



Fiche Bio 2009-04 : Marquage individuel de crevettes par bagues oculaires : une technique simple et utile pour la sélection de géniteurs

J-M. Peignon, R. Dufour, P. Morvan, E. Goyard
Contact : jmpeigno@ifremer.fr

1. Introduction

La mise en œuvre de protocoles d'amélioration génétique par sélection des meilleurs candidats à la reproduction impose entre autres deux contraintes fortes :

- la sélection doit s'opérer selon un ou plusieurs critères mesurable(s) individuellement et corrélé(s) au(x) caractère(s) d'intérêt que l'on souhaite améliorer ;
- la sélection doit être pratiquée sur un grand nombre de candidats à la reproduction et le nombre d'animaux retenus doit être suffisamment faible pour que la pression de sélection soit suffisante pour induire une réponse significative. En première approche, un ratio de 1/10 pour le nombre d'animaux retenus sur le nombre de candidats est un objectif raisonnable, qui sera à moduler en fonction du niveau d'héritabilité des caractères d'intérêt.

En d'autres termes, le sélectionneur va devoir, en première approche, mesurer individuellement le(s) caractère(s) définissant le critère de sélection sur 10 fois plus d'animaux qu'il ne mènera jusqu'à la maturation.

Concrètement, dans les programmes de sélection basés sur l'évaluation d'un seul caractère qu'il est possible de mesurer instantanément, il « suffit » d'élever suffisamment de candidats à la reproduction et d'effectuer un tri en fonction du seuil retenu sur ce caractère. Mais si le critère retenu ne peut être mesuré instantanément et nécessite des analyses en laboratoire et/ou des calculs complexes, le sélectionneur va devoir stocker les candidats à la reproduction de façon à pouvoir les ré-identifier *a posteriori* au moment du tri. Le marquage individuel devient alors incontournable. Les avancées récentes dans l'étude de l'expression des peptides anti-microbiens (de Lorgeril et al ; , 2008) qui pourraient déboucher sur des techniques de « sélection assistée par marqueurs » visant une amélioration de la résistance des cheptels en sont une bonne illustration : l'évaluation du niveau d'expression de ces peptides antimicrobiens chez un individu donné, qui fait appel à analyses effectuées sur des échantillons d'hémolymphe (centrifugation, puis extraction d'ARN puis analyses par qPCR), nécessite au moins 3 jours entre le prélèvement et l'obtention de la valeur recherchée, plus si les analyses sont délocalisées.

Le marquage par injection de silicone coloré est utilisé en routine pour marquer individuellement des crevettes en utilisant les multiples combinaisons de couleurs disponibles et de position (droite-gauche/telson ou segment). Cette possibilité est particulièrement intéressante lors d'expérimentations qui nécessitent des suivis individuels de plusieurs semaines. Mais l'injection de silicone est chronophage et la relecture *a posteriori* des marques est parfois difficile. La solution du marquage par bagues oculaires multicolores ne présente a priori pas ces inconvénients.

Afin de valider la faisabilité d'une sélection basée sur un critère nécessitant des analyses non immédiates sur des échantillons d'hémolymphe (cas de l'expression des peptides anti microbiens), une simulation de la chaîne complète de traitement des animaux a été effectuée : pêche, transfert, prélèvement des échantillons d'hémolymphe, marquage individuel par bague oculaire, stabulation le temps de procéder aux analyses. La présente fiche décrit la méthode de marquage utilisée et les résultats obtenus à l'issue de la période.

2. Matériel et méthodes

Fabrication des bagues

Le moule des bagues est constitué de :

- deux demi coques de cuivre de diamètre 12 mm (photo 1)
- une tige centrale en aluminium de 3.3 mm de diamètre, munie de 2 rondelles d'extrémité permettant d'assurer l'étanchéité du moule pendant le séchage (photo 1).

Ces éléments paraffinés pour faciliter le démoulage.

Le silicone translucide ou blanc est coloré en utilisant une petite quantité de silicone coloré utilisé pour le marquage par injection (fournisseur Northwest Marine Technology TM, <http://www.nmt-inc.com>).

Chacune des 2 demi coques est dans un premier temps remplie de silicone coloré (le cas échéant avec une couleur différente par demi coque). Puis la tige centrale est insérée, puis les deux demi coques réunies et jointes par des élastiques.

Après 12 heures de séchage, l'ensemble est démoulé : le tube de silicone obtenu est découpé en rondelles de 3 mm d'épaisseur.

Avec N couleurs disponibles, le nombre de types de marques possible est égal à $N \times (N+1)/2$, dont $N \times (N-1)/2$ marques de double couleur (photo 2).



photo 1 : moule pour fabriquer les bagues oculaires en silicone



photo 2 : bagues bicolores



Photo 3a : la bague, enfilée sur le porte bague, est prête à être posée



Photo 3b : l'œil de la crevette est inséré dans l'embout porte-bague

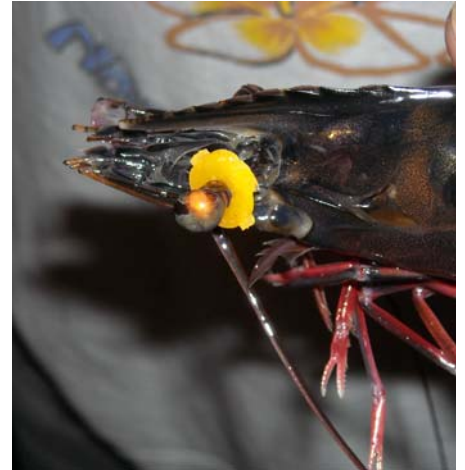


Photo 3c : le porte bague est retiré une fois que la bague a été poussée vers le pédoncule oculaire

Marquage des animaux

La pose de la marque est effectuée grâce à un embout de pipette conique dont la grosse extrémité permet de dilater l'anneau de silicone. L'œil de l'animal à marquer est positionné dans l'embout (photo 3a), pouce et index du manipulateur poussent la marque sur le pédoncule oculaire (photo 3b), l'embout est retiré et la marque, qui retrouve instantanément sa taille initiale, reste sur le pédoncule (photo 3c)

Essai de marquage et de stockage

180 animaux de plus de 25 g ont été pêchés à l'épervier dans un bassin de terre puis transférés en zone expérimentale extérieure ; Chacun des ces animaux a subi une ponction d'hémolymphe, puis un double marquage oculaire (une bague par œil). Deux lots de 60 animaux et 2 de 30 ont été constitués et transférés dans 4 bacs cylindriques de 1600 litres.

Ces animaux ont été alimentés à partir du 3^{ème} jour selon un taux de nutrition de 4% pendant 3 semaines (du 28/10 au 19/11/2008), puis leur survie a été évaluée et les bagues en place ont été comptées.

3. Résultats commentés

Un pic de mue a été observé durant la durée du test.

Sur l'ensemble des crevettes survivantes, toutes avaient au moins une bague et plus de 97% avaient leurs deux bagues (tableau 1).

Dans trois des quatre bacs, les survies dépassent 70% au bout de 3 semaines. Seul le bac A présente une survie significativement inférieure aux 3 autres (44% contre 73-83%). La bonne survie du bac B dont l'effectif initial était équivalent à celui du bac A (59-60

animaux) laisse penser que la faiblesse de la survie du bac A n'est pas liée à la densité d'élevage mais au fait que ce bac a subi des perturbations environnementales à cause de son positionnement en extrémité (ensoleillement supérieur avec fortes températures).

Tableau 1 : pertes de bagues et survies observées en fin de test

B a c	Nombre initial d'animaux avec 2 bagues	Nombre final d'animaux			Survie
		Sans bague	Avec 1 bague	Avec 2 bagues	
A	59	0	1	25	44%
B	60	0	2	46	80%
C	30	0	0	25	83%
D	30	0	0	22	73%

4. Conclusions et perspectives

Les bagues oculaires en silicone, très faciles d'emploi, permettent de marquer individuellement des animaux sur des périodes de stabulation de plus d'un cycle de mue et leur tenue dans le temps s'avère fiable. Leur mise en oeuvre est rapide et la lecture est facile. Ce type de marquage, non traumatisant, représente une alternative intéressante au marquage par injection.

L'ensemble de la simulation effectuée permet de conclure qu'une sélection basée sur un critère tel que le niveau individuel d'expression des peptides anti-microbiens (qui nécessite prélèvement d'hémolymphe et du temps d'analyse) est zootechniquement envisageable dès lors que ce critère aura démontré sa stabilité dans le temps et son héritabilité.

de Lorgeril J., Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., Piquemal D., Bachère E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular Microbiology*, 45: 3438-3445.

de Lorgeril J. 2008. Peptides anti-microbiens de crevettes : Implications potentielles dans la survie à des infections bactériennes. Réunion technique avec les partenaires de DEDUCTION ; 4 juillet 2008. Saint-Vincent.