

Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998

Convention 95/RPC-R-57 "Génétique"

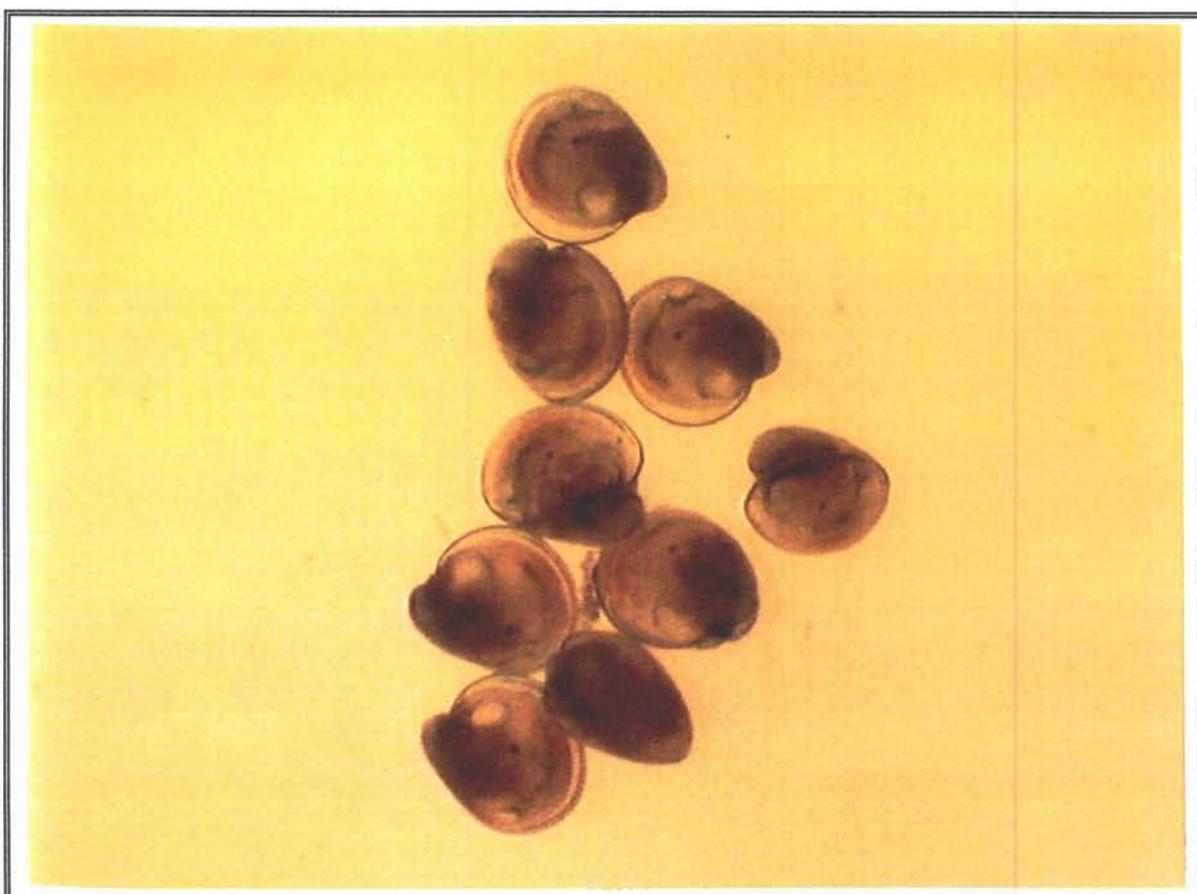
AMELIORATION DE LA QUALITE CHEZ L'HUITRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS PAR SELECTION DE SOUCHES PERFORMANTES.

Rapport année 1995

BOUDRY P.①, NACIRI Y.①, HERAL M.②, COLLET B.①, BOUGRIER S. ②,

GEFFARD O. ② , LEDU C.①, PHELIPOT P.①, HEURTEBISE S.①

et GERARD A.①.



① Laboratoire de
Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Génétique
B.P. 133 -17390 - LA TREMBLADE
Tél. : 46 36 30 07
Fax : 46 36 37 51

② Centre de Recherche
en Ecologie Marine et Aquaculture
BP 5 - L'Houmeau
17137 - NIEUL-SUR-MER
Tél. : 46 50 94 40
Fax : 46 50 91 60

IFREMER

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION : RAPPEL DES OBJECTIFS ET DU CONTEXTE SCIENTIFIQUE	3
2. DESCRIPTION DETAILLEE DU PROGRAMME DE RECHERCHE	4
2.1. <i>Etablissement des populations de référence</i>	4
2.1.1. Choix de géniteurs G0 et construction d'une population à large base génétique	4
2.1.2. Méthodes d'échantillonnage sur les stades larvaires et post-larvaires	5
2.1.3. Prégrossissement	5
2.1.4. Grossissement	5
2.1.5. Identification de géniteurs G1	5
2.1.6. Sélection divergente : Obtention et élevage de la génération G2	6
2.2. <i>Suivi des performances de croissance</i>	6
2.3. <i>Analyses génétiques</i>	6
2.3.1. Analyse de caryotypes sur les ovules et les embryons.	8
2.3.2. Analyse des géniteurs (G0) des larves et juvéniles (G1) par électrophorèse enzymatique et microsatellites	8
2.4. <i>Analyses physiologiques</i>	9
2.4.1. Identification des fonctions physiologiques	9
2.4.2. Stabilité des performances physiologiques dans le temps	10
2.5. <i>Méthodologies à mettre en oeuvre</i>	10
2.5.1. Génétique	10
2.5.2. Physiologie	10
2.5.3. Analyses statistiques	10
3. ACTIONS MENEES POUR L'ANNEE 1995	12
3.1. <i>Etablissement des populations de référence</i>	12
3.1.1. Echantillonnage de la G0	12
3.1.2. Constitution de populations de type G1 à large base génétique	14
3.1.3. Fixation des larves sur plaque et suivi de croissance précoce	15
3.2. <i>Analyses physiologiques</i>	18
3.2.1. Relation allométrique poids total - poids sec sur les géniteurs G0	18
3.2.2. Physiologie non-destructive sur les géniteurs G0	18
3.2.3. Temps d'activité et intensité respiratoire d'une cohorte	20
4. CONCLUSION GENERALE	25
4. BIBLIOGRAPHIE	26

1. INTRODUCTION : RAPPEL DES OBJECTIFS ET DU CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La relation entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance (respiration, assimilation, digestion, excrétion, rendement métabolique, etc...) et leurs bases génétiques (déterminisme, variabilité intra et inter-populations, accidents chromosomiques comme l'aneuploïdie etc...) est toujours sujet à de nombreuses interrogations chez les mollusques bivalves. La plupart des indications disponibles à l'heure actuelle concernent la relation entre la croissance d'un individu et l'hétérozygotie de son génome révélée par des marqueurs allozymiques (voir pour revue Zouros et Pogson, 1994). Une relation entre aneuploïdie et croissance a également été mise en évidence (Thiriou-Quiévreux *et al.*, 1992). Poussant plus avant les analyses, Hawkins *et al.*, (1994) ont pour la première fois révélé un lien entre des fonctions métaboliques de base (turn-over des protéines, respiration, rendement d'assimilation...) et l'hétérozygotie du génome (voir également Hawkins, sous presse). De plus, les fréquentes observations de déficits en hétérozygotes dans les populations de bivalves marins (Singh & Green, 1984 ; Borsari *et al.*, 1991 ; Gaffney, 1994) soulignent l'intérêt de mieux comprendre les liens entre variabilité génétique, hétérozygotie, aneuploïdie, métabolisme et croissance.

De récents travaux sur la physiologie des bivalves ont montré que les faibles besoins en énergie qui sont associés à une croissance plus forte des animaux sont dus à la fois à un plus faible métabolisme de base, et à de plus faibles coûts énergétiques de la croissance. Ainsi, l'intensité réduite du turn-over protéique est à la base des différences observées en terme de croissance (Hawkins *et al.*, 1986, Hawkins *et al.*, 1989a,b). L'ensemble de ces résultats montrent que les différences de croissance observées ont une base métabolique et génétique (du moins dans leur relation à l'hétérozygotie allozymique) et souligne l'intérêt d'une approche conjointe de la physiologie et de la génétique de la croissance chez les bivalves.

Rappelons également que si la gestion des zones de production reste une priorité (TROPHEE N°AQ-2500, Héral, 1994), l'amélioration que l'on peut attendre d'une sélection génétique pour un rendement physiologique plus élevé permettant une meilleure valorisation des ressources existantes est donc particulièrement intéressante. Une telle stratégie de sélection nécessite un travail préalable de connaissance des bases génétiques des caractères physiologiques concernés.

Notre projet se propose de réaliser ce travail chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, principale espèce d'huître d'intérêt commercial en Europe (Héral, 1993). Soulignons qu'à l'heure actuelle, aucune gestion génétique des stocks ni aucun programme de sélection ne sont menés sur cette espèce, malgré son importance économique. La connaissance de la variabilité génétique des populations cultivées de *Crassostrea gigas* est d'autant plus importante qu'il s'agit d'une espèce récemment introduite (Héral & Grizel, 1991), dont le niveau de consanguinité et les flux géniques inter-populations n'ont été estimés qu'à l'aide de marqueurs allozymiques (Moraga *et al.*, 1989) dont la neutralité est remise en cause (Karl & Avise, 1993) ne serait ce que par leur lien avec la croissance (Zouros & Pogson, 1994).

2. DESCRIPTION DETAILLEE DU PROGRAMME DE RECHERCHE

Le programme de recherche présenté ci-dessous est le fruit d'une réflexion conjointe entre généticiens et physiologistes afin de mettre sur pied un ensemble d'expériences permettant d'étudier les bases génétiques de la variabilité des caractères impliqués dans la croissance chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

2.1. Etablissement des populations de référence

2.1.1. Choix de géniteurs G0 et construction d'une population à large base génétique

Afin de construire une population à base génétique large, condition préalable à toute évaluation du potentiel de sélection dans l'espèce, les géniteurs (G0) seront échantillonnés dans 4 sites différents :

- l'estuaire de la Seudre,
- le bassin d'Arcachon,
- l'estuaire de la Charente
- la baie de Bonne-Anse (Gironde).

Ces sites constituent la source principale, pour la France ainsi que pour plusieurs autres pays européens, des huîtres actuellement commercialisées. Le recrutement des naissains est en effet principalement assuré par captage naturel dans ces 4 sites, la contribution des écloséries restant faible en Europe.

Ces quatre sites présentent des caractéristiques particulières :

- Des huîtres provenant de ces différents sites ont montré dans les mêmes conditions des potentiels de croissance différents (cas de l'estuaire de la Seudre et de Bonne-Anse ; Anonyme, 1983)
- Des analyses enzymatiques (Moraga *et al.*, 1989) ont montré que certains sites (Arcachon par exemple), se caractérisent par la présence de génotypes particuliers.
- Du fait de la courantologie, ou de la topographie côtière, les flux géniques naturels entre certains de ces sites sont probablement relativement limités malgré leur proximité géographique (par exemple entre Arcachon et Bonne Anse).

La population de géniteurs G0 sera constituée de 40 huîtres à raison de 10 individus par site (5 mâles pour 5 femelles). Les gamètes seront obtenus par scarification et un échantillon de chaque géniteur sera conservé pour analyse ultérieure. Pour permettre un brassage maximal et une représentation de chaque combinaison de géniteurs, un croisement de type factoriel (20 mâles x 20 femelles dans toutes les combinaisons possibles) sera effectué. Les embryons issus des 400 croisements réalisés seront mélangés une heure après fécondation et constitueront ainsi la population G1.

2.1.2. Méthodes d'échantillonnage sur les stades larvaires et post-larvaires

Le but des pratiques zootechniques exposées ci-dessous sera systématiquement :

- De ne procéder à aucune sélection volontaire pour conserver l'ensemble de la variabilité génétique présente dans la population,
- De travailler à des densités faibles limitant autant que possible toute compétition interindividuelle à quelque stade que ce soit, pour permettre à l'ensemble de la variabilité génétique de s'exprimer.

Contrairement aux techniques habituellement pratiquées en éclosion, où les individus à faible croissance sont éliminés systématiquement, aucun tamisage sélectif ne sera effectué tout au long de l'élevage larvaire (environ 3 semaines selon les conditions), de façon à conserver l'ensemble de la population. En effet, dès les premiers jours d'élevage, des différences importantes en terme de croissance apparaissent entre individus. Les raisons de ces différences sont actuellement mal connues et une origine génétique n'est pas à écarter. Une telle pratique nécessitera de travailler à une faible densité d'élevage initiale (1 larve/ml contre 10 larves/ml habituellement) de façon à ne pas handicaper la croissance ultérieure de l'ensemble de la population par phénomène de compétition.

Le maintien de l'ensemble de la population en élevage entraînera un décalage, entre individus, de la date de la métamorphose, et de la fixation qui en résulte. Afin d'obtenir des individus ayant en commun leur date de fixation (pseudo-cohorte), les collecteurs immergés pour recueillir les post-larves seront changés toutes les 24 heures. Le nombre total de pseudo-cohortes dépendra de l'étalement de la période de fixation pour l'ensemble de la population G1.

2.1.3. Prégrossissement

L'ensemble des collecteurs sera transféré dans des bacs d'élevage en conditions trophiques non limitantes (alimentation contrôlée en *Isochrysis* clone Tahiti, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans*). Pour permettre un développement optimal des post-larves, la densité sur les collecteurs sera régulée par l'élimination régulière et randomisées des individus surnuméraires.

2.1.4. Grossissement

Le détroquage des huîtres (séparation des huîtres des collecteurs) sera effectué lorsqu'elles auront atteint une taille moyenne de 5 cm. Elles seront alors transférées dans l'Etang de Thau (Méditerranée) et fixées sur des cordes selon la technique de culture locale. Le choix de ce site est motivé par les bonnes conditions trophiques qui le caractérisent et qui permettent d'obtenir des croissances rapides compatibles avec la durée du projet (Gérard *et al.*, 1994).

2.1.5. Identification de géniteurs G1

Les analyses, tant physiologiques que génétiques, exposées en §3.2.3. et §3.2.4. permettront de trier des individus à faible rendement et fort rendement métabolique, si

la stabilité de ces caractéristiques est démontrée, et à caractéristiques génétiques différentes. Des individus à rendements métaboliques contrastés, à niveau d'aneuploidie différents serviront de géniteurs pour la génération G2. Le nombre de géniteurs utilisés dépendra des corrélations observées entre ces différents caractères et donc du recoupement entre niveaux forts et faibles pour ces différents critères.

2.1.6. Sélection divergente : Obtention et élevage de la génération G2

Pour cette génération G2, des séries de croisements biparentaux seront effectués entre individus présentant des caractéristiques identiques (fort rendement x fort rendement ; faible rendement x faible rendement) ou contrastées (fort rendement x faible rendement). Pour chaque type de croisement 5 mâles et 20 femelles (4 par mâle) seront testés. Ces 60 croisements généreront des relations de parenté plein-frère et demi-frère qui permettront de déterminer l'héritabilité des caractères étudiés, ainsi que les composantes génétiques de la variation (additivité, dominance).

Comme pour la génération G1, les familles G2 seront élevées dans des conditions non sélectives (absence de tamisage et par conséquent, faibles densité de départ) afin de ne pas biaiser l'estimation des paramètres génétiques. Par contre, l'identification de pseudo-cohortes n'a pas lieu d'être réalisée à ce stade du projet, l'objectif étant simplement de conserver l'ensemble de la variabilité génétique à l'intérieur de chaque famille. La croissance se fera en conditions contrôlées à la station IFREMER de Bouin.

2.2. Suivi des performances de croissance

Un suivi régulier de la longueur des individus sera effectué dès la phase larvaire pour la population G1. Pour les familles G2, le suivi de taille commencera après fixation.

Dès que les individus seront identifiables dans la génération G1, (quelques semaines après la fixation), un suivi individuel de croissance (longueur de la coquille) sera effectué sur chaque pseudo-cohorte. Une mesure de poids interviendra lors du détroquage et du transfert à l'Etang de Thau. Après collage sur corde seul le suivi de la taille sera possible pendant la période de grossissement. Le sacrifice régulier de quelques individus permettra de déterminer pour chaque pseudo-cohorte, le rapport d'allométrie taille/poids qui pourrait lui être spécifique.

Pour les familles G2, la croissance se fera en conditions trophiques et thermiques contrôlées à la Station IFREMER de Bouin. Un protocole expérimental en 3 blocs complets conçu pour avoir une quantité de nourriture homogène sera utilisé.

2.3. Analyses génétiques

Différentes techniques (allozymes et microsatellites) seront utilisées pour tenter de mettre en corrélation performances physiologiques, performances de croissance et génotypes.

La relation entre hétérozygotie aux locus enzymatiques et la croissance a connu différentes hypothèses :

- L'hypothèse de la superdominance directe accorde un avantage sélectif aux hétérozygotes aux locus enzymatiques étudiés ou aux locus directement liés (Koehn *et al.*, 1988), ce qui implique que la relation observée découlerait directement des locus étudiés. Certains auteurs ont aussi proposé que les hétérozygotes puissent avoir une meilleure efficacité métabolique (Koehn & Gaffney, 1984) à cause de décalages dans les conditions optimales de fonctionnement des allozymes. Cela a été partiellement vérifié sur l'huître plate *Ostrea edulis* par Hawkins *et al.* (1994).
- L'hypothèse de superdominance associative considère que les locus enzymatiques ne seraient que des marqueurs de l'hétérozygotie globale du génome. Ainsi, les individus les plus homozygotes le seraient également pour des locus légèrement délétères liés physiquement ou statistiquement (Zouros & Foltz, 1987). La relation observée serait ainsi due à un effet d'hétérosis global, ce qui suppose que certains individus aient une hétérozygotie globale plus forte que d'autres.
- La perte de chromosomes (aneuploïdie) est un phénomène communément observé chez les bivalves marins (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988). En conséquence, certains locus légèrement délétères se retrouvent à l'état hémizygote (détecté comme homozygote) et la synthèse de certains produits d'expression est divisée par deux, si des effets de compensation ne se mettent pas en place. Des travaux ont montré que l'aneuploïdie pouvait ainsi toucher une proportion très importante des individus à faible croissance dans une pseudo-cohorte (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988 ; 1992).
- La présence d'allèles nuls (non détectés), allèles plus ou moins délétères à l'état homozygote (Foltz, 1986) a été également proposée. Certains individus seraient alors comptabilisés comme homozygotes avec des performances de croissance faibles. La présence d'allèles nuls à des proportions appréciables pour les locus enzymatiques a été détectée pour les bivalves (Gaffney, 1994).
- Enfin, l'existence d'allèles présents chez un des parents mais ne s'exprimant pas chez les descendants (imprinting) a aussi été proposée comme raison de cette relation positive, sans cependant qu'aucune preuve expérimentale n'ait été apportée.

Ces différentes hypothèses opposent les partisans d'un effet global (superdominance associative, aneuploïdie) aux partisans d'un effet local (superdominance direct, allèles nuls, imprinting). Par l'utilisation de marqueurs moléculaires (microsatellites par exemple) en parallèle avec les marqueurs enzymatiques et par l'analyse des caryotypes sur les différentes pseudo-cohortes de la population G1, nous nous proposons d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Ce projet va également plus loin, puisqu'il s'attachera à chercher les corrélations entre les différentes caractéristiques génétiques et les caractères physiologiques et non plus la croissance uniquement.

2.3.1. Analyse de caryotypes sur les ovules et les embryons.

Un échantillon d'ovules de chaque femelle sera prélevé pour une analyse de caryotype. Les chromosomes seront visualisés à l'Hoechst 33258 en utilisant la technique d'épifluorescence mise au point par Dubéet *al.* (1985). La détection d'une éventuelle aneuploïdie au niveau des gamètes se fera donc dès le stade des géniteurs. Malheureusement, du fait de la condensation des chromosomes, une telle analyse n'est pas accessible sur les spermatozoïdes.

Une analyse caryologique des embryons G1 (24 heures après la fécondation) sera également effectuée selon une méthode inspirée de celle utilisée par Thiriot-Quévieux & Ayraud (1982) sur le naissain.

2.3.2. Analyse des géniteurs (G0) des larves et juvéniles (G1) par électrophorèse enzymatique et microsatellites

Les récents développements de marquage moléculaire basés sur des techniques d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) permettent à la fois d'aborder la génétique en phase larvaire et d'analyser les stades suivants de façon non destructive, contrairement aux techniques allozymiques.

Les géniteurs et les juvéniles seront analysés pour leur polymorphisme aux locus allozymiques connus pour être variables (Buroker *et al.*, 1979 ; Anonyme 1982 ; Moraga *et al.*, 1989). Un premier tri des locus polymorphes sera effectué à partir des résultats obtenus sur les géniteurs G0. Les stades larvaires et post-larvaires ne sont pas accessibles à l'analyse par allozyme du fait d'une taille beaucoup trop restreinte. Les analyses seront donc effectuées systématiquement sur des juvéniles et des adultes G1 qui seront sacrifiés à cet effet. Les analyses porteront sur 100 juvéniles provenant de 3 pseudo-cohortes différentes et sur 200 adultes provenant des mêmes pseudo-cohortes. Les résultats attendus concernent :

1. Le niveau de polymorphisme global,
2. La différenciation entre les sites d'origine des géniteurs,
3. La relation hétérozygotie-croissance et hétérozygotie-caractères physiologiques,
4. La comparaison avec les résultats obtenus par microsatellites.

Géniteurs, larves, post-larves et juvéniles seront analysées pour leur polymorphisme aux locus microsatellites disponibles (voir §2.5.). Plusieurs niveaux d'analyse seront alors accessibles :

1. Niveau de polymorphisme global au niveau des différentes générations G0, G1 et G2. Hérité des allèles.
2. Différenciation entre les sites d'origine des géniteurs (à comparer avec les données existantes en allozymes (Anonyme, 1983 ; Moraga *et al.*, 1989) et celles obtenues dans le cadre de ce projet.

3. Contribution réelle des parents G0 à la génération G1. Ce type de marqueurs étant généralement très variable (Naciri *et al.*, 1995), on peut espérer distinguer chaque parent de la génération G0 par un génotype multi-locus spécifique (analyse de paternité). Cette analyse, effectuée sur des individus de tailles contrastées, apportera des premières informations sur la base génétique de la variabilité observée, à travers la répartition observée des contributions parentales.
4. Niveaux d'hétérozygotie : au niveau global de la population en relation avec la physiologie et la croissance, comparaison entre les différentes pseudo-cohortes de fixation.
5. Mise en évidence d'éventuels déficits en hétérozygotes : évolution au cours du temps au niveau global de la population (larves, post-larves, juvéniles, adultes), comparaison entre les différentes pseudo-cohortes de fixation.

L'effort principal sera mis sur la génération G1 et poursuivi sur la génération G2 en fonction des résultats obtenus. Seront ainsi analysées par microsatellites (au minimum) 200 larves, 100 post-larves sur 3 pseudo-cohortes différentes et 200 adultes provenant des mêmes pseudo-cohortes.

2.4. Analyses physiologiques

2.4.1. Identification des fonctions physiologiques

Les différentes fonctions physiologiques seront mesurées sur les individus adultes des générations G1 et G2. Les mesures devront être effectuées en continu sur une période de 12 heures, particulièrement pour le métabolisme et pour la consommation de nourriture, pour en déterminer aussi bien le niveau d'activité que sa durée quotidienne.

Sur la génération G1, 3 pseudo-cohortes seront analysées à raison de 50 individus par condition.

Pour la G2, le nombre élevé de familles nécessitera un traitement préalable de tous les types de données pour la sélection des caractères physiologiques les plus pertinents. Il est cependant envisagé de focaliser l'effort d'analyse sur quelques familles représentatives, pour obtenir l'ensemble des données génétiques, physiologiques et de croissance.

Les fonctions physiologiques non destructives mesurées seront (Hawkins *et al.*, 1994) :

- la consommation d'oxygène,
- l'excrétion d'ammoniaque,
- la quantité de nourriture consommée,
- le taux d'ingestion,
- le taux d'absorption,
- la croissance calculée (scope for growth).

Ces mesures nécessiteront tout de même d'avoir calculé auparavant des rapports d'allométrie sur les mêmes populations. Les individus sacrifiés seront analysés pour leur polymorphisme allozymique et microsatellitaire.

2.4.2. Stabilité des performances physiologiques dans le temps

Pour s'assurer de la stabilité des performances physiologiques, les expériences décrites ci-dessus seront répétées en période hivernale, en période de croissance printanière et automnale sur les mêmes individus. Cela ne concernera bien entendu que les paramètres physiologiques ne nécessitant pas le sacrifice des animaux.

2.5 .Méthodologies à mettre en oeuvre

2.5.1. Génétique

Les analyses de polymorphisme des marqueurs génétiques seront effectuées selon les protocoles de Wilkins & Mathers (1973, 1974) et de Pasteuret *al.* (1987) pour les isoenzymes, et de Magoulas (Hawkins *et al.*, 1994a) et Naciri *et al.* (1995) pour les microsatellites. L'identification de microsatellites supplémentaires se fera selon deux modalités différentes : via la poursuite d'un travail en cours sur *Ostrea edulis* (essai d'utilisation croisée de marqueurs) et via la construction d'une nouvelle banque génomique et son criblage (Hawkins *et al.*, 1994c ; Naciri *et al.*, (1995)).

Les analyses caryologiques seront faites selon la méthode exposée par Thiriot-Quiévreux (1986).

2.5.2. Physiologie

Les différentes fonctions seront analysées selon les protocoles décrits récemment par Barillé *et al.* (1994) et Hawkins *et al.* (1993, 1994a,b). Les mesures en continu seront développées selon le protocole de Bougrier *et al.* (1994). Les différentes mesures seront réalisées dans des enceintes expérimentales.

2.5.3. Analyses statistiques

La structuration géographique sera analysée par la méthode des F-statistique (Wright, 1951) en utilisant le programme F-STAT (Jérôme GOUDET, Université de Bangor, UK). Les distances génétiques entre populations seront calculées par le programme PHYLIP 3.5 (Joe FELSENSTEIN, Université de Washington, USA).

Au sein de la G1, les corrélations entre hétérozygotie et performances physiologiques et performances de croissance seront mises en évidence par comparaison d'histogrammes et par comparaison de moyennes. Les relations entre la croissance et les différentes fonctions physiologiques seront caractérisées soit par une analyse de sensibilité des modèles de croissance, soit par analyse multivariée de type ACP ou par analyse de corrélations multiples non linéaires. Les logiciels utilisés seront Addad, Seneca 2.0 ou SAS (SAS/STAT, 1988).

L'analyse des composantes génétiques de la variance pour tous les caractères mesurés sera effectuée sur la génération G2 par analyse de variance en utilisant les modèles de la génétique quantitative appliqués aux plans de croisement hiérarchique (Falconer, 1981; Gallais, 1990), et en utilisant le logiciel SAS (SAS/STAT, 1988)

3. ACTIONS MENEES POUR L'ANNEE 1995

3.1. Etablissement des populations de référence

3.1.1. Echantillonnage de la G0

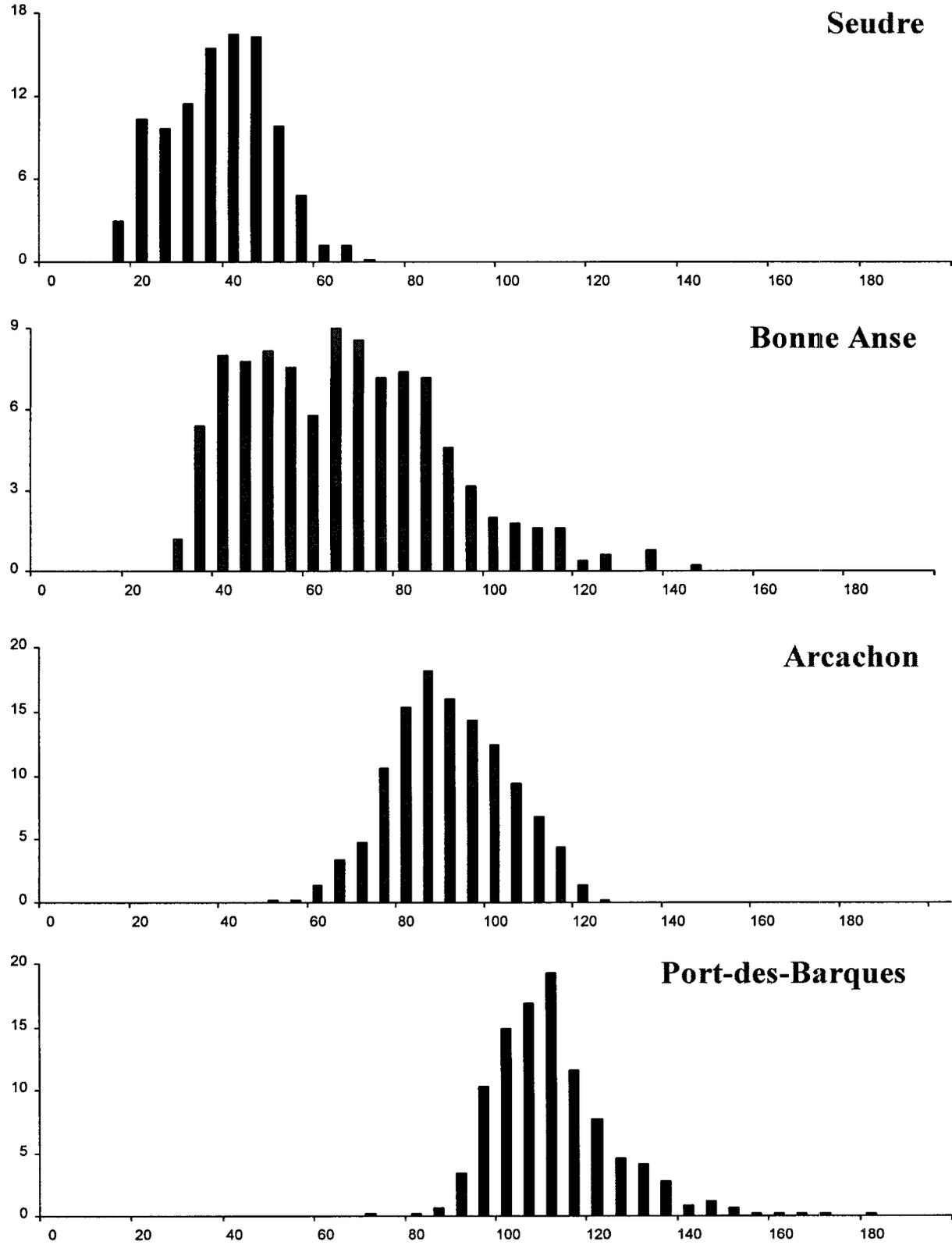
Afin de tenir compte des risques de mortalités, l'effectif de chaque population est fixé à au moins 500 animaux. L'ensemble de ces populations est maintenue dans les claires du laboratoire IFREMER de L'houmeau. Chaque huître a été pesée individuellement afin de disposer d'une bonne description de la variation observée intra et inter-population (Tableau 1 et Figure 1).

Pour chaque population, 100 huîtres ont été tirées au hasard et numérotées. Parmi ces 100 huîtres, 30 (issues d'un second tirage aléatoire) ont été analysées en physiologie non destructive et serviront de géniteurs après une période de maturation d'environ 6 semaines.

Tableau 1 : Description des 4 populations G0.

Population	Année de captage	Effectif	taille des huîtres (moyenne et écart type)
Bonne Anse	1993	501	64.6 ± 22.2
Arcachon	1993	596	87.8 ± 13.3
Port des Barques	1993	586	107.4 ± 13.3
Seudre	1993	578	34.4 ± 11.0

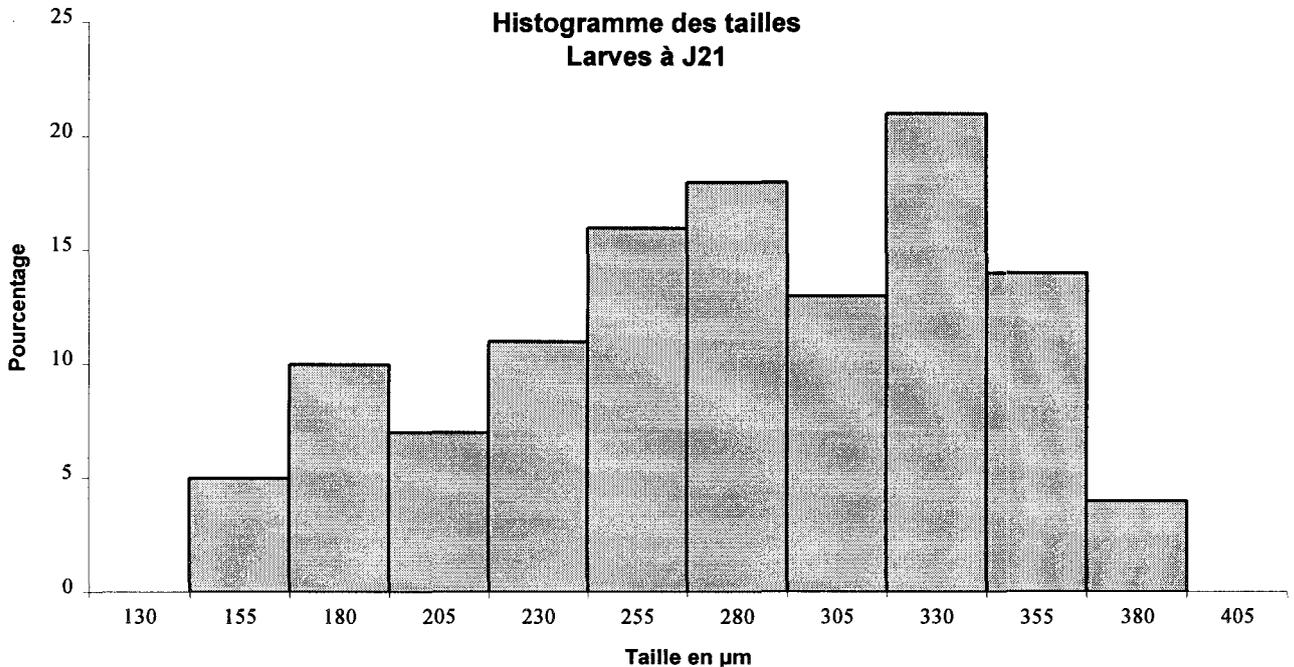
Figure 1 : histogramme de distribution des poids individuels pour les 4 populations.



3.1.2. Constitution de populations de type G1 à large base génétique

Un croisement de 20 géniteurs GO (10 mâles et 10 femelles) a été réalisé en 1995. Dans le but d'obtenir un brassage maximal et une représentation de chaque combinaison de géniteurs, un croisement de type factoriel (10 mâles x 10 femelles dans toutes les combinaisons possibles) a été effectué. Pour chaque géniteur, les gamètes ont été obtenus par scarification ("stripping") et un échantillon a été conservé pour permettre des analyses ultérieures. Les gamètes ont été comptés de manière à uniformiser le nombre apporté par chaque parent, avec un ratio sperme/ovule égal à 100. Des prélèvements ont été réalisés 3 heures après fécondation afin d'estimer le taux de fécondation par épifluorescence pour chaque couple mâle x femelle; Les 100 croisements ont ensuite été mélangés pour constituer une population G1. L'élevage larvaire est ensuite réalisé de manière à garder l'ensemble de la population (donc sans élimination systématique par tamisage des individus les plus petits). Une telle pratique révèle une grande variabilité des tailles des larves (voir figure 2).

Figure 2 : Histogramme de distribution d'un élevage larvaire sans élimination de la "queue de lot". Pour un lot traité de manière conventionnelle, les individus de moins de 250 μ seraient éliminés.



Le tableau 2 présente le détail des taux de fécondation pour chaque couple mâle/femelle. L'analyse statistique de ces données révèle un fort effet femelle et une absence d'effet mâle.

Tableau 2 : Taux de fécondations pour chaque couple mâle/femelle.

Mâles	Femelles										moyenne
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
0	94	95	72	15	55	97	39	64	65	78	67.4
1	99	98	48	10	71	99	32	67	72	71	66.7
2	90	99	50	10	30	98	22	32	60	79	57
3	89	96	35	11	33	95	31	68	61	86	60.5
4	82	93	31	8	33	98	20	51	63	72	55.1
5	94	94	27	17	52	98	28	54	64	83	61.1
6	88	97	32	8	72	99	48	70	64	84	66.2
7	72	91	26	8	40	80	17	50	44	56	48.4
8	87	100	29	6	76	100	35	58	73	88	65.2
9	86	96	43	11	53	97	45	65	48	82	62.6
moyenne	88.1	95.9	39.3	10.4	51.5	96.1	31.7	57.9	61.4	77.9	

En conclusion, ce premier croisement factoriel a permis :

- De mettre en avant les difficultés techniques liées à la réalisation de ce type de croisement. Un croisement 20 x 20 a été également réalisé au début 1996 afin de confirmer la faisabilité technique de l'expérience à cette échelle.
- De démontrer qu'avec un ratio sperme / ovule de 100 (valeur "standard" en éclosion), les différences observées en terme de taux de fécondation sont essentiellement dues aux différences entre femelles. Ces différences sont importantes : les taux moyens par femelle varient de 10.4 à 95.9. Il est probable que ces différences entre femelles peuvent être attribuées (au moins en partie) à des variations de stade de maturité des gamètes (certaines femelles ayant été strippées trop tôt ou trop tard par rapport à leur période optimale). Mais ces différences illustrent l'intérêt de pouvoir mieux quantifier la qualité des gamètes (notamment les gamètes femelles) avant fécondation.

3.1.3. Fixation des larves sur plaque et suivi de croissance précoce

La technique habituellement pratiquée pour la production de larves est basée sur la fixation des larves d'huîtres en tamis sur de la brisure de coquille ou sur des supports de type tubes PVC pour des volumes plus importants. Cette méthode est bien adaptée à la production de naissain "en masse" mais présente deux contraintes:

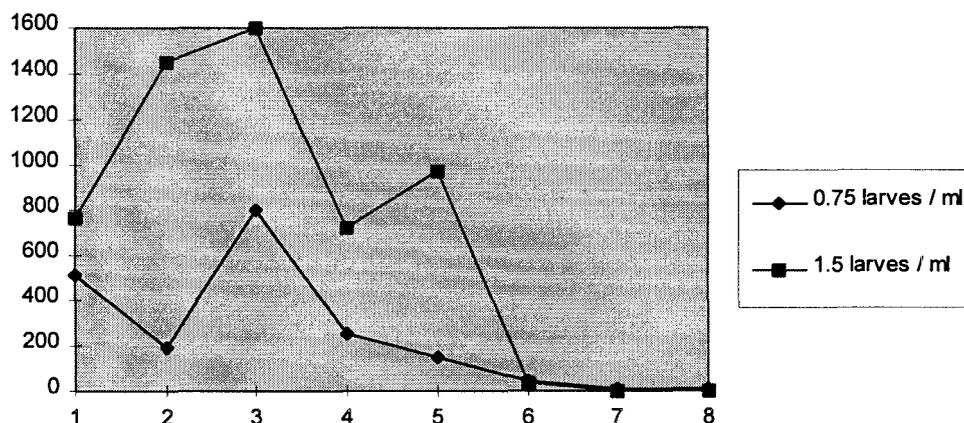
- Le suivi individuel des animaux n'est pas possible avant qu'ils aient atteint une taille suffisante pour être repérés individuellement par étiquetage.
- Le contrôle de la compétition inter-individuelle est difficile car il suppose de travailler à de très faibles densités d'élevage, conditions peu compatibles avec les contraintes d'écloserie.

Nous avons donc souhaité développer une nouvelle technique qui permettrait de réaliser le suivi de croissance individuel dès le stade de fixation. Celui-ci n'étant pas forcément synchrone au sein d'un lot, il devenait alors également intéressant de pouvoir distinguer les larves se fixant rapidement (dès la mise en contact avec un support de fixation) de celles se fixant plus tardivement.

Après avoir essayé différentes techniques, en faisant varier les paramètres suivants : type de bac, disposition des plaques dans les bacs, fréquence du bullage, densité des larves, nature ou revêtement des plaques, nous avons réussi à mettre au point une technique donnant des résultats satisfaisants. Celle-ci peut-être décrite de la manière suivante.

Les plaques de PVC sont enduites de paraffine puis d'une couche de résine "epoxy" (gelcoat). Ces plaques sont disposées horizontalement, au fond d'un bac à fond plat (type aquarium ou raceway), dont les parois sont paraffinées (afin d'éviter la fixation des larves sur ces parois). Les meilleurs résultats sont obtenus avec une couverture complète du fond de bac par des plaques. Le bullage est assuré par des rampes ou des "sucres" à raison de 1/4 h toutes les 2 h. Le changement quotidien des plaques permet d'obtenir des "pseudo-cohortes de fixation", c'est à dire des lots de larves s'étant fixées le même jour. La dispersion dans le temps de la fixation d'une population (sans tamisage) est illustrée Figure 3. Contrairement aux pratiques habituelles d'écloseries, où l'ensemble des larves sont fixées en 48 h, la fixation s'étale ici sur plus de 6 jours.

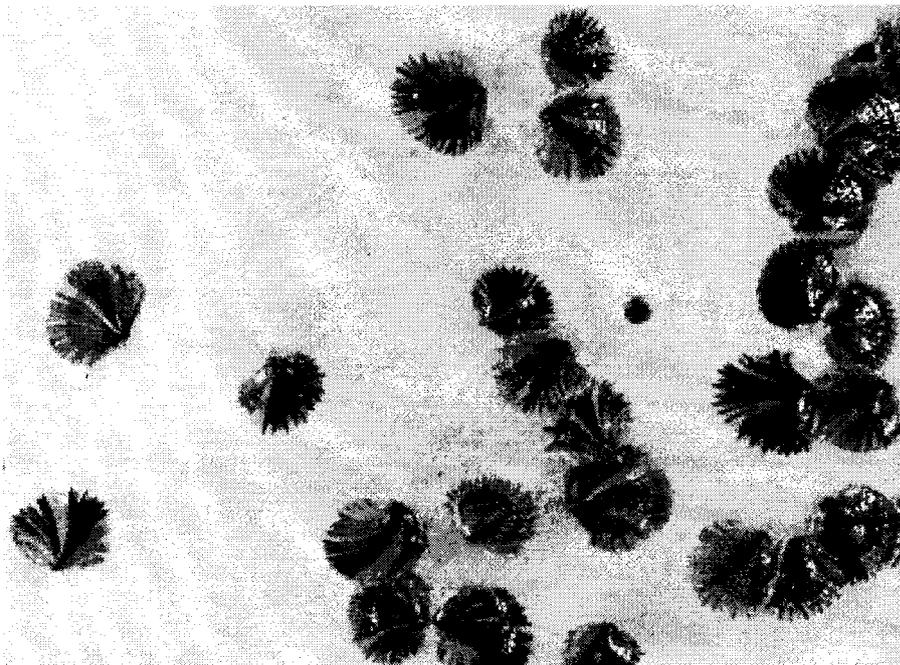
Figure 3 : Dispersion dans le temps de la fixation d'un lot "non tamisé" à 2 densités : 0.75 et 1.5 larves / ml.



Des mesures peuvent être réalisées quelques jours après fixation, chaque huître pouvant être individualisée par sa position sur la plaque. Afin d'éviter tout effet de compétition entre individus, la densité d'animaux doit être suffisamment réduite pour permettre la croissance des huîtres sans chevauchement jusqu'à leur détroquage. Un éclaircissement est souvent nécessaire pour atteindre cette densité. La double couche "paraffine-gelcoat" permet de détacher les jeunes huîtres sans les endommager (la couche de paraffine étant suffisamment peu adhérente pour qu'elle cède plus facilement que la valve inférieure de l'huître).

Ce système possède un double avantage: le suivi individuel des tailles par analyse d'image (SAMBA Alcatel) à partir des stades précoces, et le détroquage puis le marquage des animaux à des stades jeunes (stade 1 ou 2 cm). Ce système de fixation est tout à fait adapté à un élevage non sélectif en quantité de nourriture non limitante. Cependant une méthode d'éclaircissement randomisée est à mettre au point pour éviter toute compétition spatiale entre individus (Figure 4).

Figure 4 : Huîtres fixées depuis 3 semaines sur plaque PVC (avant éclaircissement). On notera les grandes différences de taille et de coloration entre individus.



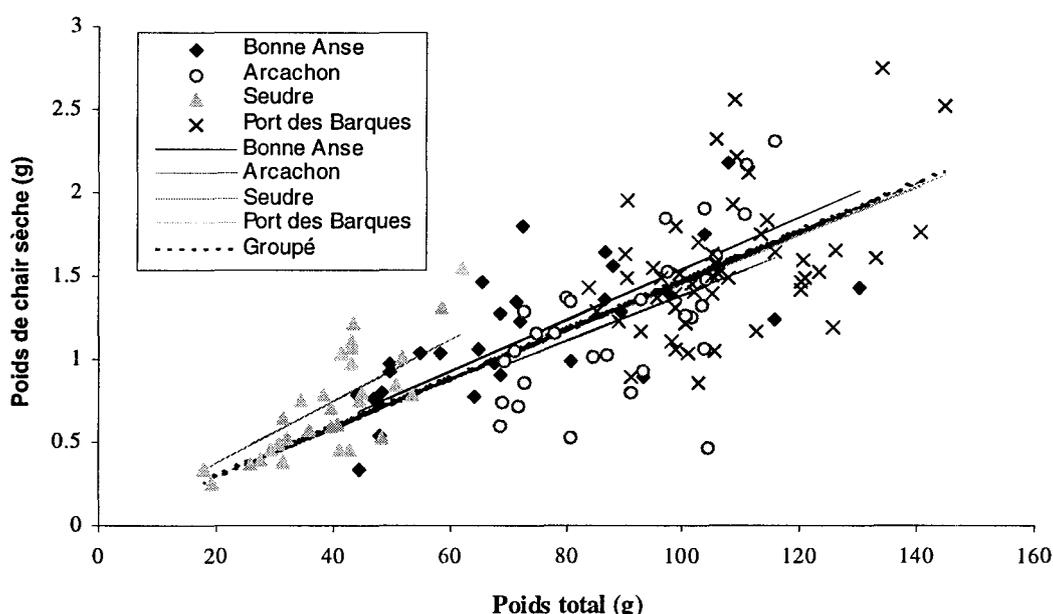
3 cm

3.2. Analyses physiologiques

3.2.1. Relation allométrique poids total - poids sec sur les géniteurs G0

30 individus par population G0 ont été sacrifiés pour établir les relations entre poids total et poids de chair sèche (après lyophilisation). Ces relations permettent de rapporter les paramètres physiologiques par unité de poids sec (figure 4). Les droites de régression ne diffèrent pas significativement entre populations.

Figure 4 : Relation entre poids total et poids de chair sèche pour les 4 populations G0.



3.2.2. Physiologie non-destructive sur les géniteurs G0

Les analyses physiologiques dites non destructives ont été effectuées à 10 °C, température proche de la température de l'eau du littoral au mois de février. Le but est d'évaluer la performance physiologique des animaux dans leur état optimal d'activation. La mesure de paramètres tels que la consommation d'oxygène, le taux absorption, le taux d'excrétion et le taux d'assimilation résumant l'état physiologique de l'animal et constitue la base du calcul de la prédiction de croissance (scope for growth). En avril 1996, la première mesure d'une série de quatre sera effectuée, dans le but d'étudier la stabilité temporelle des caractères physiologiques en période de croissance printanière, estivale automnale et hivernale (fin avril, juin, septembre et décembre). Il est ainsi indispensable de travailler avec des animaux dans un état physiologique optimal pour pouvoir comparer les performances.

• Filtration

Toutes les mesures sont effectuées à une température de 10 °C et à une salinité de 28 ‰. Des estimations régulières du pourcentage de cellules phytoplanctoniques (COULTER Multisizer) retenues donne une indication du niveau d'activité de l'animal

28 ‰. Des estimations régulières du pourcentage de cellules phytoplanctoniques (COULTER Multisizer) retenues donne une indication du niveau d'activité de l'animal que l'on considère actif à partir de 10 % de cellules d'*Isochrysis galbana* retenues. Dès que l'animal est en phase d'activité, le bac est nettoyé de tous fèces et pseudofèces, le temps de début de la mesure est noté. Lorsque l'animal a produit une quantité acceptable de fèces, un prélèvement d'eau témoin et de sortie est effectué.

Le nombre de cellules retenues est mesuré et la masse de phytoplancton est évaluée après filtration, séchage à 55 °C (Matière Organique Particulaire, M.O.P.) et après calcination (Matière Inorganique Particulaire, M.I.P.). Un échantillon d'eau est également filtré pour dosage de chlorophylle.

La quantité de matière phytoplanctonique ingérée par l'animal est ainsi estimée par divers paramètres: volume filtré (en l/h), quantité de chlorophylle absorbée (en mg/h), quantité de matière organique (en mg/h) et quantité de matière inorganique (en mg/h).

Le volume de filtration est le volume théorique d'eau de mer épuré de toute cellule phytoplanctonique à 100 % par l'animal et par unité de temps. Il est estimé par le produit du débit de l'eau transitant dans le bac de mesure et du pourcentage de cellules retenues :

$$= d.100. \frac{(E - S)}{E}$$

E et S représentent respectivement le nombre de cellules dans le bac témoin vide et le nombre de cellules dans le bac expérimental.

La consommation de phytoplancton est par ailleurs exprimée en masse de matière organique ou inorganique par unité de temps.

Les fèces sont collectés, homogénéisés et filtrés. La masse de matière organique et inorganique ainsi que la quantité de chlorophylle sont déterminées. Les différents paramètres physiologiques étudiés sont les suivants:

Taux de filtration (filtration rate) : $Fr = (E-S).débit$

Taux d'ingestion (ingestion rate) : $Ir = Fr - pseudofèces$

Les conditions expérimentales sont telles, que la production de pseudofèces est nulle: $Ir = Fr$

Taux d'absorption (Absorption rate) : $Ar = Ir - fèces$

Croissance calculée (Scope for Growth) : $Scope\ for\ Growth = Ar - consommation\ d'oxygène$

- *Consommation d'oxygène*

Un système clos a été utilisé pour mesurer la consommation d'oxygène. L'animal est installé dans une enceinte close et la décroissance de la concentration d'oxygène en fonction du temps est mesurée en fonction du temps par des sondes Orbisphère. La température de l'eau est maintenue à 10 ° C par un système de bain marie (Ministat). On considère l'animal actif lorsque la chute de quantité d'oxygène devient significative.

- *Excrétion azotée*

A la fin de la mesure de consommation d'oxygène, la teneur en nitrate, ammoniacque et phosphate est déterminée (SKALAR) dans l'eau résiduelle. Les données sont en cours de traitement.

3.2.3. Temps d'activité et intensité respiratoire d'une cohorte

- *Introduction*

L'explication des différences de croissance, observées chez les mollusques, par des différences du rendement des fonctions physiologiques de l'animal reste controversée. La première de ces fonctions reliée à des différences de croissance a été la consommation d'oxygène des moules (Koehn et Shumway, 1982). Cependant, la question de savoir si ces différences sont liées à l'intensité de respiration ou à l'activité respiratoire de l'animal reste posée.

L'intensité respiratoire est liée à la taille de l'animal. c'est ainsi que de nombreuses publications ont montré une relation allométrique entre la respiration des mollusques et le poids sec ($RES = a POIDS SEC^b$, Bougrier et al. 1995). Ce type de relation indique que les animaux de petite taille consomment proportionnellement plus l'oxygène dissout du milieu ambiant que les animaux de grande taille. Cependant, ces relations ont été établies sur des animaux, de plusieurs classes d'âge, présentant des différences importantes de poids sec (0.1 à 3 g de poids sec, soit environ 10 à 150 g de poids total). Les coefficients d'allométrie ainsi établis sont-ils directement applicables aux animaux d'une même classe d'âge, ou bien faut-il tenir compte des variations de croissance de ces animaux ?

Une réponse négative à cette première question entraîne la seconde question: les croissances différentielles observées au sein d'une même cohorte peuvent-elles être expliquées par des temps d'activité respiratoire différents?. Depuis la mise au point d'un système de mesure en continu de la consommation d'oxygène des mollusques (Bougrier et Geairon, 1991), il a été montré qu'un animal moyen constamment immergé ne respire pas en permanence. L'activité respiratoire, définie comme le pourcentage du temps de consommation d'oxygène sur une période donnée, peut varier de 30 à 80% (Bougrier et al., 1994) selon la saison et l'état physiologique de l'animal.

Le but de cette étude est de répondre à ces questions par la mesure en continu du temps d'activité et de l'intensité respiratoire d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* issues d'une même cohorte.

- *Matériel et Méthodes*

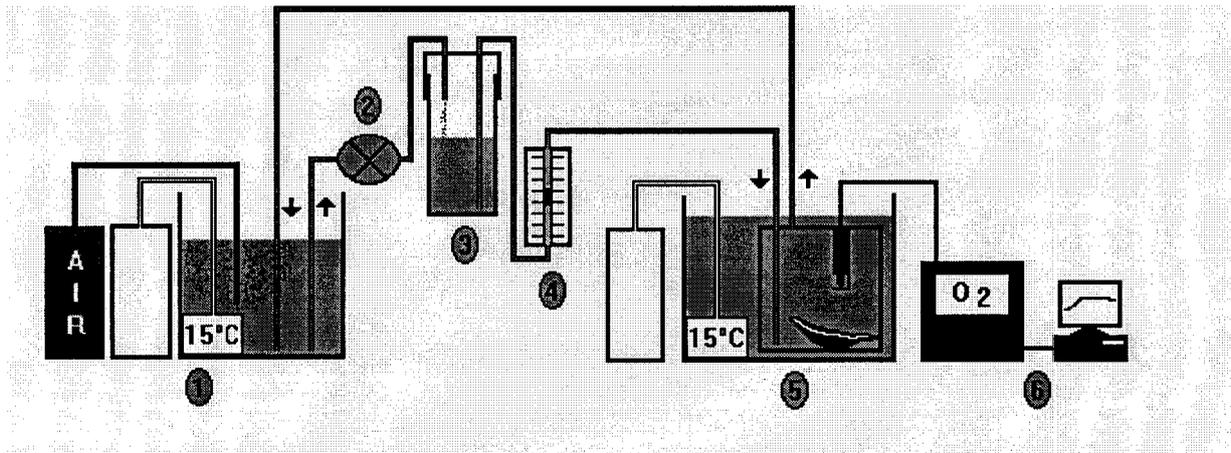
Les huîtres d'une même classe d'âge (captage de l'été 1994) ont été prélevées dans le bassin de Marennes-Oléron fin juin 1995. Le poids total de ces animaux était compris entre 7 et 57 g. Elles ont été stockées dans les claires du laboratoire de l'Houmeau pendant une semaine. Une première mesure de l'activité et de la consommation d'oxygène a été effectuée sur 29 animaux début juillet. Elles ont ensuite été stockées au laboratoire dans des bacs d'eau de mer épurée de toute particule. Fin juillet, une seconde estimation de l'activité respiratoire et de consommation d'oxygène a été effectuée après un jeun de 15 jours durant lequel tous les animaux ont pondu.

Le système (Figure 6) est basé sur un dispositif fermé développé par Bougrier et Geairon (1991a):

1. L'eau de mer est stockée dans un bac de reprise à niveau constant, d'un volume d'environ 30 litres. Cette eau, filtrée sur une cartouche de 0,22 μm , est maintenue à une température constante de 20°C, représentative de la température dans le bassin de Marennes-Oléron à cette époque de l'année. Un système de bullage permet de maintenir la saturation en oxygène de l'eau de mer à 100%. Aucun apport nutritif n'est fourni aux animaux lors de la mesure de l'activité et de la consommation d'oxygène.
2. L'eau circule dans le système à l'aide d'une pompe péristaltique. Le débit varie de 15 à 30 ml.h^{-1} selon la taille de l'animal, de façon à ce qu'il ne consomme pas plus de 30% de l'oxygène initialement disponible (Riva et Massé, 1985). En effet, au-delà de cette limite, l'animal tend à réguler sa consommation d'oxygène (Bougrier et al., 1991b).
3. La mesure de l'oxygène dissout nécessite l'absence d'air gazeux, une colonne de dégazage est ainsi disposée dans le circuit.
4. Le débitmètre permet, d'une part de contrôler le débit d'eau traversant la chambre de mesure et, d'autre part la mesure de la consommation d'oxygène de l'animal.
5. La chambre de mesure hermétique de 500 ml est placée dans un bain marie réglé à 20°C. L'eau de mer pénètre au fond et ressort par le haut de l'enceinte pour être rejetée dans le bac de reprise (1).
6. La sonde oxymétrique Orbisphère (Orbisphere Laboratories), à agitateur incorporé, est fixée sur le haut de l'enceinte de mesure. Les signaux sont recueillis, soit sur des enregistreurs papier, soit sur un micro-ordinateur à l'aide d'une carte d'acquisition Analog Connection (Strawberry Tree Incorporation) associée à son logiciel Quick Log (visualisation en temps réel).

La mesure en continu de la consommation d'oxygène a été effectuée sur 23 animaux et pour des périodes de 24 h.

Figure 5 : Dispositif expérimental de la mesure en continu de la consommation d'oxygène des mollusques.



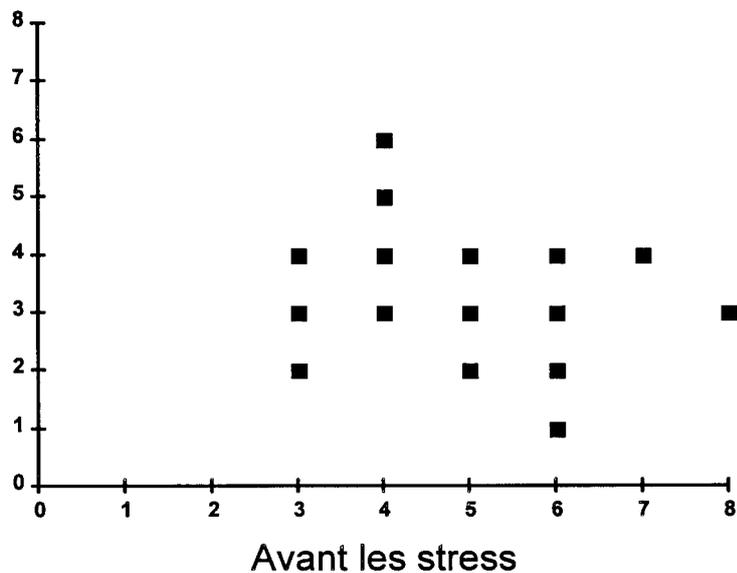
• *Résultats*

Nombre de périodes d'activité :

Le nombre de périodes d'activité a varié de 3 à 8 ($4,75 \pm 1,39$) avant les stress, et de 1 à 6 ($3,30 \pm 1,10$) après. Il ne semble pas exister de relation entre le nombre de période avant et après le stress (Figure 7).

Figure 7 : Nombre de périodes d'activité des huîtres avant et après les stress (jeun de 15 jours et ponte).

Après les stress



Pourcentage du temps d'activité :

Le pourcentage d'activité est défini comme la fraction de temps pendant lequel l'animal consomme de l'oxygène dissout durant 24 h. Que ce soit avant ou après le stress, cette activité respiratoire ne semble pas liée au poids de l'animal. En effet, la relative corrélation négative entre l'activité respiratoire et le poids total de l'animal (Figure 9) n'est pas significative ($p=0.102$ avant le stress, $p=0.115$ après). Il faut noter cependant, que le stress a induit une forte réduction de cette activité, la valeur variant de $80,02\% \pm 6,91$ à $61,97\% \pm 11,40$ (Figure 8).

Figure 8 : Relation entre le poids total et le pourcentage du temps d'activité chez l'huître.

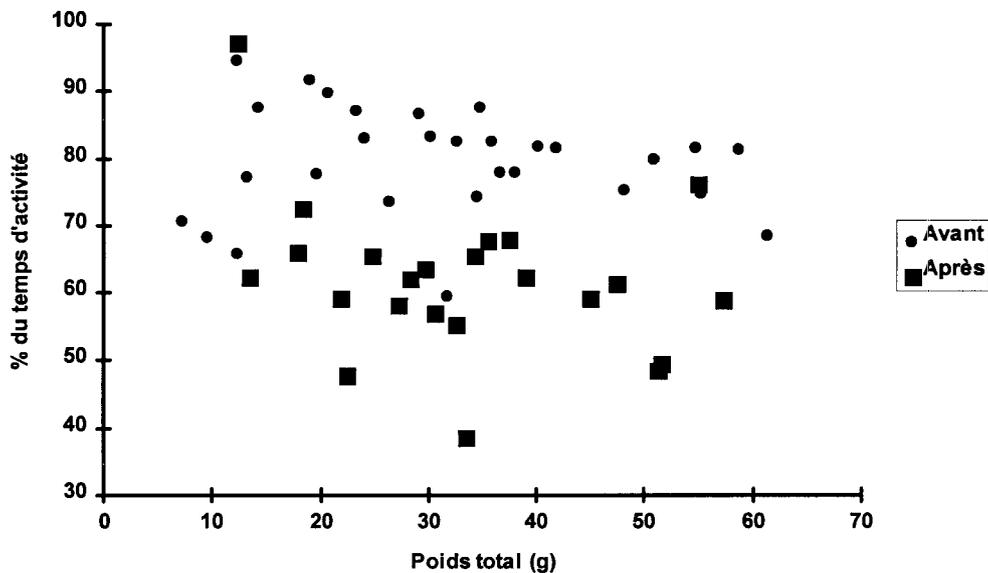
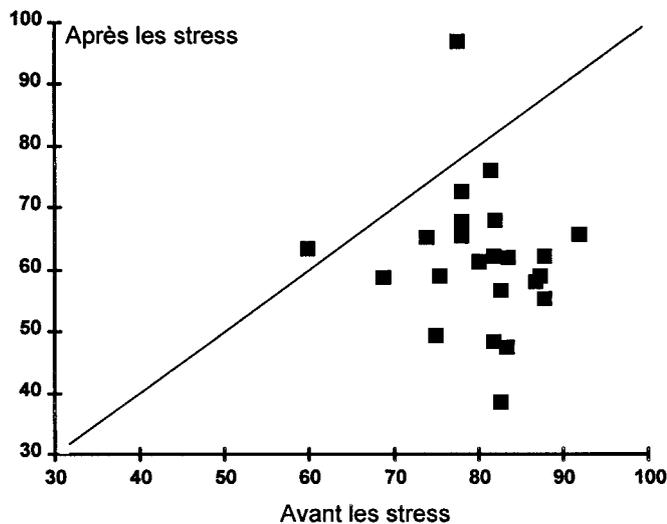


Figure 9 : Relation entre le pourcentage du temps d'activité avant et après les stress.



Consommation horaire d'oxygène : Le dépouillement des données est en cours.

- *Conclusion*

Les premiers résultats de cette étude semblent montrer que le temps d'activité respiratoire de l'huître n'est pas lié à son poids. Cependant, bien que les tests statistiques soient non significatifs, une corrélation négative peut être soupçonnée. Cela signifierait que les animaux de petites tailles sont plus actifs que les animaux de plus forte taille. L'effectif peu élevé de cette expérience ne permet pas de confirmer ou d'infirmier cette différence. Une étude complémentaire portant sur un nombre plus élevé d'animaux issus d'une même cohorte produite en éclosion, pourrait permettre de juger de cette différence. De plus, les résultats de consommation horaire ou journalière de tels animaux devront permettre de tester s'il existe une éventuelle relation entre la consommation d'oxygène et la croissance des mollusques, tout en précisant si cette relation est due à des temps d'activité et/ou des intensités respiratoires différentes selon la taille de l'animal.

4. CONCLUSION GENERALE

L'année 1995 a été consacrée aux points suivants :

- La conception d'un ensemble d'expérimentations, à la suite d'une réflexion conjointe entre généticiens et physiologistes. Cette réflexion a abouti sur la mise en place d'un large projet sur 5 ans, en collaboration avec différentes équipes françaises et européennes.
- La mise au point de techniques d'écloserie et réalisation d'expériences permettant de valider la faisabilité de ces nouvelles techniques. Celles-ci seront mises en oeuvre en 1996 pour étudier la variabilité des caractères liés à la croissance sur une population G1 à large base génétique.
- La réalisation d'expériences de physiologie pour mieux connaître l'amplitude de la variabilité observée entre individus pour un ensemble de caractères physiologiques liés au métabolisme de base et à la croissance. Ces différences sont abordées à plusieurs niveaux : intra-populations (intra- et inter-cohortes) et inter-populations.

4. BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, (1983). Données de base sur la génétique de l'huître plate *Ostrea edulis* et de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapport de Contrat EPR Bretagne-CNEXO-CNRS. Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, Laboratoire de La Trinité sur Mer. 55 pages.

Askew C.G. (1978). A generalized growth and mortality model for assessing the economics of bivalve culture. *Aquaculture*, 14 : 91-104.

Banks M.A., Hedgecock D. & Waters C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2 : 129-136.

Barillé L., Bougrier S., Geairon P. & Robert J.M. (1994). Alimentation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) à l'aide de navicules bleues *Haslea ostrearia* (Simonsen) de différentes tailles. *Oceanologica Acta*, 17(2) : 201-210.

Bayne B.L., Iglesias I., Hawkins A.J.S., Navarro E., Héral M. & Deslous-Paoli J.M., 1993. Feeding behaviour of mussel *Mytilus edulis* l. responses to variations in both quantity and organic content of seston. *Journal of Marine Biology Association U. K.*, 73 : 813-829.

Borsa P., Zainuri M & Delay B. (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity*, 66 : 1-8.

Bougrier S., Geairon P. (1991a) - Activité respiratoire en continu de l'huître *Crassostrea gigas*: Mise au point d'une nouvelle méthodologie. I.C.E.S., *Mariculture Committee*, C.M. 1991/F:54.

Bougrier S., Masson D., Geairon P., Fouche D., Leroy A., Faury N., Ratiskol J. (1991b) - Métabolisme de l'huître *Crassostrea gigas* stockée dans des dégorgeoirs conchylicoles, à différentes densités et saisons. I.C.E.S., *Mariculture Committee*, C.M. 1991/F:55.

Bougrier S., Geairon P., Deslous-Paoli J.M., Razet D. (1994) - Continuous monitoring oxygen consumption of *Crassostrea gigas* in laboratory and in the field. In *EEC Far contract AQ 2500*, Trophic capacity of an estuarine ecosystem: determination of biological criteria for the management of cultured populations of oysters and their economical consequences (TROPHEE). Final report, 12p.

Bougrier S., Geairon P., Deslous-Paoli J.M., Bacher C., Jonquières G. - 1995 - Allometric relationships and temperature effects on clearance and oxygen consumption rates in *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134: 143-154.

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

Dubé F., Schmidt T., Johnson C.H. & Epel D. (1985). The hierarchy of requirements for an elevated intracellular pH during early development of sea urchin embryos. *Cell*, 40 : 657-666.

Falconer D.S. (1981). Introduction to quantitative genetics. Clarendon Press, Oxford.

Foltz D.W. (1986). Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, 40 : 869-870.

Gaffney P.M. (1994). Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: More light? In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Ed. A.R. Beaumont, Chapman & Hall, London. pp 146-153.

Gallais A., (1990). Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson Ed., Coll. Sciences Agronomiques, Paris. 588 pages.

Gérard A., Naciri Y., Peignon J.M., Ledu C., Phélipot P., Heurtebise S., Garnier J., Baud J.P., Nourry M., Haure J., Martin A.G., Claude S., Langlade A., Joly J.P., Gouletquer P., Ruelle F., Coatanea D., Oheix J., Vercelli C., Chabiran J.M., Maurer D., Borel M., Cardinal M., Cornet J., Le Pennec M. & Le Mercier A. (1994). Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (5ème partie). *Rapport interne IFREMER, RIDRV 94-017 - RA La Tremblade*, 76 p.

Hawkins A. J. S. (1991). Protein turnover : a functional appraisal. *Functional Ecology*, 5: 222-233.

Hawkins A. J. S. Effects of temperature change on ectotherm metabolism and evolution : metabolic and physiological interrelations underlying the superiority of multi-locus heterozygotes in heterogeneous environments. *Journal of Thermal Biology* (sous presse).

Hawkins A. J. S., Bayne B. L. & Day A. J. (1986). Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the basis of variable age-specific growth. *Proceedings of the Royal Society, London*, 229 : 161-176.

Hawkins A. J. S., Bayne, B. L., Day, A. J., Rusin, J. & Worrall, C. M. (1989). Genotype-dependent interrelations between energy metabolism, protein metabolism and fitness. In: J.S. Ryland and P.A. Tyler (Editors), *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms*; 23rd European Marine Biology Symposium. Olson & Olson, Fredensborg, pp. 283-292.

Hawkins A.J.S., Bayne B., Day M., Jones S., Gérard A., Héral M., Naciri Y., Ledu C., Peignon J.-M., Phélipot P., Zouros E. & Magoulas A. (1993). Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in

commercially important marine shellfish. *First Progress Report, Contrat N° AIR1-CT92-0168*. 63 pp.

Hawkins A.J.S., Day M., Jones S., Bayne B., Gérard A., Naciri Y., Ledu C., Peignon J.-M., Phélipot P., Zouros E., Magoulas A. & Kotoulas A. (1994a). Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in commercially important marine shellfish. *Second Progress Report, Contrat N° AIR1-CT92-0168*. 89 pp.

Hawkins A.J.S., Day A.J., Gérard A., Naciri Y., Ledu C. Bayne, B.L. & Héral M. (1994b). Faster triploid growth is associated both with greater mean heterozygosity and reduced intensity of maintenance metabolism in the oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 184 : 21-40.

Hawkins, A. J. S., Widdows J. & Bayne B. L. (1989). The relevance of whole-body protein metabolism to measured costs of maintenance and growth in *Mytilus edulis*. *Physiological Zoology*, 62 : 745-763.

Hazan J., Dubay C., Pankowiak M.P., Becuwe N., and Weissenbach J. (1992). A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics*, 12:183-189.

Héral M. (1993). Why carrying capacity models are useful tools for management of bivalve molluscs culture ? In *Bivalve Filter Feeders in Estuarine Coastal Ecosystem Processes*. NATO ASI Series, Vol G33, R.F. Dame Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg : pp 455-477.

Héral M. & Grizel H. (1991). Introduction into France of the japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la mer*, 47 : 399-403.

Karl S. & Avise J.C. (1993). Balancing selection at allozyme loci in oysters : implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256 : 100-102.

Koehn R.K. & Gaffney P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 82 : 1-7.

Koehn R.K., Diehl W.J. & Scott T.M. (1988). The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 118 : 121-130.

Koehn R.K. & Shumway S.E. (1982). A genetic physiological explanation for differential growth-rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine Biology Letters*, 3(1) : 35-42.

Kolkovski S., Tandler A., Kissil GW and Gertler A. (1993). The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Liurraeus) larvae. *Fish Physiology and*

Lichter P., Chang Tang C., Call K., Hermanson G., Evans G.A., Housman D. & Waer D. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science*, 247: 64-69.

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

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

Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J. & Britton-Davidian J. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse enzymatique. Collection Technique & Documentation, Ed. Lavoisier, Paris, 217 pp.

Razet D. Héral H., Prou J., Legrand J. Sornin J.M. (1990). Variation des productions de biodépôts (fécès et pseudo) de l'huître *Crassostrea gigas* dans un estuaire macrotidal : baie de Marennes-Oléron, *Haliotis*, 10 : 143-161.

SAS/STAT (1988). SAS Institute Inc., SAS/STAT User's guide, Release 6.03 Edition. 1028 pages Box 8 000, Cary, NC 27513-8000.

Samain J.-F., Salaun M., Diouris M., Daniel J.Y., Le Coz J.R. & Moal J. (1991). Digestive enzymes during development of *Pecten maximus* : relations with ingestion and absorption processes. *13th International Congress of E.S.P.B.*

Samain J.-F., Hernendorena A., Moal J., Daniel J.Y., Le Coz J.R. (1985). Amylase and trypsin activities during *Artemia* development on artificial axenic media : effect of starvation and specific deletions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 86 : 220-225.

Singh S.M. & Green R.H. (1984). Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, 25 : 569-581.

Smerdon, G.R., Chapple, J.P. & Hawkins, A.J.S. (1995). The simultaneous immunological detection of four stress-70 protein isoforms in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, sous presse.

Thacker P.A., Campbell G.L. & Grootwassink J. (1991). The effect of enzyme supplementation on the nutritive value of rye-based diets for swine. *Canadian Journal of Animal Sciences*, 71 : 489-496.

Thiriot-Quiévreux C. (1986). Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'*Ostreidae* (Bivalvia). *Genetica*, 70 : 225-231.

Thiriot-Quiévreux C., Noël T., Bougrier S. & Dallot S. (1988). Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 75 : 89-96.

Thiriot-Quiévreux C., Pogson G.H. & Zouros E. (1992). Genetics of growth rate variation in bivalves : aneuploidy and heterozygosity effect in a *Crassostrea* family. *Genome*, 35(1) : 39-45.

Todd J.A. (1992). La carte des microsatellites est arrivée! *Human Molecular Genetics*, 1:663-66.

Trask B.J. (1991). Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, 7 : 149-154.

Wilkins N.P. & Goswami U. (1994). A study of the chromosomes of diploid and triploid shellfish using fluorescent DNA probes. Report of E.U. contract N°CM-CT93056 (Marie Curie).

Wilkins N.P. & Mathers N.F. (1973). Enzyme polymorphisms in the European oyster *Ostrea edulis*. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics*, 4 : 41-47.

Wilkins N.P. & Mathers N.F. (1974). Phenotypes of phosphoglucose isomerase in some bivalve mollusks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 48B : 599-611.

Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15 : 223-254.

Zouros E. & Foltz D.W. (1987). The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. Isozymes : *Current Topics in Biology and Medical Research*, 13 : 1-59.

Zouros E. & Pogson G.H. (1994). The present status of the relationship between heterozygosity and heterosis. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Ed. A.R. Beaumont. Chapman & Hall, London. pp 133-146.