

Projet ARCHE

*Amélioration de la Reproduction en vue de la
restauration Chez l'huître platE*



Rapport technique final

Avril 2020 – Mars 2023

Table des matières

Introduction.....	7
1. WP1 Déclenchement et maîtrise de la maturation des géniteurs	8
1.1. Sélection de souches de phytoplancton.....	8
1.2. Recherche et production de molécules du déclenchement gonadique	11
1.2.1. Protéine dimérique calcineurine A et B	12
1.2.2. Protéine FoxL2.....	12
1.2.3. Protéine Sox9.....	13
1.2.4. Protéine Nanos1	13
1.2.5. Protéine Nanos2	14
1.2.6. Protéine GnRH	14
1.2.7. Peptides PGPW	14
1.2.8. Peptides FMRF.....	15
1.2.9. Protéine bêta-caténine.....	15
1.3. Influence de la nutrition et du régime thermique sur le sexe de l’huître plate.....	16
1.4. Suivi moléculaire du développement de la gamétogénèse	16
1.4.1. Test des effets des inducteurs sur la synchronisation de la gamétogénèse	16
1.4.2. Suivi histologique de la gamétogénèse	18
1.4.3. Suivi transcriptomique de la gamétogénèse.....	22
2. WP2 Synchronisation de la libération des gamètes	31
2.1. Déclenchement de l’expulsion de gamètes chez l’huître plate	31
2.2. Tests de déclenchement de gamètes chez des géniteurs mature d’ <i>Ostrea edulis</i>	32
3. WP3 Production de familles d’huîtres plates	34
3.1. Conditionnement de géniteurs d’huître plate sous régime biparental	34
3.2. Élevage larvaire et production de naissain d’huître plate en milieu contrôlé	36
3.3. Testage en milieu ouvert des familles.....	38
4. WP4 Création de structures pour le transfert en mer	42
4.1. Développement et optimisation des matériaux cimentaires.....	42
4.1.1. Matériaux	43
4.1.2. Composition et préparation des mélanges	44
4.2. Caractérisation mécanique.....	44

4.3.	Tests en milieu contrôlé sur la base de la conception et la modélisation des récifs artificiels	45
4.4.	Elaboration et immersion de structures récifales adaptés au milieu contrôlé	47
4.5.	Conditions d’immersion, ensemencement et suivi en mer	49
5.	WP5 Communication et management	53
5.1.	Présentation du projet/grand public & médias.....	53
5.1.1.	Publications sur les réseaux sociaux.....	56
5.1.2.	Fiches trimestrielles.....	57
5.2.	Management et gestion du projet	57
	Conclusion et perspectives.....	58
	Bibliographie.....	59

Liste des figures

Figure 1 :	Souches de Rhodomonas salina et Conticribra weissflogii. A : Fioles erlenmeyer ; B : Ballons de 6 L.	9
Figure 2 :	Boîtes à moustache des concentrations cellulaires (cellules mL ⁻¹) de Rhodomonas salina (A) et Conticribra weissflogii (B) après sept jours de culture.	9
Figure 3 :	Croissance phytoplancton en cylindres de 300 L.	10
Figure 4 :	Croissance journalière de l’espèce Rhodomonas salina en cylindres de 300 L.....	11
Figure 5 :	Croissance journalière de l’espèce Conticribra weissflogii en cylindres de 300 L.....	11
Figure 6 :	Profils de migration sur gel d’acrylamide des protéines calcineurine A et B au cours de la phase de purification sur colonne His-Tag (All Blue : marqueur de taille ; EB : extrait brut ; FT : extrait centrifugé ; Bind : extrait après passage sur colonne ; Wash : extrait après lavage ; E1 à E5 : fractions éluées successivement).....	12
Figure 7 :	Profils de migration sur gel d’acrylamide de la protéine FoxL2 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : FoxL2 purifiée en condition réductrice).	13
Figure 8 :	Profils de migration sur gel d’acrylamide de la protéine Sox9 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Sox9 purifiée en condition réductrice).	13
Figure 9 :	Profils de migration sur gel d’acrylamide de la protéine Nanos1 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Nanos1 purifiée en condition réductrice).	13

Figure 10 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine Nanos2 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Nanos2 purifiée en condition réductrice).	14
Figure 11 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine GnRH après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : GnRH purifiée en condition réductrice).	14
Figure 12 : Profils de migration sur gel d'acrylamide des peptides PGPW après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : PGPW purifié en condition réductrice).	15
Figure 13 : Profils de migration sur gel d'acrylamide des peptides PGPW après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : FMRF purifié en condition réductrice).	15
Figure 14 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la bêta-caténine au cours de la phase de purification sur colonne His-Tag (All Blue : marqueur de taille ; EB : extrait brut ; FT : extrait centrifugé ; Bind : extrait après passage sur colonne ; Wash : ext rait après lavage ; E1 à E5 : fractions éluées successivement).	15
Figure 15 : Nouveau cycle de développement de la gamétogénèse chez <i>O. edulis</i> basé sur les observations histologiques réalisées dans le cadre de ce projet.	19
Figure 16 : Boîtes à moustache des stades observés selon le nombre de jours après les injections de solution tampon (témoin) ou des deux doses de calcineurine A/B. Les stades les plus précoces du cycle de gamétogénèse (1 et 2) sont regroupés et sont représenté par la couleur bleue, les stades 3B à 5 sont regroupés et sont représentés par la couleur jaune et les stades 6 à 8B sont regroupés et sont représentés par la couleur rouge.	20
Figure 17 : Distribution du sexe-ratio chez les individus injectés avec les différents inducteurs testés après de 45 jours de maturation.	21
Figure 18 : Représentation schématique de la structuration temporelle des transcriptomes chez les individus témoin et les individus injectés avec les deux doses de calcineurine (dose 1= 0,125 µg) et dose 2 (0,250 µg).	24
Figure 19 : Clustering des gènes significativement régulés au cours du temps et en fonction des deux doses de calcineurine utilisées (0,125 µg : dose 1, et 0,250 µg : dose 2).	25
Figure 20 : Clustering de l'expression des gènes selon deux critères chez les individus témoins de la deuxième expérience d'induction par la calcineurine (une dose de 0,2 µg) : la proximité des profils transcriptomiques entre individus et entre gènes (corrélation de Pearson).	26
Figure 21 : Clustering de l'expression des gènes selon deux critères chez les individus traités avec Sox9 (corrélation de Pearson).	26
Figure 22 : Clustering de l'expression des gènes selon deux critères chez les individus traités avec FoxL2 (corrélation de Pearson).	27

Figure 23 : Analyse de corrélation entre la beta-caténine g20608 et deux gènes co-régulés du cluster identifié dans les analyses par clustering (Wnt4-g10273 et Fem1-g32794). Les corrélations sont calculées sur la base des valeurs de delta-delta C(t).....	28
Figure 24 : Cinétique d’expression (FC : Fold Change) d’un isoforme de la ferritine en réponse au traitement Fer 6.	29
Figure 25 : Cinétique d’expression (FC : Fold Change) d’un isoforme de métallothionéine en réponse au traitement calcineurine.	29
Figure 26 : Cinétique d’expression (FC : Fold Change) d’un isoforme de métallothionéine en réponse au traitement calcineurine.	30
Figure 27 : Cadre expérimental test inducteur à l’émission des gamètes mâles chez <i>Ostrea edulis</i> . ..	31
Figure 28 : A : Famille de géniteurs d’huître plate sans balnéation. B : Famille de géniteurs d’huître plate exposée à la sérotonine après 4 heures de balnéation.	32
Figure 29 : Cadre expérimental test d’induction à l’émission des gamètes mâles chez <i>Ostrea edulis</i> . ..	33
Figure 30 : A : Famille de géniteurs d’huîtres plates exposées à la sérotonine le 3 janvier 2023. B : Famille de géniteurs d’huîtres plates exposée à la sérotonine le 27 janvier 2023.	33
Figure 31 : Nombre d’émissions larvaires et fécondité depuis le programme PERLE II et ARCHE.	37
Figure 32 : Sites de testage des familles issues du programme ARCHE après 6 mois de croissance en milieu ouvert.	40
Figure 33 : Bilan de la survie des familles après 6 mois de croissance en milieu ouvert. : EP = Eau profonde.....	41
Figure 34 : Croissance et survie de familles issues de la première cohorte de deuxième génération d’huîtres plates. A : croissance de juvéniles par site de testage. B : Survie de familles par site de testage. C : familles produites dans le cadre d’ARCHE et testées sur estran. D : Familles produites dans le cadre d’ARCHE et testées en eau profonde. E : juvéniles d’huître plate après 6 mois de test en milieu ouvert.	41
Figure 35 : Analyses granulométriques par tamisage des sables et granulats utilisés.	43
Figure 36 : Les premiers designs proposés lors du montage du projet.	45
Figure 37 : Modélisation et dimensionnement des récifs.....	46
Figure 38 : Design et dimensions des récifs.	46
Figure 39 : Cages utilisées et simulation de la fixation des récifs sur ces cages.	47
Figure 40 : Confection du mortier et du béton.	48
Figure 41 : Fixation et immersion des prototypes.	48
Figure 42 : Plans des coffrages des ailettes.....	49
Figure 43 : Colonisation des ailettes après immersion de 2 mois en Bretagne.	50
Figure 44 : La phase de confection – La phase de maturation.....	51

Figure 45 : La phase de séchage.....	51
Figure 46 : La phase de fixation par 10 ailettes sur palette et la phase d’emballage.	51
Figure 47 : Les 8 palettes d’ailettes (80 ailettes) avant l’expédition.....	51
Figure 48 : La phase d’expédition des ailettes.	51
Figure 49 : Récifs ARCHE immergés pendant le mois d’octobre 2022 en rade Brest (Logonna-Daoulas).	52
Figure 50 : Récifs ARCHE après 5 mois d’immersion en rade Brest (Logonna-Daoulas).....	52
Figure 51 : Logo retenu pour le projet ARCHE.	53
Figure 52 : Photos lors des visites du CRAB lors des fêtes de la Science en octobre 2021.	54
Figure 53 : Photos lors de la visite des étudiants de la MFR de Morlaix.....	54
Figure 54 : Photo du stand lors de la fête de la science 2023 aux ateliers des Capucins à Brest.	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des gènes utilisés dans l’étude de l’évolution du cycle de la gamétogénèse.	23
Tableau 2 : Familles génotypées dans ARCHE.....	34
Tableau 3 : Performances larvaires des cohortes depuis le programme PERLE II et ARCHE	38
Tableau 4 : Caractéristiques physiques du ciment.....	43
Tableau 5 : Composition minéralogique (composition de Bogue) du ciment utilisé.	43
Tableau 6 : Composition du mortier.	44
Tableau 7 : Composition du béton.....	44
Tableau 8 : Visites officielles au CRAB.....	54
Tableau 9 : évènements de présentation d’ARCHE.....	55
Tableau 10 : Détails des publications	56
Tableau 11 : Calendrier des COPIL	57

Introduction

En milieu contrôlé, le conditionnement des reproducteurs d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) est l'une des phases clés de la réussite de la production larvaire. Aussi, la connaissance préalable du déroulement du cycle sexuel est indispensable pour maîtriser cette étape. Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe ainsi que les facteurs externes pouvant les déclencher sont encore mal connus. La fécondation *in vitro* est difficile à maîtriser chez cette espèce, avec un taux de survie des larves extrêmement bas. Jusqu'alors une phase d'incubation est nécessaire et, d'un point de vue technique, elle représente une tâche difficile à maîtriser en milieu contrôlé.

Dans le cadre du programme ARCHE, la maîtrise de la reproduction est essentielle. Le synchronisme requis se situe à l'échelle des deux parents identifiés et non au niveau de la population. Ces dernières années, de réels progrès ont été réalisés dans la connaissance des mécanismes de contrôle de la gamétogenèse, de la ponte et de la fécondation mais principalement sur deux espèces : *Pecten maximus* (coquille Saint-Jacques) dans un premier temps et *Crassostrea gigas* (huître creuse japonaise) dernièrement. Le projet ARCHE fait le parallèle entre un programme de reproduction et de génétique et il souligne les lacunes restant à combler chez l'huître plate, *O. edulis*, notamment dans le domaine de la maîtrise de la gamétogenèse à une échelle individuelle.

Depuis son commencement, le 1^{er} avril 2020, le programme ARCHE vise à augmenter la réussite de la reproduction des géniteurs d'huître plate, *O. edulis*, en milieu contrôlé, en améliorant la maturation et la synchronisation des émissions larvaires, dans l'objectif d'accroître les générations futures et de permettre la sélection des individus résistants, considérées comme « rustiques ». ARCHE a permis le développement de structures récifales dont la composition innovante permet d'y implanter des larves des familles rustiques en vue de la restauration et du repeuplement des gisements naturels.

ARCHE s'inscrit dans la dynamique du développement de la recherche sur l'huître plate, initié par la profession conchylicole notamment avec les projets PERLE (2011-2014, subventionné par le FEP), PERLE II (2016-2020) et FOREVER (2018-2020) subventionnés par le FEAMP sur la mesure *Innovation*. Les objectifs d'ARCHE sont multiples et complémentaires : ils concernent l'optimisation du travail en routine en milieu contrôlé, l'augmentation du nombre de familles rustiques et le développement de matériaux innovants permettant le repeuplement des gisements naturels de cette espèce emblématique de nos côtes en vue d'un développement durable et d'une diversification des entreprises conchylicoles bretonnes.

1. WP1 Déclenchement et maîtrise de la maturation des géniteurs

L'objectif de ce Work Package (WP) est de tester la possibilité d'induire et de synchroniser la gamétogénèse chez *O. edulis* par l'utilisation d'inducteurs protéiques spécifiques. Cette synchronisation est en effet particulièrement importante dans un contexte de production de familles sur un mode bi-parental à l'échelle d'une éclosérie. En effet, un des problèmes majeurs dans la production de familles dans un mode bi-parental est l'obtention de couples qui seraient matures sexuellement en même temps pour optimiser les chances de croisements. Le mode de reproduction est particulier chez *O. edulis*, il se traduit par une alternance des cycles gamétiques au cours de la même saison de reproduction. Cette spécificité limite la possibilité d'obtenir simultanément des couples comportant un mâle et une femelle. Par ailleurs, une plus forte proportion de mâles est observée en milieu naturel. Suite à l'obtention du génome d'*O. edulis* et en comparant les données bibliographiques disponibles sur les modèles bivalves (huîtres et pectinidés essentiellement) et sur des modèles de vertébrés, un certain nombre de molécules candidates sont identifiées comme participantes au déclenchement du processus de gamétogénèse.

Ce WP a pour but de produire certaines de ces molécules et de les utiliser comme déclencheur potentiel de la gamétogénèse en conditions expérimentales afin de 1/ synchroniser la mise en place de la maturation gonadique et 2/ d'orienter le sexe des individus vers le stade mâle ou femelle pour permettre de constituer des couples dont les chances de présenter en même temps les deux sexes soient optimisées.

1.1. Sélection de souches de phytoplancton

Le conditionnement de géniteurs est une étape importante dans la reproduction contrôlée des mollusques et spécifiquement chez l'huître plate. Son succès se traduit généralement par la quantité et la qualité des ovocytes et des larves émises.

Bien que la température soit considérée comme un facteur clé pour la régulation de la reproduction, la nutrition a également un impact important. Dans la littérature, les travaux existants ne décrivent pas les mécanismes permettant de comprendre l'effet de certaines espèces de phytoplancton sur les différentes performances zootechniques des géniteurs, des larves ou des juvéniles. Les connaissances actuelles sur les techniques d'élevage en éclosérie se basent exclusivement sur l'huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*. Il est essentiel de se réapproprié un savoir-faire qui repose actuellement en grande partie sur les travaux de Walne (1966) à Conway (UK).

Pour cette partie, deux nouvelles espèces de phytoplancton sont produites au sein du Centre de Recherche Appliquée de Breizhmer (CRAB) à Lampaul-Plouarzel afin de diversifier l'offre « traditionnelle » distribuée aux géniteurs d'huîtres plates pour leur alimentation. Les souches choisies sont *Rhodomonas salina* (volume = 200 μm^3 ; poids sec 60 pg cel^{-1} ; souche CCAP978/24) et *Conticribrilla weissflogii* (volume = 950 μm^3 ; poids sec = pg cel^{-1} ; souche CCAP 927/14).

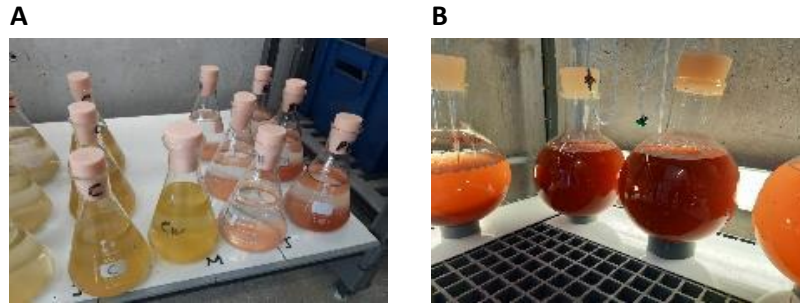


Figure 1 : Souches de *Rhodomonas salina* et *Conticribra weissflogii*. A : Fioles erlenmeyer ; B : Ballons de 6 L.

Dans un premier temps, la salle de production phytoplanctonique est modifiée et adaptée pour recevoir ces deux nouvelles espèces. Les souches de phytoplancton sont maintenues dans des fioles erlenmeyers de 500 mL contenant 450 mL de milieu de culture (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Chaque fiole erlenmeyer est repiquée à la flamme une fois par semaine de manière à renouveler le milieu nutritif. Ce dernier est le Cell-Hi WP avec une concentration de 2 mL.L⁻¹ de milieu de culture pour *R. salina* et d'1 mL.L⁻¹ pour *C. weissflogii*. Cette dernière étant une diatomée, 1 mL.L⁻¹ d'une solution de métasilicate de sodium pentahydraté (H₁₀Na₂SiO₈ + 5 H₂O) est ajouté.

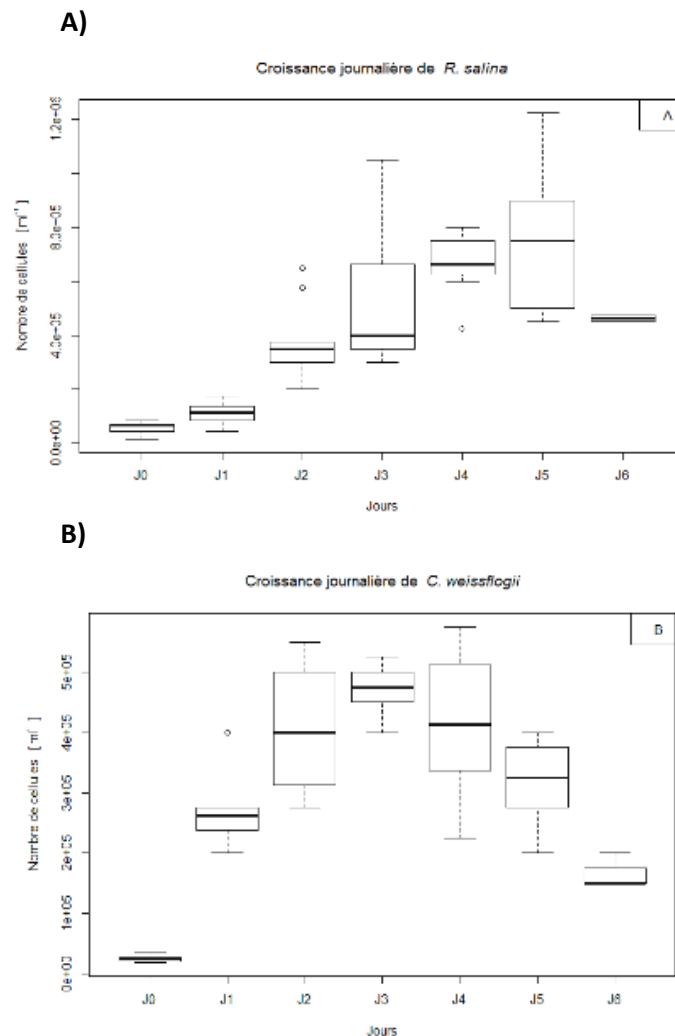


Figure 2 : Boîtes à moustache des concentrations cellulaires (cellules mL⁻¹) de *Rhodomonas salina* (A) et *Conticribra weissflogii* (B) après sept jours de culture.

Puis, après 5-6 jours supplémentaires de culture (Figure 2), une fois que les ballons de 2 L ont atteint une concentration cellulaire suffisante pour ensemercer un ballon de 6 ou 10 L, ces derniers sont utilisés pour ensemercer un cylindre de 300 L.

Les cylindres de culture ont un volume de 300 L (Figure 3.A. et 3.B.), l'eau de mer qu'ils contiennent est filtrée à 1 µm suivi d'une stérilisation aux UV. Les cylindres sont ensemercés avec un ballon de 6 L. L'ajout de milieu de culture se fait juste avant l'ensemencement avec une concentration de 1 mL.L⁻¹. Les cylindres possèdent eux aussi un système d'aération air enrichi en CO₂ à 0,5 %.

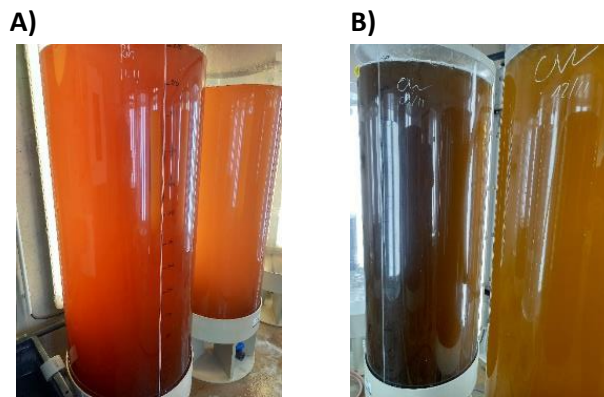


Figure 3 : Croissance phytoplancton en cylindres de 300 L.
A : *Rhodomonas salina* ; B : *Conticribra weissflogii*.

À partir de ce stade, les microalgues sont distribuées dans l'ensemble des salles du CRAB. En effet, lorsqu'un cylindre a atteint la concentration cellulaire souhaitée (généralement au bout d'une semaine), son contenu est envoyé, grâce à une pompe, dans des bacs tampons situés dans chaque salle de production.

Pour le cas de *R. salina*, les résultats obtenus montrent une concentration maximale atteinte à partir du 4^{ème} jour et qui dure jusqu'au 6^{ème} jour (Figure 3.A). Puis la concentration cellulaire diminue drastiquement. Afin d'améliorer et d'optimiser sa culture en éclosérie, il est décidé d'arrêter sa culture au 6^{ème} jour (Figure 4) puis de réaliser la distribution de cette espèce aux géniteurs.

Pour le cas de *C. weissflogii*, la concentration cellulaire maximale est atteinte au troisième jour de culture après ensemencement (Figure 3.B) avant de commencer la phase de décroissance. Pour cette espèce, il est convenu d'arrêter sa culture en salle de phytoplancton à partir du troisième jour (Figure 5) afin qu'elle soit mélangée avec *R. salina* et distribuée aux géniteurs d'huître plate en salle de conditionnement.

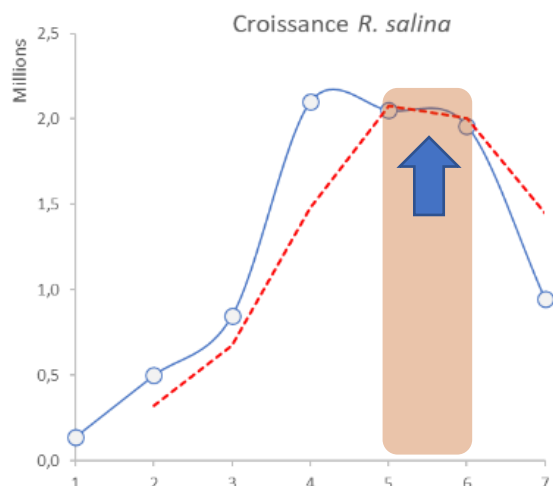


Figure 4 : Croissance journalière de l'espèce *Rhodomonas salina* en cylindres de 300 L.

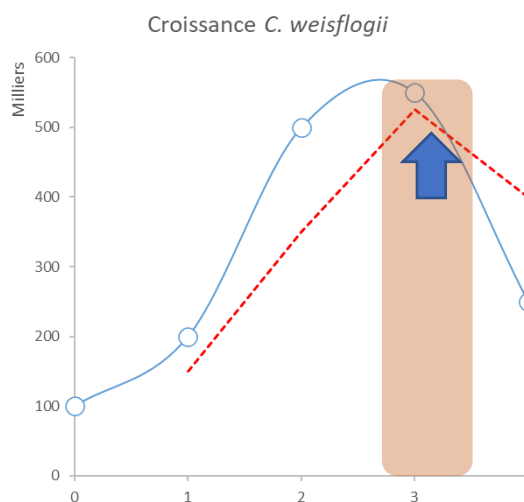


Figure 5 : Croissance journalière de l'espèce *Conticribra weissflogii* en cylindres de 300 L.

Pour mieux comprendre l'impact et le rôle de ces deux nouvelles espèces de microalgue dans le cycle de reproduction et dans le développement de l'huître plate, un mélange bispécifique (50 : 50 ; V : V) est adopté au sein de l'écloserie afin de continuer les différentes expériences de maturation de géniteurs d'huître plate.

1.2. Recherche et production de molécules du déclenchement gonadique

Une première liste contenant des protéines intervenant dans les premiers stades de l'induction de la gamétogénèse quel que soit le sexe considéré est retenue en se basant sur les données bibliographiques disponibles : le dimère calcineurine A/B, la protéine WNT4, les protéines Sox2, Sox4, et la protéine VASA. Dans un deuxième temps, la protéine Forkhead BoxL2 (FoxL2) est retenue, elle est un facteur de transcription jouant un rôle clé dans la différenciation et le maintien de l'ovaire et qui pourrait ainsi jouer un rôle plus spécifique dans l'induction des ovocytes femelles. Le facteur de transcription Sox9 a également été retenu, il code pour une protéine qui pourrait être plus spécifiquement impliquée dans le développement des spermatozoïdes. Compte-tenu des difficultés associées à cette approche de production de protéines recombinantes, il est nécessaire de travailler sur toutes ces protéines en même temps à des fins d'optimisation. Les ADN complémentaires de ces protéines sont amplifiés et clonés dans un vecteur d'expression pET20b pour permettre les premiers tests d'induction et de purification des protéines recombinantes dans différentes conditions d'induction et de temps de culture. Pour certaines de ces protéines, d'autres vecteurs sont utilisés ainsi que des approches de purification en condition dénaturante puis refolding (« repliement ») de la protéine.

Dans un deuxième temps, suite à l'analyse des profils d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la gamétogénèse, d'autres inducteurs potentiels sont retenus pour testage : la protéine beta-caténine, les protéines Nanos1 et Nanos2, les peptides de la famille des FMRH et de la famille des PGPW ainsi que la Gonado Releasing Hormone (GnRH). L'approche employée est la même pour ces protéines que celle utilisée dans le cadre de la production du premier lot de protéines.

1.2.1. Protéine dimérique calcineurine A et B

La calcineurine est une protéine intervenant dans les premiers stades de mise en place des gonades chez différentes espèces. Cette protéine est composée de deux sous-unités (calcineurine A et B) qui sont clonées et exprimées séparément dans un vecteur pET20b et bactérie BL21 (Figure 6).

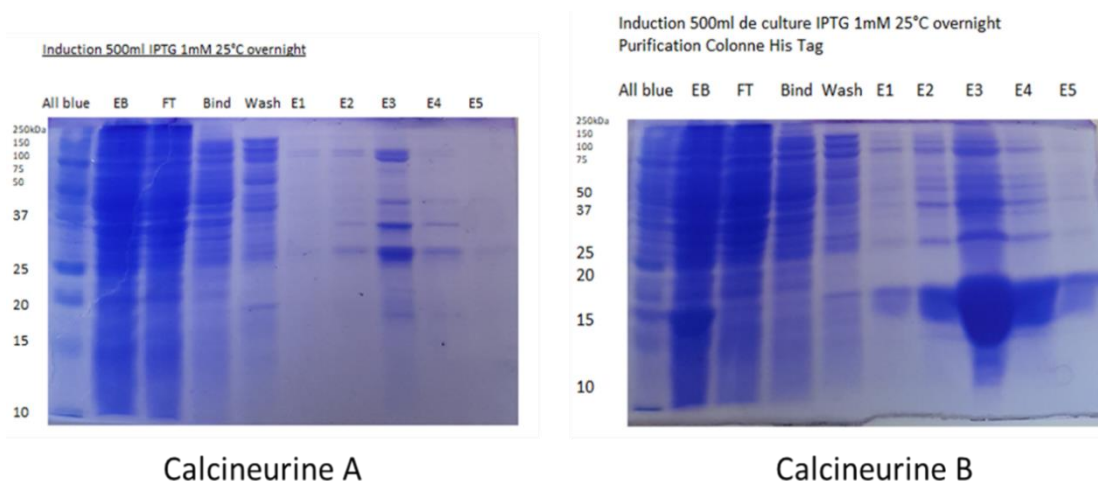


Figure 6 : Profils de migration sur gel d'acrylamide des protéines calcineurine A et B au cours de la phase de purification sur colonne His-Tag (All Blue : marqueur de taille ; EB : extrait brut ; FT : extrait centrifugé ; Bind : extrait après passage sur colonne ; Wash : extrait après lavage ; E1 à E5 : fractions éluées successivement).

Suite à la purification sur colonne His-Tag, une purification additionnelle est réalisée sur une colonne HPLC et une phase de concentration est ajoutée pour permettre de conserver les protéines dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation. Le dimère de protéine (unité fonctionnelle) a pu être obtenu simplement en incubant les deux sous-unités ensemble dans leur tampon pendant 1 heure à température ambiante. Cette dimérisation a pu être observée après passage en colonne HPLC.

1.2.2. Protéine FoxL2

FoxL2 appartient à une famille de facteurs de transcriptions très conservée au cours de l'évolution qui est décrite notamment chez le pétoncle *Chlamys farreri* et chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* chez qui une augmentation de l'expression au cours de la gamétogénèse est mise en évidence. De même, chez la souris *Mus musculus*, la différenciation en ovaire de la gonade est guidée par l'expression de FoxL2. La protéine FoxL2 est clonée dans le vecteur pET20b et a présenté une expression moyenne dans les cultures bactériennes mais s'est révélée non purifiable par la méthode His-Tag probablement du fait d'un problème de solubilité. Finalement, il est décidé de changer de vecteur d'expression. Le gène de la FoxL2 a donc été reclone dans un vecteur pET30a possédant un double système de purification His-Tag et FLAG-Tag. Malgré un rendement un peu meilleur que dans le système pET20b, la protéine s'est révélée difficile à purifier et une purification par dénaturation/renaturation en condition réductrice et par HPLC s'est avérée nécessaire pour récupérer la protéine (Figure 7). Les protéines FoxL2 purifiées sont ensuite stockées dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

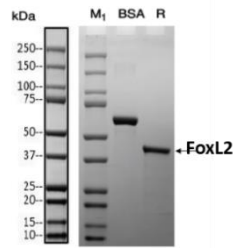


Figure 7 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine FoxL2 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : FoxL2 purifiée en condition réductrice).

1.2.3. Protéine Sox9

Sox9 est un acteur clé dans la différenciation des cellules indifférenciées en cellules mâles matures dans la gonade et ce facteur de transcription est également connu pour jouer de multiples rôles dans le développement, notamment dans la différenciation testiculaire et celle des cellules de Sertoli chez la souris. La protéine Sox9 est clonée dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée que pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 8). Les protéines Sox9 sont ensuite stockées dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

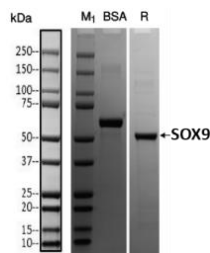


Figure 8 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine Sox9 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Sox9 purifiée en condition réductrice).

1.2.4. Protéine Nanos1

Les protéines Nanos jouent un rôle dans le développement des cellules germinales. Deux protéines sont identifiées chez *O. edulis*. La protéine Nanos1 est clonée dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée que pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 9). Les protéines Nanos1 sont ensuite stockées dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

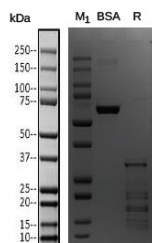


Figure 9 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine Nanos1 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Nanos1 purifiée en condition réductrice).

1.2.5. Protéine Nanos2

La protéine Nanos2 est clonée dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée que pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 10). Les protéines Nanos2 sont ensuite stockées dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

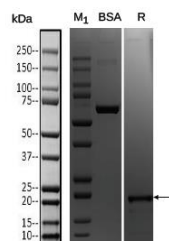


Figure 10 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine Nanos2 après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : Nanos2 purifiée en condition réductrice).

1.2.6. Protéine GnRH

La protéine Gonado-Releasing Hormone (GnRH) agit en stimulant la synthèse et la sécrétion des gonadotropines (Luteizing Hormone (LH) et Follicle-Stimulating Hormone (FSH)) chez les vertébrés mais son rôle n'a pas été encore clairement mis en évidence dans la reproduction des invertébrés. La GnRH est clonée dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée que pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 11). Les protéines GnRH sont ensuite stockées dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

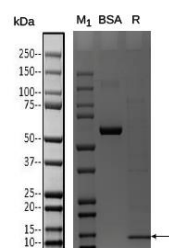


Figure 11 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la protéine GnRH après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : GnRH purifiée en condition réductrice).

1.2.7. Peptides PGPW

Cette famille de peptide pourrait jouer un rôle dans la mise en place des gonades mais son rôle reste relativement peu connu chez les mollusques. Le peptide PGPW est cloné dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée que pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 12). Les peptides PGPW sont ensuite stockés dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

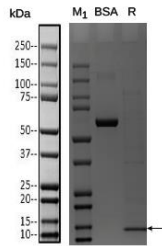


Figure 12 : Profils de migration sur gel d'acrylamide des peptides PGPW après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : PGPW purifié en condition réductrice).

1.2.8. Peptides FMRF

Cette famille de peptides est identifiée comme pouvant participer au développement des gonades chez différentes espèces. Le peptide FMRF est cloné dans un vecteur pET30a et la même méthodologie de purification utilisée pour la protéine FoxL2 est employée (Figure 13). Les peptides FMRF sont ensuite stockés dans un tampon salin contenant du glycérol à -80°C jusqu'à leur utilisation.

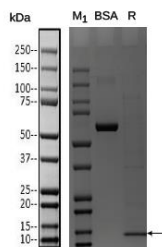


Figure 13 : Profils de migration sur gel d'acrylamide des peptides PGPW après purification sur colonne FLAG-Tag (M1 : marqueur de taille ; BSA : protéine standard, R : FMRF purifié en condition réductrice).

1.2.9. Protéine bêta-caténine

La bêta-caténine est identifiée en fin du projet suite à nos résultats d'analyses d'expression de gènes comme étant particulièrement régulé en lien avec le développement du cycle de gamétogénèse. La littérature montre également le rôle joué par cette protéine dans la voie WNT4 qui est activée lors des premières phases de la mise en place de la gamétogénèse. Deux isoformes de la bêta-caténine sont identifiés et celle qui présentait le profil de régulation le plus lié avec l'évolution de la gamétogénèse est retenue. La bêta-caténine est clonée dans le vecteur pET20b et stockée dans un tampon salin contenant du glycérol à -80°C jusqu'à son utilisation (Figure 14).



Figure 14 : Profils de migration sur gel d'acrylamide de la bêta-caténine au cours de la phase de purification sur colonne His-Tag (All Blue : marqueur de taille ; EB : extrait brut ; FT : extrait centrifugé ; Bind : extrait après passage sur colonne ; Wash : extrait après lavage ; E1 à E5 : fractions éluées successivement).

Suite à la purification sur colonne His-Tag, une purification additionnelle est réalisée sur une colonne HPLC et une phase de concentration est ajoutée pour permettre de conserver les protéines dans un tampon salin contenant du glycérol au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.3. Influence de la nutrition et du régime thermique sur le sexe de l'huître plate

Afin d'optimiser chaque période de conditionnement de géniteurs d'huître plate, le régime alimentaire bispécifique de *Rhodomonas salina* et *Conticribra weissflogii* est adopté. Concernant la température de conditionnement, il est décidé de conserver la température standard utilisée pour le conditionnement de géniteurs (19°C).

Ces régimes (nutritionnel et thermique) étant décrits dans la bibliographie comme optimaux, les recherches se sont focalisées sur l'impact de nouveaux inducteurs à la gamétogénèse.

1.4. Suivi moléculaire du développement de la gamétogénèse

1.4.1. Test des effets des inducteurs sur la synchronisation de la gamétogénèse

Les tests d'induction sont réalisés selon un protocole similaire pour les différents inducteurs. Des groupes d'*O. edulis* âgées de 24 à 30 mois et issues d'une même population pour chaque lot sont conditionnées au CRAB à Lampaul-Plouarzel pendant 2 mois à basse température (10°C) sous un régime alimentaire limité en phytoplancton afin de s'assurer que les individus ne présentent pas de démarrage préalable de leur gamétogénèse et qu'ils aient eu le temps de résorber en grande partie les gamètes résiduelles.

Les individus conditionnés sont ensuite séparés en autant de lots que nécessaires pour tester les différents inducteurs puis disposés dans des grands bacs à une température de 18°C et avec un régime alimentaire spécifique (*Rhodomonas salina* et *Chaetoceros neogracile*).

Le premier jour de l'expérimentation, tous les individus sont anesthésiés par immersion dans un bain de chlorure de magnésium qui permet de relâcher le muscle pour permettre une injection des protéines directement dans le système circulatoire à travers le muscle adducteur à l'aide d'une seringue. Ce protocole d'injection basé sur l'anesthésie préalable des individus est répété pour l'ensemble des injections car aucune mortalité n'est observée. Initialement, il était prévu de diluer les inducteurs dans la solution de balnéation dans les bacs contenant les individus. Cette option n'a pas été retenue car elle ne garantissait pas que les individus filtrent correctement les protéines et il persistait un doute sur la capacité des protéines à franchir les barrières cellulaires des tissus. C'est pourquoi, l'injection des inducteurs s'est faite directement dans le système circulatoire semi-ouvert des huîtres à travers le muscle adducteur. Cette option a permis d'augmenter considérablement la probabilité que l'inducteur soit réellement présent dans les tissus et diffuse vers les cellules ciblées. Il demeure possible que certains individus ne réagissent pas à cette injection mais la répétition des injections contribue à diminuer cette probabilité. Un lot est utilisé comme témoin et seul du tampon de dilution des protéines est injecté.

Le protocole d'injection est choisi en fonction de la nature des protéines et des résultats des analyses conduites sur les différentes expérimentations. Chaque inducteur potentiel a fait l'objet d'une expérimentation spécifique.

1.4.1.1. Test de la calcineurine A/B

Deux doses de calcineurine sont testées :

- La première dose (dose 1) est composée de 0,125 µg de chaque sous-unité protéique ;
- La deuxième dose (dose 2) est composée de 0,25 µg de chaque sous-unité protéine.

Une première injection de chaque dose est réalisée au premier jour de l'expérimentation suite à la période de stabulation puis les injections sont répétées 15 jours après.

Toutes les 2 semaines, 10 huîtres sont échantillonnées dans les deux conditions testées et dans le groupe contrôle pour dissection, coupes histologiques et extraction d'ARN.

1.4.1.2. Test de Sox9

Le protocole a consisté en 3 injections :

- Première injection de 0,2 µg de calcineurine A/B (déclencheur potentiel des premières phases de la gamétogénèse) ;
- Après 2 semaines : injection de calcineurine couplée à 0,2 µg de Sox9 ;
- Après 4 semaines : injection de 0,2 µg de Sox9.

Toutes les 2 semaines, 10 huîtres sont échantillonnées dans chaque groupe pour dissection, coupes histologiques et extraction d'ARN. Cette expérimentation s'est déroulée sur une période totale de 75 jours.

1.4.1.3. Test de FoxL2

Le protocole a consisté en 3 injections :

- Première injection de 0,2 µg de calcineurine A/B (déclencheur potentiel des premières phases de la gamétogénèse) ;
- Après 2 semaines : injection de calcineurine couplée à 0,2 µg de FoxL2 ;
- Après 4 semaines : injection de 0,2 µg de FoxL2.

Toutes les 2 semaines, 10 huîtres sont échantillonnées dans chaque groupe pour dissection, coupes histologiques et extraction d'ARN. Cette expérimentation s'est déroulée sur une période totale de 75 jours.

1.4.1.4. Premier test de la GnRH, Nanos1, Nanos2, PGPW et FMRH

Le protocole a consisté en 2 injections :

- Première injection de 0,2 µg de chaque protéine ;
- Après 2 semaines : injection de 0,2 µg des mêmes protéines.

Un échantillonnage de 10 individus a ensuite été réalisé après 45 jours et 60 jours pour dissection, coupes histologiques et extraction d'ARN.

1.4.1.5. Test de la beta-caténine, de Nanos2 et la GnRH

Le protocole a consisté en 2 injections :

- Première injection de 0,2 µg de chaque protéine ;

- Après deux semaines : injection de 0,2 µg des mêmes protéines.

Toutes les 2 semaines, 10 huîtres sont échantillonnées dans chaque groupe pour dissection, coupes histologiques et extraction d'ARN. L'expérimentation s'est déroulée sur une période totale de 60 jours.

1.4.2. Suivi histologique de la gamétogénèse

Les analyses histologiques sont menées sur l'ensemble des individus utilisés dans les différents tests d'inducteurs. L'approche histologique permet de définir le sexe et l'état d'avancement du développement de la gonade. Les coupes réalisées sur la gonade sont effectuées au même endroit chez tous les individus (du côté du muscle adducteur) afin de limiter les biais qui pourraient être associés à des prélèvements aléatoires. Un protocole standard de préparation des échantillons est suivi pour tous les échantillons. Les tissus de gonade des échantillons sont fixés au paraformaldéhyde 4 % dans de l'eau de mer diluée avant de subir un traitement de déshydratation dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante puis inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes de gonades sont réalisées à partir de ces blocs puis colorées à l'hématoxyline et à l'éosine avant d'être analysées avec un vidéomicroscope LEICA DMI6000 équipé d'une caméra couleur couplée au logiciel de prise de vue Leica. Des photographies à 3 grossissements sont prises pour chaque lame (3/individus) pour pouvoir finement déterminer le stade de maturation des gonades. L'analyse des résultats est réalisée en se basant sur les travaux de Cole (1942) qui avait attribué un code chiffré à chaque stade de maturité observé parmi les échantillons analysés, l'évolution de la gonade immature en gonade mâle puis femelle s'effectuant graduellement par au moins 6 stades successifs. Au cours de l'analyse des différents stades gonadiques, quelques variations sont identifiées par rapport au cycle de Cole. Il a donc été décidé de revisiter ce cycle afin de produire un cycle plus détaillé.

Le nouveau cycle qui est présenté dans la Figure 15 a notamment permis de mettre en évidence la possibilité que certains individus puissent ne pas développer de gamètes femelles après la première phase de maturation des gamètes mâles mais enchaînent un deuxième cycle de production de gamètes mâles après une courte phase de repos à dominance mâle. Ce nouveau cycle de gamétogénèse, plus détaillé que celui élaboré par Cole (1942), met en avant la grande complexité des différentes phases de la gamétogénèse depuis la mise en place des gonades mâles qui semblent systématiquement débiter le cycle de reproduction, la mise en place maturation différentielle des stades mâles et femelles et alternance de deux sexes.

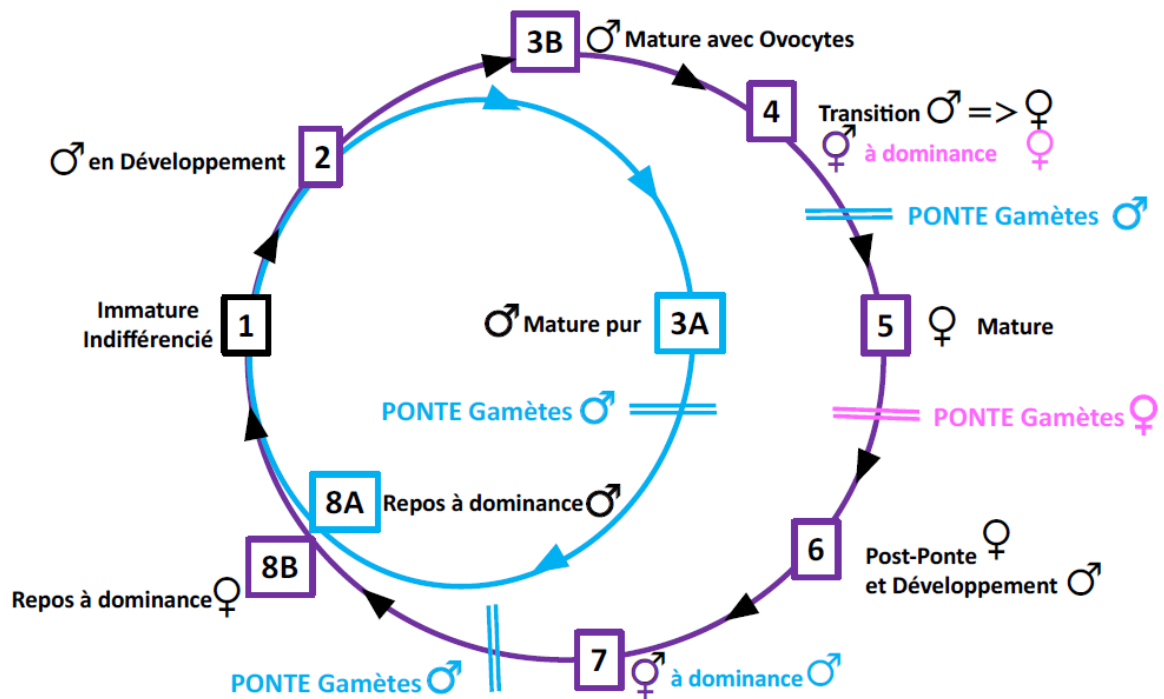


Figure 15 : Nouveau cycle de développement de la gamétogenèse chez *O. edulis* basé sur les observations histologiques réalisées dans le cadre de ce projet.

Les analyses histologiques conduites sur les inducteurs calcineurine, FoxL2 et Sox9 ainsi que sur le premier test des inducteurs Nanos1, Nanos2, GnRH, PGPW et FMRF sont réalisées en appliquant les nouveaux codes correspondant au cycle présenté dans la Figure 15.

Les résultats obtenus sur l'expérimentation sur l'effet de la calcineurine a permis de mettre en évidence l'effet synchronisateur de cette molécule. Toutefois, du fait du nombre trop limité d'individus analysés par classe de stades de gamétogenèse, les analyses statistiques ne permettent pas de mettre en évidence de différence statistiquement significative entre les témoins et le traitement à la calcineurine. En revanche, lorsqu'on regarde l'effet de la calcineurine en fonction du temps, on note des différences entre les traitements en termes de répartition de l'évolution des numéros de stades. A un temps de prélèvement donné, on observe une évolution plus rapide vers les stades plus avancés chez les individus traités à la calcineurine après 30 jours et surtout 45 jours après l'induction (Figure 16). Ces observations montrent que l'injection de calcineurine au début de la gamétogenèse engendre le démarrage de la gamétogenèse plus rapidement. Le traitement histologique de l'ensemble des individus sera poursuivi afin de permettre d'augmenter les effectifs par classe de développement pour une meilleure analyse statistique.

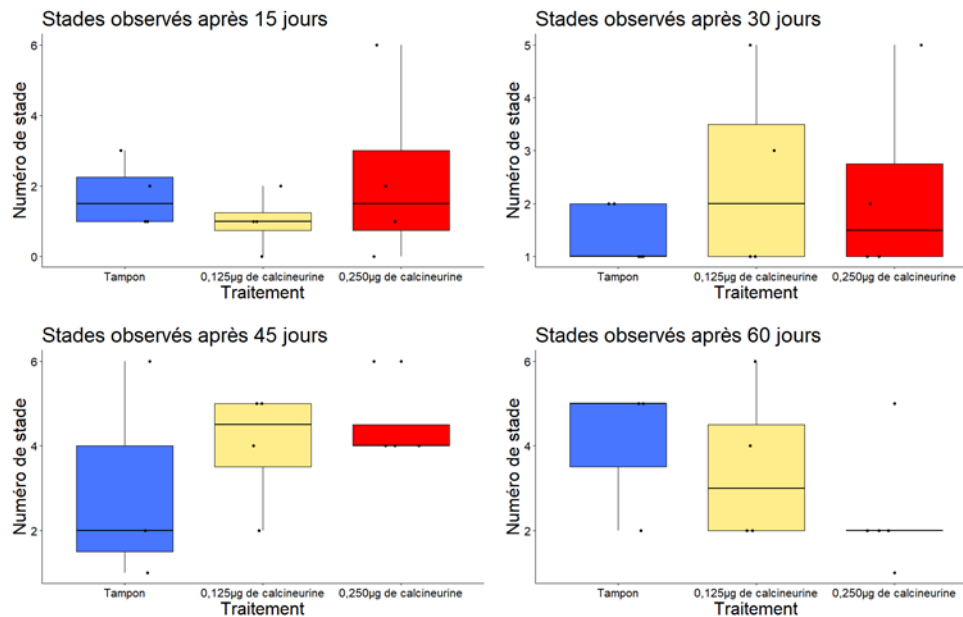


Figure 16 : Boîtes à moustache des stades observés selon le nombre de jours après les injections de solution tampon (témoin) ou des deux doses de calcineurine A/B. Les stades les plus précoces du cycle de gamétogénèse (1 et 2) sont regroupés et sont représentés par la couleur bleue, les stades 3B à 5 sont regroupés et sont représentés par la couleur jaune et les stades 6 à 8B sont regroupés et sont représentés par la couleur rouge.

Il apparaît très clairement que les injections de calcineurine favorisent le déclenchement plus précoce du cycle de gamétogénèse dès 30 jours suivant la première injection et que le cycle de gamétogénèse semble être complet entre 45 et 60 jours comparé au témoin. Ce résultat qui est confirmé sur un réplica de cette expérience montre clairement l'effet d'induction de la calcineurine sur la gamétogénèse. Il apparaît également que le nombre d'individus entrant en gamétogénèse est plus important chez les individus injectés avec la calcineurine que chez les individus témoins même si un certain nombre d'individus reste à l'état immature pendant toute la durée de l'expérience. La non-réactivité de ces individus peut être expliquée par un état physiologique trop faible des individus ne leur permettant pas d'accomplir le cycle de reproduction soit par une absence de réponse à la calcineurine (du moins chez les individus injectés avec cet inducteur). Ce résultat suggère qu'il pourrait être nécessaire de réaliser une série d'injections plus rapprochée (1 injection par semaine pendant 4 semaines). On notera également l'effet de la concentration de calcineurine injectée qui montre que la dose la plus importante accélère le processus de maturation.

Dans l'expérimentation réalisée avec l'inducteur Sox9, très peu d'individu ne présente de stade hermaphrodite ou de stade femelle fonctionnelle (présence parfois de quelques ovocytes résiduels) pendant les 70 jours de l'expérimentation ce qui suggère fortement une inhibition de la formation des gamètes femelles par l'inducteur Sox9. En revanche, la proportion importante d'individus présentant un stade jeune mâle et en stade ponte pendant toute la durée de la cinétique semble indiquer une forte induction de la gamétogénèse mâle suivie d'une émission rapide des spermatozoïdes et d'un enchaînement de cycle de formation des gamètes mâles sans passer par le stade hermaphrodite ou femelle. Après 90 jours, les premiers stades de transition mâle/femelle sont observés ce qui pourrait traduire l'effet de l'injection de Sox9.

Dans l'expérimentation conduite avec l'inducteur FoxL2, les résultats de suivi de la gamétogénèse permettent de mettre en évidence la présence d'un nombre plus faible d'individus restés immatures au cours de cette expérience par rapport au contrôle. Cela suggère que la combinaison calcineurine/FoxL2 stimule clairement le démarrage de la gamétogénèse.

Comme dans le cas de l'expérimentation avec la calcineurine, on observe un avancement de la mise en place des stades de maturation indiquant clairement l'effet synchronisateur de ce mélange d'inducteurs. En termes de répartition de stades, on observe une plus forte proportion des individus présentant des stades de transition mâle-femelle ainsi qu'une augmentation des individus jeune mâle et mâle en développement. L'inducteur FoxL2, qui est normalement impliqué dans la mise en place du sexe femelle, semble donc bien induire l'entrée en gamétogénèse de façon plus précoce et sur un plus grand nombre d'individus que les témoins mais ne présente qu'un effet limité sur l'orientation vers le sexe femelle exclusivement. Toutefois, la formation des gonades mâles semble s'avérer nécessaire voire indispensable dans le cycle de gamétogénèse et il semble donc qu'il ne soit pas possible d'obtenir des individus uniquement femelles sans passer au préalable par la phase de développement des gamètes mâles.

Dans les expérimentations pilotes conduites sur les inducteurs Nanos1, Nanos2, GnRH, PGPW et FMRF, il est décidé d'attendre 45 jours avant d'analyser les stades de gamétogénèse pour tester l'efficacité de ces inducteurs à plus petite échelle avant de commencer de nouvelles expérimentations compte-tenu du grand nombre d'inducteurs testés. Les résultats histologiques mettent en évidence un fort effet de ces inducteurs avec notamment la présence de gamètes chez tous les individus contrairement à ce qui est observé chez les témoins. Les indices de sexe-ratio (Figure 17) montrent les inducteurs GnRH et Nanos2 favorisent la production de gamètes femelles et augmentaient la proportion d'individus présentant les deux types de gamètes mâles et femelles ou ne présentant que des gamètes femelles. L'inducteur Nanos1 semble quant à lui favoriser le développement des gamètes mâles et les deux autres inducteurs FMRF et PGPW présente un effet intermédiaire. Cette expérimentation montre que l'ensemble des inducteurs testés ont bien un effet sur la stimulation de la gamétogénèse et semblent agir à la fois sur le côté synchronisation et sur le côté orientation du sexe avec un fort effet de développement des stades hermaphrodites fonctionnels et femelles.

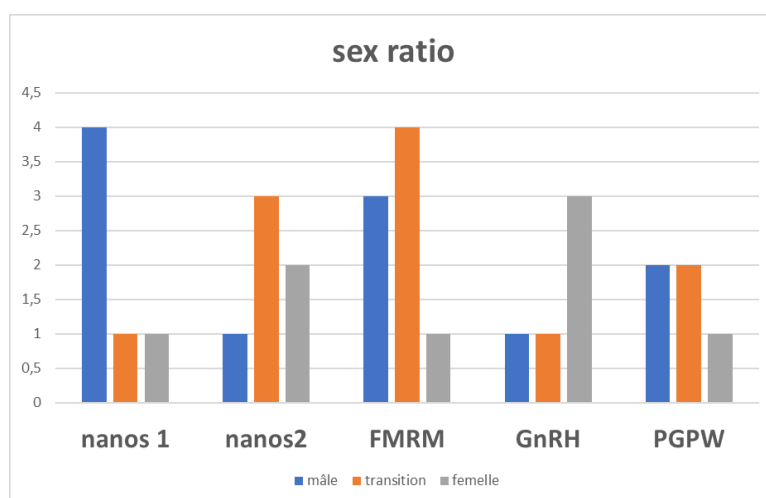


Figure 17 : Distribution du sexe-ratio chez les individus injectés avec les différents inducteurs testés après de 45 jours de maturation.

1.4.3. Suivi transcriptomique de la gamétogénèse

La méthodologie suivie pour étudier l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la gamétogénèse repose sur l'extraction des ARNs des gonades puis l'amplification des gènes candidats pour une analyse en PCR quantitative. Rapidement, un morceau de gonade est découpé dans la masse viscérale de chaque individu puis fixées à l'azote liquide ou conservé dans du tampon RNAlater. Le tissu est broyé à l'aide d'un broyeur à bille mécanique dans un tampon de lyse (Trizol) puis les ARNs sont extraits par ajout de chloroforme, séparation des phases et précipitation à l'éthanol absolu. Les ARNs sont ensuite reverse-transcrits. Les réactions de qPCR sont réalisées en plaque 384 puits avec un volume réactionnel final de 5 μ L constitué de 2,5 μ L de mix PCR, 0,1 μ L d'amorce forward, 0,1 μ L d'amorce reverse ainsi que 2.3 de produit RT dilué au 1/50^{ème}. Des répliques techniques sont effectués pour chaque individu et chaque gène. La plaque est ensuite placée dans un thermocycleur Light Cycler 480, (ROCHE) et les gènes sont amplifiés selon le programme suivant : pré-incubation de 5 minutes à 95°C, 50 cycles d'amplification (95°C : 15s; 60°C : 20s; 72°C : 30s) suivie d'une courbe de dénaturation permettant de s'assurer de la qualité du produit d'amplification (70 à 95°C à raison de 2,5 degrés par minute et 5 lectures par degré). Les valeurs de C(t) sont déterminées en utilisant la méthode de calcul de la double dérivée.

Le choix des gènes étudiés repose sur une analyse des données disponibles dans la littérature et l'identification de ces gènes dans le génome d'*O. edulis*. Lorsque plusieurs isoformes sont détectés dans le génome, le choix est fait de toutes les analyser afin de déterminer si leur régulation est similaire pour l'ensemble des gènes de la famille de protéine concernée ou si une régulation différentielle des isoformes peut être détectée, indiquant une spécialisation des différents isoformes dans la fonction de reproduction. Les résultats de différentiel d'expression sont analysés par la méthode des delta-delta C(t) puis les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel MeV (<http://mev.tm4.org/>).

Les gènes utilisés ainsi que leur rôle potentiel en lien avec la reproduction sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des gènes utilisés dans l'étude de l'évolution du cycle de la gamétogénèse.

Gène	Abréviation	Fonction
18s (gène de référence)	18s	Petite sous-unité 40s des ribosomes eucaryotes
Alpha Thalassemia/ Mental Retardation Syndrome-X-linked (ATR)	ATR	Remodelage chromatinien
B-caténine 1 isoforme : B-caténine-2608	Beta-caténine	Synthèse des hormones stéroïdes
Calcineurine A, calcineurine B	Calci A, Calci B	Maturation des gamètes
Cytochrome P450 2 isoformes : CYP17-2892, CYP17-3578	CYP17	Synthèse des hormones stéroïdiennes
Egg Releasing Hormone de type 2	ELH2	Peptide hormonaux → développement de l'ovaire
FEM1 6 isoformes : FEM1-13809, 9863,11271, 13971, 31980, 32794	Fem1	Contrôle de la détermination du sexe, processus de développement ovarien
Forkhead Box L2	Fox L2	Formation de follicules pré-ovariens, répression de Sox9
Homone de libération des gonadotrophines	GnRH	Contrôle de la libération des hormones stéroïdiennes
Motile Sperm Domain Containing 2	Motile Sperm	Formation du filament (dans le spermatozoïde) → motilité du sperme
Nanos1	Nanos1	Survie des cellules germinales et différenciation
Nanos2	Nanos2	Survie des cellules germinales et différenciation en cellule germinale mâle, inhibition de la différenciation en cellule germinale femelle
Pancreatic Lipase 2	PL2	Production d'acides gras lors de l'ovogenèse
PGPW1 (Polysaccharide)	PGPW1	Contrôle la migration et l'invasion
Sox9	Sox9	Facteur de transcription de la boîte SRY activation de la différenciation testiculaire, maintien des tubes séminifères
Sox 8L	Sox8L	Facteur de transcription de la boîte SRY, maintien des tubes séminifères, voie FoxL2
Steroid-5-Alpha-réductase 2 isoformes : SRD5A-1, SRD5A-35779	SRD5A	Récepteur à androgène
Testis Specific Serine Kinase	TSSK	Étapes tardives de la spermatogénèse
DNA binding protein with a DM domain (DMRT 1)	DMRT-1	Activation de la mise en place du sexe mâle (Transdifférenciation de cellules granuleuses en cellules de Sertoli), inhibe la voie FoxL2
Vasa	VASA	Mise en place des cellules germinales
Vitellogénine 4 isoformes (VTG-1, VTG-20470, VTG20471, VTG-2014	VTG	Précurseur du vitellus, implication dans le processus d'ovogenèse
WNT4 3 isoformes : WNT4, WNT4-3568, WNT4-10723	WNT4	Mise en place des ovaires

Dans la première expérience d'induction par la calcineurine, l'analyse des données d'expression de gènes montre une réponse assez marquée au niveau transcriptomique avec à la fois un effet dose et un effet temps. Les profils de régulations transcriptomiques montrent que chez les individus ayant reçu la calcineurine, les profils d'expression sont relativement homogènes entre les individus collectés à un même temps et distincts entre les différents temps de la cinétique. Chez les contrôles, ce patron de régulation n'est pas observé et l'ensemble des individus prélevés après 30, 45 et 60 jours présentent un profil relativement homogène. Ces résultats indiquent que l'injection de calcineurine a un effet très fort sur la régulation de nombreux autres gènes impliqués dans le processus de maturation gonadique

(Figure 18). Ces résultats sont cohérents avec ce qui est observé au niveau de l'évolution des stades de gamétogénèse.

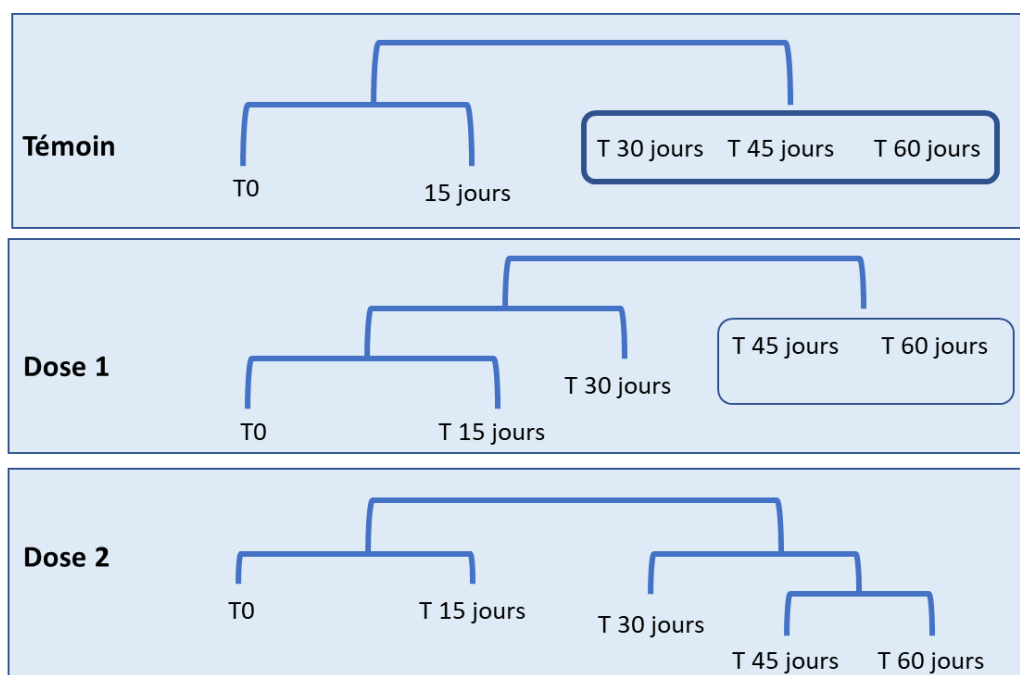


Figure 18 : Représentation schématique de la structuration temporelle des transcriptomes chez les individus témoin et les individus injectés avec les deux doses de calcineurine (dose 1= 0,125 µg) et dose 2 (0,250 µg).

Parmi les grandes modifications observées dans les profils de régulation de gènes figurent des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique comme la pancreatic lipase qui se trouve être sur-exprimée en réponse à l'induction par la calcineurine chez les individus à partir de 30 jours après l'induction. Ces protéines jouent un rôle majeur dans le transfert des lipides vers les ovocytes afin de garantir leur maturation et il semble que ce métabolisme soit accéléré suite au développement précoce du processus de maturation chez les individus induits notamment par la dose 2. Un résultat similaire est observé pour plusieurs membres de la famille des gènes Sox impliqués dans le processus de maturation des gamètes mâles notamment. On notera également que les profils transcriptomiques diffèrent légèrement avec l'effet dose avec notamment une activation plus importante des gènes impliqués dans la mise en place de la gamétogénèse dès le stade 15 jours en présence de la dose la plus forte de calcineurine (Figure 19).

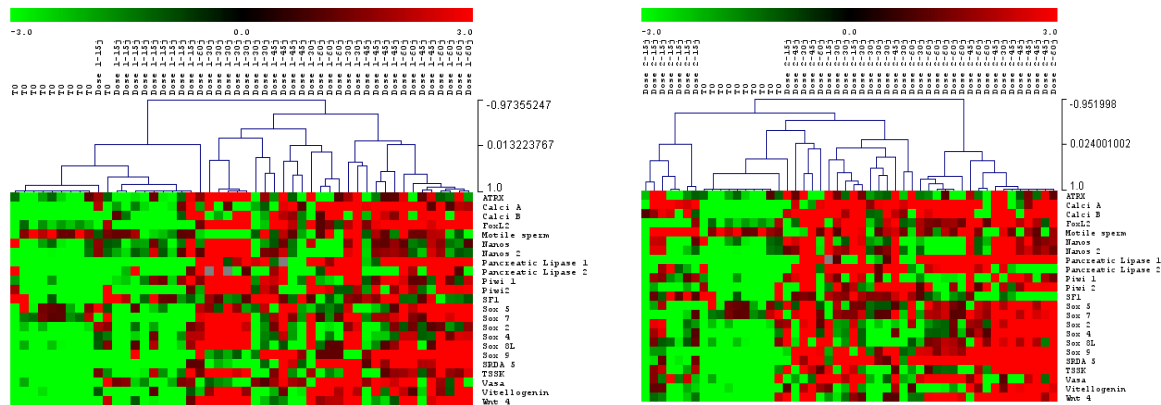


Figure 19 : Clustering des gènes significativement régulés au cours du temps et en fonction des deux doses de calcineurine utilisées (0,125 µg : dose 1, et 0,250 µg : dose 2).

Parmi les gènes ayant montré des régulations importantes, le gène *Nanos1* qui code pour un membre de la famille *Nanos*, connus pour leur rôle dans la survie et la pluripotence des cellules germinales présente une expression plus forte chez les individus injectés avec la dose 2, surtout après 15 jours comparé au témoin et à 45 jours par rapport aux individus injectés avec la dose 1. Les gènes *Nanos* jouent un rôle important dans le développement précoce et, plus particulièrement, dans le développement des cellules germinales primordiales. Ils pourraient donc constituer des nouveaux inducteurs candidats. D'autres gènes influençant la détermination sexuelle comme *SRD5 A* et *TSSK*, sont fortement associés au développement des gonades mâles. Ces deux gènes présentent une régulation différentielle à la fois dans le temps mais aussi avec l'effet calcineurine. Il existe encore peu d'études concernant le rôle et la régulation de ces deux gènes mais il semble que leur expression soit associée avec la maturité des gamètes.

Des résultats similaires sont obtenus chez les individus de la deuxième série d'induction réalisée avec la calcineurine avec une dose de 0,2 µg confirmant l'effet de cet inducteur sur la dynamique de la mise en place de la gamétogénèse mais également le rôle clé des gènes identifiés dans la première expérimentation dans la dynamique moléculaire associée à la mise en place du cycle de reproduction (Figure 20).

Le clustering (analyse par groupe) des individus obtenus par l'analyse de l'expression de ces gènes permet de mettre en évidence deux groupes principaux :

- Le premier rassemble les individus des groupes des stades T0 et T15 qui se caractérisent par de faibles changements dans la régulation des gènes au cours des premières phases de maturation des gonades et dans une moindre mesure les individus témoins après 30 jours ;
- Le deuxième groupe rassemble les autres individus.

Cette séparation semble se caractériser en partie par une forte différence d'expression du gène *Sox9*, gène participant à la mise en place du développement des gonades mâles.

L'injection de calcineurine, qui permet d'initier la gamétogénèse, et l'ajout de l'inducteur Sox9 après 15 jours puis 30 jours, montrent qu'il y a une influence significative sur le processus de maturation des gamètes mâles et un ralentissement du processus de développement des gamètes femelles conduisant à un très fort taux de production de gamètes mâles chez les individus. Cette combinaison calcineurine et Sox9 permet donc d'orienter le sexe des huîtres vers un développement accru des gonades mâles ce qui constituait l'un des objectifs de ce projet.

Dans le cas des expérimentations conduites sur l'effet de l'inducteur FoxL2, les profils de réponse transcriptomique des individus montrent que le regroupement ne se fait pas clairement en fonction du temps mais qu'une plus forte hétérogénéité est observée reflétant donc un effet de l'injection de FoxL2 sur la régulation du cycle de reproduction. Deux groupes se distinguent nettement cependant :

- Le premier groupe comprend les individus à T30 et la plupart des individus à T70 ;
- Le deuxième groupe comprend les autres individus avec un regroupement particulier des individus à T45 au sein de ce grand cluster (Figure 22).

Cette répartition montre que FoxL2 a modifié la dynamique de la reproduction par rapport à ce qui est observé chez les témoins. Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec les changements des pourcentages des différents stades observés en histologie sur ces mêmes individus. Parmi les gènes les plus régulés au début de la cinétique figurent des gènes impliqués dans la mise en place de la gamétogénèse (FMRH1, ELH2, PGPW1) et d'autres gènes plus spécifiquement impliqués dans le développement de la partie femelle (Nanos2, FoxL2, WNT4) illustrant une stimulation rapide de la gamétogénèse femelle après les injections de FoxL2. On notera toutefois qu'après 60 jours, ces mêmes gènes sont inhibés alors que les profils histologiques montrent la présence croissante des individus en transition et/ou femelle. Ces résultats illustrent l'effet inducteur joué par ces protéines qui semblent donc nécessaires à la mise en place du processus de maturation, mais dont le maintien de l'expression n'est pas nécessaire pour la poursuite du développement des gonades.

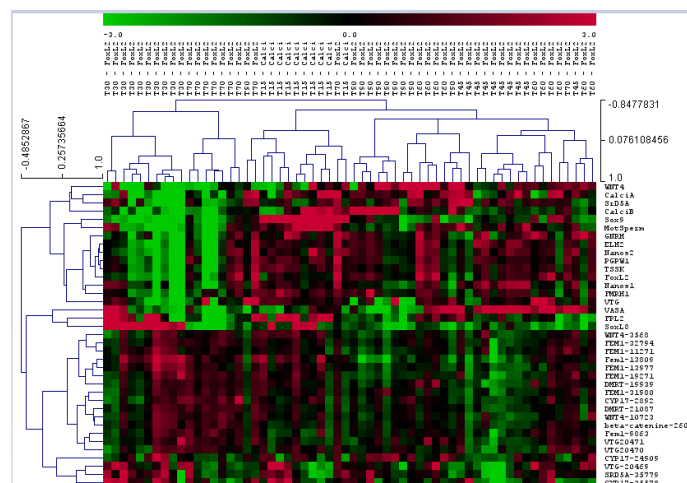


Figure 22 : Clustering de l'expression des gènes selon deux critères chez les individus traités avec FoxL2 (corrélations de Pearson).

L'ensemble des analyses effectuées mettent en évidence l'existence d'un cluster de gènes qui présente de façon systématique une forte co-régulation. Ce cluster de gènes regroupe l'un des deux isoformes de la beta-caténine identifié dans le génome (l'isoforme g2608), plusieurs des isoformes de la famille

Fem1, deux isoformes de la famille des CYP17, deux isoformes codant pour la WNT4 et que deux isoformes de DMRT. La régulation de ce cluster de gènes est indépendante de l'effet temps et conservée quel que soit l'inducteur testé et même au sein des témoins ce qui suggère que ces gènes soient très fortement liés dans une voie particulière de transcription et jouent donc un rôle clé dans la mise en place de la gamétogénèse.

Une analyse plus fine de cette co-régulation est réalisée pour chacun des gènes de ce cluster et de très fortes corrélations sont détectées pour la bêta-caténine g2608 et différents gènes du cluster (Figure 23). Ce résultat a conduit à produire la protéine correspondant à la bêta-caténine g2608 comme un nouvel inducteur potentiel. En effet, il est montré que la bêta-caténine pouvait participer notamment au développement de la voie femelle en activant la voie WNT4. Suite à ces résultats, le développement de la bêta-caténine comme nouvel inducteur précoce de la gamétogénèse est initié. La bêta-caténine, bien que présentant un rôle différent de la calcineurine pourrait également contribuer à l'effet de synchronisation de la gamétogénèse. Le choix est fait de travailler sur la bêta-caténine plutôt que sur les protéines WNT4 qui sont également régulées car il s'est avéré impossible de produire les protéines WNT4 qui sont membranaires avec les systèmes de production classique. Finalement, il est décidé de synthétiser la bêta-caténine qui est une protéine cytosolique.

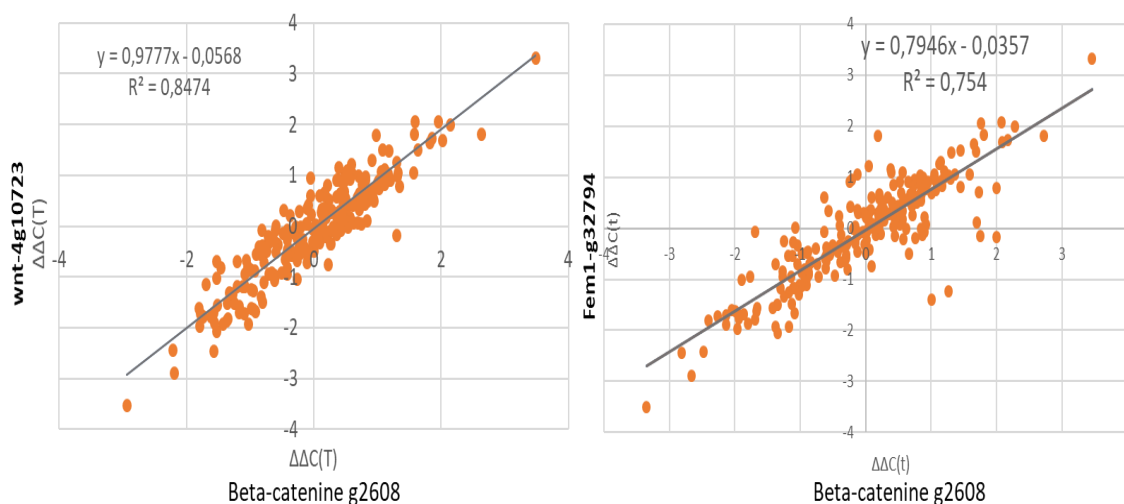


Figure 23 : Analyse de corrélation entre la beta-caténine g20608 et deux gènes co-régulés du cluster identifié dans les analyses par clustering (Wnt4-g10273 et Fem1-g32794). Les corrélations sont calculées sur la base des valeurs de delta-delta C(t).

En parallèle à l'étude de ces gènes, d'autres voies métaboliques qui ne sont pas liées directement au cycle de reproduction sont explorées. Cela a permis de détecter des nouvelles pistes de recherche qui pourraient être importantes dans le développement des gonades. Deux familles de gènes impliqués dans le transport des métaux sont explorées : les métallothionéines et les ferritines. Les métaux sont importants dans la phase de maturation des ovocytes notamment car ils sont accumulés dans ces cellules pour être utilisés ensuite lors des différentes phases de développement larvaire et ce notamment pour le cuivre, le zinc et le fer. Ainsi, l'analyse de l'expression de 5 isoformes codant pour des ferritines (protéines spécialisées dans le transport de fer) a permis de mettre en évidence une surexpression importante de cette isoforme en réponse à la dose de 0,25 µg de calcineurine (Figure 24).

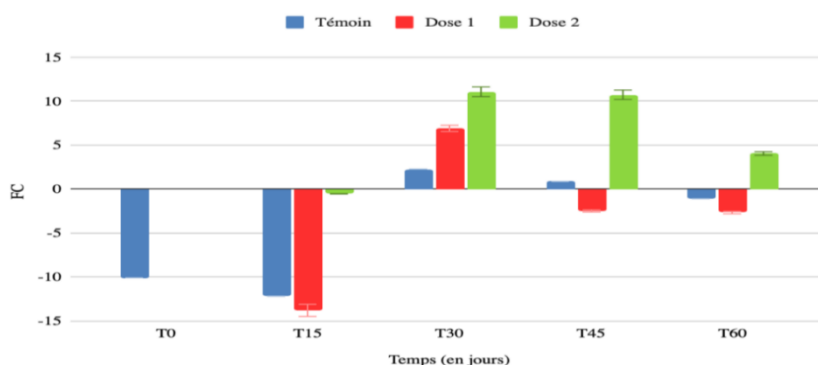


Figure 24 : Cinétique d'expression (FC : Fold Change) d'un isoforme de la ferritine en réponse au traitement Fer 6.

L'analyse de 4 isoformes de la famille des métallothionéines qui sont impliquées dans le transport du cuivre et du zinc (métaux essentiels) mais aussi dans la détoxification des métaux lourds. Une très forte surexpression de l'isoforme MTE est mise en évidence en réponse aux deux doses de calcineurine (Figure 25).

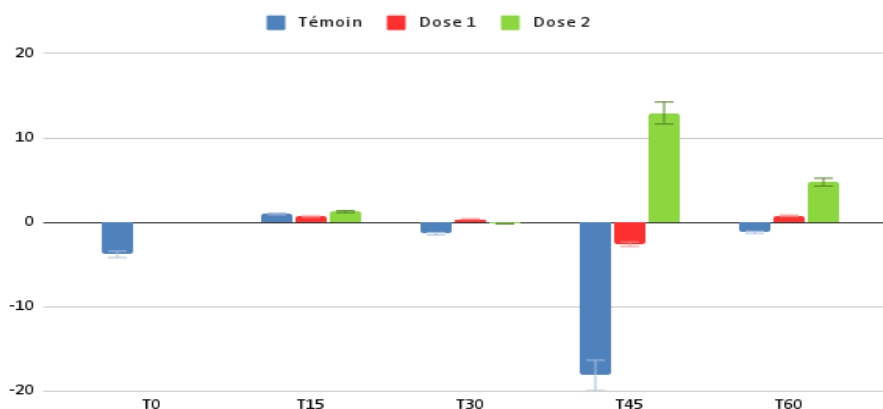


Figure 25 : Cinétique d'expression (FC : Fold Change) d'un isoforme de métallothionéine en réponse au traitement calcineurine.

Ces résultats font clairement apparaître le rôle important des métaux dans le processus de maturation des gamètes et les surexpressions observées en réponse aux inducteurs coïncident avec l'augmentation du nombre d'individus présentant des stades de développement.

Un autre système métabolique (la voie des Fatty Acid Synthase) est étudié plus particulièrement. Il concerne spécifiquement le métabolisme des acides gras. Les résultats d'expression montrent que dans l'ensemble des expérimentations conduites avec les inducteurs calcineurine et FoxL2, l'un des 3 isoformes de cette enzyme présentait une forte surexpression au cours de la formation des gonades et plus particulièrement chez les individus qui développaient des gonades femelles, mettant en avant l'importance des acides gras dans le processus de maturation des gamètes femelles.

Les dernières expériences d'induction avec la bêta-caténine, GnRH et Nanos2, qui sont réalisées en fin de projet, sont en cours de finalisation, aussi, les résultats ne pourront pas être présentés dans ce rapport. Les données obtenues seront exploitées dans le cadre d'une nouvelle phase de testage des inducteurs en utilisant une stratégie d'induction basée sur l'ensemble des résultats qui sont obtenus sur tous les inducteurs testés et des informations acquises quant à la compréhension de la mise en place et de l'évolution du cycle de reproduction chez *O. edulis*. Compte-tenu du fait qu'il apparaît que

l'induction par Sox9 permet d'obtenir des individus pratiquement tous mâles dans un délai relativement court et que l'utilisation de la sérotonine permet de déclencher l'émission des gamètes mâles de façon synchrone, le conditionnement des individus destinés à être mâles sera conduit différemment de l'induction pour obtenir des individus femelles. Il apparait également qu'il est presque impossible d'obtenir des individus exclusivement femelles sans passer par la phase de maturation des gamètes mâles. En revanche, l'emploi de l'inducteur FoxL2 favorise la formation des gamètes femelles mais ce processus prend plus de temps que la mise en place des gamètes mâles. Le protocole proposé est présenté dans la Figure 26. Ce protocole vise à combiner l'emploi de différents inducteurs en combinaison (ceux impliqués dans la mise en place initiale de la gamétogénèse (calcineurine et bêta-caténine) afin d'initier le processus puis l'utilisation des inducteurs plus spécifiques aux deux sexes.

Ce protocole sera amélioré avec l'ajout de métaux traces comme le cuivre, le zinc et le fer au cours de la formation des gamètes femelles. Une attention devra aussi être apportée à la qualité en acides gras des souches de phytoplancton utilisé pour le conditionnement des individus femelles.

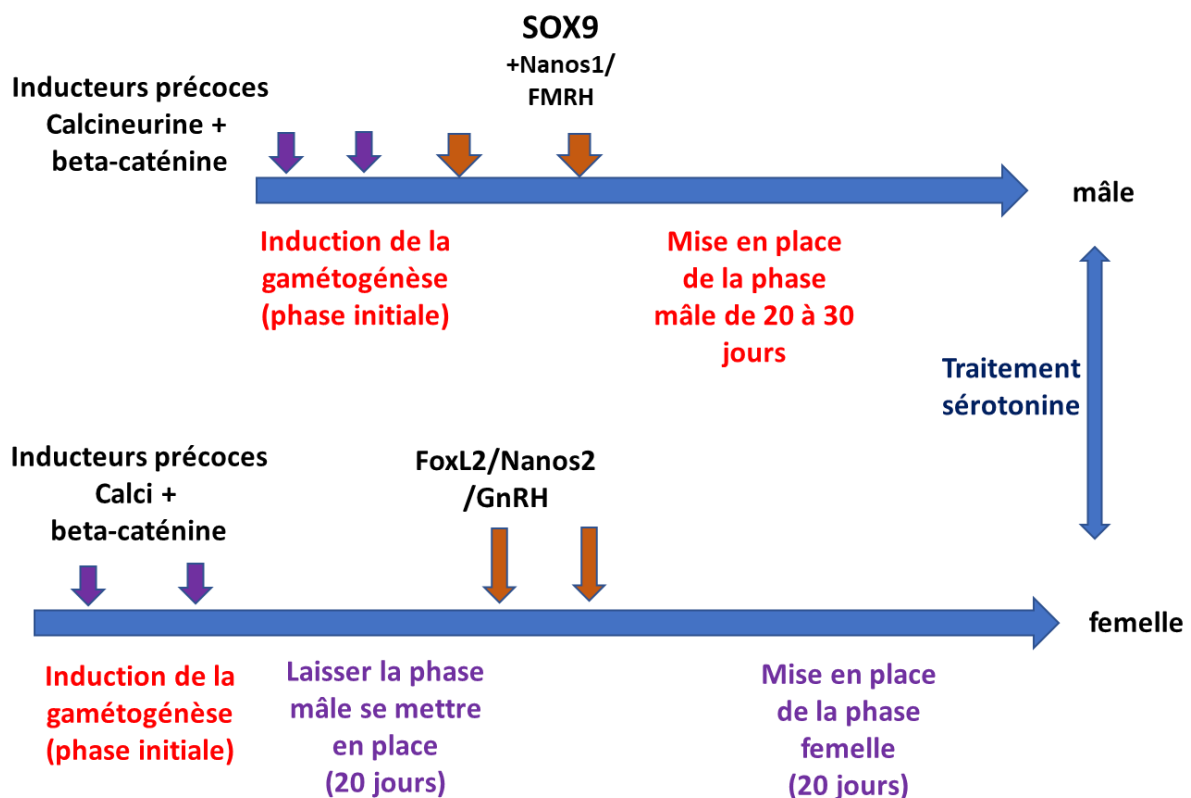


Figure 26 : Cinétique d'expression (FC : Fold Change) d'un isoforme de métallothionéine en réponse au traitement calcineurine.

2. WP2 Synchronisation de la libération des gamètes

2.1. Déclenchement de l'expulsion de gamètes chez l'huître plate

Chez l'huître plate, la fécondation est interne. En effet, les mâles libèrent leurs gamètes dans l'eau puis les gamètes mâles sont aspirés par la femelle et la fécondation s'opère dans la cavité palléale de cette dernière. La fécondation est suivie d'une dizaine de jours d'incubation avant l'expulsion des larves. Ainsi, lorsque les géniteurs sont mis en couple, il faut attendre au moins quinze jours pour avoir une ponte admissible, sinon la fécondation a potentiellement eu lieu pendant la période de conditionnement massal (quarantaine).

Une première série de tests est conduite dès le mois de juin 2022 sur trois groupes de géniteurs d'huître plate. Dans un premier temps, les géniteurs sont mis en place dans une salle de quarantaine avec contrôle de température (air et eau de mer). Dans chaque bac de conditionnement, la distribution de l'eau de mer était maintenue à un débit d'environ 100 litres par heure en circuit ouvert. La température de l'eau de mer était maintenue à 19°C durant toute la période de conditionnement et un apport journalier en phytoplancton était opéré pour chaque bac de conditionnement.

Le 3 avril 2022, 89 couples de géniteurs d'huîtres plates sont mis en conditionnement sous un régime biparental (Figure 27), et trois conditions sont testées : 50 ng.L⁻¹ ; 100 ng.L⁻¹ de sérotonine hydrochloride, 98 % (C₁₀H₁₂N₂O x HCl ; Alfa Aesar) et un groupe contrôle (pas d'exposition).

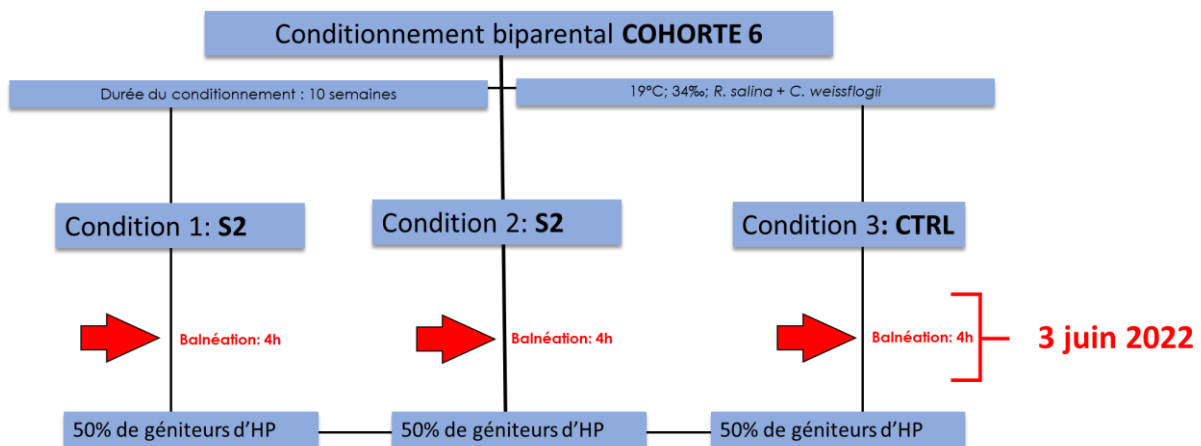


Figure 27 : Cadre expérimental test inducteur à l'émission des gamètes mâles chez *Ostrea edulis*.

Dès le 3 juin 2022, 50 % de familles sont exposées aux deux concentrations de l'inducteur ainsi que le groupe contrôle. Après quatre heures de balnéation, les premières émissions de gamètes mâles ont lieu (Figure 28).

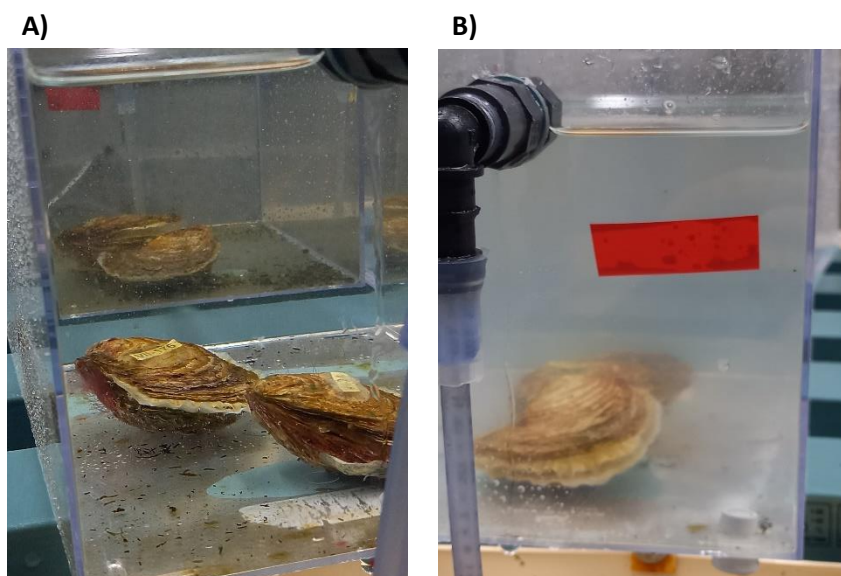


Figure 28 : A : Famille de géniteurs d'huître plate sans balnéation. B : Famille de géniteurs d'huître plate exposée à la sérotonine après 4 heures de balnéation.

Après quatre heures d'exposition à la sérotonine, 50 % d'individus présentent une expulsion de gamètes et seulement ceux qui sont exposés à une concentration de 100 ng.L^{-1} de sérotonine.

Pour les prochaines expériences, cette dernière concentration est conservée pour déclencher l'expulsion des gamètes.

2.2. Tests de déclenchement de gamètes chez des géniteurs mature d'*Ostrea edulis*

L'objectif de cette partie est de tester l'effet de la sérotonine sur des couples d'huître plate conditionnés. Pour ce faire, le conditionnement (cohorte 9) de géniteurs d'huître plate est réalisé suivant le protocole d'alimentation adopté précédemment en utilisant les différents inducteurs de la gamétogénèse testés dans le WP1.2.

Le conditionnement est conduit dès l'automne 2022. Dans un premier temps, les animaux sont mis en salle de quarantaine avec contrôle de température (air et eau de mer). Dans chaque bac, la distribution de l'eau de mer est maintenue à un débit d'environ 100 L.h^{-1} en circuit ouvert. La température de l'eau de mer est maintenue à 19°C durant toute la période de conditionnement et un apport journalier en phytoplancton est opéré pour chaque bac de conditionnement.

À partir du deuxième mois, 20 % de la microalgue *Tisochrysis affinis galbana*, complète le régime nutritionnel afin d'assurer un apport journalier minimum de 6 % de poids sec d'algue par géniteur et par jour.

Dans cette partie, les familles sont divisées en trois groupes (Figure 29) :

- **Groupe 1** composé de géniteurs orientés vers une maturation « mâle » (CalciA+CalciB+Sox9) ;

- **Groupe 2** composé de géniteurs orientés vers une maturation « femelle » (B-caténine+FoxL2) ;
- **Groupe 3** composé de géniteurs injectées avec de nouveaux inducteur (GnRH) ;
- Un groupe contrôle est mis en place afin de comparer l'efficacité des inducteurs.

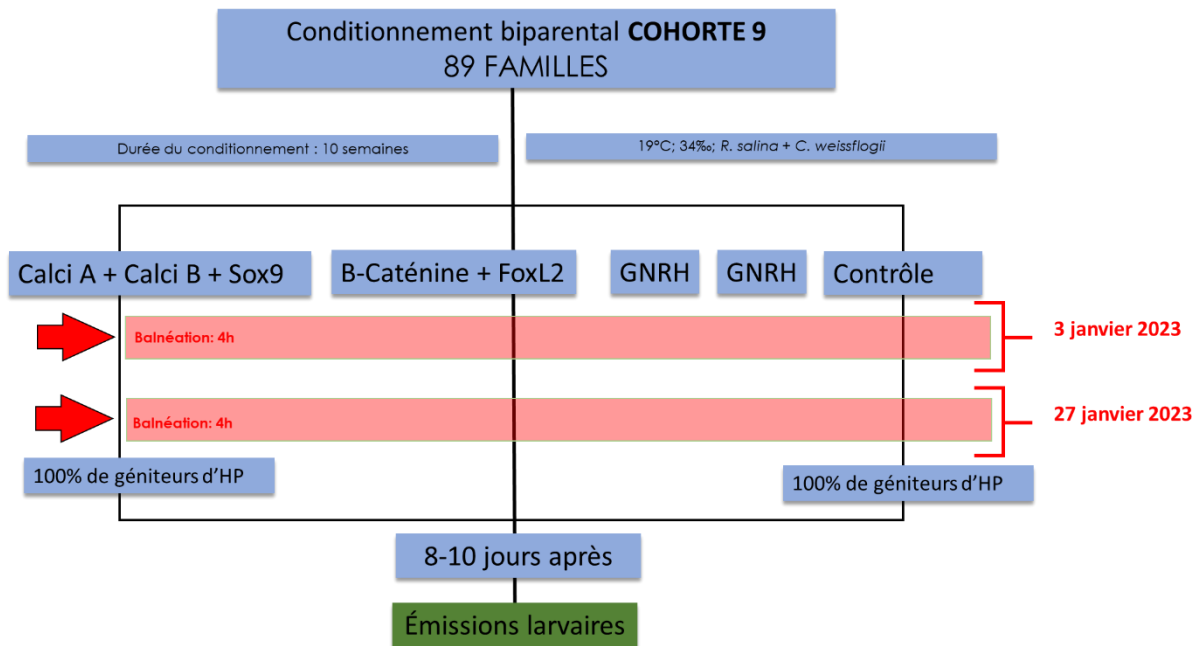


Figure 29 : Cadre expérimental test d'induction à l'émission des gamètes mâles chez *Ostrea edulis*.

Dès le 3 janvier 2023, 100 % des familles d'huîtres plates sont exposées à la sérotonine. Après quatre heures de baignation, 100 % des familles montrent l'émission de gamètes mâles (Figure 30). En revanche, 15 jours après, aucune émission larvaire n'est décelée. Si le résultat est sans équivoque, il montre que les inducteurs de la gamétogénèse vers une gonade « mâle » fonctionnent très bien et qu'un déphasage existe entre une maturation mâle et une maturation femelle.

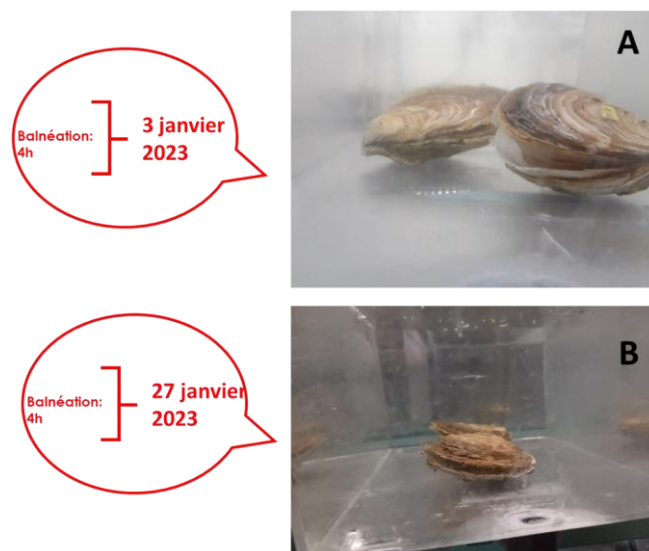


Figure 30 : A : Famille de géniteurs d'huîtres plates exposées à la sérotonine le 3 janvier 2023. B : Famille de géniteurs d'huîtres plates exposée à la sérotonine le 27 janvier 2023.

Suite à ce constat, une deuxième exposition à la sérotonine est réalisée afin d’obtenir des larves 10 jours après (27 janvier). Malheureusement, aucune émission de gamètes n’est décelée. On émet l’hypothèse que les géniteurs mâles avaient déjà commencé une nouvelle maturation femelle ou qu’ils sont entrés dans une période de réabsorption du matériel gonadique (phase de repos sexuel).

Malgré la fin du projet, de nouveaux conditionnements sont envisagés pour l’année 2023-2024 où un décalage de la maturation sera adopté entre les individus dirigés vers une gonade mâle et femelle.

3. WP3 Production de familles d’huîtres plates

L’objectif de ce WP est de travailler sur le génotypage des familles produites dans le cadre des projet PERLE 2 et ARCHE. Les génotypages sont réalisés par l’approche RADseq en utilisant trois combinaisons d’enzymes de restriction. Les familles génotypées sont présentées dans le Tableau 2, pour un total de **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** 1 600 individus.

Tableau 2 : Familles génotypées dans ARCHE.

Famille	Avant mise sur site	Rade de Brest – Estran	Rade de Brest – Eau profonde	Baie du Mont-Saint-Michel
CII-F22B	X			X
CII-F5B	X		X	
CII-F1B	X			X
CII-F24B	X			X
CII-F3	X		X	X
CII-F2	X			X
CII-F7	X		X	
CII-F36B	X			X
CII-F20B	X		X	X
CII-F4B	X			X
CII-F5	X		X	
CII-F4	X		X	
CII-F21B	X			
CII-F10B	X			
CIII-F9	X	X	X	X
CIII-F29B	X	X	X	X
CII-F31B	X	X		
CIII-F12	X	X	X	X
CIII-F4	X		X	
CIII-F30B	X			
CIII-F2B	X		X	X
CIII-F25B	X	X		
CIII-F3	X	X		X
CIII-F22B	X			X
CIII-F2	x	X	X	

Les données générées permettent de construire des cartes de liaison génétiques qui positionnent les gènes d’intérêt identifiés à la suite de l’analyse génotypique. Les génotypages seront poursuivis ultérieurement sur les croisements qui sont actuellement en cours de réalisation (deuxième génération) entre les familles les plus performantes obtenues dans les cohortes CII, CIII et CIV.

3.1. Conditionnement de géniteurs d’huître plate sous régime biparental

Une première série de conditionnement (cohorte 5) est conduite dès le printemps 2020. Dans un premier temps, les animaux sont mis en salle de quarantaine avec contrôle de température (air et eau de mer). Dans chaque bac, la distribution de l’eau de mer était maintenue à un débit d’environ 100 L.h⁻¹

¹ en circuit ouvert. La température de l'eau de mer était maintenue à 19°C durant toute la période de conditionnement et un apport journalier en phytoplancton était opéré pour chaque bac de conditionnement.

À partir du deuxième mois, 20 % de la microalgue *Tysochrisis affinis galbana*, complétait le régime nutritionnel afin d'assurer un apport journalier minimum de 6 % de poids sec d'algue par géniteur et par jour.

En février 2021, 80 couples de géniteurs d'huître plate sont mis en conditionnement sous un régime biparental. Dès le 29 mars 2021, les premières émissions ont lieu. Durant la période comprise entre le 16 février 2021 et le 30 juin 2021, 30 émissions de larves sont décelées dont une grande majorité est mise en élevage larvaire.

Pour la cohorte 6, à partir du 1^{er} octobre 2021, 45 nouvelles familles sont mises en conditionnement. Après 70 jours de maturation, 4 émissions larvaires sont décelées pour un total de 3 336 000 larves. Ces mêmes quatre familles sont mises en mer pour les tests de survie.

A partir du mois d'octobre 2021, et pour la première fois, les géniteurs d'huître plate issus de familles sélectionnées sont rapatriés au CRAB afin de commencer la première cohorte de deuxième génération. Le 1^{er} octobre 2021, 47 familles sont constituées. Pendant la période de conditionnement, 33 émissions larvaires sont décelées et actuellement 29 d'entre elles sont en phase de test sur deux sites en eau profonde en rade de Brest et baie du Mont-Saint-Michel ainsi que sur l'estran en rade de Brest et à Cancale.

En ce qui concerne la cohorte 7, 60 nouvelles familles sont mises en conditionnement à partir du 4 avril 2022. Cette cohorte avait comme objectif de tester les différents inducteurs du déclenchement et du suivi de la gamétogénèse. Ainsi, 4 lots sont créés :

- **Lot 1** : 25 % des géniteurs d'huîtres plates ayant subi l'injection des inducteurs calcineurine A + calcineurine B + FoxL2 ;
- **Lot 2** : 25 % de géniteurs ayant subi l'injection des inducteurs calcineurine A + calcineurine B + Sox9 ;
- **Lot 3** : 25 % de géniteurs ayant subi l'injection d'un mélange d'injecteurs (sept) calcineurine A + calcineurine B + Nanos1 + Nanos2 + GnRH + PGPW + FMRF ;
- **Lot 4** ou groupe contrôle : les 25 % restant de géniteurs n'ayant subi aucune injection.

Pour cette dernière cohorte, seulement 7 pontes sont décelées avec une moyenne de 4 800 000 larves émises depuis le début du conditionnement.

Afin d'optimiser les suivis de géniteurs et de familles, une 8^{ème} cohorte est lancée en même temps que la précédente. Pour cette nouvelle cohorte (deuxième génération), 60 nouvelles familles sont mises en conditionnement avec de géniteurs issus des cohortes CII, CIII et CIV. Après trois mois de conditionnement, 18 émissions larvaires sont décelées avec une moyenne de 14 000 000 larves émises. Parmi ces familles, 15 sont actuellement en phase de test en mer sur les sites d'eau profonde et sur estran).

A partir du mois de décembre 2022, 60 nouveaux couples sont mis en conditionnement. A l'image de la cohorte 7, l'objectif de cette cohorte était de tester des nouvelles combinaisons d'injecteurs de la gamétogénèse. Pour ce faire, 6 lots sont créés :

- **Lot 1** : composé de géniteurs ayant subi une injection d'un inducteur de déclenchement + un inducteur pour guider la gamétogénèse vers une gonade mâle (calcineurine A + calcineurine B + SOX9) ;
- **Lot 2** : composé de géniteurs dirigés vers une maturation femelle (calcineurine A + calcineurine B + FoxL2) ;
- **Lot 3** : composé de géniteurs ayant subi les injections des molécules β -caténine + FoxL2 ;
- **Lot 4** : composés de géniteurs ayant subi une seule injection de Nanos2 ;
- **Lot 5** : composés de géniteurs ayant subi une seule injection de GnRH ;
- **Lot 6** ou groupe contrôle : composé de géniteurs n'ayant subi aucune injection.

Pour cette cohorte, seulement 7 pontes sont repérées avec une moyenne de 3 163 000 larves émises durant toute la période de conditionnement.

Finalement, pendant le mois de janvier 2023, une dixième cohorte est lancée (deuxième génération) avec des géniteurs d'huîtres plates issus des familles des CII, CIII et CIV. Pour cette nouvelle cohorte, 42 nouvelles familles sont créées et mises en conditionnement. Après deux mois de conditionnement, 19 pontes sont repérées et un total de 11 600 000 larves sont émises. Actuellement, 13 familles sont en phase de nurserie avant d'être mise en testage en mer à la fin de l'été 2023.

3.2. Élevage larvaire et production de naissain d'huître plate en milieu contrôlé

Lorsqu'une ponte est décelée, elle est transvasée dans une éprouvette graduée de 500 mL pour effectuer un comptage du nombre de larves. Puis, les géniteurs sont remis dans un bac de stockage. Le comptage s'effectue sous un microscope à l'aide d'une cellule de comptage Sedgewick. Toutes les données (numéro de famille, date, nombre de larves mises en élevage, moyenne de la ponte, nombre total de larves) sont enregistrées dans une base de données numérique.

Chaque élevage larvaire est conduit dans des tubes de 5 L en flux ouvert avec un renouvellement de 1 : 1 (eau de mer : heure). Un tamis de 120 μ m est placé avant l'évacuation d'eau pour bloquer les larves dans le tube, ce tamis est nettoyé régulièrement afin d'éviter le colmatage. La température de l'eau de mer enrichie en phytoplancton est fixée à 22°C.

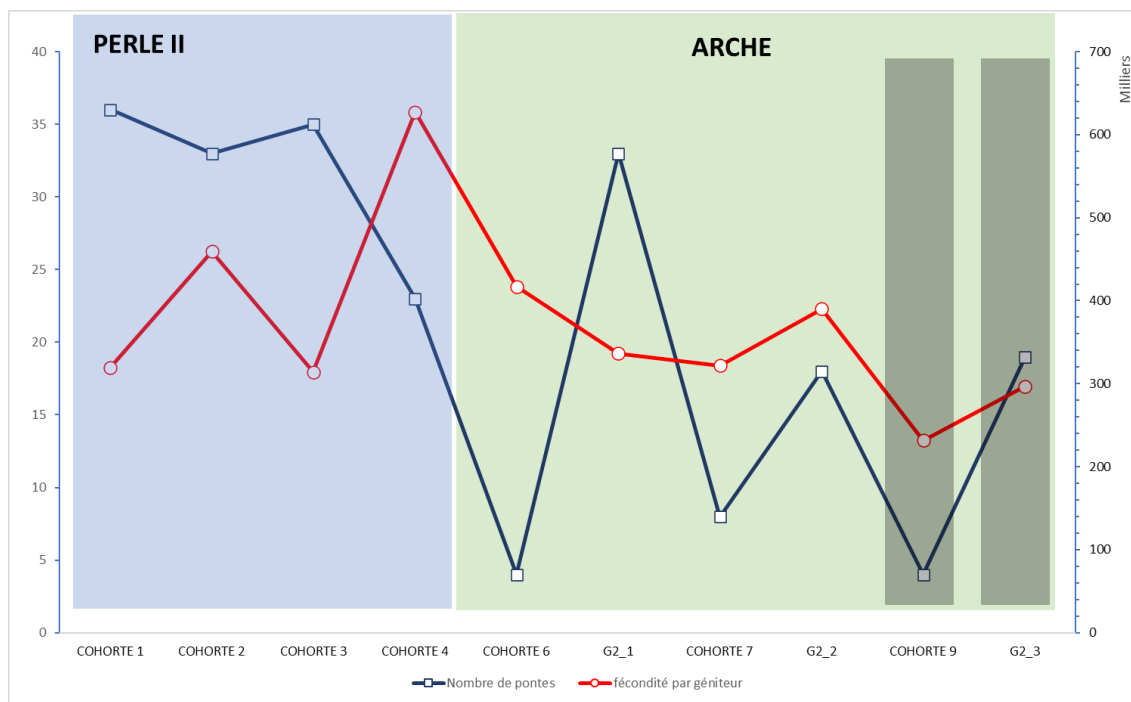


Figure 31 : Nombre d'émissions larvaires et fécondité depuis le programme PERLE II et ARCHE.

Les espèces de microalgue utilisées pour l'élevage larvaire sont un mélange 1 : 1 (vol : vol) de *Chaetoceros neogracile* et *Tisochrysis lutea*. Le CRAB est en capacité d'accueillir l'élevage de 68 tubes (familles) en simultanément. Chaque tube est numéroté, ce qui permet de tracer chaque émission en élevage larvaire.

Les premières émissions larvaires ont lieu dès le 29 mars 2021. Entre le mois de février et fin juin 2021, 30 pontes sont décelées et l'intégralité des émissions sont mises en élevage larvaire quel que soit le stade de développement des larves émises.

Après 15 jours d'élevage larvaire, la survie de larves pour la cohorte 5 est de 14,58 %. Les larves précoces (blanches et grises) sont les premiers groupes à subir une forte mortalité. À ce jour, on ne peut pas expliquer ces émissions prématurées.

Lors de l'étape de fixation, seulement 5 familles atteignent le stade de larves œillées et la mortalité atteint 100 %.

Pour la cohorte 6, et après 70 jours de conditionnement, seulement 4 émissions larvaires sont décelées pour un total de 3 336 000 larves émises (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage, 100 % de familles sont passés à la phase de fixation et, à nouveau, toutes les familles réussissent leur métamorphose.

A partir du mois d'octobre 2021, et pour la première fois, les géniteurs d'huître plate issus de familles sélectionnées sont rapatriés au CRAB afin de commencer la première cohorte de deuxième génération (G2_1). Pour ce faire, 47 familles sont constituées parmi les géniteurs issus des cohortes II et III. Pour cette nouvelle cohorte, 33 émissions larvaires sont décelées pour un total de 22 200 000 larves émises et avec un taux de réussite (nombre de pontes vs nombre de familles) de 57,8 % (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage larvaire, 29 d'entre elles sont passées à la phase de fixation et ce sont les mêmes qui

sont actuellement en phase de test sur deux sites en eau profonde en rade de Brest et Baie du Mont-Saint-Michel ainsi que sur l'estran en rade de Brest et à Cancale.

Durant le printemps 2022, 60 nouvelles familles sont mises en conditionnement (Cohorte 7) avec un taux de réussite de seulement 12 % (7 émissions larvaires). Le nombre total de larves émises était de 4 800 000 (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage larvaire, toutes les familles passent la phase de fixation et à ce jour ce sont les mêmes 7 familles qui sont en mer pour la phase de test.

Afin d'optimiser la production de familles du programme ARCHE, une nouvelle cohorte de deuxième génération est lancée en même temps que la cohorte 7. Pour cette dernière, 18 émissions larvaires sont décelées pour un total de 14 055 000 larves émises et un taux de réussite de 30 % (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage larvaire, seulement 16 familles atteignent la phase de fixation et 15 le stade de naissain. Actuellement, ces 15 familles sont en test sur 4 sites.

Concernant la cohorte 9 (décembre 2022) 7 nouvelles émissions larvaires sont décelées pour un total de 3 163 000 larves émises et un taux de réussite de 12 % (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage larvaire et 1 mois de micronurserie, 6 d'entre elles sont en phase de nursage au CRAB.

Finalement, durant la même période, la troisième cohorte de deuxième génération est lancée. Pour ce faire, 42 couples sont mis en conditionnement et 19 émissions larvaires sont décelées. Pour cette dernière cohorte, 11 660 000 larves sont émises pour un taux de réussite de 45 % (Tableau 3). Après 15 jours d'élevage, seulement 13 familles atteignent la phase de métamorphose et ces familles sont actuellement en phase de nursage avant le test en mer qui débutera en septembre 2023.

Tableau 3 : Performances larvaires des cohortes depuis le programme PERLE II et ARCHE

	PERLE II				ARCHE					
	C1	C2	C3	C4	C6	G2_1	C7	G2_2	C9	G2_3
Nombre de Couples	158	195	158	163	45	47	64	58	89	52
Survie (%)	68%	30%	65%	69%	75%	73%	35%	82%	74%	89%
Nombre de pontes	36	33	35	23	4	33	8	18	4	19
Efficacité d'émission larvaire (%)	23%	17%	21%	23%	8%	70%	13%	31%	4%	36%
Fécondité globale (millions)	21	30	20	22	3,3	22,2	5,2	14,1	1,86	11,3
Fécondité / géniteurs (milliers)	319	460	314	620	834	765	643	780	463	593

3.3. Testage en milieu ouvert des familles

Pour la cohorte 6, les géniteurs sont issus de Cancale et seulement 4 familles sont testées en mer. De ce fait, il est décidé de ne tester ces familles que sur estran en rade de Brest en raison de la proximité géographique avec le CRAB.

L'ensemble des familles de la première cohorte de deuxième génération est réparti sur 4 sites (Figure 32) :

- 2 en eaux profondes : en rade de Brest (Logonna-Daoulas) et baie du Mont-Saint-Michel (Hirel) ;
- 2 sur estran : en rade de Brest Ploumoustel-Daoulas et baie du Mont-Saint-Michel (Cancale).

On peut constater que pour les familles testées sur estran, la survie moyenne durant les 6 premiers mois de test est supérieure à 30 % en comparaison aux mêmes familles testées en eaux profondes (24 et 23 % respectivement, Figure 33).

Concernant la croissance, on constate que les familles testées sur estran (rade de Brest) ont une croissance supérieure aux familles testées sur les autres sites. Les juvéniles suivis en eau profonde (rade de Brest) montrent la plus faible croissance (Figure 33 ; **A**).

Pour l'ensemble de familles, un comptage, nettoyage et échantillonnage de l'ADN est effectué sur place pour chaque site de test et ce afin de corréliser l'information initial de chaque famille.

Des changements de poches avec une ouverture de maille plus importante sont opérés pour l'intégralité de familles afin de faciliter la circulation d'eau de mer entre les juvéniles lorsqu'ils sont déposés en eau profonde.

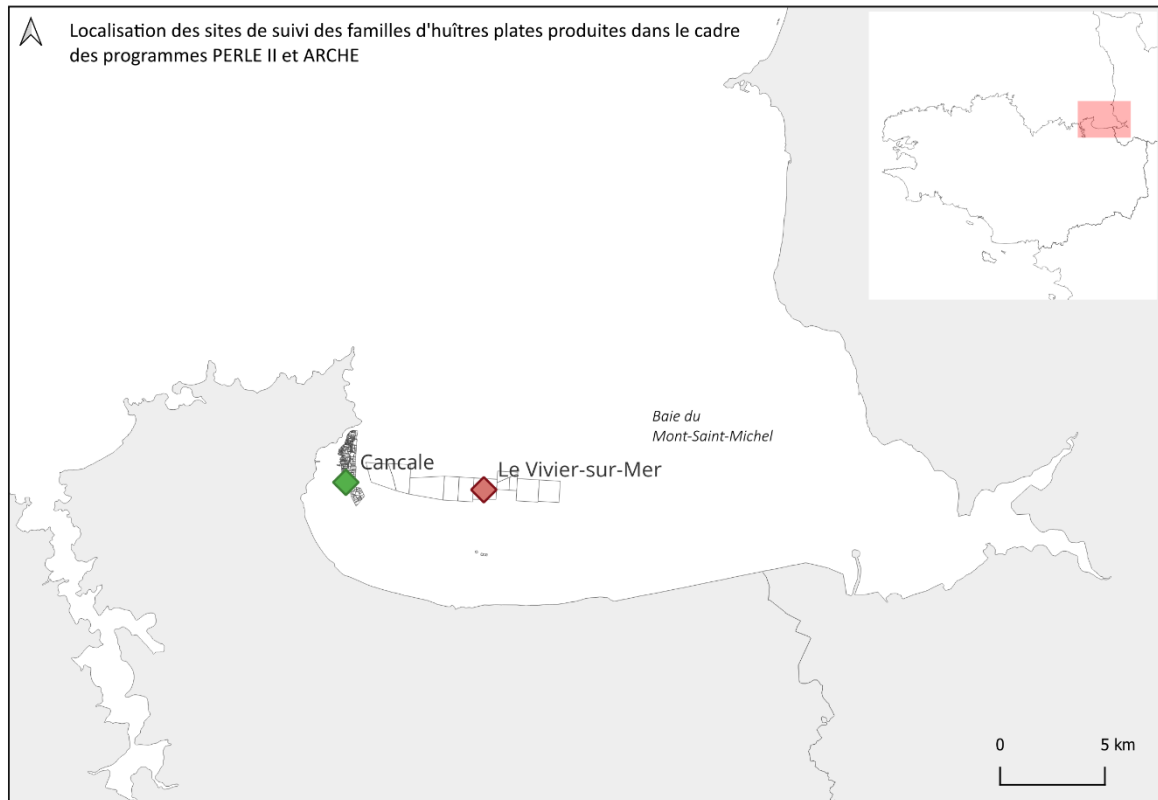


Figure 32 : Sites de testage des familles issues du programme ARCHE après 6 mois de croissance en milieu ouvert.

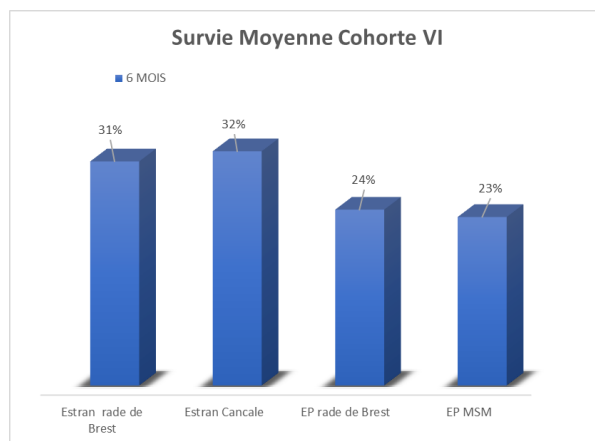


Figure 33 : Bilan de la survie des familles après 6 mois de croissance en milieu ouvert. : EP = Eau profonde.

Pour le prochain test, le reliquat de familles de la cohorte VI et les nouvelles familles de la cohorte VIII et IX sera mis à l'eau sur les quatre sites de testage en eau profonde et sur estran.

La cohorte VII est composée de géniteurs issus de la baie du Mont-Saint-Michel. Un total de 4 760 juvéniles d'huîtres plates est produit au CRAB. Pour cette cohorte, 7 nouvelles familles sont testées en milieu ouvert sur les quatre sites d'élevage.

La cohorte VIII (deuxième cohorte de deuxième génération : G2_2) est constituée de géniteurs issus des cohortes II, III et IV. Actuellement, 15 familles sont en test en mer et ce sur les quatre sites choisis (Rade de Brest : eau profonde et estran ; Baie du Mont-Saint-Michel : eau profonde et estran). Pour cette nouvelle cohorte, un total de 7 530 naissains de deuxième génération est produit.

Que ce soit pour la cohorte VII ou VIII, aucun chantier de comptage et survie n'est réalisé car ces familles sont mises en test durant le mois de février 2023.

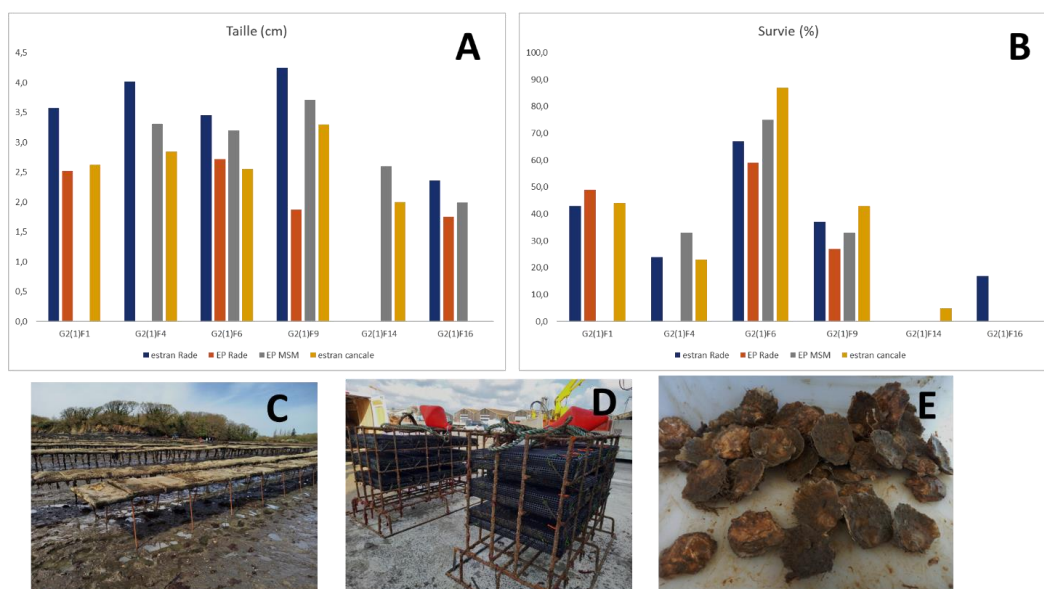


Figure 34 : Croissance et survie de familles issues de la première cohorte de deuxième génération d'huîtres plates. **A** : croissance de juvéniles par site de testage. **B** : Survie de familles par site de testage. **C** : familles produites dans le cadre d'ARCHE et testées sur estran. **D** : Familles produites dans le cadre d'ARCHE et testées en eau profonde. **E** : juvéniles d'huître plate après 6 mois de test en milieu ouvert.

4. WP4 Création de structures pour le transfert en mer

Dans cette partie sont regroupés les travaux de recherche menés dans le cadre des tâches du WP4. Les tâches portent sur la création de structures récifales pour le transfert en mer des familles rustiques d'huîtres plates.

Plusieurs groupes de travail permettent la mise au point d'un cahier des charges rassemblant les attentes et besoins des diverses parties prenantes.

L'Ecole Supérieure d'Ingénieurs des Travaux de la Construction de Caen (Builders Ecole d'Ingénieurs) a la charge du développement des supports d'accueil à base d'éco-matériaux cimentaires pour favoriser le captage *in-situ* des larves des huîtres plates rustiques produites en milieu contrôlé.

Dans un premier temps, le travail porte sur l'optimisation des formulations de béton à base de coproduits coquilliers. Il est décidé en groupe de travail de réutiliser les formulations du projet FOREVER¹². L'utilisation et le design du dispositif étant différents, il est nécessaire de réoptimiser les formulations pour répondre aux nouvelles caractéristiques dimensionnelles tout en favorisant toujours la bio-colonisation (constituants, rugosité, etc...).

Deux formulations, une de béton et une de mortier à base de coquilles d'huîtres broyées, sont réalisées pour les nouvelles infrastructures de colonisation.

Dans un deuxième temps, et ce à la suite de plusieurs échanges entre les partenaires, le design des infrastructures subit une succession de modifications afin de s'adapter à l'environnement d'immersion, aux besoins de manipulations en milieu contrôlé et en mer et à la protection des huîtres plates face à l'environnement et la prédation. Plusieurs designs sont conçus, modélisés, dimensionnés et réalisés par Builders EI. Le design final proposé et validé par les partenaires se présente sous la forme d'ailettes en éco-mortier de forme pyramidale tronquée qui sont fixées sur des cages afin de faciliter la manipulation.

Une étape de dimensionnement et de prototypage est réalisée puis après validation théorique de la résistance des infrastructures, elles sont confectionnées et immergées en rade de Brest pour effectuer une première étude de faisabilité en mer avant d'entamer la phase de production finale.

4.1. Développement et optimisation des matériaux cimentaires

Dans la partie ci-dessous, sont décrites les caractéristiques des différents matériaux et mélanges utilisés pour la réalisation des infrastructures récifales. Au final, deux formulations sont développées : un éco-mortier coquillé et un béton.

¹ Pouvreau, S., Cochet, H., Fabien, A., Arzul, I., Lapègue, S., Gachelin, S., Salaun, B., 2021. Inventaire, diagnostic écologique et restauration des principaux bancs d'huîtres plates en Bretagne : le projet FOREVER. Ifremer. Rapport Final. Contrat FEAMP 17/ 2215675.

² Potet, M., Fabien, A., Chaudemanche, S., Sebaibi, N., Guillet, T., Gachelin, S., Cochet, H., Boutouil, M., Pouvreau, S., "Which concrete substrate suits you? *Ostrea edulis* larval preferences and implications for shellfish restoration in Europe". Ecological Engineering 162 (2021) 106159.

4.1.1. Matériaux

4.1.1.1. Ciment

Les récifs artificiels sont fabriqués avec un ciment CEM-III 42.5 B/N conforme aux exigences spécifiées dans la norme NF EN 197-13³. Le ciment utilisé est commercialisé par la société Vicat. Il a une surface spécifique Blaine (finesse) de 522 m²/kg et un diamètre médian D50 d'environ 9,8 µm. Les caractéristiques physico-chimiques du ciment utilisé sont données dans les Tableau 4 et Tableau 5

Tableau 4 : Caractéristiques physiques du ciment.

	Masse volumique (g/cm ³)	Surface spécifique au Blaine (m ² /kg)	Temps de début de prise (min)	Retrait ou gonflement (mm)
CEM III B/N	3.01	522	160	1

Tableau 5 : Composition minéralogique (composition de Bogue) du ciment utilisé.

Composition (%)	C ₃ S	C ₂ S	C ₃ A	C ₄ AF
CEM III B/N	59.3	16.4	6.9	11.1

4.1.1.2. Sables

En se basant sur les résultats des travaux de recherche menés dans le cadre du projet FOREVER (Pouvreau *et al.*, 2021)¹², deux types de sables avec un diamètre maximum de 2 mm sont utilisés pour réaliser l'éco-mortier qui sert à fabriquer les supports de colonisation : un sable calcaire avec une masse volumique de 2,7 g/cm³ et un sable à base de coquilles d'huîtres broyées ayant une masse volumique de 2,66 g/cm³. L'analyse granulométrique par tamisage selon la norme NF EN 933-1⁴ des sables utilisés est présentée dans la Figure 35.

4.1.1.3. Gravier

Pour la formulation du béton qui sert pour la réalisation des poteaux centraux prévus pour porter les ailettes de captage, le gravier utilisé est de nature calcaire ayant deux classes granulaires : 2/6 et 6/10 mm. L'analyse granulométrique par tamisage des graviers est présentée dans la Figure 35.

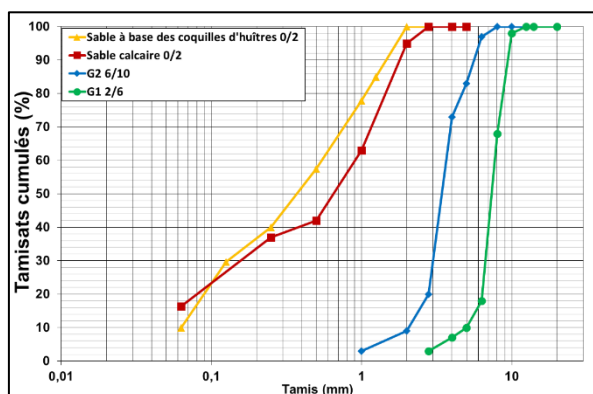


Figure 35 : Analyses granulométriques par tamisage des sables et granulats utilisés.

³ NF EN 197-1 (2001) Ciment - Partie 1 : composition, spécifications et critères de conformité des ciments courants.

⁴ NF EN 933-1 Essais pour déterminer les caractéristiques géométriques des granulats - Partie 1 : détermination de la granularité - Analyse granulométrique par tamisage.

4.1.2. Composition et préparation des mélanges

Comme indiqué précédemment, les supports d'accueil proposés et validés par les partenaires sont composés de 2 parties : un poteau central en béton et des ailettes de captage en mortier biosourcé (3 ailettes de captage et une ailette anti-bigorneaux). Généralement, la bio-colonisation des matériaux cimentaires dépend principalement de leurs constituants et de leur forme¹.

Le mortier est fabriqué suivant la norme NF EN 196-1⁵, avec un rapport E/C de 0,48 et un dosage en liant de 645,7 kg/m³. Il se compose de 2 types de sable : un sable naturel de nature calcaire avec un dosage massique de 60 % et un sable à base de coquilles d'huîtres broyées avec un dosage massique de 40 %. Les dosages des constituants sont présentés dans le Tableau 6.

Les poteaux centraux sont faits en béton ordinaire avec un dosage en ciment de 358,2 kg/m³ et un rapport Eau/Ciment de 0,53. La méthode de formulation utilisée pour concevoir les compositions de béton classique s'appuie sur la méthode des volumes absolus dite méthode de Dreux-Gorisse. Le protocole de malaxage et de mise en place de béton dans les moules est fait conformément à la norme NF EN 12390-2⁶. Les proportions massiques des différents constituants sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 6 : Composition du mortier.

Constituants	Ciment	Sable naturel calcaire	Sable de Coquilles huîtres broyées 0/2
(kg/m ³)	645.7	942.5	619.0

Tableau 7 : Composition du béton.

Constituants	Ciment	Sable 2/6	Gravier 2/6	Gravier 6/10
(kg/m ³)	358.2	646.9	236	945

4.2. Caractérisation mécanique

La résistance mécanique est une donnée importante pour un matériau cimentaire, elle permet de définir les capacités mécaniques d'une structure. Cette résistance est mesurée sur des éprouvettes prismatiques 4x4x16 cm selon la norme européenne NF EN 196-1⁵. En parallèle, la résistance à la compression des bétons est mesurée sur des éprouvettes cylindriques 11x22 cm suivant la norme européenne NF EN NF EN 12390-3⁷.

Pour limiter l'effet de l'incertitude sur la mesure des résistances, une répétabilité des essais est effectuée sur 6 éprouvettes dans le cas des mortiers et sur 3 éprouvettes pour les bétons.

Les résistances à la compression à 28 jours visées sont respectivement de 25 et 35 MPa pour le mortier (ailettes de fixation) et le béton (poteaux centraux).

⁵ NF EN 196-1 (2006) Détermination des résistances mécaniques.

⁶ NF EN 12390-2 (2012) Essais pour béton durci - Partie 2 : confection et conservation des éprouvettes pour essais de résistance.

⁷ NF EN 12390-3 (2012) Essais pour béton durci - Partie 3 : résistance à la compression des éprouvettes.

Les valeurs moyennes de la résistance en compression à 28 jours du mortier et du béton sont respectivement de 35 et 38 MPa. Les résistances développées sont supérieures à celles visées pour la résistance de l'infrastructure à développer.

4.3. Tests en milieu contrôlé sur la base de la conception et la modélisation des récifs artificiels

Au démarrage du projet, deux designs pour la création des récifs qui serviront de réceptacle pour les huîtres plates sont proposés (Figure 36) :

- Une coupole en béton pesant 4-5 kg maximum avec un diamètre de 30-40 cm et une hauteur de 15-20 cm ;
- Un cylindre en béton avec un diamètre de 30 cm et une hauteur de 10-15 cm.

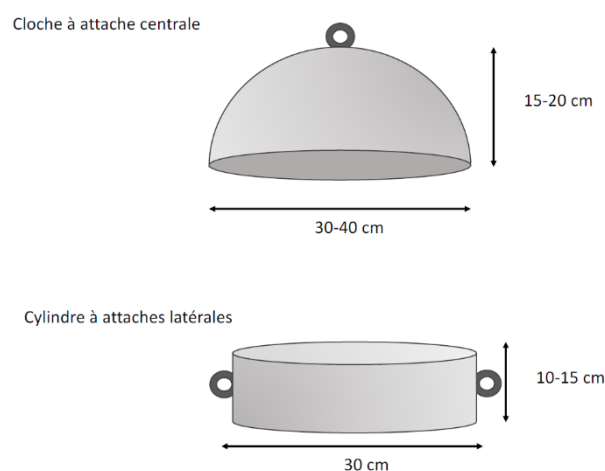


Figure 36 : Les premiers designs proposés lors du montage du projet.

Afin de répondre aux attentes et aux besoins spécifiques des partenaires, trois groupes de travail (GT) sont organisés pour mettre au point le cahier des charges des supports d'accueil. Le design proposé évolue au fur et à mesure des échanges.

Un des designs proposé et validé par les partenaires est constitué de 2 parties : un poteau central qui sert de support aux collecteurs avec 3 collecteurs sous forme d'ailettes modulables et à la base du poteau, une ailette spécifique contre la remontée des bigorneaux. Les angles d'inclinaisons des ailettes sont différents entre les collecteurs et la protection contre les bigorneaux. En effet, l'angle d'inclinaison pour les collecteurs vaut 45° pour la surface de fixation et 30° pour celle destinée à la protection contre les prédateurs (notamment les bigorneaux perceurs).

La géométrie proposée pour les ailettes permet de les utiliser en milieu contrôlé (écloserie) et de pouvoir les transporter par la suite pour leur mise à l'eau sur site.

A cette étape du développement des récifs, le design est modélisé et dimensionné en utilisant un logiciel de calcul de structures pour le Génie Civil « Robot structural Analysis ». Cette partie de modélisation et d'analyse a permis d'étudier, d'une part, la stabilité de la structure en milieu marin et, d'autre part, de choisir le dimensionnement final du poteau et des ailettes, tout en répondant aux attentes et besoins des partenaires.

Plusieurs paramètres sont pris en considération afin d'étudier la stabilité de la structure en milieu marin tels que la pression statique et dynamique, la poussée d'Archimède et le poids propre de la structure (Figure 37). L'étude de la stabilité est faite avec les conditions les plus défavorables en choisissant deux sites d'immersion : rade de Brest et baie de Morlaix. L'étude de la stabilité permet de déterminer les dimensions minimales nécessaires pour la structure (Figure 38) ainsi que de définir les sites d'immersion appropriés. En effet, l'étude de la stabilité montre l'impossibilité d'immerger les récifs sous cette forme dans la zone de l'estran de la baie de Morlaix en raison de la forte pression dynamique présente due à la période d'émergence des récifs. Cependant, la stabilité de la structure est bien vérifiée pour des sites immergés en continu comme celui de la rade de Brest où les valeurs de la contrainte sont inférieures à celle de la résistance en compression développée par les matériaux.

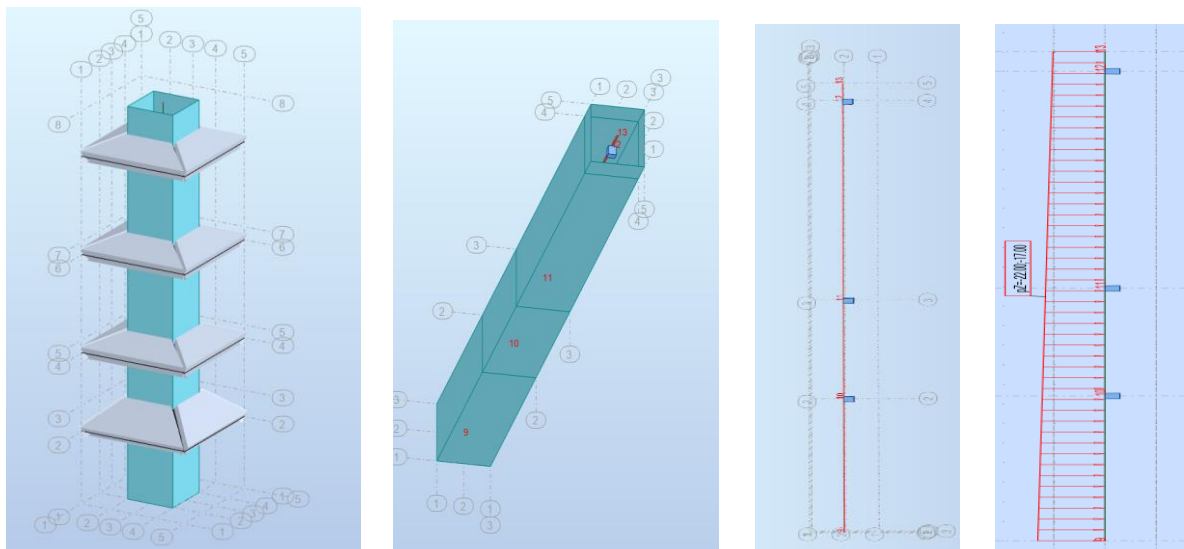


Figure 37 : Modélisation et dimensionnement des récifs.

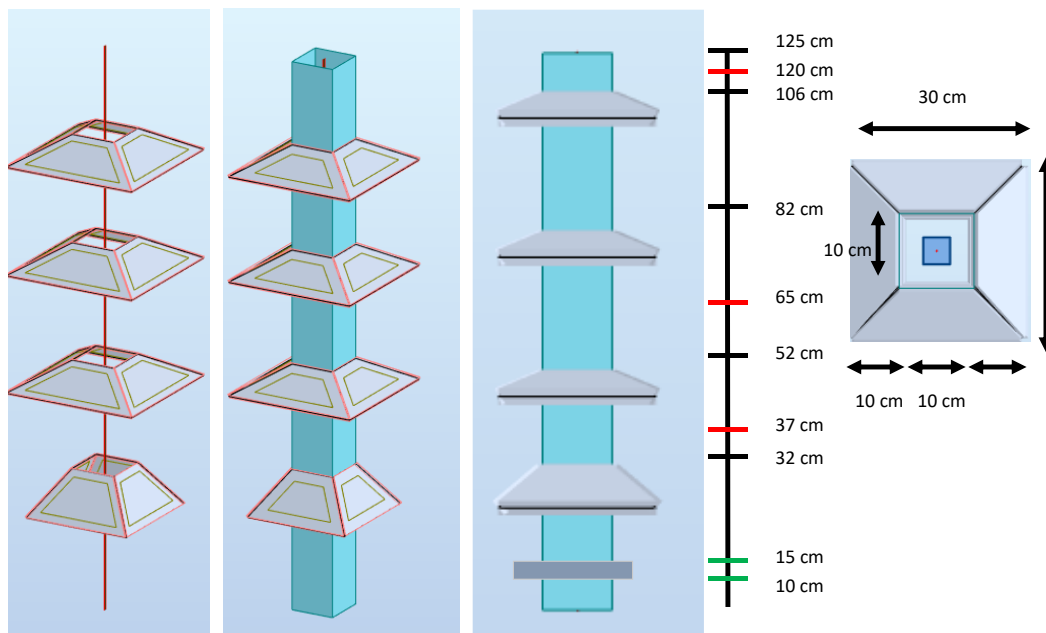


Figure 38 : Design et dimensions des récifs.

Par la suite, l'utilisation de cages métalliques est proposée pour faciliter la manipulation sous l'eau des récifs tout en limitant l'emprise au sol des infrastructures. Les récifs sont fixés sur des cages métalliques en plusieurs endroits (Figure 39). Afin d'assurer la stabilité des récifs, de nouveaux calculs de dimensionnement sont réalisés. Il est à noter ici que la fixation des supports d'accueil sur les cages est prise en compte avec l'utilisation du logiciel « Robot structural Analysis » pour revalider les premiers résultats.

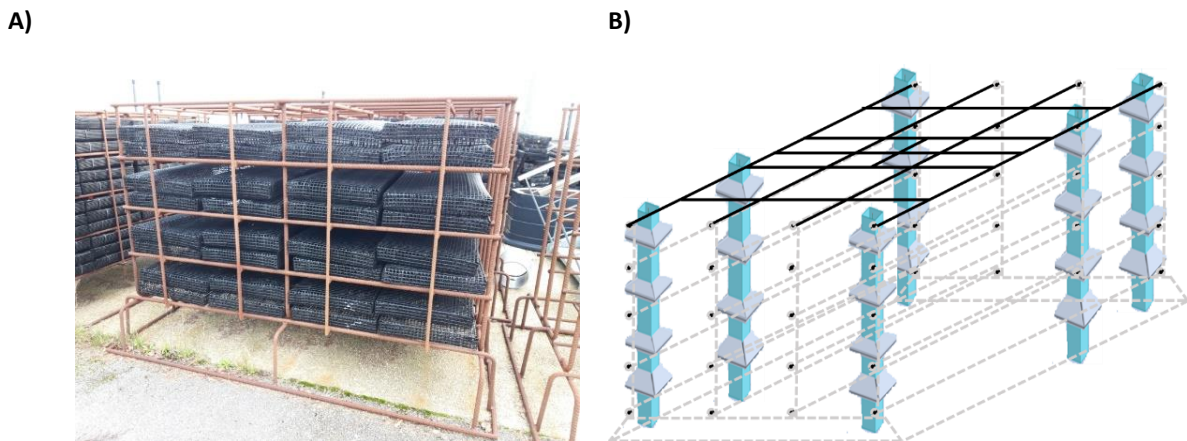


Figure 39 : Cages utilisées et simulation de la fixation des récifs sur ces cages.

Après l'utilisation des prototypes décrits dans la partie ci-après, il est décidé que la version finale des récifs ne se composera que des ailettes.

4.4. Elaboration et immersion de structures récifales adaptés au milieu contrôlé

Après avoir conçu, modélisé et étudié de façon théorique la stabilisation des supports de fixation qui seront immergés dans le milieu marin, il est nécessaire de passer à une phase de test pratique. Dans ce but, des prototypes sont fabriqués pour effectuer une première phase de faisabilité en mer avant d'entamer la phase de production finale.

Au total, 3 prototypes (3 poteaux et 12 ailettes) sont confectionnés au sein du laboratoire Builders EI. Pour rappel, le poteau central est nécessaire pour la résistance structurelle et les ailettes servent de collecteur pour la fixation des larves d'huîtres plates en éclosérie. Les ailettes de captage sont réalisées en utilisant un mortier à base des coproduits coquillés (sable à base de coquilles d'huître broyées) pour favoriser le captage des larves d'huître plate.

La confection et la mise en place des bétons et mortiers dans les coffrages sont fait conformément aux normes NF EN 196-1⁵ et NF EN 12390-2⁷. Sur la Figure 40, sont montrés les différentes parties de la structure récifale. Pour la phase de prototypage, les ailettes n'ont pas le design final, elles n'ont pas la rugosité Fischtelberg ni les angles d'inclinaisons.

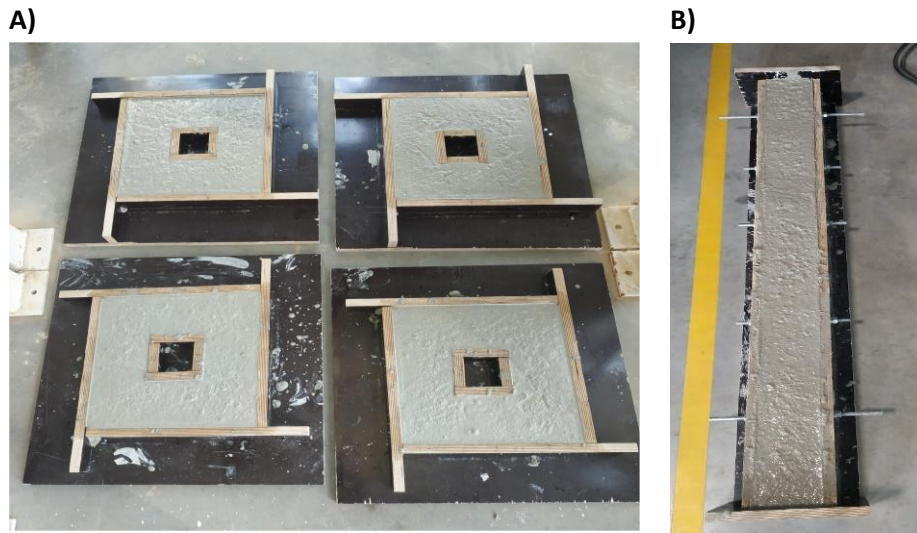


Figure 40 : Confection du mortier et du béton.

Quarante-huit heures après le coulage des matériaux, les prototypes (poteaux et ailettes) sont démoulés et conservés sur une période de 28 jours dans l'eau dans une salle ayant une température contrôlée de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les prototypes sont livrés au CRAB, lors du COPIL ARCHE, le 18 mai 2021.

Après réception et manutention du récif dans les cages (Figure 41.a) au CRAB, il est décidé de mettre les ailettes directement dans les cages (sans les poteaux) pour permettre une meilleure stabilité de la cage et surtout une manipulation individuelle des ailette plus facile (Figure 41.b). Des fixations spéciales sont conçues pour solidariser les ailettes et assurer leur résistance lors de la mise à l'eau (Figure 41.c). Les supports sont par la suite immergés en Bretagne pour une période de deux mois.

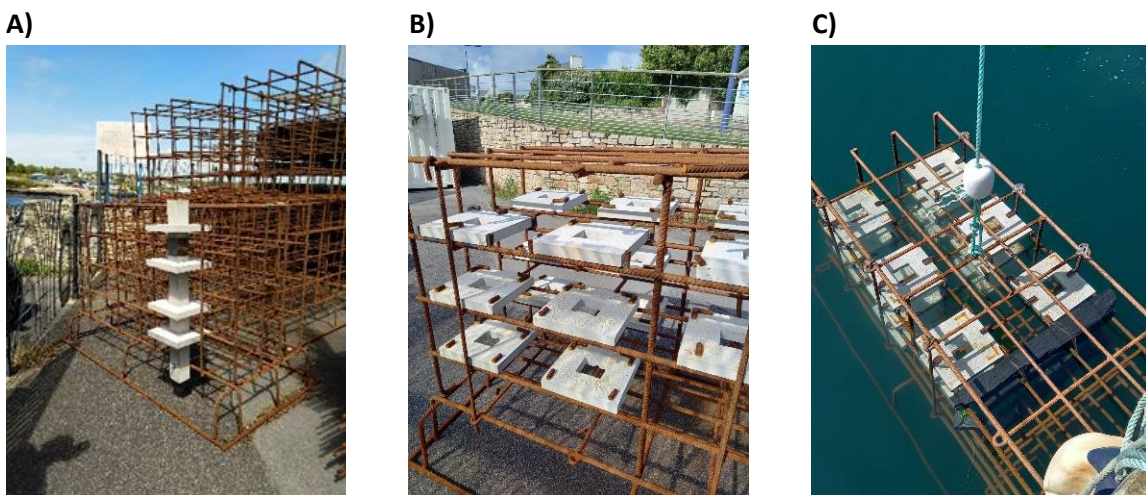


Figure 41 : Fixation et immersion des prototypes.

A la suite de la phase de test des prototypes et en accord avec la décision du CRCBN de ne mettre que les collecteurs dans les cages, un seul modèle de coffrage pour les collecteurs sera donc usiné pour la phase de production finale. Le poteau et l'ailette anti-bigorneaux ne font donc plus partie des récifs finaux. Au total, 72 collecteurs, sous forme d'ailettes ayant une longueur et une largeur de 30 cm, une

hauteur de 15 cm et avec un angle d'inclinaison de 45° seront fabriqués. Les ailettes sont de forme pyramidale tronquée au sommet et creuses (Figure 42 – partie grise).

L'ailette est trouée à son sommet pour répondre à deux besoins, le premier est de permettre à l'eau de circuler et le deuxième est de servir de poignée de manipulation. La géométrie proposée permet surtout de mettre les ailettes dans un milieu contrôlé (bacs des écloséries) afin de permettre dans un premier temps la fixation et le développement des larves d'huîtres plates. Après fixation, les ailettes seront transportées manuellement pour leur mise à l'eau.

La Figure 42 correspond aux plans de coffrages pour les ailettes à produire.

Le coffrage est composé de plusieurs parties :

- En orange : Coffrage en bois pour la stabilité et pour maintenir la matrice de rugosité ;
- En vert : Moules matricé Fischtelberg pour une rugosité souhaitée en dessous et au-dessus de l'ailette [1 ; 2] ;
- En jaune : Une partie pour la fixation du coffrage supérieur ;
- En gris : Ailettes en mortier biosourcé à fabriquer.

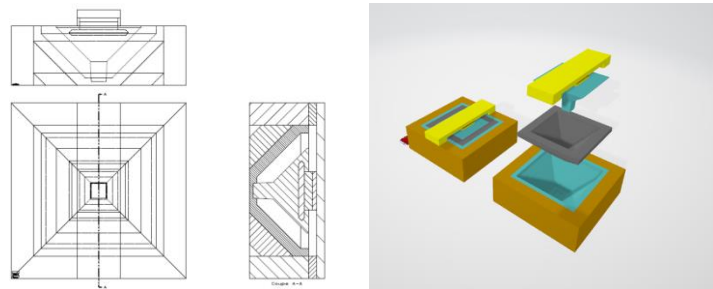


Figure 42 : Plans des coffrages des ailettes.

4.5. Conditions d'immersion, ensemencement et suivi en mer

Les prototypes des ailettes sont immergées et récupérés mi-septembre pour vérifier et valider les calculs théoriques de dimensionnement. Les ailettes montrent une belle colonisation (Figure 43), ainsi qu'une résistance mécanique suffisante pour cet environnement d'exposition.

La suite du WP4 dans le cadre du projet ARCHE consiste à la grande phase de production des récifs (72 pièces demandées) qui sera par la suite poursuivie par la phase d'ensemencement en éclosérie et le suivi en mer de la colonisation.



Figure 43 : Colonisation des ailettes après immersion de 2 mois en Bretagne.

Le design des ailettes plates est optimisé. D'un côté, pour la manipulation, il s'est avéré qu'il était plus facile de fixer les ailettes directement et individuellement sur les cages ; les poteaux sont abandonnés. De plus, le design est légèrement modifié, depuis une forme des ailettes plates à une forme des ailettes pyramidales pour maximiser la surface de contact permettant d'avoir une zone protégée sur le dessous. L'ouverture au centre de l'ailette est également diminuée. Enfin, la matière est matricée, c'est-à-dire que toute la surface intérieure et extérieure est faite par une matrice permettant une répétabilité sur l'ensemble des modules.

Après la validation du prototype, la phase de production démarre avec la production de 80 ailettes de forme pyramidale. Les étapes de la production sont les suivantes :

- La phase de confection (Figure 44) ;
- La phase de maturation des matériaux où ils sont stockés (eau) pour permettre la maturation sans le retrait du matériau (Figure 44) ;
- La phase de séchage (Figure 45) ;
- La phase d'emballage individuel dans du papier bulle (Figure 46) ;
- La phase de fixation par 10 ailettes sur palette (Figure 46) ;

La phase d'expédition au CRAB à Lampaul-Plouarzel en vue d'êtreensemencées avec les familles d'huître plate produites au



CRAB (Figure 47 et

- Figure 48).

Les figures ci-dessous illustrent les phases décrites ci-dessus :



Figure 44 : La phase de confection – La phase de maturation.



Figure 45 : La phase de séchage.



Figure 46 : La phase de fixation par 10 ailettes sur palette et la phase d'emballage.



Figure 47 : Les 8 palettes d'ailettes (80 ailettes) avant l'expédition.



Figure 48 : La phase d'expédition des ailettes.

Suite à la fabrication des récifs, durant le mois d'octobre 2022, 12 d'entre eux sont colonisés au CRAB (Figure 49) par des familles issues de la première cohorte de deuxième génération.



Figure 49 : Récifs ARCHE immergés pendant le mois d'octobre 2022 en rade Brest (Logonna-Daoulas).

En février 2023 (Figure 50), l'intégralité de récifs sont échantillonnés et comptage, nettoyage et échantillonnage de l'ADN sont effectués sur place pour chaque récif afin de corrélérer l'information initiale de chaque famille.

Des récifs vierges sont ajoutés à la cage expérimentale afin d'évaluer le captage naturel pendant l'été 2023 sur ce type de support.



Figure 50 : Récifs ARCHE après 5 mois d'immersion en rade Brest (Logonna-Daoulas).

5. WP5 Communication et management

5.1. Présentation du projet/grand public & médias

Plusieurs logos pour le projet ARCHE sont conçus et proposés par Builders EI. La Figure 51 présente le logo retenu.



Figure 51 : Logo retenu pour le projet ARCHE.

Une fiche de synthèse et de communication du projet est réalisée dès le début du projet. Celle-ci a pour but d'être transmise aux médias ou structures intéressées pour présenter le projet de manière synthétique (cf. Annexes-communication).

Une liste de diffusion (mail) est établie afin de transmettre toutes les informations et actualités liées au projet aux personnes intéressées.

La synthèse du projet ARCHE est publiée sur les sites internet des structures ci-dessous :

- BUILDERS EI : <https://builders-ingenieurs.fr/arche> ;
- CRCBN : <https://www.crcbn.com/cultures-marines/> ;
- Pôle Mer Bretagne Atlantique : <https://www.pole-mer-bretagne-atlantique.com/fr/ressources-biologiques-marines/project/2593> ;
- Breizhmer : <http://www.breizhmer.bzh/porscave/> ;
- NORA (Native Oyster Restoration Alliance) : <https://nora-europe.eu/restoration-projects/france-arche-improving-artificial-reproduction-in-hatchery-to-assist-the-restoration-of-the-flat-oyster-in-france/>
- AGLIA (Wikimer) - <https://www.wikimer.org/projets/arche-amelioration-de-la-reproduction-en-vue-de-la-restauration-chez-l-huitre-plate/>

Des articles sur ARCHE sont parus dans la presse (cf. Annexes-communication) :

- Cultures Marines N°334 – Mars 2020 « Triplé gagnant pour le CRC » ;
- Cultures Marines N°339 – Septembre 2020 « Améliorer l'habitat et la reproduction » ;
- Cultures Marines N°349 – Septembre 2021 « L'avenir de l'huître plate se joue à Porscave » ;
- Ouest France – 19/11/2021 « Trois expériences en rade de Brest pour le renouveau de l'huître plate » ;
- Produits de la mer – Aout 2022 – « le CRC de Bretagne Nord veut restaurer l'huître plate »
- Ouest France – 11/08/2022 – « Lanildut – Retour positif pour le forum de l'algue » ;
- Le Parisien – 11/08/2022 – « En Bretagne, ostréiculteurs et chercheurs travaillent à la réintroduction de l'huître plate » ;
- Euractiv – 23/12/2022 – « L'huître plate à la reconquête de l'Europe »

- Cultures Marines – Mars 2023
- Le Marin – 20/04/2023 « À Porscave, le CRAB multiplie les projets de recherche scientifique » : <https://lemarin.ouest-france.fr/secteurs-activites/peche/porscave-le-crab-multiplie-les-projets-de-recherche-scientifique-47150>

Le CRAB a fait l'objet de visites et découvertes de public divers (

Tableau 8).

Tableau 8 : Visites officielles au CRAB.

Date	Objet	Cible	Communication
7 et 8 octobre 2021	Fête de la Science 2021	Grand public	Figure 52
2 mars 2022	Visite par les candidats au CQP Responsable d'exploitation conchylicole en formation à la MFR de Morlaix	Etudiants	LinkedIn CRCBN Figure 53
17 juin 2022	Visite par Messieurs Le Drian et Le Gac	Elus	LinkedIn CRCBN Instagram CRCBN
4 avril 2023	Visite de la rédactrice en chef du Marin et de la directrice d'Infomer	Presse et média	
17 mai 2023	Inauguration du CRAB par Breizhmer, visite des installations et présentation du projet au Président de la Région Bretagne	Elus	LinkedIn CRCBN LinkedIn Breizhmer LinkedIn Loïg Chesnais-Girard Instagram CRCBN
23 mai 2023	Visite par la DG MARE	Administration européenne	LinkedIn CRCBN



Figure 52 : Photos lors des visites du CRAB lors des fêtes de la Science en octobre 2021.

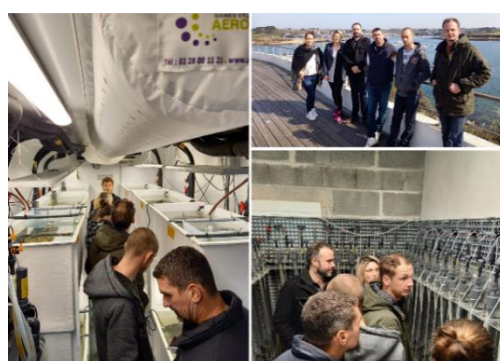


Figure 53 : Photos lors de la visite des étudiants de la MFR de Morlaix.



Figure 54 : Photo du stand lors de la fête de la science 2023 aux ateliers des Capucins à Brest.

Des événements ont permis de présenter le projet ARCHE est présenté (Tableau 9) :

Tableau 9 : événements de présentation d'ARCHE.

Date	Objet	Présentation par	Cible	Communication
09/2020	Salon Conchylicole de Vannes	Nolwenn Cozannet (CRCBN)	Conchyliculteurs	Photos
12/2020	Workshop virtuel à Monaco	Arnaud Tanguy (SU)	Scientifiques	Sans objet
25/01/2021	Journée de Restitution du CRCBN	Ricardo Gonzalez-Araya (CRCBN) et Arnaud Tanguy (SU)	Conchyliculteurs de Bretagne Nord	Photos
02/2021	NORA (Native Oyster Restoration Alliance)	Arnaud Tanguy (SU)	Scientifiques	Sans objet
11/05/2021	Étudiants du Master CELSA spécialisé dans le journalisme	Arnaud Tanguy (SU)	Etudiants	Sans objet
19/11/2021	Réunion publique à Landevennec (29)	Ricardo Gonzalez-Araya et Apolline Lebourg (CRCBN)	Grand public	Article de presse
11/07/2022	Remise des prix du concours Ruban Vert de Blue Fish, à Bruxelles par Pierre Karleskind	Sylvain Cornée et Benoit Salaun (CRCBN)	Elus et Administrations	Post LinkedIn
30/09/2022	Nuit des chercheurs à Océanopolis	Corentin Chevalier, Martin Protat (CRCBN) et Arnaud Tanguy (SU)	Grand public	Post LinkedIn

08 et 09/10/2023	Fête de la science aux ateliers des Capucin, Brest	Laure Leroux	Grand public	Photos Figure 54
03/04/2023	Journée de restitution du CRCBN	Ricardo Gonzalez-Araya (CRCBN) et Arnaud Tanguy (SU)	Conchyliculteurs de Bretagne Nord	Instagram CRCBN
30/04/2023	Fête de l'huître à Carantec	Apolline Lebourg (CRCBN)	Grand Public	Post LinkedIn
30/06/2023	AG du Pôle Mer Bretagne Atlantique (PMBA)	Ricardo Gonzalez-Araya	Administrateur du PMBA	A venir
08/09/2023	Journée Huître Plate	Ricardo Gonzalez-Araya & Apolline Lebourg	Scientifiques, professionnels, services de l'Etat, Elus, étudiants.	A venir

5.1.1. Publications sur les réseaux sociaux

Les partenaires ont régulièrement publié sur les réseaux sociaux (Instagram et LinkedIn) dans le cadre du projet ARCHE (Tableau 10).

Tableau 10 : Détails des publications.

Réseau social	Lien vers le Post	Détail du Post
LinkedIn	Lien	Présentation du CRAB et des projets à Breizhmer
LinkedIn	Lien	COFIL ARCHE
LinkedIn	Lien	Visites organisées du CRAB au grand public
LinkedIn	Lien	COFIL ARCHE
LinkedIn	Lien	Présentation du CRAB et des projets à la DIMER Bretagne
LinkedIn	Lien	Republication de l'article du Ouest France "Finistère. Ils veulent redonner une chance à l'huître historique de la rade de Brest"
LinkedIn	Lien	Chantier de suivi des familles
LinkedIn	Lien	Chantier de suivi des familles
LinkedIn	Lien	Présentation du CRAB et des projets aux étudiants MFR Morlaix
LinkedIn	Lien	COFIL ARCHE
LinkedIn	Lien	Présentation du CRAB à M. Le Drian et M. Le Gac
LinkedIn	Lien	Expériences sur les récifs
LinkedIn	Lien	Expériences sur les récifs
LinkedIn	Lien	Remise prix Blue Fish pour le projet ARCHE
LinkedIn	Lien	Nuit des chercheurs à Océanopolis
LinkedIn	Lien	COFIL ARCHE
LinkedIn	Lien	Présentation ARCHE sur site web NORA
LinkedIn	Lien	Visite des installations et une présentation des projets Qenergy
LinkedIn	Lien	Présentation des projets à l'AGLIA
LinkedIn	Lien	Chantier de suivi des familles
LinkedIn	Lien	Chantier de suivi des familles

LinkedIn	Lien	Chantier de suivi des familles
LinkedIn	Lien	Présentation du CRAB aux Eurodéputés
LinkedIn	Lien	Présentation lors de la fête de l'huître
LinkedIn	Lien	Présentation des projets au forum de l'algue de Lanildut
LinkedIn	Lien	Inauguration du CRAB en présence du Président de Région
LinkedIn	Lien	Inauguration du CRAB en présence du Président de Région : Post du Président de région
LinkedIn	Lien	Inauguration du CRAB en présence du Président de Région : Post de Breizhmer
LinkedIn	Lien	Présentation des projets à la DG MARE
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Matériaux
Instagram	Lien	Chantier de suivi des familles
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Expérience en labo
Instagram	Lien	Chantier de suivi des familles
Instagram	Lien	Matériaux
Instagram	Lien	Matériaux
Instagram	Lien	Matériaux
Instagram	Lien	Présentation du CRAB à M. Le Drian et M. Le Gac
Instagram	Lien	Chantier de suivi des familles
Instagram	Lien	Chantier de suivi des familles
Instagram	Lien	Chantier de suivi des familles
Instagram	Lien	Journée de restitution des projets du CRCBN
Instagram	Lien	Inauguration du CRAB en présence du Président de Région
Instagram	Lien	Présentation des projets à la DGMARE

5.1.2. Fiches trimestrielles

11 séries de fiches trimestrielles sont rédigées par les partenaires et transmises aux partenaires, aux services instructeurs, aux services de l'État et aux professionnels du CRCBN (cf. Annexes-communication).

5.2. Management et gestion du projet

7 Comités de Pilotage ont eu lieu à raison de 2 par an (Tableau 11).

Tableau 11 : Calendrier des COPIL.

Date	COPIL	Lieu du COPIL
27/04/2020	COPIL N°1	Visioconférence (Covid-19)
09/11/2020	COPIL N°2	CRCBN Morlaix
18/05/2021	COPIL N°3	CRCBN Morlaix
17/11/2021	COPIL N°4	CRCBN Morlaix
02/06/2022	COPIL N°5	CRCBN Morlaix
14/11/2022	COPIL N°6	BUILDERS EI Epron
16/03/2023	COPIL N°7	SU – Station Biologique Roscoff

Les invitations, supports de présentation et feuilles de présence des COPIL sont annexés à ce rapport (Annexes-documents-COPIL).

Conclusion et perspectives

Le programme ARCHE a permis de mener à bien les actions préliminaires indispensables pour envisager la restauration des gisements naturels. Les domaines de compétence abordés par le programme ARCHE permettent à ce stade :

- De disposer d'un savoir-faire sur le cycle de reproduction de l'huître plate en milieu contrôlé ;
- De produire, en milieu contrôlé, des familles rustiques présentant une forte diversité génétique ;
- De disposer de supports pour l'installation des familles rustiques d'intérêt en mer.

Les résultats d'ARCHE offrent des perspectives de concrétisation du repeuplement des gisements à plus grande échelle par l'intégration des familles rustiques sur les supports adaptés qui pourront être déployés sur des sites spécifiques en vue d'alimenter en larves les gisements naturels résiduels et les sites de captage naturel.

Il persiste du travail à mener sur la maîtrise du cycle de production, notamment en ce qui concerne les phases larvaires, néanmoins, la filière conchylicole bretonne, engagée depuis plus de 10 ans dans des travaux de recherche sur l'huître plate, aperçoit, grâce au programme ARCHE et précédemment aux projets PERLE, PERLE II, FOREVER, la finalité des efforts engagés.

Bibliographie

[1] Pouvreau, S., Cochet, H., Fabien, A., Arzul, I., Lapègue, S., Gachelin, S., Salaun, B., 2021. Inventaire, diagnostic écologique et restauration des principaux bancs d'huîtres plates en Bretagne : le projet FOREVER. Ifremer. Rapport Final. Contrat FEAMP 17/ 2215675.

[2] Potet, M., Fabien, A., Chaudemanche, S., Sebaibi, N., Guillet, T., Gachelin, S., Cochet, H., Boutouil, M., Pouvreau, S., " Which concrete substrate suits you? Ostrea edulis larval preferences and implications for shellfish restoration in Europe". Ecological Engineering 162 (2021) 106159

[3] NF EN 197-1 (2001) Ciment - Partie 1 : composition, spécifications et critères de conformité des ciments courants.

[4] NF EN 933-1 Essais pour déterminer les caractéristiques géométriques des granulats - Partie 1 : détermination de la granularité - Analyse granulométrique par tamisage

[5] NF EN 196-1 (2006) Détermination des résistances mécaniques.

[6] NF EN 12390-2 (2012) Essais pour béton durci - Partie 2 : confection et conservation des éprouvettes pour essais de résistance.

[7] NF EN 12390-3 (2012) Essais pour béton durci - Partie 3 : résistance à la compression des éprouvettes.