



HAL
open science

Application de biotechnologies moléculaires au contrôle de la production de l'arche noire (*Anadara tuberculosa*) à des fins de conservation et d'élevage

Benoit Diringier

► **To cite this version:**

Benoit Diringier. Application de biotechnologies moléculaires au contrôle de la production de l'arche noire (*Anadara tuberculosa*) à des fins de conservation et d'élevage. Biotechnologies. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLEP068 . tel-02868814

HAL Id: tel-02868814

<https://theses.hal.science/tel-02868814>

Submitted on 15 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

**Application de biotechnologies moléculaires au contrôle
de la production de l'arche noire (*Anadara tuberculosa*)
à des fins de conservation et d'élevage**

Soutenue par

Benoit DIRINGER

Le 16 décembre 2019

École doctorale n° 472

**École doctorale de l'École
Pratique des Hautes Études**

Spécialité

**Océanologie biologique et
environnement marin**

Composition du jury :

Viviane, BOULO Cadre de Recherche HDR, IFREMER	<i>Rapporteur</i>
Jehan-Hervé, LIGNOT Professeur, Université de Montpellier	<i>Rapporteur</i>
Marc, TAQUET Directeur de Recherche HDR, IRD	<i>Examineur</i>
Jean-Christophe, AVARRE Cadre de Recherche HDR, IRD	<i>Examineur</i>
Frédéric, ARNAUD DR INRA, DECU EPHE	<i>Directeur de thèse</i>
Thierry, DUPRESSOIR DE, EPHE	<i>Invité</i>



Remerciements

En premier lieu je souhaiterais exprimer ma plus grande estime ainsi que mes plus vifs remerciements aux membres du Jury qui me font l'honneur d'évaluer les résultats de ces travaux.

Je tiens à remercier en particulier Frederick Arnaud qui a accepté de reprendre la direction de cette thèse et ainsi de me permettre de finaliser avec succès ce doctorat. Un immense merci aussi à Thierry Dupressoir, pour m'avoir soutenu et fait confiance malgré la distance, merci pour ta précieuse aide tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Mon cursus à l'EPHE aura été une expérience intense et enrichissante au cours de mon futur parcours professionnel, nous nous efforcerons aussi de créer des modèles de formations alternatifs mêlant vie professionnelle et études, au Pérou et dans les différents pays où nous serons amenés à travailler.

J'exprime aussi ma toute ma gratitude à l'Ecole Doctorale Franco-Péruvienne, au CONCYTEC, au FINCyT, et à l'Université Nationale de Tumbes qui ont soutenu ces recherches et ma formation afin que je puisse maintenant à mon tour transmettre cette expérience au bénéfice de la recherche et de la formation des étudiants péruviens.

Queridos compañeros Eric, Virna, Emmerik, Gaël, et Vivianne, c'est parce que les chemins de la vie sont pavés de belles amitiés qu'ils valent la peine de les parcourir. J'espère poursuivre l'aventure pendant encore de nombreuses années à vos côtés.

J'aurais une pensée particulière pour mon père, Alain qui m'a transmis la passion de la biologie marine, pour ma mère Fabienne pour son soutien dans les coups durs de la vie, et bien sûr à Christiane sans qui je ne serais pas arrivé là.

Mathieu et Joaquim, mes deux fils, qui furent à la fois le moteur et les freins de ce doctorat, la paternité est une aventure pleine d'émotions, je vous aime fort.

Un agradecimiento especial a todos mis colegas de IncaBiotec y Concepto Azul, Krizia mi amor, por tu constante cariño y apoyo, a mis compañeros del equipo moluscos, mis amigos de crustáceos y peces, juntos seremos capaces de revolucionar la acuicultura. A la familia IncaBiotec, mis mejores sentimientos van para ustedes, gracias.

Quisiera también agradecer a Raul Loayza, por su amistad y su confianza, a Gabriele Gentile por su importante participación en los trabajos de genética de población, a todos los coautores presentes en las publicaciones de este manuscrito, a las ONG Hivos y MEDA por haber aportado al desarrollo de este modelo.

Finalmente, mis pensamientos van para los extractores y usuarios de los manglares de Sudamérica con los cuales compartimos el importante desafío de preservar estos recursos naturales para nuestros hijos.

Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières.....	2
Liste des abréviations.....	3
Index des illustrations.....	5
Introduction générale.....	6
Préambule.....	6
Les mangroves.....	6
L'arche noire.....	7
Menaces anthropiques.....	9
Objectifs généraux.....	12
Etat de l'art.....	13
Sociétés humaines, pêcheries et aquaculture.....	13
Place des bivalves dans les pêcheries et productions aquacoles.....	14
Place des arches dans les pêcheries et productions aquacoles.....	15
Place de <i>A. tuberculosa</i> en Amérique latine et au Pérou.....	17
Production aquacole de naissains.....	18
Cycle et phases de croissance.....	18
Croissance des coquillages.....	21
Ecosystème de mangrove du Pacifique Est.....	22
Spécificités géographiques de la zone d'étude.....	25
Problématique.....	29
Objectifs.....	29
Résultats.....	31
Chapitre 1 Analyse de la structure et de la diversité génétique des populations d' <i>Anadara tuberculosa</i> provenant des principaux centres d'extraction d'Amérique du Sud.....	32
Chapitre 2 Évaluation de la réponse physiologique et moléculaire d' <i>Anadara tuberculosa</i> soumise à différentes salinités.....	43
Chapitre 3 Production pilote de naissains d' <i>Anadara tuberculosa</i> libres de pathogènes spécifiques et produits à partir de reproducteurs caractérisés génétiquement à des fins de repeuplement.....	52
Discussion et perspectives générales.....	62
Analyse de la structure génétique et implications pour la conservation.....	63
Réponses physiologique et moléculaire au stress de la salinité.....	65
Développement d'une expérience pilote de production de naissains et perspectives.....	69
Bibliographie.....	77

Liste des abréviations

ADN ; Acide désoxyribonucléique

ADNmt ; Acide désoxyribonucléique mitochondrial

AFLP ; *Amplified fragment length polymorphism*

AN ; Arche Noire *Anadara tuberculosa*

AOC ; Appellation d'origine contrôlée

ARN ; Acide ribonucléique

ARNr ; Acide ribonucléique ribosomal

Av-JC ; Avant Jésus Christ

CRISPR ; *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.*

ENSO ; Oscillation australe d'El Niño (*El Niño Southern Oscillation*)

FAA ; Aminoacides libres (*Free Amino Acids*)

FAO ; Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

HRM ; *High Resolution melting analysis*

HSP ; *Heat Shock Protein*

IUCN ; *International Union for Conservation of Nature*

MALDI TOF TOF ; *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, Time Of Flight-Time Of Flight*

MAS ; *Marker Assisted Selection*

NCBI ; *National Center for Biotechnology Information*

NGS ; Séquençage de nouvelle génération

OIE ; Organisation mondiale de la santé animale

ONG ; Organisation non gouvernementale

OsHV1 ; *Ostreid Herpesvirus 1*

pH ; Potentiel d'hydrogène

PCR ; Réaction en chaine de la Polymérase

Ppt ; *Part per thousand*

QTL ; *Quantitative Trait Loci*

RT-qPCR ; *Real-time quantitative PCR*

RBNAM ; Réserve de biosphère du Nordeste Amotapes-Manglares (SNLMT)

SNP ; *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR ; *Simple Sequence Repeat*

UNESCO ; Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture

USAID ; *United State Agency for International Development*

USD ; Dollar des États-Unis

WWF ; *World Wildlife Fund*

Index des illustrations

Figure 1: Distribution géographique des zones majeures de mangroves (en vert, modifié d'après Giri, et al., 2008).....	8
Figure 2: A) Adultes d' <i>Anadara tuberculosa</i> , B) Extracteur traditionnel dans la mangrove (Photographies A. Cruz, WWF).....	9
Figure 3: Aspects morphologiques des valves d'un individu adulte d' <i>Anadara tuberculosa</i> . Echelle 1cm. (Modifié de Fischer et al., 1995).	9
Figure 4: A) Evolution des fréquences de tailles d' <i>Anadara tuberculosa</i> au Pérou, B) Evolution des densités d' <i>Anadara tuberculosa</i> au Pérou (modifié de Imarpe 2019).LV : Longueur de valve.	11
Figure 5: Évolution mondiale des productions des pêches de captures et de l'aquaculture 1990-2030 (FAO 2018).....	15
Figure 6: Représentation du nombre d'études portant sur le genre <i>Anadara</i> disponibles dans PubMed.	18
Figure 7: Cycle de vie d' <i>Anadara tuberculosa</i> produite en éclosion.	20
Figure 8: Photographie d'arbustes de <i>Rhizophora mangle</i> ou mangrove rouge de Tumbes, partiellement recouvert par la marée montante (Laura Sanjinez, IncaBiotec).	24
Figure 9: Schématisation de ENSO (El Niño Southern Oscillation). A) Schématisation de ENSO focalisée sur vents et précipitations. B) Schématisation de ENSO focalisée sur les courants marins et la température de l'eau. (Sources NOAA)	26
Figure 10: Chronologie des épisodes ENSO survenus entre 1900 à 2018 (source USCPC, 2019)	27
Figure 11: Pictogramme d'une séquence sans artéfact du gène COI de <i>Anadara tuberculosa</i>	36
Figure 12: Réseaux d'haplotypes illustrant les relations généalogiques entre les différents haplotypes d' <i>Anadara tuberculosa</i> des différents sites d'extractions en considérant A) l'échantillonnage original, B) l'échantillonnage après harmonisation de la taille de l'échantillon.	39
Figure 13: Mortalités cumulées d' <i>Anadara tuberculosa</i> maintenues à différentes salinités.	46
Figure 14: Sites d'échantillonnages d' <i>Anadara tuberculosa</i> dans le Sanctuaire National des Mangroves de Tumbes. A) Situation du SNLMT au niveau macrorégional (en rouge), B) Localisation des bancs naturels d' <i>A. tuberculosa</i> échantillonnés (points rouges) dans le SNLM.....	59

Introduction générale

Préambule

Le droit à une alimentation adéquate - et intrinsèquement le droit au travail qui permet d'accéder à cette alimentation - constitue un droit de l'homme, dont jouit chaque personne (FAO, 2012a).

Dans de nombreux pays en développement ou en transition, ce droit s'exerce pour les communautés natives par la liberté d'extraire des ressources naturelles. Cependant, l'explosion démographique de ces populations représente un risque d'effondrement des écosystèmes et d'extinction des espèces qui les composent (Diamond J., 2005).

Les mangroves

Les forêts de palétuviers ou mangroves occupent la frontière entre la terre et la mer et elles constituent l'un des 14 biomes terrestres reconnus, c'est-à-dire qu'elles forment un ensemble singulier et exceptionnel de plantes et d'animaux qui peuplent un espace doté de caractéristiques physiques également particulières (UNESCO 2019). Ces écosystèmes se rencontrent sous les latitudes tropicales et subtropicales (Figure 1) et sont composés d'arbres tolérants aux variations de salinité qui existent dans la zone intertidale et près de l'embouchure des cours d'eau douce. Les mangroves font partie des biomes les plus productifs au monde, mais sont également parmi les plus surexploitées ; depuis 1980, un cinquième des écosystèmes de mangroves a été perdu (Spalding *et al.*, 2010).

Les mangroves d'Amérique Latine offrent une vaste gamme de biens et de services aux populations qui les exploitent, notamment des produits forestiers et de la pêche.



Figure 1: Distribution géographique des zones majeures de mangroves (en vert, modifié d'après Giri, *et al.*, 2008)

L'arche noire

Le bivalve *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833 ; désigné par la suite par l'acronyme AN) est considéré comme une espèce emblématique de l'écosystème mangrove du Pacifique Est, entre le golfe de Californie, Mexique, et la région de Tumbes au nord du Pérou (Cruz et Borda, 2003). Son nom vernaculaire est "arche noire" en français ou "pustulose ark", "black ark" en anglais Nord-Américain (FAO 2010). Dans ces régions, l'arche noire est utilisée comme aliment de base pour la préparation de mets traditionnels dans plusieurs pays d'Amérique latine tropicale où elle est commercialisée sous différentes appellations : "piangua" (et Costa Rica), "concha negra" (Pérou et Nicaragua), "curil" (Salvador et), "chucheca" (Panama), "concha prieta" (Equateur), "pata de mula" (Mexique), "concha de burro" (Guatemala).

Ces mollusques sont spécifiquement associés aux racines du palétuvier rouge *Rhizophora mangle*, vivant enfouis dans des sédiments sableux-vaseux à une profondeur variant de 1 à 30 cm (INRENA, 2007) (Figure 2).



Figure 2: A) Adultes d'*Anadara tuberculosa*, B) Extracteur traditionnel dans la mangrove (Photographies A. Cruz, WWF)

Les coquilles de l'AN sont grandes, ovales et relativement épaisses (1-1.5 mm). Les valves présentent entre 33 et 37 côtes, avec des marges dorsales angulées. La coquille est blanche mais recouverte d'un periostracum velu qui varie du brun foncé au noir et possède des umbos larges et proéminents (Figure 2) (Fisher *et al.*, 1995). Son nom scientifique *A. tuberculosa* est attribué aux nodules ou tubercules présents sur les côtes. L'AN peut atteindre une taille allant jusqu'à 10 cm de long mais elle ne dépasse que rarement les 6 cm (Figure 3).

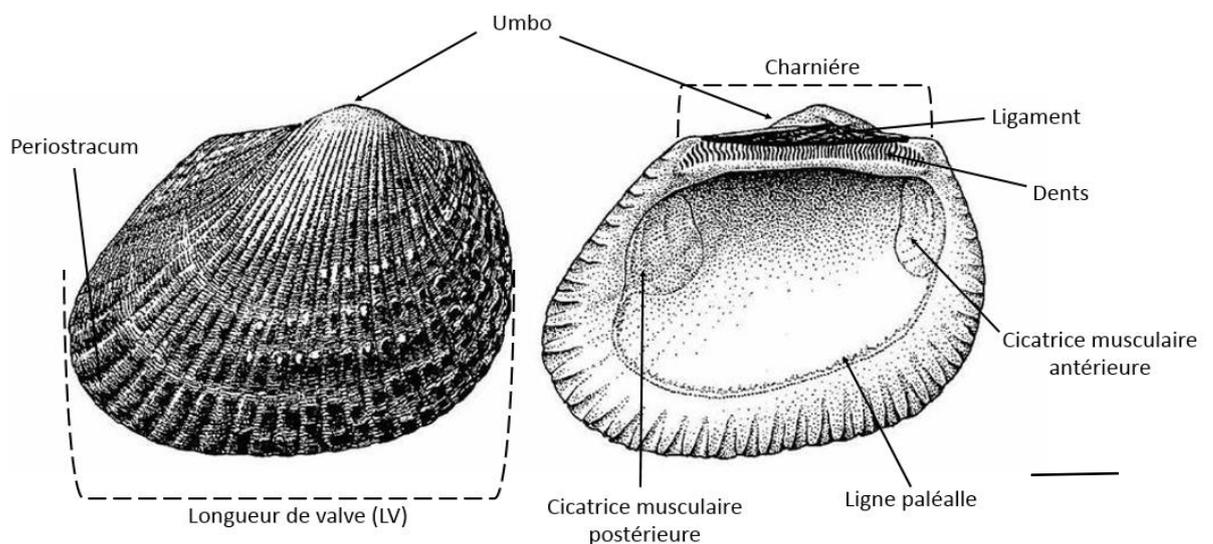


Figure 3: Aspects morphologiques des valves d'un individu adulte d'*Anadara tuberculosa*. Echelle 1cm. (Modifié de Fischer *et al.*, 1995).

Cette espèce sans dimorphisme sexuel est dioïque bien que quelques rares individus apparaissent comme hermaphrodites simultanés (Poma C., 1981). La maturité sexuelle peut être atteinte dès 23 mm de longueur de valve bien que les études de physiologie reproductive indiquent que 50% des animaux sont matures à partir de 45 mm (Borda et Cruz 2004). Comme beaucoup de bivalves tropicaux, il est possible de rencontrer des animaux matures toute l'année bien qu'il existe une époque principale de reproduction située entre novembre et mars dans l'hémisphère sud (Mendoza *et al.*, 2007).

La pêche de l'AN s'effectue à marée basse et consiste à extraire manuellement les individus de *A. tuberculosa* et *A. similis* qui se partagent le même biotope, et qui sont souvent commercialisés ensemble bien que cette dernière, *A. similis* soit de moindre valeur commerciale. L'AN est généralement commercialisée dès son extraction, vivante car capable de survivre jusqu'à 2 semaines hors de l'eau. D'ailleurs, une grande partie des plats typiques l'utilisent crue ou peu cuite et sa consommation présente donc un risque de santé publique (Callejas *et al.*, 2015) comme l'indiquent certaines études de vigilance microbiologique (USAID., 2009).

Menaces anthropiques

L'USAID, (2012) estime que plus de 2 000 familles (10 000-15 000 personnes) vivent de l'extraction et du commerce de ce bivalve qui représente une activité primordiale de pêche de subsistance pour les communautés pauvres associées à la mangrove. L'unité de vente de ce bivalve est la centaine d'individus, et son prix est dépendant de la taille des animaux extraits. Celui-ci oscille entre 9.5 et 12.3 euros à Tumbes (Pérou), et entre 9 à 18 USD en Colombie et Equateur, pouvant se négocier à plus du double au fur et à mesure que la vente s'éloigne des sites d'extractions.

Comme pour la majorité des bivalves, les activités anthropiques telles que la sur-extraction, la destruction de l'habitat et la contamination des écosystèmes de mangroves ont entraîné le déclin des populations naturelles. En Amérique du Sud (Colombie, Equateur, Pérou), certaines populations d'*A. tuberculosa* sont sur le point de s'effondrer (IMARPE *et al.*, 2007, Mora *et al.*, 2011, Lucero *et al.*, 2012a).

Des trois pays sud-américains possédant des côtes tropicales donnant sur le Pacifique, le Pérou est celui qui possède - et de loin - la plus petite surface de mangroves (10 500 hectares) contre 160 000 hectares en Equateur et 348 650 hectares en Colombie (Aizpuru *et al.*, 2000). La pression exercée sur l'AN y est par conséquent importante. Il est intéressant de signaler que 2972 hectares de cette mangrove appartiennent à la Réserve de Biosphère du Nordeste Amotapes-Manglares (RBNAM), reconnue par l'UNESCO en 2006 (Unesco 2017) et que les populations de bivalves de cette réserve sont exploitées uniquement par des communautés qui ont conservé un droit d'accès ancestral à ces ressources. On estime que dans son ensemble, les populations de *A. tuberculosa* de la région de Tumbes ont été réduites de 73,2% entre 1996 et 2007 (IMARPE *et al.*, 2007; Vivar *et al.*, 1996) bien que leur extraction soit régie par une taille minimum de pêche (≥ 4.5 cm) (RM.N°209-2001 PE) et par une interdiction de pêche durant la période de reproduction (15 février au 31 mars) (RM.N°014-2006-PRODUCE). Bien que la densité par m^2 soit stable depuis quelques années, la taille moyenne des individus ne cesse de diminuer, ce qui est un signe clair de surexploitation (Figure 4A et 4B). Un autre indicateur important, préoccupant pour l'écosystème et les populations, est la quantité d'AN collectée par marée et par extracteur, qui oscillait entre 200 à 300 individus il y a 30 ans et qui ne dépasse plus les 150 individus actuellement (IMARPE, 2019).

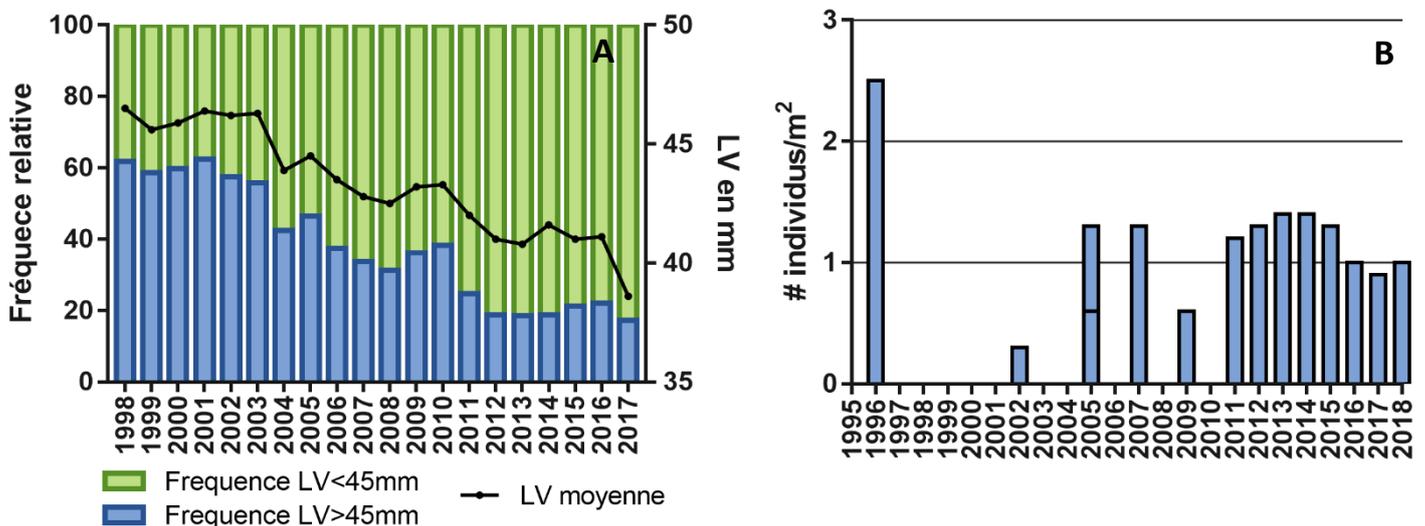


Figure 4: A) Evolution des fréquences de tailles d'*Anadara tuberculosa* au Pérou, B) Evolution des densités d'*Anadara tuberculosa* au Pérou (modifié de IMARPE 2019). LV : Longueur de valve.

La taille restreinte des mangroves du Pérou ainsi que la limite de taille d'extraction autorisée impliquent que l'écosystème mangrove de Tumbes ne peut satisfaire la demande nationale et

près de 95% des AN vendues sont extraites en Colombie et en Equateur et commercialisées illégalement au Pérou. Face à la dramatique situation de surexploitation dont souffre l'AN, l'institut des pêches (IMARPE) a même recommandé l'interdiction complète de l'extraction de ce bivalve (PRODUCE 2014). Recommandation qui ne fut pas appliquée.

Les possibles impacts socio-économiques/écologiques de la disparition de cet animal emblématique obligent à imaginer des solutions afin de prévenir l'effondrement des populations Sud-Américaines, en particulier au Pérou où la situation est la plus précaire.

Différentes stratégies sont disponibles en gestion des pêches :

- quotas, restrictions de tailles ou de temps de pêche, (Morgan G.R, 1997 ; Van Wynsberge *et al.*, 2013, FAO, 2018)
- restauration de l'habitat, (McCay *et al.*, 2003)
- déplacement de reproducteurs afin de faciliter les fécondations des populations ayant perdu en densité, (Arnold SW 2001 ; Doall *et al.*, 2008)
- repeuplement basé sur la production massive de larves produites en écloserie puis réintroduites dans le milieu naturel ou utilisées pour des opérations d'aquaculture (Gaffney *et al.*, 2006 ; Arnold SW 2008 ; Lallias *et al.*, 2010).

Cette dernière solution est apparue comme la plus logique et réaliste. En effet, cette stratégie est particulièrement attrayante pour les espèces aquatiques, notamment les mollusques, compte tenu de leur fécondité extrêmement élevée et de la possibilité de produire en écloserie des millions de naissains à partir d'un stock de géniteurs sauvages numériquement limité. Ces approches suscitent toutefois des questionnements légitimes à propos de :

- la nécessité de préserver la diversité génétique des populations naturelles qui pourrait être rapidement affectée par l'introduction massive d'animaux produits par un nombre limité de géniteurs,
- la potentielle et réelle capacité d'adaptation des animaux réintroduits à s'acclimater et survivre dans leur nouveau milieu, en particulier face à des stress abiotiques,
- les maladies infectieuses qui pourraient être transmises verticalement ou horizontalement aux naissains, qui pourraient donc mourir durant l'élevage ou infecter à

leur tour les populations naturelles, ce qui pourrait décourager les efforts des communautés,

- les connaissances zootechniques actuelles peut-être insuffisantes pour produire des naissains en quantité élevée.

Objectifs généraux

L'objectif de cette thèse consistait à implanter cette stratégie ainsi que des outils susceptibles de répondre à ces problématiques et ainsi permettre une production de naissains respectueuse de l'environnement.

Dans un premier chapitre, nous détaillerons les résultats d'analyses de la structure génétique présente dans les principales zones d'extraction d'AN d'Amérique du Sud et leur application pour la conservation de cette espèce à échelle Pérou/Equateur/Colombie.

Le second chapitre présente l'évaluation de la capacité d'adaptation de *A. tuberculosa* aux changements de salinité (par exemple lors de « el Niño ») et explore les mécanismes de sa réponse osmotique.

Le dernier chapitre repose sur le développement d'un modèle de production de naissains certifiés libres de pathogènes spécifiques (SPF), à partir de reproducteurs caractérisés destinés à des opérations de repeuplement dans la Réserve de biosphère du Nordeste Amotapes-Manglares (RBNAM).

Chacun de ces chapitres correspond à une publication.

Etat de l'art

Sociétés humaines, pêcheries et aquaculture

Les sociétés humaines sont confrontées aux défis d'alimenter et de fournir des moyens de subsistance à une population qui surpassera les 9 milliards d'habitants d'ici 2050, tout en faisant face aux impacts grandissants des productions alimentaires sur les ressources, du changement climatique et de la dégradation de l'environnement (FAO, 2012).

La base actuelle de l'alimentation humaine repose largement sur l'agriculture, bien que la part des protéines animales augmente avec le niveau de vie, de 12.5% pour les pays en voie de développement à 28% pour les pays industrialisés (FAO 2016). Les protéines dérivées de poissons, crustacés et mollusques représentent entre 13,8% et 16,5% de l'apport en protéines animales de la population humaine, la consommation moyenne par habitant étant passée d'environ 9 kg/an au début des années 60 à 20.4 kg en 2016. La consommation de poisson par habitant a donc plus que doublé en moins de 60 ans, à un rythme moyen de 3,6% alors que la population mondiale s'est accrue de 1,8% par an (FAO 2018).

Les productions de ressources hydrobiologiques ont, quant à elles, atteint un record sans précédent de 171 millions de tonnes en 2016, grâce à des niveaux de pêche (capture) relativement stables, mais surtout à une croissance continue de l'aquaculture (Figure 5). En effet, avec un taux de croissance annuel de 5,8% entre 2001 et 2016, l'aquaculture continue de croître plus rapidement que les autres grands secteurs de la production alimentaire et fournit actuellement plus de la moitié du poisson destiné à la consommation humaine. Par ailleurs une croissance à deux chiffres est toujours enregistrée dans certains pays, notamment en Afrique et en Asie. En 2017, la valeur des exportations mondiales d'origine aquacole s'élevait à 152 milliards USD, dont 54% proviennent de pays en développement (FAO 2018).

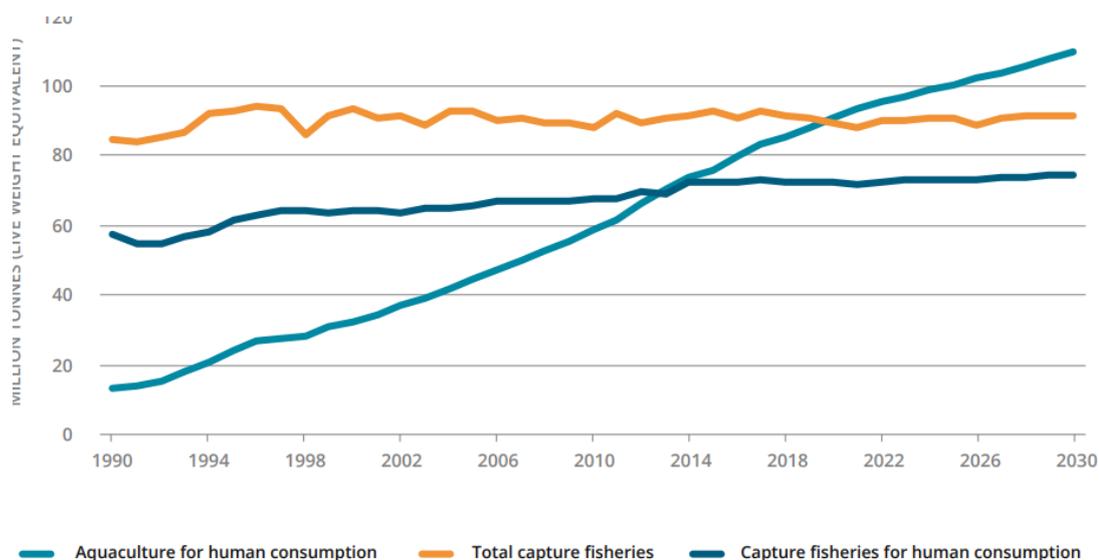


Figure 5: Évolution mondiale des productions des pêches de captures et de l’aquaculture 1990-2030 (FAO 2018).

La pêche, mais surtout l’aquaculture apparaissent donc comme deux éléments importants pour l’économie mondiale et dans la stratégie mondiale de lutte contre la faim et la pauvreté promotionnée par la FAO.

Place des bivalves dans les pêcheries et productions aquacoles

L’activité de pêche de bivalves a cessé d’augmenter dès les années 90 (FAO, 2012) et ne représente plus qu’un faible pourcentage (environ 2%) des débarquements mondiaux. Il semblerait que la plupart des zones de pêche du monde aient atteint leur potentiel maximum, la majorité des stocks étant maintenant pleinement exploités (FAO, 2018). Cependant, le prix unitaire des bivalves est généralement élevé par rapport aux catégories combinées de poissons, crustacés et autres mollusques, ce qui appelle à des approches efficaces de conservation et de gestion des populations sauvages.

Au contraire des pêcheries, depuis 1990 la production aquacole a augmenté de 10% par an et a plus que triplé en 2012 (FAO 2012). En 2016, Les élevages de mollusques ou conchyliculture ont généré 21.3% (17,1 millions de tonnes) de la production aquacole mondiale, ce qui place cette catégorie après les poissons (54,1 millions de tonnes) et avant les crustacés (7,9 millions de tonnes) et autres animaux aquatiques (0,9 millions de tonnes) (FAO 2018).

La totalité de la production aquacole de mollusques est représentée par 5 groupes principaux : les palourdes (palourdes, coques, arches, praires), les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et les ormeaux. La production de palourdes en 2011 était de 4,929 millions de tonnes ; suivie par les huîtres avec 4,519 millions de tonnes ; les moules avec 1,802 million de tonnes ; les coquilles Saint-Jacques avec 1,52 million de tonnes ; et enfin les ormeaux avec une production aquacole de 395 000 tonnes (FAO, 2013).

Place des arches dans les pêcheries et productions aquacoles

Les 5 principales espèces de mollusques produites en aquaculture (production supérieure à 250 000 tonnes), correspondent à 5 bivalves, 3 étant des « palourdes » ; *Ruditapes philippinarum* ou palourde japonaise, *Sinonovacula constricta* ou palourde chinoise ; et *Anadara granosa* (*Tegillarca granosa*) dite « arche de sang ». Les deux autres étant l'huître *Crassostrea gigas* et la moule chilienne *Mytilus chilensis*. (FAO 2013).

La dénomination « arche » correspond au nom vernaculaire générique donné à environ 200 espèces de bivalves regroupées dans la famille des Arcidae, le terme arche faisant référence à la longueur importante de la charnière vs. la longueur de la coquille au niveau de l'umbo, rappelant ainsi un « pont de bateau » (Figure 3). Les espèces appartenant à cette famille sont distribuées dans les mers tropicales et tempérées peu profondes du monde entier et présentent des tailles et des formes variées (Oliver et Holmes 2006 ; Fisher *et al.*, 1995). À la différence de la majorité des invertébrés, les arches se distinguent par la présence d'hémoglobine dans leurs hémocytes et tissus, ce qui leur procure cette coloration rouge à noire donnant lieu à la dénomination d'arche de sang (blood cockle) (Gosling E., 2015).

Depuis la nuit des temps, certaines populations humaines modernes et primitives (Néandertal) ont intégré les bivalves comme aliment de base tandis que les coquilles vides étaient utilisées comme outils ou comme ornements (Smaal et al, 2018). Parmi les premières preuves permettant de démontrer la cognition et le symbolisme humains se retrouvent des artefacts ou des représentations rupestres élaborées à partir de coquillages. La preuve la plus ancienne de la collecte intentionnelle de bivalves par l'homme se trouve à Terra Amata, en France aux alentours de 380 000 ans Avant Jésus Christ (Av-JC) tandis qu'il y a 82 000 ans, des perles de coquillage

décorées d'ocre rouge étaient laissées dans des cavernes occupées par l'homme en Afrique du Nord (Butler *et al.*, 2019). Ces datations précises sont possibles grâce au carbonate de calcium qui compose à 95% la coquille des bivalves et qui permet des mesures d'isotopes d'oxygène et de carbone) (Gosling E., 2015 ; Butler *et al.*, 2019). En ce qui concerne le genre *Anadara*, de nombreuses preuves de leur consommation ont été rapportées sous la forme de monticules à coquillages en Afrique occidentale (*Anadara senilis*, 1500 ans Av-JC) (Azzoug *et al.*, 2012), en Asie du Sud-Est (*Anadara granosa*, 400-500 ans Av-JC) (Broom, 1985 ; Morrison et al 2015), Pérou et Equateur (*Anadara tuberculosa*, *Anadara grandis*, de 2 à 6000 ans Av-JC), (Reid D.A., 2007; Staller J.E., 2013).

De nos jours, les bivalves du genre *Anadara* font l'objet d'une exploitation commerciale intensive principalement en Asie : *A. granosa* (Malaisie, Chine, Thaïlande), *A. subcrenata* au Japon, *A. broughtoni* en Corée, *A. nodifera* Thaïlande, *A. satowi* (Chine et Corée) et *A. antiquata* (Philippines) (Broom 2003).

L'épuisement des stocks naturels des espèces d'*Anadara* a conduit à l'essor d'études visant à développer leur élevage et leur reproduction, dans diverses régions du monde. Actuellement, *Anadara granosa* est le troisième bivalve le plus produit au monde. La production aquacole de cette espèce dépasse 450 000 tonnes en Asie du sud-est, environ 10 fois plus que l'activité de capture. La principale région de production est Sengalor en Malaisie, avec plus de 10 000 ha de culture (Harith *et al.*, 2015). Dans la zone asiatique, l'aquaculture se base principalement sur la capture de naissains sauvages sur des supports (télécaptation) qui sont ensuite réensemencés dans des zones réservées à l'élevage (FAO 2016, FAO 2012, Broom M.J., 1985). Récemment, les élevages de *A. granosa* ont souffert d'importantes mortalités qui furent associées à différents facteurs défavorables (faibles salinités, contaminations des sols, surpopulations) (Yurimoto *et al.*, 2014), tandis que les élevages de *A. (Scapharca) broughtonii* en Chine subirent de lourdes pertes dues à un malacoherpesvirus (OsHV1) qui affectait les éclosiers et les fermes (Bai *et al.*, 2016).

En dépit de l'importance économique de ces bivalves, relativement peu d'études (285), (NCBI, 2019) ont été consacrées au genre *Anadara* (Figure 6). La plus grande partie des travaux disponibles s'est appliquée à analyser l'innocuité de ces bivalves (59), caractériser leurs hémoglobines (48), décrire leur écologie (30), et évaluer leur physiologie (29). Avant les travaux

réalisés dans cette thèse, 16 publications traitaient de leurs maladies (virales 7, bactériennes 2, et autres parasites 7), 12 de génétique des populations et 4 de production aquacole. Finalement, des 285 publications disponibles, seulement 12 s'attachaient à l'AN, *Anadara tuberculosa*.

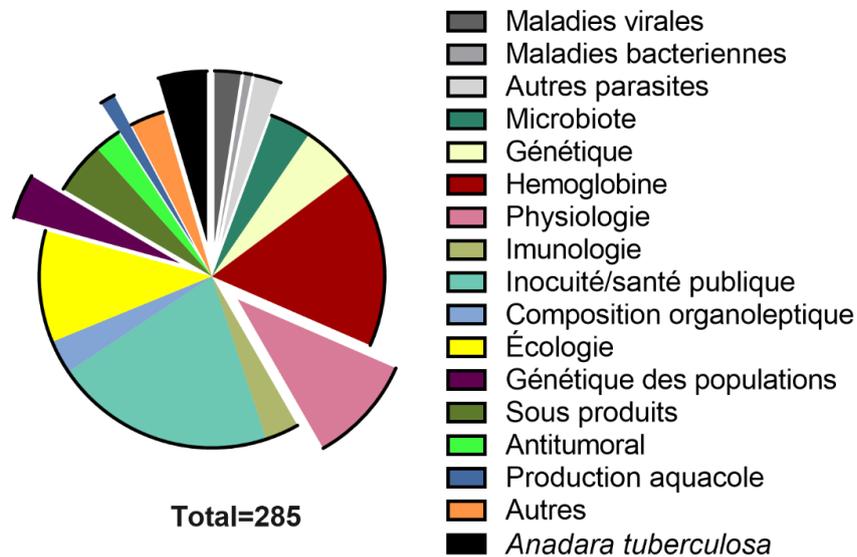


Figure 6: Représentation du nombre d'études portant sur le genre *Anadara* disponibles dans PubMed.

Place de *A. tuberculosa* en Amérique latine et au Pérou

On recense 4 espèces d'*Anadara* le long des côtes tropicales et subtropicales Ouest du continent Américain ; *Anadara multicostata*, *Anadara similis*, *Anadara grandis*, et *Anadara tuberculosa*, réparties entre la Californie et le nord du Pérou (Basqueiro *et al.*, 1982), *A. tuberculosa* pouvant être considérée comme la plus importante économiquement.

Les principales publications indexées relatives à l'arche noire *A. tuberculosa* portent essentiellement sur des études d'innocuité et de santé publique (Fernandez et Brunker, 1977 ; Mata *et al.*, 1990 ; Wong *et al.*, 1997 ; Herrero *et al.*, 1999 ; Enrique Barraza *et al.*, 2004 ; Jaramarini *et al.*, 2013), d'évaluation des stocks (Silva Benavides *et al.*, 2001 ; Lucero *et al.*, 2012b), sur la croissance (Flores LA, 2011 ; Flores *et al.*, 2014), plus récemment sur son microbiote (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2016), et son utilisation en écotoxicologie (Aguirre-Rubí *et al.*, 2019). (NCBI, 2019).

Plusieurs publications, souvent des rapports techniques et des communications à congrès sont également disponibles, notamment des études d'évaluations de stocks qui font état des déclin de populations (Alemán *et al.*, 2017, Mora *et al.*, 2011), des travaux portant sur l'écologie et la

biologie reproductive de l'espèce (García-Domínguez *et al.*, 2008, Borda et Cruz 2004, IMARPE 2019), le microbiote (Pretell K.M 2016 ; Zapata K.Y. 2017) et des recherches relatives à des tentatives d'élevages, notamment le grossissement dans les mangroves à partir d'animaux sauvages et la production de naissains.

Production aquacole de naissains

Cycle et phases de croissance

Les premières expériences de production scientifiquement suivie de naissains d'*A. tuberculosa* en laboratoire ont été réalisées au Mexique (Mazón- Suàstegui *et al.*, 2008). Cette étude permet de décrire pour la première fois le cycle larvaire de l'AN, qui ne présente d'ailleurs pas de différences avec celui de la majorité des bivalves (Figure 7). Ce cycle se compose d'une phase larvaire planctonique (activité natatoire dans la colonne d'eau) d'une durée de 15 à 20 jours, puis d'une phase benthique (fixation sur un support) où la larve adopte petit à petit un comportement similaire à celui de l'adulte (phase de naissain). Durant la phase planctonique, l'ovule fécondé se divisera pendant 6 heures jusqu'à former une larve trocophore simple, motile, dotée d'un cil. À 18h, cet amas cellulaire est devenu une larve trocophore d'environ 50-60µm qui est attirée par la lumière (phototropisme positif) (Gosling E., 2015). Durant les 24h suivantes, la glande sécrétoire produira une coquille en forme de D, qui donnera lieu à la larve véligère ou larve D. Maintenant fonctionnelle et capable de s'alimenter de microalgues grâce à son velum cilié qui lui sert d'organe natatoire et alimentaire, la larve grandira en fonction de la température de l'eau et de la disponibilité en aliment. Après 5-6 jours un umbo se forme progressivement donnant lieu à la larve umbonale. Ce stade précède celui de larve oeillée qui est caractérisé par l'apparition d'une tache ocellaire noire (œil) visible par transparence. Quand la larve atteint 150-180µm, le velum se résorbe et se transforme en un pied cilié propre à la larve pédivéligère. La larve d'AN qui mesure maintenant environ 250 µm et montre un géotropisme positif (recherche du fond) alternera un comportement de nage et de reptation jusqu'à ce qu'elle rencontre un substrat à sa convenance où elle choisira de se fixer (Hadfield M.G., 2011). S'ensuivent des changements physiologiques profonds (métamorphose) où la larve métamorphosée (300µm) devient complètement benthonique. Quand elle mesure environ 1 mm, elle est nommée « naissain » (Sahuquet M., 2013, Helm et Bourne 2004).

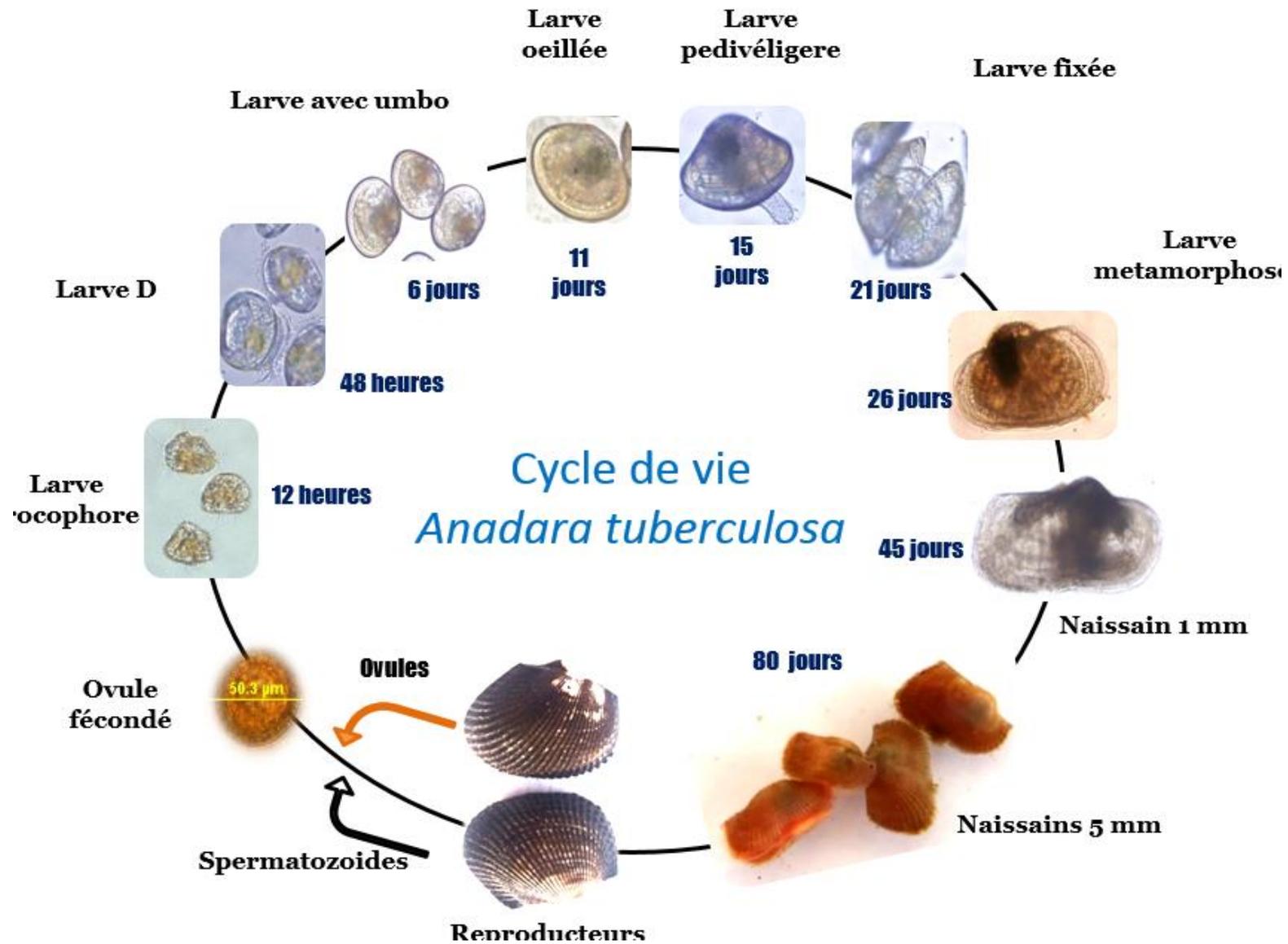


Figure 7: Cycle de vie d'*Anadara tuberculosa* produite en éclosérie.

Croissance des coquillages

Sur ces aspects aquacoles, une équipe colombienne a évalué à l'aide d'une modélisation mathématique que l'AN croissait d'environ 1,4 mm/mois en milieu naturel (Borda et Cruz, 2004). En Équateur Masache & Cobeña (2008) relèvent une croissance de 3,4 mm/mois à partir de juvéniles gardés dans des enclos, dans la province d'El Oro. Flores (2017) a obtenu un taux de croissance de 0,7 à 1 mm/mois à partir d'individus juvéniles et adultes maintenus dans des paniers. Une troisième étude signale une croissance de 2,5 mm/mois pendant 8 mois et un grossissement de 2,5 à 4,5 cm dans des enclos à partir de juvéniles sur l'île de Payana (Hualtaco) El Oro (Quizhpe *et al.*, 2017). Au Salvador, l'Equipe de CENDEPESCA *et al.*, (2009) a effectué plusieurs essais de grossissements à partir de naissains produits en laboratoire. Leurs résultats indiquent des taux de croissance variables en fonction du site d'élevage, oscillant de 1,1 mm/mois à 2,7 mm/mois, avec des survies allant jusqu'à 70%. Cette équipe signale également des mortalités dans certains sites d'élevages qui furent associées à la diminution de la salinité pendant la saison des pluies. Au Guatemala, Reyes D. (2015) rapporta les plus fortes croissances décrites chez cette espèce, de 3,8 à 4,75 mm/mois chez des individus de 22 mm maintenus dans des enclos à différentes densités par m². Au Pérou, Mendoza *et al.* (2015) firent état de la croissance de naissains cultivés à différentes densités dans des enclos de la baie de Puerto Pizarro pendant un an. Selon leurs observations, les individus ont montré une augmentation de taille de 0,94 mm/mois pour les 5 premiers mois et de 1,4 mm/mois pour les 7 mois restants, avec une survie supérieure à 50%.

Les premières productions de naissains de *Anadara tuberculosa* furent obtenues par l'équipe Mazón- Suàstegui *et al.*, (2008). Ils purent produire environ 15 millions de larves D à partir de reproducteurs sauvages matures, ce qui permit aux auteurs d'obtenir 300 000 naissains de 2-4 mm (taux de survie de 2%).

Un second projet au Salvador fait état de pontes et de productions de naissains à partir de géniteurs sauvages maintenus dans des cages en suspension dans des estuaires profonds sans contrôle particulier en termes de nourriture ou de température. Les résultats n'indiquent ni les taux de survie au niveau de la culture larvaire, ni les quantités

produites en routine (CENDEPESCA *et al.*, 2009).

Néanmoins, en Amérique du Sud, plusieurs universités du Pérou, d'Équateur et de Colombie ont tenté de reproduire *Anadara tuberculosa* avec une efficacité compatible avec une production aquacole (Mendoza et Peralta 2005 et 2008, Retamales *et al.*, 2014) sans succès.

Ecosystème de mangrove du Pacifique Est

Le terme "mangrove" provient probablement, d'après le dictionnaire Merriam-Webster (2019), d'une anglicisation - par adjonction du suffixe *-grove* (bocage) - de l'espagnol « mangle » ou du portugais « mangue » issus eux-mêmes du Taïno, une langue caraïbe.

Les mangroves, c'est-à-dire tout genre d'arbres ou d'arbustes tropicaux de type maritime qui produisent de nombreuses racines et colonisent en masses denses leur habitat, représentent des biomes tropicaux et subtropicaux formant des habitats amphibies (ayant des caractéristiques aquatiques et terrestres) situés dans la zone intertidale (entre marée haute et marée basse) des côtes protégées ou peu exposées comme les golfes, baies, criques, marais, estuaires ou embouchures de rivières. Elles se caractérisent par la présence d'arbres appelés palétuviers qui regroupent 20 genres et près de 54 espèces. Les palétuviers colonisent uniquement les fonds meubles (vase, sable, limon, argile, ou des mélanges) qui reçoivent périodiquement de l'eau douce sous forme de pluies abondantes ou à travers les embouchures de rivières... (Hogart PJ, 1999 ; Spalding *et al.*, 2010).

Les forêts de palétuviers se retrouvent actuellement dans 123 pays bien que près des 2/3 de leur surface se concentrent dans seulement 12 pays. Les plus grandes zones d'écosystèmes de mangroves se rencontrent sur les côtes du nord-est de l'Inde à l'Asie du Nord en passant par l'Asie du Sud-Est (42%), puis sur les côtes plus humides d'Amérique du Nord/centrale (15%) et du Sud (11%), de l'Afrique occidentale et centrale (21%), et finalement en Océanie (12%) (Hamilton *et al.*, 2018). À l'échelle mondiale, elles

ne couvrent que 152 000 kilomètres carrés, soit moins de 1% de toutes les forêts tropicales du monde, ce qui en fait un type d'habitat rare. C'est pour cette raison que 88 des 669 réserves de biosphère mondiales sont des écosystèmes de mangroves (13% du réseau mondial) (UNESCO, 2019).

Les palétuviers ont en commun la propriété de tolérer des conditions extrêmes de salinité (halophytes) allant de 0 à 70 ppt de sels (la salinité de l'eau de mer est d'environ 32 ppt), une illumination solaire intense, de faibles tensions en oxygène dans l'eau et le sol, des sols chargés en matières organiques en décomposition (où les bactéries anaérobies libèrent du N₂, du fer soluble, du phosphate inorganique, des sulfites et du méthane) pour lesquels ils ont développé des adaptations physiologiques ou anatomiques particulières (Srikanth *et al.*, 2015).



Figure 8: Photographie d'arbustes de *Rhizophora mangle* ou mangrove rouge de Tumbes, partiellement recouvert par la marée montante (Laura Sanjinez, IncaBiotec).

Les mangroves américaines n'abritent que 3 ou 4 espèces de palétuviers (Duke et Allen 2006), la principale étant le palétuvier rouge (palétuvier chandelle, « mangle rojo ») *Rhizophora mangle* (Figure 8). Cette espèce nécessite des temps d'inondations plus importants et une forte circulation d'eau par rapport aux autres palétuviers. *Rhizophora mangle* est une espèce pionnière qui s'enracine très bien dans les sols mous, dont les racines aériennes, dites « échasses », se voûtent au-dessus du niveau de l'eau stabilisant les sols et permettant ainsi la colonisation d'autres espèces. Les fourrés denses de *R. mangle* constituent un habitat de nidification et de chasse pour un large éventail d'organismes aquatiques et terrestres (Macintosh *et al.*, 2002).

De fait, les mangroves sud-américaines constituent l'un des écosystèmes les plus productifs de la planète et leur valeur économique varie entre 1 800 et 8 600 euros par hectare et par an (UNESCO 2019). Malheureusement, de nombreuses sociétés négligent ces avantages physiques (protection contre la montée des eaux, l'érosion, les tsunamis et typhons...) et écologiques (habitat d'une importante biodiversité exploitable, nurserie de nombreuses espèces côtières et hauturières, source de bois, de tourisme...). Actuellement l'USAID estime qu'entre 20 et 35% des mangroves dont il existe un suivi ont été détruites, presque exclusivement sous l'action de l'homme pour ses besoins en bois de chauffe, d'agrandissement des villages, et dans au moins un quart des cas pour l'implantation de fermes de crevettes (plus de 50% en Equateur et Pérou) (Hamilton S., 2013 ; Spalding *et al.*, 2010)

Spécificités géographiques de la zone d'étude

La zone géographique d'intérêt de cette étude comprend les côtes situées entre l'extrême nord du Pérou, Tumbes et Tumaco à l'extrême sud de la Colombie.

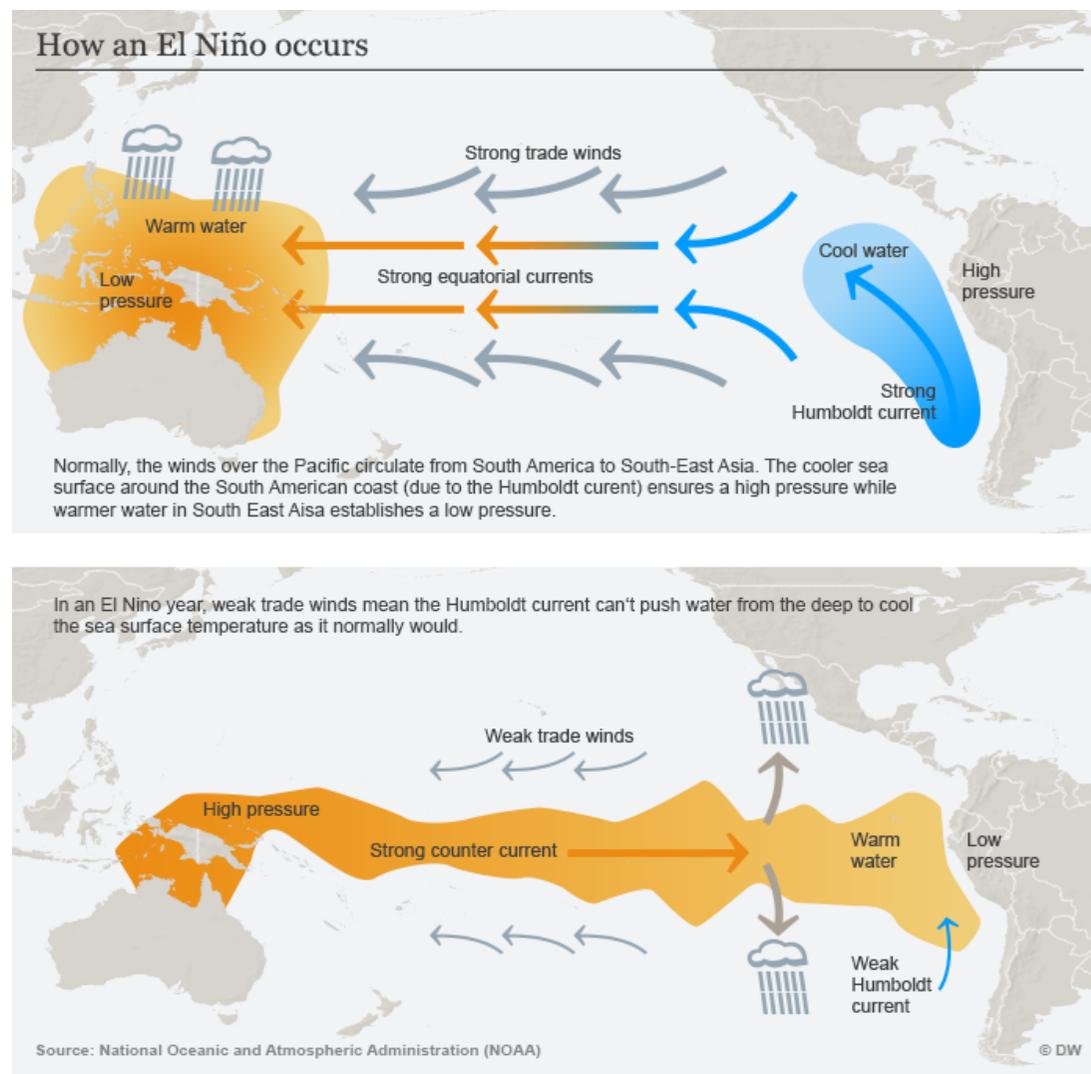
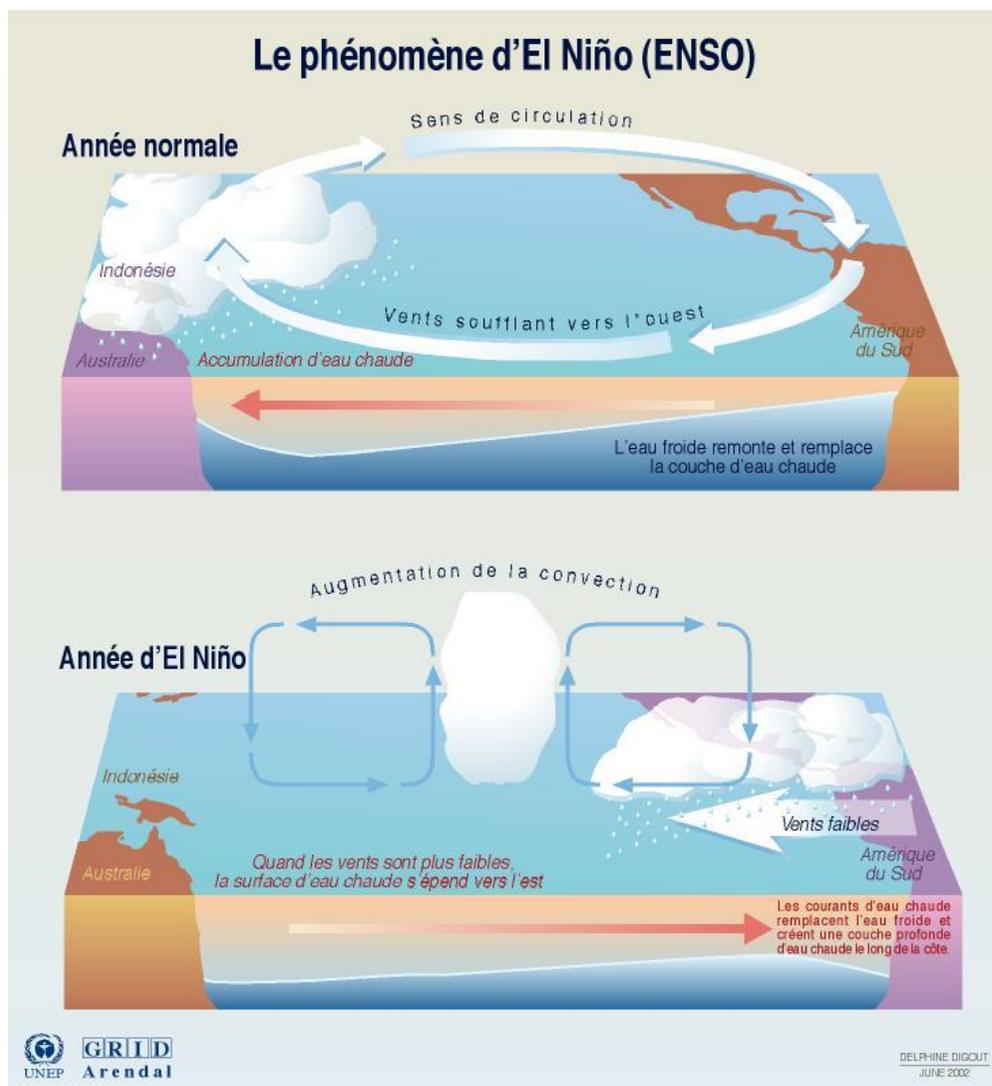
Le principal phénomène climatique qui affecte cette région correspond aux effets de "El Niño" qui se traduisent par des pluies diluviennes engendrant des inondations et autres catastrophes naturelles. "El Niño" doit son nom à une anomalie connue des pêcheurs du nord du Pérou qui associèrent l'augmentation périodique de la température des eaux de surfaces ainsi que la disparition des bancs de poissons à la période de Noël où l'on

célèbre la naissance de l'enfant « El Niño » Jésus (NOAA, 2019).

Ce phénomène climatique particulier, différent du climat usuel, est une conséquence régionale d'une perturbation dans la circulation atmosphérique générale entre les pôles et l'équateur appelée oscillation australe (Southern Oscillation) qui engendre des températures anormalement élevées de l'eau dans la partie Est de l'océan Pacifique Sud. Ces deux phénomènes sont maintenant réunis sous le nom de ENSO (El Niño-Southern Oscillation) (Philander. G., 1989) (Figure 9). Son apparition déplace les zones de précipitations vers l'Est dans l'océan Pacifique et modifie momentanément la circulation des courants marins le long de la côte de l'Amérique du Sud.

Les zones Sud Colombie et Nord Pérou sont influencées par 2 courants marins majeurs :

- le courant équatorial nord Pacifique qui se déplace d'est en ouest. Il est séparé de la circulation équatoriale par le contre-courant équatorial qui se dirige vers l'est. Le flux de surface vers l'ouest à l'équateur dans les deux océans fait partie du courant sud équatorial (Penven *et al.*, 2005).
- au sud, le courant de Humboldt, également appelé courant du Pérou est un courant océanique né de l'ascension vers la surface des eaux profondes et donc très froides sous l'action des alizés sur les côtes occidentales de l'Amérique du Sud. Ce phénomène océanographique est connu sous le nom d'*upwelling* (Oyarzún *et al.*, 2019).



Sources : Centre de Prédiction du Climat-NCEP; NOAA.

Figure 9: Schématisation de ENSO (El Niño Southern Oscillation). A) Schématisation de ENSO focalisée sur vents et précipitations. B) Schématisation de ENSO focalisée sur les courants marins et la température de l'eau. (Sources NOAA)

Dans un phénomène ENSO, les vents faibles ne favorisent pas la remontée du courant de Humbolt qui se fait recouvrir par les eaux chaudes du courant équatorial. Cette situation provoque le réchauffement de l’atmosphère dans la région et favorise l’apparition de nuages qui s’accumulent contre les Andes provoquant des pluies torrentielles persistantes (Bookhagen et Strecker, 2010).

Les phénomènes sont chroniques, et réapparaissent à intervalles irréguliers (tous les deux à sept ans). Ils peuvent durer de quelques mois à deux ans. Ces anomalies sont d’intensités variables, et les ENSO majeurs ont été décrits dans les années 1790–1893, 1828, 1876–1878, 1891, 1925–1926, 1972–1973, 1982–1983, 1997–1998 et 2014–2016 (figure 10). Durant ces périodes les précipitations peuvent atteindre plus de 250 cm d’eau sur quelques mois, ce qui se traduit par des inondations importantes, des sorties de rivières, des glissements de terrains... qui peuvent perturber les écosystèmes en place et provoquer des pertes humaines (Santoso *et al.*, 2017).

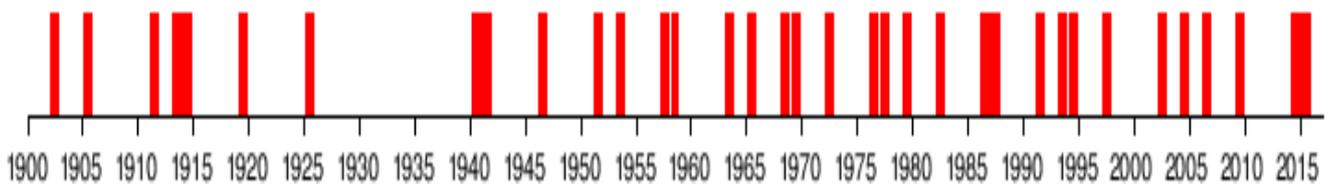


Figure 10: Chronologie des épisodes ENSO survenus entre 1900 à 2018 (source USCPC, 2019)

Problématique

Le déclin continu des populations Sud-Américaines de l'arche noire *Anadara tuberculosa* provoqué par les activités anthropiques telles que la sur-extraction, la destruction de l'habitat et la contamination des écosystèmes de mangroves menace la viabilité de cette espèce. Les autorités responsables des pêches dans ces pays n'ont actuellement pas les outils nécessaires pour élaborer des politiques de conservation et d'exploitation durables de cette espèce.

Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit dans le souhait de générer des informations et des stratégies qui permettront de prévenir la disparition de cette espèce emblématique des mangroves tout en maintenant leur écosystème et une activité économique durable pour les communautés d'extracteurs

La principale ligne de recherche proposée repose sur la production de naissains en conditions artificielles d'écloserie à des fins :

1. de repeuplement respectueux de l'environnement par ensemencement massif de naissains.
2. de production en considérant *A. tuberculosa* comme une espèce aquacole potentielle et comme modèle d'aquaculture sociale.

Pour atteindre cet objectif qui correspond à un processus de « domestication » de ce bivalve sauvage, il sera nécessaire d'appliquer de façon combinée des biotechnologies aquacoles et moléculaires afin de construire un modèle qui intégrera :

- la production de naissains d'*A. tuberculosa*, pouvant être distribués en quantité, qualité et opportunité acceptables,
- l'évaluation de la diversité génétique des populations présentes en Amérique du Sud afin d'établir des plans de repeuplement,
- la prévention de maladies qui peuvent réduire les croissances ou décimer les populations en écloserie, dans les élevages et dans le milieu naturel,

- des études d'écophysiologie afin de déterminer les paramètres optimums de grossissement, de survie et de reproduction,
- l'implémentation d'un *bio-agrobusiness* durable et rentable basé sur le développement de procédés apportant une valeur ajoutée au commerce de *A. tuberculosa* (dépuration des animaux, création d'une marque et d'une appellation d'origine contrôlé (AOC)),
- l'implémentation de politiques d'organisation du territoire (formation de concessions d'élevages, plans de gestion des mangroves...), organisation des communautés en associations (*empowerment*)...,
- la recherche de gènes biomarqueurs associés à des caractères d'intérêt (résistance, croissance...) qui permettront de débiter des programmes de sélection et d'amélioration génétique.

L'atteinte de ces objectifs nécessitera des approches pluridisciplinaires d'équipes complémentaires et demandera probablement plusieurs années avant d'arriver à un modèle de conservation et l'exploitation durable de cette ressource.

Résultats

Parmi tous les résultats obtenus durant cette thèse, 3 aspects incontournables de ces objectifs seront présentés et constituent chacun un chapitre de ce document. Chaque chapitre sera tout d'abord présenté en français et complétera les résultats obtenus et parus dans différents journaux sous forme de publications.

Le premier chapitre correspond à l'analyse de la structure génétique des populations d'arches noires provenant des principaux sites d'extraction du Pérou, d'Équateur et de Colombie. Il devra déterminer si ces populations sont génétiquement proches en se basant sur les variations observées sur le gène mitochondrial de la Cytochrome Oxydase I (COI) tout en tâchant d'expliquer les possibles raisons de ces différenciations et leurs implications pour la gestion de ces populations.

Le second chapitre devra contribuer à évaluer l'effet de différentes salinités sur la physiologie de l'arche noire afin de déterminer quels sont les paramètres optimums de ce facteur abiotique primordial pour le succès des opérations d'élevages et de repeuplement. La compréhension des phénomènes moléculaires régissant l'osmorégulation de l'AN sera exploré à l'aide d'outils de génomique et de protéomique.

Le dernier chapitre constituera la mise en place de la stratégie de production de naissains dans une éclosérie pilote basée au Pérou. L'application d'outils de biotechnologie moléculaire devra permettre l'obtention de naissains gnotobiotiques ou SPF (*Specific Pathogen-Free*), produits à partir de reproducteurs caractérisés génétiquement et provenant du Sanctuaire National des Mangroves de Tumbes.

Chapitre 1

Analyse de la structure et de la diversité génétique des populations d'*Anadara tuberculosa* provenant des principaux centres d'extraction d'Amérique du Sud.

Genetic structure, phylogeography, and demography of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia) from East Pacific as revealed by mtDNA: Implications to conservation

Benoit Diringer^{1,2}  | Krizia Pretell^{2,3}  | Ricardo Avellan⁴ | Cesar Chanta¹ | Virna Cedeño^{1,2,4} | Gabriele Gentile⁵ 

Résumé

Les populations sauvages de l'arche noire, *Anadara tuberculosa* (Bivalvia), une espèce emblématique des écosystèmes de mangrove du Pacifique Est ont décliné dans les pays d'Amérique du Sud (Colombie, Équateur et Pérou) en raison principalement de la surexploitation, et de la perte ou de la dégradation de leur habitat. La compréhension des aspects génétiques des variations géographiques et de la structure de la population de *A. tuberculosa*, actuellement inconnus, apparaît comme une priorité pour les autorités responsables des pêches afin d'élaborer des politiques de conservation intégrées et collaboratives pour les programmes de gestion des pêches, de l'aquaculture et de l'amélioration des stocks.

Nous avons utilisé les données de séquences d'ADNmt pour étudier la diversité des haplotypes, la structure génétique et la démographie d'*A. tuberculosa*. Les résultats indiquent une homogénéité génétique des populations réparties au nord et au sud de l'équateur, respectivement. Ainsi, une différenciation statistiquement a été constatée entre les populations du nord et du sud, avec des valeurs de ϕ_{ST} par paire comprises entre 0,036 et 0,092. Le système de courants océaniques agissant dans la région (Courant de Panama et Courant de Humboldt) pourrait jouer un rôle dans la limitation de la dispersion larvaire de l'espèce, laquelle est encore mal comprise. La reconstruction démographique indique une récente expansion de la population, éventuellement commencée après le dernier maximum glaciaire.

Nos résultats nous poussent à préconiser une gestion séparée et indépendante des populations au nord et au sud de l'équateur.

Le niveau de diversité génétique présent dans une population est fortement lié à sa capacité à s'adapter à de possibles changements environnementaux et donc à la viabilité à long terme de cette population. En effet, plus il y a de variations, plus il existe de probabilités que certains individus possèdent des combinaisons d'allèles susceptibles d'améliorer leur survie et qu'ils puissent transmettre cette combinaison favorable à leur progéniture. Cette variabilité génétique s'exprime donc par les fréquences relatives de ces différents allèles.

En biologie des populations, la variabilité et la diversité génétiques se façonnent par la sélection progressive des individus les plus adaptés, en évoluant de manière parallèle dans des « niches écologiques » proches ou éloignées.

L'objectif de ce premier chapitre visait à modéliser la structure génétique des principales populations de *Anadara tuberculosa* au niveau macro régional (Pérou, Equateur, Colombie) et tentait de comprendre les phénomènes géographiques et génétiques derrière ces possibles variations géographiques. Ces informations constitueraient un outil central pour que les autorités responsables des pêches puissent élaborer de manière concertée des politiques de conservation et de transfert pour les programmes de gestion des pêches, de l'aquaculture et de l'amélioration des stocks.

En effet, si au niveau écologique la stratégie de récupération de populations naturelles par ajout de naissain est attrayante, d'un point de vue génétique la situation est plus complexe et pourrait avoir des impacts négatifs majeurs allant jusqu'à altérer durablement la composition génétique des populations locales au point de compromettre leur viabilité à long terme.

Cette situation s'explique par au moins 2 raisons :

- les structures génétiques présentes dans une population sont le produit d'une adaptation locale à des conditions environnementales spécifiques, et
- ces variations génétiques sont adaptées pour répondre aux futurs changements de conditions auxquels ces populations sont susceptibles d'être soumises.

Dans ces deux cas, l'ajout massif de naissains produits par des reproducteurs porteurs

d'un bagage génétique inapproprié pourrait réduire la capacité de survie des populations à récupérer (*fitness*) en éliminant des variations génétiques précieuses, voire même en remplaçant complètement les génotypes sauvages adaptés par des génotypes exotiques non adaptés. En définitive, les modèles de variation génétique existant au sein d'une population et entre plusieurs d'entre elles n'ont de valeur de conservation que si elles contribuent au potentiel d'adaptation et de persistance à long terme du peuplement.

Pour débiter un projet de restauration durable de populations de mollusques il est donc nécessaire de considérer :

- l'évaluation de la structure génétique des populations afin de diriger le choix des géniteurs à utiliser, ce qui implique une étude génétique de la population à l'échelle de la répartition géographique de l'espèce,
- le maintien d'un maximum de variabilité génétique en réduisant la consanguinité des stocks d'écloserie,
- l'évaluation de l'impact potentiel sur la taille effective de la population sauvage après repeuplement (Gaffney PM., 2006).

Le défi à relever pour les généticiens de populations confrontés à l'évaluation du succès du programme de repeuplement consiste à trouver des outils moléculaires (techniques et marqueurs) utilisables sur un grand nombre d'animaux, à un prix accessible et qui soient capables de décrire avec suffisamment de détails la structure génétique des populations de l'écosystème récepteur afin de pouvoir ensuite distinguer les populations naturelles des populations introduites.

Au moment de cette étude, le séquençage et l'analyse des SNP (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) furent privilégié. Parmi les gènes candidats, le gène de la sous-unité I de la Cytochrome C Oxydase (COI) a été sélectionné pour 2 raisons :

- 1) il avait été utilisé avec succès pour caractériser la variabilité intraspécifique et interspécifique chez différents mollusques, en particulier chez plusieurs espèces d'arches d'Asie (Cho *et al.*, 2007; Chee

et al., 2007a; Feng *et al.*, 2011; Tanaka et Aranishi, 2013, 2014, 2016),

- 2) l'ADNmt est généralement d'hérédité maternelle chez les eucaryotes ce qui facilite son traçage (Lallias *et al.*, 2010) et pourrait donc se révéler intéressant pour le suivi de populations produites en éclosion.

Les travaux de cette étude ont considéré 5 populations réparties dans 3 pays. Les points d'échantillonnage furent choisis en fonction des recommandations de responsables de ministères de l'environnement ou des pêches de chaque pays avec comme critère principal la sélection des principaux sites d'extraction au niveau national. La proximité du laboratoire avec le site de Tumbes (SNLMT) explique la surreprésentation du nombre d'individus analysés dans cette population (111) par rapport à l'Equateur (81) et à Tumaco (50) en Colombie. Pour ce genre d'étude il est primordial de sélectionner uniquement les amplicons présentant des séquences d'excellentes qualités (pictogrammes sans artéfacts) afin de ne pas surestimer le nombre de SNP et par conséquent le nombre d'haplotypes par site qui est un indicateur important de variation génétique intra- et inter-populations (Figure 11).

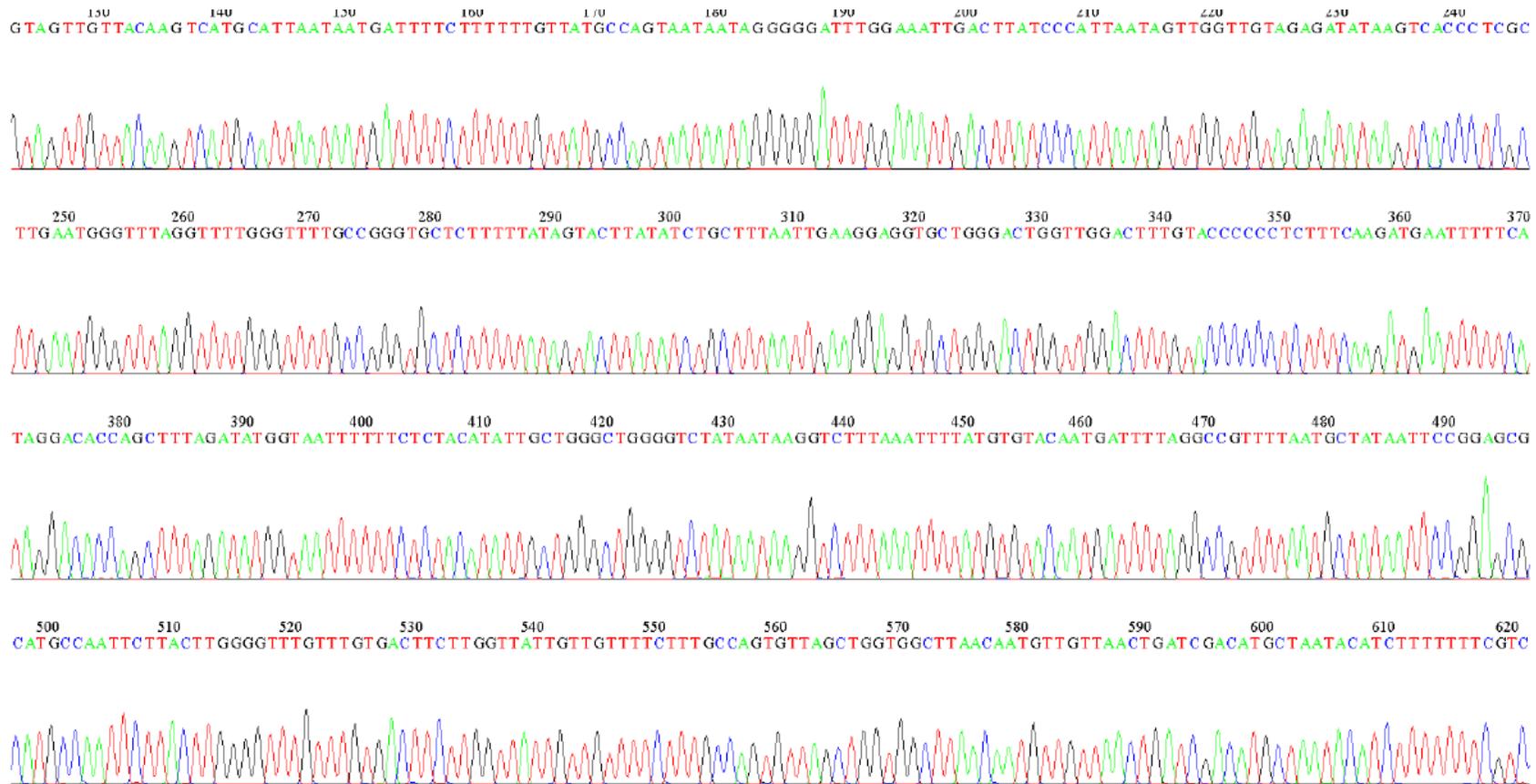


Figure 11: Pictogramme d'une séquence sans artéfact du gène COI de *Anadara tuberculosa*.

Afin de pouvoir comparer les sites entre eux, le nombre d'échantillons et d'haplotypes correspondants fut statistiquement harmonisé.

Ces données ont permis de mettre en exergue les sites d'extraction situés aux extrêmes Sud et Nord qui possèdent la plus grande diversité nucléotidique, d'haplotypes, et d'haplotypes privés (haplotypes détectés uniquement dans ce point d'échantillonnage). À partir de ces premières données, l'objectif a consisté par la suite à démontrer l'existence de différentes sous populations et le bien fondé de l'hypothèse suivante : ces différences sont liées à un isolement par la distance (IBD), autrement dit les différenciations génétiques locales rencontrées dans cette zone géographique sont attribuées à la variance de dispersion et à la migration.

Un premier test fut réalisé en estimant les indices de fixation intra- et inter-populations (FST et FSC) et leur variance (ϕ_{ST} et ϕ_{SC}) en comparant des combinaisons de rassemblements des populations par groupes de 2, 3 ou 4 populations. Cette analyse indique une différenciation significative entre les populations présentes dans les 3 sites situés au sud de l'équateur (Tumbes/El Oro/Guayas) avec les 2 sites échantillonnés au nord de l'équateur (Esmeraldas/Tumaco).

Le second test correspond à la confrontation individuelle de chacun des sites avec les autres en fonction de leurs indices de fixation FST et leurs variance ϕ_{ST} . Cette analyse comparative par paires montre que les populations d'AN de Tumaco et Esmeraldas étaient significativement différentes de celles des autres sites et statistiquement semblables entre elles.

La fiabilité de ces deux analyses qui concluent sur une différence entre les populations situées au nord et au sud de l'équateur a été démontrée par le test statistique de Mantel qui permet de tester la corrélation entre deux matrices.

Les relations phylogénétiques entre individus peuvent s'apprécier à travers les figures de réseaux d'haplotypes qui permettent d'identifier un haplotype central, le plus abondant mais aussi le seul à être présent dans toutes les populations étudiées de *A. tuberculosa*. Bien que la taille inégale des populations échantillonnées biaise légèrement le graphique en faveur de Tumbes (Pérou), l'harmonisation des données ne modifie pas

la topologie générale du réseau (Figure 12).

La connectivité incomplète de ces deux populations s'expliquerait de manière plausible d'une part par le cycle biologique de l'espèce et notamment la durée du cycle larvaire planctonique propice à la dissémination des larves d'AM, et - d'autre part - par les modèles de circulation des courants océaniques et côtiers dans l'est de l'océan Pacifique équatorial. Les modélisations d'océanographie physique reflètent une structure générale de circulation des courants « du sud vers le nord » relativement stable dans le temps avec une convergence des courants de Panama et d'Humbolt sous l'équateur. Néanmoins, l'irrégularité des côtes, en particulier dans le golfe de Guayas, et la présence intermittente de mouvements d'*upwelling* doivent accentuer les phénomènes de divergence par la distance.

Une fois déterminé qu'il existait 2 populations situées de part et d'autre de l'équateur, les analyses suivantes devaient répondre aux questions de savoir si ces populations s'associaient à des modèles de populations de taille constante (*Constant size population*). Autrement dit si ces populations avaient atteint la limite de charge de l'écosystème et donc ne s'étendaient plus, ou si elles se soumettaient au modèle de population croissante (*growing population*) qui s'adapte aux populations dont les taux de croissance sont positifs.

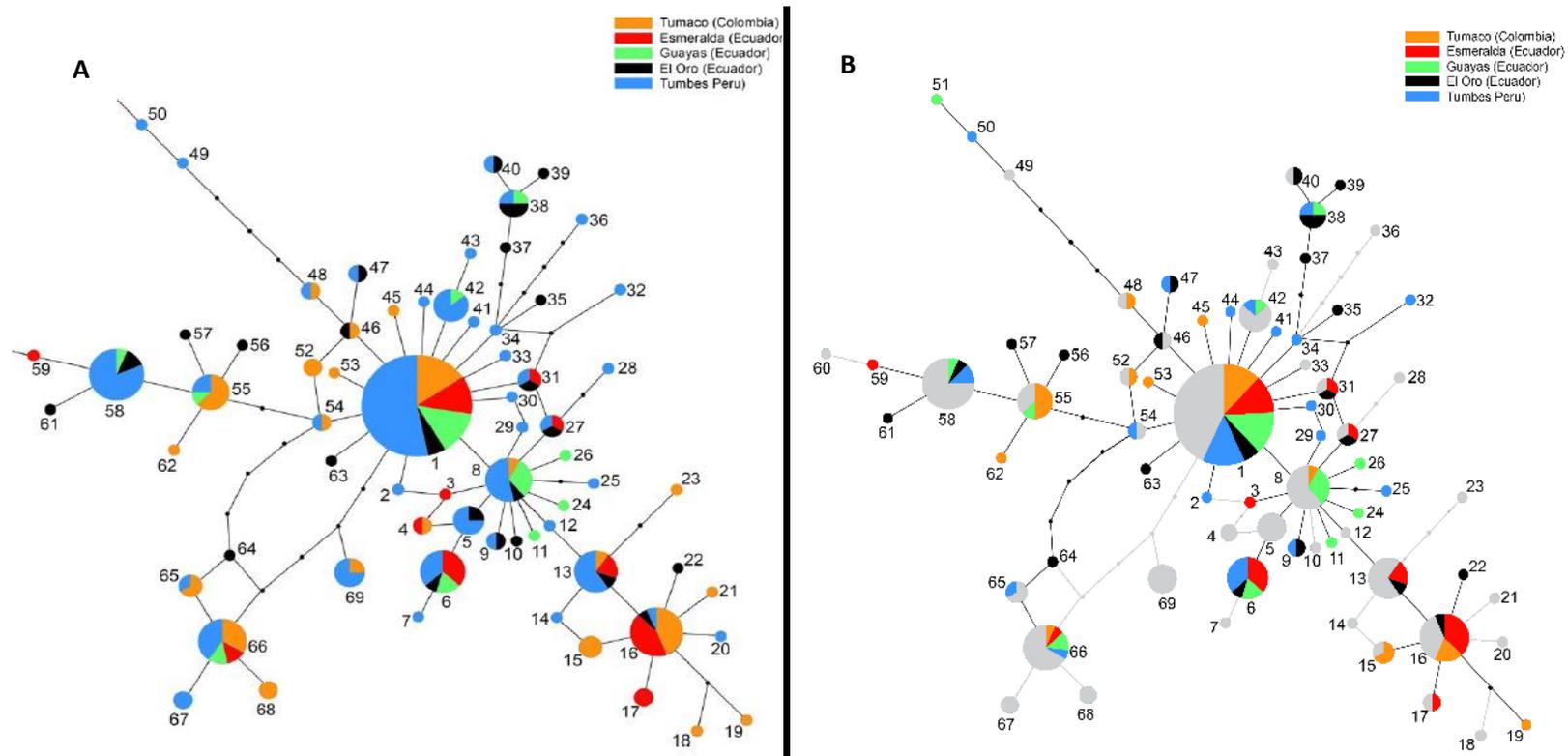


Figure 12 : Réseaux d'haplotypes illustrant les relations généalogiques entre les différents haplotypes d'*Anadara tuberculosa* des différents sites d'extraction en considérant A) l'échantillonnage original, B) l'échantillonnage après harmonisation de la taille de l'échantillon. La taille du cercle correspond à la fréquence de l'haplotype. Les diagrammes indiquent la proportion à laquelle chaque haplotype apparaît à chaque endroit. La couleur grise marque la réduction des haplotypes et des branches par rapport à A.

Il est important d'ajouter que les « histoires démographiques » des espèces reflètent une chronologie en milliers ou millions d'années qui est plutôt éloignée de la problématique de cette étude (baisse des populations d'*A. tuberculosis* par effets anthropiques sur les dernières décennies) mais reste pertinente d'un point de vue écologique.

La première approche est basée sur 3 tests statistiques en assumant la neutralité :

- la majorité des mutations dans les allèles sont neutres, autrement dit elles n'affectent pas la capacité de survie ou de reproduction d'un organisme comme c'est le cas des mutations silencieuses qui concernent un nucléotide en troisième position ou apparaissent dans des introns,
- le taux de mutation est constant dans le temps,
- la taille des populations est constante dans le temps et,
- l'état d'équilibre mutation-dérive est vérifié : le nombre d'allèles perdus par dérive génétique est égal au nombre d'allèles nouveaux produits par mutation.

Cette première approche révèle que les profils des deux populations sont davantage similaires à des profils attendus de populations dans un modèle d'expansion de la population que dans un modèle à taille constante.

Une seconde approche statistique devait permettre d'affiner le modèle démographique des populations d'AN ; population constante, croissance exponentielle et horizon bayésien – BSP (permet de déduire la taille de la population effective historique compte tenu de plusieurs génomes haploïdes sans recombinaison). Les tests de BSP et de facteur de Bayes ont permis d'identifier que la population appartenant au groupe Tumaco/Esmeraldas présente un modèle de croissance exponentielle alors que la population du groupe Tumbes/El Oro/Guayas s'apparente plus au modèle BSP.

Comme complément d'information, ces modèles permettent d'estimer les temps de divergence (*expansion dating*) en assumant 2 taux de mutations du COI (0.65% et 5.3% par million d'années) proposé par Crandall *et al.* (2012) pour les invertébrés marins et en couplant ces informations à l'histoire géologique de la zone. Il apparaît que le taux de mutation de COI chez *A. tuberculosis* oscille entre 5.0% et 2.13% par million d'années et que l'expansion de cette espèce aux alentours de l'équateur aurait débuté

« récemment », après les dernières glaciations, il y a 20 à 14 000 ans, en parallèle à l'extension des mangroves.

Au terme de cette étude, la structure génétique des populations d'*Anadara tuberculosa* des 5 principaux sites d'extraction d'Amérique du Sud avait été caractérisée. Les données collectées indiquent l'existence de 2 populations partiellement connectées situées de part et d'autre de l'équateur. En l'état actuel des connaissances, ces résultats impliquent que tout projet de conservation ou de repeuplement devra considérer ces différences phylogéographiques et suggèrent donc une gestion séparée et indépendante de ces populations.

Chapitre 2

**Évaluation de la réponse physiologique et moléculaire
d'*Anadara tuberculosa* soumise à différentes salinités.**

**Respuesta fisiológica y molecular de *Anadara tuberculosa*
(Arcoïda: Arcidae) al estrés de salinidad**

Oscar Mendoza¹, Krizia Pretell¹, Benoit Diringer^{2,4}, Ricardo Avellan³, Karina Zapata²,
Angelita Marchan¹, Virna Cedeño^{1,3}, Tessa Peralta¹, Alberto Ordinola¹ & Eric Mialhe^{2,3}

**Physiological and molecular response of *Anadara tuberculosa* (Arcoïda: Arcidae) to
salinity stress.**

Revista de Biología Tropical.2017;Vol65, N°3(2017) P1142-1151.

Résumé

L'arche noire *Anadara tuberculosa* est une espèce emblématique de l'écosystème mangrove dont les populations sont actuellement en situation vulnérable. Le développement de son aquaculture nécessite l'identification de biomarqueurs moléculaires, notamment associés au stress de salinité, dans la perspective du lancement de programmes d'amélioration génétique.

Des spécimens d'*Anadara tuberculosa* provenant de la mangrove adjacente à la baie de Puerto Pizarro (Tumbes, Pérou) ont été collectés entre janvier 2015 et février 2016. Ces individus ont été soumis à des conditions de stress hypo-osmotique extrême (5 et 10ppt), modéré (15 et 25ppt) et sans stress (groupe témoin : 33ppt) pendant 16 jours après avoir été séparés en groupes de dix animaux en triplicatas. La présence de biomarqueurs de stress de salinité a été évaluée au niveau génétique avec la détection par PCR de 19 gènes essentiels à l'osmorégulation chez les bivalves tels que les huîtres et les moules, et au niveau protéomique par séquençage de peptides exprimés dans les tissus d'animaux maintenus à différentes salinités, par spectrométrie de double masse. Aucun des marqueurs génétiques testés n'a pu être amplifié par PCR, ce qui suggère qu'*A. tuberculosa* présente des différences génétiques importantes par rapport aux mollusques « modèles » choisis.

L'analyse protéomique réalisée par MALDI TOF TOF au niveau du tissu branchial de *A. tuberculosa* a permis en revanche l'identification de 26 peptides exprimés de manière persistante ou différentielle aux différentes salinités évaluées, mettant en évidence des marqueurs possibles tels que HSP70 et une protéine de transport transmembranaire du chlorure liés à l'adaptation à la salinité. Ces séquences d'acides aminés permettront la conception d'amorces nucléotidiques spécifiques à *A. tuberculosa* pour la mise en œuvre de futures recherches en écophysiologie de cette importante espèce-ressource.

13 Les opérations de repeuplement et d'aquaculture de bivalves basées sur la production de naissains impliquent des transferts d'animaux, que ce soit de reproducteurs collectés des mangroves et envoyés vers les éclosiers, ou de juvéniles produits en éclosier puis transportés vers des structures d'élevages d'échelle supérieure ou des écosystèmes sauvages. Dans tous les cas, le succès de ces opérations dépend en grande partie des capacités d'adaptation des individus à l'écosystème récepteur.

La température, la salinité, le pH, et la concentration en oxygène dissous de l'eau sont considérés comme les principaux paramètres physico-chimiques affectant la physiologie des bivalves (Gosling E., 2015). Le maintien prolongé d'animaux dans des conditions abiotiques éloignées de leur optimum physiologique peut altérer leur équilibre métabolique provoquant différents troubles allant de l'immunodépression à la diminution de croissance et la mort.

Anadara tuberculosa peuple la zone intertidale et est obligatoirement associée à la présence de mangroves. Les palétuviers qui organisent cet écosystème se développent dans des eaux marines à saumâtres et dans des sols vaseux ou limono-argileux qui sont particulièrement riches en détritiques en décomposition. Ceci étant combiné à l'effet des marées, il apparaît donc que les AN sont exposées plusieurs fois par jour à de fortes variations de température, de salinité et de concentration en oxygène dissous, en particulier lors de la saison des pluies (El Niño).

Il semblerait, en théorie, que l'AN soit une espèce eurytherme (capable de supporter de grandes variations de température) et euryhaline (capable de supporter de grandes différences de la salinité de l'eau). Cette théorie est énoncée dans les travaux de l'équipe mexicaine de Nieves-Soto *et al.*, (2011) qui a évalué la croissance, le taux de filtration et l'absorption énergétique d'adultes de l'AN de 23°C à 32°C et de 20 ppt à 50 ppt pendant 15 jours. Ils déterminèrent que la meilleure combinaison physiologique se trouvait à 20 ppt et 32°C sans observer de mortalités sous aucun des traitements, démontrant ainsi que les animaux n'avaient pas été soumis aux extrêmes de leur tolérance.

Cependant, les extracteurs traditionnels rapportent fréquemment des observations de mortalités massives survenues dans les bancs naturels d'AN les plus proches des lits de rivières durant la saison des pluies. En conséquence il semble primordial de délimiter la tolérance aux variations de salinité de l'AN afin de disposer de critères objectifs sur les zones aptes à l'élevage et au repeuplement.

Il est important de rappeler qu'en dépit des différences interspécifiques de sensibilité aux variations de salinité, tous les bivalves sont osmoconformes (la concentration osmotique et ionique de leur hémolymphe s'équilibre sur celle du milieu extérieur) et possèdent donc peu – voire aucune - capacité de régulation osmotique de leur milieu interne (Gosling E., 2015). Ceci engendre une hémodilution à basse salinité et donc une augmentation du volume cellulaire par absorption d'eau et réduction de la concentration osmotique intracellulaire. Afin de limiter cette augmentation de volume, les cellules doivent ajuster leurs concentrations intracellulaires d'acides aminés libres (FAA) et autres petites molécules organiques qui seront expulsés dans le milieu extracellulaire. Cependant, une fois épuisés, les FAA sont obtenus à partir du catabolisme des protéines (autophagie). Ce processus affaiblit progressivement l'animal et peut provoquer sa mort s'il est prolongé (Gosling E., 2015).

L'objectif de cette étude consistait dans un premier temps à déterminer la tolérance de *A. tuberculosa* aux faibles salinités. Pour cela, des AN furent prélevées dans les mangroves de Puerto Pizarro (Tumbes, Pérou) puis réparties (10 animaux par aquarium, en triplicata pour chaque traitement) à différentes salinités (5, 10, 15, 25 et 33 ppt). Lorsqu'ils sont confrontés à des conditions abiotiques défavorables, le premier comportement des bivalves consiste à se fermer hermétiquement et à s'isoler de leur milieu pendant plusieurs heures à plusieurs jours avant d'être contraints à se rouvrir sous l'effet du manque d'oxygène, de la nécessité de s'alimenter ou afin de devoir se déplacer. Pour assurer le contact synchronisé entre les AM et leur milieu, une fente dans la partie longitudinale de la valve a été réalisée.

Cette expérience permet d'évaluer la réponse physiologique d'adultes d'*Anadara tuberculosa* confrontés à des stress de salinité (Figure 13). Il apparaît que les AM supportent bien d'être maintenues dans des eaux saumâtres à 25 ppt et 15 ppt pendant

au moins 16 jours. En dessous de 15 ppt, cette tolérance diminue d'autant plus que la salinité est basse. Il est concevable de penser que la possibilité de se fermer complètement aurait pu permettre aux AM de survivre un peu plus longtemps à ces conditions.

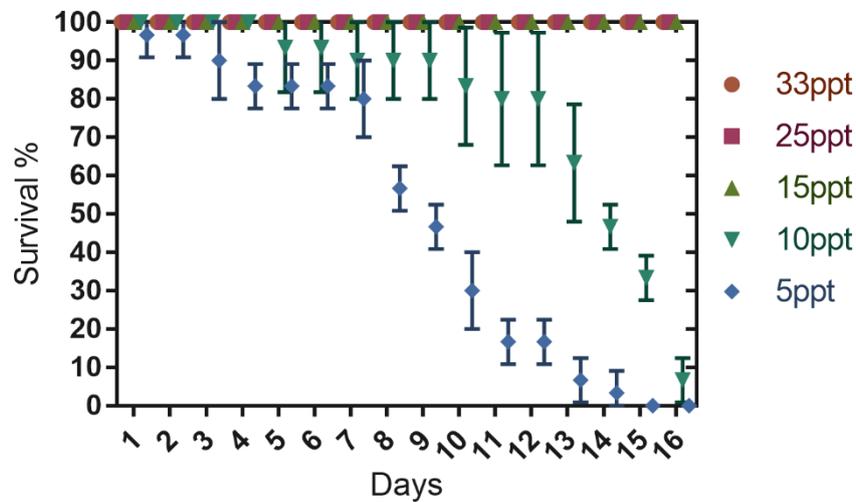


Figure 13: Mortalités cumulées d'*Anadara tuberculosa* maintenues à différentes salinités.

Ces résultats ont également mis en évidence qu'il existe d'importantes différences de tolérance au stress de salinité entre individus d'une même espèce, par exemple près de 15 jours séparent les premiers et les derniers animaux à succomber aux plus basses salinités. D'un point de vue écologique, il serait intéressant de comprendre quels sont les mécanismes expliquant cette tolérance, par exemple des différences dans la composition ou la quantité de réserves énergétiques des animaux qui permettent à certains individus de soutenir leur métabolisme plus longtemps.

D'un point de vue zootechnique, l'identification de biomarqueurs associés à une plus grande résistance au stress de salinité permettrait l'utilisation de souches plus adaptées à certaines conditions environnementales tandis que pour l'aquaculture, ces biomarqueurs faciliteraient le processus d'amélioration génétique en sélectionnant des animaux capables de résister à des stress de salinités fluctuantes ou extrêmes.

Afin de caractériser de possibles biomarqueurs, une approche moléculaire fut proposée en cherchant notamment à identifier puis à quantifier l'expression de gènes marqueurs de l'osmorégulation de l'AN. Face à la carence d'informations génétiques pour cette espèce, nous avons cherché à nous appuyer sur un modèle biologique mieux renseigné

et le plus proche possible de l'AN : l'huître.

Les huîtres représentent, après les cyprinidés, le second groupe d'espèces le plus important de la production aquacole mondiale (FAO, 2012) et ont donc fait l'objet de nombreuses études approfondies d'écophysiologie et de génétique. Tout d'abord, le génome complet de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* est disponible (Zhang *et al.*, 2012). Les travaux de Zhao *et al.*, (2012) ont caractérisé spécifiquement le transcriptome de *C.gigas* en réponse au stress de salinité, avant que Meng *et al.*, (2013) ne visualisent les changements d'expression des gènes codant les enzymes clés du cycle des FAA et démontrant par la même occasion le rôle central des FAA pour l'osmorégulation de *C.gigas* exposée à différentes salinités. Plus récemment, le séquençage du génome de *C.angulata* a révélé les similitudes et les polymorphismes avec les gènes de réponses au stress hypo-osmotique chez *C. gigas* (Cross *et al.*, 2014), tandis que Eierman *et al.* (2014) a démontré par transcriptomique que plus de 80% des gènes impliqués dans la réponse de *C. virginica* maintenue à différentes salinités coïncidaient avec ceux de *C. gigas*. En parallèle, Lockwood et Somero (2011) ont identifié, toujours par transcriptomique différentielle, les principaux gènes impliqués dans la réponse au stress hypo-osmotique des moules *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus trossulus*.

Des amorces pour *Reverse Transcriptase*- PCR quantitative (RT qPCR) de 19 gènes clés de l'osmorégulation chez les bivalves furent sélectionnées à partir des génomes et des séquences disponibles dans NCBI. De ces jeux d'amorces, 15 sont dirigés vers des enzymes essentielles au métabolisme des FAA, 3 s'hybrideraient sur des protéines transporteurs des principaux FAA, et un reconnaîtrait spécifiquement la chaperone *heat shock Protein hsp70* associée aux mécanismes de stress.

La validation des essais d'amplification de ces gènes fut réalisée par PCR à partir d'ADN génomique de tissus de branchies de *A. tuberculosa*, et de *C. gigas*. L'amplification du gène COI a servi de « contrôle positif » d'extraction d'ADN tandis que l'ADN génomique de *C.gigas* a été utilisé comme contrôle positif de PCR des gènes d'osmorégulation.

Le gène COI a pu être amplifié chez *A. tuberculosa* et *C. gigas*. Parmi les 19 gènes associés au stress hypo-osmotique des mollusques, 17 ont pu être détectés par PCR chez l'huître

tandis qu'aucun d'entre eux ne put être détecté chez l'AN, et ce malgré plusieurs tentatives et adaptations de protocoles.

L'absence d'amplification des gènes évalués chez *A. tuberculosa* pourrait être due à des différences génétiques dans les régions considérées comme conservées (une seule mutation en 3' de la cible d'une amorce peut obérer sa fixation efficace et empêcher l'amplification), ou à l'absence de ces gènes chez cette espèce. La première hypothèse apparaît comme la plus plausible et ce pour au moins deux raisons :

- la conservation du système d'osmorégulation par gestion des FAA chez les bivalves et gastéropodes marins,
- les études transcriptomiques réalisées sur les bivalves modèles avaient mis en évidence d'importantes différences nucléotidiques au sein d'un même genre, il est donc concevable que ces différences soient accentuées entre des groupes plus éloignés.

Parmi les alternatives disponibles pour identifier et quantifier les gènes impliqués dans la réponse au stress de la salinité chez l'AN, il conviendrait de réaliser des études de transcriptomique comparative d'*A. tuberculosa* maintenues à différentes salinités grâce aux outils de séquençage massif de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*) inspirées du modèle proposé par Meng *et al.*, (2013). Une approche complémentaire pourrait comparer ces transcriptomes différentiels après une étape d'Hybridation Soustractive et Suppressive (SSH) similaire à celle proposée par Barman *et al.* (2012) qui permit à cette équipe de détecter des transcrits plus rares à partir de crevettes *Macrobrachium rosenbergii* soumises à différentes salinités.

N'ayant pas la possibilité de réaliser une étude du transcriptome plus poussée, l'exploration de la présence de biomarqueurs fut entreprise par protéomique grâce à la disponibilité d'un équipement de spectrométrie de double masse MALDI TOF TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, Time Of Flight-Time Of Flight*). La description du protéome peut permettre d'identifier les protéines exprimées dans un échantillon et ainsi obtenir une image instantanée de l'état métabolique de cellules, ou tissus, soumis à des conditions spécifiques. La présence, l'absence ou l'altération du profil protéomique influencé par des conditions spécifiques peuvent être visualisées à

travers des techniques d'électrophorèse 1D ou 2D. Cela permet ainsi d'associer ces patrons de migration à différents états physiologiques.

Les analyses par MALDI TOF TOF des bandes présentes et différentielles de protéomes d'AN maintenues à 5, 10, 15 et 25 ppt ont permis d'obtenir 26 peptides, parmi lesquels 10 étaient uniquement présents à 5ppt et 10ppt, et dont 2 étaient associés au stress osmotique chez les invertébrés marins ; Heat Shock Protein de 70Kda (HSP70) et canal de chlore (chloride channel protein 2-like isoform X2).

Bien que le nombre et la taille des peptides obtenus dans cette étude soient très limités, et qu'il soit indispensable d'améliorer cette technique encore novatrice au niveau du Pérou, ces travaux ont ouvert la voie à la protéomique chez les arches et correspondent à la seconde étude de comparaison du protéome de bivalves exposés en conditions de stress hypo-osmotique (Tomanek, *et al.*, 2012).

En définitive, les résultats présentés complètent les connaissances relatives à la tolérance au stress de diminution de salinité de *A. tuberculosa* et ont permis de dégager des indices sur les voies moléculaires associées à cette réponse. L'optimisation progressive des techniques appliquées dans cette étude devrait permettre, à terme, de caractériser des biomarqueurs génétiques. L'obtention de transcriptomes propres à l'AN devrait amener à identifier des SNP ou des isoformes associés à la résistance au stress hypo-osmotique. L'analyse de biomarqueurs associés à des gènes fonctionnels devrait d'ailleurs être privilégiée à des marqueurs génétiques classiques (COI, 16SrRNA...) car ils apportent d'avantages d'informations utiles en ce qui concerne les opérations de repeuplement et d'aquaculture.

La réalisation d'études d'écophysiologie a conduit à la réalisation de programmes cohérents et efficaces de repeuplement et de gestion des stocks d'huîtres aux Etats Unis (Pollack *et al.* 2012; North *et al.* 2010). À l'instar de ces études, la détermination de la tolérance des AM aux autres principaux paramètres physico-chimiques s'avère également primordiale et augmenterait les probabilités de succès des opérations de repeuplement et de productions de naissains envisagées au Pérou, Equateur et Colombie.

Chapitre 3

Production pilote de naissains d'*Anadara tuberculosa* libres de pathogènes spécifiques et produits à partir de reproducteurs caractérisés génétiquement à des fins de repeuplement.

Research Articles

Production of specific pathogen-free larvae from genetically characterized populations of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia), for stock enhancement and aquaculture in the Peru Northeast Biosphere Reserve

**Benoit Diringer^{1,7}, Violeta Moreno², Krizia Pretell³, Ricardo Avellan⁴, Mélanie Sahuquet^{1,7}
Ritchie Vasquez⁵, Gabriele Gentile⁶ & Eric Mialhe^{1,4}**

Résumé

Anadara tuberculosa, l'arche noire, est considérée comme une espèce emblématique de l'écosystème de la mangrove du Pacifique Est. Le déclin de ses populations est une préoccupation croissante, en particulier au Pérou. L'utilisation de larves produites en éclosion pour améliorer les stocks ou l'aquaculture est attrayante mais soulève de vives critiques d'un point de vue écologique car elle pourrait entraîner une perte de diversité génétique chez les populations sauvages et favoriser la propagation de maladies des éclosions à l'environnement.

Dans ces travaux, la production de naissain au moyen des technologies traditionnelles d'aquaculture/biotechnologie a été associée au diagnostic moléculaire d'agents pathogènes et à l'estimation de la diversité génétique afin de produire des larves exemptes de pathogènes spécifiques (SPF) à partir de populations génétiquement caractérisées. Tous les diagnostics PCR et nested PCR d'agents pathogènes communs chez les bivalves, tels que *Bonamia*, *Martelia*, *Perkinsus* et OsHV1, furent négatifs pour des échantillons d'adultes et de naissains, sains ou moribonds. Les analyses microbiologiques et moléculaires réalisées au cours des épisodes de mortalité ont permis d'identifier une souche pathogène de *Pseudomonas* présente sur les parois des cuves de culture, dans les naissains moribonds et dans le sang des adultes. La variation génétique de la population a été évaluée par les séquences du gène mitochondrial COI qui ont montré une diversité d'haplotype de 36,7%. Cette étude portant sur la production en éclosion, la pathologie et les composants génétiques d'un bivalve indigène surexploité représente un modèle original pour la mise en valeur réussie des stocks de mollusques et/ou de programmes d'aquaculture innovants.

Au Pérou et en Équateur, les écosystèmes de mangroves ont été dramatiquement réduits par les activités de pénéculture, générant d'importantes tensions sociales entre les communautés natives exploitantes traditionnelles de la mangrove, et les éleveurs de crevettes ou « *camaroneros* ». Cette compétition entre 2 mondes pour les ressources, en l'occurrence l'espace et l'eau ont généré des inimitiés profondes depuis plus de 60 ans. Au niveau local, les relations conflictuelles entre les « *camaroneros* » et les « *extractores* » sont toujours vives, les premiers voyant les seconds comme des voleurs de crevettes, s'immisçant de nuit dans les fermes afin de piller les étangs, et les seconds voyant les « *camaroneros* » comme des capitalistes destructeurs de la mangrove en plus d'être vivement critiqués pour les rejets de leurs effluents d'élevage dans l'environnement.

Actuellement au Pérou, la coupe de palétuvier est interdite (Resolución Ministerial 184-78-VC-4400), mais les espaces perdus ne seront que peu ou pas récupérés. Ces dernières années, les extracteurs de Tumbes se sont organisés en associations avec l'aide d'ONG, et ont réussi à se faire attribuer par l'État Péruvien la gestion de la réserve nationale des Mangroves de Tumbes (SNLMT) à travers un contrat d'administration (Resolución Presidencial N° 097-2011-SERNANP). L'objectif de ce contrat réside dans un premier temps à promouvoir la croissance économique et la création d'emplois des populations associées aux réserves naturelles en harmonie avec l'écosystème (contrôle des pêches, surveillance, reboisement, écotourisme...). Un des objectifs de cette alliance visait à trouver une stratégie d'augmentation des populations naturelles d'*Anadara tuberculosa* et à convertir les « *extractores* » de AN à une autre activité.

Lorsqu'une ressource est menacée de surexploitation, l'une des premières mesures disponibles pour les autorités des pêches correspond à l'application de régulations qui visent à limiter l'extraction de la ressource sur des critères de temps, de taille, de lieu, de nombre d'individus..., ou à réguler l'effort de pêche (nombre de pêcheurs, outils de pêches...). Ces restrictions ont souvent échoué à préserver les stocks (FAO 2018), comme c'est le cas avec l'AN au Pérou (IMARPE 2019). Afin de restaurer les populations de mollusques, 3 autres stratégies peuvent être appliquées ; le regroupement d'adultes

dans des sanctuaires afin de faciliter la reproduction, le relargage de larves précoces (planctonique) ou le repeuplement à partir de naissains/juvéniles (Lallias *et al.*, 2010).

Dans le cadre de l'AN, la première option est difficile à mettre en place car les adultes sont mobiles, et parce qu'il existe de nombreux extracteurs « sauvages ou non associés » qui profiteraient de ces sanctuaires. La seconde car les expériences de relargage de larves planctoniques sont impossibles à contrôler, (dispersion des larves sur plusieurs jours, sujette à l'effet des courants, des marées, de la prédation...) (Arnold 2008). Pour ces raisons, les projets de restauration de bivalves et en l'occurrence ce projet se sont concentrés sur cette dernière stratégie de production massive de naissains en éclosier.

Cette approche suscite toutefois de vives inquiétudes :

- il est nécessaire de prévenir les maladies infectieuses qui pourraient être transmises verticalement ou horizontalement aux naissains qui pourraient infecter à leur tour les populations naturelles ou mourir durant les élevages ce qui pourrait décourager les efforts des communautés.
- la nécessité de préserver la diversité génétique des populations naturelles qui pourraient être rapidement affectées par l'introduction massive d'animaux produits par un nombre limité de géniteurs comme décrit dans le premier chapitre.

Cette stratégie repose donc sur un premier composant zootechnique, qui consistait à développer des protocoles de sélection de reproducteurs, de transport, d'acclimatation, d'induction à la ponte, d'élevage larvaire (phase planctonique, fixation, et phase benthique) et transfert et acclimatation dans les zones réceptrices. Au moment de cette étude il n'existait pas de protocoles disponibles propres à la production de l'AN. En conséquence les opérations d'aquaculture furent menées à partir de l'adaptation de protocoles provenant d'espèces d'huîtres, de palourdes ou de pectinides (Helm et Bourne, 2006).

Le second composant correspondait à la prévention des maladies infectieuses qui pourraient affecter *Anadara tuberculosa*. Il n'existait à l'époque aucune donnée

indiquant la présence de pathogènes chez ce bivalve. Certains extracteurs avaient en mémoire des mortalités massives d'AN survenues ponctuellement sur certains bancs naturels mais aucune étude n'avait été menée pour déterminer l'étiologie réelle de ces phénomènes. Ce projet souhaitait donc réaliser sans à priori une évaluation de la présence et de la prévalence des principaux agents pathogènes de bivalves connus, en particulier des 7 agents pathogènes surveillés par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Il convient de souligner que la sous-estimation de l'importance de la prévention des maladies infectieuses en aquaculture a généré les pires pandémies. Pour ne citer que quelques exemples, le White Spot Syndrome Virus (WSSV) de la crevette, le virus de la nécrose pancréatique infectieuse du saumon (IPNV), ou l'herpesvirus de l'huître (OsHV1) (Stentiford *et al.*, 2017). Les maladies engendrent plus de 6 milliards de USD de pertes par an et des pertes jusqu'à 40% des productions mondiales (World Bank, 2014). Ces infections constituent la principale menace pour l'expansion de l'aquaculture (FAO 2018).

L'aquaculture reconnaît 2 types de transmission de maladies infectieuses :

- Les infections transmises verticalement sont provoquées par des agents pathogènes qui utilisent la transmission reproducteurs-descendance, elle peut être directe (présence du pathogène dans les ovocytes) ou indirectes (infection dans le tractus génital lors de la ponte ou dans les fluides séminaux),
- Les infections transmises horizontalement sont provoquées entre membres de la même espèce, et peuvent être directes (cohabitation, contact, cannibalisme...) ou indirectes (via les fèces, piqûres ou morsures de parasites...). Le porteur de la maladie peut être de la même espèce ou peut seulement jouer le rôle de vecteur (micro algues, autres espèces consommées ou parasites...).

Les mesures appliquées par les aquaculteurs pour éliminer ou réduire les risques de transmission verticale des maladies résident dans l'application de bonnes pratiques d'élevages (*Best Management Practices*) ; l'utilisation de géniteurs exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) ; le diagnostic et l'élimination des porteurs sains et

symptomatiques ou des aliments contaminés ; le traitement chimique des géniteurs pour contrôler un agent pathogène spécifique ; la stérilisation ou traitements des eaux d'élevages ; le traitement chimique des gamètes, des embryons ou des premiers stades larvaires. Aussi bien, les stratégies de prévention, en particulier de la transmission verticale sont connues et appliquées depuis longtemps chez les crevettes et les poissons (Brock et Bullis 2001, Motte *et al.*, 2003), il n'existe pas à notre connaissance de tels programmes pour les mollusques.

Il faut dire que la démonstration de la transmission verticale d'un pathogène majeur est récente chez les bivalves, le premier modèle étant l'herpès virus de l'huître OsHV1 (Lopez Sanmartin *et al.*, 2016), bien que sa présence fut diagnostiquée antérieurement dans les gamètes (Arzul *et al.*, 2002; Lipart & Renault, 2002). De même, l'ADN de protozoaires parasites de type *Bonamia spp.* a été diagnostiqué dans les gonades et les larves d'huître (Arzul *et al.*, 2011, 2017). De par leur cycle biologique, d'autres pathogènes comme les *Perkinsus spp.* que l'on retrouve dans les fèces devraient pouvoir réaliser une transmission verticale indirecte en s'évacuant au moment de la ponte.

Le troisième composant correspond à l'évaluation de la diversité génétique de la population des AN présentes dans la réserve des Mangroves de Tumbes (SNLMT) afin d'établir une ligne de base qui permettra de réaliser des opérations de repeuplement sans affecter les populations naturelles.

Cette évaluation est primordiale car plus la structure génétique d'une population est complexe, plus la réserve de gènes de l'espèce est importante. Cette réserve représente une assurance adaptative de l'espèce face aux changements du milieu et autres adversités que pourrait affronter l'espèce et doit donc être préservée (*cf.* partie 1).

En effet, les opérations de repeuplement basées sur l'introduction de naissain produit en éclosion auront inévitablement un impact génétique sur la population receveuse si les animaux réintroduits survivent et se reproduisent. Les principales préoccupations sont :

1. les changements dans la taille effective de la population de la population sauvage et
2. les changements dans la composition génétique de la population receveuse.

Ces préoccupations sont réelles car plusieurs études ont signalé une perte significative de la diversité génétique et une réduction de la taille effective des populations d'huîtres en écloserie (Gosling 1982, Hedgecock et Sly 1990, Gaffney *et al* 1992, Saavedra et Guerra 1996, Launey *et al* 2001, Boudry *et al* 2002, Appleyard et Ward 2006, Lind *et al.*, 2009). La chute de diversité génétique est généralement liée au nombre limité de reproducteurs utilisés, et/ou à une meilleure aptitude (fitness) de certains génotypes dans des conditions de culture artificielle.

Dans cette étude il nous a été possible de produire une grande quantité de naissains à partir de reproducteurs extraits du SNLMT. Le cycle larvaire correspondait à ceux précédemment décrits pour d'autres bivalves (Figure 7). La majorité des larves produites fut offerte aux associations d'extracteurs pour des opérations de repeuplement et d'essais de croissance en cage suspendues et en enclos, tandis qu'une autre partie servit à évaluer leur croissance dans des fermes de crevettes (polycultures).

Durant les opérations de production en écloserie, des mortalités furent observées. Les adultes moribonds présentaient des symptômes non spécifiques correspondant à des animaux « ouverts », dont les valves se refermaient lentement au contact, le pied sortant parfois de la coquille, et l'observation d'un « saignement » correspondant à l'expulsion du liquide palléal chargé d'hémoglobine peu avant la mort. Les mortalités se propageaient rapidement entre les animaux d'un même bassin. Chez les larves, l'apparition de taches roses ténues sur les parois des bacs et les larves précédait des mortalités massives. Les adultes et les parois des bacs de maturation étant de couleur noire, il est probable que les biofilms roses caractéristiques des mortalités larvaires aient été présents mais indétectables.

Le diagnostic pathologique fut réalisé à partir de protocoles validés par l'OIE, généralement basés sur une simple PCR. Cependant, de nombreuses études de

productions d'organismes marins SPF, notamment la crevette, recommandent l'utilisation de sondes spécifiques et surtout sensibles car les charges de pathogènes transmis verticalement dans les larves par des reproducteurs asymptomatiques sont généralement très faibles (Hsu *et al.*, 1999, Satoh *et al.*, 1999 ; Cowley *et al.*, 2002 ; Motte *et al.*, 2003 ; Sudhakaran *et al.*, 2007). Cette étude développa un ensemble de sondes de Nested PCR en deux temps (une première PCR utilisant des primers externes amplifient les séquences cibles avant qu'une seconde PCR, nichée, utilisant des primers internes aux fragments amplifiés ne soit réalisée) qui devraient augmenter significativement la sensibilité du diagnostic. L'amplification du gène COI fut utilisée comme contrôle de la qualité des ADN extraits dans les cas où il n'existait pas de contrôles positifs pour les pathogènes recherchés. L'analyse de reproducteurs et de naissains sains et moribonds ne permirent l'identification d'aucun pathogène recensé.

À l'inverse, les analyses microbiologiques permirent d'isoler plusieurs souches de *Vibrio* et de *Pseudomonas*. La souche de *Pseudomonas sp.* CNLS1P était partagée par l'ensemble des animaux moribonds suggérant une bactériose. Les pathologies bactériennes sont considérées comme un problème majeur des éclosiers de bivalves dans le monde, et les membres du genre *Vibrio* sont généralement considérés comme les principaux agents étiologiques (Travers *et al.*, 2015). Chez les bivalves, les *Pseudomonas* ont parfois été associées à des bactérioses mais toujours comme infection secondaire après une vibriose. Une seule publication considère une *Pseudomonas* comme strictement pathogène (Lodeiros, *et al.*, 1992). L'existence de synergies entre différents pathogènes (pathobiome) couplée à l'évidence que moins d'1% des bactéries sont cultivables (Streit et Schmitz, 2004) illustre l'intérêt de l'application d'outils de type NGS qui permettent de déterminer l'étiologie des pathogènes lors d'infections mixtes comme le démontrent Lokmer *et al.*, (2014) chez *C. gigas*. Par ailleurs, il serait possible de caractériser la virulence de la souche notamment via des infections expérimentales, complétées par l'identification des toxines impliquées dans la virulence, par PCR ou MALDI TOF TOF.

La caractérisation du microbiote natif de l'AN faciliterait la prévention des bactérioses par la sélection et l'application dans les élevages de bactéries probiotiques antagonistes aux *Pseudomonas* et *Vibrio* pathogènes.

Les analyses d'évaluation de la diversité génétique focalisèrent sur des reproducteurs prélevés dans 7 points du SNLMT afin d'en évaluer la diversité génétique (Figure 14).

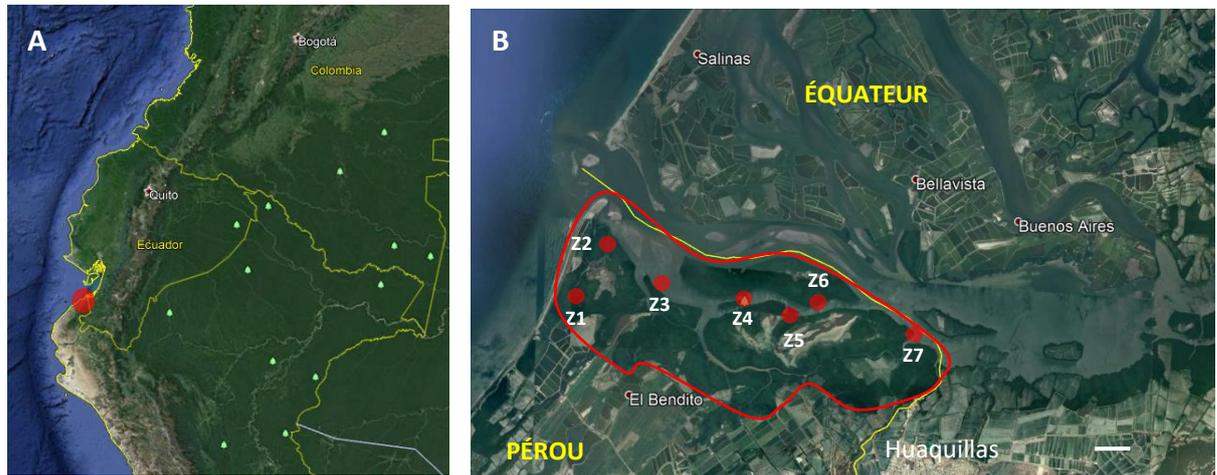


Figure 14: Sites d'échantillonnage d'*Anadara tuberculosa* dans le Sanctuaire National des Mangroves de Tumbes. A) Situation du SNLMT au niveau macrorégional (en rouge), B) Localisation des bancs naturels d'*A. tuberculosa* échantillonnés (points rouges) dans le SNLMT

Les résultats d'analyses génétiques bruts indiquèrent une plus grande diversité d'haplotypes en amont du fleuve (Z7>Z4>Z6>Z5>Z1>Z3>Z2). La zone Z7 regroupe également la plus grande diversité nucléotidique à l'inverse de Z2. Ces résultats qui méritent d'être approfondis sembleraient indiquer qu'il existe plus de diversité génétique dans les zones les plus exposées aux variations de salinité et aux rejets urbains de la ville de Huaquillas.

Des 111 séquences obtenues 39 haplotypes furent identifiés. L'haplotype 1 fut de loin le plus abondant et le seul à être présent dans toutes les zones échantillonnées. Il peut être considéré comme l'haplotype « colonisateur » ou ancestral. Cette diversité est importante considérant la courte distance géographique qui sépare les extrêmes des sites échantillonnées (10.6km en ligne droite).

Dans son ensemble, cette étude a ouvert la voie à la restauration durable d'une espèce vulnérable au travers de la production de naissains SPF produits en éclosérie par des

reproducteurs caractérisés génétiquement. Cette première opération a également permis de débiter le processus de reconversion des extracteurs en aquaculteurs. Si, en soi, les technologies appliquées ne sont pas nouvelles, cette stratégie combinant biotechnologies aquacoles et moléculaires pourrait servir de modèle à la récupération d'autres espèces menacées peuplant les forêts de palétuviers mangrove comme par exemple le crabe de mangrove *Ucides occidentalis*.

Discussion et perspectives générales

La consommation et la demande mondiale de bivalves marins sont en constante augmentation. Actuellement les activités aquacoles fournissent 89% de la production, et supplantent donc largement les activités de pêches/collecte (FAO 2017). Toutefois, la conchyliculture reste largement dépendante de la collecte/pêche de naissains sauvages laquelle est fortement sujette aux fluctuations naturelles en abondance de larves car elles-mêmes régies par des facteurs environnementaux non contrôlés (Astorga M.P. 2014). À cela il convient d'ajouter l'épuisement des stocks locaux de reproducteurs, les épidémies, les espèces invasives, la pollution/destruction d'habitats (Boudry *et al.*, 1997, 2004) et les effets néfastes du changement climatique (Waldbusser *et al.*, 2015). L'avenir des productions mondiales de mollusques réside sans aucun doute dans le développement d'écloseries permettant de produire suffisamment de naissains, de domestiquer un plus grand nombre d'espèces, d'améliorer progressivement des caractéristiques commerciales importantes (croissance, survie, résistance aux maladies et tolérance aux stress) (Boudry *et al.*, 1997; Camara et Symonds, 2014) tout en respectant les populations naturelles et si possible en les bio-augmentant par ensemencement de nouveaux individus. L'obtention de productions durables nécessite donc le développement de stratégies et d'outils assurant la stabilité des activités aquacoles et le maintien des activités de pêches.

Cette thèse, réalisée dans cette logique visait à ouvrir la voie à la production durable de naissains de l'arche de noire *Anadara tuberculosa*, à des fins d'aquaculture et d'amélioration des stocks, en tenant compte de trois éléments :

- 1) l'estimation de la diversité génétique des principales populations naturelles afin d'assurer une gestion responsable,
- 2) l'étude de la réponse physiologique et moléculaire au stress de salinité afin de permettre des déplacements d'individus, et
- 3) la production de naissain libre de pathogènes spécifiques.

Analyse de la structure génétique et implications pour la conservation

L'analyse de la structure génétique de l'arche noire sud-américaine (chapitre 1) basée sur le polymorphisme du gène COI (SNPs) et réalisée à partir d'individus collectés dans les principaux centres d'extractions du Pérou, d'Equateur et de Colombie a permis de :

- démontrer l'existence de 2 populations distinctes séparées au niveau de l'Equateur,
- d'identifier une importante variabilité d'haplotypes différents (47/120 individus $\approx 39.2\%$) et,
- d'estimer un taux de mutation de COI chez *A. tuberculosa* élevé (entre 5.0% et 2.13% par million d'années).

Ces informations reprises en détail sur une zone restreinte comme le SNLMT confirment l'importante diversité génétique de l'AN et indiquent également qu'il existerait plus de diversité génétique dans les zones les plus exposées aux variations de salinité et aux rejets urbains que dans les zones sous influence océanique pouvant être considérées comme plus stables (chapitre 2).

Ces résultats confirment que *A. tuberculosa*, comme la majorité des bivalves, présente des niveaux de diversité génétique extrêmement élevés en comparaison à d'autres espèces aquacoles (Hollonbeck et Johnston 2018).

L'analyse du *barcode* de COI fournit un outil permettant de déterminer la taxonomie de différents organismes (à partir de larves ou d'individus non différenciés, de nouvelles espèces ou espèces invasives, après un processus de transformation alimentaire...) et de différencier des variants géographiques ou de suivre des animaux produits en éclosion (Trivedi *et al.*, 2016, Cordero *et al.*, 2017). Néanmoins cette technique possède comme principale limite la nécessité de séquencer les amplicons, ce qui se révèle parfois compliqué ou chronophage dans les pays en développement. Une première alternative pourrait être d'acquiescer une des nouvelles plateformes de séquençage en temps réel (MinION - Oxford Nanopore Technologies). L'application de cette technologie très

récente dans l'étude des bivalves a notamment permis l'identification par séquençage du ADNmt 16S d'un bivalve non indigène en Europe (Craeymeersch *et al.*, 2019) ou même le séquençage du génome mitochondrial de la moule *Perna canaliculus* (Ranjard *et al.*, 2018). Une seconde alternative d'analyse rapide du polymorphisme de COI résiderait dans l'analyse HRM (High Resolution Melting curve) afin de détecter les SNP, les insertions ou délétions en fonction des variations dans la mesure de la disparition de la fluorescence durant la phase de dénaturation de l'ADN par qPCR. Cette technique, efficace, précise et économique a récemment été utilisée afin de distinguer différentes espèces de carpes et de détecter des variants géographiques (Behrens-Chapuis *et al.*, 2018). Elle pourrait ainsi être développée pour *A. tuberculosa* en s'appuyant sur la bibliothèque de séquences obtenues dans la présente étude.

Une alternative intéressante a été proposée par Meistertzheim *et al.*, (2014) qui combinèrent le séquençage du COI avec des profils de HRM sur 9 gènes associés à la résistance aux vibrioses sur des individus résistants et sensibles de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, afin d'obtenir des marqueurs de sélection (MAS ; Marker Assisted Selection) facilitant la production de larves résistantes.

En effet, si tant est que l'étude du polymorphisme du gène COI est un standard dans les analyses de diversité génétique, il est toutefois raisonnable de s'interroger s'il reste un marqueur de choix dans une optique de programmes de sélection et d'amélioration génétique. En effet, la majorité des mutations du gène COI sont dites silencieuses (mutation du troisième nucléotide, sans conséquence sur la protéine) (Galtier *et al.*, 2009). Ces mutations ainsi que celles des régions non codantes ont peu de chance de permettre l'obtention de marqueurs QTL (*quantitative trait Loci*) associés à un caractère d'intérêt (survie, croissance...). L'application croissante de technologies de séquençage massif de type NGS à la phylogénomique a permis progressivement aux SNP de s'imposer face à des techniques plus traditionnelles comme les microsatellites ou l'AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) pour l'attribution de la filiation (Hollenbeck et Johnston, 2018). Les études de transcriptomiques (*de novo transcriptome assembly*) utilisant les technologies de séquençage de dernière génération (NGS) sont particulièrement intéressantes car elles permettent d'obtenir des informations sur la

physiologie des animaux dans un contexte donné et d'obtenir des marqueurs de gènes fonctionnels sur des espèces non modèles (Pante *et al.*, 2012, Patnaik *et al.*, 2016, Hollenbeck et Johnston, 2018). L'application de ces techniques à *A. tuberculosa* permettrait le développement de stratégies d'adaptation locale de l'espèce (pour les zones hybrides ou de transition), d'identifier les gènes et les voies impliqués dans les principaux métabolismes (système immunitaire, adaptation aux stress, reproduction) et d'identifier des MAS (SNP, SSP (Single Sequence Repeat)) sur ces gènes fonctionnels à des fins de conservation et d'aquaculture.

Réponses physiologique et moléculaire au stress de la salinité

La survie des individus jusqu'à la taille de reproduction ou une taille exploitable représente un des enjeux majeurs des opérations de repeuplement ou d'aquaculture. Pour les organismes marins la salinité constitue un des facteurs clé influençant leur métabolisme et ses fluctuations entraînent des processus énergétiquement coûteux afin de maintenir l'équilibre iso-osmotique. Certaines espèces d'huîtres sont particulièrement euryhalines et supportent facilement des variations de salinités allant de 5 à 35 ppt (Eierman *et al.*, 2014). La présente étude a démontré que les adultes de *Anadara tuberculosa* pouvaient supporter pendant plus de 15 jours des salinités allant de 35 à 15 ppt. À partir de 10 et 5 ppt l'AN présente des mortalités d'autant plus importantes et rapides que la salinité est basse.

De manière générale ces résultats sont représentatifs des tendances observées chez d'autres espèces d'arches tropicales ou subtropicales d'importance commerciale. Par exemple, une mortalité de 100 % a été observée chez des adultes d'*Anadara granosa* maintenus à 9.6 ppt et en dessous pendant 6 jours, elle était de plus de 50% à 12.8 ppt tandis qu'aucun décès n'est survenu à 22,4% ou plus (Davenport et Wong, 1986). Liong (1979) reportait des mortalités élevées quand *A. granosa* était maintenue entre 4 et 14 ppt. Chez *Scapharca broughtonii*, les mortalités commencèrent sous les 20 ppt, s'accumulèrent à 85% à 13.2 ppt à 9 jours, et à 100% au 5^{ème} jour d'expérimentation à 6.6 ppt (Shin *et al.*, 2006).

Sturmer *et al.*, (2009) rapportèrent des mortalités de plus de 80% chez *A. ovalis* et *Noetia ponderosa* après un double stress de salinité (>17 ppt) et la montée de la température durant des essais de production aquacoles. La descente de salinité à 10 ppt générerait à elle seule des pertes majeures dans les élevages expérimentaux. Si l'on considère les données écologiques de leurs milieux naturels respectifs, il apparaît que l'arche africaine *A. Senilis* se rencontre principalement dans la partie inférieure des estuaires, criques et lagunes (Okera *et al.*, 1976). *A. trapezia* peut également être observée dans les zones d'influence estuarienne d'Australie et se reproduire dans des eaux à 22 ppt de sels, même si elle favorisera des eaux à 30 ppt. Cette espèce peut également s'acclimater à 12 ppt mais au détriment de sa croissance (Sullivan 1960). D'après l'équipe japonaise Ting *et al.*, (1972) *A. subcrenata* est présente dans des zones où la salinité est comprise entre 28,9 et 32,1 ppt. De même Castagna et Chanley (1973) suggérèrent que les arches nord-américaines *A. ovalis* et *Noetia ponderosa* présentent un optimal de salinité au-dessus de 18 ppt.

Ces travaux réalisés sur des adultes mériteraient d'être évalués sur des stades plus jeunes qui après avoir grandi en condition de laboratoire serontensemencés dans un milieu non contrôlé. Pour l'heure, des essais réalisés sur des naissains de *A. tuberculosa* de 2-4mm indiquent que des mortalités apparaissent à des salinités inférieures à 25 ppt, d'autant plus intenses au fur et à mesure que diminue la salinité (résultats non montrés). Ces informations recourent les observations de Sturmer *et al.*, (2009) réalisées sur des naissains et juvéniles de *A. ovalis* et *N. ponderosa*. Il semblerait que l'impact de la salinité sur la survie soit d'autant plus important que les animaux sont jeunes, probablement dû à de moindres réserves de FAA ou à une mauvaise capacité à se fermer hermétiquement.

Dans les expériences réalisées sur l'AN, il fut intéressant de constater que les animaux les plus sensibles succombèrent dès le second jour de stress à 5 ppt, tandis que les plus résistants supportèrent le stress pendant 14 jours. Cette diversité interindividuelle est probablement liée à des différences pour un ou plusieurs facteurs : quantités de réserve énergétique initiales différentes (Gosling E., 2015), présence d'un pathogène qui affaiblirait plus rapidement l'animal (Reid *et al.*, 2003 ; Paillard C., 2016), colonisation

par un microbiote apportant un avantage sélectif (concept d'hologénome) (Carrier et Reitzel 2017 ; Pierce et Ward 2018), et/ou différences génétiques.

Les programmes de sélection génétique ont justement pour objectif d'améliorer un ou plusieurs caractères d'importances et sont d'autant plus réalisables qu'ils s'appuient sur des productions en éclosion. Les individus produits en éclosion sont ensuite distribués dans des milieux offrant des conditions environnementales différentes, et certains génotypes peuvent présenter une performance phénotypique supérieure dans un environnement spécifique (Falconer et Mackay, 1996). Si des interactions Génome-Environnement (GxE) significatives existent, il peut être avantageux de sélectionner des lignées ayant des performances supérieures dans des environnements particuliers. Dans ce sens, Allen *et al.* (1993) ont décrit la sélection empirique d'individus ayant une meilleure capacité osmorégulatrice chez l'huître, par récupération *in situ* d'individus survivant à des stress halins, tandis que Proestou *et al.*, 2016 démontrèrent un fort effet GxE sur différentes lignées d'huîtres sélectionnées et soumises à différentes conditions environnementales et de pathogènes. Il serait donc plausible de réaliser des opérations de sélection génétique afin d'augmenter progressivement la tolérance de *A. tuberculosa* aux variations de salinités. D'ailleurs Gaffney, (2006) soutient que le repeuplement avec des souches d'éclosion génétiquement améliorées pourrait avoir des effets positifs sur les populations sauvages, notamment en termes de taux de croissance et de résistance aux maladies sans pour autant affecter dramatiquement la diversité génétique s'il est réalisé judicieusement.

En se basant sur des études d'héritabilités de la réponse à la sélection de caractères productifs chez les bivalves, il a été démontré que le gain moyen par génération était de 10,6% pour la croissance et de 15,7% pour la résistance à des maladies (Hollenbeck et Johnston, 2018) ce qui laisserait envisager un bon potentiel à la sélection pour la tolérance aux variations de salinité.

Les programmes de types MAS peuvent permettre d'augmenter sensiblement la rapidité d'obtention d'animaux « élites ». Les approches de types génomique et protéomique proposées dans cette étude permettent d'approfondir les connaissances du

système d'osmorégulation sans toutefois aboutir à développer un outil pratique. Cependant, la disponibilité croissante de génomes et transcriptomes de mollusques permet d'observer que l'expansion spécifique de certaines familles de gènes liés à la réponse immunitaire et à la réponse au stress constituerait une adaptation évolutive liée à la survie en tant qu'organismes sessiles soumis à des conditions abiotiques hétérogènes (Hollenbeck et Johnston, 2018). En particulier les protéines chaperones de type Heat Shock Protein (HSP), dont le rôle est de protéger la structure des protéines soumises à différents types de stress, sont surexprimées en réponse aux chocs thermiques (Li *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012), à des infections virales (He *et al.*, 2015) à l'exposition aux polluants (Gao *et al.*, 2007) ou aux variations de salinités (Zhao *et al.*, 2012). Il fut déterminé que le génome de l'huître *C.gigas* ne contient pas moins de 88 gènes de la protéine Hsp70, (Zhang *et al.*, 2012). L'expansion des familles de gènes HSP dans les lignées de mollusques suggère que la variation du nombre de copies dans les gènes liés au stress peut être un facteur important à exploiter pour la sélection génétique. La détection d'un peptide de HSP chez *A. tuberculosa* soumise à des stress osmotiques ainsi que l'importante quantité d'informations existante sur cette famille de gènes en font de bons candidats comme marqueurs MAS.

L'application des techniques de NGS afin de révéler les transcriptomes de *A. tuberculosa* soumises à différentes salinités permettrait d'identifier sans équivoque les gènes candidats au MAS tout en obtenant leurs séquences. Idéalement, il pourrait être entrepris une double approche ; une première, expérimentale avec la sélection d'animaux survivant à des stress de salinités, combinée à une approche de transcriptomique afin d'identifier les marqueurs les plus intéressants. Ce retour à la sélection phénotypique associé à l'étude approfondie GxE pour l'obtention d'organismes résistants aux stress abiotiques s'intégrerait dans la mouvance d'études de « phénomique » (Singh *et al.*, 2018).

Dans cette optique, il pourrait être également intéressant d'évaluer les réponses au stress halin, d'animaux dont on aurait expérimentalement augmenté le polymorphisme des gènes MAS, notamment grâce à des techniques de mutagenèse dirigées comme le

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas9 récemment appliquées chez l'huître (Yu *et al.*, 2019).

Développement d'une expérience pilote de production de naissains et perspectives

La domestication d'une espèce animale correspond à la perte, l'acquisition ou le développement de certains caractères morphologiques, physiologiques ou comportementaux nouveaux et héréditaires, résultant d'une interaction prolongée, d'un contrôle, voire d'une sélection délibérée de la part des communautés humaines. (Price E.O., 1984). La grande majorité des espèces de bivalves produites actuellement en aquaculture sont partiellement domestiquées car elles sont élevées de manière extensive et dépendent fortement du naissain récolté dans la nature.

Les obstacles rencontrés afin de fermer le cycle de vie d'espèces sauvages sont nombreux ; difficultés d'obtenir des animaux matures, d'induire la ponte, mortalités massives durant les phases larvaires et la fixation, acclimatation des naissains dans le milieu naturel et survie jusqu'à l'âge adulte en tenant compte des facteurs abiotiques, biotiques (prédateurs, maladies) et zootechniques (stress, génétique, densités...) propres à chaque environnement et chaque espèce.

L'obtention de naissains d'*A. tuberculosa* dans cette étude correspond à la première expérience réussie de production de cette espèce en Amérique du Sud. Les naissains produits furent transférés aux associations d'extracteurs et dans certaines fermes de crevettes afin d'évaluer la croissance et les survies. La grande majorité des naissains furentensemencés dans le SNLMT. Malheureusement il n'y eut pas de suivi exhaustif réalisé, ni d'un point de vue génétique ni d'un point de vue zootechnique afin d'évaluer la survie des animaux dans le temps. Le suivi de populations de bivalvesensemencées à travers l'identification de SNP du gène mitochondrial est possible (Milbury *et al.*, 2004; Hare *et al.*, 2006) bien qu'économiquement coûteux. Le marquage des valves par un marqueur physique ou chimique pourrait être une alternative plus économique et

directe. Dans cette logique, des évaluations de marquage avec des clips métalliques ou différents fluorochromes furent réalisées chez l'arche *A. broughtonii* (Zhou *et al.*, 2017). Les auteurs reportèrent que les clips permettaient de conserver les informations généalogiques (numéros ou codes inscrits), mais requièrent que les animaux soient élevés jusqu'à ce qu'ils soient suffisamment grands pour être étiquetés (>2cm). De plus ces marqueurs affectent négativement la survie et la croissance des animaux, et près d'un tiers des clips se détachent durant le premier semestre. Au contraire, le marquage chimique des valves à l'aide de rouge alizarine ou de calcéine qui se complexent avec le carbonate de calcium des valves n'affecte pas les animaux et reste visible un an après le marquage. Ce genre d'expérience devrait être menée sur des naissains d'*A. tuberculosa* afin de pouvoir réaliser un suivi effectif des populations réintroduites.

Durant cette étude, les opérations de diagnostic moléculaire réalisées sur des reproducteurs et naissains sains et moribonds ne permirent pas de détecter de pathogènes majeurs comme ceux référencés par l'OIE. Cependant, peu après ces travaux, lors d'analyses en Équateur, des reproducteurs maintenus en captivité et exhibant des taux de mortalité de plus de 70% furent diagnostiqués par notre équipe comme porteurs de *Perkinsus cheasapeaki* (Pretell *et al.*, 2017). Cette espèce fut aussi retrouvée dans des reproducteurs asymptomatiques sauvages de Esmeraldas, Guayas, et El Oro (prévalence moyenne 4%).

La perkinsiose est une maladie parasitaire causée par des protozoaires du genre *Perkinsus* qui infectent une grande variété de mollusques (huîtres, palourdes, coquilles Saint-Jacques, coques, moules, arches, ormeaux, etc.) du monde entier (Villalba *et al.*, 2004, Dang *et al.*, 2015). Actuellement, ce genre comprend 7 espèces valides ; *P. marinus*, *P. olseni* (*P. atlanticus*), *P. cheasapeaki* (*P. andrewsi*), *P. beihainensis*, *P. honshuensis*, *P. mediterraneus* et *P. qugwadi*, les deux premières étant considérées comme pathogènes majeurs et à déclaration obligatoire par la OIE (OIE 2018). Les espèces de *Perkinsus* affectent les hémocytes de mollusque, provoquent une anémie hémolytique et une dégénérescence des tissus, entraînant un déséquilibre énergétique, une perte de croissance et un possible décès ultérieur. L'augmentation de la prévalence de *P. cheasapeaki* de 4% chez des reproducteurs « porteurs sains » à hauteur de 72%

durant les mortalités massives de *A. tuberculosa* confirme l'intérêt d'instaurer des outils de vigilance épidémiologique. Il serait indispensable de vérifier si les mortalités furent consécutives à *P. cheasapeaki* ou si l'augmentation de la prévalence est due à une transmission horizontale durant les mortalités. Dans tous les cas, la présence de ces parasites est problématique. En effet, Dang *et al.*, 2013 ont montré que la présence de *Perkinsus* affecte les fonctions physiologiques d'animaux "asymptomatiques" en réduisant leur croissance de près de 25%. Pire encore, la présence de *P. marinus* a entraîné des mortalités massives chez les huîtres d'élevage et sauvages aux États-Unis et a jusqu'à présent entravé les efforts de restauration et de repeuplement dans ces zones (Smolowitz R., 2013). Il apparaît dès lors primordial de poursuivre des études de pathologies analytiques afin d'approfondir les connaissances existantes sur les relations *P. cheasapeaki* – *A. tuberculosa*. Une première approche pourrait être de réaliser des mises en culture *in vitro* de ce parasite afin d'évaluer son impact par infections expérimentales (Waki *et al.*, 2012, Dang *et al.*, 2015). Si la pathogénicité de ce protozoaire était avérée, il serait envisageable de réaliser des opérations de sélection basées sur l'augmentation de la résistance à *Perkinsus* sur le modèle de l'huître Nord-Américaine (Proestou *et al.*, 2016).

Durant cette thèse, d'importantes mortalités des élevages larvaires et des reproducteurs de *A. tuberculosa* furent imputées à la présence de *Pseudomonas sp.* CNLS1P. De nombreuses espèces du genre *Pseudomonas* sont pathogènes opportunistes et associées à de graves infections chez l'humain et ses animaux domestiques (Streeter et Katouli 2016, Peix *et al.*, 2009). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* infectent sévèrement les élevages de poissons (Haenen 2017), les crustacés (Ramalingam et Ramarani 2007, Soltani *et al.*, 2010). Chez les bivalves, les *Pseudomonas* détectées durant les bactérioses sont généralement associées à une infection secondaire après une vibriose (Prado *et al.*, 2010 ; Travers *et al.*, 2015) et très peu de travaux ont démontré le caractère strictement pathogène de *Pseudomonas* envers les bivalves (Lodeiros *et al.*, 1992 ; Molloy *et al.*, 2013a, 2013b). Les travaux de Molloy *et al.*, (2013a, 2013b) démontrèrent que la pathogénicité de *P. fluorescens* envers plusieurs espèces de moules d'eau douce était liée aussi bien à la sécrétion extracellulaire de métabolites toxiques qu'à une cytotoxicité par ingestion des cellules

vivantes ou mortes.

Les résultats préliminaires présentés dans cette étude ont été complétés afin de démontrer la virulence de la souche de *Pseudomonas sp.* CNLS1P isolée et ses mécanismes d'actions. Les infections expérimentales réalisées démontrèrent que l'injection directe de CNLS1P provoquait des mortalités à hauteur de 52%, tandis que les toxines du surnageant provoquaient 24% de pertes en 1 mois (Diringer *et al.*, 2017). Des analyses complémentaires par PCR permirent de confirmer la présence de gènes codant pour les toxines ExoU et ExoS et d'identifier CNLS1P comme *Pseudomonas aeruginosa* tandis que les analyses par MALDI TOF TOF de l'excrétome mirent en évidence un cocktail de 5 toxines, dont 3 entomotoxines.

Après avoir identifié et caractérisé ce pathogène, l'enjeu majeur reposerait sur le développement d'outils de prévention et de contrôle de pathogènes bactériens. En ce qui concerne la gestion de l'eau en aquaculture, principale source d'entrée des pathogènes, les tentatives de stérilisation excessive ainsi que l'utilisation d'antibiotiques se sont révélées insuffisantes pour éviter les épisodes de mortalité - voire contreproductifs en raison de l'élimination de bactéries potentiellement bénéfiques et de l'émergence de souches pathogènes multirésistantes aux antibiotiques (Kemper N., 2008). L'utilisation de bactéries probiotiques antagonistes capables de protéger les larves et les reproducteurs apparaît comme une stratégie plus durable.

Les bactéries probiotiques peuvent bénéficier aux élevages par la production de composés antimicrobiens, d'inhibiteurs du *quorum sensing* (système de communication microbienne basée sur les échanges de signaux moléculaires), en entrant en compétition pour les nutriments et l'espace, mais également en améliorant l'assimilation des aliments, en stimulant le développement du système digestif et du système immunitaire de l'hôte (Prado *et al.*, 2010 ; Desriac *et al.*, 2013). Des études récentes suggèrent que certaines bactéries circulant dans l'hémolymphe des bivalves puissent jouer un rôle important dans la défense immunitaire (Defer *et al.*, 2013). La caractérisation par métagénomique du microbiote présent dans le sang, l'estomac et les gonades d'adultes « sains » de *A. tuberculosa* ont permis d'une part de déterminer que les adultes sains

arboraient une flore microbienne diverse, et que la perte de cette diversité était associée à des mortalités (Pretell K., 2016 ; Zapata K., 2017). D'autre part, des collections de bactéries indigènes spécifiques purent être isolées. Les prochains travaux devront s'attarder à sélectionner et évaluer ces bactéries comme candidates au rôle de probiotiques afin de pouvoir élire des souches capables de coloniser les larves et les adultes de *A. tuberculosa* et de prévenir les maladies.

L'étude microbiologique des biofilms s'avère également aussi importante que prometteuse afin d'améliorer la productivité des élevages larvaires. En effet, les larves de bivalves marins peuvent choisir de se fixer ou non en réponse à des signaux liés aux substrats (Gosling E., 2015; Helm et Bourne, 2004). Ces signaux peuvent indiquer la présence de nourriture, d'adultes de la même espèce, de prédateurs ou d'autres facteurs environnementaux indicateurs de la qualité du site où se fixer. La nature et la composition des biofilms microbiens qui se développent à la surface du substrat semblent déterminantes et peuvent favoriser, ou inhiber la colonisation des surfaces par les invertébrés marins (Hadfield M.G., 2011). Il apparaît que la structure de la communauté microbienne, plus que l'abondance microbienne, a la plus grande influence sur l'induction de la colonisation du bivalve (Toupoint *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2003). Néanmoins, la composition de biofilms naturels est très aléatoire en raison des variations environnementales naturelles, contrairement à la nécessité pour l'aquaculture de disposer d'une technique normalisée et efficace pour l'induction synchrone de la fixation. Dans cette perspective, il serait intéressant d'évaluer la capacité de certaines bactéries et microalgues isolées de biofilms naturels de la mangrove afin d'augmenter les taux de fixation de l'AN ainsi que cela a été fait dans des études réalisées chez d'autres bivalves (Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Sur un plan plus « économique », ce projet a ouvert la voie à la production durable d'AN en répondant à la première nécessité, celle de produire du naissain. Actuellement, la perspective d'obtenir du naissain en laboratoire permet aux associations de pêcheurs, aux ONG et aux entités gouvernementales de se projeter dans le futur de cette activité et la conservation de cette espèce.

Le premier point à court terme sera d'assurer le maintien des opérations de production

de naissains destinés aux repeuplements et aux essais aquacoles. Dans ce sens, il existe des fonds nationaux (subventions) qui doivent permettre la poursuite de ce travail. Le maintien des financements sur le long terme pourrait être entretenu par le paiement de permis de pêches qui soutiennent les opérations de repeuplement comme c'est le cas pour la pêche continentale aux Etats Unis (Sayer M.D.J., 2019). Une autre alternative étant l'instauration de quotas propres à chaque association où le nombre d'animaux pêchés serait proportionnel au nombre d'individus ensemencés (Bell *et al.*, 2008). Il apparaît néanmoins peu probable que les extracteurs se tournent rapidement vers des activités d'aquaculture. En effet, bien qu'intéressants, les essais de grossissement dans des enclos, lanternes suspendues ou nasses présentés dans la littérature indiquent qu'il faudrait de 1 à 2 ans avant de récolter des animaux de taille commercialisable. Il faut à cela ajouter les mortalités (d'ordres biotiques et abiotiques), la complexité de l'élevage (surveillance pour éviter les vols, obtention de concessions légales, assimilation de paramètres zootechniques...), les difficultés de reconversion (passer d'un extracteur dont les bénéfices s'obtiennent à court terme à un aquaculteur qui se projette dans l'avenir), et finalement les difficultés d'investissement de base (infrastructures, maintien du niveau de vie de la famille jusqu'à la pêche des premiers animaux élevés etc.). Pour autant que les taux de croissance et les survies de l'AN, à l'instar des autres bivalves, puissent s'améliorer de 10-15% par génération via des programmes de sélections génétiques (Hollenbeck *et al.*, 2018), qu'il soit possible d'entreprendre des actions de formation continue des extracteurs et d'obtenir des subventions pour les infrastructures et le maintien des populations jusqu'à la récolte, il reste un problème de fond essentiel à régler aussi bien pour l'aquaculture que pour le repeuplement : la rentabilité de l'activité.

En effet, le commerce de l'AN est réputé être irrégulier et informel, les fournisseurs et les acheteurs partagent principalement des liens fondés sur les liens familiaux et la confiance. De leur côté, les consommateurs sont peu exigeants en termes de critères de tailles minimales, de provenance, de légalité et d'innocuité des animaux pêchés. Ils se basent principalement sur un concept plus général : l'exigence d'un produit frais et économique (Preciado H., 2018). Il convient donc en parallèle à la production ou au repeuplement de développer ou créer des marchés plus exigeants prêts à valoriser un

produit de qualité et « écologique » car non déprédateur. Ce marché existe, et correspond aux restaurants gastronomiques des grandes villes, représentés par la Société Péruvienne de Gastronomie (Apega). L'Apega a banni depuis près de 10 ans l'AN de ses cartes pour des raisons de risques sanitaires et de responsabilité environnementale. L'Apega représenterait néanmoins un marché capable d'assimiler toutes les AN collectées au niveau national (≈ 3 millions d'unité par an) (Preciado H., 2018). Pour reconquérir cette niche économique susceptible d'acheter des AN jusqu'à 4 fois le prix normal, un projet pilote sera lancé fin 2019 et devrait se cristalliser autour de 3 axes principaux.

Le premier correspond au développement d'un protocole de dépuración de l'AN afin de réduire les risques sanitaires. La dépuración est une technique qui vise à éliminer les microorganismes pathogènes des bivalves légèrement ou modérément contaminés. Les animaux sont placés dans des bassins d'eau de mer propre de façon à ce qu'ils reprennent leur activité normale de filtration et expulsent leurs contenus intestinaux pendant une période comprise entre quelques heures et plusieurs jours (Lee *et al.*, 2010). La durée de cette technique dépend de nombreux paramètres propres à chaque espèce qui devront être évalués. En plus des critères microbiologiques classiques et de l'évaluation moléculaire de la présence de gastroentérovirus (Lee *et al.*, 2010), une vigilance par métagénomique du microbiome de l'eau des points d'extractions et des contenus stomacaux sera proposée afin d'identifier de possibles zones insalubres.

Le second point correspond à la traçabilité du produit, avec l'instauration de permis de pêches pour des extracteurs autorisés à la collecte d'AN de taille légale dans la zone du SNLMT. Le projet développera une application afin d'assurer la traçabilité du lot depuis son extraction jusqu'à sa commercialisation.

Le dernier point consistera à instaurer une dénomination d'origine contrôlée de l'AN de Tumbes. Cette reconnaissance est importante car l'appellation d'origine contrôlée implique non seulement une reconnaissance d'une origine géographique mais également certaines caractéristiques ou qualités intrinsèques au produit, en particulier son processus de production. Il sera possible de renforcer cette singularité en exploitant les résultats de diversité génétique obtenus dans cette étude.

Dans son ensemble, cette stratégie qui a été acceptée par l'Apega devrait améliorer la

chaîne de production de l'AN tant d'un point de vue économique, social qu'écologique en se basant sur l'offre d'un produit de haute qualité, contrôlé, traçable et orienté vers les marchés gastronomiques formels du pays. Cette démarche devrait progressivement permettre de changer le modèle économique historique de l'AN, d'un produit de base surexploité à celui d'une denrée dont la valeur ajoutée justifierait le processus de conservation, au bénéfice de l'écosystème et des populations qui y sont associées.

Finalement, les travaux présentés dans cette thèse ont montré la nécessité d'intégrer les biotechnologies moléculaires modernes aux biotechnologies classiques afin d'offrir un modèle, pour les futures stratégies de production et de repeuplement des stocks, extrapolable à d'autres espèces vulnérables. La pérennité de tels projets nécessitera la création de collaborations entre les populations natives, les institutions gouvernementales, les groupes environnementaux, le secteur privé de l'aquaculture et la communauté scientifique.

Bibliographie

- Aguirre-Rubí, J. R., Ortiz-Zarragoitia, M., Izagirre, U., Etxebarria, N., Espinoza, F., & Marigómez, I. (2019). Prospective biomonitor and sentinel bivalve species for pollution monitoring and ecosystem health disturbance assessment in mangrove-lined Nicaraguan coasts. *Science of the Total Environment*, *649*, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.269>
- Aizpuru, M., Achard, F., & Blasco, F. (2000). Global Assessment of Cover Change of the Mangrove Forests using satellite imagery at medium to high resolution. In *EEC Research project n 15017-1999-05. FIED ISP FR*. Ispra (Italy) ISPRA/LET.
- Alemán, S., Montero, P., Ordinola, E., & Vera, M. (2017). PROSPECCIÓN BIOECOLÓGICA DE CONCHA NEGRA *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) Y CONCHA HUEQUERA *Anadara similis* (Adams, 1852) (ARCOIDA: ARCIDAE) EN LOS MANGLARES DE TUMBES, PRIMAVERA 2014. *Instituto Del Mar Del Perú*, *44*(3), 371–384. <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/3220>
- Allen, S. K., & Shellfish, H. (1993). Genetic Improvement of the Eastern Oyster for Growth and Disease Resistance in the Northeast. *Northeastern Regional Aquaculture Center*, *210*.
- anadara* - *PubMed* - *NCBI*. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=anadara>
- Appleyard, S. A., & Ward, R. D. (2006). Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, *254*(1–4), 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.017>
- Arnold, W. S. (2001). Bivalve enhancement and restoration strategies in Florida, U.S.A. In *Coastal Shellfish — A Sustainable Resource* (pp. 7–19). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0434-3_2
- Arnold, W. S. (2008). Application of larval release for restocking and stock enhancement of coastal marine bivalve populations. *Reviews in Fisheries Science*, *16*(1–3), 65–71.

<https://doi.org/10.1080/10641260701678140>

- Arzul, I., Corbeil, S., Morga, B., & Renault, T. (2017). Viruses infecting marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, *147*, 118–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.009>
- Arzul, I., Langlade, A., Chollet, B., Robert, M., Ferrand, S., Omnes, E., Lerond, S., Couraleau, Y., Joly, J. P., François, C., & Garcia, C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology*, *179*(1–3), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.060>
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., & Davison, A. J. (2001). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, *82*(4), 865–870. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-865>
- Astorga, M. P. (2014). Genetic considerations for mollusk production in aquaculture: Current state of knowledge. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 5, Issue DEC). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00435>
- Azzoug, M., Carré, M., & Schauer, A. J. (2012). Reconstructing the duration of the West African Monsoon season from growth patterns and isotopic signals of shells of *Anadara senilis* (Saloum Delta, Senegal). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *346–347*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2012.06.001>
- Bai, C., Gao, W., Wang, C., Yu, T., Zhang, T., Qiu, Z., Wang, Q., & Huang, J. (2016). Identification and characterization of ostreid herpesvirus 1 associated with massive mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks in China. *Diseases of Aquatic Organisms*, *118*(1), 65–75. <https://doi.org/10.3354/dao02958>
- Barbaroux, G., Bizzarri, M. R., Hasan, L., Miuccio, J., Saha, J., Sanders, J., & Spaul, J. (2012). *Cover photographs courtesy of FAO, O*. <http://www.fao.org/3/a-i2727e.pdf>
- Barman, H. K., Patra, S. K., Das, V., Mohapatra, S. D., Jayasankar, P., Mohapatra, C., Mohanta, R., Panda, R. P., & Rath, S. N. (2012). Identification and characterization of differentially expressed transcripts in the gills of freshwater prawn

- (*Macrobrachium rosenbergii*) under salt stress. *The Scientific World Journal*, 2012.
<https://doi.org/10.1100/2012/149361>
- Barraza, J. E., Armero-Guardado, J. A., & De Toledo, Z. M. V. (2004). The red tide event in El Salvador, August 2001-January 2002. *Revista de Biología Tropical*, 52(SUPPL. 1), 1–4. <https://doi.org/10.15517/rbt.v52i1.26489>
- Basqueiro C., E., Massó R., J. A., & Guajardo B., H. (1982). *Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur*. https://books.google.com.pe/books/about/Distribución_y_abundancia_de_moluscos_d.html?id=y91jAAAAMAAJ&redir_esc=y
- Behrens-Chapuis, S., Malewski, T., Suchecka, E., Geiger, M. F., Herder, F., & Bogdanowicz, W. (2018). Discriminating European cyprinid specimens by barcode high-resolution melting analysis (Bar-HRM)—A cost efficient and faster way for specimen assignment? *Fisheries Research*, 204, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.02.007>
- Bell, J. D., Leber, K. M., Blankenship, H. L., Loneragan, N. R., & Masuda, R. (2008). A new era for restocking, stock enhancement and sea ranching of coastal fisheries resources. *Reviews in Fisheries Science*, 16(1–3), 1–9. <https://doi.org/10.1080/10641260701776951>
- Bodmer, W. F., & Falconer, D. S. (1961). Introduction to Quantitative Genetics. *Biometrics*, 17(2), 329. <https://doi.org/10.2307/2528001>
- Bookhagen, B., & Strecker, M. R. (2010). Modern Andean Rainfall Variation during ENSO Cycles and its Impact on the Amazon Drainage Basin. In *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past* (pp. 224–241). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444306408.ch14>
- Borda, C. A., & Cruz, R. (2004). REPRODUCCIÓN Y RECLUTAMIENTO DEL MOLUSCO *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833...: EBSCOhost. *Revista de Investigaciones Marinas*, 25(3), 185–195. <http://nebulosa.icesi.edu.co:2517/ehost/detail/detail?vid=16&sid=0183f1d2->

d188-4c99-9a08-

f4a8785e3007%40sessionmgr120&hid=115&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1laG9
zdC1saXZl#AN=20861433&db=asn

Boudry, P., Barré, M., & Gérard, A. (1997). GENETIC IMPROVEMENT AND SELECTION IN SHELLFISH: A REVIEW BASED ON OYSTER RESEARCH AND PRODUCTION. *Zaragoza, Spain*, 28–29.

https://www.researchgate.net/publication/29492496_Genetic_Improvement_and_Selection_in_Shellfish_A_Review_Based_on_Oyster_Research_and_Production

Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V., & Bonhomme, F. (2002). High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204(3–4), 283–296. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00841-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00841-9)

Brock, J. A., & Bullis, R. (2001). Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. In *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (pp. 137–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50913-0.50010-2>

Broom, M. (1985). The biology and culture of marine bivalve molluscs of the genus *Anadara*. In *Management*. https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=U_0qqH2FFh8C&oi=fnd&pg=PP6&dq=The+Biology+and+Culture+of+Marine+Bivalve+Molluscs+of+the+Genus+Anadara&ots=JS0VeWfhPU&sig=VS6k6flysW9Vb65IK12Mi1Biz-Y

Burt, A., Maher, W., Roach, A., Krikowa, F., Honkoop, P., & Bayne, B. (2007). The accumulation of Zn, Se, Cd, and Pb and physiological condition of *Anadara trapezia* transplanted to a contamination gradient in Lake Macquarie, New South Wales, Australia. *Marine Environmental Research*, 64(1), 54–78. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.12.009>

Butler, P. G., Freitas, P. S., Burchell, M., & Chauvaud, L. (2018). Archaeology and sclerochronology of marine bivalves. In *Goods and Services of Marine Bivalves* (pp. 413–444). https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_21

- Callejas, L., Darce, A. C. M., Amador, J. J., Conklin, L., Gaffga, N., Schurz Rogers, H., DeGrasse, S., Hall, S., Earley, M., Mei, J., Rubin, C., Aldighieri, S., Backer, L. C., & Azziz-Baumgartner, E. (2015). Paralytic shellfish poisonings resulting from an algal bloom in Nicaragua. *BMC Research Notes*, 8(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1012-4>
- Camara, M. D., & Symonds, J. E. (2014). Genetic improvement of New Zealand aquaculture species: Programmes, progress and prospects. In *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* (Vol. 48, Issue 3, pp. 466–491). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00288330.2014.932291>
- Camara, Mark D., & Vadopalas, B. (2009). Genetic Aspects of Restoring Olympia Oysters and Other Native Bivalves: Balancing the Need for Action, Good Intentions, and the Risks of Making Things Worse. *Journal of Shellfish Research*, 28(1), 121–145. <https://doi.org/10.2983/035.028.0104>
- Carrier, T. J., & Reitzel, A. M. (2017). The hologenome across environments and the implications of a host-associated microbial repertoire. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00802>
- Castagna, M., & Chanley, P. (1973). Salinity tolerance of some marine bivalves from inshore and estuarine environments in Virginia waters on the western mid-Atlantic coast. *Malacologia*, 12, 47–96. https://archive.org/stream/cbarchive_49076_salinitytoleranceofsomeb1973/salinitytoleranceofsomeb1973_djvu.txt
- CENDEPESCA, & Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2009). *Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de ostra japonesa (Crassostrea gigas)*. https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/2271029E1/materials/pdf/2009/2009_1_2.pdf
- CISIPA 2017: 03. *Aplicación de las “omicas” para el estudio de las ba...* (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <https://es.slideshare.net/SanipesPeru/aplicacin-de-las-omicas-para-el-estudio-de-las-bacteriosis-en-cultivos-de-la-concha-negra->

anadara-tuberculosa

Cobeña, S., & Tairon, E. (2008). *Cultivo de concha prieta anadara tuberculosa a diferentes densidades en estanques camaroneros utilizando canastas de cultivo.*

Cordero, D., Delgado, M., Liu, B., Ruesink, J., & Saavedra, C. (2017). Population genetics of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) introduced in North America and Europe. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39745>

Cornejo, X. (2014). *Plants of the South American Pacific mangrove swamps : Columbia, Ecuador, Perú. January, 311.* https://www.researchgate.net/publication/305434365_Plants_of_South_American_Pacific_Mangrove_Swamps_Colombia_Ecuador_Peru

Cowley, J., Hall, M., Cadogan, L., ... K. S.-D. of aquatic, & 2002, undefined. (n.d.). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. In *int-res.com*. Retrieved March 14, 2020, from www.int-res.com

Craeymeersch, J. A., Faasse, M. A., Gheerardyn, H., Troost, K., Nijland, R., Engelberts, A., Perdon, K. J., Van Den Ende, D., & Van Zwol, J. (2019). First records of the dwarf surf clam *Mulinia lateralis* (say, 1822) in Europe. *Marine Biodiversity Records*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s41200-019-0164-7>

Crecimiento y engorde de concha prieta (anadara tuberculosa) en corrales en los manglares de la isla Payana | Conference Proceedings. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <http://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/article/view/30>

Cross, I., Merlo, M. A., Rodríguez, M. E., Portela-Bens, S., & Rebordinos, L. (2014). Adaptation to abiotic stress in the oyster *Crassostrea angulata* relays on genetic polymorphisms. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.011>

Cruz, R., & Borda, C. (2003). Estado de explotación y pronóstico de la pesquería de

Anadara tuberculosa (Sowerby, 1833) en el Pacífico Colombiano. *Revista de Investigaciones Marinas*, 24(3), 221–230.

D. Kusakabe, "Studies on the Culture of the Artificial Seeds of the Ark Shell *Anadara subcrenata* (Lischke)," *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry Hiroshima University*, Vol. 2, No. 2, 1959, pp. 183-239. - References - Scientific Researc. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1062197](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1062197)

Dang, C., De Montaudouin, X., Binias, C., Salvo, F., Caill-Milly, N., Bald, J., & Soudant, P. (2013). Correlation between perkinsosis and growth in clams *ruditapes* spp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(3), 255–265. <https://doi.org/10.3354/dao02640>

Dang, C., Dungan, C. F., Scott, G. P., & Reece, K. S. (2015). Perkinsus sp. infections and in vitro isolates from *Anadara trapezia* (mud arks) of Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 51–58. <https://doi.org/10.3354/dao02816>

Davenport, J., & Wong, T. M. (1986). Responses of the blood cockle *Anadara granosa* (L.) (Bivalvia: Arcidae) to salinity, hypoxia and aerial exposure. *Aquaculture*, 56(2), 151–162. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90024-4)

Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2013). Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(6), 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>

Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., & Fleury, Y. (2014). Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: Haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 350, Issue 1, pp. 107–116). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12308>

Diringer, B. B., Vasquez, R., Moreno, V., Pretell, K., & Sahuquet, M. (2019). *Peru project*

studies blood cockles for stock enhancement , aquaculture. July 2012.
<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/peru-project-studies-blood-cockles-for-stock-enhancement-aquaculture/>

Doall, M. H., Padilla, D. K., Lobue, C. P., Clapp, C., Webb, A. R., & Hornstein, J. (2008). Evaluating Northern Quahog (= Hard Clam, *Mercenaria mercenaria* L.) Restoration: Are Transplanted Clams Spawning and Reconditioning. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1069–1080. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1069>

Eierman, L. E., & Hare, M. P. (2014). Transcriptomic analysis of candidate osmoregulatory genes in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *BMC Genomics*, 15(1), 503. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-503>

FAO. (2007). Fishing and Aquaculture Statistics ; Statistiques des pêches et de l'aquaculture ; Estadísticas de pesca y acuicultura. Retrieved March 14, 2020, from www.fao.org/icalog/inter-e.htm

FAO. (1999). World fisheries and aquaculture in review. *Nature and Resources*, 35(3), 4–13. Retrieved March 14, 2020, from www.fao.org/publications

FAO. (2002). towards 2015/2030 World agriculture: Summary report FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

FAO, P. y A. (2019). Miscellaneous pelagic fishes Capture production by species, fishing areas and countries or areas B-37 Poissons pélagiques divers Captures par espèces, zones de pêche et pays ou zones Peces pelágicos diversos Capturas por especies, áreas de pesca y países.

Fernández, B., & Brunker, T. (1977). Bacteriological study of bivalves from the Gulf of Nicoya, Costa Rica. I. Condition of the mollusk recently collected. *Revista de Biología Tropical*, 25(1), 101–107. <https://doi.org/10.15517/rbt.v25i1.25871>

Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (1995). *Guía FAO para la identificación para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental.*

- Flores, L. (2010). Tasa de crecimiento de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)(Bivalvia:Arcidae) en la reserva ecológica Manglares Cayapas-Mataje (REMACAM): un análisis basado en sistemas de cajas suspendidas. *Revista Ciencias Del Mar y Limnología*, 4(1), 89–98. <http://www.oceandocs.org/handle/1834/4838>
- Flores, L., Licandeo, R., Cubillos, L. A., & Mora, E. (2014). Intra-specific variability in life-history traits of *Anadara tuberculosa* (Mollusca: Bivalvia) in the mangrove ecosystem of the Southern coast of Ecuador. *Revista de Biología Tropical*, 62(2), 473–482. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i2.8501>
- Flores, L. (2017). Tasa de crecimiento de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) en la reserva ecológica manglares Cayapas-Mataje (remacam): un análisis basado en sistemas de cajas suspendidas. *Revista Ciencias del Mar y Limnología* - 1390-5767 Vol. 11 Núm. 1 (2017)
- French McCay, D. P., Peterson, C. H., DeAlteris, J. T., & Catena, J. (2003). Restoration that targets function as opposed to structure: Replacing lost bivalve production and filtration. In *Marine Ecology Progress Series* (Vol. 264, pp. 197–212). Inter-Research Science Center. <https://doi.org/10.3354/meps264197>
- Gaffney, P. M. (2006). The role of genetics in shellfish restoration. In *Aquatic Living Resources* (Vol. 19, Issue 3, pp. 277–282). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/alr:2006028>
- Gaffney, P. M., Davis, C. V., & Hawes, R. O. (1992). Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 105(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90157-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90157-G)
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. In *Molecular Ecology* (Vol. 18, Issue 22, pp. 4541–4550). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

294X.2009.04380.x

- Gao, Q., Song, L., Ni, D., Wu, L., Zhang, H., & Chang, Y. (2007). cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.010>
- García-Domínguez, F. A., de Haro-Hernández, A., García-Cuellar, Á., & Rodríguez-Astudillo, S. (2008). Ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* (Cowerby, 1833) Arcidae) en Bahía Magdalena, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(1), 143–152. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572008000100015>
- Giri, C., Zhu, Z., Tieszen, L. L., Singh, A., Gillette, S., & Kelmelis, J. A. (2008). Mangrove forest distributions and dynamics (19752005) of the tsunami-affected region of Asia. *Journal of Biogeography*, 35(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01806.x>
- Gosling, E. (2015). Marine Bivalve Molluscs: Second Edition. In *Marine Bivalve Molluscs: Second Edition*. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119045212>
- Gosling, E. M. (1982). Genetic variability in hatchery-produced Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 26(3–4), 273–287. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90163-6)
- Hadfield, M. G. (2011). Biofilms and Marine Invertebrate Larvae: What Bacteria Produce That Larvae Use to Choose Settlement Sites. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 453–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142753>
- Haenen, O. (2017). Major bacterial diseases affecting aquaculture. FAO Aquatic AMR Workshop 1, Mangalore, India.
- Hamilton, S. (2013). Assessing the role of commercial aquaculture in displacing mangrove forest. *Bulletin of Marine Science*, 89(2), 585–601. <https://doi.org/10.5343/bms.2012.1069>

- Hamilton, S. E., Castellanos-Galindo, G. A., Millones-Mayer, M., & Chen, M. (2018). Remote sensing of mangrove forests: Current techniques and existing databases. In *Coastal Research Library* (Vol. 25, pp. 497–520). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73016-5_22
- Hare, M. P., Allen, S. K., Bloomer, P., Camara, M. D., Carnegie, R. B., Murfree, J., Luckenbach, M., Meritt, D., Morrison, C., Paynter, K., Reece, K. S., & Rose, C. G. (2006). A genetic test for recruitment enhancement in Chesapeake Bay oysters, *Crassostrea virginica*, after population supplementation with a disease tolerant strain. *Conservation Genetics*, 7(5), 717–734. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9108-3>
- Harith, H., Lokman, H., Mohd, A., Mohd, F. (2015). Potential Natural Blood Cockle (*Anadara granosa*) Spawning Ground Based on Coastal Physical Disturbance during Great Diurnal Tide in Kapar, Selangor, Malaysia. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/283266466_Potential_Natural_Blood_Cockle_Anadara_granosa_Spawning_Ground_Based_on_Coastal_Physical_Disturbance_during_Great_Diurnal_Tide_in_Kapar_Selangor_Malaysia
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S. E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., & Guo, X. (2015). Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.023>
- Hedgecock, D., & Sly, F. (1990). Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 88(1), 21–38. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90316-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90316-F)
- Helm, M.M., Bourne, N., (2004). Hatchery culture of bivalves (A practical manual). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, Italy.
- Hogarth, P. J. (1999). The biology of mangroves. *The Biology of Mangroves*.
- Hollenbeck, C. M., & Johnston, I. A. (2018). Genomic tools and selective breeding in

- molluscs. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue JUL, p. 253). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00253>
- Hsu, H. C., Lo, C. F., Lin, S. C., Liu, K. F., Peng, S. E., Chang, Y. S., Chen, L. L., Liu, W. J., & Kou, G. H. (1999). Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(1), 13–19. <https://doi.org/10.3354/dao039013>
- IMARPE. (2007). *El bivalvo concha negra, Anadara Tuberculosa (Sowerby), en los manglares de Tumbes, Perú. Febrero 2007.* (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/2009>
- IMARPE. (2019). Información biológica y poblacional de los recursos concha negra (*Anadara tuberculosa*) y cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en Tumbes. Informe técnico 4P.
- INRENA. (2007). Plan Maestro del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes. Lima 10P.
- Jara-Marini, M. E., Tapia-Alcaraz, J. N., Dumer-Gutiérrez, J. A., García-Rico, L., García-Hernández, J., & Páez-Osuna, F. (2013). Comparative bioaccumulation of trace metals using six filter feeder organisms in a coastal lagoon ecosystem (of the central-east Gulf of California). *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(2), 1071–1085. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2615-z>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. In *Ecological Indicators* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Kusakabe, D. (1959). *Studies on the Culture of the Artificial Seeds of the Ark Shell Anadara subcrenata (Lischke), Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry Hiroshima University, Vol. 2, No. 2, 1959, pp. 183-239.* - References - *Scientific Researc.* (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1062197](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1062197)

- Lallias, D., Boudry, P., Lapègue, S., King, J. W., & Beaumont, A. R. (2010). Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics*, *11*(5), 1899–1910. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0081-0>
- Launey, S., Barre, M., Gerard, A., & Naciri-Graven, Y. (2001). Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae* -resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genetical Research*, *78*(3), 259–270. <https://doi.org/10.1017/s0016672301005353>
- Lee, R., Lovatelli, A., & Ababouch, L. (2010). *Purification des coquillages bivalves: aspects fondamentaux et pratiques Purification des coquillages bivalves: aspects fondamentaux et pratiques 511 FAO DOCUMENT TECHNIQUE SUR LES PÊCHES*. 156.
- Lim, S. J., Davis, B. G., Gill, D. E., Walton, J., Nachman, E., Engel, A. S., Anderson, L. C., & Campbell, B. J. (2019). Taxonomic and functional heterogeneity of the gill microbiome in a symbiotic coastal mangrove lucinid species. *ISME Journal*, *13*(4), 902–920. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0318-3>
- Lind, C. E., Evans, B. S., Knauer, J., Taylor, J. J. U., & Jerry, D. R. (2009). Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture*, *286*(1–2), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.009>
- Liong, P.C. (1979). Large scale mortality of cockle in Province Wellesley. *Malays. Agric. J.* *52*: 51-57.
- Lockwood, B. L., & Somero, G. N. (2011). Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*). *Molecular Ecology*, *20*(3), 517–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04973.x>
- Lodeiros, C., Freitas, L., & Vélez, A. (1992). Necrosis bacilar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. *Acta Cient. Venez*, *43*(3), 154–158. <https://www.worldcat.org/title/necrosis-bacilar-en-larvas-del-bivalvo-euvola-ziczac-linneo-1758-causada-por-una-pseudomonas-sp/oclc/69805597>

- Lokmer, A., & Mathias Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, *9*(3), 670–682. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160>
- López Sanmartín, M., Power, D. M., de la Herrán, R., Navas, J. I., & Batista, F. M. (2016). Evidence of vertical transmission of ostreid herpesvirus 1 in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *140*, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.012>
- Lucero, C., Cantera, J., & Nelra, R. (2012a). Pesquería y crecimiento de la piangua (arcoida: Arcidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico Colombiano, 2005-2007. *Revista de Biología Tropical*, *60*(1), 203–217. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i1.2754>
- Lucero, C., Cantera, J., & Nelra, R. (2012b). The fisheries and growth of ark clams (arcoida: Arcidae) *Anadara tuberculosa* in Málaga Bay, Colombian Pacific, 2005-2007. *Revista de Biología Tropical*, *60*(1), 203–217. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i1.2754>
- Macintosh, D. J., & Ashton, E. C. (2002). A Review of Mangrove Biodiversity Conservation and Management. *Ecosystems*, June. www.worldbank.org;
- MAGAP. (2015). *MANUAL PRÁCTICO DE PRODUCCIÓN DE CONCHA PRIETA “Anadara tuberculosa”, EN CONDICIONES DE LABORATORIO*. <https://docplayer.es/38320243-Manual-practico-de-produccion-de-concha-prieta-anadara-tuberculosa-en-condiciones-de-laboratorio.html>
- Mata, L., Abarca, G., Marranghello, L., & Viquez, R. (1990). Paralytic shellfish poisoning by *Spondylus calcifer* contaminated with *Pyrodinium bahamense*, Costa Rica, 1989-1990. *Revista de Biología Tropical*, *38*(1), 129–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2093952>
- Masache, D., Samaniego, E.T. (2008) Cultivo de concha prieta *Anadara tuberculosa* a diferentes densidades en estanques camaroneros utilizando canastas de cultivo (tesis de pregrado). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias,

Machala, Ecuador.

Mazón-Suàstegui, J., Robles-Mungaray, M. Ormart P., Monsalvo-Spencer P., Garzón-Favela, J., Reynoso-Granados T., Moctezuma, T. (2008). Reproducción controlada de tres especies de concha negra *Anadara Spp* en el laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.- UNAN León Facultad de Ciencia y Tecnología; Departamento de Biología. Segundo encuentro conchero León, Nicaragua.

Meistertzheim, A. L., Calvès, I., Rouse, V., Van Wormhoudt, A., Laroche, J., Huchette, S., & Paillard, C. (2014). New genetic markers to identify european resistant abalone to vibriosis revealed by high resolution melting analysis, a sensitive and fast approach. *Marine Biology*, 161(8), 1883–1893. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2470-2>

Mendoza, O., Peralta, T., (2007). Biología Reproductiva de *Anadara tuberculosa* (SOWEBY, 1833). Universidad Nacional de Tumbes. Tumbes.

Mendoza, O., & Alvitres, V. (2015). Growth and survival of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) on three densities. *Manglar*, 12(1), 55–64. <https://doi.org/10.17268/manglar.2015.007>

Meng, J., Zhu, Q., Zhang, L., Li, C., Li, L., She, Z., Huang, B., & Zhang, G. (2013). Genome and Transcriptome Analyses Provide Insight into the Euryhaline Adaptation Mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 8(3), e58563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058563>

Merriam-Webster. (2019). *Mangrove* | Definition of Mangrove by Merriam-Webster. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <https://www.merriam-webster.com/dictionary/mangrove>

Milbury, C. A., Meritt, D. W., Newel, R. I. E., & Gaffney, P. M. (2004). Mitochondrial DNA markers allow monitoring of oyster stock enhancement in the Chesapeake Bay. *Marine Biology*, 145(2), 351–359. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1312-z>

Molloy, D. P., Mayer, D. A., Gaylo, M. J., Morse, J. T., Presti, K. T., Sawyko, P. M.,

- Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Laruelle, F., Nishikawa, K. C., & Griffin, B. H. (2013). *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A - a biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.012>
- Molloy, D. P., Mayer, D. A., Giamberini, L., & Gaylo, M. J. (2013). Mode of action of *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: Dreissenidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.013>
- Mora, E., Moreno, J., Jurado, V. (2011). Un análisis de la pesquería del recurso concha en Ecuador durante el 2010. Instituto Nacional de Pesca, Boletín Científico y técnico, 21(2), 1-13.
- Morgan, G. R. (1997). Individual Quota Management in Fisheries. Methodologies for determining catch Quotas and Initial Quota allocation. In *FAO. Fisheries Technical Paper*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/a-w7292e/index.html%5Cnhttp://www.fao.org/documents/card/en/c/39ea3f4b-10a7-5837-a68b-18170aa7e266/>
- Morrison, M. (2015). Late Holocene Aboriginal shellfish production strategies in Northern Australia: Insights from prunung (Red Beach), Weipa, Cape York Peninsula. *Queensland Archaeological Research*, 18(2015), 1–27. <https://doi.org/10.25120/qar.18.2015.3498>
- NCBI, (2019). *anadara* - *PubMed* - *NCBI*. (n.d.). Retrieved March 14, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=anadara>
- Nieves-Soto, M., Enriquez-Ocaña, F., Piña-Valdez, P., Maeda-Martínez, A. N., Almodóvar-Cebreros, J. R., & Acosta-Salmón, H. (2011). Is the mangrove cockle *Anadara tuberculosa* a candidate for effluent bioremediation? Energy budgets under combined conditions of temperature and salinity. *Aquaculture*, 318(3–4), 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.041>

- NOAA. (2016). *What are El Nino and La Nina?* National Ocean Service | NOAA | Department of Commerce. <http://oceanservice.noaa.gov/facts/ninonina.html>
- North, E. W., King, D. M., Xu, J., Hood, R., Newell, R. I. E., Paynter, K., Kellogg, M. L., Liddel, M. K., & Boesch, D. F. (2010). Linking optimization and ecological models in a decision support tool for oyster restoration and management. *Ecological Applications*, 20(3), 851–866. <https://doi.org/10.1890/08-1733.1>
- Okera, W. (1976). Observations on some population parameters of exploited stocks of *Senilia senilis* (= *Arca senilis*) in Sierra Leone. *Marine Biology*, 38(3), 217–229. <https://doi.org/10.1007/BF00388935>
- Oliver, P. G., & Holmes, A. M. (2006). The Arcoidea (Mollusca: Bivalvia): A review of the current phenetic-based systematics. In *Zoological Journal of the Linnean Society* (Vol. 148, Issue 3, pp. 237–251). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00256.x>
- Oyarzún, D., & Brierley, C. M. (2019). The future of coastal upwelling in the Humboldt current from model projections. *Climate Dynamics*, 52(1–2), 599–615. <https://doi.org/10.1007/s00382-018-4158-7>
- Paillard, C. (2016). an Ecological Approach To Understanding Host-Pathogen-Environment Interactions: the Case of Brown Ring Disease in Clams. *Oysters and Clams: Cultivation, Habitat Threats and Ecological Impact*. https://www.researchgate.net/publication/312164443_AN_ECOLOGICAL_APPROACH_TO_UNDERSTANDING_HOST-PATHOGEN-ENVIRONMENT_INTERACTIONS_THE_CASE_OF_BROWN_RING_DISEASE_IN_CLAMS
- Pante, E., Rohfritsch, A., Becquet, V., Belkhir, K., Bierne, N., & Garcia, P. (2012). SNP Detection from De Novo Transcriptome Sequencing in the Bivalve *Macoma balthica*: Marker Development for Evolutionary Studies. *PLoS ONE*, 7(12), e52302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052302>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current

- status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1132–1147). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Penven, P., Echevin, V., Pasapera, J., Colas, F., & Tam, J. (2005). Average circulation, seasonal cycle, and mesoscale dynamics of the Peru Current System: A modeling approach. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, 110(10), 1–21. <https://doi.org/10.1029/2005JC002945>
- Philander, G. S. (1989). *El Niño, La Niña, and the Southern Oscillation (Vol.46). International Geophysics Series*. Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/el-nino-la-nina-and-the-southern-oscillation/philander/978-0-12-553235-8>
- Pierce, M. L., & Ward, J. E. (2018). Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family Ostreidae. *Journal of Shellfish Research*, 37(4), 793–806. <https://doi.org/10.2983/035.037.0410>
- Poma, C. (1981). Estudio de la concha negra: Bioecología, explotación y cultivo. Dirección Zonal de Pesquería- Tumbes.
- Pollack, J. B., Cleveland, A., Palmer, T. A., Reisinger, A. S., & Montagna, P. A. (2012). A restoration suitability index model for the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in the Mission-Aransas Estuary, TX, USA. *PLoS ONE*, 7(7), e40839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040839>
- Preciado, H.C. (2018). Desarrollo de la Cadena Productiva de la Concha Negra (*Anadara Tuberculosa*) con enfoque de bionegocio. 22P.
- Pretell, K., Zapata, K., Masias, P., Cedeño, V., Lignot, J., Mialhe, E., Diringer, B. (2017). “Detección de *Perkinsus sp.* en el bivalvo *Anadara tuberculosa* “concha negra” Perú-Ecuador”. CISIPA <https://es.slideshare.net/SanipesPeru/deteccion-de-perkinsus-sp-en-el-bivalvo-anadara-tuberculosa-concha-negra-perecuador>
- Pretell, K., (2016.). *UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES Identificación de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de la sangre y tracto digestivo de*

reproductores de concha negra Anadara tuberculosa. 60P.

Prado, S., Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 145, Issues 3–4, pp. 187–197). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.021>

Price, E. O. (1984). Behavioral aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology*, 59(1), 1–32. <https://doi.org/10.1086/413673>

Proestou, D. A., Vinyard, B. T., Corbett, R. J., Piesz, J., Allen, S. K., Small, J. M., Li, C., Liu, M., DeBrosse, G., Guo, X., Rawson, P., & Gómez-Chiarri, M. (2016). Performance of selectively-bred lines of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, across eastern US estuaries. *Aquaculture*, 464, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.012>

Quizhpe, P., Yáñez, D., Jimbo, J. (2017). Crecimiento y engorde de concha prieta (*Anadara tuberculosa*) en corrales en los manglares de la isla Payana. *Conference Proceedings*, [S.l.], v.1,n.1,ISSN 2588-056X.

Ramalingam, K., & Ramarani, S. (2007). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* - Histopathological and electron microscopic study. *Journal of Environmental Biology*, 28(3), 627–635. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380087>

Ranjard, L., Wong, T. K. F., Külheim, C., Rodrigo, A. G., Ragg, N. L. C., Patel, S., & Dunphy, B. J. (2018). Complete mitochondrial genome of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Mollusca: Mytiloidea), from long nanopore sequencing reads. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 3(1), 175–176. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1437810>

Reid, D. (2007). Peruvian Beach Ridges: Records of Human Activity and Climate Change. *Honors College*, 2. https://www.researchgate.net/publication/304129474_Peruvian_Beach_Ridges_Records_of_Human_Activity_and_Climate_Change

- Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., & Birkbeck, T. H. (2003). Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(3), 249–258. <https://doi.org/10.3354/dao056249>
- Reyes D., (2015). Cultivo experimental de la concha casco de burro *Anadara tuberculosa* a diferentes densidades dentro del área de manglar en Las Lisas, Chiquimulilla, Santa Rosa, Guatemala. Universidad De San Carlos De Guatemala. 41P.
- Saavedra, C. (1997). Low effective sizes in hatchery populations of the European oyster (*Ostrea edulis*): Implications for the management of genetic resources. *J Shellfish Res.* 16:441-446
- Sahuquet, M. (2013). Biotechnologies appliquées à deux espèces de mollusques d'intérêt aquacole: Cephalopoda, *Octopus sp* et Bivalvia, *Anadara tuberculosa*. EPHE. 133P
- Sánchez-Ortiz, A. C., Angulo, C., Luna-González, A., Álvarez-Ruiz, P., Mazón-Suástegui, J. M., & Campa-Córdova, Á. I. (2016). Effect of mixed-Bacillus spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 59, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.022>
- Santoso, A., Mcphaden, M. J., & Cai, W. (2017). The Defining Characteristics of ENSO Extremes and the Strong 2015/2016 El Niño. In *Reviews of Geophysics* (Vol. 55, Issue 4, pp. 1079–1129). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/2017RG000560>
- Sayer, M. D. J. (2019). Fishery manipulation through stock enhancement or restoration. In *Encyclopedia of Ocean Sciences* (pp. 385–392). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.04115-4>
- Shin, Y.-K., Kim, B.-H., Oh, B.-S., Jung, C.-G., Sohn, S.-G., & Lee, J.-S. (2006). Physiological Responses of the Ark Shell *Scapharca broughtonii* (Bivalvia: Arcidae) to Decreases in Salinity. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 9(4), 153–159.

<https://doi.org/10.5657/fas.2006.9.4.153>

Silva Benavides, A. M., & Bonilla Carrión, R. (2001). [Abundance and morphometry of tuberculosa *Anadara* and *A. similis* (Mollusca: Bivalvia) in the Manglar de Purruja, Dulce Gulf, Costa Rica]. *Revista de Biología Tropical*, 49 Suppl 2, 315–320. https://www.researchgate.net/publication/8444134_Abundance_and_morphometry_of_tuberculosa_Anadara_and_A_similis_Mollusca_Bivalvia_in_the_Manglar_de_Purruja_Dulce_Gulf_Costa_Rica

Singh, B., Mishra, S., Bohra, A., Joshi, R., & Siddique, K. H. M. (2018). Crop Phenomics for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. In *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 277–296). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813066-7.00015-2>

Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K., & Strand, Ø. (2018). Goods and services of marine bivalves. In *Goods and Services of Marine Bivalves*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9>

Smolowitz, R. (2013). A Review of Current State of Knowledge Concerning *Perkinsus marinus* Effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the Eastern Oyster). In *Veterinary Pathology* (Vol. 50, Issue 3, pp. 404–411). SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA. <https://doi.org/10.1177/0300985813480806>

Soltani, M., Ahmadi, M., Yavari, H., & Mir zargar, S. S. (2010). Red-pink colony-producing *Pseudomonas* sp. is the causative agent of mass mortality in larvae and post-larvae of *Litopenaeus vannamei* raised in hatcheries in south Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 4(2). <https://doi.org/10.22059/ijvm.2010.21360>

Srikanth, S., Lum, S. K. Y., & Chen, Z. (2016). Mangrove root: adaptations and ecological importance. In *Trees - Structure and Function* (Vol. 30, Issue 2, pp. 451–465). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1233-0>

Spalding, M., Kainuma, M., Collins L. (2010). "World Atlas of Mangroves" Highlights the Importance of and Threats to Mangroves: Mangroves among World's Most Valuable Ecosystems." Press release. Arlington, Virginia". The Nature Conservancy.

Archived from the original on 2010-07-17.

- Staller, J. E. (2013). ANCIENT EL NIÑO EVENTS, HUMAN ADAPTATION, AND ECOLOGICAL TRANSFORMATIONS: EARLY FORMATIVE PERIOD (2400-1450 B.C.) OCCUPATIONS IN SOUTHERN COASTAL ECUADOR. *Diálogo Andino*, 41, 101–132. <https://doi.org/10.4067/s0719-26812013000100007>
- Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathogens*, 13(2), e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>
- Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 7, Issue 5, pp. 492–498). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Sturmer, L., Nunez, J., Creswell, R., & Baker, S. (2009). *The potential of blood ark and ponderous ark aquaculture in Flordia: results of spawning, larval rearing, nursery and growout trials* (Issue September). www.flseagrant.org
- Sudhakaran, R., Ishaq Ahmed, V. P., Haribabu, P., Mukherjee, S. C., Sri Widada, J., Bonami, J. R., & Sahul Hameed, A. S. (2007). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases*, 30(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00774.x>
- Sullivan, G. E. (1960). Functional morphology, micro-anatomy, and histology of the “sydney cockle” *Anadara trapezia* (Deshayes)(Lamellibranchia: Arcidae). *Australian Journal of Zoology*, 9(2), 219–257. <https://doi.org/10.1071/ZO9610219>

- Ting, Y.Y., S. Kasahara and N. Nakamura. 1972. An ecological study of the so-called Mogai (Anadam subcrenata(Lischke)) cultured in Kasaoka Bay. J. Fac. Fish, Anirn. Husb., Hiroshima University 11: 91-110
- Tomanek, L., Zuzow, M. J., Hitt, L., Serafini, L., & Valenzuela, J. J. (2012). Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus mytilus): Implications for biogeographic range limits in response to Climate change. *Journal of Experimental Biology*, 215(22), 3905–3916. <https://doi.org/10.1242/jeb.076448>
- Toupoint, N., Mohit, V., Linossier, I., Bourgougnon, N., Myrand, B., Olivier, F., Lovejoy, C., & Tremblay, R. (2012). Effect of biofilm age on settlement of *Mytilus edulis*. *Biofouling*, 28(9), 985–1001. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.725202>
- Travers, M. A., Boettcher Miller, K., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 11–31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
- Trivedi, S., Aloufi, A. A., Ansari, A. A., & Ghosh, S. K. (2016). Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 23, Issue 2, pp. 161–171). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.001>
- UNESCO. (2017). Ecological Sciences for Sustainable Development ; Noroeste Amotapes-Manglares. Retrieved March 14, 2020, from <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/biosphere-reserves/latin-america-and-the-caribbean/peru/noroeste/>
- UNESCO. (2019). Ecological Sciences for Sustainable Development; Mangroves. Retrieved March 14, 2020, from <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/specific-ecosystems/mangroves/>
- Van Wynsberge, S., Andréfouët, S., Gilbert, A., Stein, A., & Remoissenet, G. (2013). Best Management Strategies for Sustainable Giant Clam Fishery in French Polynesia Islands: Answers from a Spatial Modeling Approach. *PLoS ONE*, 8(5), e64641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064641>

- Villalba, A., Reece, K. S., Ordás, M. C., Casas, S. M., & Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. In *Aquatic Living Resources* (Vol. 17, Issue 4, pp. 411–432). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>
- Waki, T., Shimokawa, J., Watanabe, S., Yoshinaga, T., & Ogawa, K. (2012). Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.009>
- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L., Gray, M. W., Miller, C. A., & Gimenez, I. (2015). Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nature Climate Change*, *5*(3), 273–280. <https://doi.org/10.1038/nclimate2479>
- Wang, C., Bao, W. Y., Gu, Z. Q., Li, Y. F., Liang, X., Ling, Y., Cai, S. L., Shen, H. D., & Yang, J. L. (2012). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms. *Biofouling*, *28*(3), 249–256. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.671303>
- Wang, J., Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, *490*(7418), 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Wong, E., Antillón, F., Glenn, E., & González, M. I. (1997). [Microbiologic depuration of *Anadara tuberculosa* (Mollusca: Arcidae)]. *Revista de Biología Tropical*, *45*(4), 1445–14452. https://www.researchgate.net/publication/13586216_Microbiologic_depuration_of_Anadara_tuberculosa_Mollusca_Arcidae
- World Bank/The International Bank for Reconstruction and Development. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture world bank report number 88257-GLB. 88257, 119*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4525.5529>
- Xia, J., Bai, C., Wang, C., Song, X., & Huang, J. (2015). Complete genome sequence of

- Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks Herpes viruses. *Virology Journal*, 12(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0334-0>
- Yang, J. L., Shen, P. J., Liang, X., Li, Y. F., Bao, W. Y., & Li, J. Le. (2013). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling*, 29(3), 247–259. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.764412>
- Yu, H., Li, H., Li, Q., Xu, R., Yue, C., & Du, S. (2019). Targeted Gene Disruption in Pacific Oyster Based on CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Marine Biotechnology*, 21(3), 301–309. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09885-y>
- Yurimoto, T., Mohd Kassim, F., Fuseya, R., & Man, A. (2014). Mass mortality event of the blood cockle, *Anadara granosa*, in aquaculture ground along Selangor coast, Peninsular Malaysia. *International Aquatic Research*, 6(4), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0077-3>
- Zapata Karina. (2017). Caracterización molecular de la microbiota asociada a la sangre y gonadas de la concha negra *Anadara tuberculosa*. *Universidad Nacional de Tumbes*. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/492>
- Zhang, S., Wang, C., Yue, Z., Song, X., Bai, C., Yin, W., Huang, J. (2015). Full length cDNA cloning and bioinformatics analysis of Acute viral necrosis virus IAP-86 gene from *Anadara uropygimelana*. (Chinese J.) *Progress in Fishery Sciences*, 36(1): 85-90. DOI:10.11758/yykxjz.20150113
- Zhao, B., Zhang, S., & Qian, P. Y. (2003). Larval settlement of the silver- or goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues. *Aquaculture*, 220(1–4), 883–901. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00567-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00567-7)
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L., & Li, Q. (2012). Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046244>

Zhou, S., Zhang, X., Li, W., Li, L., & Cai, X. (2017). Experimental evaluation of fluorescent (alizarin red S and calcein) and clip-tag markers for stock assessment of ark shell, *Anadara broughtonii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(2), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5137-7>

RÉSUMÉ

L'extraction de l'arche noire (AN) *Anadara tuberculosa* est une des activités de pêche artisanale ancestrales des mangroves de la côte ouest d'Amérique Latine et son commerce soutient l'économie de milliers de familles. La conservation de ce bivalve emblématique des mangroves est menacée par la surexploitation des populations naturelles. Les mesures classiques de préservation de l'espèce se sont révélées inefficaces pour enrayer le déclin des populations.

Ce travail de thèse propose la production de naissains en conditions artificielles d'écloserie, au Pérou, à des fins de repeuplement à l'issue d'un processus de « domestication » de ce bivalve sauvage. Nous avons

- analysé la structure génétique des populations d'AN Sud-américaines
- évalué l'effet de différentes salinités sur la réponse physiologique de l'AN
- établi une stratégie de production de naissains SPF (*Specific Pathogen Free*), à partir de reproducteurs caractérisés génétiquement et provenant du Sanctuaire National des Mangroves de Tumbes.

Ce travail constitue un modèle pour les futures stratégies de production et de repeuplement des stocks d'autres espèces vulnérables.

MOTS CLÉS

Anadara tuberculosa, repeuplement, aquaculture, biotechnologies

ABSTRACT

The extraction of the Black Ark (BA) *Anadara tuberculosa* is one of the ancestral artisanal fishing activities of Latin America West Coast mangroves and its trade supports the economy of thousands of families. The conservation of this emblematic bivalve of mangroves is threatened by the overexploitation of natural populations. Conventional conservation measures have proved to be ineffective in halting the decline of populations. This thesis work proposes spats production in artificial conditions of hatchery, in Peru, in order to restock after a process of "domestication" of this wild bivalve. We have:

- analyzed the genetic structure of some South American BA populations
- evaluated the effect of different salinities on the physiological response of the BA
- produced in hatchery specific pathogen free (SPF) spats from genetically characterized broodstocks of the National Sanctuary of Mangroves of Tumbes.

This work is a model for future strategies for the production and restocking of stocks of other vulnerable species.

KEYWORDS

Anadara tuberculosa, restocking, aquaculture, biotechnology