



### c- Les microsatellites

Les microsatellites sont des **motifs répétés en tandem de 2 à 5 nucléotides**, d'une longueur totale inférieure à 200 pb (Rassman *et al.*, 1991), qui présentent un polymorphisme dans le nombre de répétitions. Ce sont des séquences non codantes et uniformément réparties dans le génome (Hearne *et al.*, 1992).

L'amplification par PCR de ces microsatellites a pour avantages de permettre de travailler sur de petits échantillons ou sur des animaux de taille très réduite. De plus, contrairement à l'étude des enzymes c'est une technique **non destructive**.

La spécificité d'un locus microsatellite est déterminée par la séquence des **régions flanquantes**, très peu variables, et dont la connaissance est nécessaire à l'amplification. On a utilisé pour *Crassostrea gigas* **trois locus microsatellites** : MSCG 44, MSCG 49 et MSCG 108, dont le laboratoire possède les amorces qui ont été séquencées en Grèce par l'équipe de Zouros (Magoulas, com. pers.).

L'utilisation de ce type de marqueurs a été choisie en raison de son **haut degré de polymorphisme**, permettant une caractérisation fine des individus.

La technique utilisée pour l'étude des microsatellites est la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Legall *et al.*, 1991).

### d- La PCR

#### d-1- Définition

La PCR est une **technique d'amplification spécifique** d'une séquence d'ADN. Elle s'effectue par une succession de cycles thermiques à **3 étapes** :

♦ **La dénaturation** de l'ADN. Elle se fait à 94 °C pendant 1 minute. On obtient ainsi de l'ADN simple brin sur lequel vont pouvoir s'hybrider les amorces.

♦ **L'annealing** ou appariement des amorces aux régions flanquantes du microsatellite. Elle nécessite une température de 53 °C pour les locus CG 44 et CG 49 et de 55 °C pour CG 108, et ce pendant 2 minutes.

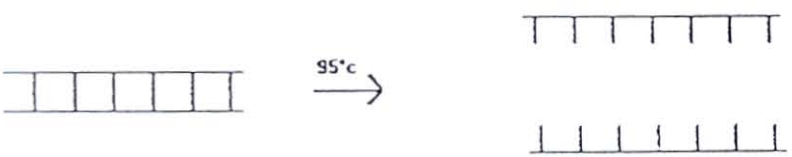
Pour chaque locus, deux amorces sont nécessaires ("forward" et "reverse"). Les brins complémentaires sont donc synthétisés simultanément de façon complémentaire.

♦ La phase d'**élongation** par la **Taq polymérase** se fait à 72 °C pendant 45 secondes. L'ADN est synthétisé dans le sens 5' - 3' suivant la séquence du brin matrice.

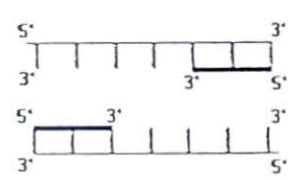
Ces trois étapes sont répétées **30 fois**, le nombre de brins d'ADN étant doublé à chaque fois. On obtient donc théoriquement au final **2<sup>30</sup> brins** d'ADN par molécule présente au départ.

**Figure 6 : Schéma des trois étapes d'un cycle de PCR**  
(d'après Legall et al., 1991)

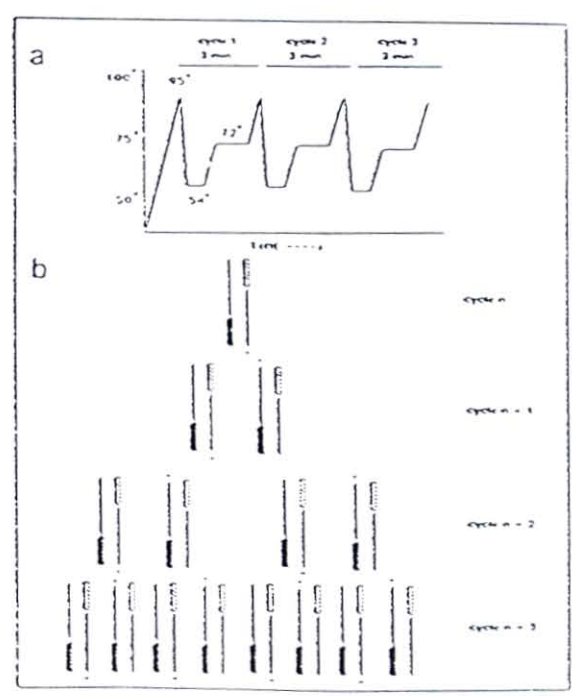
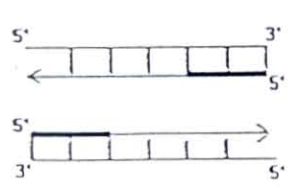
1. DENATURATION DE L'ADN:



2. APPARIEMENT DES AMORCES (température voisine de 50°C):



3. ELONGATION (température de 72°C):



**PROFIL DE TEMPERATURE DE TROIS CYCLES CONSECUTIFS DE PCR**  
(d'après Amheim N. et al., 1990)

L'ensemble des 30 cycles est :

- ◆ précédé d'une **première étape de dénaturation** de 2 minutes à 94 °C,
- ◆ suivi d'une **élongation finale** pendant 7 minutes à 72 °C, pour compléter la synthèse de l'ADN.

Les PCR ont été effectuées dans des thermocycleurs programmables (crocodile II Apligene et NPT 100 MJ Research, Inc.).

#### d-2- Le choix d'une PCR "froide" (non radioactive) ou "chaude" (radioactive)

Elles ont été menées selon la technique décrite ci-avant (Sambrook *et al.*, 1989), sur des individus des générations G<sub>0</sub> et G<sub>1</sub>. le choix de la technique dépend de la résolution souhaitée.

##### d-2-1- Les PCR non radioactives

Elles sont couramment appelées "**PCR froides**".

##### ◆ Amplification de l'ADN extrait des géniteurs

Les trois locus microsatellites ont été tour à tour amplifiés sur l'ADN extrait. Le détail des produits utilisés est décrit en annexe 7.

*Remarque* : Pour s'assurer que l'ADN amplifié est bien celui qui a été extrait des animaux, on ajoute toujours lors de la PCR, un ou plusieurs témoins négatifs pour lesquels l'ADN a été remplacé par de l'eau.

##### ◆ Amplification de l'ADN des individus de la G<sub>1</sub>

Ce sont principalement des larves isolées au moment de la fixation qui ont été utilisées pour amplification de l'ADN aux locus CG44, CG49 et CG108.

##### d-2-2- Les PCR avec marquage radioactif d'une amorce

Cette technique est aussi appelée couramment "**PCR chaude**".

Elle est connue pour donner une **meilleure définition** grâce à la visualisation des résultats par autoradiographie. La manipulation des radioéléments nécessite toutefois de nombreuses précautions.

L'une des deux amorces est ici marquée au <sup>33</sup>P. Le protocole est décrit Annexe 8.

Les trois locus ont été testés, puis, pour des raisons de temps, un choix a du être fait, et la mise au point a été poursuivie uniquement sur le locus **CG44**.

## e- Visualisation des produits d'amplification par électrophorèse

### e-1- Principe

L'ADN amplifié migre dans un champ électrique en fonction de sa taille. La migration dépend de plusieurs paramètres :

- le poids moléculaire de l'ADN
- la concentration du gel en Agarose ou en Polyacrylamide
- le courant appliqué, la résolution étant maximale à 5 V / cm pour les gels d'agarose par exemple.

### e-2- Des techniques plus ou moins résolutive

Plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- ◆ une technique classique sur **gels d'agarose**, assez peu résolutive mais simple à mettre en oeuvre;
- ◆ une technique plus délicate et plus longue à mettre en oeuvre sur gel de **polyacrylamide non dénaturant** après une PCR non radioactive;
- ◆ une méthode à haute résolution sur **gel de polyacrylamide dénaturant** après une PCR radioactive. Cette méthode requiert des mesures de sécurité sévères pour la manipulation des radioéléments.

Ces techniques permettent l'analyse de fragments dont la taille est inférieure à 1 kb (Maniatis *et al.*, 1975) comme c'est le cas pour les microsatellites.

#### e-2-1- Visualisation sur gel d'agarose

##### ◆ Généralités

Après une PCR non radioactive, la **vérification de la présence d'ADN** amplifié se fait en routine sur **minigel d'agarose 1%**. Ceci permet simplement de confirmer le bon déroulement de l'extraction. En effet l'électrophorèse sur agarose ne permet **pas une séparation fine** des microsatellites.

L'avantage est que la présence des acides nucléiques peut être visualisée directement par **addition de BET** (Bromure d'éthidium) qui s'intercale entre les bases (Annexe 9) et qui fluoresce sous UV (260 nm).

Nous avons principalement utilisé des gels à 1% d'agarose, résolutifs pour des fragments compris entre 0.5 et 7 kb (migration 30 min à 50 V).

D'autres essais ont été faits sur gel de **Nu Sieve** (low melting point SIGMA) avec une **meilleure résolution** mais aussi un coût plus élevé et une manipulation plus délicate. Les concentrations alors utilisées ont varié entre 3 et 4 %.

#### ◆ Technique

L'agarose est coulé dans une minicuve horizontale d'environ 30 ml. Un peigne à nombre variable de dents est inséré dans le gel. Après polymérisation, celui-ci est retiré, libérant les puits où vont être déposés les échantillons d'ADN issus de l'amplification. Le gel est baigné dans une solution **tampon de TAE 1 fois concentré**.

On dépose :

- **5 µl d'ADN** auquel on a rajouté 1 µl de bleu de dépôt destiné à faciliter la précipitation de l'échantillon au fond du puits et à permettre de visualiser la migration;
- 6 µl de marqueur de taille moléculaire dans les puits situés de part et d'autre des échantillons. Le plus couramment utilisé est le marqueur 100 pb (Annexe 10).

### e-2-2- Visualisation sur gel de polyacrylamide (Annexe 11)

#### ◆ Généralités

Ces gels ont été utilisés après des PCR classiques ou en radioactivité à une concentration de **8% d'acrylamide**, ce qui permet de séparer des fragments de 60 à 400 nucléotides. L'un des problèmes posés par cette méthode, outre la manipulation plus complexe que pour l'agarose, est sans nul doute la **toxicité de l'acrylamide**, et la **manipulation délicate des radioéléments** pour les PCR avec marquage d'amorces.

La polymérisation de ces gels se fait par addition de TEMED et d'APS (Annexe 12).

La principale différence entre les gels utilisés après les deux types d'amplification provient de la composition du produit. Ainsi, les gels destinés à recevoir les produits radioactifs contiennent de **l'urée**, alors que les gels utilisés après PCR "froide" n'en renferment pas. En effet, les premiers sont appelés « **gels dénaturants** » puisque destinés à recevoir de l'ADN qui a subi au préalable une dénaturation pendant 8 minutes à 94 °C. Les électrophorèses sur polyacrylamide après PCR non radioactives se font en conditions non dénaturantes, et donnent une moins bonne résolution.

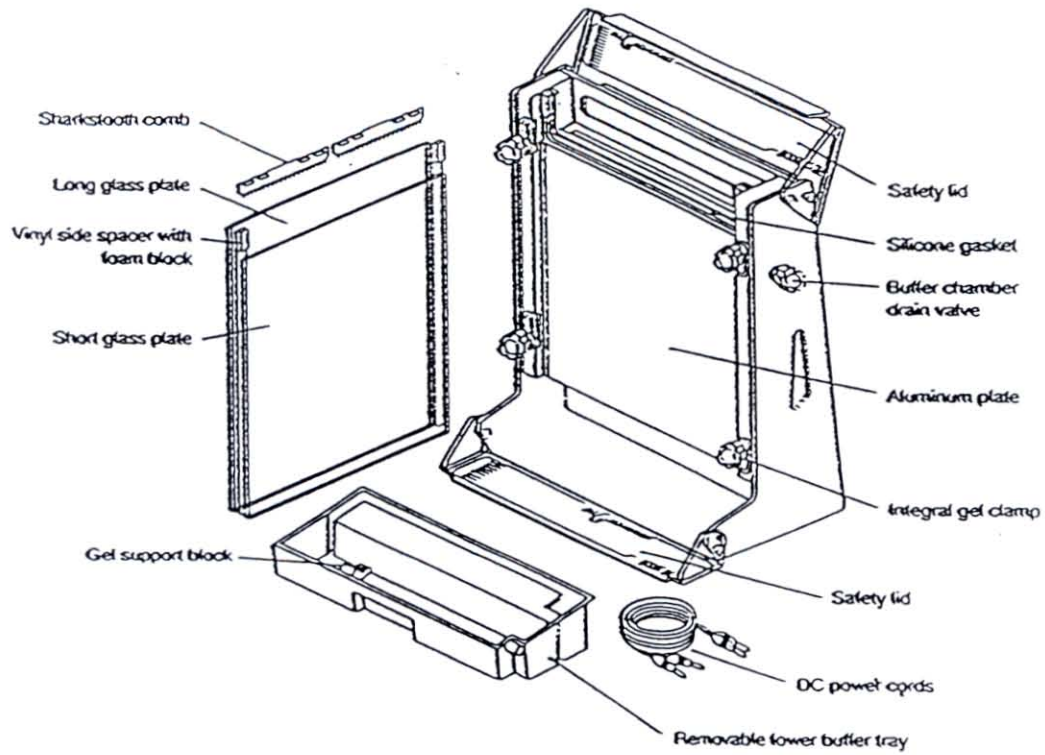
De plus la visualisation des résultats se fait par ajout de BET pour les gels dénaturants et par autoradiographie pour les gels dénaturants.

#### ◆ Technique

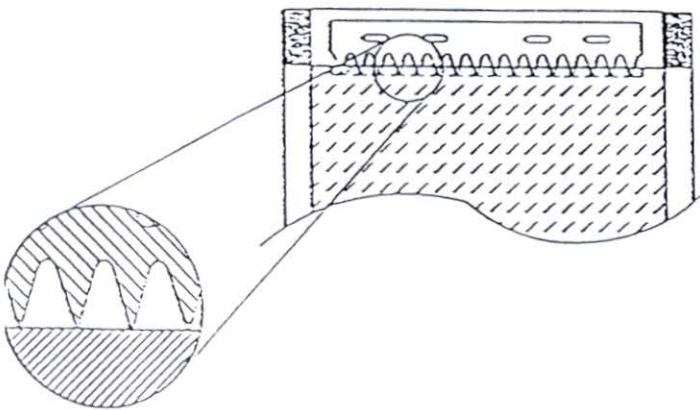
##### - Pour les gels non dénaturants

Le gel de polyacrylamide est **coulé à l'horizontale** entre deux plaques de verre espacées d'environ 1.2 mm. Un peigne est déposé à l'envers à la surface du gel de façon à former une encoche.

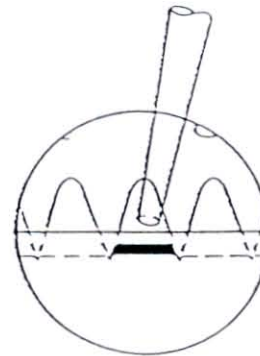
**Figure 7 : L'électrophorèse après une PCR radioactive**



**Schéma de la cuve verticale d'électrophorèse radioactive.**



Formation des puits  
avec le peigne à dents requin



Dépot de l'échantillon d'ADN.

Une fois polymérisé, le gel est placé dans la cuve à électrophorèse verticale contenant une solution de tampon (TBE 1 fois concentré). Le peigne est enlevé afin de permettre le dépôt de l'ADN.

Les dépôts sont effectués de même que pour l'agarose, le volume étant de **8 µl d'ADN et 1 µl de bleu**.

Lorsque la migration est suffisante, le gel est récupéré et baigné 30 minutes dans le BET pour **lecture sous UV**.

#### - Pour les gels dénaturants après PCR en radioactivité

Le gel est coulé entre deux plaques séparées de 0.4 mm, et le peigne disposé comme précédemment. Les dépôts sont de **4 µl (ADN + Tampon de dépôt)**. La solution de tampon utilisée dans ce cas est du TBE 0.5 fois concentré.

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et récupéré sur du papier Whattman. Il est ensuite séché dans un appareil relié à une pompe à vide (Gelpump GP 110 Savant). Lorsqu'il est sec il est placé dans une cassette opaque avec un **film autoradiographique** (Kodak Biomax) sur lequel il va émettre des rayonnements. Au bout de 24 heures, il reste à développer le film impressionné et à en faire une lecture.

Les diverses solutions utilisées au cours de cette étude sont présentées en annexe 12.

### 3/ L'analyse statistique

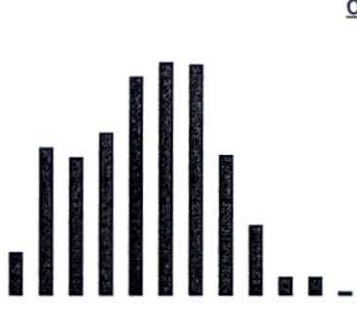
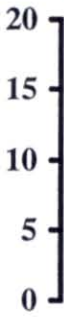
Les différents tests statistiques ont tous été effectués à l'aide du logiciel SAS 6.03 (SAS Institute). Les statistiques descriptives et les tests de normalité ont été effectués par la procédure UNIVARIATE. Les analyses de variance et les régressions ont été faites grâce à la procédure GLM, les test T par la procédure TTEST et les tests de Chi<sup>2</sup> avec la procédure FREQ.



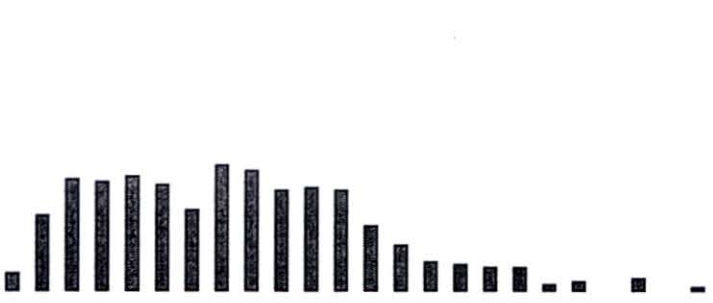
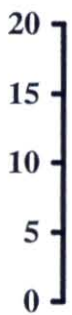
**Figure 8 :** Distribution des poids totaux pour les cinq populations de géniteurs

Seudre

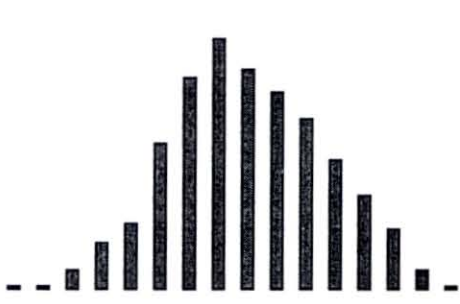
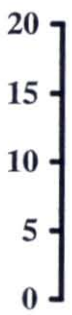
Effectifs



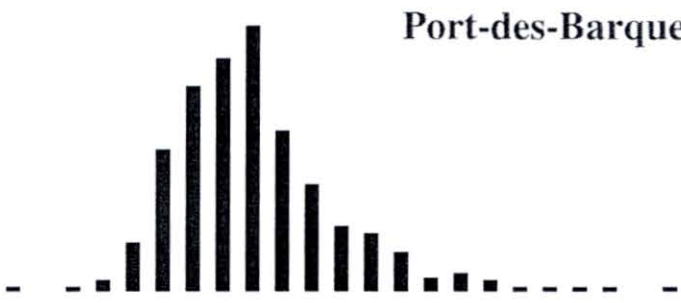
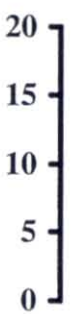
Bonne Anse



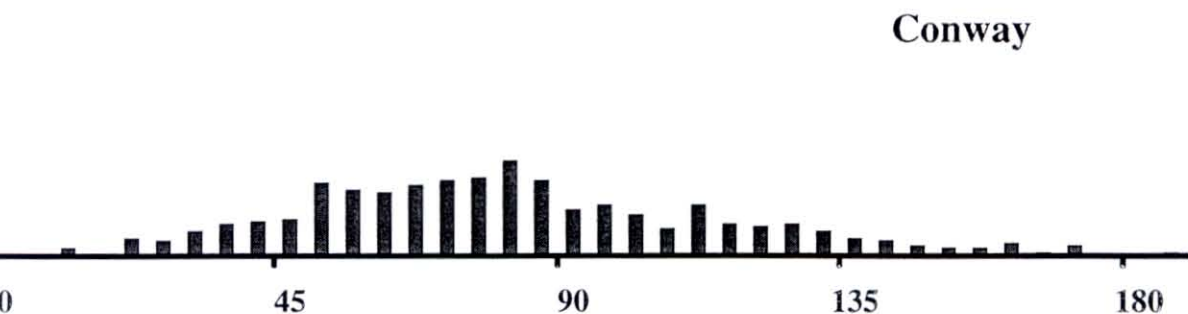
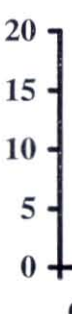
Arcachon



Port-des-Barques



Conway



Poids totaux en g

## V RESULTATS

### 1/ Zootechnie

#### a- L'échantillonnage des géniteurs

##### a-1- Les poids totaux individuels

Le prélèvement des géniteurs a été effectué comme prévu chez les ostréiculteurs à raison d'une moyenne de **565 individus par population** concernant les animaux des quatre origines françaises. Comme on l'a déjà précisé, il a été demandé que ces animaux appartiennent à une même année de captage. Seuls 485 individus ont été prélevés à Conway, abaissant la moyenne d'échantillonnage pour le programme "Link" à **549 individus par population**.

**Tableau 1 : Données concernant les poids totaux des géniteurs pour les programmes "Genephys" et "Link"**

<b>population</b>	<b>numéro correspondan t</b>	<b>effectif</b>	<b>poids moyen (g)</b>	<b>écart-type</b>	<b>poids min (g)</b>	<b>poids max (g)</b>	<b>Test de Non Normalité</b>
Seudre	1	577	34,4	11,2	15	75	0,0001
Port des Barques	2	586	107,7	13,3	70	185	0,0001
Bonne Anse	3	501	64,7	22,2	30	145	0,0001
Arcachon	4	596	87,5	13,2	50	130	0,0422
<b>Total Genephys</b>		<b>2260</b>	<b>73,58</b>	<b>14,98</b>	<b>15</b>	<b>185</b>	
Conwy	5	485	77,95	32,91	6	189	0,0001
<b>Total Link</b>		<b>2745</b>	<b>74,45</b>	<b>18,56</b>	<b>6</b>	<b>189</b>	

Le tableau 1 présente à la fois les poids moyens et les poids minimaux et maximaux afin de mettre en évidence l'hétérogénéité plus ou moins importante existant dans la composition de chaque population.

Les histogrammes présentés sur la figure 8 font apparaître la **distribution des poids totaux** pour ces mêmes lots. Pour une meilleure lecture, les effectifs ont été ramenés à la même échelle sur chacun des graphiques.

Les lots de Bonne Anse (30 à 145 g) et de Conway (6 à 189 g) présentent les amplitudes les plus importantes. Les autres populations semblent avoir une distribution plus proche de la Normale.

Cependant, après **test de Non-Normalité** (Tableau 1), il ressort que la distribution de poids est **très significativement différente de la normale** pour les populations de la Seudre, de Bonne Anse, du Port des Barques et de Conway ( $p < 0.0001$ ), et **significativement différente** de la normale pour les animaux d'Arcachon ( $p < 0.04$ ).

Il semblerait donc que certains lots aient subi un tri plus important que d'autres, contrairement à ce qui avait été demandé aux fournisseurs.

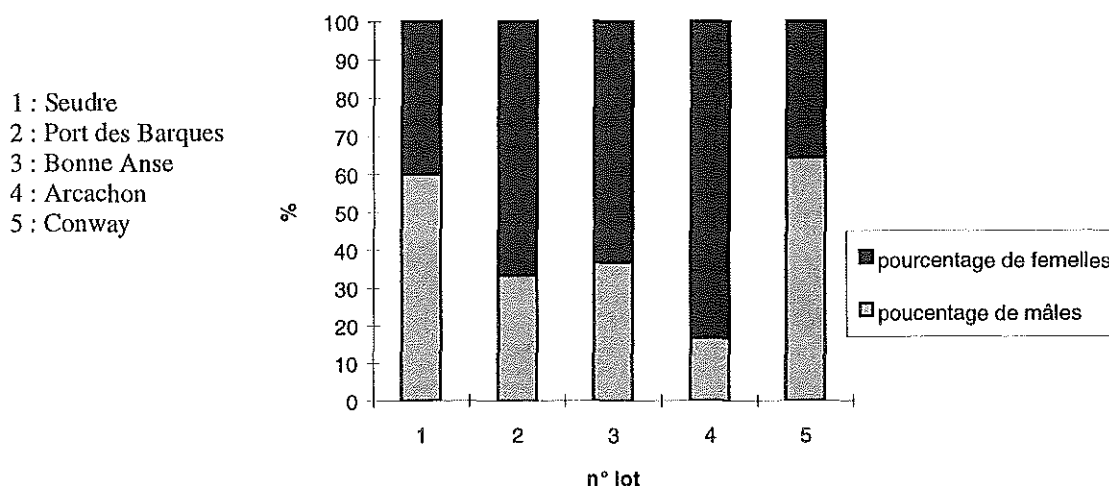
#### a-2- La sex ratio

La sex ratio a été déterminée pour chaque population à partir de 30 individus étudiés en physiologie non destructive. Les résultats sont présentés sur la figure 9 et en annexe 13.

On constate une **grande variation du pourcentage de mâles et de femelles** pour chaque population. Les sex ratio respectivement les plus équilibrés et déséquilibrés semblent être ceux de la Seudre (60/40) et d'Arcachon (15/85 environ).

Un test d'indépendance ( $\chi^2$ ) a été effectué dans ce sens et nous a amenés à conclure qu'il **existe un déséquilibre significatif** du sex ratio ( $p < 0.0001$ ). Cette étude ne nous a pas permis de dire dans quel sens était orienté le déséquilibre.

**Figure 9 : Sex ratio pour les cinq populations de géniteurs**



Un **test d'indépendance** entre population et sex-ratio a également été effectué à partir des effectifs en mâles.

**Tableau 2 : Test d'indépendance pour les proportions de mâles de chaque population de géniteurs**

<u>Statistique</u>	<u>degré de liberté</u>	<u>Valeur</u>	<u>Probabilité</u>
Chi <sup>2</sup>	4	18.89	<b>0.001</b>
Test exact de Fisher			<b>0.007</b>

Les résultats montrent qu'il existe un effet significatif de la population sur le nombre d'individus mâles. Ceci signifie qu'il existe au moins deux populations pour lesquelles les sex ratio sont différents.

*b- Les croisements*

b-1- Le dénombrement des gamètes

**Tableau 3 : Dénombrement des gamètes mâles et femelles pour chaque population de géniteurs**

<u>Sexe</u>	<u>Origine</u>	<u>nombre total de gamètes en millions</u>	<u>nombre de gamètes utilisés en millions</u>
<b>Femelles</b>	Seudre	15	3
	Port des Barques	16,2	3
	Bonne Anse	23,1	3
	Arcachon	22,2	3
	<b>Moyenne Gènephys</b>	<b>19,12</b>	<b>3</b>
	Conway	24,8	3
<b>Moyenne Link</b>		<b>20,26</b>	<b>3</b>
<b>Mâles</b>	Seudre	22 791	300
	Port des Barques	14 930	300
	Bonne Anse	15 190	300
	Arcachon	22 000	300
	<b>Moyenne Gènephys</b>	<b>18,72</b>	<b>300</b>
	Conway	9,34	300
<b>Moyenne Link</b>		<b>16,85</b>	<b>300</b>

Les géniteurs de chaque population ont été ouverts et sexés jusqu'à obtention de 5 mâles et 5 femelles comme il était prévu afin de rendre l'échantillonnage le plus aléatoire possible.

La **moyenne du dénombrement des gamètes** est présentée dans le tableau 3 à la fois pour "Genephys" et "Link".

Le détail de ces comptages pour chaque individu de chaque population est donné dans les tableaux en annexe 14.

#### b-2- Le taux de développement embryonnaire à trois heures

Le taux de développement moyen, toutes populations confondues, est de **87.6%** (Tableau 4).

**Tableau 4** : Taux de développement en % pour les quatre lots de géniteurs français

		<b>Origine mâles</b>				<b>Total</b>
		<i>Seudre</i>	<i>PdB</i>	<i>BA</i>	<i>Arcachon</i>	
<b>Origine femelles</b>	<i>Seudre</i>	89,88	94,32	91,04	93,24	92,12
	<i>PdB</i>	89	85,9	83,84	83,68	85,61
	<i>BA</i>	94,48	94,17	92,65	94,92	94,06
	<i>Arcachon</i>	79,25	78,64	78,76	77,84	78,62
	<b>Total</b>	88,15	88,26	86,57	87,42	<b>87,60</b>

Une analyse de variance à deux facteurs a été effectuée pour définir les **effets de différents paramètres sur le taux de développement**. Les résultats sont les suivants :

- ◆ Le **test choisi s'adapte** aux données de façon très significative ( $p < 0.0001$ ). On peut donc prendre les résultats suivants en compte.

**Tableau 5** : Analyse de variance sur les quatre populations françaises

<b>Facteur</b>	<b>Valeur de F</b>	<b>Probabilité</b>
Population mâle	1.42	0.2362
Population femelle	103.87	0.0001
Individu mâle	2.47	0.0014
Individu femelle	108.41	0.0001

Remarque : on appelle "population femelle" l'ensemble des femelles appartenant à une même origine. Il existe donc quatre "populations femelles" (populations de la Seudre, de Port des Barques, de Bonne Anse et d'Arcachon) pour le programme "Genephys".

♦ Il existe un **effet très significatif** ( $p < 0.0001$ ) **des individus femelles** sur le taux de développement, à la fois au niveau population et au niveau individuel.

Il existe un **effet significatif des individus mâles** sur le taux de fécondation ( $p < 0.0014$ ).

L'effet de la population mâle sur ce même taux n'est pas significatif ( $p < 0.23$ ).

**Conclusion** : le taux de fécondation varie selon :

- la population pour les femelles
- les individus femelles
- les individus mâles

La population mâle n'entre pas en jeu dans les variations du taux de fécondation.

On peut supposer que la qualité des gamètes a un effet sur le taux de fécondation. Si c'est le cas, il semble que la qualité des ovocytes soit variable selon l'origine des animaux alors que celle des spermatozoïdes ne semble dépendre que des individus et non de la population à laquelle ils appartiennent.

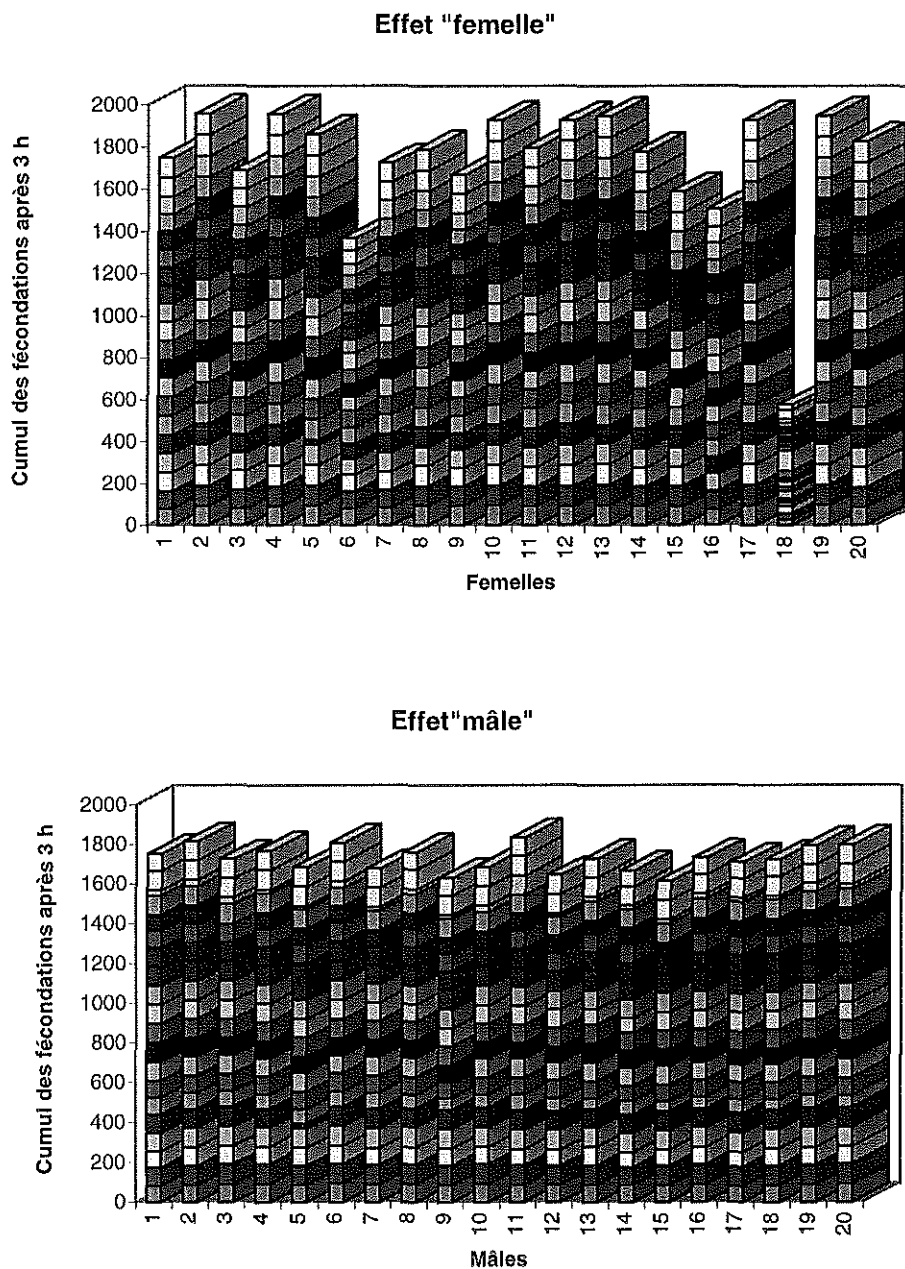
L'huître creuse est une espèce hermaphrodite successive, ce qui signifie que les individus mâles et femelles sont les mêmes. Il est donc étonnant de constater que la qualité des gamètes femelles peut avoir un effet sur le taux de fécondation alors que celle des gamètes mâles n'en a apparemment pas. On peut supposer que l'étude effectuée n'a pas permis de mettre en évidence cet effet, ce qui ne veut pas dire qu'il n'existe pas.

♦ Après comparaison des **populations femelles** entre elles, les moyennes des taux de fécondation pour les 4 populations françaises ont été trouvées **significativement différentes entre elles**.

Le même test pour les populations mâles confirme qu'il n'existe pas de différence significative du taux de fécondation entre ces populations.

La figure 10 est une schématisation des effets mâles et femelles pour l'ensemble des géniteurs. Elle laisse apparaître très clairement l'effet femelle (significatif à  $p < 0.0001$ ) au niveau individuel, l'effet mâle étant moins visible (significatif à  $p < 0.0014$ ).

**Figure 10** : Effets mâle et femelle sur le taux de développement embryonnaire à 3 heures pour les 40 géniteurs du programme "Genephys"



### c- L'élevage larvaire

#### c-1- Le taux d'éclosion

Des comptages de larves ont été effectués à j<sub>1</sub> (premier jour après fécondation), et rapportés au nombre d'ovocytes utilisés pour le croisement. On en déduit **les taux d'éclosion** résumés ci-après.

**Tableau 6 : Taux d'éclosion pour les différents lots en élevage**

<b>Population</b>	<b>nombre d'ovocytes</b>	<b>nombre de larves</b>	<b>taux d'éclosion</b>
	<b>à j<sub>0</sub></b>	<b>à j<sub>1</sub></b>	
<b>Genephys</b> (lots 1, 2, 3 et 4)	60 000 000	16 240 000	<b>27,1%</b>
<b>Link</b> lot 1 (Seudre)	15 000 000	6 320 000	42,1%
lot 2 (Port des Barques)	15 000 000	4 680 000	31,2%
lot 3 (Bonne Anse)	15 000 000	4 850 000	32,3%
lot 4 (Arcachon)	15 000 000	4 507 000	30,0%
lot 5 (Conway)	15 000 000	5 363 000	35,8%
moyenne	15 000 000	5 144 000	<b>34,3%</b>
<b>Moyenne</b>			<b>30,7%</b>

On obtient une moyenne, tous lots confondus, de **30,7 %**, et des taux d'éclosion pour les élevages "Genephys" et "Link" respectivement de 27 et 34 %.

Les effectifs figurant dans le tableau 6 sont les moyennes estimées à partir des comptages effectués dans trois prélèvements. Le test du Chi<sup>2</sup> (test d'indépendance) permettant de savoir si les taux d'éclosion calculés pour les lots "Link" diffèrent entre eux n'a pu être effectué car les données brutes (nombre de larves comptées) nécessaires pour ce type de test n'ont pas été enregistrées.

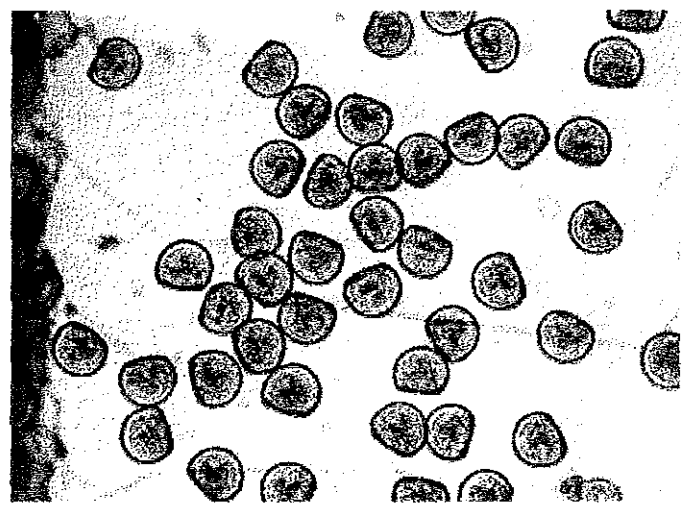
#### c-2- Le pourcentage de larves anormales à j<sub>1</sub>

Le taux de larves anormales des élevages "Genephys" peut être considéré comme négligeable. Seules les données enregistrées pour les cinq lots "Link" figurent dans le tableau 7.

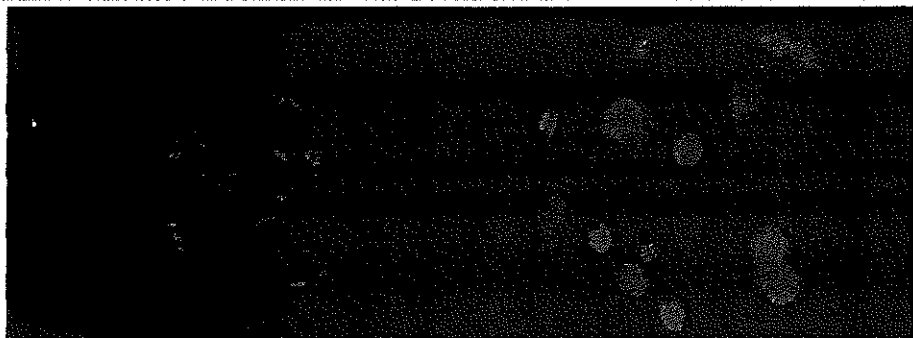


# LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE CHEZ CRASSOSTREA GIGAS

## N°1 : Larves D d'huître creuse *Crassostrea gigas*



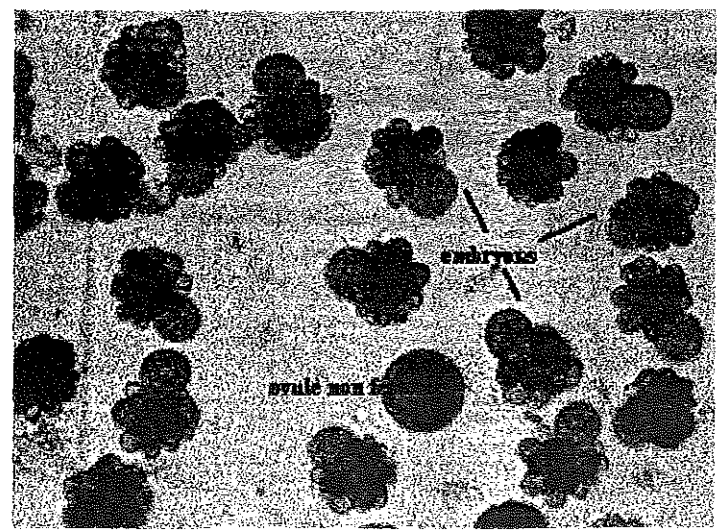
## N°2 : Contrôle du développement embryonnaire par épifluorescence



Ovule non fécondé

Ovule fécondé (embryon)

## N°3 : Embryons de *Crassostrea gigas*



**Tableau 7 : Pourcentage de larves anormales pour les cinq lots d'élevage du programme Link**

<u>n° de lot</u>	<u>nombre de larves anormales</u>	<u>% de larves anormales</u>
1	30 000	0.47
2	146 000	3.02
3	48 000	0.98
4	26 000	0.57
5	30 000	0.46
<b>moyenne</b>	<b>56 000</b>	<b>1.03</b>

c-3- Le suivi de l'élevage larvaire

c-3-1- L'état de l'élevage larvaire à j<sub>1</sub>

Le nombre de larves en élevage pour les lots des deux programmes est rapporté dans le tableau en annexe 15.

Pour assurer une meilleure homogénéité des lots, le nombre de larves a été ajusté dès j<sub>1</sub> à 1500000 pour chacun, soit une densité de **10 larves par ml au départ**.

c-3-2- Le suivi de l'élevage larvaire

Les différents paramètres ayant trait à l'élevage larvaire sont recensés dans les tableaux en annexe 16 pour Genephyss et Link.

Le suivi des larves (nombre, densité, tailles) ainsi que les **conditions d'élevage** (température, salinité, nourriture distribuée) y sont regroupés.

Un second **contrôle de la quantité de larves** en élevage a été effectué à j<sub>10</sub>, par ajustement à 500000 larves pour chaque lot.

La densité à ce moment était par conséquent de **3 larves par ml**.

Une chute soudaine du nombre d'animaux a été constatée à j<sub>13</sub> pour le **lot 2** de "Genephyss". Un problème sanitaire indéterminé serait à l'origine de ces pertes qui ont amené le lot 2 en fin d'élevage à une densité de 0.6 larves / ml.

Les densités des autres lots "Genephyss" sont restées assez homogènes durant tout l'élevage larvaire (2.6, 1.5 et 2.5 larves / ml respectivement pour les lots 1, 3 et 4).

Les cinq lots "Link" avaient quant à eux, en fin d'élevage larvaire, des densités assez différentes, et ce malgré l'ajustement effectué à j<sub>10</sub> comme pour "Genephyss".

Les densités varient en effet à ce stade de 1 à 4,4 larves/ml.

Les tailles minimales et maximales pour chaque lot à chaque séance de comptage sont également présentées en annexe 16.

Elles sont la preuve qu'à aucun moment la queue de lot n'a été écartée, l'hétérogénéité des tailles ayant ainsi pu être conservée.

### c-3-3- Le taux de survie

En complément des données d'élevage larvaire, les taux de survie pour chaque lot de "Genephyss" sont présentés tableau 8A jusqu'à ajustement à 500 000 larves par lot. Le tableau 8B présente l'évolution du nombre de larves en élevage à la suite de ce même ajustement.

**Tableau 8A : Taux de survie pour les quatre lots du programme Genephyss avant ajustement**

Jour d'élevage	Taux de survie en %			
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4
1	100	100	100	100
3	92,6	116,4	90	135,3
6	96,6	82,6	80,6	130
8	90,6	93,3	98	99,6

La survie moyenne pour les quatre lots au huitième jour d'élevage est de 95,4 %.

**Tableau 8B : Taux de survie pour les quatre lots du programme Genephyss après ajustement**

Jour d'élevage	Taux de survie en %			
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4
10 *	100	100	100	100
13	82	26	72	126
15	88	18	70	78
17	80	18,4	52	76,4

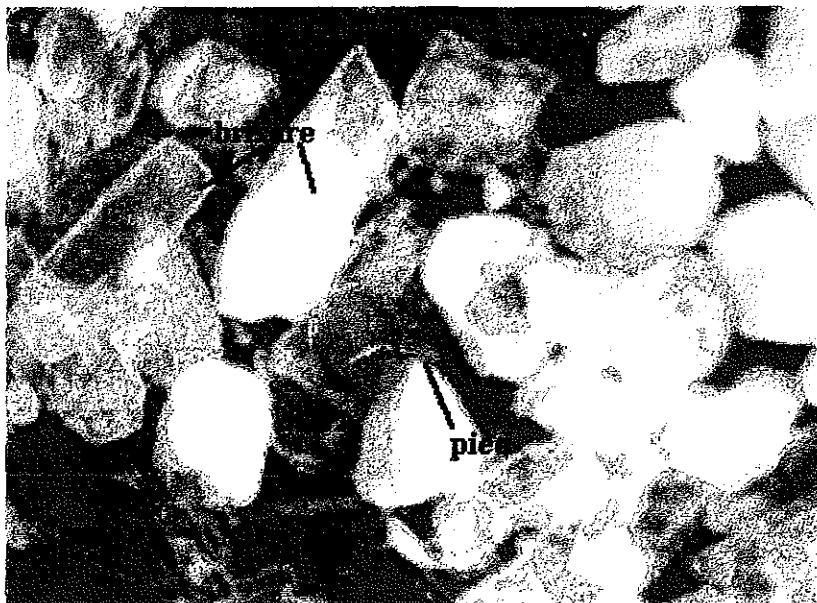
\* : ajustement à 500 000 larves par lot

La survie moyenne pour les quatre lots est de 56,7 % si l'on prend comme effectif de départ 500000 larves par lot après ajustement. Si on exclut le lot 2, la moyenne est alors de 69,5 %.

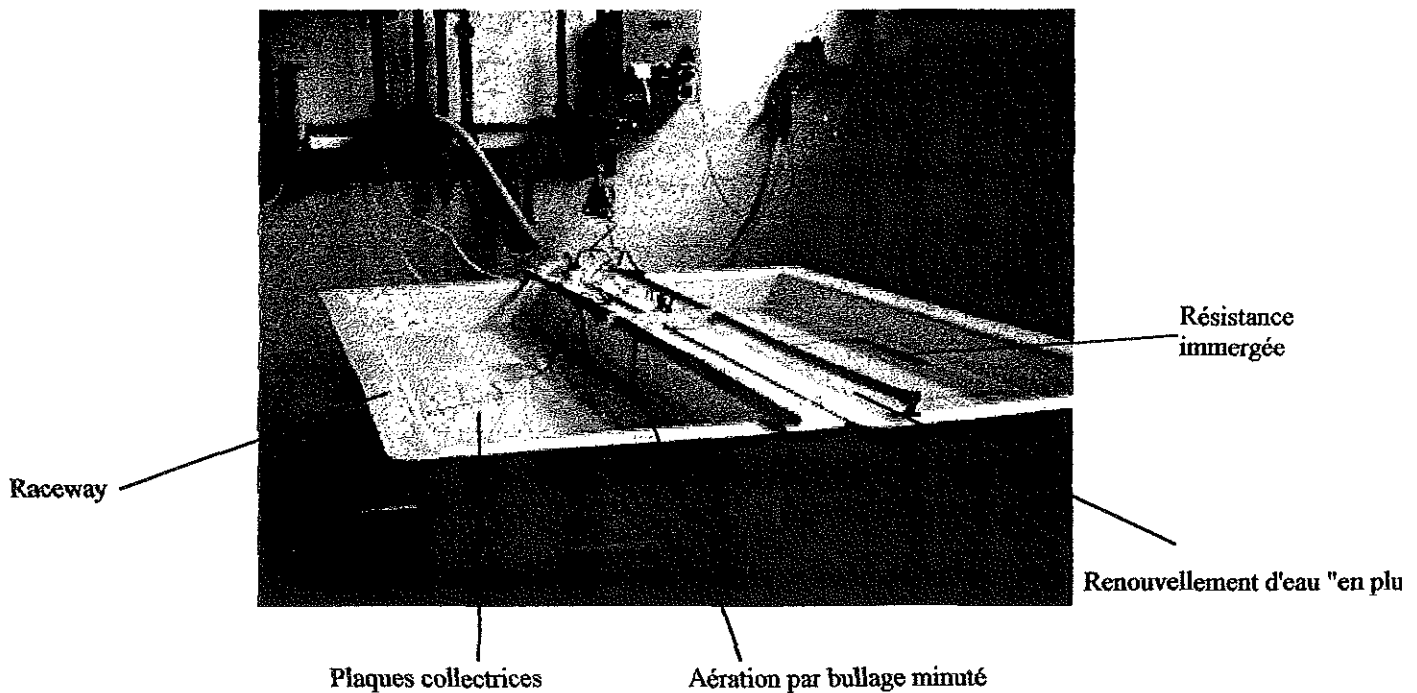
Ces résultats mettent clairement en évidence le problème intervenu sur le lot 2 entre j<sub>10</sub> et j<sub>13</sub>.

## LA MISE EN FIXATION

### N° 4 : Pédiveligère à la recherche d'un support pour se fixer



### N° 5 : Installation utilisée pour le captage sur plaques collectrices



Le tableau 9 résume les mêmes données pour les cinq lots "Link". Les taux de survie sont assez hétérogènes à j 20 puisqu'ils varient, après ajustement, de 31 % pour le lot 1 (Seudre x Seudre) à 132 % pour le lot 4 (Arcachon x Arcachon). Ces taux de survie supérieurs à 100 % peuvent être dus à l'erreur liées à l'estimation lors des comptages par différents manipulateurs.

**Tableau 9 : Taux de survie pour les cinq lots du programme Link**

<u>Jour d'élevage</u>	<u>lot 1 Seudre</u>	<u>lot 2 Port des Barques</u>	<u>lot 3 Bonne Anse</u>	<u>lot 4 Arcachon</u>	<u>lot 5 Conway</u>
1	100	100	100	100	100
3	89.8	106.9	78.7	96.7	71.3
6	87.3	106.7	86.7	100	70.7
8	75.3	85.3	73.7	80	48.7
10	36.7	36.7	41.3	50	40.0
13	100	100	100	100*	100*
15	62.8	76.8	128.8	91.4	107.4
17	64	58	116	98	84
20	31	50	132	108.6	96

\* ajustement à 500 000

On obtient pour les cinq lots "Link" une survie moyenne au vingtième jour après ajustement de 83.52 %. A j 17, ce même taux est de 84 %, ce qui est bien supérieur aux 56.7 % obtenus en moyenne pour les 4 lots "Genephyss" à la même date.

#### d- Le captage sur plaques

##### d-1- La mise en fixation

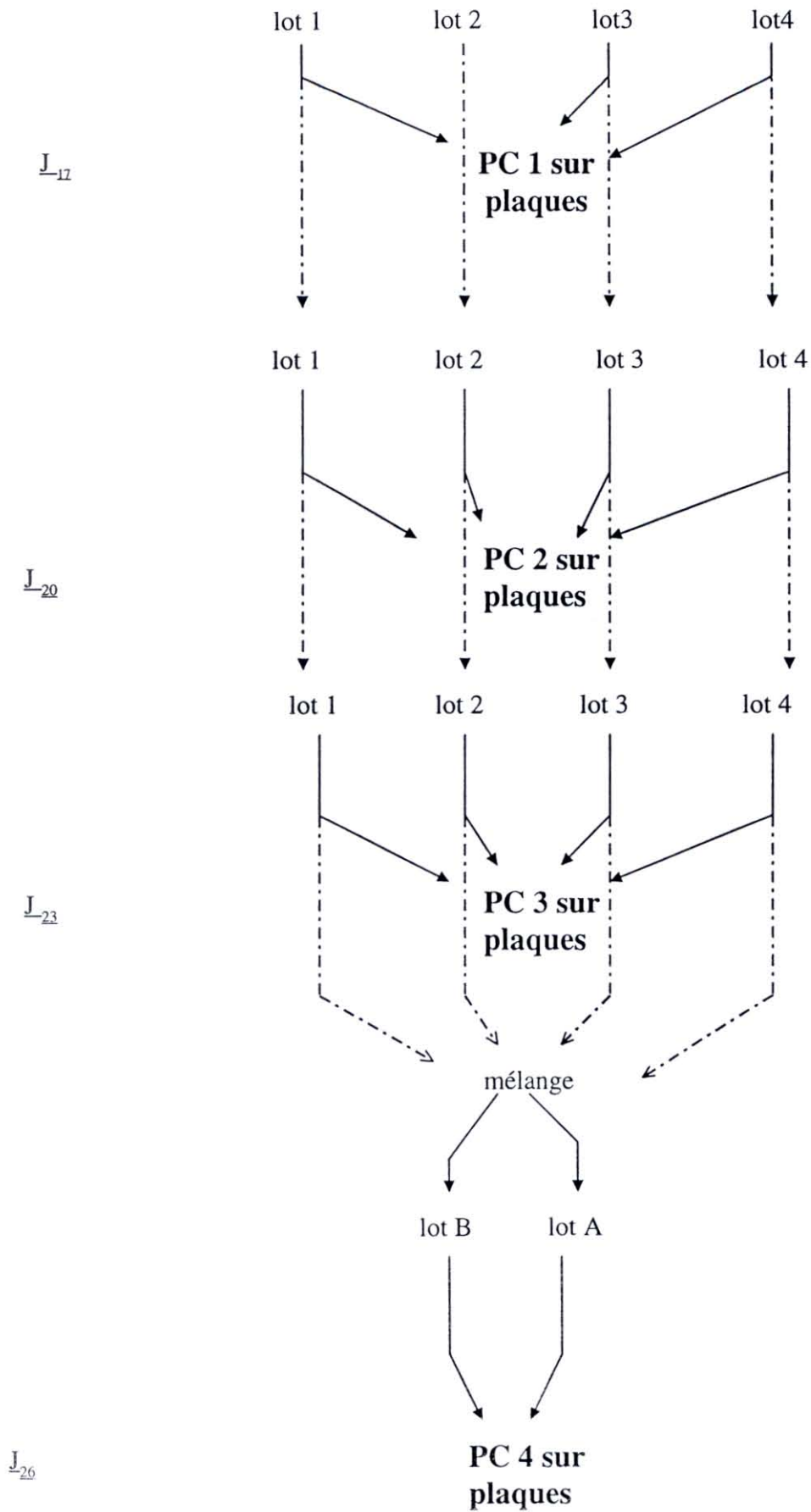
##### d-1-1- "Genephyss"

L'obtention des pseudo-cohortes de "Genephyss" a été menée comme présentée dans le paragraphe Matériel et méthodes.

**Quatre tamisages sélectifs** ont donc été effectués, définissant ainsi **4 pseudo-cohortes**. Le dernier tamisage a permis la mise en fixation de toutes les larves encore en élevage.

Le déroulement des captages est résumé en annexe 17. Il présente la quantité de pédivéligères mise en fixation sur plaques et sur brisure à chaque filtration.

**Figure 11** : Shématisation de la composition de chaque pseudo-cohorte



Comme nous l'avons signalé précédemment, le lot 2 a vu sa densité chuter brutalement. Par conséquent, au départ des filtrations, seuls les lots 1, 3 et 4 ont été mélangés, et le résultat du tamisage mis à capter sur plaques. Les pédivéligères du lot 2 ont été récupérées de la même façon, mais elles ont été fixées sur brisure. Les animaux du lot 2 n'entrent donc en aucune façon dans la composition de la première pseudo-cohorte (figure 11).

Au contraire, la seconde pseudo-cohorte résulte de la filtration des 4 lots et de la mise en fixation des larves recueillies en mélange.

Par la suite, le reste des 4 lots a été mélangé et remis en élevage et les tamisages poursuivis. Les deuxième, troisième et quatrième cohortes résultent donc du captage des individus de tous les lots. Seule la pseudo-cohorte numéro 1 se distingue des autres par sa composition.

Le nombre d'individus récoltés à **chaque tamisage a conditionné le nombre de plaques collectrices** placées en raceways pour chaque pseudo-cohorte.

Le petit nombre de collecteurs utilisé pour la pseudo-cohorte 1 s'explique par le fait que le lendemain de la mise en fixation, les larves apparaissant "immobiles", celles qui n'étaient pas encore fixées ont été récupérées et déposées sur brisure par crainte de l'échec complet du captage. Il s'est avéré par la suite que la fixation sur brisure avait été excellente, l'immobilité des larves n'ayant donc en rien entamé le processus de métamorphose.

Pour les autres pseudo-cohortes, les **plaques ont été changées régulièrement** jusqu'à fixation d'un maximum de larves (figure 12). Ceci explique qu'elles soient en nombre plus important.

#### d-1-2- "Link"

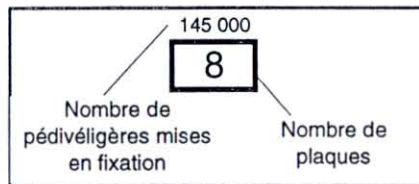
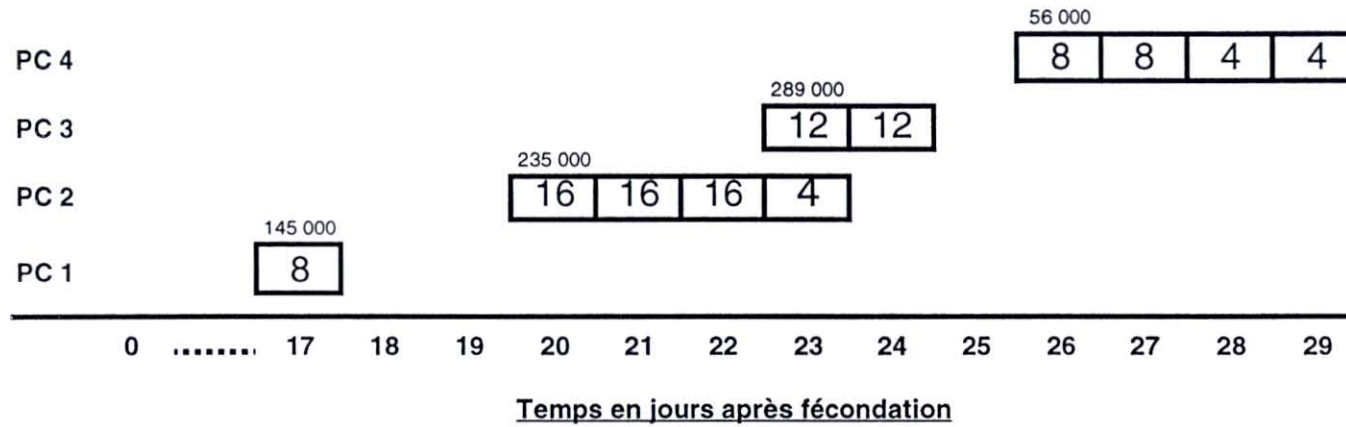
Le protocole et les dates de captage des lots "Link" sont présentés en annexe 18. Le but n'était pas ici d'obtenir des pseudo-cohortes. C'est pourquoi la totalité de chaque lot a été mise en fixation simultanément sur brisure lorsqu'il a été jugé qu'ils contenaient une proportion assez importante de larves oeillées.

#### d-2- Les résultats du captage sur plaques

**Tableau 10 : Taux de fixation pour les quatre pseudo-cohortes sur plaques**

<u>Pseudo-cohorte</u>	<u>nombre de pédivéligères mises en fixation</u>	<u>nombre d'individus fixés</u>	<u>Taux de fixation</u>
PC 1	145 000	1559	1,08%
PC 2	235 000	5244	2,23%
PC 3	289 000	6016	2,08%
PC 4	56 000	980	1,75%
<b>moyenne</b>	181 250	<b>3 450</b>	<b>1,78%</b>

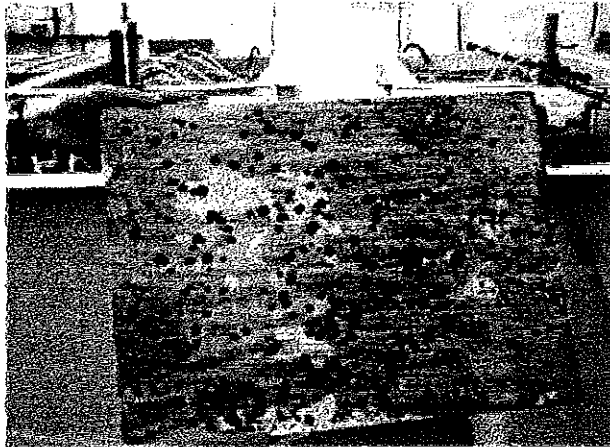
**Figure 12 :** Le déroulement du captage en pseudo-cohortes





## LES RESULTATS DU CAPTAGE

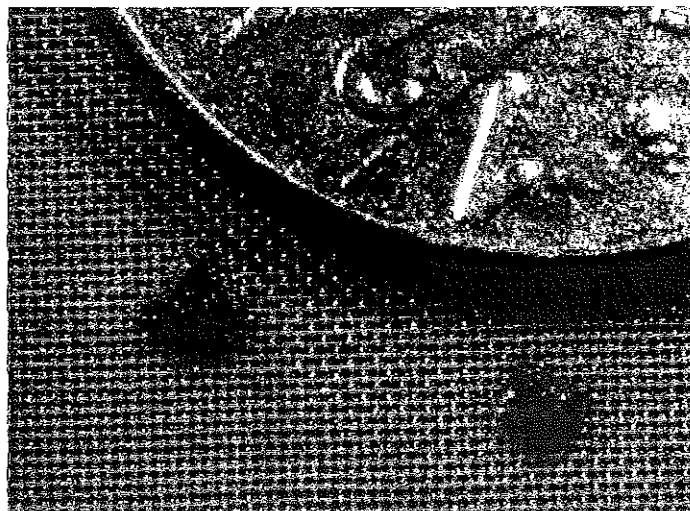
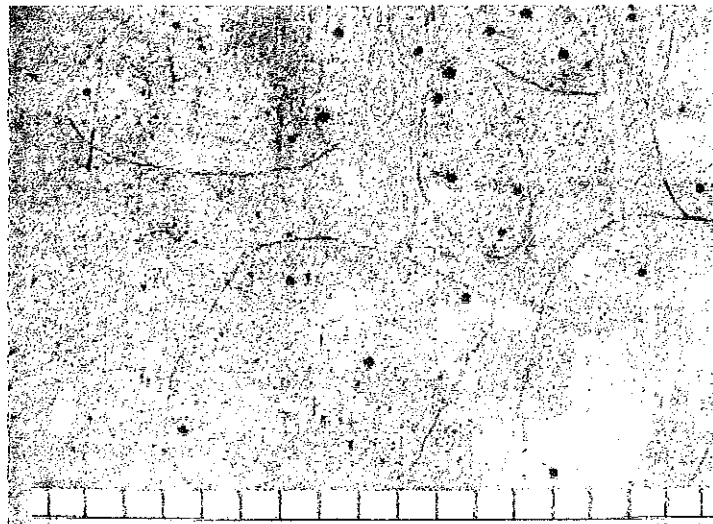
N° 6 : Un exemple de plaque collectrice après captage



N° 7 : Structure de stockage des plaques collectrices



N° 8 : Méthode de comptage des animaux sur chaque plaque. Un ensemble compte 5 individus

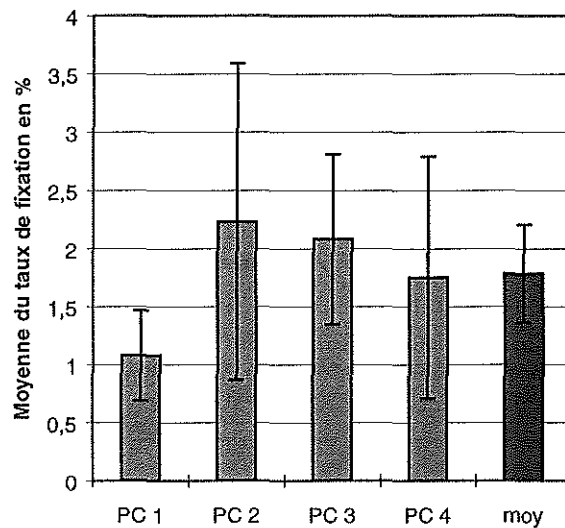


N° 9 : Deux huîtres mises à capter sur brisure (fixées dans la maille du tamis)

Un bilan a été effectué pour estimer le taux de captage des différentes pseudo-cohortes. Les animaux fixés sur chaque plaque ont ainsi été dénombrés pour chaque pseudo-cohorte, et cette quantité rapportée au nombre de larves mises en fixation. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 10 et sur la figure 13.

*Remarque* : le taux de fixation ne prend en compte que les larves qui se sont fixées sur les plaques. De nombreux animaux ont également été retrouvés fixés sur les raceways eux-même malgré la couche de parafine dont ils avaient été enduits pour éviter ce problème.

**Figure 13** : Moyenne du taux de fixation par plaque pour chaque pseudo-cohorte  
(les barres d'erreur indiquent les écarts-types)



Le taux le plus faible calculé pour la pseudo-cohorte 1 s'explique par le fait que la fixation sur plaques a été interrompue pour se terminer sur brisure.

La moyenne du taux de captage pour l'ensemble des lots "Genephys" est compris entre 1 et 2 %.

Il faut toutefois rappeler que plus que le taux de fixation, c'est le nombre d'animaux fixés qui nous importe dans ce cas, le but étant d'obtenir par cette méthode un effectif suffisant pour pouvoir tirer des individus au sort et assez réduit pour assurer le minimum de contraintes à ces mêmes individus.

Aucune estimation du nombre d'animaux fixés sur brisure pour "Link" et "Genephys" n'a été effectuée. Les larves des 4 lots "Genephys" déposées sur brisure ne devaient en effet servir que d'assurance en cas d'échec de la fixation sur plaques.

Le programme Link ne demandait pas non plus de connaître la quantité exacte de naissain obtenu, le but étant seulement de maintenir les animaux des cinq lots dans des conditions identiques au début et à la fin de l'étude.

### e- Le suivi de croissance en longueur

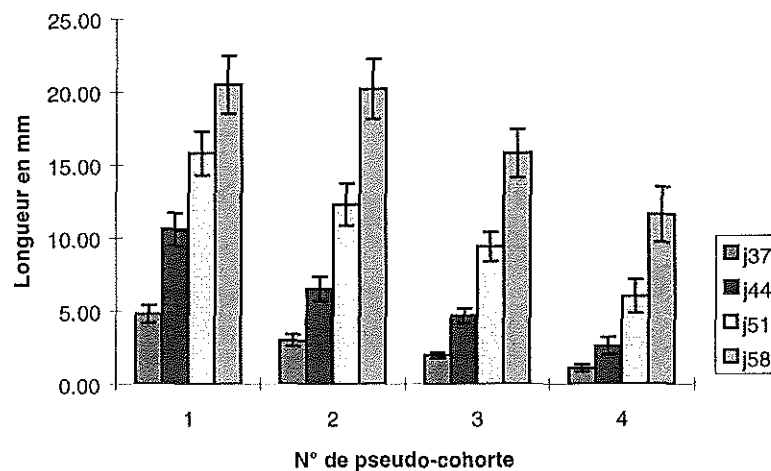
Des mortalités massives sont intervenues lors du suivi de croissance des animaux du programme "Genephys". Après diagnostic par l'équipe de pathologie du laboratoire, il a été trouvé que ces pertes étaient dues à l'Herpès-virus. Ceci a remis en question l'étude en cours puisque deux mesures seulement ont pu être effectuées suite au détroquage des animaux fixés sur plaques, le suivi de croissance ayant par conséquent été abandonné 69 jours après fécondation.

#### e-1- Histogrammes de tailles et de croissance

Les animaux ont fait l'objet de la **première mesure de taille 37 jours après fécondation** soit respectivement :

- ◆ 20 jours après fixation pour la PC 1,
- ◆ 17 jours pour la PC 2,
- ◆ 14 jours pour la PC 3,
- ◆ 11 jours pour la PC 4.

**Figure 14** : Longueurs moyennes des animaux pour chaque pseudo-cohorte à chaque mesure  
(les barres d'erreur représentent les écarts-types)



La figure 14 présente la moyenne des tailles pour chaque pseudo-cohorte lors de chaque mesure, sachant que celles-ci ont été effectuées **4 fois à 7 jours d'intervalle**.

La taille moyenne des 100 individus croît pour chaque pseudo-cohorte, atteignant pour les PC 1 à 4 à la dernière mesure 20,5; 20,2; 15,8 et 11,6 mm.

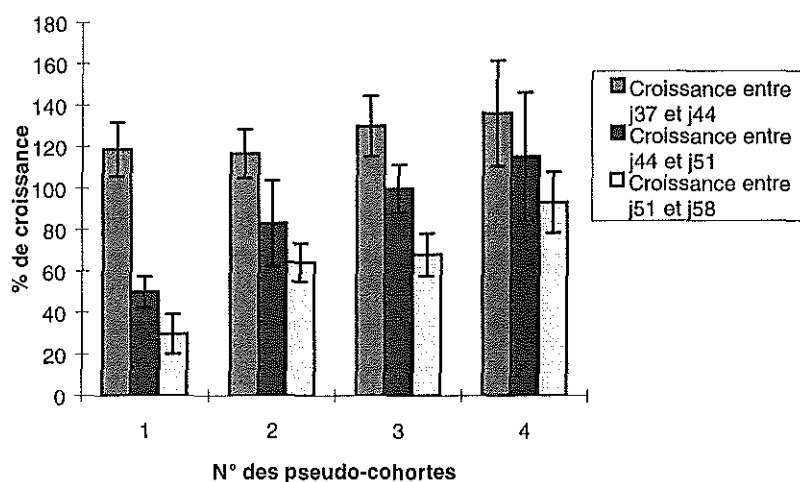
On constate également que le **gain de taille augmente avec le temps** sauf pour la première pseudo-cohorte où le nombre de mm acquis à chaque mesure va en décroissant. Ceci explique qu'à la dernière mesure, la moyenne de tailles de la PC 2 soit très proche de celle de la PC 1.

Ainsi à la fin du suivi les gains moyens de taille en mm étaient respectivement de 4.7, 7.9, 6.4 et 5.6 mm pour les pseudo-cohortes 1, 2, 3 et 4.

On peut observer que **plus une cohorte s'est fixée tôt, plus son gain de taille est important** (figure 14). Ce n'est le cas que pour les 3 dernières pseudo-cohortes, la première semblant déjà dans une phase de ralentissement de croissance.

De plus, on constate que le taux de croissance **décroit au cours du temps**, et ce pour chacune des pseudo-cohortes. Cette baisse paraît assez régulière sauf pour la PC1 où la chute du taux de croissance entre j<sub>37</sub>-j<sub>44</sub> et j<sub>44</sub>-j<sub>51</sub> est beaucoup plus conséquente que pour les autres.

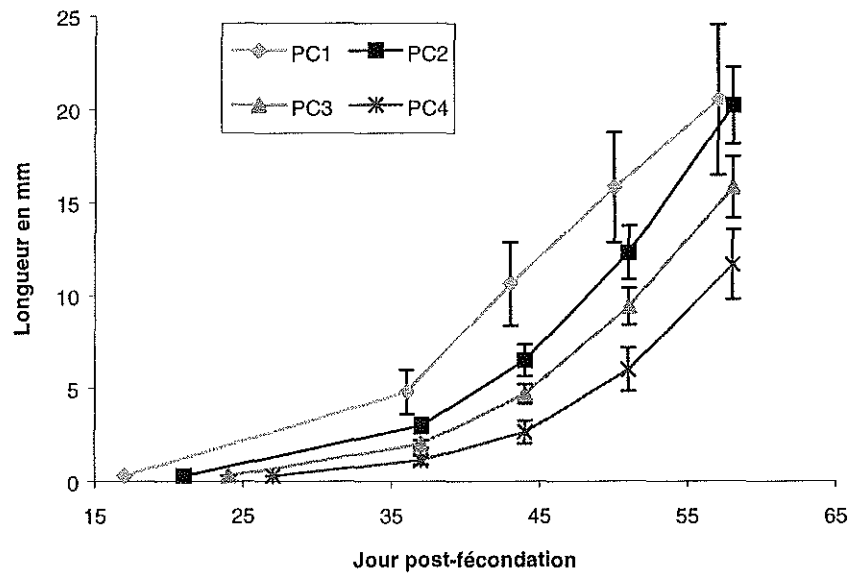
**Figure 15** : Taux de croissance pour chaque pseudo-cohorte  
(les barres d'erreur représentent l'écart-type)



#### e-2- La cinétique de croissance

La figure 16 présente la cinétique de croissance de chaque pseudo-cohorte, le temps étant exprimé en jours après fécondation.

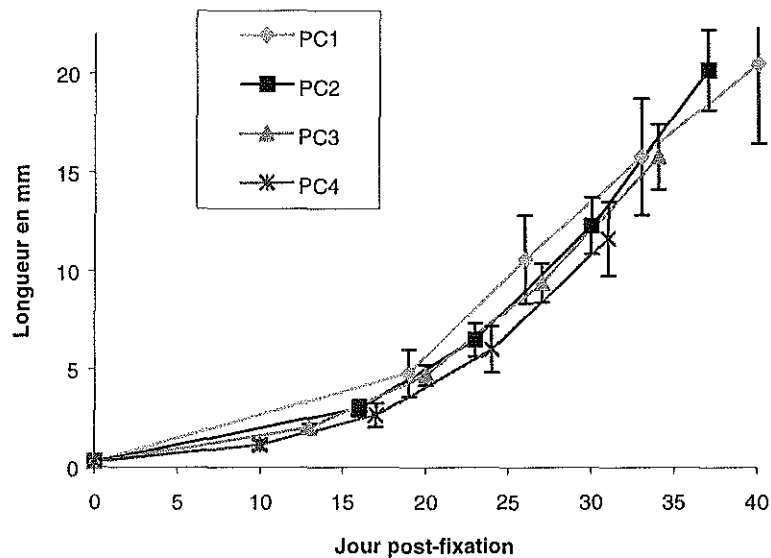
**Figure 16** : Cinétiques de croissance en jours après fécondation  
(les barres d'erreur représentent les écarts-types)



On constate que les croissances des PC 1, 2, 3 et 4 semblent différentes. Mais il est à noter que cette différence peut provenir du fait qu'il existe un décalage à la fixation entre ces 4 pseudo-cohortes, et donc un **décalage dans les courbes de croissance**.

Pour appuyer cette hypothèse les 4 courbes ont été retracées en annulant le décalage entre pseudo-cohortes à la fixation par **changement de l'axe des ordonnées**. Celui-ci présente donc à présent le temps en jours après fixation, remettant les 4 pseudo-cohortes à égalité (figure 17).

**Figure 17 : Cinétiques de croissance en jours après fixation**  
(les barres d'erreur représentent les écarts-types)



On peut alors constater que les **différences de cinétique sont nettement plus réduites**. Un **test a été effectué** dans le but d'essayer de savoir si les quatre cinétiques de croissance diffèrent de façon significative.

Autrement dit : **peut-on dire que le retard de croissance pris en élevage larvaire disparaît après métamorphose?**

*Remarque* : sur la figure 16 à  $t_0$  = jour de fixation, les tailles moyennes des individus pour chaque pseudo-cohorte sont confondues car les larves pédivéligères prêtes à se fixer avaient des tailles identiques.

La différence existant entre les 4 pseudo-cohortes à la fixation se situe donc au niveau de la vitesse de croissance et non au niveau de la taille finale.

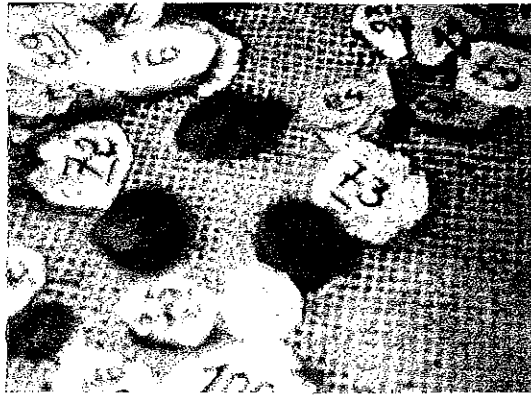
Une analyse de variance à deux facteurs a été effectuée. Le modèle utilisé est le suivant :

$(\text{longueur})_{i,j,k} = \text{moyenne} + (\text{jour après fixation})_i + (\text{pseudo-cohorte})_j + \mathcal{E}_{i,j,k}$ , avec *longueur* la variable mesurée, *jour après fixation* le premier facteur et *rang de la pseudo-cohorte* le second facteur.

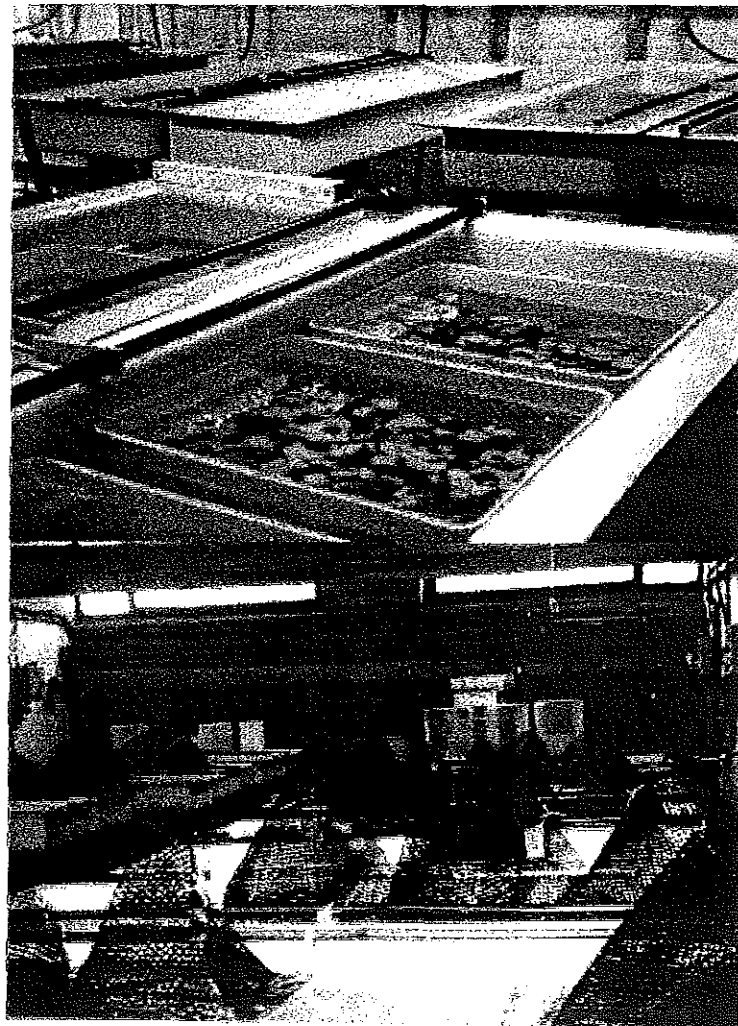
Le tableau 11 indique que ce modèle s'ajuste aux données de façon significative ( $p < 0.0001$ ). Le plan d'expérience déséquilibré avec les différentes modalités de facteurs est présenté en Annexe 19 bis.

## LE STOCKAGE DES ANIMAUX DU PROGRAMME GENEPHYS APRES DETROUQUAGE

N° 10 : Les numéros des individus utilisés pour le suivi de croissance ont été inscrits directement sur l'enduit



N° 11 : Les animaux détroqués ont été stockés en tamis puis en poches



**Tableau 11 : Validité du modèle utilisé**

	Degré de liberté	Valeur de F	Probabilité
Modèle	15	665	0.0001

Les résultats de l'analyse de variance sont donnés dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs**

Facteur	Degré de liberté	Valeur de F	Probabilité
Pseudo-cohorte	3	2.81	0.0939
Jour après fixation	12	652.62	0.0001

Il n'y a **pas d'effet significatif du rang de la pseudo-cohorte** sur la cinétique de croissance ( $p < 0.0939$ ). Ceci signifie que les quatre pseudo-cohortes ont la même cinétique de croissance après fixation.

Les ajustements de ces courbes de croissance sont en cours d'élaboration et une analyse des différences entre celles-ci permettra de confirmer les résultats obtenus.

### f/ Le suivi de croissance en poids

#### f-1- "Genephys"

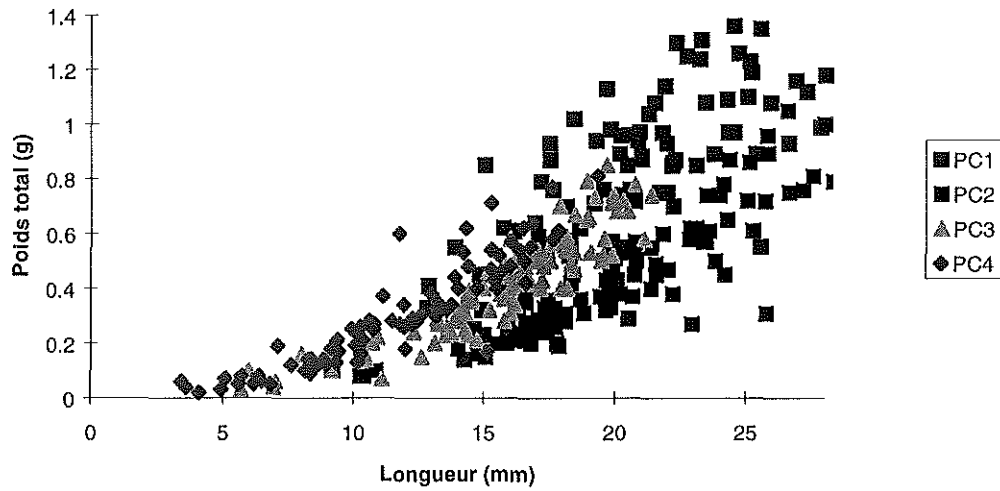
##### f-1-1- Allométrie

Les mesures de longueurs ont pris fin dès que les animaux ont été d'une taille suffisante pour être marqués, soit **62 jours après fécondation**.

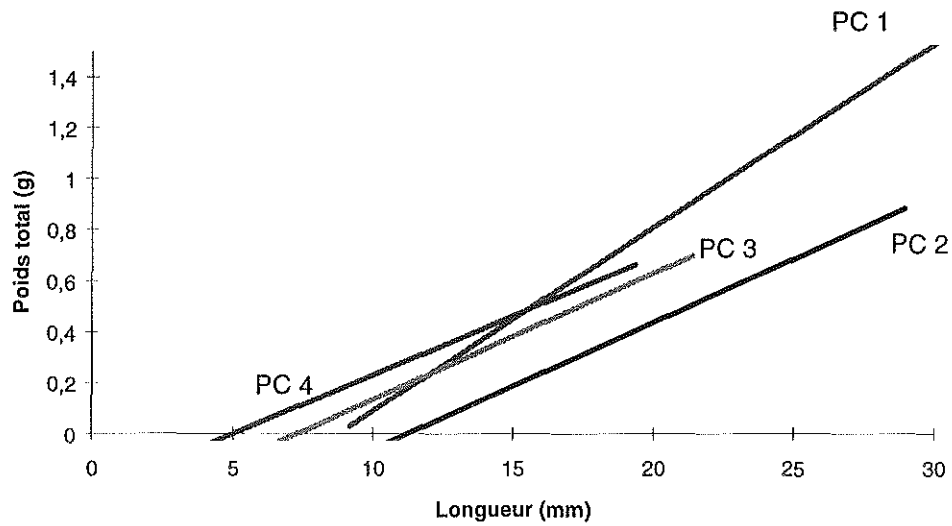
Pour s'assurer que l'étude de croissance entamée pouvait être poursuivie par pesées, l'allométrie longueur-poids de chaque pseudo-cohorte a été étudiée. Les résultats sont présentés figures 18 et 19.



**Figure 18** : Relation d'allométrie longueur/poids sur les individus "Genephys"



**Figure 19** : Représentation de l'allométrie longueur/poids après régression linéaire



Les quatre régressions sont significatives au seuil de 0.1 ‰. La qualité de l'ajustement est estimée par les coefficients de régression  $R^2$  présenté ci-dessous.

**Tableau 13 :** Coefficients de régression et équation des courbes d'allométrie

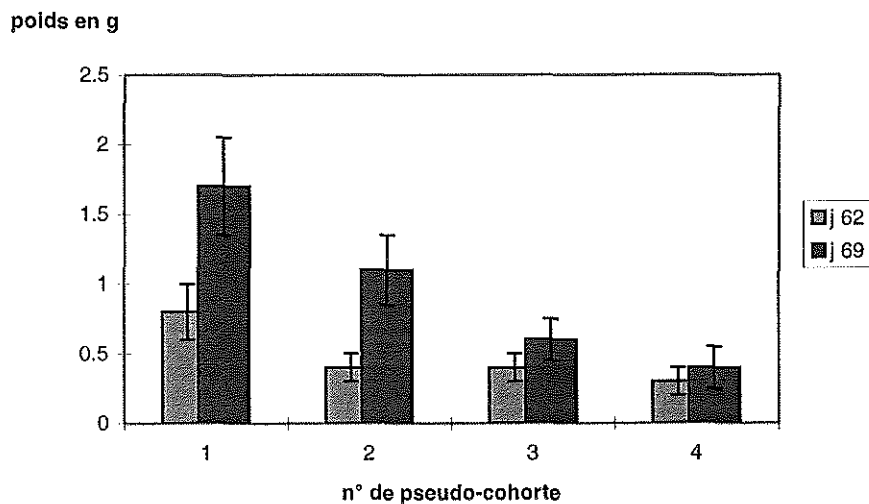
<u>numéro de pseudo-cohorte</u>	<u><math>R^2</math></u>	<u>niveau de significativité</u>	<u>Equation de la courbe</u>
1	0.52	0.0001	$y=0.072 x^{-0.63}$
2	0.77	0.0001	$y=0.050 x^{-0.56}$
3	0.80	0.0001	$y=0.050 x^{-0.36}$
4	0.81	0.0001	$y=0.046 x^{-0.23}$

Les résultats sont donc très satisfaisants : la longueur est un bon estimateur du poids total.

f-1-2- Les résultats du suivi de croissance par pesées

Les pesées ont donc débuté 62 jours après fécondation. Elles n'ont malheureusement pu être poursuivies au-delà de j<sub>69</sub> à cause des **pertes conséquentes subies** à ce moment. Les résultats moyens concernant les **deux mesures effectuées** sont présentés figure 20.

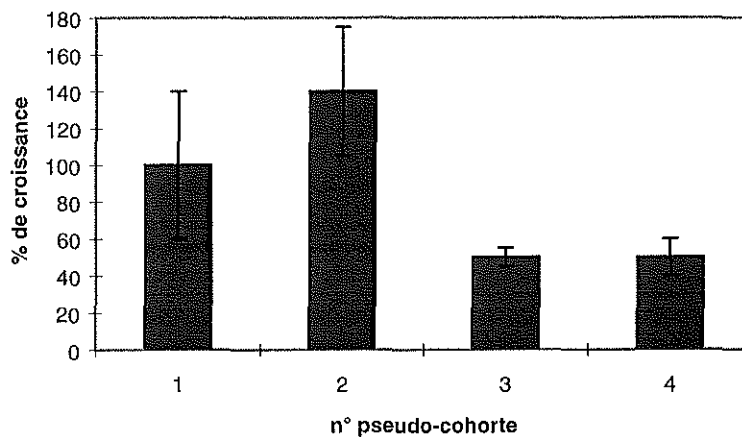
**Figure 20 :** Suivi de la croissance en poids des animaux du programme Genephys (les barres d'erreurs représentent les écarts-types)



On constate tout d'abord que lors de la première pesée, les individus des pseudo-cohortes 2 et 3 ont un poids moyen identique. Cette similitude ne se retrouve cependant pas lors de la seconde mesure, pour laquelle les poids moyens sont d'autant plus importants que les individus se sont fixés précocement.

La figure 21 présente enfin le **pourcentage de croissance** pour chaque pseudo-cohorte entre les deux mesures. Les croissances les plus importantes sont celles des PC 1 et 2, les taux de croissance des PC 3 et 4 étant beaucoup plus faibles.

**Figure 21 : Taux de croissance entre  $j_{62}$  et  $j_{69}$**   
**(les barres d'erreur représentent les écarts-types)**



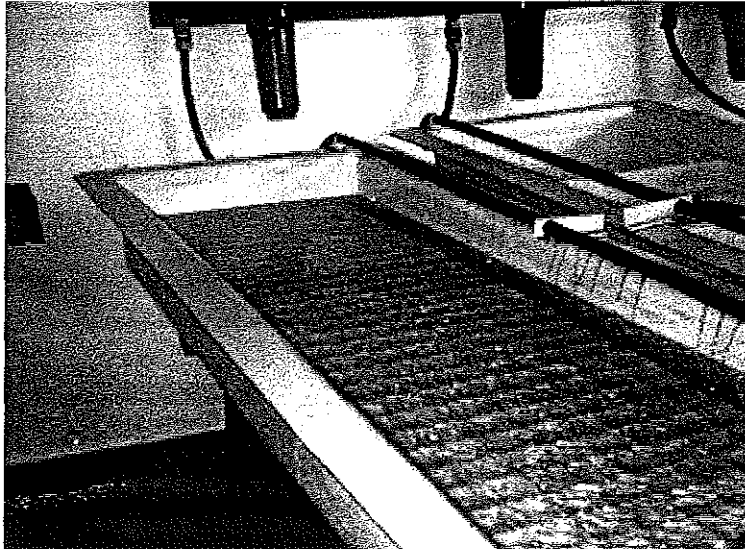
Ceci diffère des observations faites lors des résultats du suivi de croissance en longueur, et selon lesquelles la pseudo-cohorte 1 était en phase de ralentissement de croissance alors que pour les 3 autres le gain de croissance était d'autant plus important que la fixation avait été tardive. On tentera d'expliquer ces différences lors de la discussion.

f-2- "Link"

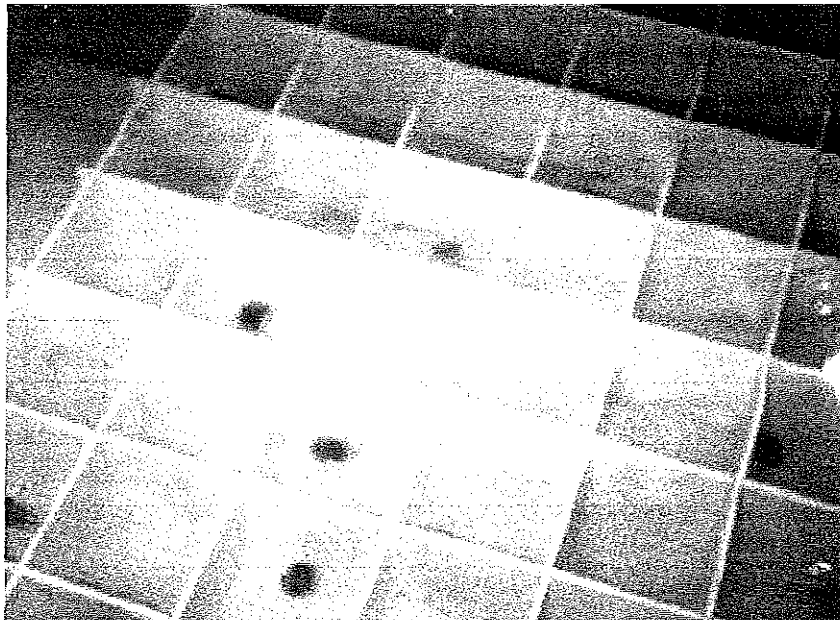
L'étude qui suit a **débuté 91 jours après fécondation** et est toujours en cours. Nous traiterons ici les résultats obtenus jusqu'à  $j_{154}$ .

## **ORGANISATION DES ANIMAUX DU PROGRAMME LINK POUR LE SUIVI DE CROISSANCE EN POIDS**

### **N° 12 : Stockage des structures PVC en raceways**



### **N° 13 : Chaque case accueille un animal**



### f-2-1- La composition de l'échantillon

17 "cagettes" ont été complétées. Les lot 1, 2, 3 et 4 de "Link" et la PC4 de "Genephys" ont été répartis dans 3 cagettes chacun, les 2 dernières contenant un mélange des 5 lots. Cela représente au total **1 215 animaux**.

Cette organisation est présentée en annexe 19.

Les 17 structures ont ensuite été réparties dans 6 raceways, soit 5 fois 3 cagettes et 1 fois 2 cagettes.

### f-2-2- Poids totaux en début et en fin d'étude

La figure 22 présente la répartition des poids des animaux "Link", tous lots confondus en début et en fin d'analyse. On peut constater que l'allure générale de la répartition des poids totaux est pratiquement identique dans les deux cas.

Cependant le **facteur qui sépare les plus petits individus des plus gros** diffère puisqu'il est de **30 en début de suivi** (poids étalés de 0.1 à 3 g) contre **18 environ** à la date où le suivi a été arrêté (poids de 1,4 à 25,5). Il semblerait donc que l'écart entre les individus ait tendance à se réduire avec le temps, ce qui signifierait que les animaux les plus petits ont tendance à compenser leur retard de croissance avec le temps.

**Tableau 14 : Résumé des données moyennes concernant la distribution des poids totaux, tous lots confondus, en début et en fin d'analyse**

<u>Date</u>	<u>j<sub>91</sub></u>	<u>j<sub>154</sub></u>
<u>Moyennes des poids totaux en g</u>	0.8	8.62
<u>Ecart-types</u>	0.5	4.09
<u>Variances</u>	0.25	16.73
<u>Coefficients de variation</u>	0.62	0.47

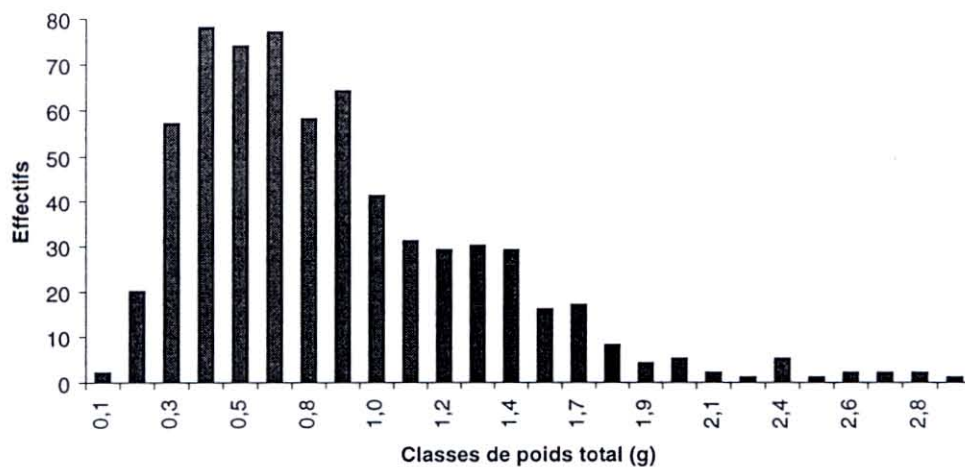
Après un **test de Bartlett** (test d'homogénéité des variances), il apparaît que les différences entre les variances à j<sub>91</sub> et j<sub>154</sub> sont significatives ( $p < 0.0001$ ), et que, contrairement à ce qui avait été calculé auparavant, la tendance soit à une évolution vers un **étalement plus grand à j<sub>154</sub> qu'à j<sub>91</sub>**.

La remise en question du résultat précédent pourrait être dûe au fait que les individus extrêmes qui nous ont permis d'évaluer le facteur séparant l'animal le plus petit du plus gros sont très rares. Par exemple à j<sub>154</sub>, un seul individu dépasse les 25 g, ce qui représente 1 individu sur plus de 600. On le retrouve d'ailleurs sur les figures 24 et 25 comme seul représentant de sa classe de poids.

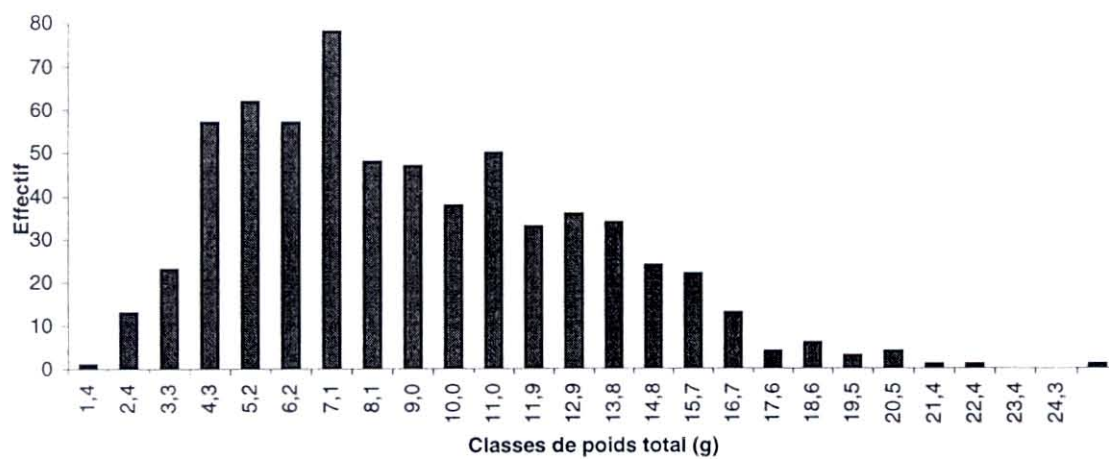
Ce dernier résultat nous permet de dire que **les animaux ont une croissance d'autant plus faible qu'ils sont de petite taille**.

**Figure 22** : Histogrammes des poids totaux, tous lots confondus, en début et en fin d'étude

j 91



j 154

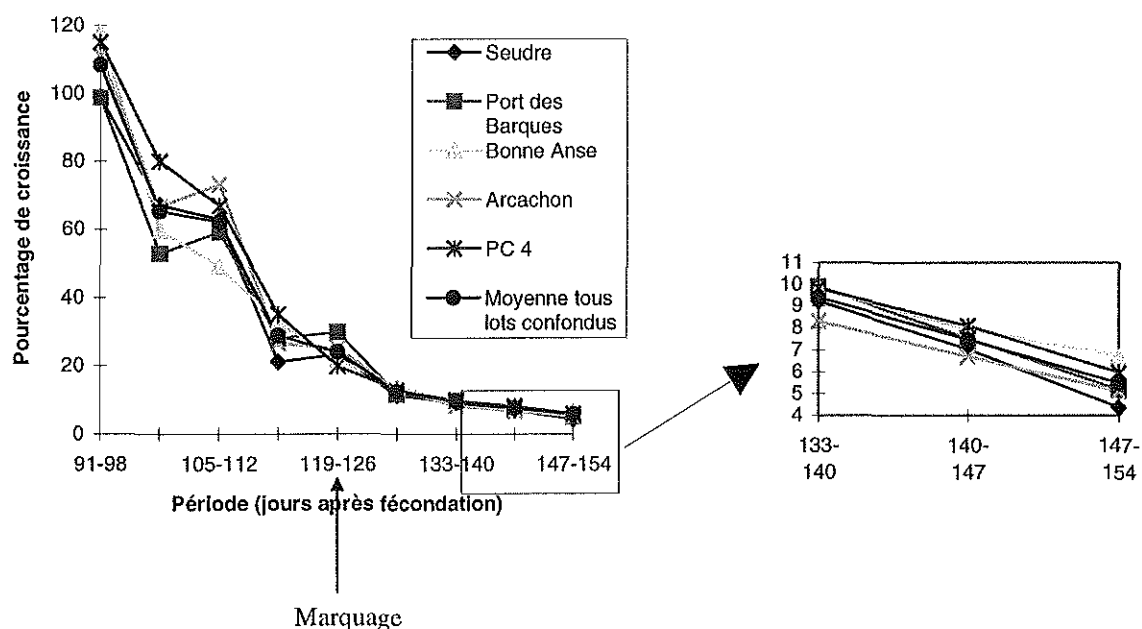


Les coefficients de variation nous donnent une indication sur la précision de la mesure. Il semblerait que celle-ci soit meilleure à j<sub>154</sub> (0.47) qu'à j<sub>91</sub> (0.62), ce qui signifie que l'erreur de mesure est d'autant plus importante que les animaux sont de petite taille.

### f-2-3- Le taux de croissance

Le tableau en annexe 19 reprend les données moyennes concernant le suivi de croissance, tous lots confondus. Le détail des poids totaux et des croissances pour chacun des 5 groupes ayant subi ce suivi est donné en annexe 20.

**Figure 23 :** Taux de croissance entre deux mesures successives pour chaque lot et tous lots confondus



Les taux de croissance sont schématisés sur la figure 23.

Les 5 lots ont en commun de voir leur **taux de croissance chuter au fur et à mesure du suivi**. Au début des mesures, les lots issus des croisements à l'intérieur des populations de Bonne Anse, Arcachon ainsi que la PC 4 ont la plus forte croissance devant les lots issus des croisements à l'intérieur des populations de la Seudre et du Port des Barques (à égalité).

Alors que ces mêmes taux semblent décroître de façon linéaire pour le lot Bonne Anse et la PC4, la chute est moins nette pour les trois autres lots. Les trois derniers points ont été grossis pour permettre d'observer que des différences subsistent jusqu'à j<sub>154</sub>. Les taux de croissance à cette date s'échelonnent en effet de 4.37 (Seudre) à 6.74 % (Arcachon). Il semble donc que l'ordre qui apparaissait au départ pour les cinq taux de croissance soit à peu près conservé jusqu'à j<sub>154</sub>.

**Tableau 15 : Effectif pour chaque échantillon à j<sub>154</sub>**

<u>lot</u>	<u>effectif final</u>	<u>% de l'échantillon de départ</u>
Seudre	88	36.2
Port des Barques	112	46.0
Bonne Anse	191	78.6
Arcachon	103	42.4
PC4	157	64.6
<b>Total</b>	<b>652</b>	<b>52.7</b>

Le tableau ci-dessus met en évidence la **proportion d'animaux manquants** pour chaque groupe. En globalité, l'échantillon total **reste très suffisant** pour mener l'étude. On peut seulement déplorer le déséquilibre qui existe entre les groupes.

On notera que les animaux disparus incluent ceux pour lesquels une erreur a pu être commise lors de l'étiquetage, des pesées ou de la saisie des données, et pour lesquels on a préféré écarter tout doute en les éliminant du suivi. On peut cependant considérer que ces chiffres donnent également une certaine idée de la mortalité survenue tout au long du suivi.

#### f-2-4- La cinétique de croissance

La figure 24 reprend la **cinétique de croissance** pour chaque lot de l'échantillon.

On constate au premier abord qu'il existe plusieurs groupes ayant une cinétique de croissance différente. Après analyse de variance, on peut préciser que l'échantillon se structure en 3 groupes :

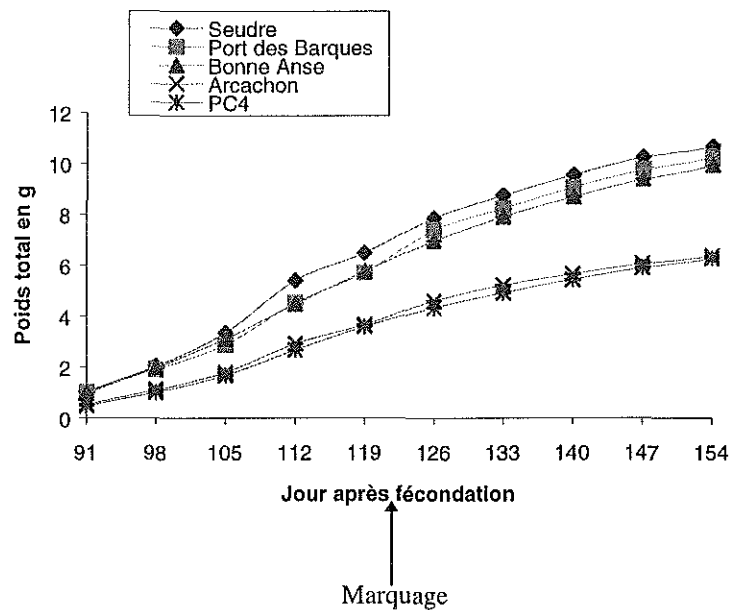
- Arcachon et la PC4 d'une part,
- Port des Barques et Bonne Anse,
- Seudre d'autre part.

Il est important de souligner qu'entre j<sub>119</sub> et j<sub>126</sub>, les animaux ont tous été numérotés et retirés des cases où ils étaient stockés jusqu'alors.

Jusqu'à j<sub>126</sub>, les cinétiques de croissance de chaque lot sont assez variables. Ensuite **elles se régularisent** et les courbes ne se croisent plus.



**Figure 24** : Cinétique de croissance en poids pour chaque lot



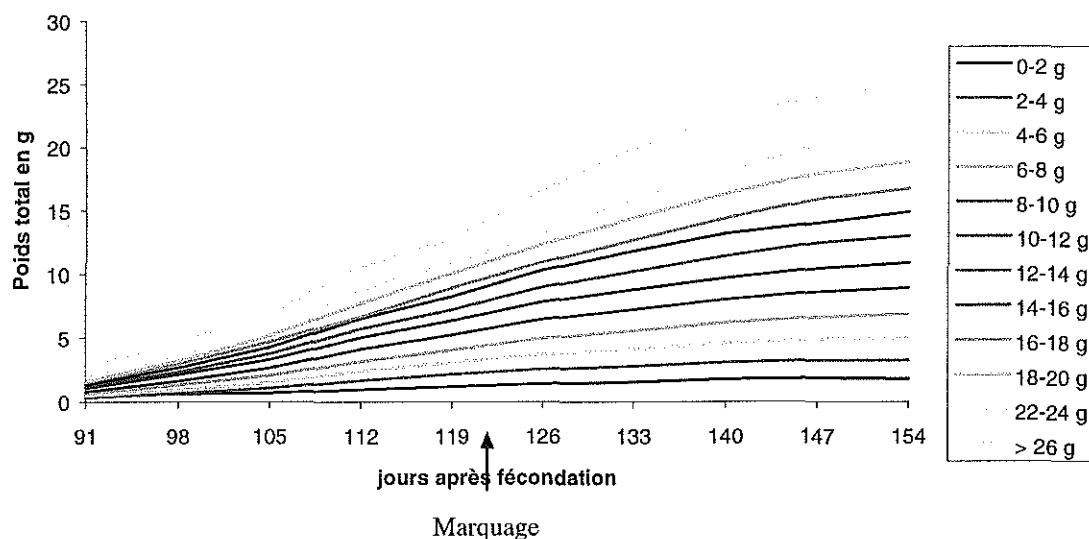
Dans un second temps, les individus, tous lots confondus, ont été séparés en classes de poids totaux selon leurs poids à j 154.

On constate dans ce cas (figure 25) que toutes les classes ont une **cinétique de croissance qui leur est propre**. Ainsi, les animaux qui avaient un poids supérieur au départ conservent leur avantage tout au long de l'étude.

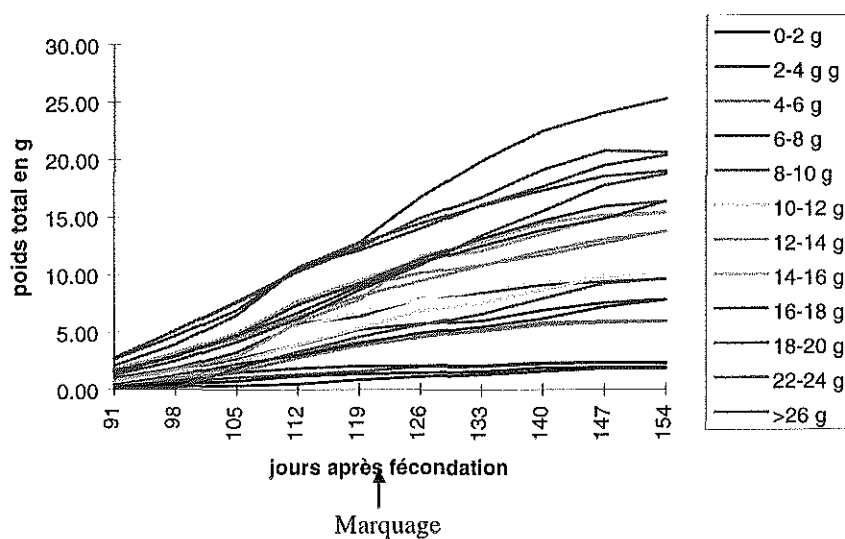
Les pentes nous permettent de dire que la vitesse de croissance est **d'autant plus importante que les individus avaient un poids élevé à j 91**. Ce résultat confirme les conclusions émises lors de l'étude des histogrammes des poids totaux en début et en fin de suivi (paragraphe f-2-2, test de Bartlett).

Pour appuyer cette remarque, quelques animaux ont été pris au hasard dans chaque classe pour montrer la structuration de celles-ci à partir de données brutes (figure 26). Les cinétiques de croissance sont moins clairement définies, quelques animaux ayant en quelque sorte changé de classe au cours du temps. La tendance générale reste cependant que plus un animal a un poids élevé à j 154, plus leur poids était important à j 91 et plus leur croissance a été rapide, excepté pour quelques individus.

**Figure 25 :** Moyennes des cinétiques de croissance par classes de poids totaux, tous lots confondus



**Figure 26 :** Exemples de cinétique de croissance pour quelques individus par classe de poids



Les **mortalités massives** qui ont frappé progressivement tous les lots alors en prégrossissement en juin 1996 nous ont obligés à revoir l'organisation du travail et les objectifs pour les programmes "Link" et "Genephy".

Après test de dépistage par l'unité de recherche en Pathologie du laboratoire de La Tremblade, il a été conclu que les pertes subies devaient être imputées à l'**Herpès-virus**.

Cet épisode de mortalités a eu pour conséquences la perte presque totale des animaux fixés sur plaques et a également atteint très largement les individus fixés sur brisure. Ainsi la pseudo-cohorte 1 de Genephy a été quasi-totalement éradiquée (il reste à l'heure actuelle une dizaine d'animaux) et le lot 5 (Conway) de "Link" a complètement disparu.

Heureusement, le nombre d'animaux rescapés pour les autres lots "Link" a été suffisant pour permettre de procéder au suivi de croissance en poids dans les structures PVC lorsque les mortalités ont commencé à être moins nombreuses.

La PC 4 de "Genephy" est venue compléter l'échantillon tout d'abord à cause de sa date de fixation très proche de celle des animaux "Link" comme nous l'avons déjà expliqué mais aussi parce que le nombre d'animaux encore disponible était le plus élevé, les autres pseudo-cohortes ayant subi des pertes plus importantes.

Le suivi de croissance du programme "Genephy" a pour sa part été totalement abandonné.

Remarque : Une partie de chaque lot représenté à l'écloserie de La Tremblade a été transféré à l'unité de nurserie de Bouin par sécurité. Des pertes ont également été à déplorer parmi ces animaux. Ceci amène à se demander si l'un des lots de géniteurs n'était pas porteur d'Herpès-virus qui se serait transmis verticalement et aurait été rendu actif par l'arrivée précoce de températures élevées.

## **2- Résultats de l'étude génétique**

### **a- Résultats de la mise au point pour l'étude des microsatellites en routine**

#### **a-1- Le bilan des extractions**

##### **♦ Extraction de l'ADN des géniteurs**

L'**extraction d'ADN au Chélex** donne des résultats assez satisfaisants en ce qui concerne les géniteurs. Il apparaît en effet que les 40 échantillons ont pu être visualisés après amplification d'un gène mitochondrial au locus Cytochrome Oxydase III par PCR froide. Les PCR radioactives ont donné de moins bons résultats puisque l'ADN de 30 individus sur 40 seulement a pu être visualisé. Ceci peut s'expliquer par le fait que, dans la cellule, le génome mitochondrial portant le locus CO III est présent en multiples copies alors que le génome nucléaire portant le locus CG 44 l'est en simple copie. Ainsi un certain nombre d'échantillons qui fonctionnaient dans le premier cas n'ont pu être suffisamment amplifiés dans le second pour être visualisés.

On peut toutefois considérer que **l'extraction au Chélex donne 100 % de réussite**. Pour la technique qui nous intéresse, les ADN qui n'ont pas pu être visualisés après extraction au Chélex ont été extraits à nouveau au phénol-chloroforme, méthode qui donne un ADN beaucoup plus pur. L'ADN de huit géniteurs supplémentaires a ainsi pu être amplifié. Deux individus n'ont pu être étudiés, mais on ne peut pas dire que ce problème soit dû à la méthode d'extraction utilisée elle-même.

♦ Extraction de l'ADN de la première génération

Le premier type d'échantillon utilisé pour l'étude de la G<sub>1</sub> était constitué d'animaux prélevés lors de la mise en fixation pour chaque pseudo-cohorte.

Les extractions au Chélex sur ces individus ont été effectuées dans le but d'une amplification par PCR froide. Les électrophorèses sur gel d'agarose n'ont pas permis d'obtenir de résultats. Et dans ce cas, c'est bien l'extraction qui peut être remise en cause.

Ceci vient certainement du fait que l'on a travaillé sur les larves entières.

Pour faciliter les manipulations, nous avons par la suite pratiqué des extractions sur les animaux prélevés à j<sub>45</sub>, et donc d'une taille un peu supérieure. Les résultats n'ont été visualisés que sur gel d'acrylamide dénaturant après amplification en radioactivité, et sont assez variables.

**Tableau 16 : Taux de réussite des extractions au Chélex sur les animaux de la G<sub>1</sub> prélevés à j<sub>45</sub>**

<u>Extraction n°</u>	<u>Résultat après visualisation sur acrylamide dénaturant</u>
1	27.5 %
2	75 %
3	65 %
4	44 %
5	89.5 %

♦ L'extraction 1 a été effectuée sur des animaux entiers après évaporation de l'alcool ajouté pour les conserver.

♦ Pour les extractions 2 à 4, l'alcool a également été évaporé. En plus, les animaux ont été broyés et un petit fragment prélevé lorsque c'était possible.

♦ Pour la cinquième extraction, une technique encore différente a été adoptée :

- les animaux ont été isolés au dernier moment et l'alcool dans lequel la totalité de l'échantillon était conservé a été égouté sur papier absorbant;
- chaque individu a été stocké dans un tube sans alcool et broyé;
- pour les animaux les plus gros, une partie du broyat (chair) a été prélevée pour extraction.

C'est cette technique qui donne les résultats les plus satisfaisants. Il reste à l'utiliser un nombre de fois suffisant pour évaluer sa fiabilité. On peut ajouter pour compléter ces observations que cette dernière méthode est d'autant plus efficace que l'on a prélevé une partie du broyat.

En effet, si on détaille les résultats de la cinquième extraction pour chaque pseudo-cohorte, on obtient les pourcentages qui suivent.

**Tableau 17 : Taux de réussite des extractions au Chélex pour les animaux de chaque pseudo-cohortes prélevés à j<sub>45</sub>**

<u>Pseudo-cohorte n°</u>	<u>Echantillon</u>	<u>Résultats après visualisation sur gel d'acrylamide dénaturant</u>
1	une partie du broyat	100 %
2	une partie du broyat	93.3 %
3	une partie du broyat	93.3 %
4	totalité du broyat	66.7 %

Il ne faut pas perdre de vue que ces résultats ne signifient pas à coup sûr que l'extraction de l'ADN a échoué pour tous les individus qui n'ont pas pu être visualisés. Nous avons en fait considéré comme taux d'extraction le **taux d'individus ayant donné un résultat après PCR radioactive**.

a-2- Essais d'amplification par PCR froide avec visualisation sur gels d'agarose et de polyacrylamide non-dénaturant

♦ Les PCR non radioactives

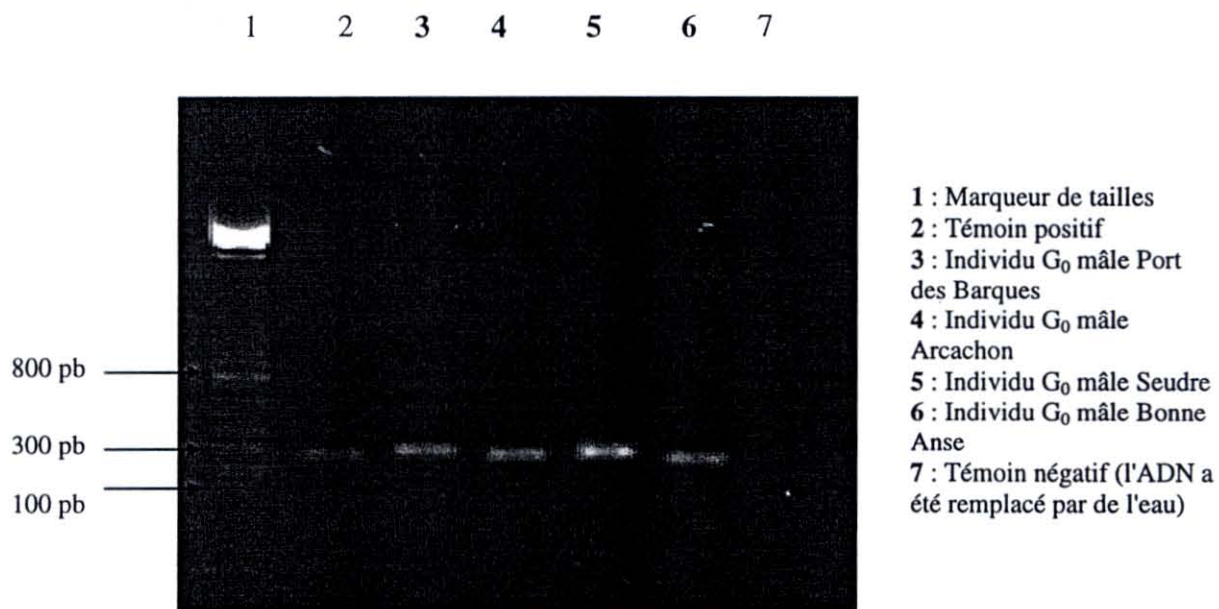
L'amplification de l'ADN des géniteurs aux locus CG 44, CG 49 et CG 108 a donné des résultats satisfaisants. Comme on l'a déjà dit, aucun résultat n'a été obtenu pour les larves prélevées lors de la fixation. Cependant après vérification des ADN extraits par migration sur gel d'agarose 1 % sans amplification préalable, aucun résultat n'a pu être visualisé. Il semblerait donc qu'en ce qui concerne l'étude de la G<sub>1</sub> pour ces animaux ce soit bien l'extraction qui a fait défaut et non une étape liée à l'amplification.

Cette série d'essais d'amplification par PCR froide nous aura permis de vérifier par l'intermédiaire des géniteurs que les cycles thermiques qui nous avaient été communiqués par Magoulas (com. pers.) étaient bien optimaux pour chaque locus.

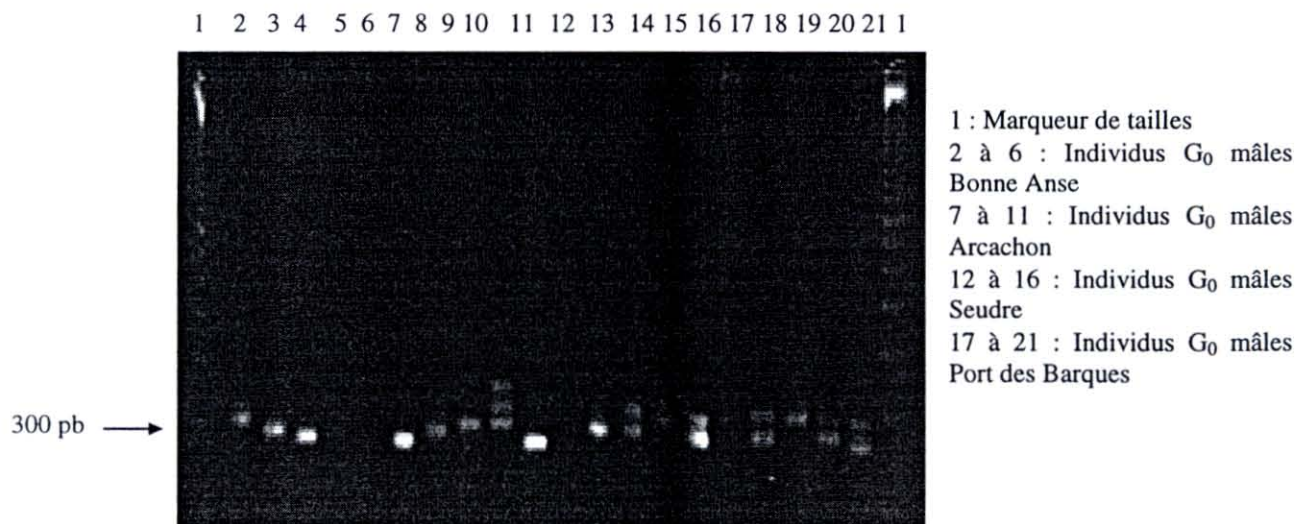
♦ Visualisation des résultats d'amplification sur gels d'agarose ou de polyacrylamide

Les gels d'agarose sont tout à fait adaptés lorsqu'il s'agit de vérifier la réussite des extractions. L'autre avantage de cette technique est qu'elle nous a permis d'évaluer la taille des séquences amplifiées à chaque locus. Par contre, les **bandes obtenues étant très épaisses**, il est impossible de différencier les allèles les uns des autres et donc les individus les uns des autres.

**Figure 27 :** Visualisation des produits d'amplification au locus CG 44 après migration sur gel d'agarose à 1 %

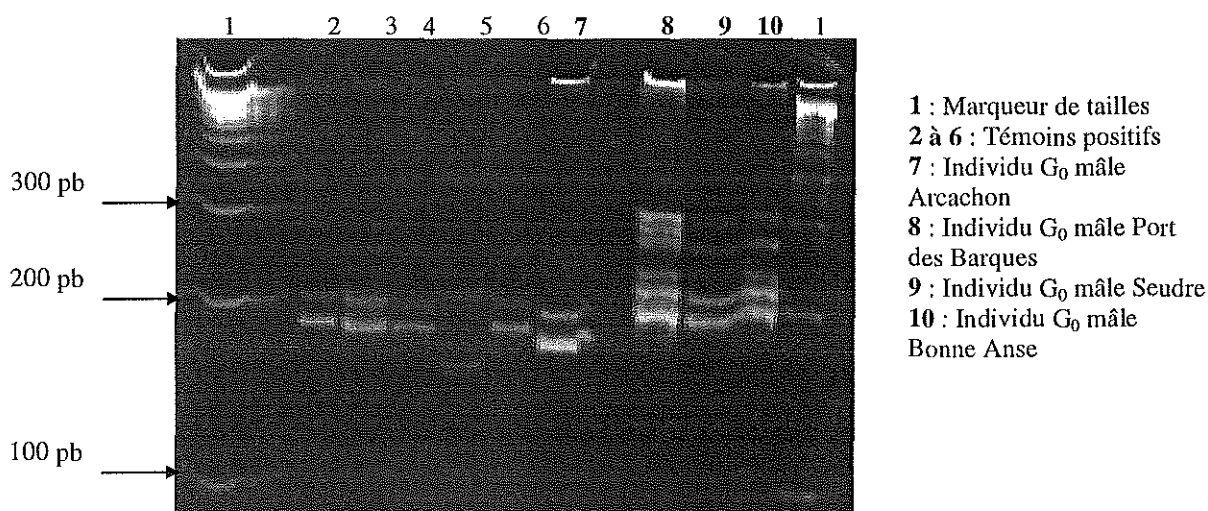


**Figure 28 :** Visualisation des produits d'amplification au locus CG 44 après migration sur gel de Nu Sieve à 4 %



Le Nu Sieve donnant une meilleure précision, quelques essais ont été effectués avec ce type de gel, sans succès. La manipulation en était trop délicate et la réussite trop aléatoire pour que l'on pense à pouvoir l'utiliser en routine.

**Figure 29** : Visualisation des produits d'amplification au locus CG 44 après migration sur gel de polyacrylamide non dénaturant à 8 %



Le même problème a été rencontré lors des essais sur gel de polyacrylamide. La difficulté la plus importante, outre la gestion de la polymérisation, est celle du démoulage. La faible épaisseur du gel rend en effet cette étape, nécessaire à la visualisation sous UV, très délicate. De plus, les résultats obtenus n'étaient pas d'une qualité suffisante pour différencier les allèles.

La technique d'amplification de l'ADN par PCR froide et de visualisation des résultats sur gels d'agarose ou de polyacrylamide a été abandonnée très rapidement à cause de l'impossibilité d'utiliser les résultats obtenus pour une étude fine des différences génétiques entre individus. Elle nous aura cependant permis :

- de vérifier l'efficacité de l'extraction au Chélex par migration des échantillons extraits sur gel d'agarose;
- de nous assurer de la validité des cycles thermiques préconisés pour amplifier l'ADN aux locus CG 44, CG 49 et CG 108;
- de définir la taille des séquences amplifiées à chaque locus sur gel d'agarose.

**Tableau 18 : Approximation des tailles des séquences amplifiées aux locus microsatellites CG 44, CG 49 et CG 108**

<b>Locus microsatellite</b>	<b>Taille de la séquence amplifiée</b>
CG 44	environ 300 pb
CG 49	environ 300 pb
CG 108	environ 100 pb

Nous avons donc abandonné cette technique pour mettre au point **l'amplification par PCR radioactive avec visualisation sur gel de polyacrylamide dénaturant**. C'est la méthode la plus couramment utilisée dans l'étude des microsatellites. En effet, ce type de gel est le seul permettant de séparer des fragments d'ADN ne différant que de quelques paires de bases.

#### a-3- Les résultats obtenus en radioactivité

Nous avons choisi de mettre cette étude au point sur un seul des trois locus disponibles, le CG 44. Les résultats obtenus sont très satisfaisants en terme de résolution puisque deux allèles distants de seulement deux paires de bases peuvent être différenciés dès lors que la migration a été suffisamment longue. Mis à part le problème du nombre de copies soulevé lors du bilan des extractions, aucun handicap majeur n'a été rencontré durant cette étape.

Il a été trouvé que la définition des bandes obtenues sur les gels était meilleure lorsque l'amplification était démarrée à chaud (la plaque étant placée dans le thermocycleur lorsque la température a atteint 94 °C). En effet, lors de l'augmentation de la température jusqu'à 94 °C, le milieu réactionnel se retrouve quelques instants à une température proche de la température d'annealing (appariement des amorces) et ceci entraîne des amplifications parasites.

**L'inconvénient** majeur de cette méthode réside surtout dans la manipulation délicate des radioéléments.

**Les avantages** sont multiples :

- ◆ une haute résolution ;
- ◆ une manipulation du gel de polyacrylamide plus aisée que celle des gels non dénaturants;
- ◆ une conservation des films autoradiographiques permettant l'archivage des résultats sous une forme nettement plus facile d'accès que les photographies prises pour les gels d'agarose ou de polyacrylamide non dénaturant.



b- Proposition d'un protocole pour l'étude des microsatellites en routine chez Crassostrea gigas

b-1- L'extraction

Nous avons choisi de pratiquer toutes les extractions au Chélex, technique qui a donné des résultats très satisfaisants à la fois pour les animaux de taille adulte et pour ceux prélevés 45 jours après fécondation.

On préconisera donc :

◆ Pour extraire l'ADN d'animaux adultes

- de prélever un fragment de branchie (cela peut être fait de façon non destructive par biopsie) de la taille d'une tête d'épingle;
- d'ajouter par échantillon le mélange d'extraction figurant en annexe 6;
- de laisser ce mélange 4 heures à 56 °C puis 20 minutes à 100 °C;
- d'utiliser le surnageant récupéré après centrifugation pour les analyses qui vont suivre.

◆ Pour extraire l'ADN des animaux de taille plus petite

- d'isoler chaque animal sans ajout d'alcool, juste avant extraction (s'ils étaient stockés dans l'alcool, celui-ci sera éliminé sur papier absorbant);
- de broyer les animaux et de prélever si possible un morceau de chair en laissant la coquille de côté;
- de procéder ensuite de la même façon que précédemment en ajoutant le mélange d'extraction.

b-2- L'amplification

L'amplification après marquage d'une des amorces au <sup>33</sup> P semble être de loin la meilleur technique. Le protocole à utiliser est résumé en annexe 8. Pour une meilleure définition, on conseille de ne placer les échantillons d'ADN dans le thermocycleur qu'une fois la température ayant atteint 94 °C.

Le stockage des ADN amplifiés se fera à - 20 °C jusqu'à utilisation.

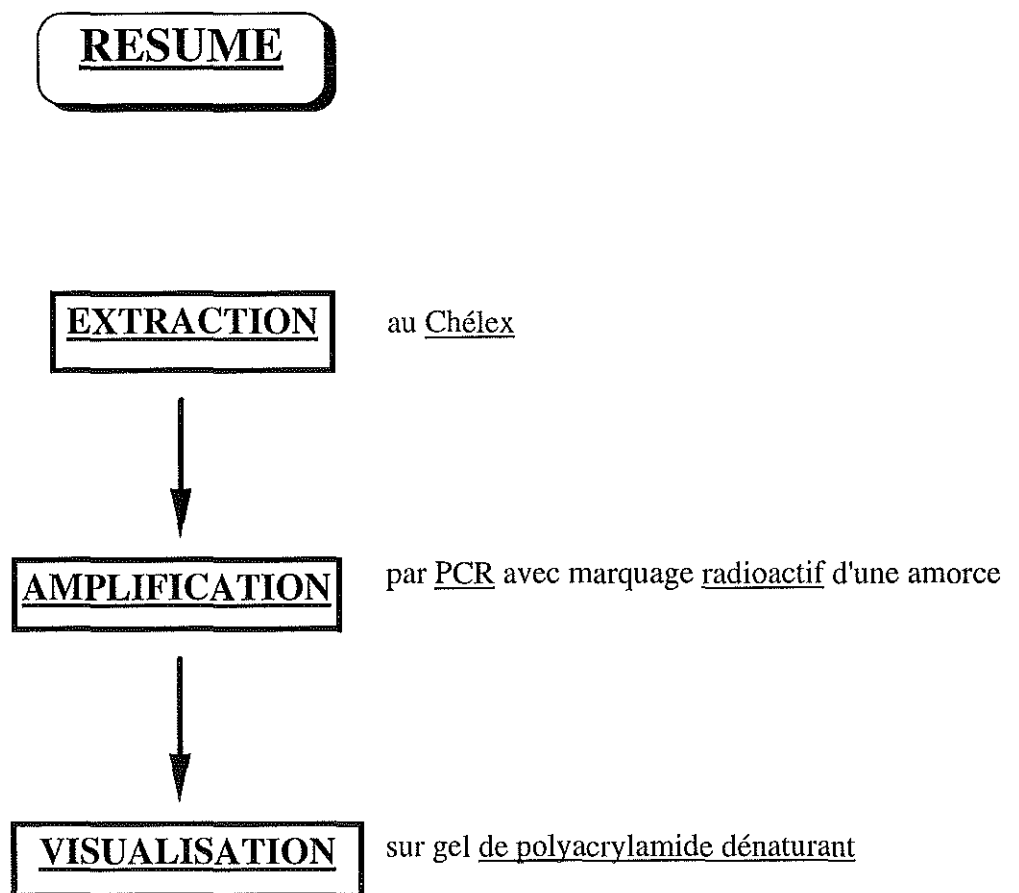
Avant migration l'ADN devra subir une dénaturation à 94 °C pendant 8 minutes.

### b-3- La visualisation du résultat de l'amplification

Les gels de polyacrylamide dénaturants donnent une excellente résolution dont on donnera un exemple dans le paragraphe suivant. Le protocole est détaillé dans la partie IV Matériel et méthodes. Pour le locus CG 44, une migration pendant au moins trois heures (à 40 W) est conseillée pour avoir des résultats plus facilement exploitables.

Le séchage du gel doit se faire pendant minimum une heure à 80 °C et sous vide.

Après avoir placé le film autoradiographique au contact du gel, il est nécessaire d'attendre 24 heures avant révélation. Si le gel n'est que moyennement radioactif (un contrôle peut être effectué avant ou après séchage), il sera nécessaire d'impressionner plus longuement le film.



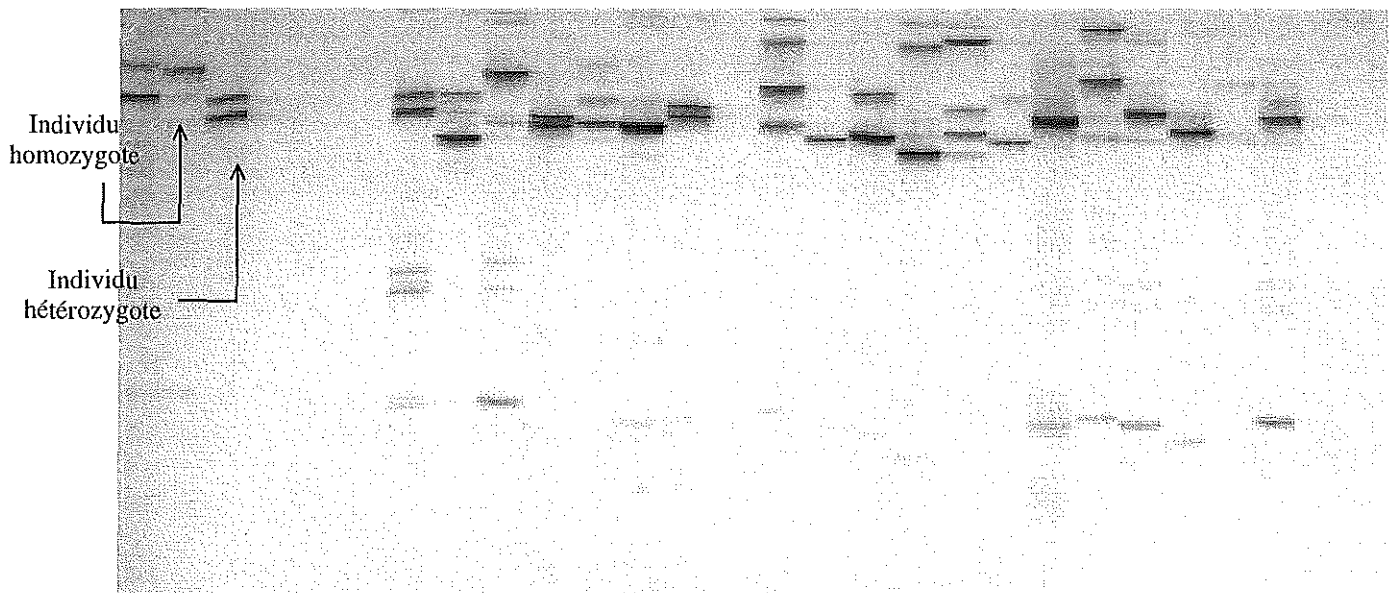
c- Premiers résultats de l'étude génétique

c-1- Etude des géniteurs des quatre populations françaises

Une première lecture des résultats a été effectuée après amplification en radioactivité de l'ADN des géniteurs au locus CG 44.

Le polymorphisme à ce locus est important puisque **dix neuf allèles** ont été dénombrés sur 37 individus . En effet, comme on l'a déjà dit, deux animaux sur les 40 n'ont donné aucun résultat après amplification. Le troisième individu n'a pu être pris en compte , l'intensité des bandes étant trop faible pour permettre une lecture correcte.

**Figure 30** : Exemple de visualisation des résultats obtenus après amplification de l'ADN des géniteurs au locus CG 44



Les pourcentages d'hétérozygotes obtenus sont présentés ci-après.

**Tableau 19 : Homozygotie et hétérozygotie au locus CG 44 pour chaque population française de géniteurs**

<u>Population</u>	<u>Nombre d'homozygotes</u>	<u>Nombre d'hétérozygotes</u>
Seudre	6	3
Port des Barques	5	4
Bonne Anse	7	3
Arcachon	3	6
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>16</b>
<b>Moyenne en %</b>	<b>56,7 %</b>	<b>43,3 %</b>

Il existe des **différences assez importantes** entre les proportions d'hétérozygotie pour les quatre populations.

**Tableau 20 : Fréquences alléliques au locus CG 44 pour l'ensemble des géniteurs**

<u>allèle</u>	<u>fréquence en %</u>
1	5.4
2	13.5
3	2.7
4	18.9
5	9.4
6	6.7
7	2.7
8	8.1
9	2.7
10	5.4
11	5.4
12	2.7
13	1.3
14	1.3
15	4.0
16	2.7
17	4.0
18	1.3
19	1.3

Ces premiers résultats mettent en évidence un **polymorphisme important** au locus CG 44. Aucun résultat ne peut toutefois être considéré comme définitif et l'étude se poursuit pour les mêmes individus au même locus afin de confirmer les résultats obtenus après première lecture.

Le tableau suivant présente le nombre d'allèles communs à plusieurs populations.

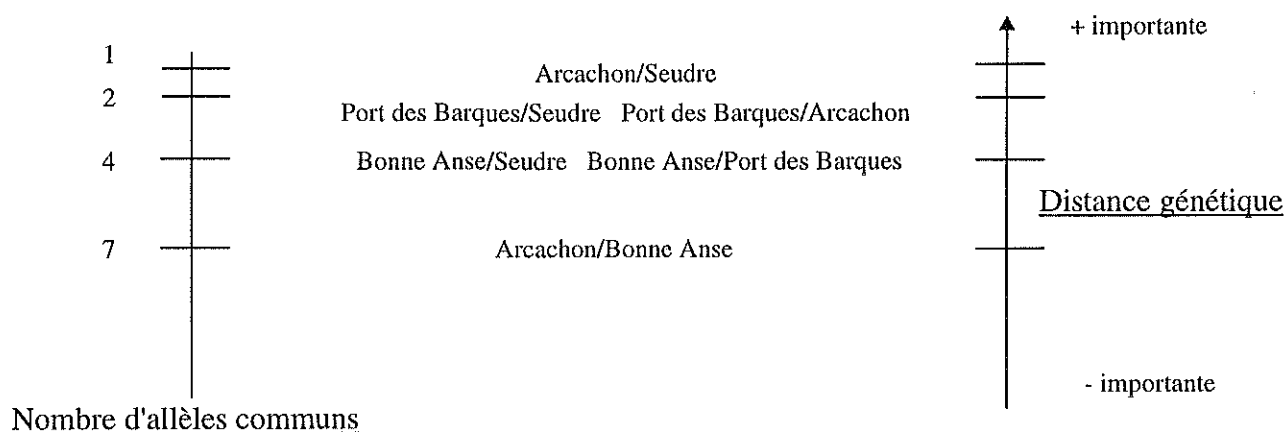
**Tableau 21** : Liste des allèles communs à plusieurs origines et des allèles privés

<u>Origine</u>	<u>Seudre</u>	<u>Port des Barques</u>	<u>Bonne Anse</u>	<u>Arcachon</u>		
<u>Seudre</u>	12 13 14					
<u>Port des Barques</u>	10 11				18 19	
<u>Bonne Anse</u>	2 4 5 6				2 4 5 8	3 7
<u>Arcachon</u>	10				16 17	1 2 4 5 6 8 9

 Allèles "privés" : présents uniquement chez les géniteurs appartenant à une origine.

Ces données peuvent nous permettre de faire une première évaluation de la distance génétique séparant les différentes populations.

**Figure 31** : Evaluation des distances génétiques entre les quatre populations françaises



Les populations de la Seudre et d'Arcachon semblent donc très proches génétiquement. L'effectif est cependant trop réduit pour pouvoir calculer exactement les distances séparant les différentes populations.

### c-2- Etude de la première génération issue des croisements interpopulations

Les premiers résultats obtenus après étude de la première génération au locus CG 44 ne nous ont pas permis de dire précisément quels étaient les allèles les plus représentés sur les 19 évalués après étude des géniteurs.

Une première évaluation du pourcentage d'hétérozygotes pour chaque pseudo-cohorte a été effectuée.

Les résultats sont présentés dans le tableau 22.

**Tableau 22 : Homozygotie et hétérozygotie au locus CG 44 pour chacune des pseudo-cohortes de première génération**

<b>Pseudo-cohorte</b>	<b>Effectif étudié</b>	<b>Homozygotes</b>	<b>Hétérozygotes</b>
1	26	50 %	50 %
2	28	46.4 %	53.6 %
3	26	57.7 %	42.3 %
4	20	65 %	35 %
<b>Moyenne</b>	<b>100</b>	<b>54 %</b>	<b>46 %</b>

On constate d'après ces premières estimations que les proportions homozygotes / hétérozygotes diffèrent selon la pseudo-cohorte. Le résultat trouvé en moyenne (46 % d'hétérozygotes) est très proche de celui qui avait été calculé lors de l'étude des géniteurs.

De plus il existe des **différences selon les pseudo-cohortes** avec une tendance à l'homozygotie d'autant plus importante que les animaux se sont fixés tard (50 % d'homozygotes pour la PC 1 contre 35 % pour la PC 4).

## VI DISCUSSION

### 1/ Zootechnie

#### a- Les géniteurs

Les géniteurs demandés aux différents ostréiculteurs devaient appartenir à des lots captés en 1993. Cependant lorsqu'on observe les **histogrammes des poids totaux** pour chaque population de géniteurs, on peut se demander si la population de la Seudre appartient à la même **classe d'âge** que celles d'Arcachon et du Port des Barques. On sait déjà que, selon les fournisseurs, il avait été annoncé des dates de captage différentes : 1992 pour certains et 1993 pour d'autres. Si l'on considère ces indications, les populations d'Arcachon et du Port des Barques pourraient avoir été captées en 1992 et celle de la Seudre en 1993.

Il paraît beaucoup moins facile de définir l'âge des géniteurs de Bonne Anse et de Conway, étant donné l'étalement des poids totaux retrouvé pour ces populations. Si l'on poursuit dans le même sens, on peut envisager l'hypothèse d'un mélange de deux stocks d'huîtres de deux classes d'âge différentes.

Le but recherché était bien une hétérogénéité maximale de tous ces lots de géniteurs, impliquant un tri sélectif par les producteurs le plus réduit possible, de façon à avoir une **représentation maximale de tous les poids** pour chaque population concernée.

La Non-Normalité de la répartition des poids tendrait à confirmer qu'un tri plus ou moins important a été effectué pour toutes les populations. Si l'on considère l'asymétrie existant dans la répartition des poids pour les populations de la Seudre, d'Arcachon et du Port des Barques, on aurait tendance à dire qu'il existe un léger déficit en animaux de poids élevé pour les géniteurs de la Seudre et du Port des Barques, alors que les individus les plus petits semblent avoir été éliminés du lot d'Arcachon. Il n'est par exemple pas impossible que la population d'Arcachon ait subi un tri puisque cette opération est très précoce chez l'ostréiculteur concerné.

D'un autre côté on peut supposer que les différences existant au niveau de la répartition des poids totaux sont en grande partie dûes aux conditions d'élevage. Ainsi pour les populations de Bonne Anse ou de Conway par exemple, l'échantillon peut être constitué d'animaux provenant de deux ou plusieurs sites d'élevage et n'ayant pas profité des mêmes conditions environnementales (trophiques par exemple).

Si l'on se réfère aux ostréiculteurs concernés, il semblerait que, pour Arcachon, la Seudre et Port des Barques, on puisse être assuré de ne voir représentée qu'une seule date de captage.

Il semble cependant difficile d'affirmer que **deux captages successifs** n'ont pas eu lieu puisque le détroquage pour une année de fixation peut se faire 18 mois plus tard. Il n'est donc pas impossible que le second captage soit intervenu avant détroquage du premier. Ceci ne peut pas être contrôlé. L'appartenance à **un captage naturel** était l'une des conditions primordiales à la constitution d'une population de référence à **base génétique large** pour le programme GenephyS. On peut s'apercevoir ici que c'est aussi un problème délicat lorsqu'il s'agit de s'assurer de l'âge des animaux.

La seule façon de connaître les âges respectifs de tous les géniteurs français serait un **test de datation**. Ce type d'étude devrait effectivement être mené prochainement par M. Roux à l'Université des Sciences de la Terre de Reims, et ce par analyse en **cathodoluminescence des stries de croissance des charnières**, les coquilles des 40 géniteurs ayant été conservées (Barbin *et al.*, 1991).

Il ne nous a pas été nécessaire de connaître ces données pour effectuer l'étude de croissance des animaux de première génération. Par contre l'âge des géniteurs a une grande importance dans l'étude des caractéristiques physiologiques dont on cherche à établir les bases génétiques et la relation avec la croissance. L'étude de l'âge des géniteurs devra donc impérativement être effectuée.

De ce point de vue, la population de Conway représente une exception puisqu'elle est issue d'écloserie. Le **nombre de parents** ayant participé à son élaboration est donc beaucoup plus réduit que pour les populations françaises issues de captages naturels (seulement trois mâles et trois femelles). Ceci se serait certainement retrouvé au niveau du **nombre d'allèles** mis en évidence lors des analyses en microsatellites. Malheureusement, la descendance a été totalement décimée lors des pertes survenues en juin 1996 et aucune analyse génétique n'a par conséquent pu être entreprise.

On peut cependant se demander s'il n'aurait pas été plus judicieux, pour pouvoir comparer la croissance des animaux issus des croisements intrapopulations de choisir une cinquième origine à base génétique moins restreinte. On aurait pu par exemple rassembler des animaux en provenance d'un pays où il existe effectivement un captage naturel.

La raison du choix de Conway comme cinquième origine a très certainement été motivée par la facilité d'obtention d'huîtres anglaises, étant donné les nombreux contacts entretenus avec ce pays. De plus, l'approvisionnement en animaux de captage naturel issus d'un pays étranger est beaucoup plus délicat au niveau sanitaire que lorsqu'il s'agit d'animaux produits en écloserie.

Concernant la **sex ratio**, le test d'indépendance effectué a permis de montrer qu'il existe un déséquilibre significatif de la proportion de mâles et de femelles ( $p < 0.0001$ ). On a pu constater également que la sex ratio était liée de façon significative à la population ( $p < 0.001$ ).

Il reste maintenant à savoir si l'échantillon des 30 individus par population est suffisant pour que l'on puisse considérer les résultats obtenus comme représentatifs.

Quoi qu'il en soit, cette tendance au déséquilibre des sexes ne semble pas être rare dans les populations d'huîtres creuses utilisées couramment au laboratoire de La Tremblade. C'est apparemment un déséquilibre en faveur des femelles qui se rencontre le plus souvent.

### *b- Les croisements*

Les géniteurs n'ont pas été choisis mais bien **pris au hasard** et ouverts un à un jusqu'à obtention de 5 mâles et 5 femelles. Cependant, les déséquilibres des sex ratio présentés juste avant ont eu une incidence sur le déroulement de cette étape. Par exemple, le déséquilibre en faveur des femelles qui semble exister dans certaines populations a obligé les manipulateurs à ouvrir de nombreux animaux pour obtenir les 5 mâles voulus. Ceci suppose donc que le nombre de femelles alors sexées était supérieur à 5. Pour en sélectionner la quantité voulue, un **tirage au sort** a été effectué.

L'obtention d'une **représentation égale de toutes les combinaisons de croisements** dans le programme Genephys a pu être respecté par dénombrement des gamètes pour chaque géniteur. Ce fut un travail énorme mais nécessaire pour aligner le nombre de gamètes utilisé pour chaque animal sur la quantité la plus faible trouvée, à la fois pour les mâles et pour les femelles.

**Toutes les possibilités de croisements** ont donc été mises à égalité au départ de l'expérience. Ceci ne signifie cependant pas que tous les croisements soient représentés de façon équivalente en élevage larvaire et après.



L'étude effectuée sur le taux de développement embryonnaire tend ainsi à mettre en évidence la **grande hétérogénéité des populations et des individus** quant aux performances de reproduction. Ainsi on aura remarqué par exemple que les individus femelles d'Arcachon donnent des résultats nettement inférieurs aux autres concernant la fécondation, mettant déjà en relief l'effet « population femelle » annoncé plus tard.

Le tableau 4 permet d'entrevoir les effets (ou non) des populations mâles et femelles sur le taux de fécondation mis en évidence par l'analyse de variance. La figure 10 met en évidence les effets individuels testés de la même façon, et permet d'appuyer les résultats obtenus après analyse de variance : l'effet femelle individuel ( $p < 0.0001$ ), plus significatif que l'effet mâle ( $p < 0.0014$ ) est aussi plus visible sur les histogrammes.

**L'étude de la descendance grâce aux microsatellites**, après caractérisation des 40 géniteurs, peut permettre d'évaluer la **participation effective de chacun des parents à ces croisements**. C'est d'ailleurs en partie dans ce but que la mise au point d'une technique de routine a été entreprise.

### c- L'élevage larvaire

L'élevage larvaire a été mené avec grand soin étant donnée **l'importance de la densité** sur la croissance des animaux. Ce point a d'ailleurs été souligné par de nombreux auteurs. Ainsi, lors de leur étude de l'héritabilité du taux de croissance chez *Mercenaria mercenaria*, Hadley *et al.* (1991) ont débuté les élevages larvaires à raison de 5 larves / ml, puis cette densité a été progressivement réduite pour atteindre 1 larve / ml à l'approche de la métamorphose.

De même, en 1983, lors de leur travail sur la sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour le taux de croissance, Newkirk et Haley, ont adopté, pour n'opérer aucune contrainte, un nombre de larves au départ de la phase larvaire de 7 / ml. Enfin, Wada (1986) a préféré débiter l'élevage larvaire directement à 1 larve / ml alors qu'il étudiait la sélection génétique de certaines caractéristiques de la coquille chez *Pinctada fucata martensii*, l'huître perlière japonaise.

Bien qu'un peu supérieure dans le cas présent (**10 larves / ml** au départ), la densité choisie nous a permis de minimiser les contraintes pour les lots des élevages "Genephys" et "Link".

De plus, comme dans l'un des cas cités précédemment, la densité a baissé progressivement, avec alignement des lots les plus denses sur le moins dense, jusqu'à atteindre à la fin de la période larvaire 1,7 à 2,6 larves / ml pour "Genephys" (exception faite du lot 2 pour lequel un "accident" est survenu entre  $j_{10}$  et  $j_{13}$ ) et 1 à 4,4 larves / ml pour "Link".

**L'homogénéité des conditions d'élevage** pour les lots "Genephys" (toujours excepté le lot 2) semble donc avoir été respectée. Pour les élevages "Link", l'écart un peu plus important entre les densités finales de tous les lots remettrait en cause cette homogénéité si on ne pouvait considérer que, tant à 1 qu'à 4,4 larves / ml, les contraintes sont limitées.

Remarque : Il faut toutefois noter que les chiffres relatés en annexe 16 pour les densités sont à prendre avec précaution. Les comptages n'ayant pas toujours pu être faits par la même personne, on ne peut écarter l'existence d'une certaine erreur liée au manipulateur.

**La non sélectivité de l'élevage larvaire** est, avec le contrôle des densités, l'un des points primordiaux lorsqu'il s'agit d'étudier la variabilité ou l'héritabilité de la croissance dans une population. Ainsi, Hadley *et al.* (1991) et Newkirk *et al.* (1977), dans leurs travaux respectifs sur l'héritabilité du taux de croissance chez *M. mercenaria* et *Crassostrea gigas*, ont procédé à un élevage larvaire non sélectif en conservant les animaux à croissance lente, ce qui est rarement le cas dans les éclosiers traditionnelles.

Nous avons utilisé la même technique pour l'ensemble des lots "Genephys" et "Link". Contrairement à la technique utilisée par Wada consistant en un renouvellement total de l'eau tous les 5 jours, nous avons procédé à un **changement total de l'eau d'élevage tous les 2 jours** avec traitement à l'érythromycine à chaque fois. Ceci n'a pas permis d'éviter les mortalités sur le lot 2, les autres lots de "Genephys" et "Link" n'ayant apparemment pas souffert des mêmes pertes. Ceci a posé un certain nombre de problèmes, à la fois pour le maintien des densités à égalité, mais aussi lors de l'étape de captage sur plaques.

#### d- Le captage

Le captage **sur plaques collectrices**, technique mise au point à l'occasion du programme "Genephys", présente effectivement de **nombreux avantages**. Le premier est celui de permettre une **individualisation très précoce** des postlarves puisque les derniers animaux fixés ont pu être **mesurés 11 jours seulement après métamorphose**. Ceci présente l'avantage de limiter le laps de temps écoulé entre la dernière mesure du suivi d'élevage larvaire et la première mesure post-fixation.

Cette technique a de plus permis le marquage des 400 animaux numérotés sans ajouter au stress du détroquage celui de l'étiquetage. On a ainsi pu inscrire le numéro directement sur la couche d'enduit prélevée avec chaque animal. Il était de toute façon inconcevable de ne pas conserver cette parcelle d'enduit étant donnée la **quasi absence de valve inférieure** chez tous les individus captés selon cette méthode. C'est là l'un des principaux inconvénients de ces collecteurs.

La précocité du détroquage permet également d'accéder très tôt aux poids individuels, et de **contrôler les densités** afin d'assurer un minimum de contraintes aux individus suivis en croissance.

Les travaux publiés jusqu'ici ne mentionnent pas l'utilisation de tels collecteurs. Les divers auteurs emploient généralement des collecteurs plus "classiques". Newkirk *et al.* (1977) ont utilisé des valves de Coquilles Saint-Jacques pour capter des larves de *Crassostrea virginica* tous les deux jours.

Nous avons adopté une technique différente pour déterminer les cohortes de fixation, technique dans laquelle c'est le suivi de l'élevage larvaire qui a permis de définir 4 pseudo-cohortes au lieu de trois prévues au départ. Malgré cela, les captages ont débuté pour chaque pseudo-cohorte à intervalles réguliers de 3 jours (j 17, j 20, J 23 et j 26 respectivement pour les PC 1, 2, 3 et 4).

De même, alors que Newkirk considérait dans la même étude que 2 jours de fixation définissaient une cohorte, nous n'avons pas défini préalablement de durée de captage, comme on peut le constater sur la figure 11. Les pseudo-cohortes 2 et 3 ont d'ailleurs en commun un jour de fixation.

Cette étape n'a pas posé de problème particulier, si ce n'est lors de la fixation des larves pour **la première cohorte**. Le fait que le captage sur plaques ait été interrompu affecte finalement assez peu le taux de fixation calculé par la suite. Ce problème peut certainement être attribué à un problème de toxicité dû au relargage de produits toxiques à partir des plaques. Le transfert des animaux découverts immobiles le lendemain de leur mise en fixation ont ensuite été transférés sur brisure. Ce changement semble leur avoir permis de survivre et même de poursuivre le processus de métamorphose entamé.

Fait beaucoup plus important, la PC 1 se distingue également des autres par sa composition puisque le lot 2 en a été évincé. On peut toutefois considérer que cela n'affecte pas la composition de celle-ci au niveau de la représentation de chaque géniteur étant donné que les lots 1, 2, 3 et 4 de l'élevage larvaire étaient issus des mêmes croisements mélangés puis séparés en 4 groupes.

Suite aux problèmes sanitaires rencontrés sur le second lot à partir du dixième jour d'élevage, on a préféré l'écartier de la première filtration mise à fixer sur plaques pour éviter un échec total.

Il reste donc qu'en interrompant la fixation sur plaques, seules les larves métamorphosées le premier jour sont représentées sur les 8 plaques de la PC 1, les larves les moins actives s'étant fixées sur brisure les jours suivants.

Plus que la composition de cette première pseudo-cohorte, c'est donc bien plutôt la **représentativité des animaux filtrés de la première pseudo-cohorte à j 17 qui peut être remise en question.**

Le but de la fixation sur plaques était de pouvoir gérer au mieux le nombre d'animaux fixés afin d'éviter une compétition trop importante. Ce but a été atteint dans la mesure où le nombre de postlarves obtenu pour chacune des pseudo-cohortes nous a permis à la fois de contrôler la densité et d'obtenir un échantillon assez important pour pouvoir effectuer une sélection aléatoire des animaux à suivre. Nous disposions en effet de 3450 animaux en moyenne pour chacune des pseudo-cohortes, parmi lesquels 100 ont été pris au hasard.

Des essais ont été menés avant le début du programme afin d'évaluer la quantité de larves nécessaires pour obtenir un nombre d'animaux fixés satisfaisant pour la suite de l'étude. Des tests ont été effectués avec différentes quantités de larves déposées sur les plaques. Les résultats obtenus semblent mettre en évidence que la proportion d'animaux fixés est d'autant plus faible que le nombre de larves mis à capter était bas. Ce qui signifierait qu'il est nécessaire d'utiliser un grand nombre de pédivéligères si l'on veut obtenir un résultat satisfaisant. Des taux de fixation de 20 % ont été obtenus lors de ces essais.

Bien plus qu'en termes de taux de captage, c'est donc en effectifs qu'il faut raisonner dans le cas de la fixation sur plaques. Ainsi, le taux de captage de 1,78 % donne un nombre assez important d'individus fixés (3450 en moyenne par pseudo-cohorte) étant donnée la quantité importante de pédivéligères qui ont été mises à fixer pour chaque pseudo-cohorte.

On doit en outre prendre en compte que le taux de 1,78 % annoncé ne prend pas en considération les animaux qui se sont fixés sur la face inférieure des plaques ou directement dans les raceways.

Le taux de fixation de 1,78 % calculé en moyenne ne peut donc en aucun cas être comparé à des pourcentages de captages obtenus sur collecteurs classiques (lamelles ou tubes) et dont les valeurs sont comprises entre 10 et 100 % (CREAA, 1991; Baud *et al.*, 1991).

De plus il faut prendre en considération le fait que ces derniers taux de fixation annoncés ont certainement été obtenus à partir des têtes de lot d'élevage larvaire comme c'est l'usage couramment.

La fixation des animaux du programme "Link" s'est faite, comme on l'a déjà dit, en une seule fois pour chaque lot. Il a donc fallu attendre que la majorité des larves soient présentes à l'état de pédivéligères dans l'élevage. On a donc certainement éliminé la queue de lot qui n'était pas en état de se métamorphoser lorsque les larves ont été déposées sur brisure. Il faut toutefois noter que le temps imparti aux animaux pour se fixer selon cette technique n'est pas limité.

D'un autre côté, si l'extrême queue de lot n'a pas participé au captage, on peut penser que ce fut également le cas pour la tête de lot qui devait déjà avoir dépassé le stade de la métamorphose lors du transfert sur brisure. Si l'on considère que la tête de lot a été laissée dans les bacs d'élevage larvaire où elle était déjà fixée, on peut dire qu'un certain équilibre s'est établi dans cette étape.

On peut considérer en quelque sorte que ce sont surtout les **animaux du corps de lot de l'élevage larvaire** qui se retrouveront à l'état de naissain. Il reste maintenant à savoir si cela signifie que l'on a provoqué une **perte d'hétérogénéité** dans la répartition des poids totaux après métamorphose.

Autrement dit : est-ce qu'en éliminant la tête et la queue de lot au cours de cette étape on a provoqué l'élimination de celles qui auraient été les plus petites et les plus grosses à l'état de naissain?

### e- La croissance des animaux fixés sur plaques

#### e-1- La croissance en longueur

De nombreuses études ont déjà été menées sur diverses espèces afin de trouver le **moyen de sélectionner les mollusques ayant la croissance la plus rapide**. Les résultats qui nous intéressent ici concernent plus particulièrement la corrélation qui existerait entre croissance larvaire et croissance après métamorphose.

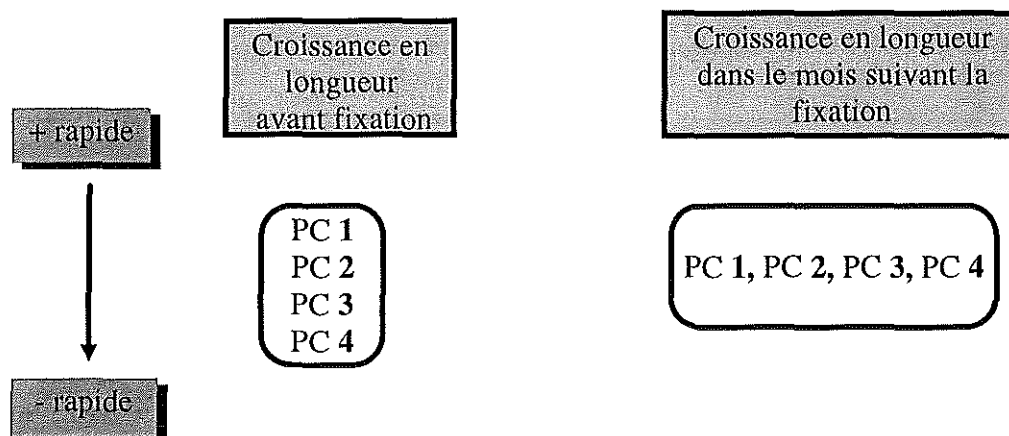
Chez *Crassostrea virginica* par exemple, il semblerait que le **taux de croissance larvaire** et le **taux de croissance des juvéniles** soient corrélés de façon positive (Haley et Newkirk, 1978; Losee, 1979; Newkirk *et al.*, 1977; Haley et Newkirk, 1991).

Lors de diverses études les résultats ont montré que, pour *C. Virginica* et *Ostrea edulis*, il n'existe par contre pas de corrélation entre croissance larvaire et croissance à la taille marchande (Newkirk *et al.*, 1977; Haley et Newkirk, 1978; Losee, 1979; Newkirk et Haley, 1982a, Newkirk et Haley, 1982b).

Le suivi que nous avons effectué sur les quatre pseudo-cohortes du programme Genephys ne permettront pas de dire si les croissances à la taille marchande et à l'état larvaire ont un rapport étant donnée la perte des animaux étudiés dès le début de l'expérience. Nous pouvons cependant donner un début de réponse concernant la relation des croissances des animaux à l'état de larve et de naissain, tous les résultats restant à confirmer par renouvellement de suivis similaires.

L'analyse de variance à deux facteurs (rang de la pseudo-cohorte et jour après fixation) nous a permis de dire qu'il n'existe pas de différences significatives ( $p < 0.09$ ) entre les cinétiques de croissance après fixation. Ceci signifie que les différences qui existaient à l'état larvaire ne se retrouvent pas dans le mois qui suit la métamorphose.

**Figure 32** : Schématisation de la cinétique de croissance en longueur de chaque pseudo-cohorte avant et après fixation



Ce schéma est basé sur les résultats obtenus lors du suivi de croissance en longueur en **jours après fixation** et non en jours après fécondation.

Ceci va dans le sens des résultats obtenus par Strömngren *et al.* (1989) chez la moule *Mytilus edulis* et qui mettaient en évidence que les longueurs des larves et des juvéniles ne sont pas corrélées. Les mêmes résultats ont été obtenus par Pechenik *et al.* (1996) concernant les gastéropodes *Crepidula plana* et *C. fornicata*.

Ces conclusions peuvent avoir des conséquences sur le **mode de sélection** des animaux pour le taux de croissance. Ainsi lorsque la croissance larvaire n'est pas représentative de la croissance à la taille marchande (Hadley *et al.*, 1991 et Manzi *et al.*, 1991 chez *Mercenaria mercenaria*; Hadley *et al.*, 1977 chez *C. virginica* et *O. edulis*), cela signifie qu'on ne peut pas sélectionner les animaux à croissance rapide de façon précoce. Strömngren (1991) conclut par exemple qu'une sélection après 2 ans pour *M. edulis* serait la méthode la plus efficace.

Nos conclusions impliquent que, pour *Crassostrea gigas*, ne garder que les animaux à croissance rapide en éliminant la queue de lot d'élevage larvaire n'assure nullement de sélectionner les animaux qui atteindront le plus vite la taille marchande.

Ces résultats sont à prendre avec une grande prudence étant donnée la courte durée du suivi entrepris sur ces animaux pour cause de mortalités massives. Il se peut en effet que les individus nouvellement fixés aient besoin d'un certain temps pour s'adapter et reprendre une croissance qui leur est propre.

Il reste maintenant à savoir si les animaux à fort taux de croissance donnent une descendance possédant les mêmes caractéristiques. Ceci permettrait encore d'améliorer la sélection par des croisements orientés. Ce point pourra être abordé lors du suivi de la seconde génération (G<sub>2</sub>) sur les animaux du programme "Genephys".

## e-2- Allométrie et poids

Le **test d'allométrie** effectué à la suite des mesures de tailles donne d'excellents résultats mis en évidence par les coefficients de régression  $R^2$ . Cela signifie que la longueur est un bon estimateur du poids total.

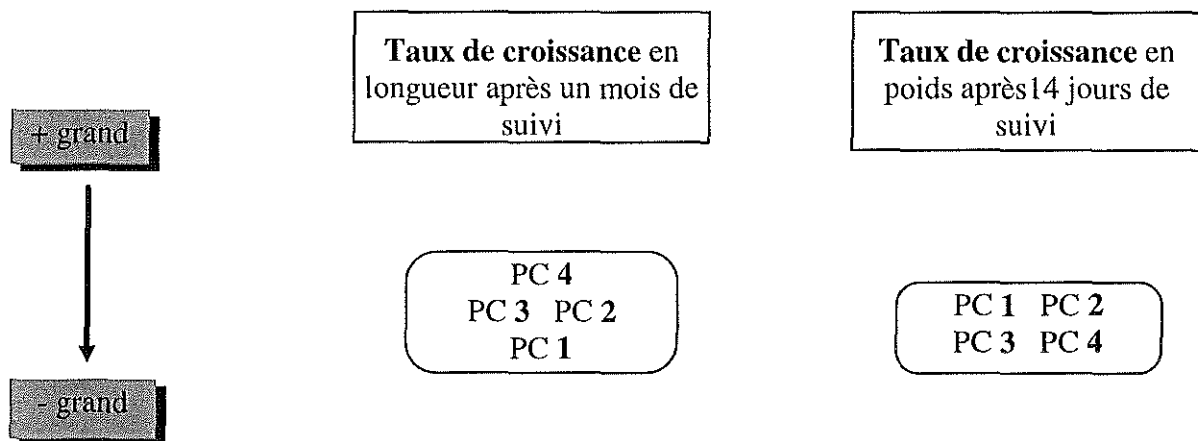
La croissance sur les plaques collectrices, bien qu'homogène, reste une **croissance "en surface"**. On peut alors se demander, étant donnée la méthode de mesure (en longueur), si on ne surestime pas légèrement la taille de ces animaux.

On peut penser que la mesure des dimensions "longueur-largeur-épaisseur" permettrait de mieux appréhender la croissance de l'huître. Cependant on peut considérer que le poids après détroquage a également été surestimé dans une certaine mesure par la parcelle de résine pesée avec chaque individu, celle-ci étant proportionnelle à sa longueur. Cela peut compenser la surestimation de taille et donner une très bonne allométrie.

Il paraît évident que **deux points de mesures de poids sont bien insuffisants** pour établir une tendance du mode de croissance.

La figure ci-dessous schématise la tendance du taux après un mois de suivi de croissance en longueur et quinze jours de suivi par pesées. Pour pouvoir effectuer la comparaison, on a repris les taux de croissance en longueur en fonction du **jour après fécondation** et non plus en fonction du jour après fixation comme c'était le cas sur la figure 32.

**Figure 33** : Shématisation de l'ordre des taux de croissance pour chaque pseudo-cohorte en fonction du jour après fécondation



Les tendances données ici sont approximatives étant donné qu'aucun test n'a été effectué pour savoir si les différences apparaissant à première vue sur les figures 15 et 21 sont significatives. Si l'on se base uniquement sur ces tendances, l'ordre des taux de croissance est bouleversé par rapport aux mesures précédentes. On ne peut toutefois pas prendre ces résultats comme définitifs si l'on considère le **choc subi au détroquage** et qui aurait pu bouleverser la croissance de certains animaux pour quelques temps. Le suivi prévu sur plusieurs mois aurait permis de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en suivi de croissance en longueur. Cette étude s'avère malheureusement inexploitable en raison de son interruption précoce forcée.

### f- Le suivi de croissance des animaux en casiers PVC

Les résultats obtenus en cinétique de croissance pour les animaux "Link" mettent en évidence, comme on l'a dit auparavant, qu'il existe des **cinétiques de croissance différentes** selon les lots. Après analyse de variance, **trois groupes** ont été différenciés selon leur cinétique :

- 1° Seudre,
- 2° Port des Barques et Bonne Anse,
- 3° Arcachon et pseudo-cohorte 4 de Genephys.

Ces conclusions amènent à se demander si la PC 4 ne contient pas une majorité d'individus issus des géniteurs d'Arcachon. Les analyses génétiques grâce aux microsattellites pourront apporter une réponse à cette interrogation.

Les conclusions émises dans le paragraphe précédent ne nous permettent pas de dire avec précision si l'élimination supposée de la tête et de la queue de lot lors de la mise en fixation a une incidence sur le taux de croissance moyen de chaque lot après métamorphose.

Le stockage des animaux dans les "cagettes" PVC au départ a permis de mettre de côté les problèmes liés à la densité. Il a en effet été montré que la densité avait un effet négatif sur la croissance des animaux (Rawson *et al.*, 1990). Ce mode de stockage a cependant posé un autre souci en limitant très vite la croissance de certains animaux qu'il a fallu sortir des casiers et marquer plus tôt que les autres.

Dans la seconde phase du suivi, après marquage de tous les individus stockés en structures PVC, même si la densité en tant que telle a été beaucoup moins contrôlée, on s'est assuré que la **quantité d'animaux dans chaque lot de stockage était identique**. Ceci implique que même si les valeurs des poids ont subi l'effet de la densité, la contrainte a été la même pour tous les animaux. Cela peut donc avoir eu un effet sur le poids lui-même, mais ne change pas au final les différences de croissance existant entre les animaux.

Contrairement au problème de la densité qui n'a été réellement contrôlée qu'en début de suivi, la **répartition aléatoire** des individus ne s'est réellement faite que lors du marquage. Cela signifie que l'on aurait pu encore améliorer la fiabilité de l'expérience en répartissant les individus de façon aléatoire dans les "cagettes" dès le départ ou tout au moins en répartissant au hasard les "cagettes" dans les différents raceways. Le fait de **mélanger les divers lots d'animaux** dans les casiers aurait demandé un travail beaucoup trop important lors du marquage étant donné qu'à chaque lot a été attribuée une couleur d'étiquette. Pour plus de facilité, un casier devait donc contenir, autant que possible, les individus d'un même lot. La répartition de ceux-ci aurait certainement pu être améliorée car dans le cas présent, les 3 "cagettes" d'un même lot ont été stockées dans le même raceway.

Le changement des conditions de répartition et de densité **semblent avoir permis une stabilisation de la croissance des animaux**. L'étape de marquage n'a apparemment pas causé de trouble trop important au niveau du taux de croissance (figure 24).

L'idée d'isoler les animaux paraît excellente dans ce genre d'étude pour s'affranchir des problèmes d'interaction croissance-environnement, mais cela demande un très grand soin et une attention toute particulière lors des scéances de pesées lorsqu'il faut veiller à ne pas déplacer les animaux dans les structures PVC d'une case à l'autre. Ce travail s'est révélé d'autant plus difficile que le nombre de cases vides était assez important pour certains lots à j 154.

L'exploitation de ces casiers n'a pas été de très longue durée étant donné la **croissance rapide** de certains animaux et le **démarrage tardif** des pesées dû à l'épisode de mortalités.

La **baisse d'effectif** en fin d'étude peut être en grande partie attribuée aux mortalités intervenues au mois de juin et qui se sont poursuivies dans des proportions moindres après le début des pesées. Le lot 1 (Seudre) semble avoir été le plus touché par ces pertes. Après diagnostic par l'équipe de pathologie, il a été trouvé que ce lot était porteur de l'Herpès-virus. Ces résultats nous ont laissé supposer que les mortalités intervenues par la suite sur le reste des lots en élevage, dans des proportions plus ou moins importantes, étaient dues à une contamination par transmission horizontale du virus à partir du lot 1.

On peut s'interroger sur le fait de savoir dans quelle mesure ce ne sont pas les individus les **plus gros ou les plus petits qui ont été les plus touchés** par l'Herpès-virus. Aucune étude n'a malheureusement été entreprise sur le sujet.

Remarque : les lots d'élevage issus des croisements intrapopulations ont été bien moins touchés par les mortalités que les pseudo-cohortes issues des croisements interpopulations.

On peut encore noter d'après les résultats présentés figure 25 que les huîtres les plus grosses sont en outre celles qui croissent le plus vite et que les plus petites ont la croissance la plus faible, tous lots confondus.

Chaque animal possède donc, selon sa taille un rythme de croissance qui lui est propre.

## 2/ Génétique

Parmi les marqueurs génétiques disponibles, les microsatellites sont ceux qui ont pris récemment le plus d'essor.

Ces séquences présentent un **grand polymorphisme** dans toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, de la drosophile (Tautz, 1989) à l'homme (Weber et May, 1989).

Les microsatellites ont contribué de façon primordiale à la **construction de cartes génétiques** chez de nombreuses espèces (Hazan *et al.*, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992; Fries *et al.*, 1990; Gellin et Chevalet, 1994).

La variabilité de longueur de ces séquences viendrait d'une mutation qui pourrait avoir lieu pendant la réplication de l'ADN (Tautz, 1989). Ces erreurs sont assez fréquentes pour maintenir un haut degré de polymorphisme mais pas assez pour se produire chez des générations successives.

Les **microsatellites connaissent un grand intérêt** pour diverses raisons (Hearne *et al.*, 1992) :

- ◆ intérêt commercial et médical (étude des maladies génétiques),
- ◆ recherche pour l'augmentation du rendement en agriculture, du taux de croissance ou des caractéristiques physiologiques par exemple dans le cas qui nous intéresse.



En comparaison à d'autres techniques utilisées, **l'utilisation des marqueurs microsatellites** présente de nombreux avantages :

- ◆ une fois mise au point, cette technique peut être **utilisée facilement en routine**;
- ◆ le haut degré de polymorphisme permet une **caractérisation très fine** des individus;
- ◆ un nombre élevé de locus microsatellites pourrait permettre d'obtenir une cartographie précise du génome de *Crassostrea gigas* et ainsi de **corréler marqueurs microsatellites et caractères simples** (taux de croissance par exemple dans le cas qui nous intéresse);
- ◆ la taille des régions amplifiées permet une visualisation sur gel de polyacrylamide dénaturant mettant en évidence des **différences de deux paires de bases**;
- ◆ le taux de mutation des microsatellites est estimé à  $5.10^{-4}$  à  $10^{-5}$  (Hearne *et al.*, 1992). C'est assez bas pour permettre leur utilisation à des fins de caractérisation au niveau individuel.

La **technique d'amplification par PCR** semble particulièrement adaptée à l'étude des microsatellites. Un rapport a d'ailleurs été rédigé sur les avantages théoriques de typer les ADN polymorphes par la PCR (Skolnick et Wallace, 1988).

Voici quelques points en faveur de l'utilisation de cette technique :

- ◆ l'amplification in vitro (PCR) permet de travailler en **conditions non destructives** (Horn *et al.*, 1989; Litt et Luty, 1989) sur de petits échantillons ou des organismes de petite taille (larves d'huître par exemple);
- ◆ la PCR permet, grâce à la connaissance des régions flanquantes, d'amplifier des **séquences d'ADN choisies** à partir de la totalité de l'ADN génomique;
- ◆ elle est capable d'amplifier l'ADN présent sous la forme **d'une simple copie** (Saiki *et al.*, 1988) comme c'est le cas dans notre étude.

Les auteurs sont souvent confrontés à **divers problèmes** lors de la lecture des autoradiographies :

- ◆ il existe parfois des artéfacts dûs à des "glissements" de la Taq polymérase, qui peut "sauter" une des répétitions. Cela donne des **bandes de taille un peu inférieure** à celles correspondant aux séquences microsatellites. Aucun moyen efficace n'a été trouvé pour résoudre ce problème. Des changements des conditions de réactions n'ont pas donné d'amélioration concernant ces artéfacts (Tautz, 1989).

♦ il peut arriver que se produise l'amplification de séquences qui n'ont rien à voir avec le microsatellite, ceci à cause d'une trop grande homologie de l'amorce pour d'autres locus.

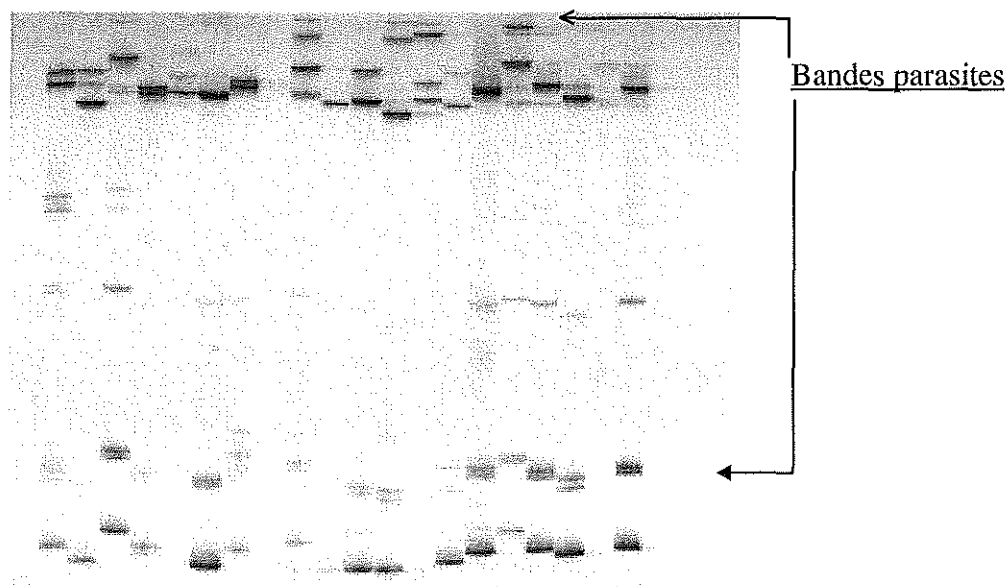
La plupart des PCR destinées à amplifier des séquences microsatellites ont été effectuées avec marquage d'une amorce au  $^{32}\text{P}$ . L'utilisation du  $^{33}\text{P}$  offre, sans nul doute, une plus grande sécurité de manipulation. Le tableau ci-dessous présente la comparaison entre ces deux isotopes.

**Tableau 23 : Propriétés comparatives et avantages du  $^{33}\text{P}$**

<b>Isotope radioactif</b>	<b><math>^{32}\text{P}</math></b>	<b><math>^{33}\text{P}</math></b>
<b>Pénétration du rayonnement dans l'air</b>	100 cm	16-17 cm
<b>Activité spécifique</b>	6000 Ci	4000 Ci
<b>Résolution</b>	très bon	très bon
<b>Bruit de fond</b>	mauvais	très bon
<b>Sécurité radiologique</b>	mauvais	très bon
<b>Temps de conservation des déchets</b>	très bon	bon

Les résultats obtenus concernant les géniteurs ne peuvent être considérés comme définitifs. La difficulté majeure de ce travail est la lecture des gels, étant donné les nombreuses bandes parasites présentes.

**Figure 34** : Visualisation de l'ensemble d'un gel de polyacrylamide



Ces bandes pourront peut-être être éliminées par modification des températures utilisées dans les cycles de PCR. Les artéfacts mentionnés plus avant nous ont finalement été très utiles pour déterminer les bandes correspondant aux séquences amplifiées.

Le déficit en hétérozygotes n'a pas pu être calculé étant donné le petit nombre d'individus étudiés et surtout leur appartenance à plusieurs populations. Le nombre d'individus homozygotes a par conséquent été évalué en terme d'effectifs pour chaque origine.

Le but d'une lecture précise des génotypes des géniteurs est de sélectionner ceux qui pourront servir de référence pour l'étude de la première génération. Cette étape sera certainement très difficile à franchir étant donné le nombre important d'allèles trouvés lors des premiers essais. Il faudra donc certainement un nombre conséquent de ces géniteurs pour voir représentés tous les allèles et les comparer à ceux de la première génération.

Le nombre d'allèles trouvés après première lecture met en évidence un polymorphisme important chez les individus de la  $G_0$  au locus CG 44. Les allèles privés présentés dans le tableau 21 permettront d'évaluer la participation des géniteurs de chaque origine à chacune des pseudo-cohortes.

Les premiers résultats concernant les individus de première génération nous indiquent que les allèles des parents se retrouvent chez ces animaux comme on pouvait logiquement s'y attendre. De plus le pourcentage d'hétérozygotie calculé pour chacune des pseudo-cohortes semble démontrer que l'homozygotie au locus CG 44 semble augmenter avec l'âge à la fixation. Ces données devront être complétées par l'étude d'un échantillon plus conséquent.

Tous les résultats présentés dans cette étude génétique sont une première étape qui nous a permis par la même occasion de mettre au point une technique fiable. Les conclusions tirées de ces données ne sont que provisoires et des vérifications sont actuellement en cours concernant l'étude des géniteurs.

## VII CONCLUSION

Le but de ce travail était de contribuer à l'étude des relations existant entre caractères physiologiques, croissance et caractéristiques génétiques de façon à sélectionner les animaux présentant les caractères les plus intéressants en termes de physiologie et de croissance.

La première étape abordée a donc été une étude de la variabilité de croissance chez les animaux d'une première génération, cette variabilité pouvant permettre de mettre en évidence un lien entre croissance et caractéristiques génétiques.

La première question était de savoir si l'étude de ces différences pouvait être abordées à partir d'animaux ayant des croissances larvaires différentes. Les résultats obtenus concernant la croissance des animaux fixés en pseudo-cohortes nous indiquent que les différences de croissance constatées avant fixation ne se retrouvent pas après métamorphose.

Les résultats du suivi de croissance nous ont d'autre part permis de constater que ces animaux de première génération issus des croisements interpopulations présentaient une variabilité de croissance importante au niveau individuel. Nous n'avons malheureusement pu poursuivre l'étude pour cause de mortalités massives subies 70 jours après fécondation.

Heureusement, il s'est révélé que les animaux issus des croisements intrapopulations présentaient une variabilité de croissance importante et suffisante pour pouvoir continuer le travail entrepris. Ceci a été mis en évidence par l'étude des cinétiques de croissance nous permettant d'établir que les individus les plus gros conservent leur avantage au cours du temps.

L'étude des caractères génétiques liés à la croissance pourrait donc se faire à partir des animaux issus de croisements intrapopulations, et ce grâce au protocole mis au point dans ce but lors de l'étude génétique entreprise au locus microsatellite CG 44.

C'est donc parmi ces animaux que devront être choisis les géniteurs devant servir à la production de la seconde génération. La sélection devra se faire à la fois sur des critères de croissance mais également sur des critères physiologiques afin de tenter de relier physiologie, croissance et génétique.

Les animaux de seconde génération, dont l'obtention est prévue en 1997 et 1998, seront soumis au même type d'études biométrique, physiologique et génétique afin de compléter les résultats obtenus.

## VIII 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., 1984b. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacologia*, 25 (2) : 525-533.

Barbin, V., Schein, E., Roux, M, Decrouez, D. et 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.

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., Hershberger, W.K. and Chew, K.K., 1979. Population genetics of the family Ostreidae. I. Interspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54 : 157-169.

Chanley, P.E., 1961. Inheritance of shell marking and growth in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Proceedings of the National Shellfish Association*, 50 : 163-169.

CREAA, 1991. Rapport 1991.

Crenshaw, J. W. Jr., Heffernan, Peter B. and Walker, Randal L., 1991. Heritability of growth rate in the Southern bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say, 1822). *Journal of Shellfish Research*, 1 (10) : 55-63.

Foltz, D. W. and Zouros E., 1984. Enzyme heterozygosity in the scallop *Placopecten magellanicus* (GMELIN) in relation to age and size. *Marine Biology Letters*, 5 : 255-263.

Fries, R., Eggen, A. and Stranzinger, G., 1990. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8 : 1-3.

Gaffney, P.M. and Scott, T.M., 1984. Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture*, 42 : 289-302.

Garton, D.W., Koehn, R.K. and Scott, T.M., 1984. Multiple-locus and the physiological energetics of growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* : the basis of variable age-specific growth. *Proceedings of the Royal Society, London*, 229 : 161-176.

Gellin, J. and Chevalet, C., 1994. Stratégie d'établissement des cartes géniques. Exemple du porc. *Genetics, Selection, Evolution*, 26 (1) : 35s-51s.

- Hadley, N.**, 1988. Improving growth rate of hard clams through genetic manipulation. *World Aquaculture*, 19 (3) : 65-66.
- Hadley, N.**, Dillon, Robert Jr. and Manzi, John, 1991. Realized heritability of growth rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 93 : 109-119.
- Haley, L.E.** and Newkirk, G.F., 1978. Selecting oysters for rapid growth. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 8 : 557-565.
- Haley, L.E.** and Newkirk, G.F., 1982. The genetics of growth rate of *Crassostrea virginica* and *Ostrea edulis*. *Malacologia*, 22 (1-2) : 399-401.
- Hawkins, A.J.S.**, Bayne, B.L. and Day, A.J., 1986. Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the blue mussel, *Mytilus edulis* : the basis of variable age-specific growth. *Proceedings of the Royal Society, London*, 229 : 161-176.
- Hawkins, A.J.S.**, Bayne, B.L., Day, A.J., Rusin, J. and Worrall, C.M., 1989. Genotype-dependant interrelations between energy metabolism and fitness. *In* J.S. Ryland and P.A. Tyler (Editors), *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms; 23rd European Marine Biology Symposium*. Olson and Olson, Fredensborg : 283-292.
- Hazan, J.**, Dubay, C., Pankowiak, M.P., Becuwe, N. and Weissenbach, J., 1992. A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics*, 12 : 183-189.
- Hearne, C.M.**, Ghosh, S. and Todd, J.A., 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetics traits. *Trends in Genetics*, 8 (8) : 288-294.
- Héral, M.**, 1993. Why carrying capacity models are useful tools for management of bivalve molluscs culture? *In* *Bivalve Filter Feeders in Estuarine Coastal Ecosystem Processes*. NATO ASI Series, Vol G33, R.F. Dame Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 455-477.
- Horn, G.T.**, Richards, B. and Klinger, K.W., 1989. Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Acid Nucleic Research*, 17 : 2140.
- Jarayabhand, P.** and Thavornnyutikarn, M., 1995. Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture*, 138 : 111-118.
- Koehn, R.K.** and Gaffney, P.M., 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 82 : 1-7.
- Koehn, R.K.**, Diehl, W.J and Scott, T.M., 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics, M.D.*, 119 : 121-130.
- Litt, M.** and Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 : 397-401.

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

**Mallet, A.L.**, Freeman, K.R. and Dickie, L.M., 1986. The genetics of production characters in the blue mussel *Mytilus edulis*. I. A preliminary analysis. Aquaculture, 57 : 133-140.

**Manzi, J.I.**, Hadley, N.H. and Dillon, R.T., 1991. Hard clam, *Mercenaria mercenaria*, broodstocks : growth of selected hatchery stocks and their reciprocal crosses. Aquaculture, in press.

**Molecular cloning**, a laboratory manual, 1989. Vol. 1, CSH.

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

**Naciri, Y.**, Vigouroux, Y., Dallas, J., Delsert, C. and Bonhomme, F., 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)<sub>n</sub> and (AC/GT)<sub>n</sub> repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). Molecular Marine Biology and Biotechnology, 4 (1) : 83-89.

**Newkirk, G.F.**, 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. Aquaculture, 19 : 209-228.

**Newkirk, G.F.**, 1983. Applied breeding of commercially important molluscs : a summary of discussion. Aquaculture, 33 : 415-422.

**Newkirk, G.F.** and Haley, L.E., 1982 a. Progress in selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 10 : 77-79.

**Newkirk, G.F.** and Haley, L.E., 1982b. Phenotypic analysis of the European oyster *Ostrea edulis* L. : relationship between length of larval period and postsetting growth rate. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 59 : 177-184.

**Newkirk, G.F.** and Haley, L.E., 1983. Selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis* : response of second generation groups. Aquaculture, 33 : 149-155.

**Newkirk, G.F.**, Haley, L.E., Waugh, D.L. and Doyle, R., 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. Marine biology, 41 : 49-52.

**Pechenik, J.A.**, Hilbish, T.J., Eyster, L.S. and Marshall, D., 1996. Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, *Crepidula plana* and *C. Fornicata*. Marine Biology, 125 : 119-127.

**Rassman, K.**, Schlöterer, C. and Tautz, D., 1991. Isolation of simple-sequence loci for use in Polymerase Chain Reaction-base DNA fingerprinting. Electrophoresis, 12 : 113-118.

**Rawson, P.D.** and Hilbish, T.J., 1990. Heritability of juvenile growth for the hard clam *Mercenaria mercenaria*. Marine biology, 105 : 429-436.

**Saiki, R.K.**, Gelfand, S., Stoffel, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491.

**SAS Institute Inc.**, 1988. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 : 1028 pp.

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

**Singh, S.M.** and Zouros, E., 1981. Genetics of growth rate in oysters and its implications for aquaculture. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 23 : 119-130.

**Skolnick, M.H.** and Wallace, R.B., 1988. Simultaneous analysis of multiple polymorphic loci using amplified sequence polymorphisms. *Genomics*, 2 : 273-279.

**Strömgen, T.** and Nielsen, M. V., 1989. Heritability of growth in larvae and juveniles of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 80 : 1-6.

**Tautz, D.**, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17 : 6463-6471.

**Thiriou-Quiévreux, C.** and Ayraud, N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de Bivalves et Gastéropodes marins. *Marine Biology*, 70 : 165-172.

**Thiriou-Quiévreux, 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.

**Toro, J.E.** and Newkirk, G.F., 1990. Phenotypic analysis in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* Philippi 1845 : relationship between juvenile and adult growth rates. *Aquaculture and Fisheries Movement*, 21 : 285-291.

**Wada, K.T.**, 1986. Genetic selection for shell traits in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 57 : 171-176.

**Walsh, P.S.**, Metzger, D.A. and Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing of forensic material. *BioTechniques*, 10 : 506-513.

**Weber, J.L.** and May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44 : 388-396.

**Weissenbach, J.**, Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Milasseau, P., Vaysseix, G. and Lathrop, M., 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359 : 794-801.

**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 : Implantations de l'IFREMER

- Centres
- Stations rattachées / Attached stations
- ▲ Délégations / Delegations



**Participant n°1** : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), FRANCE.

**Equipe scientifique** : **Laboratoire Génétique Aquaculture et Pathologie** (IFREMER La Tremblade et Bouin) (participant : P1a)

Dr. André GERARD,  
Dr. Yamama NACIRI,  
Dr. Pierre BOUDRY,  
Dr. Claude DELSERT,  
Dr. Jean-Pierre BAUD (Bouin),  
Serge HEURTEBISE,  
Christophe LEDU,  
Max NOURRY (Bouin),  
Pascal PHELIPOT.

**Centre de recherche en Ecologie Marine et Aquaculture** (Unité mixte IFREMER/CNRS L'Houmeau) (participant : P1b)

Dr. Maurice HERAL,  
Dr Serge BOUGRIER,  
Bertrand COLLET.

**Laboratoire Méditerranéen de Recherche en Aquaculture** (IFREMER Palavas) (participant : P1c)

Dr Dominique BUESTEL,  
Catherine VERCELLI,  
Jocelyne OHEIX.

**Laboratoire de Physiologie des Mollusques** (IFREMER Brest) (participant : P1d)

Dr Jean-François SAMAIN,  
Jeanne MOAL,  
Claudie QUERE,  
Jean Yves DANIEL.

### Objectifs

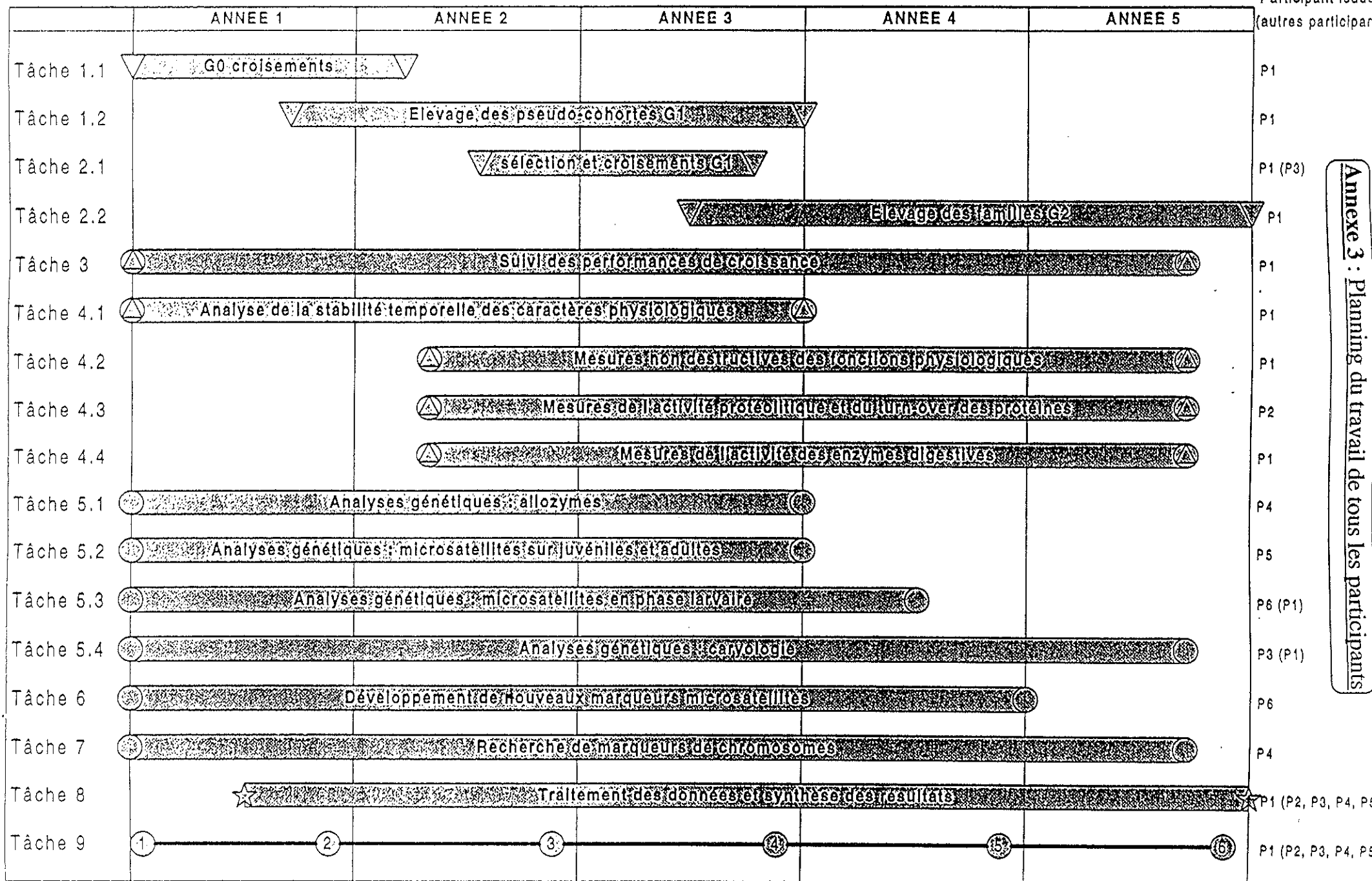
- Obtention et gestion du matériel biologique
- Suivi de croissance du matériel biologique
- Participation aux analyses génétiques
- Mesure des fonctions physiologiques
- Exploitation et synthèse des données.

**Participant n°2** : Plymouth Marine Laboratory , GRANDE-BRETAGNE

**Equipe scientifique** : Dr A.J.S. HAWKINS  
Miss A. DAY

### Objectifs

- Mesure de fonctions physiologiques
- Exploitation et synthèse des données.



Annexe 3 : Planning du travail de tous les participants

## Annexe 4 : Coloration des cellules au Hoeschst pour observation au microscope à épifluorescence

### Coloration in vitro (Hoeschst 33258 à utiliser à 0.5 µg/ml)

- ◆ Fixer les cellules pendant 60 min dans le tampon fixateur (GA + formol à 6 %) : un volume d'ovocytes + un volume de tampon fixateur
- ◆ Enlever le tampon fixateur par aspiration grâce à une trompe à vide
- ◆ Laver 60 min dans le tampon GA (2 lavages de 30 min)
- ◆ Colorer 60 min dans une solution de GA + Hoeschst (1 µl de solution stock pour 1 ml d'oeufs)
- ◆ Laver 60 min dans le tampon GA (2 lavages de 30 min)
- ◆ Observer au microscope en épifluorescence

### Préparation de la solution stock de Hoeschst

A préparer à 0.5 mg/ml

#### Tampon GA

<u>Produit</u>	<u>Molarité</u>	<u>g/l de solution</u>
N-méthylglucamine	250 mM	48.8
K-gluconate	250 mM	58.6
Hepes	50 mM	13.0
EGTA	10 mM	3.8

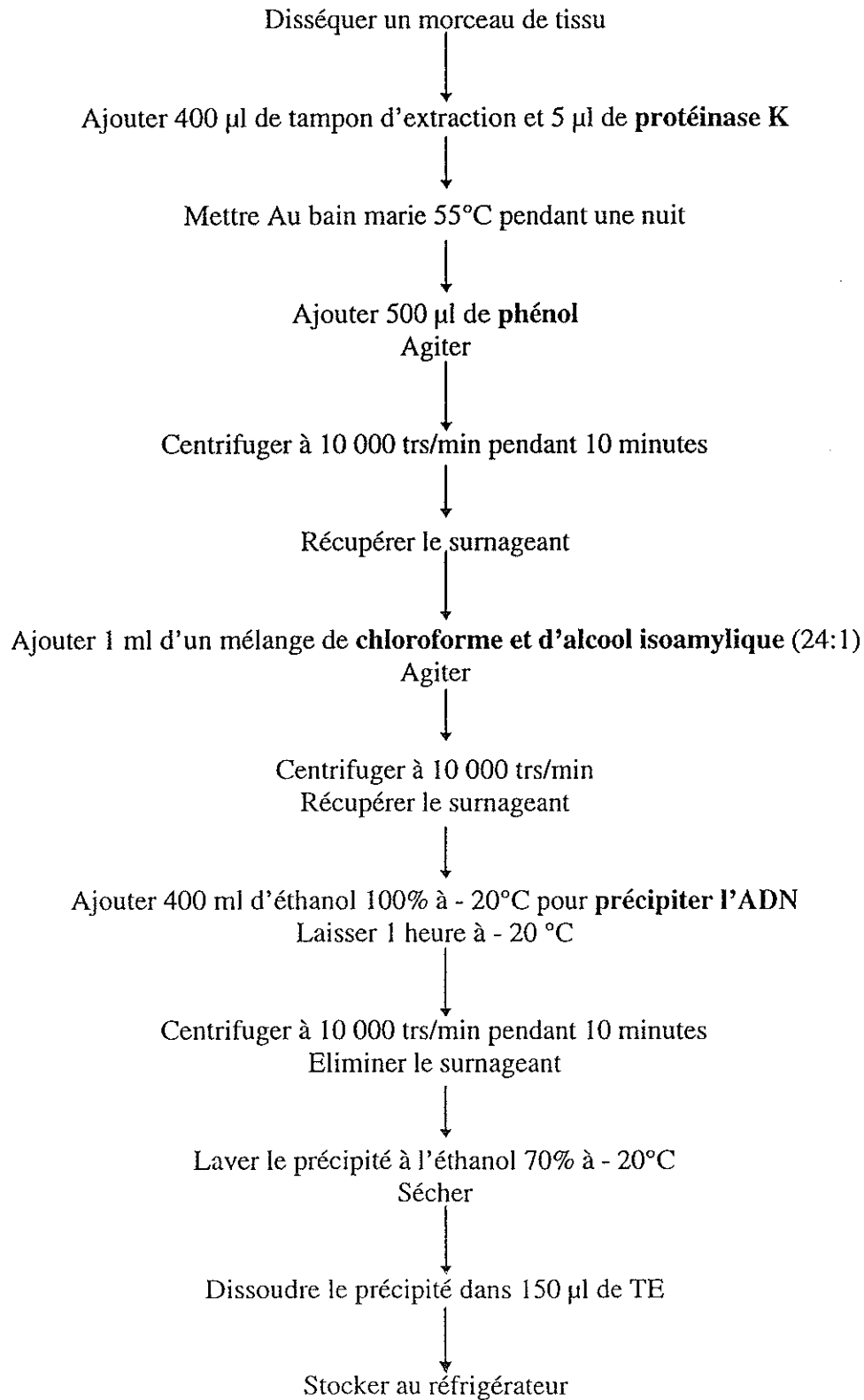
Ajuster à pH 4 avec de l'acide acétique glacial

#### Tampon de fixation

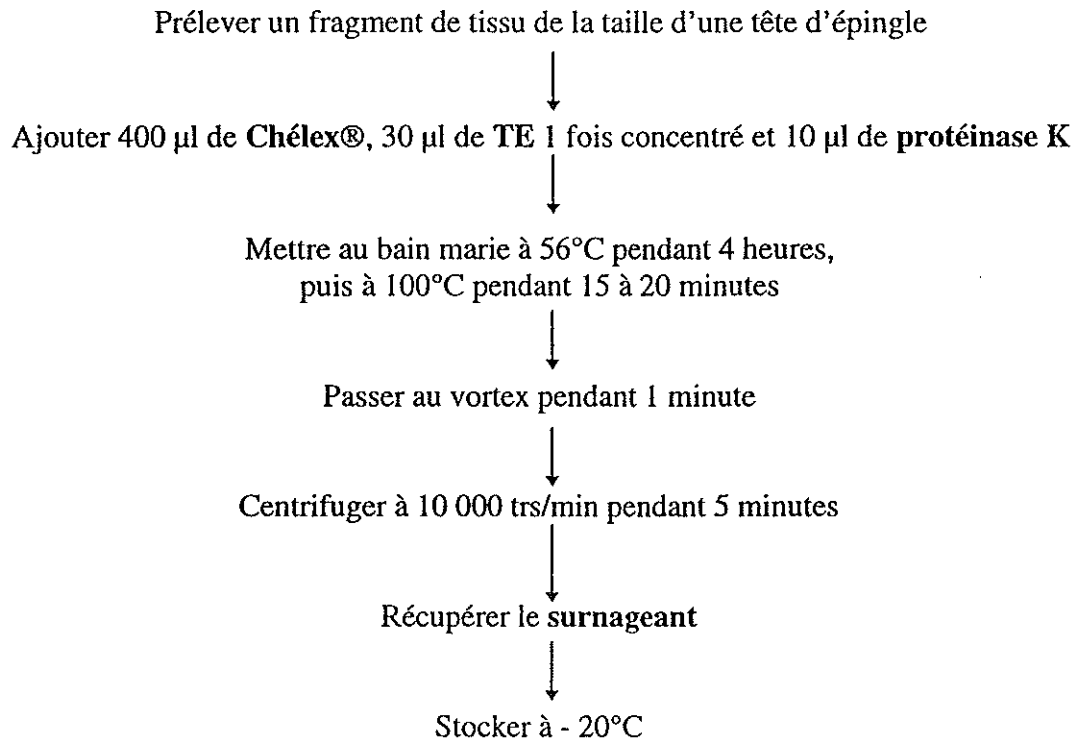
Pour 500 ml :

79 ml de formaldéhyde  
compléter à 500 ml avec le tampon GA

## Annexe 5 : Protocole d'extraction de l'ADN au phénol-chloroforme



## Annexe 6 : Protocole d'extraction de l'ADN au Chélex®



**Annexe 7 : Préparation pour l'amplification d'ADN par PCR**  
**non radioactive**  
**(Polymerase Chain reaction)**

Pour un volume réactionnel final de 25 µl

Tampon de l'enzyme	2.5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (1 µM)	3 µl	locus CG44
	2 µl	locus CG49
	1 µl	locus CG108
dNTP (2µM)	2.5 µl	
Amorce F (20 µM)	0.5 µl	
Amorce R (20 µM)	0.5 µl	
ADN extrait au Chélex	15 µl	
Taq polymerase	0.15 µl	
Eau	0.85 µl	

**Références :**

Taq polymerase : Goldstar DNA Polymerase Eurogentec (5 U/µl)

Tampon de l'enzyme : Goldstar reaction Buffer Eurogentec



## Annexe 8 : Protocole utilisé pour la PCR radioactive

### ◆ Marquage de l'une des amorces au $^{33}\text{P}$

Pour un échantillon d'ADN (4  $\mu\text{l}$ ):

- ◆ Décongeler la source radioactive
- ◆ Préparer un mélange contenant :
  - 0,51  $\mu\text{l}$  d'eau
  - 0,23  $\mu\text{l}$  d'amorce F à 20  $\mu\text{M}$
  - 0,1  $\mu\text{l}$  de tampon A (Kinase buffer Eurogentec)
  - 0,06  $\mu\text{l}$  d'enzyme (T4 Kinase Eurogentec 100 U/ $\mu\text{l}$ )
- ◆ Ajouter à ce mélange 0,1  $\mu\text{l}$  de  $^{33}\text{P}$
- ◆ Mettre au bain marie :
  - à 37°C pendant 30 minutes
  - à 70°C pendant 10 minutes

### ◆ Préparation du mélange contenant l'amorce non marquée

Pour un échantillon d'ADN (4  $\mu\text{l}$ ) :

- 6,18  $\mu\text{l}$  d'eau
- 1,5  $\mu\text{l}$  de tampon 10 fois concentré
- 1,5  $\mu\text{l}$  d'oligonucléotides à 2 $\mu\text{M}$
- 0,6  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$
- 0,21  $\mu\text{l}$  d'amorce R à 20  $\mu\text{M}$
- 0,05  $\mu\text{l}$  de Taq polymérase

### ◆ Ajouter ensuite le mélange contenant l'amorce radioactive pour obtenir le mélange final

### ◆ Préparation des échantillons d'ADN pour l'amplification

Rq : Les échantillons sont déposés sur plaques.

Déposer 4  $\mu\text{l}$  d'ADN

Ajouter 11  $\mu\text{l}$  du mélange final

Effectuer la PCR suivant le cycle indiqué dans le paragraphe Matériel et méthodes

Stocker à -20° C

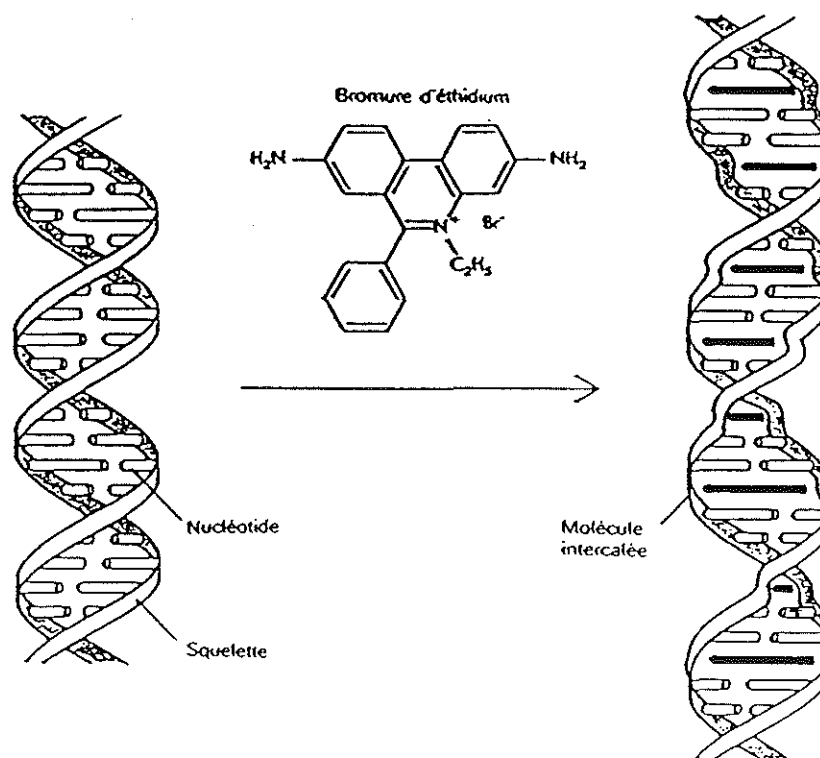
### ◆ Préparation des échantillons d'ADN pour la migration sur gel de polyacrylamide dénaturant

Ajouter 10  $\mu\text{l}$  de bleu de dépôt dénaturant par échantillon

Dénaturer les produits de PCR à 94 °C pendant 8 minutes

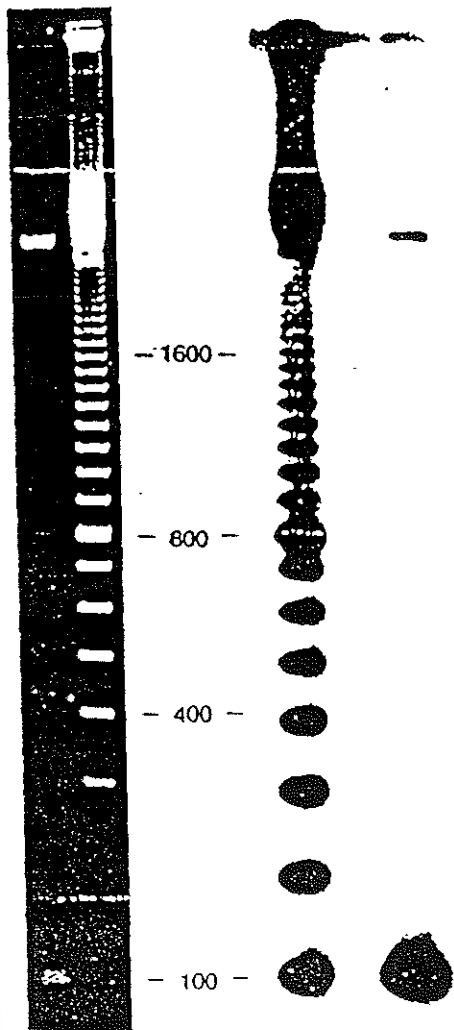
Déposer 4  $\mu\text{l}$  du mélange dénaturé par puits

## Annexe 9 : Le mode d'action du BET (Bromure d'Éthidium)



Intercalation de bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN. Notez que le bromure d'éthidium augmente l'espacement entre les paires de bases successives, provoque une distorsion du squelette sucre-phosphate régulier et diminue le pas de l'hélice.

(d'après Watson et *al*, 1989.)



### Molecular Weight Markers (continued)

#### 100 Base-Pair Ladder

- For simple determination of the sizes of DNA fragments from 100-2000 bp on agarose gels.

The 100 Base-Pair Ladder is a useful "ruler" for determining the size of double-stranded DNA fragments in the range indicated above. The Ladder has uniform gaps of 100 base pairs between successively larger DNA fragments. This brings two important advantages: simplicity (because unknown DNA fragments can be "measured" on a "ruler" with a 100 base-pair scale) and accuracy (because there are no large gaps between marker fragments). Since the ladder is prepared by a partial restriction digest of a plasmid, it is not designed for quantitating the amount of DNA in a sample.

The Ladder may be visualized by ethidium bromide fluorescence or by autoradiography (assuming it is first labelled). It resolves to 20 or more readily distinguishable bands on a 1.5% agarose gel. Each band stains with approximately the same intensity, except for the band at 800 base pairs, which is twice as intense as the others. (This "band" is actually a combination of the Ladder's own 800 bp band and a "spike" of a 792 bp fragment.) The 100 Base-Pair Ladder is supplied at 1 µg/µl in TE buffer.

## Annexe 11 : Préparation des gels d'acrylamide

### Gel d'acrylamide pour l'étude en radioactivité

#### Préparation de la solution stock

420 g d'Urée diluée à chaud dans 300 ml d'eau  
150 ml d'Acrylogel n° 5  
100 ml de TBE 10 fois concentré

Compléter à 1 l  
Stocker au réfrigérateur

#### Préparation du gel (60 ml)

60 ml de la solution stock  
370 µl d'APS 10% (Ammonium PerSulfate)  
51 µl de TEMED  
(Ces deux derniers produits facilitent la polymérisation)

### Gel d'acrylamide pour l'étude "en froid" (8 %)

#### Préparation de la solution stock

Pour 500 ml

145 g d'Acrylamide  
5 g de N-N' Macrylamide  
eau qsp 500 ml

Dissoudre à 37 °C.

#### Préparation du gel (40 ml)

10.6 ml de la solution stock  
21.1 ml d'eau  
8 ml de TBE 5 fois concentré  
280 µl d'APS 10 %  
35 µl de TEMED

## Annexe 12 : Diverses solutions utilisées

### ♦ TBE (Tris borate EDTA)

0.045 M de Tris borate  
0.001 M d'EDTA pH 8.0

### ♦ TAE 10 X

0.04 M de Tris acétate  
0.001M d'EDTA pH 8.0

### ♦ Solution d'EDTA 0.5 M pH 8.0

186.1 g d'EDTA  
800 ml d'eau  
ajuster à pH 8.0 avec de la soude

### ♦ Solution d'APS (Ammonium PerSulfate) 10 %

Pour 10 ml

1 g d'ammonium persulfate  
10 ml d'eau

Stocker au réfrigérateur

### ♦ Bleu de charge non dénaturant

0.25 % de bleu de bromophénol  
0.25 % de cyanol xylène  
40 % (poids/volume) de saccharose  
eau qps 100%

### ♦ Bleu de charge dénaturant

10 ml de formamide  
10 mg de xylène cyanol FF  
10 mg de bleu de bromophénol  
200 µl d'EDTA 0,5 M(pH 8.0)

**Annexe 13 : Sex ratio des géniteurs de chaque population**

<b>Origine</b>	<b>n° lot correspondant</b>	<b>Effectif</b>	<b>% mâles</b>	<b>% femelles</b>
Seudre	1	30	60	40
Port des Barques	2	30	33,3	66,7
Bonne Anse	3	30	36,7	63,3
Arcachon	4	30	16,7	83,3
<b>Moyenne Genephys</b>			<b>36,68</b>	<b>63,33</b>
Conway	5	28	64,3	35,7
<b>Moyenne Link</b>			<b>42,2</b>	<b>57,8</b>

## Annexe 14 : Dénombrement des gamètes pour chaque lot de géniteurs

### SEUDRE : lot1

Sexe	Référence	concentration en gamètes	volume total	nombre total	nombre utilisé	volume utilisé
F	M1	30 000 ovocytes/ml	500 ml	15 millions	3 millions	100 ml
	M2	28 000	500	14	3	107,1
	M3	34 000	500	17	3	88,2
	M4	13 000	500	6,5	3	230,8
	M5	24 000	500	12	3	125
Moy		25 800	500	12,9	3	130,22
M	M1	44 500 000 spzoïdes/ml	500 ml	22,25 milliards	300 millions	6,742 ml
	M2	49 800 000	500	24,9	300	6,024
	M3	70 800 000	500	35,4	300	4,237
	M4	36 710 000	500	18,355	300	8,172
	M5	26 100 000	500	13,05	300	11,494
Moy		45 582 000	500	22,791	300	7,334

### Port des Barques : lot 2

Sexe	Référence	concentration en gamètes	volume total	nombre total	nombre utilisé	volume utilisé
F	B1	47 000 ovocytes/ml	500 ml	23,5 millions	3 millions	63,8 ml
	B2	43 000	500	21,5	3	69,8
	B3	45 000	500	22,5	3	66,7
	B4	9 000	500	4,5	3	333,3
	B5	18 000	500	9	3	166,7
Moy		32 400	500	16,2	3	140,06
M	B1	49 800 000 spzoïdes/ml	500 ml	24,9 milliards	300 millions	6,024 ml
	B2	41 900 000	500	20,95	300	7,16
	B3	13 100 000	500	6,55	300	22,901
	B4	18 300 000	500	9,15	300	16,393
	B5	26 200 000	500	13,1	300	11,45
Moy		29 860 000	500	14,93	300	12,78

**Annexe 14 : Dénombrement des gamètes pour chaque lot de géniteurs  
(suite)**

**Bonne Anse : lot 3**

Sexe	Référence	concentration en gamètes	volume total	nombre total	nombre utilisé	volume utilisé
F	V1	20 000 ovocytes/ml	500 ml	10 millions	3 millions	150 ml
	V2	33 000	500	16,5	3	90,9
	V3	41 000	500	20,5	3	73,2
	V4	56 000	500	28	3	53,6
	V5	81 000	500	40,5	3	37
Moy		46 200	500	23,1	3	80,94
M	V1	41 900 000 spzoïdes/ml	500 ml	20,95 milliards	300 millions	7,16 ml
	V2	36 700 000	500	18,35	300	8,174
	V3	26 200 000	500	13,1	300	11,45
	V4	39 300 000	500	19,65	300	7,634
	V5	7 800 000	500	3,9	300	38,462
Moy		30 380 000	500	15,19	300	14,576

**Arcachon : lot 4**

Sexe	Référence	concentration en gamètes	volume total	nombre total	nombre utilisé	volume utilisé
F	J1	27 000 ovocytes/ml	500 ml	13,5 millions	3 millions	111,1 ml
	J2	33 000	500	16,5	3	90,9
	J3	21 000	500	10,5	3	142,9
	J4	87 000	500	43,5	3	34,5
	J5	54 000	500	27	3	55,6
Moy		44 400	500	22,2	3	87
M	J1	68 000 000 spzoïdes/ml	500 ml	34 milliards	300 millions	4,412 ml
	J2	81 300 000	500	40,65	300	3,69
	J3	18 300 000	500	9,15	300	16,393
	J4	36 700 000	500	18,35	300	8,174
	J5	15 700 000	500	7,85	300	19,108
Moy		44 000 000	500	22	300	10,35

**Conway : lot 5**

Sexe	Référence	concentration en gamètes	volume total	nombre total	nombre utilisé	volume utilisé
F	R1	72 000 ovocytes/ml	500 ml	36 millions	3 millions	41,7 ml
	R2	76 000	500	38	3	39,5
	R3	38 000	500	19	3	78,9
	R4	38 000	500	19	3	78,9
	R5	24 000	500	12	3	125
Moy		49 600	500	24,8	3	72,8
M	R1	23 600 000 spzoïdes/ml	500 ml	11,8 milliards	300 millions	12,712 ml
	R2	10 500 000	500	5,25	300	28,571
	R3	22 600 000	500	11,3	300	13,274
	R4	26 200 000	500	13,1	300	11,45
	R5	10 500 000	500	5,25	300	28,571
Moy		18 680 000	500	9,34	300	18,916



	Lot	Nombre de larves	taille min en $\mu\text{m}$	taille moy en $\mu\text{m}$	taille max en $\mu\text{m}$	température	salinité	phytoplancton distribué
Genephys	1	4 400 000	67	73	76	22,9°C	31,7 pour mille	Isochrysis galbana
	2	4 320 000	67	73	76			
	3	4 000 000	67	73	76			
	4	3 520 000	67	73	76			
Moyenne		4 060 000	67	73	76			
Link	1	6 320 000	69	74,2	79	22,9	31,7	Isochrysis galbana
	2	4 680 000	67	71,6	78			
	3	4 850 000	67	71,3	77			
	4	4 507 000	65	71,4	78			
	5	6 460 000	67	72,6	78			
Moyenne		3 563 400	67	72,2	78			
<b>MOYENNE</b>		4 784 000	67	72,3	77,6			

ajustement

jour apres fécondation	lot	nombre	densité (larves/ml)	taille min	taille max	différence	taille moy	température	salinité	Phytoplancton distribué
1	1	4 400 000	29					22,9 °C	31,7 /1000	Isochrysis galbana (500 ml/100 l par jour)
	2	4 320 000	28	67	76	9	72,8			
	3	4 000 000	26	µm	µm	µm	µm			
	4	3 520 000	23							
3	1	1 390 000	9,2					22,5	31,7	Isochrysis galbana
	2	1 746 000	11,6	71	98	27	78,2			
	3	1 350 000	9							
	4	2 030 000	13,5							
6	1	1 450 000	9,6					22,7	31,8	Isochrysis galbana
	2	1 240 000	8,2	82	122	40	95,6			
	3	1 210 000	8							
	4	1 980 000	13,2							
8	1	1 360 000	9						32,1	Isochrysis galbana
	2	1 400 000	9,3	79	155	76	108,7			
	3	1 470 000	9,8							
	4	1 495 000	9,9							
10	1	750 000	3					22	31,6	Isochrysis galbana
	2	640 000	3	87	212	125	129,5			
	3	510 000	3,4							
	4	550 000	3,6							
13	1	410 000	2,7					22,8	32,2	Isochrysis galbana
	2	130 000	0,86	104	286	182	182,2			
	3	360 000	2,4							
	4	630 000	4,2							
15	1	440 000	2,9					22,7	31,2	Isochrysis galbana
	2	90 000	0,6	106	314	208	227,5			
	3	350 000	2,3							
	4	390 000	2,6							
17	1	400 000	2,6					22,7	31,3	Isochrysis galbana
	2	92 000	0,6	127	340	213	271,5			
	3	260 000	1,7							
	4	382 000	2,5							

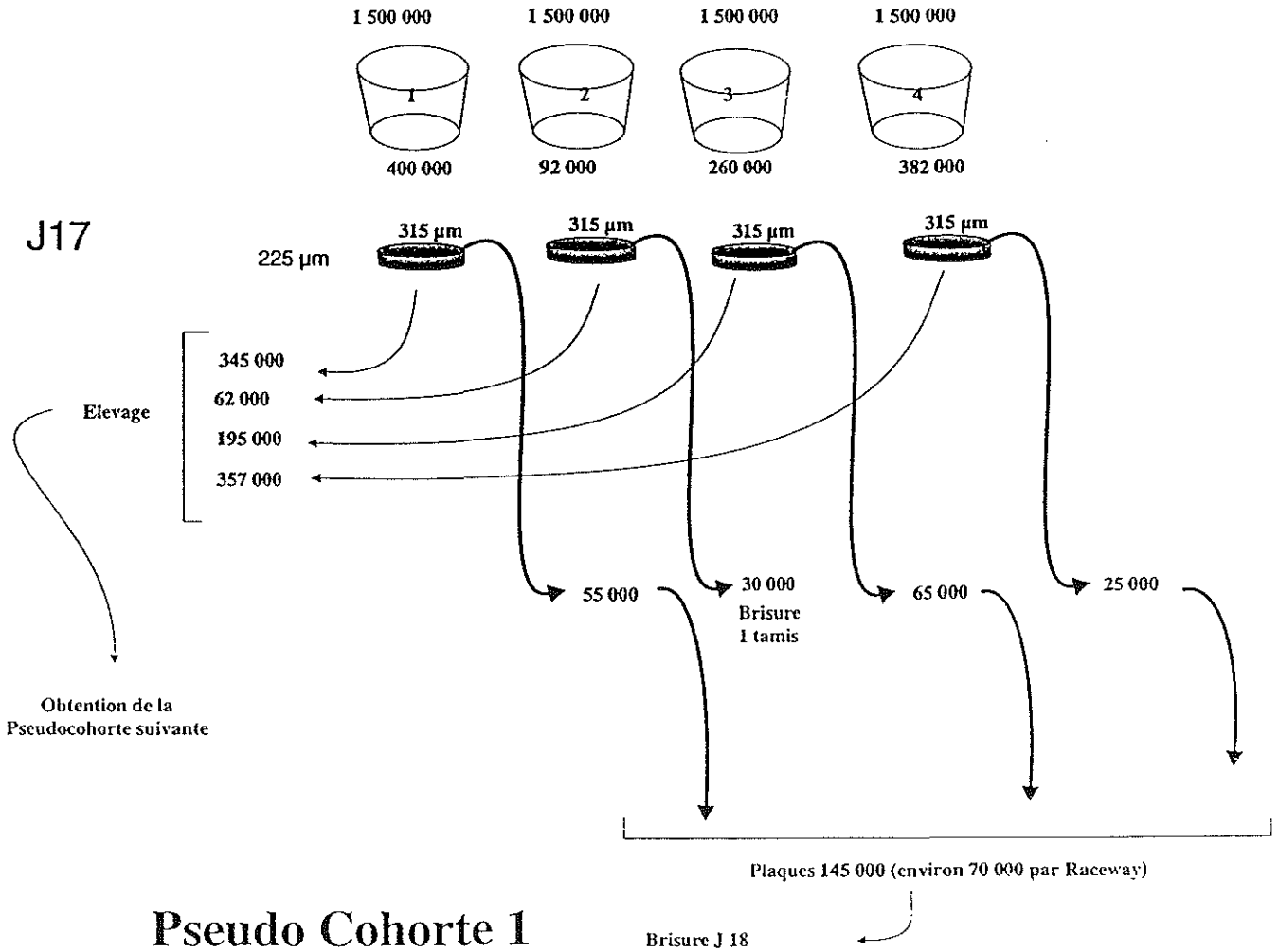
Annexe 16 : Déroulement des élevages larvaires  
Pour les quatre lots "Genephys"

Jour d'élevage	lot n°	nombre de larves	densité	T min (um)	T moy	T max	Différence	Température	Salinité	Nourriture
	1	6 320 000	42 larves/ml	69		79	10	22,9	31,7	Isochrysis galbana
	2	4 680 000	31	67		78	11			
	3	4 850 000	32	67		77	10			
	4	4 507 000	30	65		78	13			
	5	6 460 000	43	67		78	11			
3	1	1 347 000	8,9	77	85	89	12	22,5	31,7	Isochrysis galbana
	2	1 603 000	10,6	78	84	88	10			
	3	1 180 000	7,8	74	84	91	17			
	4	1 450 000	9,6	77	85	89	12			
	5	1 070 000	7,1	79	86	93	14			
6	1	1 310 000	8,7	83	89	102	19	22,7	31,8	Isochrysis galbana
	2	1 600 000	10,6	79	91	105	26			
	3	1 300 000	8,6	82	92	111	29			
	4	1 500 000	10	86	98	119	33			
	5	1 060 000	7	77	91	101	24			
8	1	1 130 000	7,5	86	106	139	53		32,1	Isochrysis galbana
	2	1 280 000	8,5	81	106	142	61			
	3	1 105 000	7,3	81	112	153	72			
	4	1 200 000	8	88	114	141	53			
	5	730 000	4,8	88	108	153	65			
10	1	550 000	3,6	90	125	162	72	22	31,6	Isochrysis galbana
	2	550 000	3,6	93	127	197	104			
	3	620 000	4,1	87	125	178	91			
	4	750 000	5	94	132	176	82			
	5	600 000	4	91	120	166	75			
13	1	510 000	3,4	101	143	226	125	22,8	32,2	Isochrysis galbana
	2	320 000	2,1	93	134	180	87			
	3	570 000	3,8	92	161	238	146			
	4	775 000	5,1	110	166	217	107			
	5	600 000	4	113	150	219	106			
15	1	314 000	2	101	174	252	151	22,7	31,2	Isochrysis galbana
	2	384 000	2,5	104	160	246	142			
	3	644 000	4,2	87	196	281	194			
	4	457 000	3	102	199	286	184			
	5	537 000	3,5	98	198	295	197			
17	1	320 000	2,1	116	177	247	131	22,7	31,3	Isochrysis galbana
	2	290 000	1,9	105	182	258	153			
	3	680 000	4,5	114	210	308	194			
	4	490 000	3,2	156	234	322	166			
	5	420 000	2,8	125	229	333	208			
20	1	155 000	1	139	197	244	105			Isochrysis galbana
	2	250 000	1,6	148	237	297	149			
	3	660 000	4,4	167	271	348	181			
	4	543 000	3,6	154	269	353	199			
	5	480 000	3,2	144	272	352	208			

Annexe 16 : Déroulement des élevages larvaires (suite)  
Pour les cinq lots "Link"

**Annexe 17 : La fixation des quatre lots "Genephys" en pseudo-cohortes**

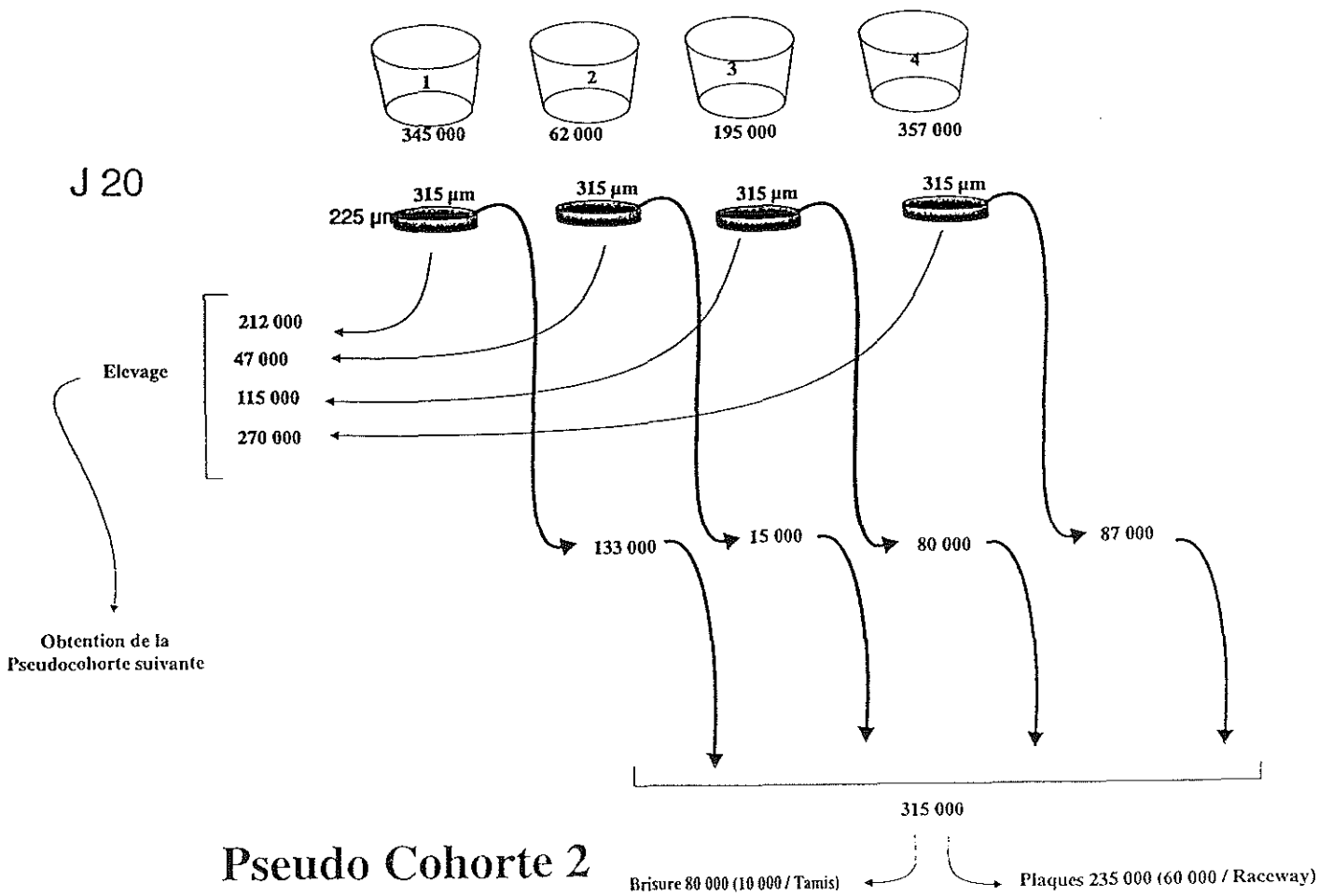
**PC 1**



**Pseudo Cohorte 1**

**Annexe 17 : La fixation des quatre lots "Genephys" en pseudo-cohortes (suite)**

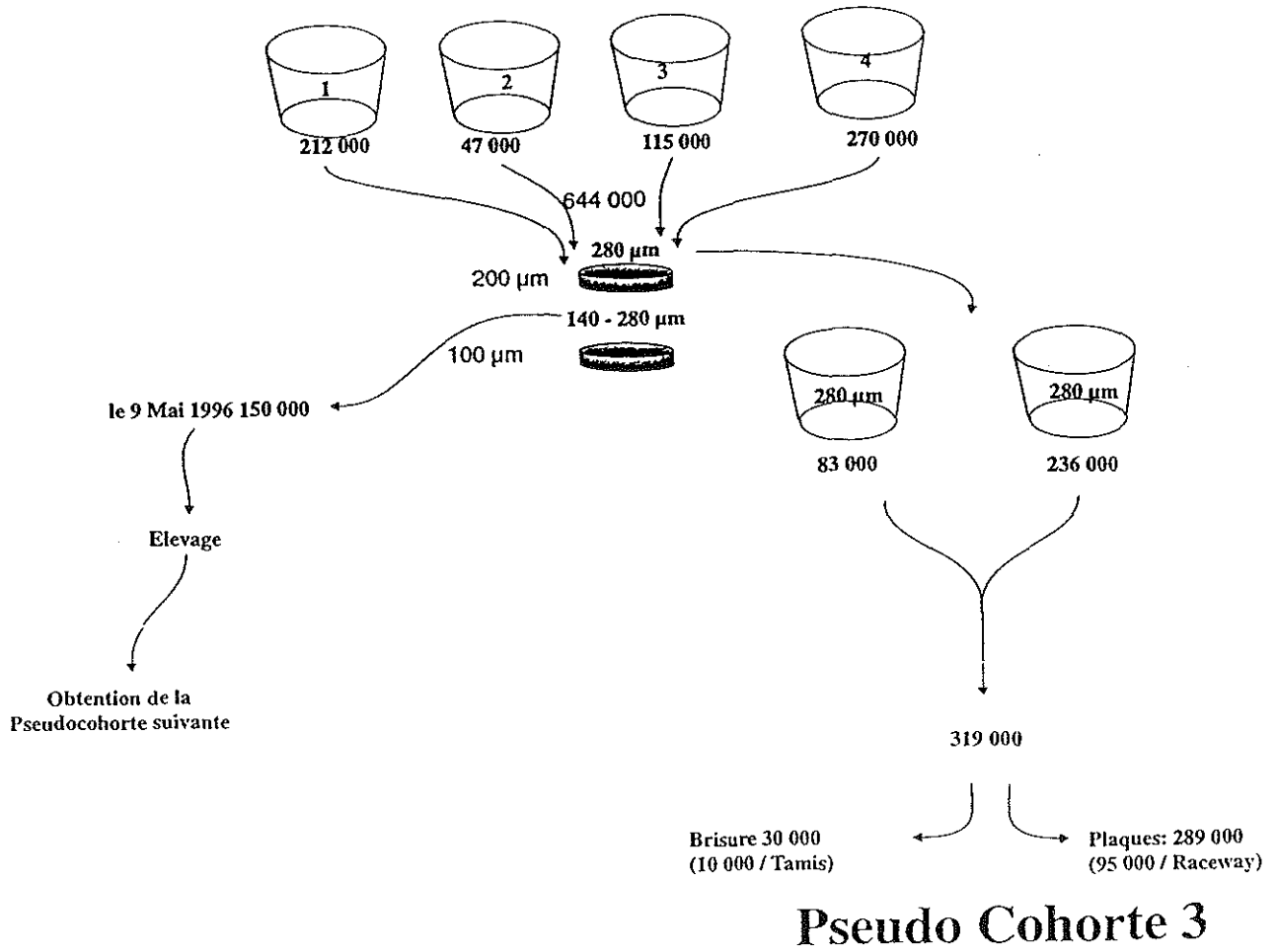
**PC 2**



**Annexe 17 : La fixation des quatre lots "Genephys" en pseudo-cohortes (suite)**

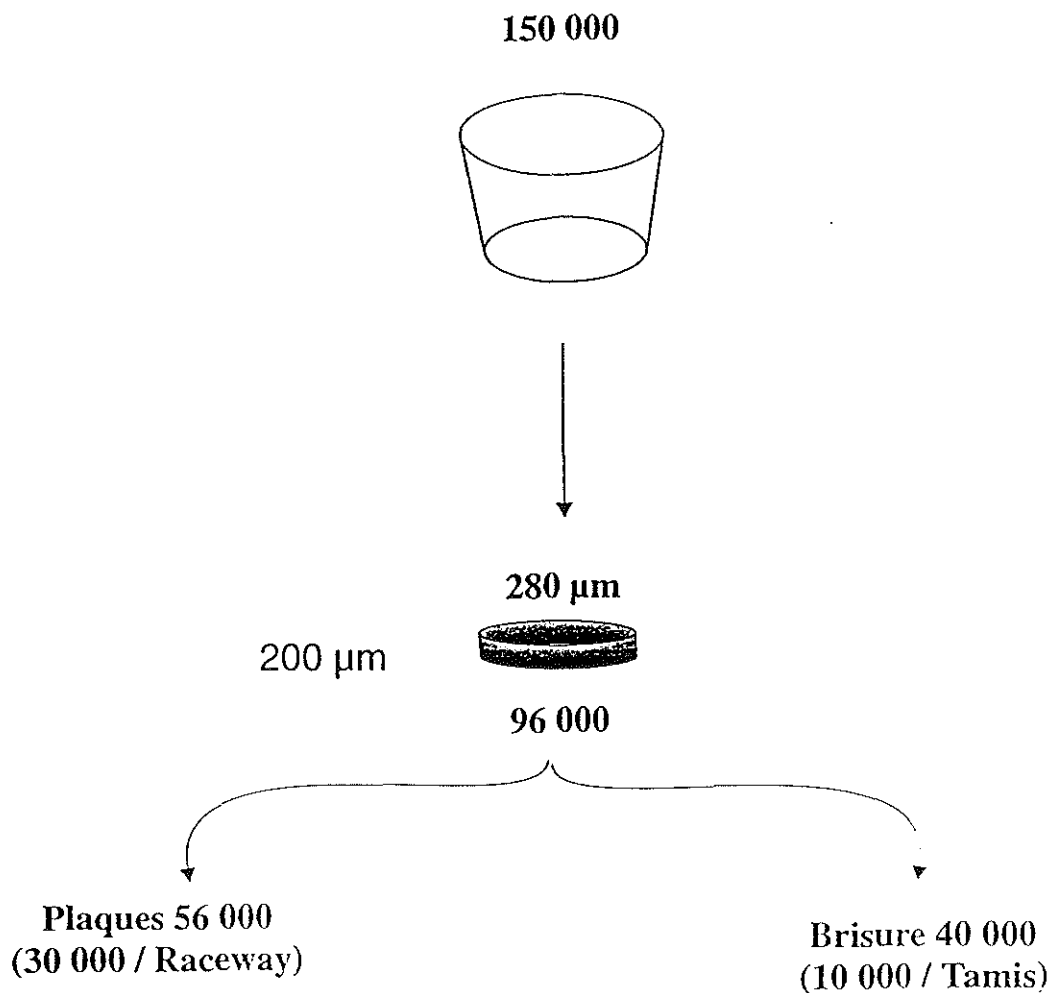
**PC 3**

J 23



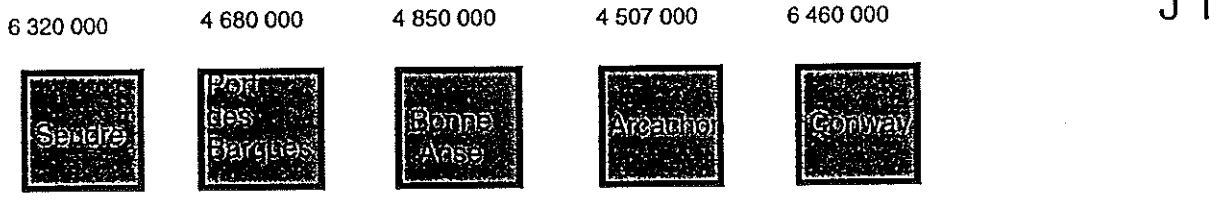
**Annexe 17 : La fixation des quatre lots "Genephys" en pseudo-cohortes (suite)**  
**PC 4**

J 26

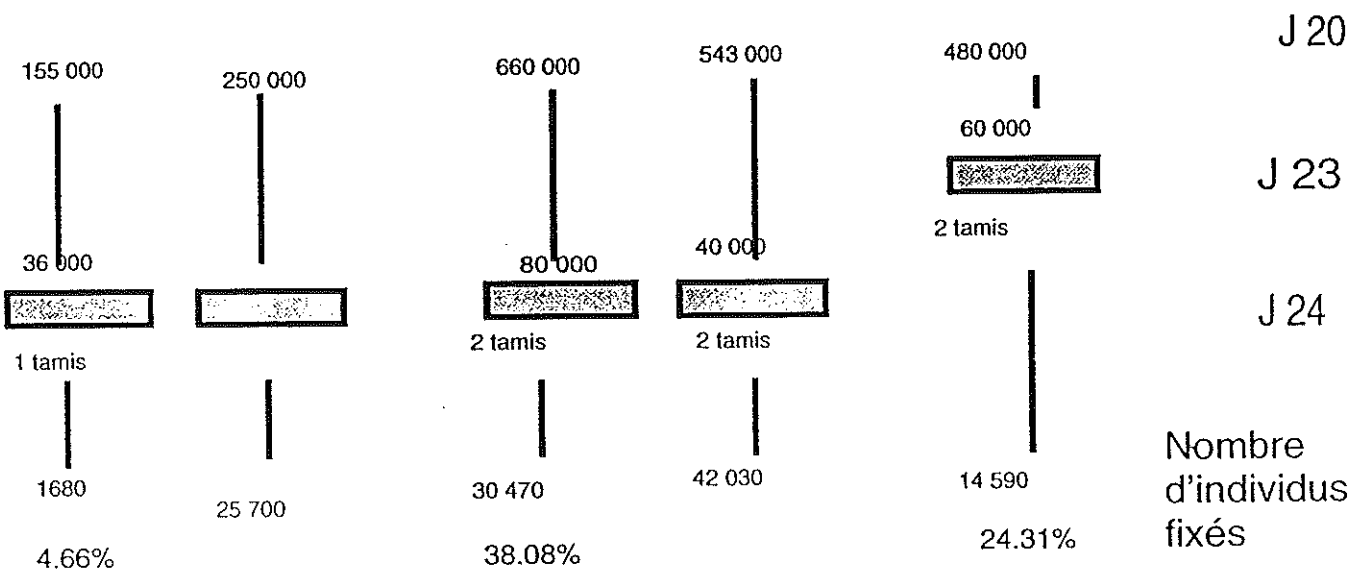


# Pseudo Cohorte 4

**Annexe 18 : La fixation des lots "Link" sur brisure**



ajustement à 1 500 000





## Annexe 19

### Suivi de la croissance en poids des animaux du programme Genephys

<u>date de mesure</u>	j 62				j 69			
<u>PC n°</u>	1	2	3	4	1	2	3	4
<u>Poids moyen en g</u>	0,8	0,4	0,4	0,3	1,7	1,1	0,6	0,4
<u>écart-type</u>	0,4	0,2	0,2	0,2	0,7	0,5	0,3	0,3
<u>gain moyen en g</u>					0,8	0	0,2	0,1
<u>écart-type</u>					0,4	0,5	0,1	0,1
<u>gain moyen en %</u>					100	140	50	50
<u>écart-type</u>					0,8	0,7	0,1	0,2
<u>effectif</u>	99	97	99	81	97	79	92	79

### Répartition des animaux dans les casiers PVC

<u>N° de cagette</u>	<u>Référence du lot</u>
1, 2, 3	lot 1 Link
4, 5, 6	lot 2 Link
7, 8, 9	lot 4 Link
10, 11, 12	PC4 Genephys
13, 14, 15	lot 3 Link
16, 17	mélange

### Données de croissance en poids pour les animaux placés dans les casiers, tous lots confondus (Link + PC 4 Genephys)

N = 652

<u>jour post-fécondation</u>	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<u>poids moyen en g</u>	0,7	1,39	2,22	3,5	4,4	5,4	6,1	6,6	7,2	7,5
<u>écart-type</u>	0,3	0,52	0,84	1,4	1,7	2,2	2,4	2,6	2,7	2,9
<u>gain moyen en g</u>		0,79	0,95	1,4	1	1,2	0,8	0,7	0,6	0,4
<u>écart-type</u>		0,23	0,27	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1
<u>% de croissance</u>		108	65,2	62	29	24	12	9	7,5	5,5
<u>écart-type</u>		9,04	10,1	9	5,5	3,8	1	0,7	0,6	0,4

**Annexe 19 bis : Plan d'expérience déséquilibré de l'analyse de variance sur la cinétique de croissance**

Jour après fixation	Rang de la pseudo-cohorte			
	1	2	3	4
10				$n = 100$ $\mu = 1.13$
13			$n = 100$ $\mu = 2.03$ <i>Normal</i>	
16		$n = 100$ $\mu = 2.98$		
17				$n = 94$ $\mu = 2.64$
19	$n = 100$ $\mu = 4.82$ <i>Normal</i>			
20			$n = 100$ $\mu = 4.67$ <i>Normal</i>	
23		$n = 100$ $\mu = 6.51$		
24				$n = 89$ $\mu = 6.00$ <i>Normal</i>
26	$n = 100$ $\mu = 0.56$ <i>Normal</i>			
27			$n = 99$ $\mu = 9.40$ <i>Normal</i>	
30		$n = 97$ $\mu = 12.26$ <i>Normal</i>		$n = 83$ $\mu = 11.65$ <i>Normal</i>
33	$n = 100$ $\mu = 15.83$ <i>Normal</i>			
34			$n = 99$ $\mu = 15.8$	
37		$n = 95$ $\mu = 20.24$ <i>Normal</i>		
40	$n = 99$ $\mu = 20.52$ <i>Normal</i>			

avec

$n$  : effectif

$\mu$  : moyenne

"Normal" donne le résultat du test de normalité

**Annexe 20 : Données de croissance en poids pour les animaux placés en casiers PVC**

**Données de croissance pour le lot Seudre**

N=88

jour post-fécondation	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<b>poids moyen en g</b>	1,03	2,02	3,35	5,39	6,47	7,85	8,74	9,55	10,2	10,7
<b>écart-type</b>	0,44	0,82	1,29	1,88	2,16	2,41	2,73	3,05	3,35	3,45
<b>gain moyen en g</b>		0,99	1,33	2,04	1,08	1,38	0,89	0,81	0,69	0,43
<b>écart-type</b>		0,41	0,52	0,73	0,54	0,69	0,54	0,47	0,53	0,33
<b>% de croissance</b>		98,9	67,17	62,94	21,16	23,29	11,3	9,23	7,05	4,37
<b>écart-type</b>		23	16,23	16,47	11,57	15,84	5,88	4,06	4,85	3,41

**Données de croissance pour le lot Port des Barques**

N=112

jour post-fécondation	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<b>poids moyen en g</b>	1	1,91	2,87	4,51	5,7	7,38	8,24	9,06	9,75	10,3
<b>écart-type</b>	0,5	0,83	1,15	1,65	1,9	2,44	2,77	3,11	3,39	3,65
<b>gain moyen en g</b>		0,91	0,95	1,64	1,19	1,68	0,86	0,82	0,69	0,52
<b>écart-type</b>		0,38	0,39	0,65	0,49	0,68	0,53	0,46	0,49	0,49
<b>% de croissance</b>		98,7	52,84	59,28	27,91	29,8	11,6	9,91	7,53	5,19
<b>écart-type</b>		32,1	19,21	17,48	9,77	7,67	6,12	4,53	4,45	4,91

**Données de croissance pour le lot Bonne Anse**

N=191

jour post-fécondation	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<b>poids moyen en g</b>	0,97	1,98	3,09	4,46	5,75	6,95	7,9	8,69	9,37	9,92
<b>écart-type</b>	0,55	0,96	1,42	1,94	2,35	2,75	3,17	3,54	3,88	4,07
<b>gain moyen en g</b>		1	1,11	1,37	1,28	1,21	0,95	0,78	0,68	0,55
<b>écart-type</b>		0,45	0,53	0,82	0,89	0,5	0,61	0,53	0,84	0,96
<b>% de croissance</b>		118	59,69	49,08	32,87	21,9	13,7	9,79	7,95	6,74
<b>écart-type</b>		49,1	18,34	32,32	32,35	6,12	6,78	4,71	7,55	19,4

**Données de croissance pour le lot Arcachon**

N=103

jour post-fécondation	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<b>poids moyen en g</b>	0,53	1,09	1,78	2,9	3,66	4,6	5,21	5,64	6,05	6,36
<b>écart-type</b>	0,28	0,53	0,83	1,28	1,66	2,17	2,51	2,74	3,02	3,18
<b>gain moyen en g</b>		0,56	0,69	1,11	0,76	0,94	0,6	0,44	0,4	0,32
<b>écart-type</b>		0,28	0,34	0,54	0,48	0,59	0,49	0,31	0,36	0,26
<b>% de croissance</b>		111	66,68	73,15	26,56	25,24	12,9	8,29	6,69	5,13
<b>écart-type</b>		36	21,9	104,6	10,09	8,01	7,14	3,97	4,18	3,52

**Données de croissance pour la PC4 Genephys**

N=157

jour post-fécondation	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154
<b>poids moyen en g</b>	0,48	0,99	1,68	2,67	3,58	4,32	4,91	5,42	5,89	6,25
<b>écart-type</b>	0,28	0,53	0,82	1,21	1,58	2,05	2,47	2,83	3,15	3,35
<b>gain moyen en g</b>		0,51	0,69	0,99	0,91	0,74	0,59	0,51	0,47	0,36
<b>écart-type</b>		0,26	0,34	0,45	0,43	0,53	0,5	0,43	0,41	0,29
<b>% de croissance</b>		115	79,99	66,77	35,02	19,83	12,8	9,8	8,1	5,96
<b>écart-type</b>		38,9	102,8	71,9	8,83	7,51	6,09	4,4	4,79	3,8