

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

pour obtenir le diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE ET L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
LOIRE

Spécialité : Biologie Marine
École Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral

présentée par

Sébastien Lachambre

Préparée à l'UMR 6539
Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoire des sciences de l'environnement marin

Mise en place d'un plan de sélection génétique pour l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*

Thèse soutenue le 15 décembre 2017

devant le jury composé de :

Stéphanie Bordenave

Maître de conférences, MNHN / Rapporteur

Marc Vandeputte

Ingénieur de recherche, Ifremer-INRA / Rapporteur

Fabienne Guérard

Professeur, UBO LEMAR / Examinatrice

Catherine Mariojols

Professeur, AgroParisTech / Examinatrice

Ludovic Dickel

Professeur, Université de Caen / Examineur

Hervé Le Bris

Professeur, Agrocampus Ouest / Examineur

Sabine Roussel

Maître de conférences UBO / Directrice de thèse

Pierre Boudry

Directeur de recherche, Ifremer / Directeur de thèse

Sylvain Huchette

PhD, France Haliotis / Invité



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse. Merci à Stéphanie Auzoux-Bordenave et à Marc Vandeputte d'avoir accepté d'expertiser ce manuscrit et à Fabienne Guérard, Catherine Mariojouis, Ludovic Dickel, Hervé Le Bris pour la participation au jury et les différents commentaires réalisés sur mon travail.

Un grand merci à mes deux directeurs de thèse, Sabine Roussel et Pierre Boudry, pour leur accompagnement tout au long de cet apprentissage. Merci pour leur implication qui a rendu possible la réalisation de ces 3 années de travail. Merci pour leur amitié qui m'a permis d'affronter les difficultés rencontrées lors de ces trois années. Merci pour leur pédagogie et leur patience m'ont permis de découvrir le monde de la recherche et de comprendre les exigences demandées de la recherche scientifique de haut niveau. Enfin, merci pour leur soutien dans la rédaction de ce manuscrit. Je n'aurais pas réussi sans eux et je sais que tous les directeurs de thèse n'ont pas la même implication pour la réussite de leurs étudiants.

Merci à Sylvain Huchette d'avoir été commanditaire de ce projet et d'avoir cofinancé cette thèse avec l'ANRT. Merci de m'avoir fait découvrir l'Halioticulture il y a déjà bientôt 5 ans et de m'avoir offert une formation à l'interface entre la recherche et la production par de nombreuses formations professionnelles et deux voyages dans des pays producteurs d'ormeaux. Merci aussi à tous mes collègues de France Haliotis, Maryvonne Leroux, Michael Gleeson, Frederic Laurans, Xavier Lesage, Iain McKensy et Guillaume Colin. Ils m'ont tous soutenu pendant ces trois années et sans eux la réalisation de 3 expérimentations d'élevage de 3 ans n'aurait pas été possible. L'halioticulture est un métier complexe et incertain, elle demande une implication de tous les instants et comme chaque entreprise d'élevage elle dépend avant tout des hommes et des femmes qui la rende possible. Je leur tire mon chapeau pour le courage dont ils font preuve pour faire vivre notre profession.

Je voudrais également remercier l'ensemble de mes collègues chercheurs, ingénieurs de recherche et producteurs que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse. Tous les membres de mon comité de thèse, Mathilde Du-pont Nivet, Valérie Roussel, Joël Aubin, Robert Day, Pierrick Haffray pour leur accompagnement, leur confiance maintes fois renouvelées et les différents conseils qui ont permis d'orienter ma thèse. Merci à mes camarades du SYSAAF :

Anastasia Bestin, Florian Enez et Romain Morvezen sans quoi les analyses réalisées en fin d'année 2017 n'auraient pas pu être possibles. Merci pour leur grande patience, leur pédagogie, et l'engagement qu'ils ont au travail pour permettre aux différents adhérents de mettre en place des programmes de sélections performants. Merci aussi à mes collègues Sud-Africains, Clint Rhode, Retha Van Staden, Michael Joubert et Nick Loubser qui m'ont ouvert les portes de leurs écloseries, montré des méthodes de productions innovantes et partagé avec moi leurs expériences en sélection.

J'ai une pensée pour tous les stagiaires que j'ai rencontrés au cours de mes trois ans de thèse à France Haliotis et qui m'ont toujours nourris par leurs expériences et leurs questionnements divers. Plus particulièrement, je voudrais remercier les cinq stagiaires que j'ai encadrés directement aux cours de cette thèse : Jean-Lou Gervois, Jaison Raj, Valentin Courant, Kyle Chenevert, et Amy Courant.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à écrire ce manuscrit Bruno, Antoine, Maèla avec une mention spéciale pour Marjorie qui a effectué la première relecture de l'intégralité des textes en Français qui composent cette thèse.

Enfin, merci aux membres de ma famille Marie-Lou, Bruno, Amandine, Antoine qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours qui ne m'a pas permis de les voir assez. Ma dernière pensée sera pour mes amis qui ont vécu au jour le jour à mes côtés, les joies et les peines associées à cette aventure: Marjorie, Maèla, Quentin, Jean-Lou, Louis et Damien. Je n'oublierai jamais votre soutien, vous savez qu'une partie de vous est dans ce travail.

Table des matières

Remerciements	1
Index des figures	6
Index des tableaux	9
Avant-propos	10
Introduction générale.....	11
1. Domestication des espèces aquatiques	11
1.1 Définition de la domestication des espèces animales	11
1.2 Histoire et enjeu de la domestication des espèces animales	12
1.3 Niveaux de domestication des différentes productions halieutiques	17
2. Présentation du modèle biologique <i>Haliotis tuberculata</i>	22
2.1 <i>Haliotis spp</i> : des mollusques gastéropodes.....	22
2.2 Histoire évolutive, en construction	23
2.3 Biologie de l'espèce d'ormeau européen, <i>Haliotis tuberculata</i>	24
2.4. Reproduction et développement de l'ormeau	29
2.5. Physiologie et comportement de l'ormeau européen.....	33
3. Production des ormeaux dans le monde et en France : un besoin d'accélération du processus de domestication	39
3.1 Une production mondiale en forte croissance.....	39
3.2 Production en Europe.....	42
3.3 Structures d'élevage de France <i>Haliotis</i>	44
4. Bases génétiques de la variabilité des caractères phénotypiques et amélioration par la sélection.....	51
4.1 Notions de base de génétique quantitative : le modèle polygénique infinitésimal	51
4.2 Utilisation des effets génétiques additifs en sélection	52
4.3 Estimation des paramètres génétiques	54
4.4 Prévision du progrès génétique	56
4.5 Sélection et gestion de la diversité génétique en élevage	59
4.6 Conséquences des récents progrès en génétique sur la pratique de la sélection	60
4.7 Différents plans de sélection génétique	62
5. Sélection génétique en aquaculture : le cas particulier de l'halioticulture	66
5.1 Différents plans de sélection et résultats en aquaculture	66
5.2. Sélection en halioticulture.....	71
5.3 Gestion de la diversité génétique dans les écloséries d'ormeaux	76
Conclusion	77

6. Physiologie et comportement : deux champs d'étude clés pour une optimisation de la performance en élevage	79
6.1 Mesures des performances en élevage	79
6.2 Mesures des caractères physiologiques	84
6.3 Connaissances et mesures de caractères comportementaux	89
7. Problématique et objectifs de thèse	93
Chapitre 1 : Etude des effets d'un processus de domestication à son commencement pour l'ormeau Européen <i>Haliotis tuberculata</i>	96
Contexte et Objectifs	97
Méthodes utilisées	99
Principaux résultats et discussions	101
Conclusion	103
<i>Manuscrit 1</i> : Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria approach to <i>Haliotis tuberculata</i> phenotypic traits. <i>Aquaculture</i> . 467, 190-197... 104	
<i>Manuscrit 2</i> : Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection. <i>Appl. Anim. Behav. Sci.</i> 196, 13-21. 113	
Chapitre 2 : Estimation de paramètres génétiques pour une cohorte d'élevage d' <i>Haliotis tuberculata</i>	123
Objectifs.....	124
Méthodes utilisées	125
Principaux résultats et conclusions	126
Conclusion	129
<i>Manuscrit 3</i> : First low density SNP panel from RNA seq for parentage assignment of a farm cohort of European abalone <i>Haliotis tuberculata</i> in a perspective of selective breeding implementation. 130	
<i>Manuscrit 4</i> : Estimation of genetic parameters of growth, morphologic, immune and behavioral traits in the European abalone <i>H. tuberculata</i> in the context of its domestication and implementation of selective breeding to improve growth. 157	
Discussion générale.....	186
1. Etude d'un processus de domestication à son commencement.....	186
1.1 Domestication récente n'ayant pas généré une amélioration de la productivité des populations d'élevage	186
1.2 Différenciation des populations sauvages et des populations d'élevage sur le plan comportemental et physiologique	188
2. Mise en place d'un programme de sélection génétique pour améliorer la croissance des ormeaux	191
2.1. Etapes de réflexion menant à la mise en place d'un programme de sélection individuelle	191

2.2. Objectifs de la sélection et caractères à sélectionner	192
2.3. Définition de la population de base pour l'établissement d'un programme de sélection	197
2.4 Application d'une pression de sélection	198
2.5 Pratiques de reproduction	200
2.6 Stratégie d'élevage à adopter	204
3. Perspectives d'évolution pour la sélection génétique de l'ormeau européen.....	206
3.1 Ajout de caractères d'intérêt pour la sélection.....	206
3.2 Etude de l'opportunité de mise en place d'un programme de sélection généalogique pour l'ormeau.....	208
3.3 Poursuite de l'étude des effets de la domestication mise en place à France Haliotis.....	209
3.4 Amélioration de la productivité d'élevage par d'autres méthodes que la sélection individuelle	210
Conclusion générale	212
Liste des annexes.....	214
Annexe 1: Anti-predator response of <i>Haliotis tuberculata</i> : behaviour is modified after one generation of domestication.....	216
Annexe 2: Conséquence du prélèvement d'épipodes et du marquage de la coquille sur la croissance et la mortalité d'une population d'ormeaux de 2 ans.....	246
Annexe 3 : Recherche d'un prédicteur non invasif du taux de chair et du taux de gonade.....	250
Annexe 4: Lexique.....	251
Bibliographie.....	257
Résumé	275

Index des figures

Figure 1 : Les différents foyers de domestication dans le monde (Mazoyer et Roudart, 2002)	12
Figure 2 : Fresque égyptienne illustrant l'importance de l'exploitation des caractères comportementaux dans les premiers pas de la domestication. Ici, la vache ne donne son lait qu'avec la présence de son veau (https://fr.pinter/ (Inconnu, 2014)).....	13
Figure 3 : Aperçu de la diversité des races de poules en fonction des objectifs d'exploitation allant de la production d'œufs ou de chair, au combat ou à l'apparat (http://volaillepoultry.pagesperso-orange.fr/index1.html (Periquet, 2010)).....	15
Figure 4 : Illustration d'une hyper spécialisation dans la production de viande avec le taureau culard de race blanc bleu belge (Source : https://i.ytimg.com/vi/u1m8AkIBxCg/hqdefault.jpg)	16
Figure 5 : Evolution des productions halieutiques par pêche et par aquaculture au cours des 60 dernières années. (Source : http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/fr FAO, 2013)......	19
Figure 6 : A) Classification moderne des taxons communs sur le base de données morphologiques et moléculaires (Hooper et al., 2007) ,B) Arbre phylogénétique des Haliotidae (Geiger, 1999b) ,EM-RS : Europe, Méditerranée, IP : Indo-Pacifique, NZ : Nouvelle-Zélande, RSA : Afrique du Sud.	22
Figure 7 : Distribution du genre Haliotis dans le monde et représentation des différentes étapes de son histoire évolutive (Franchini et al., 2010).....	23
Figure 8 : Anatomie de l'ormeau : A) Vue dorsale de la coquille d'un ormeau d'élevage de 45 mm et 3 ans, B) Vue ventrale du même ormeau (Source : personnelle), C) Vue dorsale, schéma de la biologie interne d'un ormeau une fois la coquille enlevée (Source : Le Petit, 2009).....	26
Figure 9 :A) Coquille d'un ormeau de 3 ans (48 mm) dont la coloration permet d'observer l'historique alimentaire mono-spécifique composé de 3 algues à 3 périodes différentes du cycle de vie. B) Nacre (Photos: Source personnelle)	26
Figure 10 : A) Coupe transversale représentant les 5 parties de la chair du pied d'un ormeau avec une correspondance entre un schéma (Porturas Olaechea et al., 1993) et un tissu frais (Photo : source personnelle), A. repli supportant les épipodes, B. partie dure de la base du pied avec épithélium. C. partie tendre de la base du pied, D. et E. muscle abducteur inférieur et supérieur (Photo : source personnelle) B) Photo du dessous de pied d'un ormeau illustrant la variabilité de coloration (Photo : source personnelle).....	27

Figure 11 : Appareil gonado-digestif d'ormeaux en cours de maturation à deux ans, coloration jaunâtre d'un mâle à gauche et bleue foncée d'une femelle à droite (Photo : source personnelle).	28
Figure 12 : Cycle de vie d'un ormeau. (Source : Cardinaud 2015)	30
Figure 13 : Evolution des productions d'ormeaux de pêche et d'aquaculture au niveau mondial depuis 1950 (Source : http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/fr FAO 2015).	40
Figure 14 : l'équipe de France Haliotis en 2016 (Photo : SCEA France Haliotis)	44
Figure 15 : A) Position de France Haliotis en Bretagne Nord, B) Position de la concession et de la nurserie de France Haliotis (Photos : SCEA France Haliotis).	45
Figure 16 : Cycle de production à France Haliotis avec les principaux agents stressants associés aux pratiques d'élevage en rouge et les principales pressions de sélection en vert (Source : personnelle)	46
Figure 17 : A) Salle de conditionnement B) et la salle larvaire de France Haliotis (Photos : SCEA France Haliotis).	46
Figure 18 : A) Les 120 bassins de la nurserie de France Haliotis, B) Bassin sous serre composé de 22 paniers de 20 plaques recouvertes d'Ulvea lens, C) Panier contenant du naissain de 6 mm (Photos : SCEA France Haliotis).	47
Figure 19 : Cribleuse ostréicole en eau utilisée pour un tri par la taille de juvéniles inférieurs à 30 mm (Photo : SCEA France Haliotis)	48
Figure 20 : A) Organisation d'une filière de production, B) Extérieur et intérieur d'une cage utilisée pour le grossissement (Photos : SCEA France Haliotis).	49
Figure 21 : Les 4 espèces les plus fréquemment utilisées par France Haliotis pour les cages de grossissement en mer : A) <i>Palmaria palmata</i> , B) <i>Ulva lactuca</i> , C) <i>Laminaria digitata</i> , D) <i>Saccharina latissima</i> (Photos : SCEA France Haliotis).	49
Figure 22 : A) Ormeau d'élevage cuisiné sur une galette de blé noir, B) Pots d'ormeaux cuisinés ou en rilette (Photo : SCEA France Haliotis)	50
Figure 23 : A) Intervalle de génération de différents animaux domestiqués et B) dynamique du progrès génétique (Source : CSAGAD, 2017)	58
Figure 24 : A) Photo d'un ormeau adulte de 60 mm marqué avec un marquage Hallprint® à trois chiffres, B) Deux juvéniles qui ont atteint la taille limite de 15-20 mm pour être marqués avec un transpondeur à gauche et un tip-tag à droite (Photo : personnelle)	80
Figure 25 : Calibreuse de France Haliotis permettant la pesée de 900 individus par heure	80

Figure 26 : Grille de notation réalisée sur le pied et la coquille d'Haliotis iris élevé dans un environnement commun (Camara et Symonds, 2014).....	83
Figure 27 : Photo d'un texturomètre à compression utilisé en analyse sensorielle (Photo : https://www.google.fr/search?q=texturomètre&source).....	84
Figure 28 : Prélèvement d'hémolymphe sur un ormeau d'élevage (Photo : SCEA France Haliotis).....	85
Figure 29 : Gonade femelle développée autour de la glande digestive (Source : personnelle)	88
Figure 30 : Différentes étapes du retournement d'un ormeau (Photo : France Haliotis).....	91
Figure 31 : Représentation des différents croisements effectués aux cours des 12 années de production au sein de l'entreprise France Haliotis, et niveaux de domestication (d'après Teletchea et Fontaine (2014))	97
Figure 32 : Différentes étapes du questionnement associé à la mise en place d'un programme de sélection individuelle.....	192
Figure 37 : Itinéraire technique d'une cohorte supportant la sélection sur ses 4 ans d'élevage	204
Figure 38 : Blox-plot de la croissance en taille (G.L. mm.m), en poids (G.W. g.m), de l'indice de condition (Ic mm.g), du Indice visuel gonadique (unité), et de % de mortalité (%.Morta) pour les différents niveaux de manipulations testés.....	227
Figure 38 : Blox-plot de la croissance en taille (G.L. mm.m), en poids (G.W. g.m), de l'indice de condition (Ic mm.g), du Indice visuel gonadique (unité), et de % de mortalité (%.Morta) pour les différents niveaux de manipulations testés	248
Figure 38 : Blox-plot de la croissance en taille (G.L. mm.m), en poids (G.W. g.m), de l'indice de condition (Ic mm.g), du Indice visuel gonadique (unité), et de % de mortalité (%.Morta) pour les différents niveaux de manipulations testés	248

Index des tableaux

Tableau 1 : Niveau de domestication en aquaculture et nombre d'espèces de poissons par catégorie (Teletchea et Fontaine, 2014)	20
Tableau 2 : Taille de génomes de plusieurs espèces de la famille des Halitidae	24
Tableau 3 : Différents types de sélection utilisés en élevage	63
Tableau 4 : Réponses à la sélection pour différentes populations d'ormeaux	72
Tableau 5 : Liste des différents travaux publiés proposant une estimation d'héritabilité pour une performance en élevage.....	73
Tableau 6 : Estimation d'héritabilité sur des caractères innovants	75
Tableau 7 : Récapitulatif des différentes populations comparées au sein des 3 premières expérimentations et des effets rentrant en jeu dans le processus de domestication des différentes populations.	100
Tableau 8 : Prospective de création d'un programme de sélection multi-caractères	196
Tableau 9 : Estimation des gains possibles en g et % par rapport à la moyenne en 4 ans sur le poids à 42 mois par différentes stratégies de sélection	199

Avant-propos

Le développement de l'halioticulture au niveau mondial a été très rapide lors des 20 dernières années. Elle représente aujourd'hui l'une des premières productions aquacoles en valeur pour plusieurs pays (Rhode et al., 2014). Ces progrès rapides ont été principalement permis par des avancées sur l'alimentation et les structures d'élevage (Allen et al., 2006; Fleming, 1995a). Malgré ces avancées zootechniques, le point faible de l'halioticulture reste la croissance lente qui caractérise la plupart des espèces d'ormeaux produites et les coûts importants en main d'œuvre qui y sont associés (Elliott, 2000). Ce contexte explique la volonté des producteurs de mettre en place des plans de sélection pour améliorer la croissance (Elliott, 2000; Rhode et al., 2012; You et al., 2010c).

Dans ce cadre, cette thèse CIFRE a été mise en place au sein de l'entreprise France Haliotis, en collaboration avec le LEMAR et le SYSAAF, avec pour objectif de réunir des bases scientifiques nécessaires à la mise en place d'un plan de sélection durable et adapté au système d'élevage et de commercialisation de France Haliotis. L'ensemble des expérimentations présentées dans cette thèse se sont déroulées à France Haliotis et ont été financées grâce au projet GenOrmeau (FEAMP innovation en aquaculture). L'écloserie de France Haliotis compte aujourd'hui sept salariés. J'y ai été embauché en CDI en tant qu'ingénieur recherche et développement le 24 novembre 2014. France Haliotis commercialise aujourd'hui 5T/an d'ormeaux vivants, sous un cahier des charges agriculture biologique pour la gastronomie française haut de gamme. Pour atteindre une taille et un poids commercial de 64 mm et 40 g, l'élevage dure en moyenne 4 ans. Ce contexte de cycle long et de coûts de production élevés a motivé le lancement d'un projet de sélection génétique.

Cette thèse a été pour moi l'occasion d'approfondir la biologie de l'ormeau, ses techniques de production et les méthodes de sélection. L'introduction générale présente le modèle biologique, le concept de domestication et les différents résultats obtenus par la sélection en aquaculture. Le premier chapitre réunit deux manuscrits s'attachant à l'étude de la relation entre le comportement, la physiologie et la production en situation d'élevage. Un deuxième chapitre présente deux manuscrits étudiant la validation d'un panel de marqueurs SNP permettant l'assignation de parenté au sein d'une cohorte d'élevage et l'estimation de paramètres génétiques sur les caractères étudiés en première partie. Les résultats de ces deux premiers chapitres ont été utilisés dans la discussion pour proposer un programme de sélection multicritères à France Haliotis.

Introduction générale

1. Domestication des espèces aquatiques

Les travaux effectués au cours de cette thèse en biologie marine ont été réalisés dans le cadre de l'étude des effets de la domestication sur l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata*. Après avoir défini le processus de domestication, la place particulière de l'aquaculture y sera décrite.

1.1 Définition de la domestication des espèces animales

Entre la fin du Paléolithique -12000 av. J-C, et la fin du Néolithique -2000 av. J-C, le mode de production des denrées alimentaires pour l'humanité a totalement changé. L'homme est passé du statut de chasseur-cueilleur au statut de cultivateur-éleveur (Mazoyer et Roudart, 2002). Ce changement de mode de production s'est accompagné d'un réchauffement global avec la fin d'une période glaciaire (-11000 -9000 av.J-C). C'est aussi pour l'homme la période des changements d'organisations sociaux-culturels majeurs avec l'apparition de la sédentarisation, la spécialisation des productions, la diversification des techniques, la propriété privée, une hiérarchisation sociale et l'organisation des grandes religions (Mazoyer et Roudart, 2002). Plusieurs hypothèses ont été discutées pour expliquer l'arrivée de l'agriculture dans l'histoire de l'humanité. L'hypothèse selon laquelle l'agriculture est née d'innovations techniques brutales qui ont permis de compenser la raréfaction des ressources naturelles est aujourd'hui rejetée (Vigne, 2002). En effet, des données paléontologiques montrent que la production alimentaire réalisée par la cueillette et la chasse a côtoyé pendant plusieurs milliers d'année une agriculture en lente évolution (Gautier, 1990). L'explication admise de la diffusion de l'agriculture est que la diversité des outils et des techniques a progressivement conféré à ce mode de production un meilleur coût d'opportunité dans une société de plus en plus sédentaire et spécialisée (Mazoyer et Roudart, 2002).

La domestication est une notion complexe qu'il convient de définir. Au sens étymologique, une espèce domestique est une espèce qui fait partie de la maison (*Domus* en latin). La notion de domestication fait donc appel à l'intégration d'une population dans un écosystème sinon artificialisé au moins anthropisé. Elle suppose ensuite un contact régulier entre l'homme et l'animal, et l'isolement d'une population par rapport aux populations sauvages (Gautier, 1990). Il est aussi évident que certaines espèces domestiques ont acquis des caractères qui nous

permettent de les différencier par rapport aux espèces sauvages dont elles dérivent. L'acquisition de ces caractères s'est faite au cours des cycles biologiques sous l'action de mécanismes évolutifs induits par un milieu artificialisé et par des choix de sélections intentionnelles. Au début de la domestication, cet aspect évolutif sur de nombreuses générations a rendu difficile la discrimination entre les espèces domestiques et les espèces en cours de domestication. Pour trancher, le statut de dépendance de l'animal par rapport à un environnement anthropisé permet de dire qu'une espèce est domestiquée (Gautier, 1990). Les différents exemples de populations marronnes (populations d'élevage ayant reconstitué une population sauvage à part entière) comme les mouflons, montrent que le statut d'animal domestiqué n'est arrivé que très tardivement dans l'histoire humaine (Gautier, 1990). La domestication est finalement un long processus par lequel une population sauvage devient adaptée à la présence de l'homme dans un environnement captif, par la combinaison d'évolutions génétiques liées à des événements induits ou intentionnels qui se répètent à chaque génération (Price, 1984).

1.2 Histoire et enjeu de la domestication des espèces animales

1.2.1 Foyers de domestication multiples

Il existe plusieurs foyers de domestication dans le monde, très éloignés et probablement indépendants (Figure 1). C'est à partir de ces foyers que se seraient répandues les espèces domestiques et les pratiques d'élevage dans le monde entier (Mazoyer et Roudard, 2002).



Figure 1 : Les différents foyers de domestication dans le monde (Mazoyer et Roudard, 2002)

Le chien a été le premier animal domestiqué vers 15 000 av J-C. Cette espèce aurait été domestiquée de manière indépendante dans plusieurs foyers de domestication mais tous les

chiens ont une espèce ancestrale unique apparentée au loup actuel (Vigne, 2002). La domestication des espèces végétales a précédé celle des espèces animales. L'observation de l'évolution des espèces domestiquées nous montre que l'apparition de l'élevage est toujours précédée par la domestication de trois types de plantes : une plante protéagineuse, une plante fourragère et une plante textile (Mazoyer et Roudart, 2002). La domestication végétale et la capacité de stockage dans un mode de vie de plus en plus sédentaire semblent favoriser l'émergence d'une domestication animale même si les premières populations domestiquées se nourrissaient en grande partie de manière autonome (Mazoyer et Roudart, 2002; Vigne, 2002). Les premiers animaux domestiques étaient caractérisés par des comportements particuliers, notamment le comportement social de type grégaire (animaux sociaux), le comportement sexuel avec un mâle pouvant se reproduire avec plusieurs femelles, et un comportement alimentaire herbivore ou omnivore (Figure 2) (Vigne, 2002). Les animaux sociaux auraient été plus faciles à domestiquer, l'homme pouvant prendre la place du dominant dans la hiérarchie sociale de la population qu'il souhaite domestiquer. Cette prise de contrôle peut se faire lors de la distribution alimentaire par exemple (Vigne, 2002). Pour qu'une espèce puisse être domestiquée, elle doit en outre répondre à trois impondérables : l'acceptation de l'homme et de la captivité, le fait de produire un service pour les communautés humaines et la capacité d'être féconde en milieu anthropisé (Gautier, 1990). De manière générale, c'est la connaissance de la niche écologique d'une population sauvage, comme son alimentation, ses prédateurs, son habitat qui permet de mettre en place le contrôle culturel nécessaire à sa domestication. L'éleveur doit donc connaître la niche écologique occupée par l'espèce sauvage qu'il veut domestiquer (Gautier, 1990).



Figure 2 : Fresque égyptienne illustrant l'importance de l'exploitation des caractères comportementaux dans les premiers pas de la domestication. Ici, la vache ne donne son lait qu'avec la présence de son veau ([https://fr.pinter//\(Inconnu, 2014\)\)](https://fr.pinter//(Inconnu, 2014))))

1.2.2 Syndrome de domestication

Les deux principaux facteurs qui ont une action sur une population au cours du processus de domestication sont : les objectifs de son exploitation et l'interaction de la population

domestique avec le milieu captif dans lequel elle est entretenue (Gautier, 1990). L'interaction d'une population avec l'environnement où elle est maintenue en captivité a des propriétés bien définies. Elle engendre la suppression de la sélection naturelle, une perte de la panmixie, un apport alimentaire moins diversifié et une exposition à des agents stressants différents de ceux rencontrés dans le milieu naturel comme, par exemple, une forte densité ou la présence de l'homme. Ce contexte a produit des évolutions biologiques reconnaissables chez un grand nombre d'animaux domestiques baptisées « Syndrome de la domestication » (Gautier, 1990). Il est aussi possible de parler de morphotype domestique (Vigne, 2002).

La plus importante composante de ce morphotype est comportementale. Ainsi, le processus de domestication engendrerait une modification du seuil de perception et de sensibilité des populations aux stimuli extérieurs attribués à une évolution du système endocrinien (Gautier, 1990). Les animaux domestiques ont par exemple un comportement d'évitement des prédateurs plus réduit (Yamamoto et Reinhardt, 2003). Ils sont aussi moins sensibles aux manipulations et présentent une baisse et une régularisation de leur rythme d'activité (Gautier, 1990) ainsi qu'une diminution de l'expression du comportement social à l'exception du comportement de reproduction (Gautier, 1990). Chez les mammifères, une diminution de l'agressivité des individus est aussi observée en parallèle à la création de troupeaux de plus en plus grands. Le comportement de recherche alimentaire a lui aussi été réduit (Andersson et al., 2001).

La deuxième composante de ce morphotype d'animaux domestiques est d'ordre éco-physiologique. Les températures généralement plus élevées, les plus fortes densités d'individus et les apports alimentaires plus importants accompagnant la domestication augmentent les pressions bactériennes et virales sur les populations d'élevage entraînant des modifications du statut immunitaire et de taux hormonaux des populations domestiques (Gautier, 1990; Rauw et al., 1998). En lien avec cette modification du taux d'hormones, il semble que le processus de domestication ait engendré une réduction de la taille des animaux chez les grandes espèces domestiquées, en particulier des mâles, ce qui participerait à une réduction du dimorphisme sexuel chez les espèces domestiques (Gautier, 1990).

La troisième composante du morphotype domestique est la plus faible variabilité génétique qui caractérise la population domestique par rapport à la population sauvage. Ces plus faibles variabilités génétiques seraient dues aux petites tailles initiales des populations domestiques et à l'arrêt progressif d'intégration d'individus sauvages dans les reproducteurs de la population d'élevage. Cette situation engendre des dérives génétiques propres à chaque

population en cours de domestication et est souvent accompagnée d'un choix de l'éleveur de ne faire reproduire que les animaux qui lui paraissent le plus facile à exploiter (Gautier, 1990).

Au cours des cycles de domestication des espèces, la création d'une extraordinaire diversité en terme phénotypique a été observée. En effet, au cours des 10 derniers siècles, les éleveurs ont créé une grande diversité de races au sein des espèces domestiquées, les races étant définies comme des populations présentant des caractères héréditaires communs propres (Falconer et Mackay, 1996). Il existe par exemple plus de 400 races de chien, c'est-à-dire 400 populations domestiques (Gautier, 1990). Cette diversité est liée à la grande disparité des foyers de domestication et des cultures humaines qui les composent. Cela montre l'importance des objectifs d'exploitation que posent les communautés humaines dans le devenir des espèces domestiques (Figure 3). Par exemple, un même animal pouvait être domestiqué par une communauté avec pour objectif de fournir de la laine, et dans une autre communauté, de fournir de la viande (Vigne, 2002). Ces deux objectifs ont produit des races domestiques très différentes.

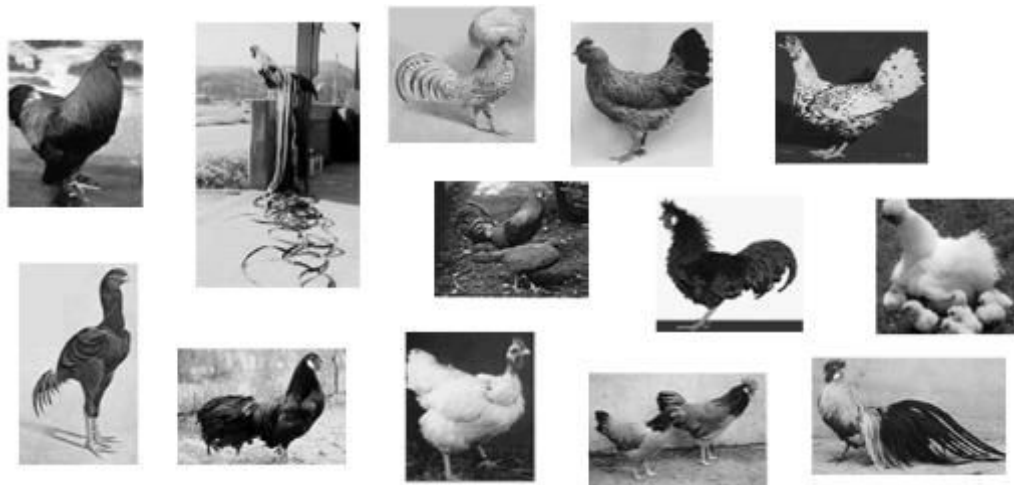


Figure 3 : Aperçu de la diversité des races de poules en fonction des objectifs d'exploitation allant de la production d'œufs ou de chair, au combat ou à l'apparat (<http://volaillepoultry.pagesperso-orange.fr/index1.html> (Periquet, 2010)

1.2.3 Limites et enjeux liés au processus de domestication

Au début de la domestication animale, il est peu probable que les espèces en cours de domestication aient été utilisées dans un seul but précis. Un bovin domestiqué pouvait à la fois

servir de force de traction, fournir du lait et de la viande. Puis au cours de l'histoire agronomique, à une échelle très récente au regard de l'histoire de la domestication, une spécialisation des races a été observée pour une exploitation de plus en plus unidirectionnelle. Aujourd'hui, il existe par exemple des races de vaches à viande et des races de vaches à lait (Mazoyer et Roudart, 2002). Cette spécialisation a été accompagnée de choix de plus en plus précis des reproducteurs, en particulier grâce aux progrès faits en génétique (Rauw et al., 1998). L'évolution des animaux domestiques est donc toujours plus rapide et spécialisée, mais elle atteint aujourd'hui deux limites. La première est d'ordre biologique puisque les animaux sélectionnés sur un nombre restreint de caractères de production et sur un faible laps de temps subissent des déséquilibres biologiques majeurs constituant des trade-off (évolutions de caractères non souhaités ayant un effet délétère sur le caractère en sélection) pour la rentabilité des élevages (Rauw et al., 1998). La seconde limite est d'ordre éthique. Le niveau de spécialisation des animaux pose les questions du bien-être animal et des limites de l'action de l'homme sur les êtres vivants. La perte de fonctions naturelles comme le vêlage et l'obligation de césarienne pour les vaches culardes est un exemple de dépendance à l'homme qui pose question (Figure 4). Depuis 50 ans, le nombre de variétés végétales et de races animales domestiques utilisées baisse drastiquement. L'agriculture qui était une force de création de biodiversité, est aujourd'hui largement responsable d'une perte de biodiversité. La mondialisation des productions conduit en effet à l'exploitation d'un nombre faible de races sur l'ensemble du globe (Vigne, 2002)



Figure 4 : Illustration d'une hyper spécialisation dans la production de viande avec le taureau culard de race blanc bleu belge (Source : <https://i.ytimg.com/vi/u1m8AkIBxCg/hqdefault.jpg>)

L'avancée du processus de domestication au cours du temps implique un éloignement toujours plus grand entre les populations domestiques et les populations sauvages apparentées. La perte des populations sauvages interdit le retour à des caractères ancestraux. Cette

composante renforce la responsabilité des éleveurs, premiers acteurs de la domestication. L'avenir dépend des choix qu'ils font pour l'évolution des caractères d'une race donnée et de leur capacité de gestion de la diversité des races qu'ils exploitent. Il est important que les éleveurs débutant un processus de domestication puissent tirer parti des erreurs et des réussites des aventures passées (Rhode et al., 2012).

1.3 Niveaux de domestication des différentes productions halieutiques

1.3.1 Particularité de la domestication des espèces halieutiques

Par rapport au contexte précédemment défini chez les premières espèces domestiquées, les espèces aquatiques présentent plusieurs originalités. D'abord, le processus de domestication de ces espèces a été engagé plus tardivement que la plupart des espèces terrestres. En Chine, les premières traces d'élevage de la carpe ne remontent qu'à 2000 ans avant notre ère (Gautier, 1990). En Europe, les carpes ont été domestiquées au Moyen Age pour répondre à une demande régulière de poissons lors des offices religieux (Gautier, 1990). Ce caractère tardif de la domestication halieutique implique que la plupart des espèces aquacoles sont encore totalement viables dans le milieu naturel (Lorenzen et al., 2012). Une deuxième particularité des productions halieutiques est l'importance de la pêche dans les volumes de production destinés à la consommation humaine (Figure 5). L'aquaculture ne représente en effet que la moitié de ces volumes et la pêche constitue l'autre moitié alors qu'en production terrestre la chasse peut être considérée comme globalement négligeable (FAO 2016). La grande majorité des espèces aquatiques possèdent une population sauvage dans le milieu naturel ce qui n'est plus forcément le cas des grands mammifères domestiqués (Lorenzen et al., 2012).

Une dernière différence identifiable dans le processus de domestication entre le monde halieutique et le monde terrestre porte sur la diversité des espèces en cours de domestication. Dans le monde terrestre, peu d'espèces sont domestiquées mais elles donnent lieu à un nombre important de races. Dans le monde halieutique, un processus de domestication est entamé sur plus de 300 espèces. A l'exception de la carpe, il existe peu de différenciations distinctes entre populations sauvages et populations d'élevage, et donc peu de races distinctes ont été créées (Lorenzen et al., 2012). Cette opposition est peut-être à mettre en relation avec le caractère récent de la domestication et l'avenir permettra de voir si l'aquaculture se spécialisera autour de quelques espèces ou si elle permettra la production d'une large diversité d'espèces.

1.3.2 Relation entre la pêche et l'aquaculture

Un point important de la compréhension du processus de domestication aquacole est l'étude approfondie des liens entre aquaculture et pêche. La frontière entre production aquacole et exploitation d'une population par la pêche n'est pas toujours très facile à distinguer. L'aquaculture est définie comme « l'élevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, végétaux) sous deux conditions : une intervention humaine dans le processus de la production de plus que la capture et une propriété juridique de la population d'élevage (FAO 1997) ». La production par pêche, quant à elle se restreint à la capture d'une population considérée comme un bien commun.

Depuis 30 ans, la production par pêche s'est stabilisée autour de 85 million de tonnes (Figure 5). Cette limitation s'explique par le fait que la plupart des populations sont surexploitées ou en pleine exploitation. A contrario, l'aquaculture est en pleine croissance et répond à une demande mondiale en produits halieutiques de plus en plus importante (Figure 5). Elle est le secteur de production agricole qui connaît la plus grande croissance depuis 20 ans (+12% par an, FAO 2012). Il faut cependant noter que 50% des quantités pêchées servent de sources alimentaires à l'aquaculture par l'intermédiaire des pêches minières et de la fabrication d'aliments extrudés riches en protéines et en acides gras (Lorenzen et al., 2012). L'aquaculture extractive (aquaculture qui ne nécessite pas l'apport d'une nutrition) utilise quant à elle une partie de la production primaire utilisée par les chaînes trophiques naturelles et éventuellement des populations exploitées (Arbach Leloup et al., 2008; Byron et al., 2011). Parallèlement, certaines productions aquacoles par l'intermédiaire du ranching ou d'opérations de repeuplement soutiennent la production naturelle nécessaire au maintien des efforts de pêche en place (Masuda et Tsukamoto, 1996). Il existe donc un lien ténu et complexe entre production par pêche et aquaculture.

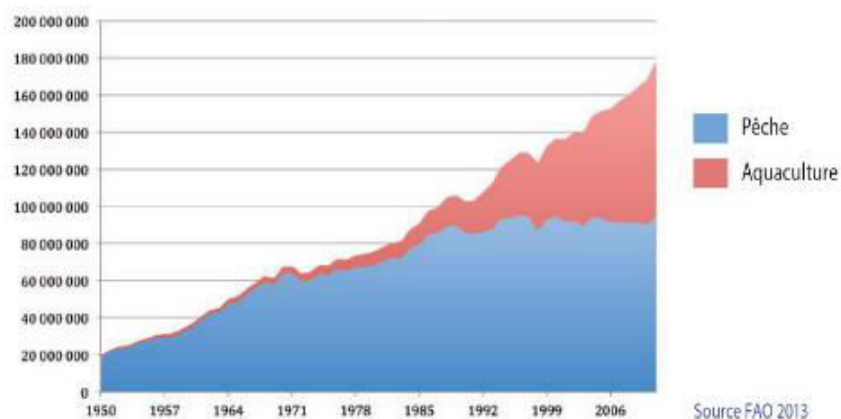


Figure 5 : Evolution des productions halieutiques par pêche et par aquaculture au cours des 60 dernières années. (Source : <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/fr> FAO, 2013)

Si les modes de production sont parfois interdépendants, il existe aussi de nombreuses relations entre populations d'élevage et populations sauvages. La première interaction entre les populations sauvages et les populations d'élevage est une interaction trophique. L'aquaculture peut être à l'origine de la création d'habitats sur lesquels une chaîne trophique exploitée par des populations d'élevage peut se développer. Une population aquacole peut à l'inverse s'accaparer une partie de la chaîne trophique naturelle (Byron et al., 2011). Les populations élevées peuvent aussi être rejetées dans le milieu, s'échapper des structures d'élevage ou pondre librement. Elles génèrent alors une interaction génétique (Lorenzen et al., 2012). Des transferts de maladies peuvent aussi exister entre populations sauvages et populations d'élevage. Enfin, l'aquaculture occupe des habitats côtiers essentiels dans les processus de recrutement permettant la constitution des populations pêchées. L'aquaculture et la pêche présentent donc parfois un conflit d'intérêt pour un même espace.

Plus qu'une opposition entre les deux modes de production, il existe aujourd'hui une interrelation entre pêche et aquaculture. Cette situation implique que la direction donnée à la domestication des espèces halieutiques et la gestion des écosystèmes productifs doivent être fondées sur une réflexion multifactorielle et intégrative (Lorenzen et al., 2012).

1.3.3 Classification des populations selon leurs niveaux de domestication

Au regard de la domestication des espèces terrestres, les espèces halieutiques sont globalement au commencement du processus de domestication. Pour décrire la situation des différentes espèces dans ce processus, une échelle de 5 niveaux a été représentée (Teletchea et Fontaine, 2014) (Tableau 1) : du niveau 0 où la capture est la seule intervention dans le processus de production, au niveau 5 où la population est à la fois élevée en captivité et produite à partir de reproducteurs d'élevage issus d'une sélection intentionnelle. L'échelle décrit un niveau croissant d'impact du système de production sur la population élevée. Parmi les 300 espèces aquacoles en domestication, seulement 75 espèces ont atteint le niveau 4 ou 5 (Teletchea et Fontaine, 2014). Ce faible nombre s'explique par le plus faible niveau de maîtrise biologique du cycle de vie des espèces aquatiques en comparaison des connaissances sur les espèces terrestres. Il est aussi important de noter qu'environ 5000 espèces de poissons sont exploitées par la pêche. L'aquaculture a donc un large potentiel de diversification. Un des enjeux actuels est de pouvoir produire des espèces adaptées aux écosystèmes locaux et de tirer parti de cette biodiversité d'espèces exploitables pour développer des systèmes de production les plus durables possibles. Une possibilité de l'exploitation de la biodiversité aquatique peut

aussi être la fabrication de molécules rares ou des biens d'ornement. Aujourd'hui, même si certains verrous biologiques ne sont pas encore levés pour plusieurs espèces, la principale raison qui limite l'expansion de l'aquaculture à de nouvelles espèces est plutôt liée à une trop faible demande des consommateurs et des problèmes de rentabilités économiques pour les exploitations qu'à des problèmes techniques (Teletchea et Fontaine, 2014).

Tableau 1 : Niveau de domestication en aquaculture et nombre d'espèces de poissons par catégorie (Teletchea et Fontaine, 2014)

Niveau de domestication	Description	Nombre d'espèces	Exemples d'espèces de poissons
0	Pêche	4671	
1	Premier test d'acclimatation à un environnement artificiel	39	Dorade blanche
2	Partie complète du cycle de production réalisé en captivité mais pas de maîtrise de la reproduction	75	Anguille européenne, thon rouge
3	L'ensemble du cycle de production est réalisé en élevage mais les reproducteurs sont sauvages	61	Sole sénégalaise
4	Le cycle de production est fermé, les reproducteurs qui constituent la population sont issus de l'élevage	45	Perches
5	Les reproducteurs qui constituent la population sont issus de l'élevage et sélectionnés sur des critères phénotypiques	30	Truite, Saumon, Carpe

Entre les échelons 0 et 3, le milieu de production impacte la biologie des espèces produites mais les modifications ne sont pas transmises au cours des générations suivantes puisque les reproducteurs qui constituent la population d'élevage sont d'origine sauvage. Le passage au niveau 4 rend possible une différenciation continue des populations d'élevage par transmission de caractères induits par le système de production à travers les générations. Alors que le processus de domestication était surtout étudié par les évolutions génétiques induites par une sélection intentionnelle, les évolutions physiologiques et comportementales induites par le milieu d'élevage sont de plus en plus considérées (Lorenzen et al., 2012). Ces évolutions sont en général plus rapides pour les espèces halieutiques que pour les espèces terrestres et peuvent survenir en une génération pour les saumons par exemple (Christie et al., 2012; Christie et al., 2016). Cette rapidité semble être due aux fortes fécondités des espèces aquatiques permettant la génération de populations avec des tailles génétiques faibles et favorisant la dérive génétique (Taris et al., 2007). En parallèle à cette fécondité, de fortes mortalités induites en phase larvaire par les pratiques d'élevage en milieu artificiel exercent des pressions de sélection non nulles (Boudry et al., 2002). Les espèces aquatiques présentent aussi une forte plasticité phénotypique impliquant des différenciations morphologiques et physiologiques plus importantes en relation

avec la diversité des milieux d'élevage (Ernande et al., 2004; Lorenzen et al., 2012). Le potentiel effet de sélection non-intentionnelle est aussi plus grand pour les espèces halieutiques que pour les espèces terrestres car elles possèdent des bases génétiques très larges. La relative rapidité d'évolution des populations produites en aquaculture donne lieu à des évolutions rapides de productivité en élevage. Elles posent à *contrario* des problèmes d'efficacité dans de nombreux programmes de repeuplement. Les populations d'élevages deviennent très rapidement inadaptées au milieu sauvage. Des stratégies de production pour obtenir des individus d'élevage ayant une bonne fitness dans le milieu sauvage et définis comme étant de « type sauvage » sont en cours d'étude (Hansen et Gosselin, 2013; Hansen et Gosselin, 2016).

Conclusion : De très nombreuses populations d'élevage aquacole sont au commencement d'un processus de domestication. Le caractère récent de ce processus offre l'opportunité à l'aquaculture de pouvoir tirer parti de l'expérience sur les espèces terrestres pour se développer dans un cadre le plus durable possible. Les productions halieutiques se caractérisent par de nombreuses interrelations entre populations sauvages et populations d'élevage. Les altérations biologiques induites par le processus de domestication sur les populations d'élevage auront un impact sur les populations sauvages. Il est donc primordial d'étudier les effets du processus de domestication afin :

1. De comprendre et contrôler les changements biologiques des populations d'élevage et leurs impacts sur les populations sauvages.
2. D'évaluer la rentabilité de l'élevage des populations en cours de domestication.
3. D'évaluer la capacité de ces mêmes populations à être élevées en milieu naturel pour des stratégies d'exploitation de ranching ou de repeuplement.

2. Présentation du modèle biologique *Haliotis tuberculata*

Afin d'étudier les effets de la domestication de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, il convient de présenter la biologie de l'ormeau. Les modifications biologiques dues au processus de domestication sur des populations d'ormeaux d'élevage seront aussi présentées.

2.1 *Haliotis spp* : des mollusques gastéropodes

Les ormeaux (*Haliotis spp.*) sont des mollusques gastéropodes marins. Cette classe est, au sens phylogénétique, plus proche des céphalopodes que des bivalves (Figure 6). Plus de 75 espèces d'*Haliotidae* sont décrites aujourd'hui (Geiger et Owen, 2012) et une vingtaine d'entre elles seraient actuellement exploitées. L'espèce *Haliotis discus hannai* représente la majorité de la production puisque c'est l'espèce la plus prisée sur les marchés asiatiques (Gordon et Cook, 2004).

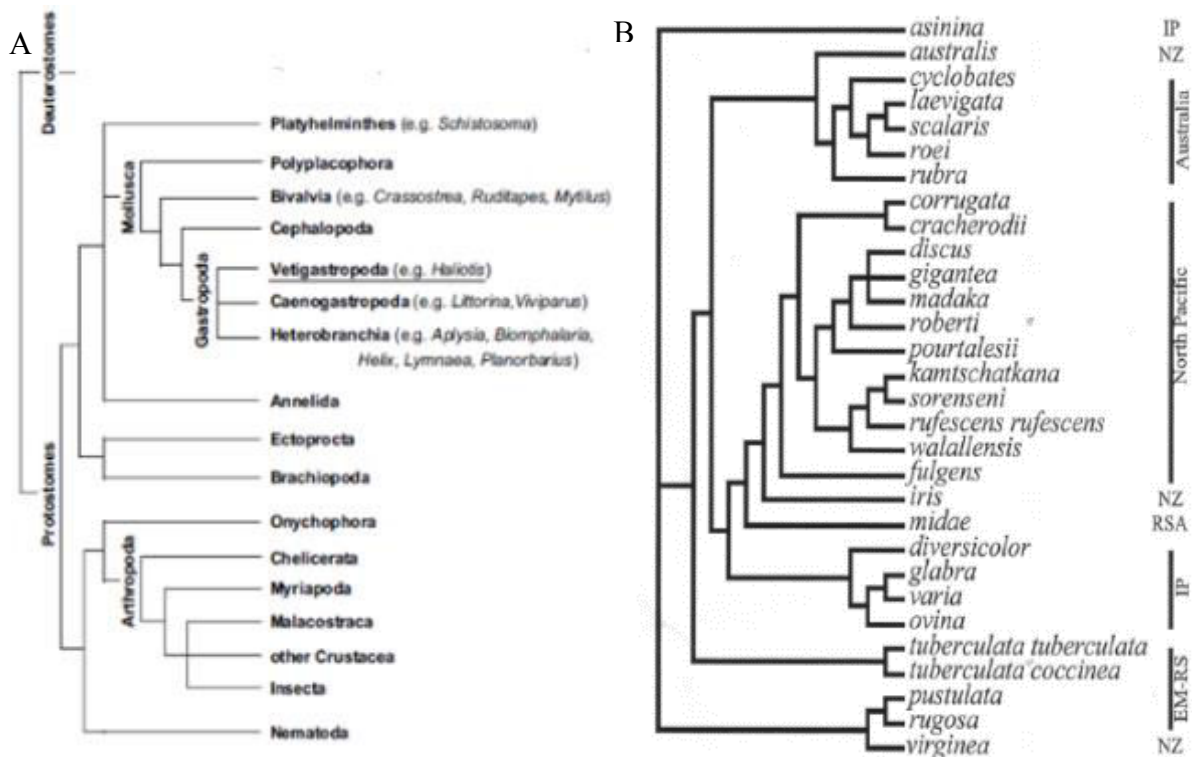


Figure 6 : A) Classification moderne des taxons communs sur le base de données morphologiques et moléculaires (Hooper et al., 2007) ,B) Arbre phylogénétique des Haliotidae (Geiger, 1999b) ,EM-RS : Europe, Méditerranée, IP : Indo-Pacifique, NZ : Nouvelle-Zélande, RSA : Afrique du Sud.

2.2 Histoire évolutive, en construction

Les ormeaux ont été décrits comme issus d'une population ancestrale du bassin méditerranéen. Ils se seraient répandus sur tous les continents aux cours de deux événements de migration, d'abord dans la région Indo-Pacifique, puis en Afrique, Océanie et aux Etats-Unis (Figure 7) (Franchini et al., 2010). Ces événements expliquent probablement les différences de caryotype et la plus grande distance phylogénétique qui séparent l'espèce européenne *Haliotis tuberculata* des espèces de l'Océan Pacifique (Figure 7). Les génomes des différentes espèces d'*Haliotidae* sont donc de tailles variables (Tableau 2). Les femelles ont un génome plus grand que les mâles, laissant supposer un déterminisme génétique du sexe par la voie de transmission de chromosomes sexuels (Adachi et Okumura, 2012).

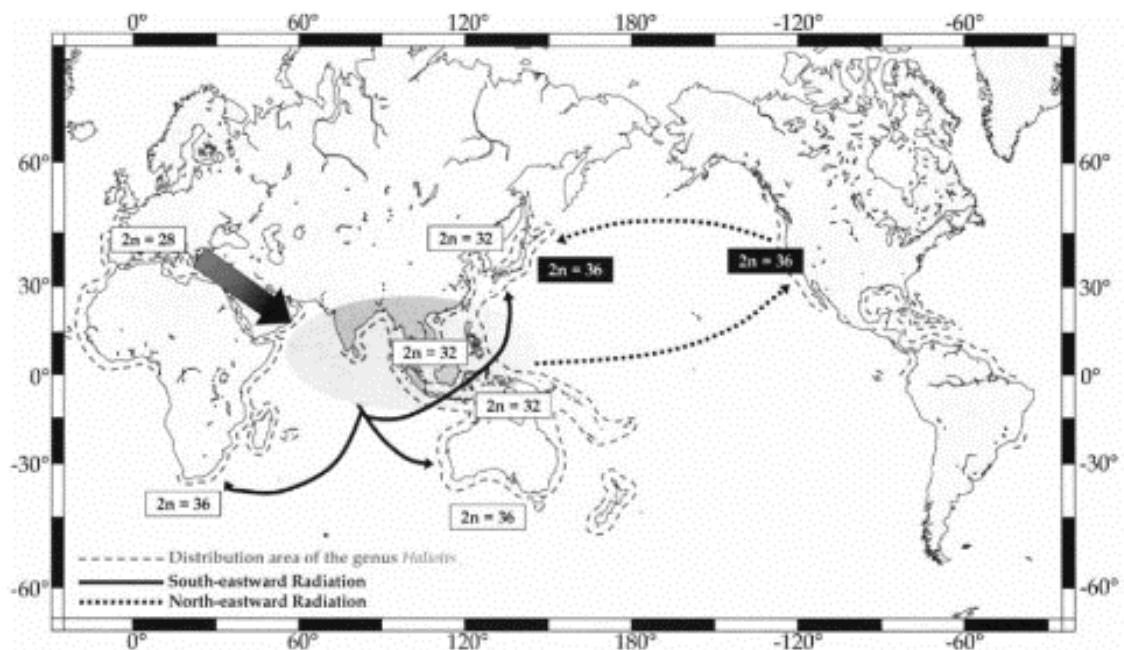


Figure 7 : Distribution du genre *Haliotis* dans le monde et représentation des différentes étapes de son histoire évolutive (Franchini et al., 2010)

Tableau 2 : Taille de génomes de plusieurs espèces de la famille des Haliotidae

Espèce	Nombre chromosomes	Taille C-value	Taille Nombre bases	Références
<i>Haliotis tuberculata</i>	2n=28	Na	Na	(Roussel et al., 2013)
<i>Haliotis diversicolor</i>	2n=32	1,45 ± 0,01 pg	1,420 ± 9 MB	(Adachi et Okumura, 2012)
<i>Haliotis midae</i>	2n=36	1,43 ± 0,02 pg	2,803 ± 42 MB	(Franchini et al., 2010)
<i>Haliotis rufescens</i>	2n=36	1,82 ± 0,36 pg	Na	(Gallardo-Escarate et Del Rio-portilla, 2007)
<i>Haliotis discus hannai</i>	2n=36	1,84 ± 0,08 pg	1,802 ± 8 MB	(Adachi et Okumura, 2012)

L'exploitation des populations d'élevage ne semble pas impacter la diversité génétique des populations sauvages qui ont, de manière classique chez les mollusques marins, une base génétique très large (Rhode et al., 2017). Une sélection intentionnelle a été appliquée sur plusieurs populations de 8 espèces différentes (*Haliotis discus*, *H. discus hannai*, *H. midae*, *H. iris*; *H. rufescens*, *H. diversicolor*, *H. rubra* et *H. laevigata*). Les processus de sélection intentionnelle étant récents, aucune race n'a pour l'instant été créée. En continuation de l'histoire évolutive de l'espèce, il est important de noter que deux hybrides inter-spécifiques sont couramment élevés et possèdent des caractéristiques propres d'adaptation aux systèmes d'élevage. C'est le cas de l'hybride entre *H. rubra* x *H. laevigata* en Australie et *H. discus hannai* et *H. gigantea* en Chine (Chen et al., 2016; Elliott, 2000). L'existence de production en mer et de stratégie de ranching ou de repeuplement confère inévitablement aux éclosiers d'ormeaux du monde entier une responsabilité par rapport aux diversités des populations existantes et aux processus de domestication en développement (Rhode et al., 2017). Comme les bases génétiques des populations soumises à la sélection en éclosierie sont inévitablement de plus en plus étroites, des stratégies de sauvegarde des populations sauvages doivent être mises en place pour pouvoir durablement maximiser l'utilisation de cette diversité.

2.3 Biologie de l'espèce d'ormeau européen, *Haliotis tuberculata*

2.3.1 Espèce unique en Europe

H. tuberculata est l'unique espèce présente en Europe et en Afrique du nord (Huchette et Clavier, 2004). Historiquement, la zone où les populations sont les plus abondantes en France sont la Bretagne et la Normandie (Clavier et Richard, 1986a). C'est aussi la zone où les individus de plus grandes tailles sont observés (Travers, 2008). Deux sous-espèces ont été décrites : *H. tuberculata* et *H. tuberculata coccinea*. Il est cependant impossible de différencier

ces deux sous-espèces sur des critères morphologiques (Geiger, 1999a). La constitution d'un stock de reproducteurs à faible coût est donc possible. En revanche, l'existence d'une espèce unique ferme la porte à l'utilisation d'hybrides interspécifiques constitués à partir d'espèces présentes dans le milieu sauvage et donc bénéficiant de la vigueur hybride (Elliott, 2000; Luo et al., 2013).

2.3.2 Mollusque herbivore de la zone intertidale basse

L'ormeau européen vit en zone intertidale basse et subtidale jusqu'à 10 mètres de profondeur. Il est présent sur le littoral où le substrat est rocailleux (Clavier et Richard, 1986b). Exclusivement nocturne et lucifuge, il aime se fixer sous des rochers stables ou à l'intérieur de crevasses. Cet habitat a aussi l'intérêt de lui offrir une meilleure protection contre ses prédateurs (principalement étoiles de mer et crabes). Les ormeaux consomment principalement des macroalgues et les plus fortes biomasses sont présentes dans des zones où ces algues sont abondantes. L'ormeau consomme les algues dérivantes qui s'échouent sur l'estran, mais il peut aussi rechercher activement sa nourriture (Clavier et Richard, 1984).

Sur l'estran, les individus plus jeunes se situent plus en surface que les adultes (Clavier et Richard, 1986b). L'ormeau a un comportement grégaire et se déplace peu (Clavier et Richard, 1984). Cependant, en cas de prédation, la fuite est son principal moyen de défense. Il peut alors se déplacer rapidement sur quelques mètres (15 fois sa taille de coquille par minute) (Donovan et Carefoot, 1997). Comme la plupart des espèces d'ormeaux, *H. tuberculata* est sensible aux variations des conditions de son milieu et vit dans des habitats constamment oxygénés et stables en salinité (Cheng et al., 2004a; Cheng et al., 2002). Il peut s'adapter à une large gamme de température allant de 8° à 26°C. Cependant, un animal mature élevé dans un milieu dont la température est supérieure à 17°C est plus sensible à la bactérie pathogène *Vibrio harvyi* et cette sensibilité peut générer des mortalités massives en France (Travers et al., 2009). L'absence de variations brutales dans l'environnement est tout aussi prépondérante.

2.3.3 Morphologie d'un escargot de mer

La morphologie d'*H. tuberculata* est bien détaillée dans plusieurs études (Crofts, 1929; Le Petit, 2009; Travers, 2008) (Figure 8).

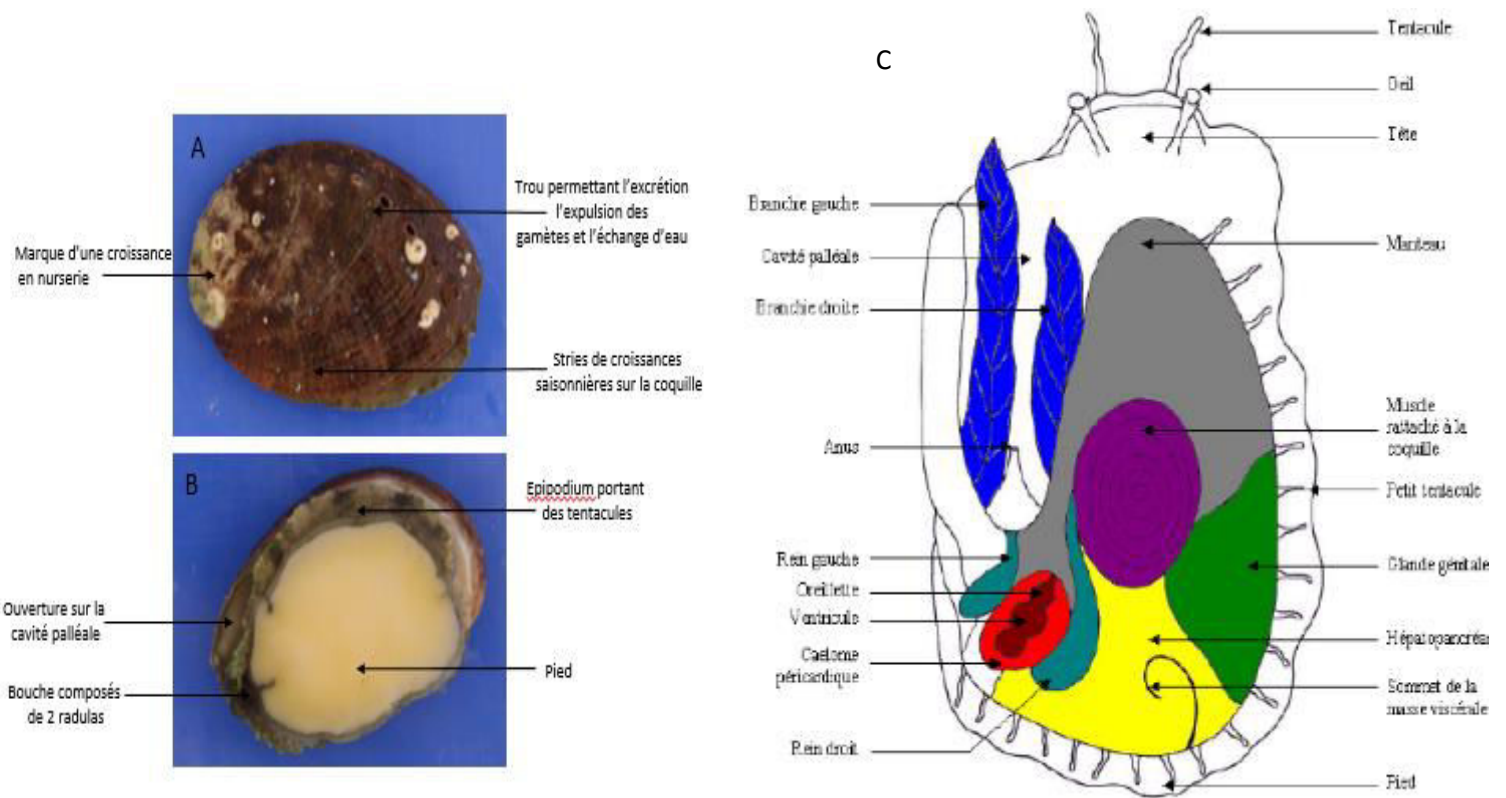


Figure 8 : Anatomie de l'orveau : A) Vue dorsale de la coquille d'un orveau d'élevage de 45 mm et 3 ans, B) Vue ventrale du même orveau (Source : personnelle), C) Vue dorsale, schéma de la biologie interne d'un orveau une fois la coquille enlevée (Source : Le Petit, 2009)

La coquille

L'orveau européen possède un corps mou recouvert d'une coquille nacrée qui se développe en spirale au cours du développement de l'animal (Figure 9 A). Elle possède 5 à 7 orifices respiratoires dorsaux permettant un flux d'eau entre la cavité palléale et le milieu extérieur pour la respiration, l'excrétion des déchets azotés et l'émission des gamètes. La coquille représente environ 29% du poids frais total chez les orveaux sauvages et 25% du poids des orveaux d'élevage de plus de 60 mm (Basuyaux, 1997). Des pigments sont incorporés dans la couche externe organique (le périostacum) et permettent d'identifier *a posteriori* des changements d'alimentation mono-spécifique (Figure 9A) : par exemple, la consommation de *Palmaria palmata* donne une coloration plutôt rouge et celle *Laminaria digitata* plutôt verte (Figure 9 A).

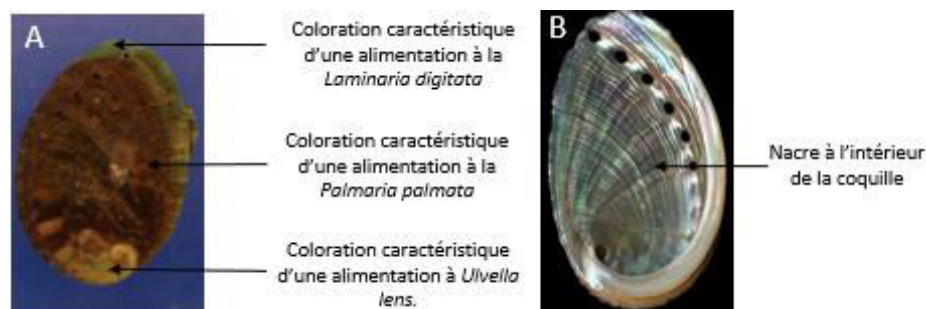


Figure 9 : A) Coquille d'un orveau de 3 ans (48 mm) dont la coloration permet d'observer l'historique alimentaire mono-spécifique composé de 3 algues à 3 périodes différentes du cycle de vie. B) Nacre

(Photos: Source personnelle)

Le pied

L'ormeau se déplace grâce à son pied qui représente en poids frais en moyenne 40% du poids d'un individu sauvage adulte et entre 36 et 50% du poids d'un individu d'élevage adulte (Basuyaux, 1997). Le pied correspond à l'ensemble de la chair consommable de l'ormeau (Figure 10). Au sein d'un lot ayant le même historique alimentaire, une variation du taux de chair avec un coefficient de variation de 0,05 à 0,10 peut être observée (Camara et Symonds, 2014). En absence d'alimentation, l'ormeau peut puiser dans son pied pour y mobiliser le glycogène et ensuite les protéines (Sheedy et al., 2016). Le pied est composé de cinq parties avec différentes caractéristiques organoleptiques (Olaechea et al., 1993) (Figure 10 A). L'épithélium à la base du pied contient des pigments jaunes (Figure 10 B). La base du pied possède un système de glandes unicellulaires permettant la sécrétion de mucus qui facilite le déplacement réalisé par un glissement alternatif d'ondes de contractions sur les zones périphériques du pied (Clavier, 1984; Le Petit, 2009). Le pied est entouré d'un repli portant des tentacules et des épipodes qui complètent les tentacules céphaliques et les yeux dans la fonction de perception du milieu extérieur (Figure 10 C). Le pied permet un ancrage très fort sur le substrat. Il peut se mouvoir à l'intérieur de la coquille (Donovan et Taylor, 2008) et s'étendre à l'extérieur ce qui rend possible un retournement lorsque l'ormeau tombe sur le dos en cas de décollement par un congénère ou en réaction à un prédateur ou à un choc lumineux (Baldwin et al., 2007).

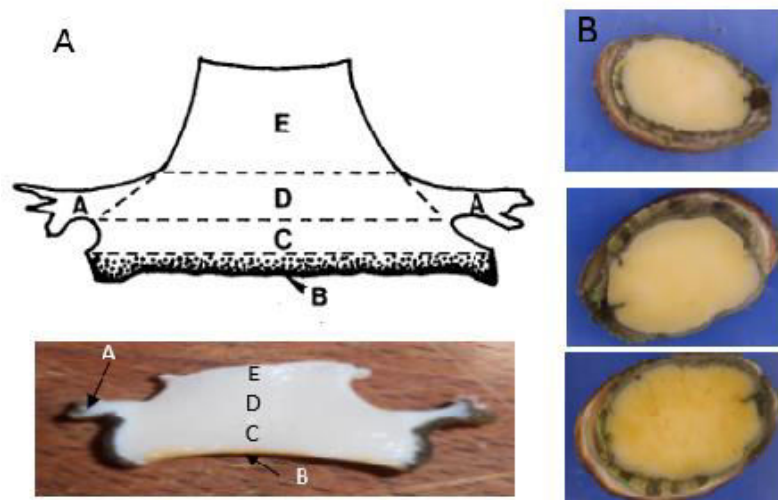


Figure 10 : A) Coupe transversale représentant les 5 parties de la chair du pied d'un ormeau avec une correspondance entre un schéma (Porturas Olaechea et al., 1993) et un tissu frais (Photo : source personnelle), A. repli supportant les épipodes, B. partie dure de la base du pied avec épithélium. C. partie tendre de la base du pied, D. et E. muscle abducteur inférieur et supérieur (Photo : source personnelle) B) Photo du dessous de pied d'un ormeau illustrant la variabilité de coloration (Photo : source personnelle).

Les autres tissus mous :

Le tissu mou le plus important en volume est l'appareil gonado-digestif. Il est composé d'une gonade ou glande génitale qui se développe autour de la glande digestive (Figure 11). Pour un ormeau mature en été, la gonade représente entre 6 à 12% du poids de l'animal et la glande digestive entre 6 et 9%. Au sein des populations d'*H. tuberculata*, il existe une grande diversité de couleurs pour ces organes. La glande digestive varie de l'orange foncé au marron ocre. Chez les mâles, la gonade varie du jaune crème pâle au jaune orangé. Chez les femelles, elle est le plus souvent gris-vert mais peut être ocre, bleue ou noire (Figure 11). Au cours de la maturation des ormeaux, la gonade se développe en forme de cône du côté gauche de l'animal et finit par recouvrir totalement la glande digestive. Elle peut même se développer sur le côté droit de l'animal sur le cœur et les reins. La glande digestive joue un rôle dans la digestion et l'absorption des nutriments présents dans le liquide sortant de l'estomac et jouerait un rôle important dans la synthèse du glycogène qui est la principale molécule de réserve énergétique de l'ormeau. Un transfert de glycogène de la glande digestive vers la gonade serait à la base de la maturation sexuelle (Le Petit, 2009). Dans le milieu naturel, plus la croissance est rapide, plus le développement gonadique est précoce et plus la taille atteinte à la première maturité est grande (McAvaney et al., 2004).



Figure 11 : Appareil gonado-digestif d'ormeaux en cours de maturation à deux ans, coloration jaunâtre d'un mâle à gauche et bleue foncée d'une femelle à droite (Photo : source personnelle).

Le reste de la masse viscérale est composée de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, du cœlome, des branchies, des reins, du cœur et du manteau (Figure 8). La bouche possède une radula composée de rangées de dents qui se développent au cours du cycle de vie de l'animal à partir de 4 mm (Travers, 2008). Pour cette raison, l'ormeau ne peut consommer que des films bactériens ou des diatomées jusqu'à 2 mm (Johnston et al., 2005), et consommer des macros algues qu'aux alentours de 6 mm (Daume et Ryan, 2004). Pour s'alimenter, l'ormeau coince l'aliment entre son pied et le sol, et râpe l'aliment fixé avec sa radula. Dans la bouche et

l'œsophage, des glandes permettent de sécréter un mucus qui entoure le bol alimentaire. Un tri des particules ingérées et une première digestion en milieu acide est faite dans l'estomac (Le Petit, 2009). Cet organe est composé de multiples diverticules. La digestion est aidée par l'intermédiaire de populations bactériennes variées qui peuvent changer en fonction du régime alimentaire (Gobet et al., 2015). L'orveau peut réguler la vitesse d'absorption des nutriments, et présente une très bonne adaptation à la privation alimentaire. Une partie du bol alimentaire présent dans l'estomac peut toujours être visible deux mois après une période de jeûne (Sheedy et al., 2016). Après le tri et la première digestion, un jus nutritif et des microparticules sont transférés de l'estomac vers la glande digestive et les fèces sont transférées vers l'anus.

Comme la quasi-totalité des gastéropodes, l'orveau possède un cœur au contact de la glande digestive et des reins. Il est composé de deux auricules et d'un ventricule (Le Petit, 2009). Il permet la mise en circulation de l'hémolymphe dans un système ouvert composé d'artères, de veines et de sinus irriguant le corps de l'animal. L'hémolymphe est pigmentée en bleu car la fixation de l'oxygène est réalisée par un hème à cuivre présent dans l'hémocyanine. L'hémolymphe contient des cellules circulantes appelée hémocytes qui jouent un rôle important dans le transport des nutriments, la respiration cellulaire et la défense immunitaire (Travers, 2008). L'échange gazeux en oxygène se fait au niveau des branchies. Le flux d'eau passif est permis par une différence de potentiel entre le bas de la coquille et le haut. Cette respiration passive explique la grande sensibilité générale des orveaux aux diminutions de saturation en oxygène de l'eau (Cheng et al., 2004a). Un épithélium spécialisé, le manteau entoure la cavité palléale où se trouvent les branchies et le muscle abducteur. Il permet la rétention d'un volume d'eau important autour des branchies lors de l'exondation. Le manteau est impliqué dans la synthèse de protéines spécifiques et dans le transport des minéraux nécessaires à la fabrication de la coquille (Suja et Dharmaraj, 2005). Le rein a pour fonction essentielle la formation de déchets ammoniacaux qui sont la forme la plus importante de déchets produits par l'orveau (Le Petit, 2009).

Un système nerveux complexe et non centralisé composé de plusieurs ganglions permet aux orveaux de percevoir les modifications de la lumière, de la composition du milieu extérieur ainsi que de coordonner la contraction des fibres musculaires (Le Petit, 2009).

2.4. Reproduction et développement de l'ormeau

2.4.1 Cycle de vie avec deux phases distinctes

L'ormeau est une espèce gonochorique à fécondation externe. Comme la plupart des mollusques marins, son cycle de vie est séparé en deux phases distinctes : une phase pélagique pendant laquelle il est présent dans la colonne d'eau à l'état larvaire, et une phase benthique où après fixation, l'ormeau se développe sur le fond (Figure 12).

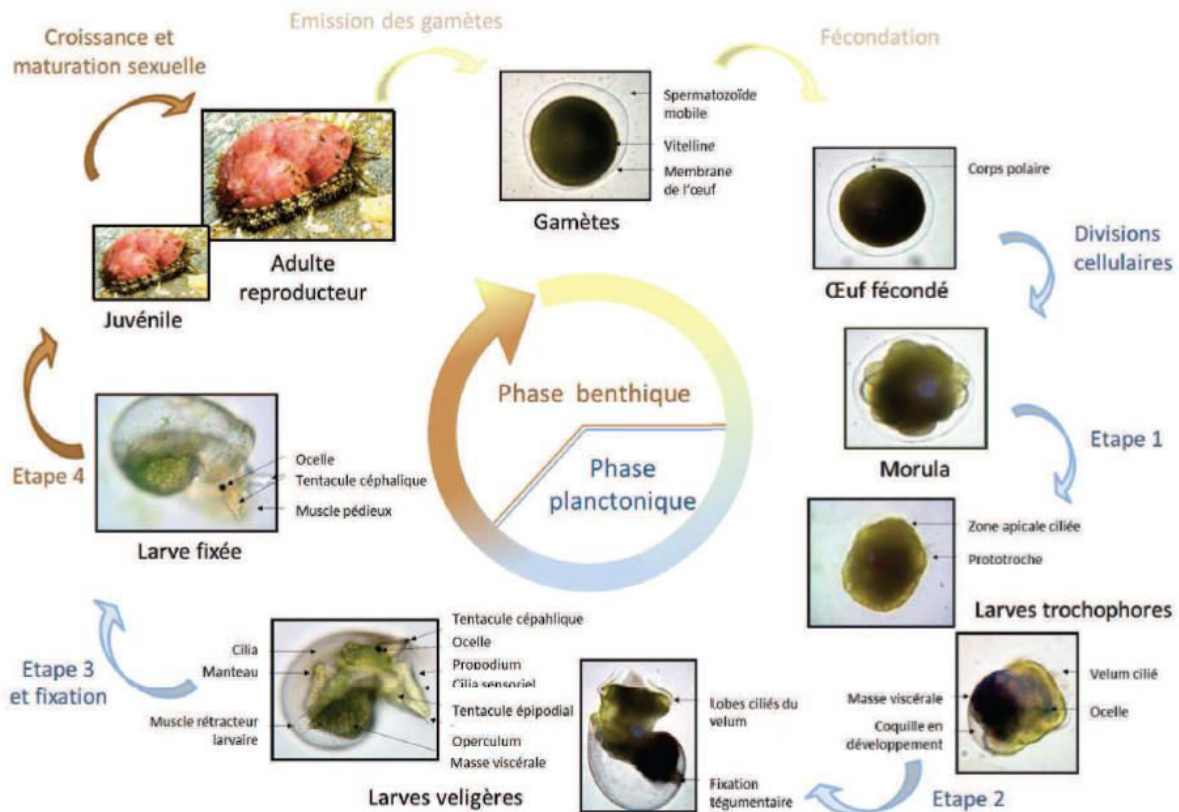


Figure 12 : Cycle de vie d'un ormeau. (Source : Cardinaud 2015)

2.4.2 Maturation sexuelle

Dans le milieu naturel, le sex-ratio est toujours proche de 1:1 (Cochard, 1980; Cochard et Flash, 1981). Le sexe des individus n'est observable qu'entre avril et novembre. Chez l'ormeau européen, la gonade se développe au cours du printemps et elle est résorbée en période de repos sexuel. La période naturelle de ponte en Bretagne et en Normandie se situe entre juin et septembre. Comme pour beaucoup de mollusques, le début de la maturation sexuelle est contrôlé par la photopériode et la température de l'eau (Travers et al., 2009). La température joue sur la vitesse du développement gonadique et la résorption de la gonade. Dans le milieu naturel, le développement gonadique commence en février. Une somme de 1400 degrés jours

au-delà du 0 biologique, fixé à 7°C pour *Haliotis tuberculata*, est nécessaire pour que l'individu soit en capacité de pondre (Travers, 2008). Pour *H. discus hannai* en élevage, une accumulation de 800 degrés jours a été suffisante pour amener un groupe d'individus à maturité dans une salle de conditionnement à température stable de 16 °C (Uki et Kikuchi, 1984b). Il semblerait que cela soit aussi suffisant pour *H. tuberculata* (observations personnelles). La température peut aussi jouer sur la résorption gonadique : des animaux élevés à 18° à température contrôlée ne présentent pas de repos sexuel, avec un retour tous les 3 mois à une pleine maturité générant des pontes incontrôlées (Basuyaux, 1997). La quantité et la qualité de la nourriture présente influent sur l'intensité et la précocité du développement gonadique (Bilbao et al., 2012). Dans des conditions avec un apport alimentaire important en qualité et quantité comme en situation d'élevage, l'ormeau peut se reproduire plusieurs fois dans l'année. Le développement gonadique est aussi lié à la croissance des individus : au sein d'une même cohorte, les ormeaux ayant une plus grande taille réalisent un développement gonadique plus important (McAvaney et al., 2004). Enfin, dans une même saison de maturation, les mâles sont en général matures plus tôt que les femelles et peuvent se reproduire de manière plus répétée, probablement en raison d'un investissement énergétique moins important pour la constitution du sperme que des ovocytes (Uki et Kikuchi, 1984a).

2.4.3 Emission des gamètes et fécondation

Dans le milieu naturel, l'émission des gamètes est déclenchée par des facteurs environnementaux. Des molécules libérées dans le milieu favorisent une ponte synchrone de nombreux individus à l'intérieur d'un site pour favoriser le succès reproducteur (Hayashi, 1980). De manière classique en conchyliculture, l'émission des gamètes est déclenchée chez *H. tuberculata* par un choc thermique de 4°C couplé à un choc lumineux réalisé par UV (Flassch et Aveline, 1984). Les mâles libèrent leurs gamètes généralement au bout de 3h et les femelles au bout de 4h. La fécondation doit être rapide après l'émission des œufs qui font environ 210 µm de diamètre (Flassch et Aveline, 1984). En conditions optimales 10 000 à 20 000 œufs sont produits par gramme de femelle (Bilbao et al., 2012). Pour éviter la polyspermie, un ratio de 10 spermatozoïdes pour un ovule est recommandé. Au bout de 20 minutes, dès l'émission du globule polaire, les œufs sont rincés (Flassch et Aveline, 1984). Les premières divisions cellulaires sont observables à la loupe binoculaire dès deux heures après fécondation. En situation normale, un taux de fécondation supérieur à 85% est attendu. L'éclosion a lieu 13 heures après la fécondation dans un élevage à 20 °C (Flassch et Aveline, 1984).

2.4.4 Développement larvaire

La phase larvaire est souvent associée à des mortalités importantes dans le milieu naturel. Elle est la phase qui permet la plus large dissémination de l'espèce (Forster et al., 1982). Les larves d'ormeau, contrairement aux larves de bivalves, n'ont pas besoin d'alimentation pour cette phase qui dure 4 jours à 18°C (Flassch et Aveline, 1984). Les larves puisent leur énergie dans leurs réserves provenant de l'ovocyte. Etant donné l'absence d'alimentation à ce stade de développement, l'élevage en circuit ouvert alimenté par une eau filtrée à 1 µm et désinfectée par un traitement UV est la technique la plus utilisée. En éclosion, une survie de 50% entre la larve trochophore et la larve véligère est habituellement observée. Au terme de cette phase larvaire, les larves véligères matures tombent sur fond et commencent leur métamorphose. Cette phase marque la transition de la vie pélagique à la vie benthique. Dans le milieu naturel, les larves seraient attirées par des signaux chimiques produits par des algues encroûtantes comme l'algue coralliaire (Daume et al., 2000b). En élevage, une technique de production sur plaques a été développée dans les années 1980 au Japon (Takahashi et Koganezawa, 1988), et s'est ensuite perfectionnée au cours du développement de l'industrie aquacole (Daume et al., 2000; Hannon et al., 2014; Strain et al., 2006). Le principe de base est de produire différents types d'algues sur des plaques posées perpendiculairement au fond du bassin pour démultiplier la surface de fixation qui servira à la fois de support et de source alimentaire pour les ormeaux. Les taux de fixation dépendent essentiellement de la qualité des algues recouvrant les plaques de fixation (Daume et al., 2004).

2.4.5 Croissance

Dans le milieu naturel comme en élevage, la croissance est extrêmement dépendante de la température (Basuyaux, 1997), de la densité (Huchette et al., 2003) et des ressources alimentaires (Fleming, 1995b; Fleming et al., 1996b). Dans le milieu naturel, la croissance est discontinue : elle est importante de mai à novembre et faible en hiver (Clavier et Richard, 1986c). Pour des individus matures, elle est maximale d'août à décembre (Forster, 1967). Comme beaucoup d'animaux, l'ormeau a d'abord une phase de développement somatique importante sans développement germinal, puis un développement germinal qui devient de plus en plus important au détriment de la croissance (Basuyaux, 1997). Finalement même si la croissance de l'ormeau est continue, elle atteint un plateau de croissance nulle en pleine maturité sexuelle. Cette croissance peut être modélisée par l'équation de Von Bertalanffy et chaque espèce peut être caractérisée par une taille maximale correspondant au plateau décrit précédemment. La majorité des espèces d'*Haliotidae* ont des tailles maximales comprises entre

50 à 70 mm (Travers, 2008). Ce n'est pas le cas d'*Haliotis tuberculata* dont la coquille peut atteindre 130 mm (Clavier et Richard, 1986c). Les ormeaux d'une population sauvage de Normandie présentaient une taille moyenne de 77 mm à 5 ans (Clavier et Richard, 1986a). Certains ormeaux sauvages sont capables de croissance encore plus rapide et atteignent 70 mm en 3 ans (Roussel et al., 2011). Dans l'eau plus chaude de Méditerranée, les animaux sauvages n'atteignent pas ces tailles. Cette différence est probablement due à un développement germinal plus précoce dans cet environnement plus chaud, limitant la taille maximale des animaux (Travers, 2008).

Alors qu'*H. tuberculata* a une taille maximale plus importante que la plupart des espèces d'ormeaux sauvages, elle présente une taille maximale inférieure aux principales espèces élevées dans le monde. Elle est plus petite qu'*Haliotis rufescens*, *Haliotis rubra*, *Haliotis laevigata*, *Haliotis midae*, *Haliotis discus discus* dont la longueur maximale de la coquille peut dépasser 200 mm. Ceci implique des difficultés en élevage à dépasser des tailles moyennes de 70 mm et à des implications sur la place d'*H. tuberculata* dans le marché mondial. La limitation de la taille maximale est associée à un développement gonadique plus précoce chez *H. tuberculata* que chez d'autres espèces (observations personnelles, comparaison avec les espèces australiennes et sud-africaines). En élevage en mer, il faut en moyenne 4 ans pour atteindre une taille comprise entre 50 et 70 mm (Travers, 2008). A 18°C en température contrôlée, il faut deux ans et demi pour atteindre une taille comprise entre 50 et 90 mm avec une moyenne de 65 mm et 40 g (Basuyaux, 1997). Des coefficients de variation de l'ordre de 20 à 30% sont souvent observés pour la taille et le poids à la vente, ce qui montre une grande variabilité de la croissance au sein d'une même population (Camara et Symonds, 2014).

2.5. Physiologie et comportement de l'ormeau européen

2.5.1 Alimentation

Dans le milieu naturel, le régime alimentaire d'*H. tuberculata* a été peu étudié. Il est reconnu pour être herbivore mais des cas de cannibalisme ont été rapportés en élevage (Basuyaux, 1997). L'ormeau, *H. laevigata* présente une très bonne capacité de croissance sur des aliments composés de farines animales (Stone et al., 2014). Des expériences de choix alimentaires ont mis en évidence que l'ormeau avait une préférence pour les algues rouges souvent riches en protéine et les algues vertes qui ont une structure plus tendre (Fleming, 1995b). L'ormeau peut cependant consommer des grandes laminaires comme *Laminaria digitata* ou *Macrocystis pyrifera* (Gerber, 2013). Comme pour beaucoup d'espèces, des régimes

plurispécifiques sur le long terme induisent des meilleurs résultats de croissance (Basuyaux, 1997; Viera et al., 2011) sauf dans le cas de *Palmaria palmata*, qui est l'algue permettant d'avoir les meilleurs taux de croissance pour l'espèce européenne (Mai et al., 1994). Des aliments artificiels formulés et extrudés ont été développés et sont en constante évolution depuis une vingtaine d'années (Fleming et al., 1996a). En élevage, les meilleures croissances et survies sont généralement observées lorsqu'une nutrition mixte à base d'algues fraîches est combinée à un aliment formulé (Stone et al., 2014), l'ajout d'algues dans des régimes alimentaires formulés ayant un impact positif sur la santé. En réponse à l'augmentation des coûts de la farine animale et aussi pour des raisons éthiques, de nombreux aliments formulés pour ormeaux à base de protéines végétales sont en développement (Bansemer et al., 2016). La plasticité phénotypique des algues en réponse à différentes méthodes de production offre aussi de nombreuses pistes pour l'optimisation de l'alimentation des ormeaux en élevage (Viera et al., 2011).

2.5.2 Comportement de l'ormeau en milieu sauvage

Plusieurs études basées sur des observations d'ormeaux dans le milieu naturel ont permis de mieux comprendre le rythme d'activité des ormeaux. D'abord, une étude très exhaustive, réalisée par Shepherd en 1973 en Australie, avec plus de 1000 heures d'observation en plongée sur 5 espèces d'Haliotidae a permis de mettre en évidence un effet important de l'espèce et de l'habitat sur le comportement de déplacement et le rythme d'activité des ormeaux (Shepherd, 1973). Par exemple, les espèces *H. rubra* et *H. roei* occupent des fractures dans la roche entre 0 et 10 m, et se placent sur des failles exposés aux courants une fois adulte. Ils sont capables de consommer des algues fixées sur le substrat et des algues dérivantes et constituent des espèces qui se déplacent peu en milieu ouvert. D'autres espèces comme *H. laevigata* et *H. scalaris* occupent des zones plus profondes de 10 à 30 m, dans des milieux rocheux plus ouverts, en bordure d'herbier. Ils se déplacent plus en milieu ouverts et peuvent se déplacer sur des fonds sableux grossiers dans des zones peu exposées aux courants. Ils consomment des algues dérivantes et peuvent être actifs en journée (Shepherd, 1973).

L'ormeau européen *H. tuberculata* appartient plutôt au premier groupe, avec peu de déplacement, et exclusivement la nuit (moins d'une dizaine de mètres parcourus en 1 an d'observation) (Clavier et Richard, 1984). Une étude en laboratoire comparant l'activité d'ormeaux suivis individuellement durant 6 jours, montre que l'ormeau européen *H. tuberculata* sortait moins de son habitat rocheux et franchissait moins une barrière sableuse que

l'ormeau japonais *H. discus hannai* (Werner et al., 1995). La présence de nourriture semble diminuer l'activité des ormeaux (Shepherd, 1973; Werner et al., 1995). En élevage avec une nutrition tous les 3 jours, *H. iris* une espèce proche sur le plan écologique et comportementale d'*H. tuberculata* n'était actif que 6% de son temps (Allen et al., 2006). Un effet de l'âge est aussi observé sur le déplacement, avec en milieu naturel, des juvéniles d'*Haliotis tuberculata* qui sont plus mobiles que les adultes (Clavier et Richard, 1984).

Des observations en élevage et en laboratoire ont montré que les saisons avaient des conséquences importantes sur le rythme circadien des ormeaux (Allen et al., 2006). L'hiver est caractérisé par peu de mouvements (<10% d'activité de déplacement par jour), et un rythme circadien peu marqué. L'été est caractérisé par une activité beaucoup plus importante (plusieurs heures de mouvement dans la nuit) et un rythme circadien très marqué avec une absence de mouvement en journée et une activité moyenne beaucoup plus importante qui commence 1 à 2h après le coucher du soleil ou l'extinction des lumières (Cenni et al., 2009; Werner et al., 1995).

L'étude du comportement individuel au sein d'une population permet d'observer trois catégories d'ormeaux caractérisés par des comportements de déplacement distincts. Le premier type comportemental correspond à des ormeaux sédentaires tandis que le deuxième et troisième type comportemental correspondent à des ormeaux actifs (Cenni et al., 2010; Momma et Sato, 1970). Parmi les ormeaux actifs, certaines se déplacent toute la nuit (« moving type »), et d'autres réalisent des mouvements plus courts avec des retours réguliers dans le même abri (« homing type ») (Momma et Sato, 1970). Dans cette étude, les ormeaux actifs ont parcouru les plus longues distances, ont été plus réactifs lors de l'apport alimentaire et ont consommé plus que les ormeaux sédentaires. L'existence d'un contraste entre des ormeaux sédentaires et des ormeaux actifs au sein d'une même population a été aussi observé dans le milieu sauvage pour *H. tuberculata* (Clavier, 1984). En laboratoire les déplacements d'*H. tuberculata* peuvent atteindre 20 à 30 cm/min, laissant suggérer un potentiel de dissémination pour l'espèce (Cenni et al., 2009). Cependant dans le milieu naturel, lorsque les ormeaux ne sont pas stressés par des prédateurs et sont placés dans un environnement comportant des abris, les déplacements restent réduits, avec un éloignement de moins de 10 m du récif où ils ont été déposés après marquage au cours d'une année. Les comportements de type sédentaire ou actif avec retour à l'abri peuvent aussi expliquer cette dissémination réduite (Clavier, 1984).

Dans le milieu sauvage, les principaux prédateurs de l'ormeau sont les crabes et les étoiles de mer (Day et al., 1995a). Les ormeaux adoptent une stratégie de fuite qui peut être décomposée en plusieurs patrons comportementaux (Bancalà, 2009). Le comportement de réponse au prédateur est différent suivant le prédateur. En présence d'une étoile de mer, l'ormeau réagit en premier en contractant les épipodes en contact avec l'étoile de mer (Bancalà, 2009). Puis il soulève sa coquille, et la tourne brutalement une ou plusieurs fois. Ce mouvement aurait pour fonction de détacher les podia du prédateur. Il peut aussi sécréter un mucus au niveau des pores respiratoires, qui aurait pour fonction d'impacter le système olfactif du prédateur et masquerait la direction de fuite (Bancalà, 2009). Ensuite, après un déplacement le plus souvent circulaire, l'ormeau fuit ensuite tout droit pour rejoindre un abri. En présence d'un crabe ou d'un poisson, le comportement est différent puisque l'ormeau se rétracte, en abaissant la coquille sur son pied (Bullock, 1953).

2.5.3 Immunité et réponses aux stress

Concernant l'immunité des ormeaux, deux travaux majeurs ont présenté une liste de caractères immunitaires mesurables chez l'ormeau (Hooper et al., 2007; Travers et al., 2008c). L'immunité des ormeaux a d'abord été considérée comme une immunité strictement innée. Aujourd'hui, plusieurs observations mettent en évidence des phénomènes impliquant une part d'immunité acquise dans la réponse des ormeaux à des pathogènes (Dubief et al., 2017). Les premières barrières à l'entrée d'un pathogène dans l'ormeau sont le mucus, le tégument, les branchies et les intestins (Travers, 2008). Tout contact avec le pied de l'ormeau élimine facilement le mucus et les pigments des téguments créant des décolorations blanchâtres et augmentant le risque d'entrée de pathogènes (Hooper et al., 2014a). De même, des coupes de branchies ont permis de montrer que, après un stress lié à une anesthésie par l'éthanol, l'épithélium branchial présente une érosion croissante jusqu'à 3 jours après le transfert (Hooper et al., 2014a). Les travaux sur des populations résistantes et sensibles au *Vibrio harveyi* de *H. tuberculata* suggèrent aussi l'importance des branchies dans les mécanismes de défense aux pathogènes (Dubief, 2017). L'impact des manipulations sur l'épithélium pourrait expliquer les mortalités souvent observées en élevage après le mouvement d'un stock (Hooper et al., 2011). L'évolution des épithéliums branchiaux après le stress pourrait être à l'origine du décalage de plusieurs jours parfois observé entre manipulation et mortalité (Ragg et Watts, 2015).

Chez le mollusque, le stress peut être défini comme une réaction neuro-endocrinienne non spécifique à un paramètre extérieur qui menace l'homéostasie (Ottaviani et Franceschi,

1996). L'homéostasie se définit comme l'ensemble des fonctions permettant de maintenir l'équilibre interne de l'individu (Rauw et al., 1998). Le stress est une composante très conservée au sein du règne animal. Il est aujourd'hui admis que cette réponse constitue un avantage évolutif en tant que mécanisme qui permet de produire une réponse intégrée et adaptative aux perturbations du milieu. Deux types de stress existent : les stress aigus et les stress chroniques. Une littérature abondante permet de montrer que l'ormeau est sensible à de nombreuses variations de son environnement, qui peuvent être à l'origine de réponses de stress aigus : la température (Hooper et al., 2014b), l'oxygène (Cheng et al., 2004a), le pH (Cheng et al., 2004b), la salinité (Cheng et al., 2002), le régime alimentaire (Allen et al., 2006) et la pression de pathogènes (Dubief et al., 2017). Les manipulations d'élevage comme l'émersion (Ragg et Watts, 2015), l'anesthésie (Hooper et al., 2011), le tri (Malham et al., 2003) ou le déplacement de lots (Hooper et al., 2011) ou une simple exondation (Cardinaud et al., 2014) constituent eux aussi des perturbations pouvant causer des mortalités importantes. D'autres agents stressants peuvent également impacter les ormeaux sur le long terme, notamment: les hautes densités (Huchette et al., 2003), les fortes températures (Basuyaux, 1997), et les altérations de la concentration chimique de l'eau (Cenni et al., 2010), avec des conséquences aussi bien sur la croissance que sur la mortalité ou la sensibilité aux agents pathogènes (Cheng et al., 2004b; Cheng et al., 2004c).

Conclusion : L'ormeau *H. tuberculata* est une espèce particulièrement sensible aux variations de son milieu. Cette sensibilité est accompagnée d'une reproduction externe, d'une stratégie démographique R (un grand nombre de descendants) et d'une alimentation à base d'algues impliquant la présence d'écosystèmes côtiers en bonne santé pour pouvoir fournir une alimentation de qualité. Le cycle de vie de l'ormeau est bien connu et sa reproduction maîtrisée depuis une trentaine d'années. La maîtrise du cycle complet a permis une évolution des élevages et des modes de production. Alors que la biologie de l'espèce est de mieux en mieux connue, de nombreux points de recherche restent à approfondir pour permettre une meilleure compréhension de son éthologie, de sa physiologie, et de son métabolisme.

3. Production des ormeaux dans le monde et en France : un besoin d'accélération du processus de domestication

Dans le monde, la production des ormeaux par la pêche côtoie la production aquacole. Les ormeaux issus de cette dernière se situe à plusieurs niveaux de domestication selon les espèces et les pays producteurs. Cette partie vise à faire le bilan de l'état de production actuelle au niveau mondial puis français. Le cycle de production de France *Haliotis*, où s'est déroulé l'ensemble des expérimentations de la thèse, sera aussi également présenté afin de comprendre les spécificités du processus d'élevage.

3.1 Une production mondiale en forte croissance

3.1.1 Exploitation par la pêche

Bien que présent dans le milieu naturel et exploité sur l'ensemble des continents excepté l'antarctique, l'ormeau (*Haliotis spp*), est un produit principalement consommé en Asie. Des données archéologiques attestent de son usage au paléolithique en Afrique du Sud (Henshilwood et al., 2011) et au néolithique dans d'autres parties du monde (Cox, 1962). Depuis la préhistoire, l'ormeau est préparé en tant que mets traditionnel et a été intégré également à des cérémonies (White, 2011). Malgré une consommation très ancienne, l'exploitation commerciale des populations d'ormeaux à grande échelle est assez récente au niveau mondial puisqu'elle a commencé au XIXe siècle sous l'impulsion de flux migratoires de populations asiatiques qui détenaient des savoir-faire permettant la pêche de l'ormeau (Hauck et Gallardo-Fernández, 2013).

Durant les 50 dernières années, l'augmentation du pouvoir d'achat, en particulier dans les pays asiatiques, a généré un excès de la demande en ormeaux au niveau mondial par rapport à l'offre proposée par les pêcheries (Gordon et Cook 2004). Cette situation a entraîné le maintien de prix élevés sur les marchés internationaux (10 à 100 euros le kg). Face à cette demande en augmentation, la plupart des stocks de pêche sont aujourd'hui en pleine exploitation ou surexploités (Cook, 2016; Huchette et Clavier, 2004). Cette surpêche, cumulée à des perturbations globales sur les zones côtières, génère une décroissance de la plupart des populations sauvages. Afin d'éviter leur effondrement, des mesures drastiques de restriction de l'effort de pêche ont été prises dans la quasi-totalité des pays. Dans certains pays comme en

Amérique du Nord ou en Afrique du Sud, les pêcheries ont été fermées (Cook et Gordon, 2010). Mais face à des prix toujours très hauts et des réglementations strictes, le braconnage est une menace pour la gestion durable de nombreux stocks (Gordon et Cook, 2013). Les volumes de pêche illégale ont été estimés à 5700 T au niveau mondial ce qui représentait 60% de la production par pêche en 2009 (Cook et Gordon, 2010). Dans ce contexte, l'exploitation mondiale d'ormeaux de pêche ne pourra pas augmenter pour répondre à l'augmentation de la demande. Elle est même en décroissance depuis 20 ans où elle est passée de 15 000 T à 6 500 T aujourd'hui (Cook, 2016) (Figure 13).

3.1.2 Production aquacole en pleine expansion

Au début des années 1990, les prix élevés des ormeaux sur les marchés internationaux ont permis le développement d'une production aquacole avec des volumes de plus en plus importants. En considérant les incertitudes liées à l'estimation des volumes de production en Chine qui représentent actuellement 90% de la production mondiale, il est difficile de donner des chiffres précis (Gordon et Cook, 2004). Il est cependant probable que la production mondiale ait doublé entre 1990 et 2000 pour atteindre 3 500 T à la fin des années 2000 (Elliott *et al.* 2000). Elle connaît depuis une croissance exponentielle avec en 2015, plus de 120 000 T produites, correspondant à plus de 10 fois le tonnage de la pêche. Derrière la Chine, les 10% de production restants sont réalisés par des pays très divers (classement par ordre d'importance en volume aquacole produit : Corée du Sud, Taiwan, Japon, Afrique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande, Chili, Etats Unis, Mexico (Cook, 2016)).

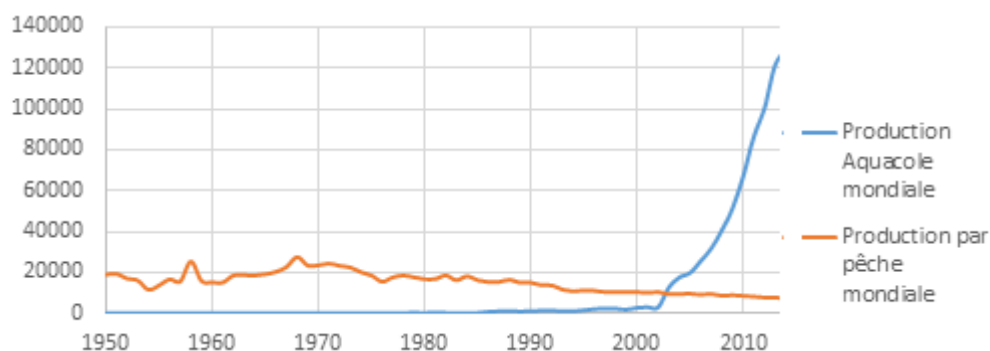


Figure 13 : Evolution des productions d'ormeaux de pêche et d'aquaculture au niveau mondial depuis 1950 (Source : <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/fr> FAO 2015).

Suite à la crise économique de 2008-2010, une baisse des prix de l'ormeau a été observée. Cette baisse des prix a été attribuée à une baisse momentanée du pouvoir d'achat en Chine et au Japon plutôt qu'à une surproduction (Cook, 2016). Elle a impacté en premier les pays aux coûts de production élevés (Corée du Sud, Australie, Etas Unis, Nouvelle-Zélande, Afrique du Sud). En parallèle, des menaces pèsent sur les équilibres écosystémiques et des mortalités de masse ont impacté plusieurs pays producteurs (Chine, Taiwan, Australie, Chili) (Gordon et Cook, 2013). En 2014, ces crises ont fait penser qu'une diminution de la production allait se produire. Cependant, la Chine annonce toujours des volumes de production croissants (Cook, 2016). Depuis 2013, les prix semblent remonter. Etant donné que l'essentiel de la consommation mondiale est réalisée en Chine et au Japon, la croissance de ces pays incite à penser qu'une augmentation des prix et des volumes de production devrait continuer dans les prochaines années (Cook, 2016).

Il est important de noter que, dans plusieurs pays tels que le Japon, la Corée du Sud et l'Australie, il existe un lien direct entre l'exploitation par pêche et la production aquacole. En effet, dans ces pays, des écloséries produisent du naissain pour le semer entre 2 et 5 cm afin de soutenir la productivité biologique et entretenir des volumes de pêche importants (Dixon et al., 2006; Saito, 1984), et cette technique est en cours d'étude en Afrique du Sud (observations personnelles). Au Japon, 12 millions de naissains sont semés chaque année en milieu naturel (Ferra et al., 2008).

Alors que la reproduction de l'ormeau était maîtrisée dès les années 1980 (Uki et Kikuchi, 1981), le succès mondial de la production aquacole d'ormeaux au cours des années 2000 a été rendu possible par les prix importants du marché international. Egalement, la croissance exponentielle du nombre d'élevages a été possible avec la maîtrise de plusieurs autres facteurs (Elliott, 2000) :

- Production d'un très grand nombre de juvéniles en nurserie (Daume et al., 1997; Daume et al., 2000a; Daume et Gervis, 2000).
- Nutrition à base d'algues pêchées ou produites en quantité, couplée à la formulation d'aliments riches en protéines (Fleming et Hone, 1996; Fleming et al., 1996b).
- Systèmes d'élevage performants, générant une production continue (Hannon et al., 2014).
- Programme de sélection génétique massale permettant de réduire la longueur des cycles de sélection (Elliott, 2000).

3.2 Production en Europe

3.2.1 Production par pêche restreinte et limitée

En Europe, l'ormeau est un produit beaucoup moins connu qu'en Asie. Depuis la deuxième guerre mondiale, il est consommé par la population des côtes bretonnes et normandes principalement, même s'il est présent en Italie et en Espagne, avec une consommation par exemple observée ponctuellement sur la côte sicilienne. Il est pêché de manière traditionnelle et a une valeur patrimoniale forte dans ces régions. En dehors de la France, peu d'informations sur les quantités pêchées sont disponibles et la pêche peut être considérée comme très limitée ou inexistante. Contrairement aux pêcheries mondiales, entre les années 1970 et 1990, il semble que les populations françaises n'ont pas subi de surexploitation par la pêche. Cependant, la dernière étude de stock a été réalisée par plongée il y a 30 ans dans la zone de Saint Malo, avec une évaluation de la biomasse présente entre le Cap Fréhel et le Cap de Grouin estimée à 400 tonnes, avec une forte proportion d'individus âgés (Clavier et Richard, 1986a). Il existe aujourd'hui une vingtaine de licences de pêche professionnelle, et les prélèvements restent inférieurs à 50 tonnes par an sur l'ensemble du littoral français. Si une pêche récréative existe, il est difficile d'estimer son impact sur les populations naturelles. Cette pêche est très encadrée et réglementée au niveau national. Elle est ouverte de septembre à mai, et restreinte à la zone intertidale. Une taille supérieure à 9 cm est imposée et le prélèvement est limité à 20 ormeaux par personne et par jour. La pêche en apnée ou avec bouteille sans licence est interdite. Néanmoins, une pêche par braconnage est pratiquée par la population locale, et son impact est difficilement appréciable sans une étude approfondie. La pêche illégale reste très limitée en contraste avec les pêches illégales réalisées dans des pays comme l'Afrique du Sud. Ce contraste entre la France et les pêcheries du monde entier pourrait être expliqué par l'absence de réseaux d'exportation historiquement constitués vers l'Asie (Riera, communication personnelle). Il n'en reste pas moins que les populations naturelles sont sensibles aux perturbations de leur environnement. Des mortalités de l'ordre de 50% ont par exemple été recensées en Bretagne Nord et en Normandie entre 1998 et 2004. Ces mortalités massives sont probablement liées à des cas de vibriose (Mazurié et al., 1999). L'impact à long terme de cet épisode sur la viabilité des populations n'est pas connu, mais il serait intéressant de refaire des études comparables à celles réalisées en 1986 pour avoir une vision de l'évolution des stocks d'ormeaux européens.

3.2.2 Production aquacole en développement

Au cours du XX^e siècle, l'aquaculture française a été largement dominée par la production d'huîtres *Crassostrea angulata* puis d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* ainsi que des moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*. Ces espèces représentent plus des trois quarts de la production aquacole nationale et sont consommées de manière traditionnelle par une partie importante de la population (FAO, 2014). Dans les années 1970, des investissements publics ont été mobilisés pour permettre de diversifier ces productions. Le développement des techniques aquacoles permettant de produire du naissain d'*H. tuberculata* a eu lieu dans les années 80 au même moment que dans les autres pays du monde (Uki, 1982). Une adaptation des techniques japonaises a permis la production de naissains par l'Ifremer (Flassch et Aveline, 1984). Cette étude de faisabilité a pris en compte la possibilité de production d'*H. tuberculata* en structure sur l'estran avec un nourrissage à l'algue fraîche. Des réserves concernant les possibilités d'une rentabilité de la filière ormeaux ont cependant été évoquées notamment en raison de l'absence de réseaux de commercialisation existants vers l'Asie (Flassch et Aveline, 1984). Dans les années 1990, des expérimentations complémentaires ont été réalisées au SMEL (Synergie Mer et Littoral), mettant en évidence la possibilité d'un élevage à terre avec températures contrôlées (Basuyaux, 1997). Suite à ces travaux, trois élevages d'ormeaux ont vu le jour en Normandie. Ces systèmes de production étaient basés sur un système à terre avec de l'eau chauffée à 18°C. Ces entreprises produisaient en moyenne 200 000 naissains par an. Cependant, elles n'ont pas permis de générer des profits et ont fermé leur activité au milieu des années 2000. L'absence de marché pour un ormeau cocktail de 20 g, qui était vendu à 120 euros le kg, était l'une des principales raisons du déficit de ces entreprises (Riera, communication personnelle). Des mortalités importantes ont aussi été observées sur des animaux matures (Nicolas et al., 2002). Ces mortalités étaient liées à un développement de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* dans des eaux supérieures à 17°C. Ce facteur ne sera mis en évidence qu'après la fermeture de ces entreprises (Travers et al., 2008a).

Aujourd'hui, il n'existe que deux entreprises halioticoles en France. France Haliotis est la seule éclosérie en activité et produit 5 tonnes d'ormeaux avec un atelier de grossissement en mer. Groix haliotis produit 1 tonne par an dans un système à température contrôlée à terre. Au départ, l'objectif de France Haliotis était de produire du naissain permettant aux entreprises normandes de grossissements de constituer leurs populations d'élevage, et aussi pour les éleveurs ostréicoles afin de diversifier leurs activités. Devant l'absence d'une demande suffisante, cette entreprise a rapidement du concentrer son activité sur un atelier de

grossissement en mer, et développer un marché pour la gastronomie française de luxe. Entre 2006 et 2012, plusieurs élevages avec des ambitions de production industrielle ont acheté du naissain à France Haliotis (Tower aqua, Connemara abalone en Irlande et Galician Marine Aquaculture en Espagne). Ces tentatives se sont soldées par des échecs dus à des mortalités très importantes après le transfert, et pendant la phase d'élevage. A l'instar des stratégies employées en Australie et en Asie, un marché potentiel de naissain pour le repeuplement ou « sea-ranching » est envisageable en Europe (Masuda et Tsukamoto, 1996; Saito, 1984). Les faibles volumes pêchés et la non-structuration des pêcheurs français n'a cependant pas permis l'établissement de ce marché pour le moment.

3.3 Structures d'élevage de France Haliotis

3.3.1 Entreprise de 6 salariés située dans le Finistère Nord

L'entreprise France Haliotis a été fondée en 2004 par Sylvain Huchette, qui avait réalisé sa thèse sur l'écologie et l'aquaculture de l'ormeau en Australie et Guirec Rolando, ingénieur agronome avec une formation de commercial. L'entreprise comprend maintenant 6 salariés, et est aujourd'hui dirigée par Sylvain Huchette, après le départ de Guirec Rolando en 2007. Une spécificité de cette entreprise est le travail de l'entreprise sur l'ensemble de la filière, de la recherche jusqu'au marketing et à la commercialisation (Figure 14).



Figure 14 : l'équipe de France Haliotis en 2016 (Photo : SCEA France Haliotis)

France Haliotis est située dans le Finistère Nord à Plouguerneau, sur l'Aber Wrac'h (Figure 15). Cet environnement est dominé depuis les années 70 par l'ostréiculture, avec une production annuelle d'environ 1 600 tonnes d'huîtres creuses (CRC Bretagne Nord, production

dans l'Aber Wrac'h). Ce bassin fait face à des mortalités épisodiques d'huîtres en fin de cycle de production sous la pression de la bactérie pathogène *Vibrio aesturianus* (Labreuche et al., 2006). La côte extrêmement découpée qui entoure l'Aber offre l'avantage de posséder de nombreux champs d'algues. Une eau de qualité classée en zone A est renouvelée par le flux des marées. Sa température est relativement stable, et ne dépasse que très rarement les 16°C. Ces trois derniers points sont des avantages essentiels pour l'installation d'un élevage d'ormeaux.



Figure 15 : A) Position de France Haliotis en Bretagne Nord, B) Position de la concession et de la nurserie de France Haliotis (Photos : SCEA France Haliotis).

3.3.2 Cycle de production de l'ormeau à France Haliotis

Le cycle de production a la particularité d'être long puisqu'il faut 4 ans en moyenne pour obtenir un ormeau de 64 mm et 35 g (Figure 16). Le système de production est basé sur deux sites différents : un site d'écloserie-nurserie à terre localisé à Plouguerneau, et une concession en mer située en sortie de l'Aber Wrac'h (Figure 15). Enfin, France Haliotis est la seule écloserie d'ormeaux au monde réalisant l'ensemble de son cycle de production sous cahier des charges « Agriculture Biologique ». Cette certification impose de nombreuses contraintes techniques relatives à la production d'algues, la maîtrise de la ressource alimentaire en grossissement et les possibilités de traitements. Elle offre en contrepartie une labélisation reconnue sur le marché.

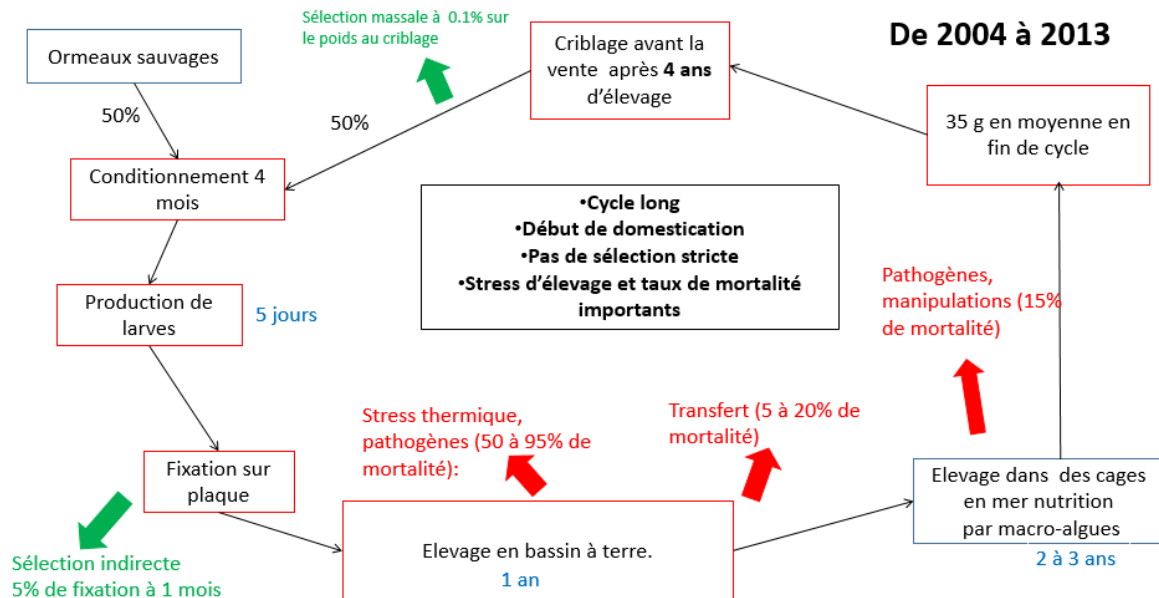


Figure 16 : Cycle de production à France Haliotis avec les principaux agents stressants associés aux pratiques d'élevage en rouge et les principales pressions de sélection en vert (Source : personnelle)

3.3.3 Conditionnement, ponte et élevage larvaire

Une salle de conditionnement composée de 60 bassines de 20 L permet d'assurer le conditionnement des reproducteurs avec une eau chauffée à 16°C, une photopériode artificielle (16h de jour et 8h de nuit), et une alimentation hebdomadaire de plusieurs espèces d'algues fraîches (Figure 17 A). Jusqu'en 2013, le cycle de production était ouvert et des ormeaux d'élevage étaient systématiquement croisés avec des ormeaux sauvages. L'enjeu majeur du conditionnement est de pouvoir garder les animaux dans un environnement le plus stable possible. Lors du dernier mois de conditionnement, tout stress lié à un arrêt d'alimentation en eau ou à un changement brutal de température peut en effet entraîner une ponte non contrôlée des animaux. Après 3 à 4 mois dans cette salle, la ponte est induite et les larves peuvent être élevées durant 4 jours dans des bacs cylindro-coniques. La présence de 12 bacs permet un élevage maximal de 12 familles ou lots séparés (Figure 17 B).

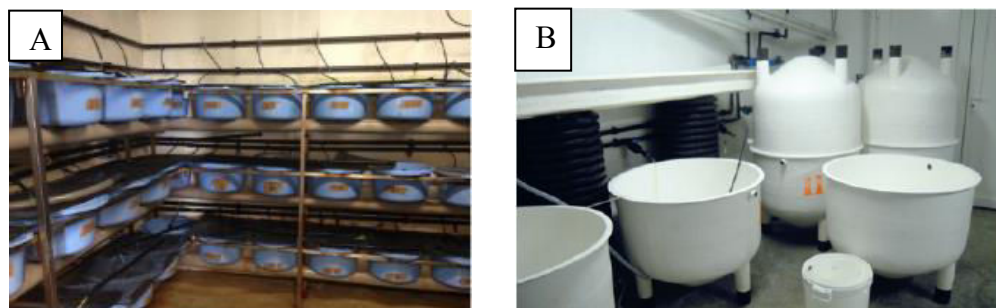


Figure 17 : A) Salle de conditionnement B) et la salle larvaire de France Haliotis (Photos : SCEA France Haliotis).

3.3.4 Nurserie

La fixation des larves matures se fait sur des plaques PVC où sont cultivées des diatomées opportunistes et une algue verte *Ulvela lens* (Figure 18 C). La nurserie de France Haliotis est composée de 120 bassins de 440 plaques et a une capacité de production annuelle de 2 millions de naissain (Figure 18 A, B). L'élevage en nurserie pose la difficulté de l'élevage d'une algue et d'un brouteur dans un même microenvironnement et requiert une maîtrise avancée de la production d'algues et de la gestion de la densité des ormeaux. Ce système de production multi-trophique est largement inscrit dans une perspective d'agro-écologie puisqu'elle offre l'opportunité d'utiliser la lumière du soleil et les sels nutritifs présents dans l'eau de mer pour produire de la biomasse animale et végétale de manière intégrée. La principale difficulté réside dans le fait que les ormeaux sont placés dans un environnement où les gammes de températures sont plus importantes qu'en zone intertidale. En effet, les températures de l'eau peuvent dépasser les 22°C en été avec deux renouvellements par jour, et descendre en dessous de 6°C en hiver. Les grands volumes d'eau utilisés ne permettent pas un contrôle de la température par pompe à chaleur.

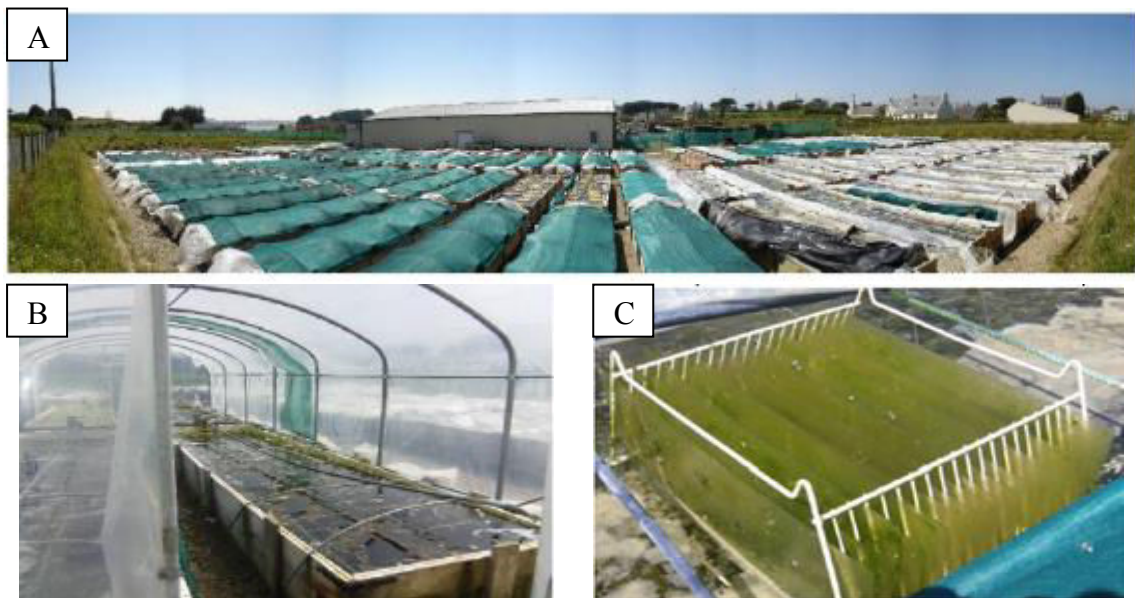


Figure 18 : A) Les 120 bassins de la nurserie de France Haliotis, B) Bassin sous serre composé de 22 paniers de 20 plaques recouvertes d'Ulvela lens, C) Panier contenant du naissain de 6 mm (Photos : SCEA France Haliotis).

Le naissain est élevé à terre pendant 10 mois puis transféré en mer lorsqu'il atteint une taille minimale de 8 mm qui lui permet de ne pas s'échapper à travers la maille des cages. Dans un bassin de nurserie, après 10 mois d'élevage, la taille des juvéniles présente une grande

variabilité allant de 5 mm à 16 mm. Cette variabilité impose un criblage réalisé par une cribleuse ostréicole en eau classique (Figure 19). Ce criblage et l'existence de 2 sites de production localisés à 30 min de chaland génèrent plusieurs stress pour les animaux : l'anesthésie, la manipulation en seau, le criblage, et l'exondation. Ces stress entraînent des taux variables de mortalité au cours des différents cycles de production (Figure 16) et font ressortir l'importance du niveau énergétique des animaux en sortie de nurserie.



Figure 19 : Cribleuse ostréicole en eau utilisée pour un tri par la taille de juvéniles inférieurs à 30 mm (Photo : SCEA France Haliotis)

3.3.5 Le grossissement en mer

À la suite de cette première période à terre, 3 ans d'élevage sont réalisés en mer dans des cages en filières reposant sur le fond (Figure 20 A). Pour mimer l'habitat naturel des ormeaux, des collecteurs d'huîtres sont placés dans les cages pour créer de l'obscurité et augmenter la surface disponible dans les cages (Figure 20 B). L'alimentation à base de macro-algues est réalisée une fois par mois. L'élevage en mer permet le maintien des ormeaux dans un environnement naturel et offre une qualité d'eau océanique dont la température évolue sans variations brutales. L'enjeu majeur est d'avoir une capacité régulière d'approvisionnement en macro-algues. Ce système nécessite la récolte de 100 tonnes d'algues fraîches pour une production de 5 tonnes d'ormeaux. Les 4 espèces les plus utilisées par l'entreprise sont *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima* et *Ulva lactuca* (Figure 21). Le coût des structures d'exploitation en mer ainsi que la durée d'élevage de 3 ans et le besoin important en main d'œuvre sont les principaux freins à la rentabilité de la structure d'élevage. Après de nombreux travaux de R&D sur le développement des cages et l'optimisation de l'alimentation, France Haliotis désire mettre en place un plan de sélection génétique afin d'améliorer la croissance des animaux pour réduire la durée du cycle d'élevage et diminuer les coûts fixes de production.

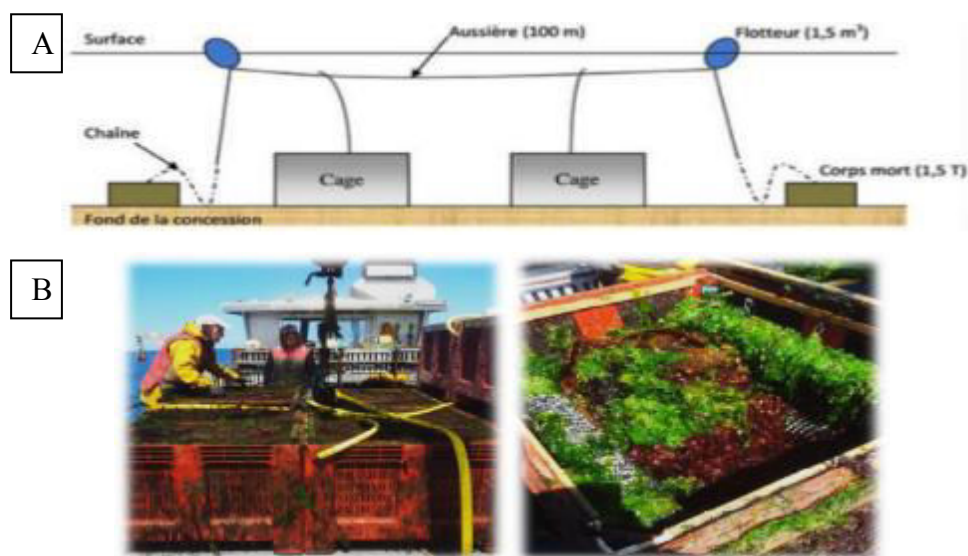


Figure 20. A) Organisation d'une filière de production, B) Extérieur et intérieur d'une cage utilisée pour le grossissement (Photos : SCEA France Haliotis).

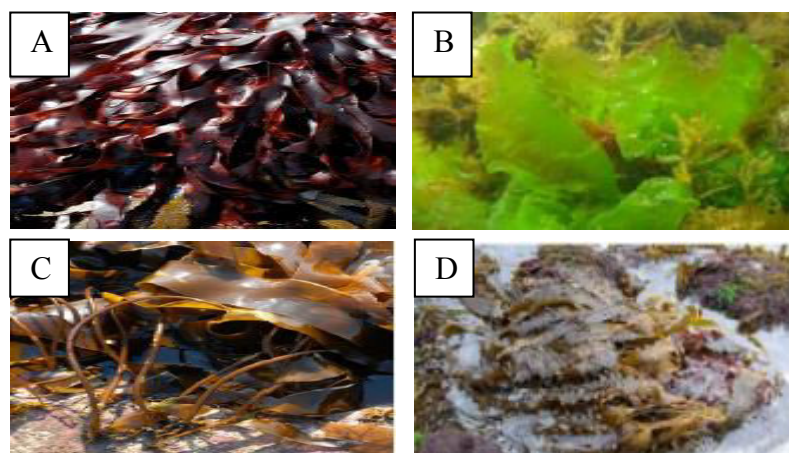


Figure 21. Les 4 espèces les plus fréquemment utilisées par France Haliotis pour les cages de grossissement en mer : A) *Palmaria palmata*, B) *Ulva lactuca*, C) *Laminaria digitata*, D) *Saccharina latissima* (Photos : SCEA France Haliotis)

3.3.6 Commercialisation

Après 4 ans d'élevage, les ormeaux de 40g en moyenne sont commercialisés. Les principaux clients sont de grandes tables de la gastronomie française. Grâce à un effort commercial important, ce produit plutôt méconnu s'impose progressivement comme un produit de luxe (Figure 22 A). Son prix s'élève à 65 euros/kg, alors que le prix de vente de l'ormeau sauvage est compris entre 25 et 50 euros/kg selon la saison. L'augmentation des volumes de vente nécessite un effort continu. Des produits consommés sous forme de rilette ou de plats

préparés sont plus accessibles (Figure 22 B). Le fait que le produit d'aquaculture est plus cher que le produit de pêche est assez original sur le marché des produits halieutiques. La principale concurrence du produit aquacole est le produit de pêche. Le surcoût est consenti par les restaurateurs car le produit aquacole est plus jeune, plus petit et plus tendre que le produit sauvage, avec un approvisionnement régulier tout au long de l'année. La sélection génétique pourrait être un moyen efficace pour améliorer la qualité organoleptique des produits. Elle pourrait également être utile dans la mise en place d'une différenciation de qualité pour un produit aquacole qui pourrait continuer à justifier un prix supérieur au prix de l'orveau sauvage.



Figure 22 : A) Orveau d'élevage cuisiné sur une galette de blé noir; B) Pots d'orveaux cuisinés ou en rillette (Photo : SCEA France Haliotis)

Conclusion : La production haliotique est un succès de l'aquaculture au niveau mondial. Ce succès a été rendu possible grâce à une forte demande asiatique pour un produit très prisé et donc à des prix élevés sur le marché. Chez de multiples producteurs, la croissance lente des animaux est identifiée comme un problème majeur pour la rentabilité des élevages. Ce contexte est en particulier vrai en Europe où *H. tuberculata* est un orveau de plus petite taille maximale que la plupart des autres espèces élevées dans le monde. Il est aujourd'hui nécessaire de produire des individus mieux adaptés à l'élevage, et présentant une croissance plus rapide. Il est également essentiel de réduire le cycle de production pour réduire les coûts fixes des structures d'élevage et de la main d'œuvre qui sont élevés en Europe. Dans ce contexte, les professionnels de l'halioticulture soutiennent le processus de domestication par la mise en place d'un programme de sélection génétique sur la base de l'estimation des paramètres génétiques pour les caractères liés à la croissance et également pour d'autres caractères d'intérêt.

4. Bases génétiques de la variabilité des caractères phénotypiques et amélioration par la sélection

L'amélioration génétique des populations d'élevage aquacole repose actuellement sur 4 grandes méthodes (Boudry et al., 1997) :

1. L'importation de nouvelles espèces
2. Le développement d'animaux polyploïdes
3. L'hybridation entre espèces
4. La sélection génétique

La transgénèse et les nouvelles méthodes d'édition du génome sont également envisagées comme axes d'amélioration génétique pour certaines espèces aquacoles mais sont encore aujourd'hui à l'état de recherche ou très peu diffusées en production. Même si les méthodes citées précédemment peuvent être pertinentes en halioticulture, ma thèse s'est concentrée sur la sélection génétique. Cette approche présente l'avantage de permettre un progrès cumulatif et continu pour les populations en sélection (Falconer et Mackay, 1996). La mise en place d'un programme de sélection génétique correspond à un investissement sur le long terme permettant d'exploiter la variabilité génétique d'une population d'élevage pour la rendre plus adaptée aux contraintes d'une production donnée. Cet investissement est d'autant moins risqué quand les paramètres génétiques d'une population dans un élevage sont connus. Cette partie présentera les bases de la génétique quantitative à l'origine de tout processus de sélection.

4.1 Notions de base de génétique quantitative : le modèle polygénique infinitésimal

Une population peut être définie comme un ensemble d'individus d'une même espèce qui peuvent se reproduire entre eux. Au sein d'une population, les individus peuvent présenter de la variabilité pour des caractères phénotypiques : taille, poids, couleur, etc. Le résultat de la mesure effectuée sur un individu est appelé *valeur phénotypique* ou *performance*. De même, le génome des individus d'une population est généralement variable, sauf si la population est composée d'un seul clone. L'information portée sur un ou plusieurs locus au sein du génome est appelée génotype. Les individus présentent des phénotypes qui résultent de l'expression de leur génome en interaction avec le milieu dans lequel ils se développent. Parmi les effets de

l'environnement sur les phénotypes, il est possible de distinguer les effets contrôlés de l'environnement et les effets non contrôlés. Les effets contrôlés ou *macro-environnement*, comme la température, la densité ou l'alimentation sont les effets du milieu que maîtrise l'observateur. Les effets non contrôlés du milieu ou *microenvironnement* sont tous les effets qui échappent à l'observateur et qui s'appliquent de manière différente à chacun des individus. Pour certains caractères d'intérêt en élevage, comme la taille ou le poids, les variations de valeurs phénotypiques des individus d'une population sont continues : elles sont dites « quantitatives continues ». Un modèle théorique explicatif de ces variations est le modèle *polygénique additif infinitésimal*. Il explique la performance d'un individu par l'action d'un nombre très grand de locus aux effets faibles et cumulatifs. Ce modèle permet de définir la *valeur génétique (breeding value)* d'un individu comme l'effet moyen de son génotype sur un caractère et dans un environnement donnée (Falconer et Mackay, 1996) (Encadré 1).

Encadré 1 : Modèle de décomposition de la valeur phénotypique d'un individu

La valeur phénotypique P , mesurée pour un individu dans un macro-environnement donné, peut être décomposée selon le modèle suivant $P = \mu + G + E$ où μ est la moyenne de la population étudiée, G un effet génétique aléatoire à distribution normale et E l'effet du microenvironnement défini comme l'écart entre la valeur phénotypique centrée d'un individu et sa valeur génétique. Par construction, l'effet du microenvironnement est donc une variable aléatoire de distribution normale. Cette équation implique que la valeur génétique d'un individu dépend de la population et du macro-environnement dans laquelle il est considéré, et qu'en espérance, la valeur phénotypique centrée prise par un individu est sa valeur génétique. La valeur génétique additive d'un individu correspond à la valeur qu'il va transmettre en moyenne à sa descendance. Cette notion est fondamentale en génétique quantitative parce qu'elle permet de prédire la valeur génétique des individus dont l'ascendance est connue. En effet, la valeur génétique d'un individu est égale à la moyenne des valeurs génétiques reçues du père et de la mère, plus un résidu de dominance représentant l'effet de l'interaction de ce qui est hérité du père et de la mère. L'équation suivante peut donc être écrite : $G = A + D$, avec A l'effet additif moyen des parents et D l'effet de dominance.

4.2 Utilisation des effets génétiques additifs en sélection

Selon le modèle présenté précédemment, la moyenne et la variance des valeurs phénotypiques d'une population dépendent des valeurs génétiques et des effets du microenvironnement. Dans une population en élevage, la sélection consiste à retenir, pour la production de la génération suivante, des reproducteurs ayant une valeur génétique additive, c'est-à-dire transmissible, supérieure à celle de la moyenne de la population. La première étape, lorsqu'un caractère variable est observé dans une population, est donc d'estimer la part de la diversité phénotypique qui est d'origine génétique additive parmi la diversité phénotypique totale. Ce paramètre de génétique quantitative permet d'estimer *l'héritabilité* au sens strict

(Falconer et Mackay, 1996) (Encadré 2). Etant donné que la variabilité des phénotypes d'un groupe d'individus est le produit de l'interaction d'un environnement et de la diversité des génomes de la population, une héritabilité est propre à un environnement et à une population. L'héritabilité est par construction comprise entre 0 et 1. Lorsqu'elle vaut 0, la totalité de la variabilité du caractère est d'origine environnementale ; la sélection des meilleurs individus ne modifiera pas la moyenne du caractère à la génération suivante. Si elle vaut 1, l'ensemble de la variance phénotypique est d'origine génétique additive (Falconer et Mackay, 1996).

Encadré 2 : Définition de l'héritabilité au sens strict

Sur le modèle précédent, on peut écrire :

1. $P = \mu + G + E$ et $G = A + D$
2. D'où $P = A + D + E$

En admettant que A, D et E sont indépendants, on a :

3. $V(P) = V(A) + V(D) + V(E)$

L'héritabilité en tant que part de la variabilité phénotypique imputable à des variabilités d'origine génétique transmissible est donc :

4. $h^2 = V(A) / V(P)$ ou $h^2 = V(A) / (V(A) + V(D) + V(E))$

Cette définition implique que l'héritabilité d'un caractère est d'autant plus élevée que les individus sont produits dans un environnement homogène, c'est à dire sans des effets micro-environnementaux et favorables au développement. Un environnement d'élevage où l'alimentation serait insuffisante impliquerait par exemple que des individus pourraient s'alimenter et d'autres non, ce qui pourrait générer une plus grande variabilité micro-environnementale et augmenterait V(E). A l'inverse, plus un caractère présente une base génétique additive dans la population V(A), plus l'héritabilité peut être grande. Les caractères avec $h^2 < 0,2$ sont qualifiés de peu héritable (Falconer et Mackay, 1996). C'est souvent le cas pour des caractères fortement liés à la fitness et pour lequel l'environnement joue un rôle important, comme l'aptitude reproductrice. Par ailleurs, ils sont soumis à une pression de sélection naturelle importante réduisant en principe leur polymorphisme génétique. De plus, les effets de dominance V(D) semblent jouer un rôle important pour ces caractères. Les caractères pour lesquels l'héritabilité est comprise entre $0,2 < h^2 < 0,4$ sont très souvent retrouvés pour des caractères reliés à l'intensité d'une production comme la quantité de lait produit ou la croissance des individus. Enfin, les caractères où l'héritabilité est supérieure à 0,4 sont considérés comme hautement héritable. Ces hérabilités sont retrouvées pour des caractères dont la variabilité est peu soumise à la sélection naturelle et peu sensible au microenvironnement tels que la qualité des produits ou les rendements en chair.

Lorsque le sélectionneur sait qu'un caractère présente une variabilité dont une part est d'origine génétique additive, il cherche à identifier les individus possédant le meilleur potentiel génétique additif. Une population peut être élevée dans un environnement contrôlé défini, par exemple, en aquaculture par une structure, une qualité d'eau homogène et une alimentation identique. L'écart entre les performances de l'individu et la moyenne de la population est un estimateur de sa *valeur génétique additive*. Elle permet de classer les individus en fonction de

leur capacité à augmenter la moyenne d'un caractère lors de la transmission de leurs gènes à la génération suivante. L'écart entre la performance individuelle et la performance moyenne de la population sera transmise à proportion de l'héritabilité de ce caractère. Autrement dit, en cas d'absence d'information généalogique, l'espérance de la valeur génétique d'un individu est égale au produit de l'héritabilité et de l'écart de sa performance phénotypique à la moyenne. Cette formule nous montre que, dans le cas simple de la sélection individuelle, l'héritabilité peut aussi être interprétée comme la précision de l'estimation de la valeur génétique de l'individu lorsque son phénotype est observé, ou la confiance qui peut être accordée à un phénotype en tant que valeur prédictive de la valeur génétique additive d'un individu.

Lorsqu'au sein d'une population les valeurs génétiques de deux caractères des individus sont corrélées, il existe *une corrélation génétique* entre ces caractères. La sélection d'individus ayant un haut potentiel génétique sur le premier caractère entraînera alors une évolution du second caractère. En amont de la mise en place d'un programme de sélection, il est important d'estimer ces corrélations. Une sélection sur deux caractères corrélés négativement entre eux ou par rapport à la rentabilité de l'élevage sera inefficace (Falconer et Mackay, 1996). On parle de *trade-off* génétique. Un cas connu en agronomie est la corrélation génétique négative entre la production laitière et la capacité de reproduction pour la vache qui peut aboutir à une diminution des volumes de production globale pour les exploitations (Rauw et al., 1998). Une des explications possibles de l'existence de ces corrélations est la pléiotropie, c'est-à-dire qu'un gène contrôle l'expression de deux caractères différents (Falconer et Mackay, 1996).

4.3 Estimation des paramètres génétiques

Lorsqu'un caractère est héritable dans une population, en moyenne deux individus apparentés se ressemblent plus sur ce caractère que deux individus choisis au hasard dans la population. Le degré de ressemblance phénotypique, apprécié par une corrélation, dépend du niveau d'apparentement et d'éventuels facteurs d'environnement communs. L'utilisation de la performance d'un individu et des différents liens de parenté avec d'autres individus permet, grâce à une analyse de variance, l'estimation des paramètres génétiques. L'estimation est réalisée par l'intermédiaire de modèles mixtes permettant d'intégrer toutes les relations de parenté d'une population et d'estimer sans ambiguïté les effets fixes du milieu contrôlé et les effets génétiques aléatoires sur les différentes performances mesurées. Ce modèle est appelé BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) (Henderson, 1953). Il permet une estimation de valeur

génétique pour un caractère qui ne s'exprime pas sur un individu en capitalisant l'information de ses apparentés où le caractère est exprimé.

Encadré 3 : Estimation d'héritabilité en absence d'effets de macro-environnement et modèle BLUP

Le degré de ressemblance entre un groupe d'animaux apparentés peut être apprécié par l'étude de la corrélation des valeurs phénotypiques qu'ils partagent pour un même caractère. Pour deux individus i et j , lorsque les performances des individus sont corrigées par les effets du milieu contrôlé en l'absence d'environnement commun, il est facile de démontrer que la covariance phénotypique est égale à la covariance génétique. Avec

1. $P_i = G_i + E_i$
2. $Cov(P_i, P_j) = Cov(G_i, G_j) + Cov(E_i, E_j)$ si sans environnement commun $Cov(E_i, E_j) = 0$
3. donc $Cov(P_i, P_j) = Cov(G_i, G_j)$

Or pour une régression linéaire :

$$4. r = Cov(P_i, P_j) / V(P) = Cov(G_i, G_j) / V(P)$$

La covariance génétique entre deux individus dépend du lien d'apparenté entre les individus. Pour des demi-frères et sœurs, elle est d'un $1/4VA$ puisqu'en moyenne ils partagent un quart de leur génome, en admettant une indépendance des effets de dominance.

5. $Cov(G_i, G_j) = Cov(A_i, A_j) + Cov(D_i, D_j) = Cov(A_i, A_j) = 1/4(VA)$
6. En reprenant la formule 3 on a $r = 1/4(VA/VP)$ d'où $r = 1/4h^2$

Le modèle précédent a l'avantage de permettre d'estimer par une simple régression linéaire l'héritabilité des caractères. En pratique, il est difficile de ne pas avoir d'environnement commun pour des individus ***et de corriger sans biais les effets du milieu contrôlé***. Deux sous-groupes de candidats à la sélection pourront, par exemple, avoir été produits dans deux cages différentes. Cet environnement différentiel expliquera une partie de la variabilité de leur performance. Le modèle utilisé est donc le mixte, modèle BLUP dont l'écriture matricielle peut être donnée avec la formule suivante

$$7. Y = X\beta + Zu + e,$$

avec Y : vecteurs des performances mesurées ; β : vecteur des effets du milieu pris comme effet fixe, u : vecteur des effets génétiques pris comme effet aléatoire, e : résidus du modèle, X : matrice d'incidence reliant chaque performance au milieu où elle a été mesurée et Z : matrice d'incidence reliant chaque performance aux effets génétiques qui l'ont conditionnés. La résolution de cette équation matricielle qui atteint très vite des milliers de lignes et de colonnes lorsque l'on considère plusieurs caractères et plusieurs générations permet l'obtention de tous les paramètres génétiques présentés en partie 4.2. Le modèle BLUP permet l'estimation d'une valeur génétique de synthèse sur les différentes performances mises dans la matrice de performances et tire parti de l'estimation de corrélations génétiques existantes entre les différents caractères à améliorer. En pratique on parle d'indice synthétique de sélection. Cet indice permet de classer des candidats à la sélection. Il est important de rajouter que, malgré une estimation sans biais des paramètres génétiques et des paramètres environnementaux, une performance mesurée est toujours astreinte à un environnement. Un même individu d'une même population pourrait avoir des valeurs génétiques différentes dans deux environnements. On parle d'interaction génétique-environnement. Il est donc essentiel d'estimer les paramètres génétiques des individus dans des environnements les plus proches possibles des milieux d'élevage.

Ce cadre théorique a plusieurs conséquences sur la pratique de la sélection. D'abord, l'estimation de valeurs génétiques se base sur les mesures individualisées des différents critères

soumis à la sélection. Pour maximiser la précision de l'estimation, il faut que les mesures des valeurs phénotypiques soient faites sans biais sur différents individus pouvant appartenir à des générations différentes. Le protocole de mesure doit donc être précis (pour réduire l'effet de microenvironnement) et permettre de réaliser des mesures répétables (mesures qui prennent en compte *tous les biais possibles* sur la performance de l'individu en effet de macro-environnement). Parallèlement, le nombre de paramètres à estimer dans un modèle BLUP est très grand (Valeur génétique, héritabilité génétique, corrélation génétique entre les caractères, effet du milieu). Une estimation précise des valeurs génétiques nécessite un grand nombre de données de phénotypage d'individus apparentés. En l'absence d'informations suffisamment conséquentes le modèle BLUP peut ne pas converger. Ainsi, il faut parfois se restreindre à une évaluation mono-caractère des paramètres génétiques ou investir plus de temps dans le phénotypage de la population apparentée. Par conséquent, le développement de méthodes de phénotypage rapides et peu coûteuses est essentiel pour la pratique de la sélection. Une deuxième conséquence de l'utilisation de ce genre de modèle est la nécessité que les individus phénotypés présentent des niveaux d'apparentement connus et variables dans la population étudiée pour l'estimation conjointe de tous les paramètres. La gestion des informations d'ascendance et de descendance demande un gros investissement. Enfin, les estimations simultanées de plusieurs paramètres environnementaux et génétiques sur plusieurs centaines d'individus présentant des niveaux d'apparentement variables nécessitent une grande capacité de calculs. Ceci explique que, malgré une filiation et un marquage facilement réalisable en production terrestre, le BLUP a bénéficié de l'arrivée des ordinateurs et n'a finalement été utilisé que récemment.

Conclusion : Un modèle théorique de génétique quantitative permet par une décomposition de la variance d'apporter au sélectionneur 3 paramètres génétiques fondamentaux : l'héritabilité d'un caractère, les corrélations génétiques entre caractères et les valeurs génétiques de chaque individu pour chaque caractère. Ces trois paramètres sont les informations de base que peut rassembler le sélectionneur pour choisir les animaux qu'il fera reproduire.

4.4 Prévision du progrès génétique

Un autre intérêt de l'estimation de paramètres génétiques est qu'ils permettent de prédire le progrès génétique qui sera réalisé à chaque génération de sélection. On parle alors de *réponse à la sélection*. Cette réponse permet d'évaluer la pertinence d'un investissement en sélection.

Elle est calculée sous l'hypothèse d'une sélection par troncature (sélection où tous les candidats affichant une performance au-delà d'un seuil sont retenus) et de distribution normale du caractère considéré:

$$\text{Réponse à la sélection : } E(\Delta G_a) = i \cdot R \cdot \sigma_a / T$$

Avec, $E(\Delta G_a)$ est l'espérance du progrès génétique réalisée par an, i l'intensité de sélection, R est la précision de la sélection σ_a est la variabilité génétique additive du caractère considéré, T est l'intervalle de génération.

Dans cette formule, $E(\Delta G_a)$ le progrès génétique réalisé dépend à la fois de 3 paramètres techniques sur lesquels l'éleveur peut intervenir et d'un paramètre génétique qui dépend de la population en sélection. Dans le cadre d'une amélioration génétique additive, cette formule illustre bien le fait que, sans variabilité génétique additive σ_a , le caractère ne sera pas amélioré par sélection.

La précision de la sélection R (écart entre la valeur génétique vraie et l'estimateur de la valeur génétique) dépend de l'héritabilité des caractères et du nombre d'individus phénotypés ; son calcul varie en fonction des pratiques de sélection choisies.

L'intensité de sélection i est calculée par le différentiel de sélection (moyenne des reproducteurs sélectionnés – moyenne des candidats à la sélection) standardisé par l'écart type phénotypique du caractère dans la génération parentale. Il indique la sévérité du choix réalisée lors de la sélection des reproducteurs. L'intensité de sélection peut être vue comme la différence en nombre d'écart type entre les valeurs génétiques des individus sélectionnés et la population parentale. En pratique, il est simple de définir une pression de sélection qui représente de manière combinée l'intensité de sélection et le nombre d'individus phénotypés. Elle correspond au nombre d'animaux sélectionnés sur le nombre d'animaux candidat à la sélection. Si parmi des candidats triés sur la taille, les 1% plus grands sont sélectionnés, la pression de sélection sera de 1%. Plus la pression est élevée, plus le progrès attendu est fort. Selon les plans de sélection, la pression de sélection varie entre 1 et 20%. Lors de la mise en place d'un plan de sélection, la pression de sélection adoptée est conditionnée par la capacité d'évaluation de performance et de tri d'un nombre important de candidats à la sélection. Elle doit permettre d'établir une pression suffisante et d'obtenir un nombre de reproducteurs minimum nécessaire à la constitution d'une population d'élevage. Dans chaque élevage, elle a donc une valeur minimale limitée par le ratio nombre de reproducteurs nécessaire / nombre de candidats évaluables. Elle ne doit pas être non plus trop élevée. En effet, une pression de sélection forte

induit une diminution de la variabilité génétique totale et peut conduire à l'émergence d'une dépression de consanguinité néfaste pour les niveaux de performances (Rauw et al., 1998).

La dernière variable intervenant dans la prédiction du progrès est l'intervalle de génération. Plus les animaux peuvent être évalués rapidement pour les caractères sous sélection, plus le progrès annuel sera grand. La grande variabilité dans ces intervalles explique les différentes dynamiques de progrès génétiques réalisées sur les différentes filières agronomiques (Figure 23). La réduction du temps de génération est limitée par l'âge où l'animal atteint la maturité sexuelle.

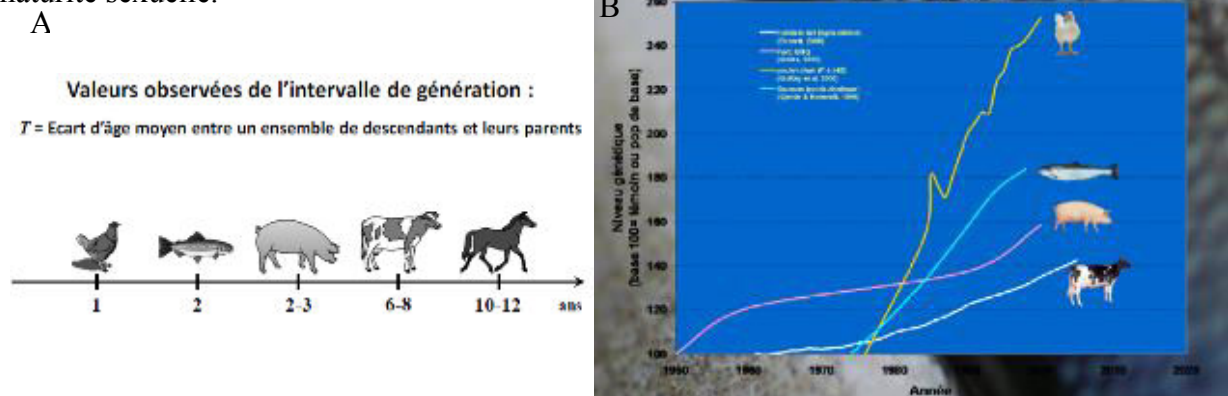


Figure 23 : A) Intervalle de génération de différents animaux domestiqués et B) dynamique du progrès génétique (Source : CSAGAD, 2017)

Pour confronter les prédictions données dans cette partie avec la réalité du terrain, la réponse à la sélection peut être mesurée comme les différences de performances entre les descendants et les reproducteurs. Cette définition suppose qu'il est possible d'élever les descendants dans le même environnement que les reproducteurs ce qui est souvent compliqué en aquaculture et parfois impossible selon les modes de vie des animaux considérés. Il est alors préférable d'élever dans un environnement commun des progénitures d'individus sélectionnés et d'individus non sélectionnés pour mesurer la réponse à la sélection exercée. Les réponses à la sélection sont variables en fonction des années et souvent réellement identifiables après deux générations de sélection (Falconer et Mackay, 1996). Lorsqu'une réponse à la sélection est mesurée, il est possible de la diviser par un différentiel de sélection pour obtenir une *héritabilité réalisée* en élevage. Ce paramètre nous montre comment l'effort de sélection a été transmis en amélioration sur le terrain. Les héritabilités réalisées sont souvent inférieures aux héritabilités génétiques estimées. C'est particulièrement vrai lorsque les populations produites sont élevées dans des environnements d'élevage changeant par rapport à leurs reproducteurs.

Enfin, il est évident que la rentabilité en élevage peut dépendre de plusieurs caractères distincts (par exemple la survie et la croissance). Les sélectionneurs souhaitent donc améliorer plusieurs caractères en même temps. Il est donc important d'identifier les caractères permettant des gains de rentabilité et de hiérarchiser l'effort de sélection qu'on voudra porter sur chacun d'eux pour construire un objectif de sélection. *L'objectif de sélection* est donc la fonction des aptitudes à améliorer permettant d'attribuer une valeur génétique de synthèse à chaque individu.

4.5 Sélection et gestion de la diversité génétique en élevage

Comme un processus de sélection permet de choisir parmi une diversité génétique, cela implique inévitablement une élimination d'une autre partie de cette diversité. La diversité génétique d'une population peut être estimée par sa *taille génétique efficace* (N_e) (Encadré 4). Cette mesure permet d'évaluer la diversité génétique (neutre par rapport au caractère sélectionné). La diversité génétique d'une population est reliée au coefficient de consanguinité (Falconer et Mackay, 1996). La mise en place d'un processus de sélection sur des populations de tailles génétiques efficaces faibles peut en effet conduire à une augmentation du taux de consanguinité. Or, la dépression de consanguinité a potentiellement un effet délétère sur les rendements en production (Encadré 4). La taille génétique efficace de la population en sélection est donc un paramètre de limitation possible du progrès génétique. Un conseil classique en aquaculture, pour limiter ce problème, est de rester en dessous de 1% d'augmentation de la consanguinité par génération (Bentsen et Olesen, 2002). Cet objectif peut être atteint en choisissant une population de base génétique large pour commencer la sélection (Falconer et Mackay, 1996) et en reprenant un nombre large de reproducteurs chaque année (Dupont-Nivet et al., 2006). Une pression de sélection n'excédant pas 1% sur un même caractère semble elle aussi garantir une plus lente érosion de la diversité (Bentsen et Olesen, 2002). Le mode de reproduction en élevage doit aussi permettre la création d'un maximum de brassage allélique (Dupont-Nivet et al., 2006) et une égalisation du succès reproducteur des individus sélectionnés (Boudry et al., 2002). Enfin, la maîtrise biologique de l'élevage est fondamentale, des mortalités massives ou une élimination régulière d'animaux pouvant conduire à une réduction du N_e (Taris et al., 2007). Egalement, un progrès trop rapide sur un seul caractère est responsable d'un déséquilibre homéostatique pouvant entraîner des trade-off destructeurs pour la production (Rauw et al., 1998).

Conclusion : Entre le progrès par sélection sur une variabilité génétique additive et la conservation de la diversité génétique, la multiplication des caractères à améliorer et la pression

de sélection applicable, le nombre de candidats à la sélection et le coût de phénotypage, il existe de nombreux équilibres à trouver lors de la mise en place d'un programme de sélection génétique. Ces équilibres doivent faire l'objet d'une réflexion au cas par cas en fonction de la filière, des objectifs du sélectionneur et de sa maîtrise de l'élevage.

Encadré 4 : Perte de diversité génétique dans une population en sélection

La mise en place d'un processus de sélection génétique peut provenir de deux mécanismes distincts :

1. La sélection d'individus ayant une meilleure valeur génétique additive conduisant inévitablement à l'élimination d'une partie de la diversité génétique de la population en sélection. Ce processus génère une diminution progressive de la *diversité allélique* de la population, c'est-à-dire une diminution du nombre moyen d'allèles par locus.

2. La reproduction d'animaux issus d'une même population de génération en génération. Ce processus engendre inévitablement une augmentation des individus *apparentés* dans la population. *Le taux d'apparentement* peut être défini par la probabilité qu'à un locus donné, deux individus possèdent le même génotype.

Ces deux mécanismes participent conjointement à l'augmentation du *degré de consanguinité* noté F. Pour des individus diploïdes, il est calculé comme la probabilité pour un individu de posséder le même allèle sur le locus hérité du père et de la mère. Ce mécanisme aboutit à la diminution du taux d'hétérozygotie. La consanguinité est à l'origine des diminutions de performances d'une population en élevage. En effet, lorsque qu'un individu devient homozygote, les allèles délétères récessifs présents à l'état hétérozygote dans la population sauvage se retrouvent exprimés. Pour estimer la diversité génétique d'une population, il est possible de mesurer sa taille génétique efficace, notée N_e . Le N_e correspond au nombre théorique d'individus non apparentés qu'il faudrait trouver dans un schéma de croisement et de contribution idéale pour obtenir la diversité observée (Schéma de croisement idéal = absence d'apparentement, panmixie, égalité de contribution, pas de sélection. Le N_e est un indicateur synthétique de la diversité génétique neutre d'une population. Il peut être estimé:

1. De manière dynamique par l'étude de l'évolution des fréquences alléliques de population en sélection par rapport à une situation initiale donnée.

2. En ne considérant qu'une seule cohorte

a) A l'aide de différentes formules basées sur le succès reproducteurs de reproducteurs non apparentés

b) Par la mesure de déséquilibre de liaison ou d'excès d'hétérozygotie au sein de la population

3. Avec une formule classiquement utilisée (Falconer et Mackay, 1996) :

$N_e = (4*N-2)/(V_k+2)$ avec N nombre total de reproducteurs ayant effectivement participé à la production de la prochaine génération et V_k la variance du nombre de gamètes par individu contribuant à la prochaine génération

4.6 Conséquences des récents progrès en génétique sur la pratique de la sélection

Les avancées dans le domaine de la sélection génétique sont extrêmement rapides depuis les 30 dernières années. Une première opportunité permise par ces progrès a été de pouvoir déterminer la parenté entre individus par leur génome. Une conséquence fondamentale est la

possibilité d'élever dans un même environnement un grand nombre de familles et de s'affranchir des effets de l'environnement contrôlé lors de l'estimation de paramètres génétiques. Cette méthode renforce la précision des estimations et diminue les coûts de maintenance demandés par des plans de sélection où un grand nombre de familles sont élevées séparément. Les premiers *marqueurs génétiques* suffisamment nombreux et polymorphes largement utilisés dans ce but ont été les microsatellites. Ils constituent des séquences d'ADN non codantes contenant un enchaînement de nucléotides répétés avec un fort polymorphisme. Cette caractéristique leur permet de pouvoir différencier les individus d'une population dès lors que quelques microsatellites sont connus sur le génome (Encadré 6). Ils ont été très utilisés en aquaculture pour permettre de déterminer la parenté des individus (Slabbert et al., 2009; Vandeputte et Haffray, 2014). Le deuxième type de marqueurs utilisés sont les Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Ils correspondent à des polymorphismes issus de la variation d'un nucléotide et présentent l'avantage d'être extrêmement nombreux sur le génome (plusieurs millions de SNP possibles sur le génome humain). Ils ont, par conséquent, une puissance d'assignation plus grande même s'ils sont moins polymorphes dès lors que plus de 50 SNP sont connus sur le génome. Les SNP sont les marqueurs les plus utilisés actuellement (Holman et al., 2017; Lapègue et al., 2014; Valenzuela-Munoz et al., 2013; Vandeputte et Haffray, 2014). Ce très grand nombre de SNP permet de détecter des locus majeurs appelés QTL, c'est-à-dire des locus qui ont un effet significatif sur la performance d'un caractère. Enfin, lorsqu'un ensemble de marqueurs est connu sur tout le génome (700 000 pour la vache), les SNP permettent d'estimer des valeurs génétiques des individus, non plus sur des performances mesurées, mais sur la présence ou l'effet moyen d'un très grand nombre de marqueurs génétiques. On parle alors de *sélection génomique*. Ce type de sélection nécessite la mise en place d'un nombre très important de marqueurs génétiques c'est-à-dire de polymorphismes détectables sur l'ADN et la constitution d'une large population de référence, génotypée et phénotypée pour les caractères qui doivent être améliorés. Ce prérequis implique un très gros effort de R&D et explique pourquoi ce type de sélection n'est pas encore présent dans la majorité des plans de sélection de la jeune filière aquacole.

Etant donné que la sélection génomique ne nécessite plus la mesure de performance sur l'individu, elle permet de réduire considérablement l'intervalle de génération et donc d'augmenter la vitesse du progrès. Les progrès en génétique en terme de détection de marqueurs et de diminution de coûts de génotypage sont tels que la capacité de phénotypage peut être aujourd'hui considérée comme le paramètre limitant de l'étude des relations entre phénotypes

et géotypes (Monget et Le Bail, 2009). Ce constat renforce l'intérêt d'études développant des méthodes de phénotypage précises, rapides, répétables et peu chères.

Encadré 5 : La détection de marqueur SNP dans le génome et son utilisation pour l'assignation d'apparenté

L'établissement d'un jeu de marqueurs SNP comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, il faut identifier les polymorphismes au sein d'une population. Cette identification suppose le séquençage d'individus représentatifs de la diversité de la population d'élevage et peut être réalisée aussi bien sur de l'ADN que sur de l'ARN. Une méthode de séquençage haut débit couramment utilisée est la méthode Illumina. Elle utilise l'enregistrement de signaux fluorescents spécifiques à chacune des bases lors de la synthèse de brins d'ADN complémentaires aux brins des individus prélevés. Le séquençage produit plusieurs dizaines de millions de séquences d'environ 200 paires de base appelées « short reads ». A l'aide de logiciels bio-informatiques, ces morceaux peuvent être assemblés par homologie pour former des contigs entre 300 et 10000 PB sur lesquels plusieurs millions de SNP peuvent être identifiés. La dernière étape d'identification correspond à un tri de qualité sur ces SNP. Seules les mutations bi-alléliques sont conservées. Les marques doivent être informatives, c'est-à-dire qu'elles doivent pouvoir discriminer les individus. Un tri peut donc être fait sur la fréquence allélique minimum (MAF). Pour pouvoir amplifier efficacement des SNP, il est aussi intéressant de sélectionner des marqueurs présentant des zones flanquantes non polymorphes (zones de 50 paires de base qui entourent les marqueurs).

Enfin, lorsqu'un jeu de marqueurs SNP est constitué et répond à ces critères, il peut être utilisé pour permettre une assignation de parenté. Lorsque les allèles aux marqueurs des reproducteurs ayant constitué la cohorte sont connus, chaque individu de la population doit avoir un allèle de son père et un allèle de sa mère pour chaque locus. Deux méthodes et de nombreux logiciels existent pour l'assignation d'apparenté. La méthode d'exclusion consiste à exclure tous les individus dont un allèle n'est pas commun avec l'individu étudié. Bien que très efficace, cette méthode est très sensible aux erreurs de génotypage. La deuxième méthode qui se base sur la maximisation de vraisemblance, permet d'attribuer les couples de parents les plus probables parmi l'ensemble des couples possibles.

4.7 Différents plans de sélection génétique

Les sélectionneurs ont mis en place un grand nombre de stratégies de sélection en fonction des situations et des objectifs. Six grands types de sélection peuvent être décrits (Tableau 3). Les différentes stratégies de sélection ont été présentées suivant un ordre croissant de complexité. Les trois premiers types de sélection ne nécessitent pas de recueil de traçabilité ou de développement particulier en génétique. Ils reposent sur différentes organisations au sein de l'élevage. La sélection massale est très souvent le premier type de sélection mis en place dans un élevage de par sa simplicité. Ce type de sélection, bien que très efficace, ne permet cependant pas d'améliorer un caractère qui ne s'exprime pas pour les candidats à la sélection. De plus, il n'est pas possible d'utiliser ce type de sélection pour les critères dont la mesure est invasive. La sélection massale est également peu efficace pour les caractères dont l'héritabilité est inférieure à 0,2 et ne permet pas de contrôler la consanguinité. Pour répondre à ces limites, des plans de sélection familiale ont été mis en place en aquaculture avec l'objectif de constituer

des populations résistantes à des maladies d'élevage (Gjedrem et Baranski, 2009). Les plans de sélection familiale ont été rendus possibles dans des filières organisées avec des infrastructures importantes. Les valeurs génétiques de famille y sont donc constituées par l'intermédiaire de la moyenne de performance des individus qui la composent. Cependant, malgré de gros efforts de standardisation, l'élevage séparé des familles génère inévitablement une influence de l'environnement qui biaise les performances mesurées. En présence d'environnement commun, la ressemblance des individus d'une même famille élevée dans un même environnement est surestimée. L'héritabilité est donc surestimée. Lorsque l'effet de l'environnement commun est pris en compte, en expliquant une part importante de la variabilité des performances de la population, il diminuera l'héritabilité et donc la qualité d'estimation de la valeur génétique individuelle. La sélection familiale est aussi extrêmement coûteuse, ce qui explique les investissements consentis pour le développement de marqueurs génétiques. En fonction des situations, il est possible de réaliser une sélection combinée entre une sélection massale et familiale, où les meilleurs individus des meilleures familles sont sélectionnés. Cette sélection est souvent la plus efficace (Falconer et Mackay, 1996). Plus l'héritabilité et l'effet de l'environnement communs sont faibles, plus la sélection familiale est efficace. Plus ces paramètres sont forts, plus la sélection intrafamiliale est intéressante (Gjedrem et Baranski, 2009).

Tableau 3 : Les différents types de sélection utilisés en élevage

Type de sélection	Principe	Avantages pour le sélectionneur	Désavantages pour le sélectionneur
Sélection massale	Sélection de caractères sur les performances individuelles	Simple, faible coût	Risque de trade-off et de perte de diversité, voire de consanguinité. Ne fonctionne que si $h^2 > 0,2$
Sélection intrafamiliale	Sélection massale avec subdivision d'une génération en plusieurs familles ou cohortes	Diminution du risque de consanguinité	Effort de traçabilité supplémentaire pour l'élevage séparé de plusieurs groupes par génération
Sélection familiale	Sélection sur les performances familiales	Précis, progrès possible avec $h^2 < 0,2$, Permet un contrôle de la consanguinité, permet d'améliorer des caractères dont la mesure est invasive ou non exprimée chez les candidats	Coûts importants pour maintenir les familles, confusion possible entre structure d'élevage et valeur génétique de la famille si aucun marqueur n'est disponible pour un élevage en mélange -50 % du progrès potentiel vs massale
Sélection massale avec empreintes génétiques	Sélection sur les performances individuelles	Maîtrise de la consanguinité par connaissance des pédigrées et optimisation des croisements, possibilité de sélectionner sur des caractères létaux ou non exprimés par l'intermédiaire de challenge sur apparenté	Coût de génotypage important en R&D et en routine

Sélection généalogique	Sélection sur la synthèse des performances des générations connues, indexation généalogique BLUP	Accès direct à la valeur génétique après phénotypage de la descendance de l'animal. Maximisation du progrès et intégration de caractères létaux estimés sur des apparentés	Besoin d'un historique des croisements (généalogie) sur plusieurs générations
Sélection génomique	Sélection sur la base d'informations génomiques	Précis et rapide car il est possible de connaître la valeur génétique des individus à la naissance avec une bonne précision	Coût très élevé de génotypage et en R&D

En agriculture terrestre, la sélection généalogique a été employée car il est relativement facile d'identifier dès la naissance les descendants de croisement. Aujourd'hui, la sélection génomique la supplante progressivement pour un nombre croissant d'espèces. Elle présente l'immense avantage de réduire l'intervalle de génération à moins de 3,5 ans alors qu'elle était de 7 ans pour les bovins laitiers par exemple.

La mise en place d'un programme de sélection génétique pour une filière est un investissement lourd qui ne génère des profits que sur le long terme. Cet investissement peut être sécurisé par la connaissance de paramètres génétiques de la population prise dans l'environnement de sélection. Un point important est la définition des objectifs de sélection. Ce point nécessite une bonne compréhension des élevages considérés et des coûts de production associés. Une méthodologie aujourd'hui conseillée est d'avoir une approche multicritères pour permettre un progrès continu et une bonne gestion de la consanguinité. La sélection génétique permet des gains de productivité importants. Ces gains sont d'autant plus intéressants qu'ils sont cumulatifs au cours des générations et que l'aquaculture travaille le plus souvent avec des populations sauvages peu adaptées au contexte d'élevage. Ces gains expliquent la mise en place croissante de ces programmes dans toutes les filières aquacoles.

5. Sélection génétique en aquaculture : le cas particulier de l'halioticulture

Les premières données de sélection intentionnelle pour les espèces domestiques terrestres, avec des suivis de pédigrées dateraient des années 1700 (Gautier, 1990). La sélection aboutit à une spécialisation des animaux domestiques et à la création de races. Les premiers critères de sélection portaient principalement sur la morphologie et la robe, définissant ainsi une race donnée. Seuls les individus portant ces caractères étaient retenus pour la reproduction. En aquaculture, les premières publications présentant des plans de sélection datent des années 1920. Même si cette pratique de production est assez récente, elle présente une histoire qui suit les évolutions technologiques du siècle dernier. Dans les faits, la sélection intentionnelle de la plupart des espèces aquacoles produites n'a débuté que dans les années 1960. Cette partie présentera les différents progrès qui en résultent.

5.1 Différents plans de sélection et résultats en aquaculture

5.1.1 Sélection chez les poissons

Les premiers plans de sélection massale ont été mis en place chez les poissons dès l'après-guerre pour améliorer la croissance mais ont abouti à des résultats variables. En effet, le faible nombre de reproducteurs utilisés dans la constitution des populations de base a rapidement eu pour conséquence l'émergence d'une dépression de consanguinité (Gjedrem, 2000). En 1970 en Norvège, des investissements publics importants ont permis la mise en place d'un premier plan de sélection familiale chez le saumon, sur une base génétique large avec la production en élevage séparé de 200 familles par an. Ce programme a apporté un progrès génétique et le saumon est devenu une espèce emblématique permettant de démontrer les gains possibles de la sélection en aquaculture (Gjedrem, 2000; Gjedrem et Baranski, 2009). La sélection familiale était d'abord concentrée sur la croissance et s'est ensuite diversifiée sur des caractères de résistance, de maturité tardive et de qualité de la chair (Gjedrem et Baranski, 2009). Sur 6 générations, le progrès moyen de croissance était compris entre 12 et 14% de gain de croissance en poids par génération. Sur la base de ces résultats, des plans de sélection familiale ont été implémentés sur d'autres poissons comme la truite, la carpe, le tilapia, avec également un gain de croissance en poids compris entre 10 et 20% par génération. Ces gains sont continus, cumulatifs et de moins en moins variables aux cours des générations (Gjedrem et Baranski, 2009). Enfin, la croissance a pu être améliorée chez les poissons conjointement à

des résistances aux maladies d'élevage puisque des corrélations génétiques positives existent entre la croissance et la résistance aux maladies (Gjedrem et Baranski, 2009). Un avantage de cette sélection familiale a été la possibilité d'une sélection par challenges bactériens ou dissections d'apparenté. L'âge de la première maturité sexuelle étant variable pour la plupart des poissons, une sélection a pu être conduite sur ce caractère (Wild et al., 1994). Ainsi chez le saumon, une approche familiale de la sélection a permis de retarder la maturité sexuelle des animaux. L'évolution de ce caractère doit être contrôlée puisque la maturité précoce est corrélée génétiquement avec la croissance et qu'elle génère une diminution d'énergie allouée à la croissance (Gjerde et al., 1994). Enfin chez les poissons carnivores, l'alimentation représente entre 50 et 80% des coûts de production. Un résultat très important de la sélection sur la croissance au niveau familial est l'amélioration induite de l'efficacité alimentaire de familles sélectionnées à raison de 3,5% par génération (Gjedrem et Baranski, 2009). Des méthodes de mesures de l'efficacité alimentaire sur les individus sont en cours de recherche. L'existence d'une variabilité individuelle permet d'envisager une sélection directe sur ce caractère pour obtenir des gains plus importants (Verdal et al., 2017).

En France, une autre méthode a été proposée pour éviter les coûts des structures imposés par la sélection familiale séparée. Cette méthode appelée PROSPER a été mise en place dans les années 1990 (Chevassus et al., 2004). Elle correspond à un système de sélection massale et propose une réponse intégrée aux différentes causes d'échecs identifiés sur les premiers plans de sélections massales développés par la filière (taille génétique trop faible, influence de l'environnement d'élevage sur les performances, effets maternels non contrôlés, effets des interactions sociales (Su et al., 1996)). La méthode PROSPER repose sur la sélection d'individus par groupe d'élevage accompagnée d'un tri successif en différentes classes de taille et d'un contrôle de la reproduction (utilisation d'un nombre de reproducteurs supérieurs à 100 reproducteurs efficaces par génération et réalisation de plans de croisement factoriels complets). Cette méthode a permis des gains compris entre 10 et 20% du poids par génération sur la truite fario (*Salmo trutta*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ces progrès importants ont été rendus possibles par l'application de pressions de sélection cumulées importantes (inférieures à 2% sur 4 générations). La limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas l'amélioration de caractères non exprimés chez les candidats à la sélection. De même elle ne permet pas l'amélioration de caractère dont le phénotypage est léthal (Chevassus et al., 2004).

Aujourd'hui en Europe la truite, le saumon, le bar, la dorade et le turbot sont les principales espèces de poissons en sélection. L'utilisation de marqueurs moléculaires permet

d'améliorer une large gamme de caractères pour des familles élevées en mélange. Le contrôle de la diversité génétique est assurée par assignation de parenté et optimisation des croisements (Vandeputte et Haffray, 2014). Chez les poissons, les capacités de marquage précoce et de phénotypages multicritères deviennent alors les facteurs limitants du progrès génétiques des populations exploitées. De gros efforts de R&D sont actuellement réalisés pour la construction de puces génétiques à haute densité pour le saumon en Norvège (50 000 marqueurs sur le génome) (Lillehammer et al., 2013). Le passage à la sélection génomique est envisageable dans un futur proche lorsque les puces et les populations de référence seront constituées. Cependant, l'intérêt de cette technologie pourrait être moindre en aquaculture par rapport à la production animale terrestre. En effet, les intervalles de génération courts, et les fortes pressions de sélection déjà appliquées en sélection génétique aquacole pourraient réduire les avantages comparatifs de la sélection génomique par rapport à une sélection massale assistée par marqueurs (Sonesson et Meuwissen, 2009).

5.1.2 Sélection chez les mollusques

Les résultats de sélection sur les poissons ont entraîné un intérêt de sélection pour les mollusques bivalves (huîtres, moules, pectinidés, palourdes...). Pour les bivalves, la sélection à large échelle est plus récente que pour les poissons puisqu'elle date des années 2000 (Boudry et al., 1997). Ce retard peut être expliqué par le fait que les populations étaient principalement constituées de naissains captés dans le milieu naturel et issus de la reproduction d'individus sauvages. De plus, pour améliorer la résistance aux agents pathogènes d'élevage ou améliorer la production des populations exploitées, les conchyliculteurs ont d'abord opté pour des stratégies d'introduction de nouvelles espèces, de manipulations cytogénétiques ou d'hybridations (Boudry et al., 1997). Depuis les années 1980, les écloséries se développent avec le principal avantage de pouvoir produire du naissain calibré avec des volumes de production moins impactés par les aléas environnementaux annuels. L'amélioration génétique est donc devenue possible et augmente de manière cumulative l'avantage concurrentiel du naissain d'écloserie par rapport au naissain capté (Dégremont et al., 2010a). Pour les huîtres, et en particulier *Crassostrea gigas* qui est la première espèce aquacole au monde en tonnage, une augmentation de production de 10% a été obtenue en une génération de sélection familiale en s'appuyant sur une sélection basée sur la croissance et la mortalité (Langdon et al., 2003). Plusieurs travaux montrent aussi des réponses à la sélection sur la survie des agents pathogènes avec des héritabilités réalisées supérieures à 0,5 dès la première génération (Dégremont et al., 2010a). Même si les performances de survie observées en laboratoire sont reliées à des

performances sur le terrain, il a été montré que l'environnement avait un impact plus important sur les réponses à la sélection que pour les poissons. Il est donc important pour les mollusques bivalves d'étudier les relations entre les génotypes et les différents environnements (Dégremont et al., 2010b). Si les variabilités environnementales étudiées ne changent pas l'ordre des valeurs génétiques des familles en sélection, elles peuvent cependant avoir un effet sur le sens de certaines corrélations génétiques au sein d'une population (Ernande et al., 2004). Ces mécanismes pourraient être liés à une grande plasticité phénotypique chez les bivalves marins.

Les pectinidés semblent aussi très bien répondre à la sélection avec un potentiel de progrès de 16% par génération sur le poids total à un an (Ibarra et al., 1999). La nature de la population considérée semble cependant déterminante, des populations avec une trop faible taille génétique pouvant rendre inefficace la sélection (Zheng et al., 2004). De même, des héritabilités encourageantes ont été estimées sur la croissance pour différentes espèces de moules dès le stade naissain (Toro et al., 2004) et sur la taille, la forme et le rendement en chair à 1 an avec un potentiel de gain de poids de 10% par génération (Nguyen et al., 2014).

En raison de leur importance économique, les ormeaux sont les principaux gastéropodes marins soumis à la sélection. Les résultats de sélection sont contrastés selon les espèces et les populations étudiées. Les gains espérés sur le poids peuvent être quasiment nuls (Kube et al., 2007) ou de d'ordre de 15 à 20% de progrès à chaque génération (Brokordt et al., 2014). Cette différence de résultats peut s'expliquer par un fort impact des méthodes d'élevage sur les performances réalisées.

5.1.3 Sélection aquacoles pour les crustacés

Les résultats sont plus contrastés pour les crustacés (Gjedrem et Baranski, 2009). Chez les crevettes, une corrélation génétique négative entre la résistance à une maladie virale WSSV (White Spot Syndrome Virus) et la croissance réduit les gains possibles lors d'une sélection conjointe sur la croissance et la survie (entre 4 et 6% de progrès par génération) (Gitterle et al., 2007). De manière intéressante, une corrélation génétique positive entre la survie et la croissance a été trouvée dans une autre expérience sur la même espèce (*P. vannamei*) montrant que l'efficacité d'une sélection multicritères peut être dépendante d'une population, de l'environnement et du système de production (Gitterle et al., 2005).

Conclusion :

Lorsqu'une population sauvage est utilisée pour l'élevage, elle est souvent peu adaptée aux conditions d'élevage. Cette mauvaise adaptation peut s'expliquer par des conditions très différentes entre le milieu sauvage et le milieu d'élevage. L'environnement d'élevage est caractérisé par un apport alimentaire spécifique, la répétition de stress dus aux pratiques de production, la présence de l'homme, de plus fortes densités de population et des températures plus élevées (Travers, 2008). Ces conditions conduisent dans un premier temps à du gaspillage alimentaire, des productivités faibles et l'apparition de maladies nouvelles limitant la rentabilité des exploitations aquacoles (Gjedrem et Baranski, 2009). Même si une variabilité de réponse à la sélection existe en fonction des espèces, des augmentations de performances peuvent être accomplies rapidement. Globalement les différents programmes de sélection aquacole génèrent 10 à 15% d'amélioration de la croissance par génération. La résistance aux maladies d'élevage peut être elle aussi améliorée avec 10% de survie supplémentaire par génération (Gjedrem et Baranski, 2009).

Les résultats de la sélection aquacole sont supérieurs à ce qui est aujourd'hui communément observé chez les animaux terrestres pour lesquels les progrès sont de 1 à 5% par génération. Ceci s'explique par trois différences majeures qui caractérisent la majorité des populations aquacoles (Gjedrem et Baranski, 2009) :

1. Une grande fécondité sur les deux sexes qui permet d'exercer une pression de sélection plus importante (entre 1 et 10% pour les espèces aquacoles contre par exemple 20% chez les mères à taureau et 5% sur les pères)
2. Des variabilités phénotypiques et génétiques plus importantes sur les caractères de croissance car la plupart des populations exploitées sont issues récemment du milieu sauvage, et que l'essentiel des populations est constitué d'une base génétique large (CV de 20 à 30% sur le poids à un âge donné contre CV de 7 à 10% pour les animaux d'élevage terrestres pour des caractères similaires).
3. Une bonne précision et une relative facilité pour effectuer le phénotypage lorsqu'il s'agit de mesurer le poids ou la taille des individus à l'issue d'une période d'élevage.

La plus grande difficulté de la sélection aquacole est la capacité de marquage précoce et l'établissement de pédigrée. Les innovations en génétique comme le développement de marqueurs SNP permettent de répondre à ces problèmes et donc réaliser un phénotypage de plus en plus précoce (Vandeputte et Haffray, 2014). Une limite au niveau de la diffusion du

progrès génétique réalisé par les sélectionneurs reste la grande diversité des modes d'élevage et d'environnement des différentes populations exploitées. Cette diversité impacte de manière différentielle les résultats de sélection avec des interactions génétique-environnement pour l'instant réduites mais potentiellement problématiques (Gjedrem et Baranski, 2009).

5.2. Sélection en halioticulture

A l'échelle du développement aquacole, la sélection en halioticulture a démarré récemment. Des plans de sélections massales ont été développés à la fin des années 90 (Elliott, 2000) et ce n'est que depuis 2006 que les premiers plans de sélections familiales assistés par empreintes génétiques ont été lancés (Lucas et al., 2006). Ce contexte permet à l'halioticulture de tirer profit des expériences accumulées sur les différents programmes de sélection des autres industries aquacoles (Rhode et al., 2014).

5.2.1 Différents résultats de sélection spécifique à l'ormeau

Peu de comparaisons entre populations sélectionnées et populations non sélectionnées ont été réalisées sur l'ormeau (Tableau 4). Ce faible nombre de publications s'explique à la fois par le caractère récent de la mise en place des plans de sélection et par la nature confidentielle des programmes de sélection mis en place par des producteurs en concurrence. Les travaux publiés mettent en évidence que seule la croissance en taille ou en poids, et la survie ont été améliorées. En Chine, sur 4 générations, un progrès cumulatif et constant a été observé (Liu et al., 2015a). Les résultats d'un plan de sélection sont aussi dépendants de la population initiale : la constitution d'une population de base très diverse apporte de meilleurs résultats qu'une population élevée depuis plusieurs générations en cycle fermé (You et al., 2010b). En Afrique du sud, une génération de sélection familiale sur le poids n'a généré aucun gain. Une approche combinée de sélection interfamiliale et intrafamiliale serait plus pertinente en raison du fort impact de l'environnement commun sur les performances de familles élevées en bassins séparés (Michel Joubert, pers. com). L'utilisation de marqueurs pour l'assignation de parenté et l'élevage des candidats à la sélection dans un environnement commun se généralisent dans différents pays producteurs comme l'Afrique du Sud (Rhode et al., 2014; Slabbert et al., 2009), l'Australie (Lucas et al., 2006), la Corée du Sud (Kang et al., 2011) et la Nouvelle Zélande (Camara et Symonds, 2014). Les premiers travaux ont permis la détection de QTL pour la croissance mais nous ne disposons pas d'informations pour savoir s'ils sont réellement utilisés en sélection (Baranski et al., 2008).

Tableau 4 : Réponses à la sélection pour différents populations d'ormeaux

Espèces	Caractères sous sélections	Méthode	Pression appliquée	Gains observés par génération	Références
<i>Haliotis rufescens</i>	Poids à 4 ans	Sélection familiale en élevage séparé	3%	+ 15 à 20%	(Elliott, 2000)
<i>Haliotis diversicolor</i>	Taille à 2 ans et survie familiale	Sélection sur index combinant la valeur familiale pour la survie et la taille de l'individu à 2 ans. Elevage séparé jusqu'à 4 mois puis marquage et élevage en mélange	5%	+ 9% pour la taille + 4% pour la survie	(Liu et al., 2015a)
<i>Haliotis diversicolor</i>	Taille à 1 an	Sélection massale sur la taille puis élevage séparé pendant 1 an	10%	+ 13%	(You et al., 2010b)

Tout comme pour certains bivalves marins, il est important de préciser qu'en parallèle des progrès réalisés en sélection génétique, des progrès ont été réalisés par des manipulations cytogénétiques et la création d'hybrides. De nombreux travaux sur la constitution de populations d'ormeaux triploïdes ont été réalisés par blocage du premier ou du deuxième globule polaire par augmentation brutale de pression ou par induction chimique (Caffeine, Cytochalasin B, 6-DMAP) dans les années 90 (Elliott, 2000) pour *Haliotis rubra* (Liu et al., 2009), *Haliotis laevigata* (Dunstan et al., 2007) et *Haliotis midae* (Stepto et Cook, 1998). La plupart des travaux comparant les ormeaux triploïdes aux ormeaux diploïdes ne montrent pas de gain de croissance liés à la triploïdisation. Ces populations triploïdes ne sont actuellement pas utilisées en production. Un avantage des ormeaux triploïdes est qu'ils possèdent un taux de chair plus élevé en été, ce qui peut avoir une importance économique majeure sur des productions d'ormeaux en conserve. Ainsi, une meilleure croissance en taille de 10 à 20% des triploïdes a été observée sur la dernière année de production pour *Haliotis discus hannai* (Okumura et al., 2007). La triploïdisation pourrait donc avoir une utilité pour les espèces pour lesquelles la croissance et la taille de vente sont fortement impactées par le développement gonadique estival. Des hybrides de différentes espèces sont aussi produits dans plusieurs pays. C'est le cas en Australie où le croisement entre *Haliotis laevigata* et *Haliotis rubra* a permis la constitution de populations plus adaptées à l'environnement d'élevage, avec des croissances rapides et des investissements reproductifs plus faibles (Evans et al., 2000). De même, en Chine, une part de la production repose sur des espèces hybrides plus tolérantes aux températures élevées du sud de la Chine avec des croisements entre *H. discus hannai* et *H. fulgens*, ormeaux du pacifique et de la côte nord-américaine respectivement (You et al., 2015), ou bien entre *H. discus hannai* et *H. gigantea* une espèce japonaise (Luo et al., 2013). Malgré l'efficacité de ces méthodes, l'aspect non cumulatif du progrès qu'elles génèrent a pour conséquence une faible

utilisation dans tous les autres pays producteurs. L'amélioration génétique d'hybrides nécessite de travailler sur l'amélioration de deux lignées séparées et des systèmes d'évaluation rétroactifs complexes pour estimer la valeur des croisements (Falconer et Mackay, 1996).

5.2.2 Estimations de paramètres génétiques chez l'ormeau

Depuis la fin des années 90, de nombreux travaux ont été réalisés pour estimer l'héritabilité de caractères d'intérêt économique chez les ormeaux d'élevage (Tableau 5). Bien que variables, les résultats sont globalement encourageants puisque sur 12 publications, 9 travaux sur 7 espèces différentes décrivent des héritabilités supérieures à 0,3 pour la taille ou le poids des animaux commercialisables. L'héritabilité quasi nulle trouvée par (Kube et al., 2007) est expliquée par un nombre trop faible de familles et la présence d'une forte variabilité environnementale en phase de nurserie réduisant les possibilités d'observations précises d'une variabilité génétique additive. Ces estimations d'héritabilité rendent *a priori* possible un progrès génétique par sélection massale (Gjedrem et Baranski, 2009). Les héritabilités sont croissantes avec l'âge, et ceci pour deux raisons principales : la variabilité de la croissance sur des stades adultes est composée d'une plus large variance génétique additive, et il est plus facile de réduire les effets de micro-environnement sur le grossissement qu'en nurserie (Farías et al., 2017). Une corrélation génétique élevée a aussi été mise en évidence entre le poids de vente et le poids de juvéniles en pré-grossissement (Jonasson et al., 1999). Le classement des valeurs génétiques des individus pour deux âges différents est conservé pour un facteur 5 d'accroissement de poids. Cela rend possible une sélection précoce et une réduction de l'intervalle de génération qui peut être long (plus de 3 ans) pour certaines espèces comme *H. rufescens*, ou *H. iris* qui ne sont pas matures avant 3 ans (Camara et Symonds, 2014; Jonasson et al., 1999). Les gains d'une telle stratégie ont été modélisés et soulignent l'importance de détection de QTL associés à la croissance pour favoriser une sélection encore plus précoce (Hayes et al., 2007). Un autre point commun entre les différents travaux est la forte corrélation génétique existant entre la taille, la largeur de la coquille et le poids total de l'individu (Jonasson et al., 1999; Liu et al., 2015b; Lucas et al., 2006). Ceci rend possible une amélioration conjointe de la taille et du poids indépendamment du caractère phénotypé, ce qui n'est pas toujours le cas en aquaculture (Ibarra et al., 1999).

Tableau 5 : Liste des différents travaux publiés proposant une estimation d'héritabilité pour une performance en élevage

Espèces	Méthode	Nombre de familles	Caractères aux âges étudiés en mois (Héritabilité, *=0 exclu de l'intervalle moyenne ± 2 écarts types)	Corrélations génétiques sur performances étudiées à différents stades	Références
<i>Haliotis rufescens</i>	Elevage séparé entre 4 et 10 mois pour atteindre 15 à 20 mm puis marquage et prélèvement avant un élevage en mélange et utilisation d'un modèle AS-Remel pour estimation des paramètres génétiques	100	Taille 8 (0,08), 10 (0,06), 18 (0,27*), 24 (0,34*) mois	Rg=0,9 entre taille 18 mois (10g) et taille 24 mois (20g) Rg=0,2 entre taille 10 mois (1g) et taille 24 mois (20g)	(Jonasson. J., 1999)
<i>Haliotis rufescens</i>		64	Poids 27 (0,07), 31 (0,15), 35(0,09), 39 (0,74* ^a), 43 (0,64*), 47 (0,59*) 51 (0,49*) mois	Rg=0,9 entre poids à 31 mois (18g) et 51 mois (60g) idem taille et largeur	(Brokordt et al., 2014)
<i>Haliotis rufescens</i>		50	Taille 32 (0,33*) 42 (0,30*) 48 (0,46*) mois Poids 32 (0,34*) 42 (0,40*) 48 (0,53*) mois	NA	(Fariás et al., 2017)
<i>Haliotis diversicolor</i>		533	Taille à 4 mois (0,11*), 12 mois (0,17*) Survie familiale 12 mois (0,07*)	Rg=0,6 entre taille à 4 mois (17 mm, 0,9) et 12 mois (60 mm, 28g)	(Liu et al., 2015a)
<i>Haliotis laevigata</i>		17	Poids 21 (0), 27(0) et 39 (0,1) mois	NA	(Kube et al., 2007)
<i>Haliotis iris</i>		43	Poids à 17 (0,47*), 22 (0,39*), 41 (0,37*) mois	Rg=0,83 entre le poids à 22 mois (12g) et 41 mois (51 g)	(Camara et Symonds, 2014)
<i>Haliotis midae</i>		24	Poids à 62 mois (0,20*) Taille à 62 mois (0,48*)	NA	(Gerber, 2013)
<i>Haliotis laevigata</i>		24	Poids à 24 mois (0,46* ^a) Taille à 24 mois (0,42* ^a)	NA	(Robinson et al., 2013)
<i>Haliotis midae</i>	Méthode identique à la précédente avec l'utilisation d'une famille comme référence pour estimation de l'effet lot dans les différentes structures de grossissement	116	Poids 21 (0,06*), 29 (0,11*), 34 (0,19*), 41(0,20*), 48(0,21*) mois	NA	(Difford et al., 2017)
<i>Haliotis diversicolor</i>	Elevage en familles séparées et évaluation des effets père et mère par des croisements intra père et intra mère	36	Taille 4 (0,22*), 10 (0,26*), 14 (0,23*), mois Poids 10 (0,38*), et 14 (0,29*) mois	NA	(You et al., 2010a)
<i>Haliotis asina</i>	Elevage mélangé après la phase larvaire et assignation par empreintes génétiques (As-Remel)	84	Taille à 12 mois (0,48*), Poids à 12 mois (0,36*)	NA	(Lucas et al., 2006)
<i>Haliotis tuberculata</i>	Elevage de pleins frères dans un environnement séparé: Héritabilité au sens large	10	Taille à 24 mois (0,37*) Poids à 24 mois (0,40*) Couleur coquille à 24 mois (0,30*)	NA	(Roussel et al., 2013)

^a biais car absence d'effet environnement commun dans le modèle

La méthodologie dominante pour l'estimation de paramètres génétiques est l'élevage en familles séparées jusqu'à ce que les individus atteignent une taille où ils peuvent être marqués par un tip-tag collé sur la coquille. Les ormeaux sont ensuite élevés en mélange. Cette méthode permet de réduire l'impact de l'environnement commun sur les performances des individus. Cette réduction n'est que partielle puisqu'un effet d'environnement commun non génétique explique toujours une forte partie de la variabilité des performances même deux ans après un élevage en mélange (Brokordt et al., 2014). De plus, la qualité de l'élevage, en particulier la nutrition en nurserie, a des conséquences à long terme sur les performances en grossissement

des ormeaux (Viera et al., 2011). L'environnement commun tend à réduire les héritabilités lorsqu'il est pris en compte dans le modèle et tend à les surévaluer lorsqu'il en est retiré. Dans ce cas, une confusion d'effets apparaît dans la ressemblance d'individus apparentés qui est imputable à la fois à une cause génétique et à leur présence dans un environnement commun en nurserie (Brokordt et al., 2014). Une étude met en avant l'intérêt de l'utilisation de marqueurs génétiques pour élever les différentes familles dans un environnement commun et confirme les fortes héritabilités trouvées dans les travaux précédents (Lucas et al., 2006). Plusieurs publications sur différentes espèces montrent que l'assignation de parenté par microsatellites est possible chez l'ormeau ; cette méthodologie est aujourd'hui conseillée (Roodt-Wilding et Slabbert, 2006; Van den Bergb et Roodt-Wilding, 2010). Enfin, il semblerait que les interactions génétique-environnement soient faibles pour l'ormeau (Difford et al., 2017; Farías et al., 2017). Ce facteur reste néanmoins à surveiller au cours des générations de sélection qui aboutiront inévitablement à une spécialisation des populations (Farías et al., 2017).

De manière cohérente avec ce qui est fait en aquaculture, une faible diversité de caractères a été étudiée pour l'ormeau. Certains travaux montrent cependant l'existence d'héritabilité pour d'autres caractères ayant une potentielle valeur économique et sur des caractères comportementaux ou physiologiques (Tableau 6). La lecture de ces travaux montre clairement que l'existence de méthodes de phénotypage précises, répétables et peu coûteuses sont les principaux facteurs limitants associés à ces estimations. Les estimations d'héritabilité ci-dessous nous montrent qu'une amélioration des caractères comportementaux ou physiologiques semble peu probable. En revanche l'existence d'une variabilité génétique additive est claire, et pourrait expliquer les évolutions comportementales et physiologiques liées aux processus de domestication et présentées en partie 1.

Tableau 6 : Estimation d'héritabilité sur des caractères innovants

Espèces	Nombre de familles	Caractères aux âges étudiés en mois (Héritabilité, *=0 exclu de l'intervalle moyenne \pm 2 écarts types)	Corrélations génétiques entre différents caractères	Références
<i>Haliotis midae</i>	64	Poids de chair à 62 mois (0,15*) Poids après processus de mise en conserve (0,21*) Rendement de mise en conserve% (0,08*)	Caractères reliés au poids total (0,86<r<0,98*) Poid total et rendement en chair (r=-0,11)	(Camara et Symonds, 2014)
<i>Haliotis iris</i>	43	Rendement en chair à 47 mois (0,33*) Rendement en chair sans sang à 47 mois (0,31*) Couleur du pied à 47 mois (0,58*)	NA	(Camara et Symonds, 2014))
<i>Haliotis rufescens</i>	60	Concentration intra-cellulaire HSP70 à 27 mois (0,09*) Concentration extra-cellulaire HSP70 à 39 mois (0,06*)	NA	(Brokordt et al., 2015)
<i>Haliotis discus hannai</i>	31	Consommation de dioxygène (0,16*) Excrétion ammoniacale (0,08*)	O/N relié à l'excrétion ammoniacale	(Winkler et al., 2007)
<i>Haliotis laevigata</i>	24	Distance parcourue après un stress de prélèvement d'épipodes (0,07*)		(Robinson et al., 2013)

5.3 Gestion de la diversité génétique dans les écloséries d'ormeaux

Une augmentation trop rapide de la consanguinité en élevage n'est pas souhaitable puisqu'elle engendre des effets délétères sur les performances d'élevage (Rauw et al., 1998). Pour limiter celle-ci, le facteur déterminant sur lequel il est possible d'agir est la quantité de reproducteurs utilisés en sélection (Dupont-Nivet et Vandeputte, 2011). Ceci est d'autant plus vrai en aquaculture que, du point de vue des caractéristiques biologiques de reproduction, la majorité des espèces élevées présentent une forte prolificité pour les deux sexes et que seuls quelques reproducteurs peuvent suffire au renouvellement d'une population. Une autre particularité biologique est la forte variance du succès reproducteur d'animaux aquacoles issus d'une même population. Cette forte variance induit un faible rapport N/N_e pour la population d'élevage (Boudry et al., 2002). Le nombre de reproducteurs utilisés ne garantit pas totalement la bonne transmission de la diversité génétique d'une population. Plusieurs précautions comme l'égalisation de la production des femelles et l'absence de compétition spermique permettent de maximiser la transmission de la diversité génétique (Boudry et al., 2002). Il semblerait aussi que le type de croisement effectué joue un rôle important dans la transmission de la diversité et que des croisements factoriels soient plus efficaces que des croisements biparentaux à nombre de reproducteurs équivalents (Dupont-Nivet et al., 2006). Enfin certaines pratiques d'élevage comme le criblage ou l'élimination des queues de lot influencent la transmission de la diversité (Taris et al., 2006).

Malgré une bonne connaissance de ce contexte, la plupart des plans de sélections génétiques d'ormeaux ont abouti à une diminution drastique de la diversité des populations d'élevage (Evans et al., 2004). Alors qu'en Afrique du Sud, à l'issue de la première génération de sélection, aucune perte de diversité génétique n'était observable, le taux d'appariement a augmenté drastiquement en deuxième génération, et le N_e est passé de 470 en F1 à 50 en F2. Cette même cohorte présentait alors 5% de consanguinité (Rhode et al., 2014; Rhode et al., 2012). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que seuls 50% des animaux induits à la ponte y ont contribué efficacement. La phase de conditionnement est déterminante même si aucune expérience spécifique n'a identifié précisément la cause de cette faible représentativité (Slabbert et al., 2009; Van den Bergb et Roodt-Wilding, 2010). Sur deux populations d'élevage australiennes, une perte de diversité allélique a été observée et les N_e estimées étaient de 20 et de 35, ce qui est relativement faible pour des populations constituées par au moins 200 reproducteurs (Evans et al., 2004). Un coefficient de consanguinité de 0,25 aurait pour conséquence une diminution de la survie larvaire et du taux de fécondation mais n'impacterait pas la croissance (Kobayashi et Kijima, 2010). Les effets délétères d'un tel niveau de consanguinité seraient donc limités sur les performances de l'élevage car l'élevage larvaire n'est pas une phase limitante à la rentabilité d'élevage halioticole (Kobayashi et Kijima, 2010). Un travail de modélisation a permis de montrer que ces résultats pouvaient être dus à de simples variations de performance de reproduction en élevage (Dominik et al., 2013). Lorsqu'un programme de sélection est bien dimensionné, le conditionnement et la maîtrise de la reproduction, de l'élevage larvaire et de la fixation sont des points clefs de la transmission du progrès génétiques (Dominik et al., 2013; Taris et al., 2006).

Conclusion

En aquaculture, comme pour les élevages terrestres, plusieurs performances peuvent être améliorées en sélection : croissance, survie, qualité, efficacité alimentaire, rendement en chair (Elliott, 2000). Le poids et la taille étant des mesures précises, rapides et faciles à mesurer, ces caractères sont les principaux sélectionnés en aquaculture. Malgré les résultats observés en sélection, seules 10% des productions aquacoles sont aujourd'hui basées sur des populations issues de programme de sélection (Gjedrem et Baranski, 2009). Ce faible pourcentage est probablement lié au caractère récent des résultats de sélection et à la nécessité de regroupement ou d'investissements publics pour la mise en place de programmes de sélection durables de large envergure. L'observation des différents programmes nous montre que la sélection aquacole s'exerce sur un nombre d'espèces variées et sur un nombre de caractères restreints que sont la croissance, la résistance aux maladies et, en moindre mesure, les rendements en chair. Après une première étape de sélection plutôt mono-caractère, les programmes de sélection sont aujourd'hui essentiellement des programmes multi-caractères. Étant donné que les résultats d'une telle sélection dépendent de l'intensité de sélection appliquée à plusieurs critères, le développement de méthodes de phénotypage efficaces sur de nombreux caractères semble aujourd'hui essentiel. La connaissance des relations phénotypiques et génétiques d'une population est très importante pour permettre aux acteurs de suivre l'évolution de leur population d'élevage et d'ajouter des caractères à leur objectif de sélection.

6. Physiologie et comportement : deux champs d'étude clés pour une optimisation de la performance en élevage

Une sélection multicritères permet une évolution mieux maîtrisée de la population d'élevage et un meilleur maintien de sa diversité génétique (Rauw et al., 1998). Un effort conséquent des travaux de recherche doit donc être dirigé vers le développement de méthode de phénotypage renseignant sur des caractères biologiques variés.

De plus, la multiplicité des objectifs de sélection de production implique que le phénotypage doit apporter des informations de plus de plus complexes (Friggens et al., 2010). La robustesse, c'est-à-dire la capacité d'un animal à s'adapter aux perturbations de l'environnement devient un point clé du phénotypage et nécessite un travail de compréhension du comportement et de la physiologie de l'animal (Friggens et al., 2010). Cette partie sera l'occasion de présenter les principaux caractères déjà mesurés chez l'ormeau, au niveau zootechnique, comportemental et physiologique.

6.1 Mesures des performances en élevage

6.1.1 Croissance en taille et en poids

Avant la taille de 15 à 20 mm, il est difficile de pouvoir réaliser un marquage chez l'ormeau. A cette taille, un tip-tag de trois numéros ou un transpondeur peut être collé à l'aide d'époxy ou de colle cyanoacrylate sur la coquille (Figure 24). Cette contrainte pratique explique l'absence de données individuelles inférieures à 1 an pour *Haliotis tuberculata* et la majorité des espèces d'ormeaux (Tableau 5). Une fois le marquage réalisé, la taille et le poids peuvent être mesurés de manière répétée au cours du développement de l'animal. La croissance en taille est globalement linéaire pour la plupart des espèces *d'haliotidae* durant les trois premières années de croissance en grossissement (Basuyaux, 1997). Pour *Haliotis tuberculata*, en condition d'élevage, une croissance en dessous de 1 mm par mois à l'année peut être considérée comme faible, et élevée au-dessus de 2 mm par mois (Basuyaux, 1997).

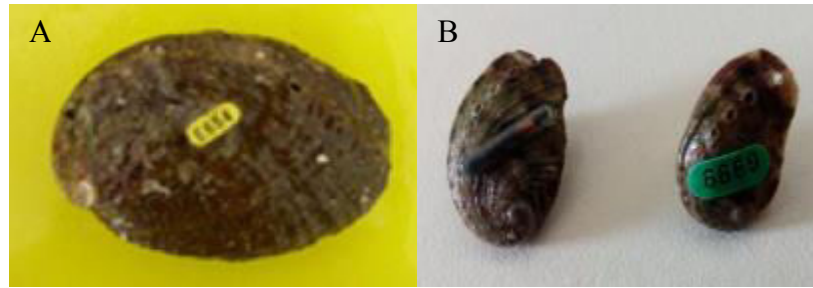


Figure 24 : A) Photo d'un ormeau adulte de 60 mm marqué avec un marquage Hallprint® à trois chiffres, B) Deux juvéniles qui ont atteint la taille limite de 15-20 mm pour être marqués avec un transpondeur à gauche et un tip-tag à droite (Photo : personnelle)

Par rapport à la taille, la mesure du poids total est biaisée par la quantité variable d'eau que peut garder un ormeau dans sa cavité palléale, et qui peut représenter jusqu'à 15% du poids total pour les juvéniles (Basuyaux, 1997). Une compression avec du papier absorbant peut réduire cette difficulté. Le poids est pourtant parfois préféré à la taille car il représente la valeur de l'animal au niveau commercial même si la taille et le poids sont souvent très corrélés (Gjedrem et Baranski, 2009). Aussi, un ormeau laissé hors de l'eau présente une perte de fluide pouvant aller jusqu'à 16% de son poids (Vosloo et Vosloo, 2006). Le temps entre la sortie de l'eau et la pesée doit donc être maîtrisé. En sélection, le poids est très souvent utilisé puisque des calibreuses en élevage permettent de classer rapidement les animaux par ordre de poids à raison de 900 à 7200 animaux par heure selon les machines (Figure 25).



Figure 25 : Calibreuse de France Haliotis permettant la pesée de 900 individus par heure

6.1.2 Mesure du taux de chair

Le pied est la seule partie de l'orveau consommée. Au niveau mondial, la majorité des ventes est réalisée en conserve, sous forme de produits éviscérés sous vide ou séchés (Camara et Symonds, 2014). Le taux de chair des animaux est donc une variable économique prépondérante. Il est traditionnellement évalué par une pesée après dissection (Gerber, 2013). Cette mesure est invasive, et cet aspect explique l'absence de progrès réalisés sur ce caractère dans les différents programmes halioticoles (Elliott, 2000). Le poids de chair est souvent relié au poids total déjà intégré à l'effort de sélection (Gjedrem et Baranski, 2009). Néanmoins, cette difficulté de mesure du rendement en chair est posée dans l'ensemble des filières d'élevage qui vendent seulement une partie de l'animal. Pour la truite, par exemple, une volonté de sélection sur la variabilité du taux de chair a été formulée en France. Des mesures par échographie ont permis une estimation directe du taux de chair et un progrès plus rapide qu'une sélection par estimation génétique sur phénotypage d'apparenté (Haffray et al., 2013).

Une autre difficulté pour estimer le taux de chair de l'orveau est la relation allométrique entre leur taille et leur taux de chair. Plus les orveaux sont grands, plus leur taux de chair est important. Il est donc conseillé de travailler avec la résiduelle du poids de chair régressé sur le poids total de l'individu pour comparer le caractère charnu d'individus de tailles différentes (Haffray et al., 2013).

La perte en hémolymphe lors de la dissection est également un problème non négligeable à intégrer. En effet, cette perte a lieu jusqu'à ½ h après l'éviscération et peut représenter jusqu'à 15% du poids total de l'animal (Communication personnelle). Une précaution méthodologique en chantier de phénotypage consiste donc à mesurer le poids de chair juste après la mise à mort ainsi que 2h après l'éviscération (Camara et Symonds, 2014).

6.1.3 Mesure de la mortalité

L'élevage de populations non domestiquées conduit la plupart du temps à des mortalités en élevage. Cette mortalité peut être mesurée de manière globale par le suivi cumulé croissant d'un pourcentage (Dégremont et al., 2010b) ou comme un variable qualitative individuelle acceptant deux modalités : vivant ou mort (Ragg et Watts, 2015). Pour l'orveau, le processus de mortalité au sein d'une population est un phénomène qui s'étale sur des longues périodes ce qui rend difficile l'identification précise de ses causes (Ragg et Watts, 2015), et ceci, d'autant plus qu'un épisode de mortalité est souvent la conséquence de facteurs croisés (Ragg et al., 2000b; Travers et al., 2008a). Plusieurs raisons susceptibles d'entraîner une mortalité ont

néanmoins été identifiées comme, par exemple un trop faible état nutritionnel (Dang et al., 2011), un état de maturité sexuelle (Travers et al., 2008a), des pathogènes (Viant et al., 2003) ou l'action de certains agents stressants comme des variations physicochimiques ou des procédures d'élevage (Cheng et al., 2004c; Hooper et al., 2011).

Des progrès zootechniques peuvent fournir des réponses pour rendre une population plus résiliente face aux causes des mortalités citées précédemment (Elliott, 2000). L'action de pathogènes peut être cependant difficile à contrôler par des améliorations zootechniques. Dans le cas de la vibriose pour l'ormeau européen élevé en mer, peu d'options zootechniques sont envisageables face aux augmentations de températures estivales et un état de maturité grandissant pour l'ormeau après 4 ans d'élevage (Travers, 2008). Les environnements aquacoles sont, de plus, souvent des environnements propices aux maladies, en partie à cause de l'eau qui véhicule rapidement les agents pathogènes, mais aussi à cause des températures élevées et des fortes densités (Travers, 2008). Dans ce cadre, la sélection génétique peut être utilisée pour augmenter la capacité de résistance d'une population d'élevage. Afin de déterminer cette capacité de résistance, plusieurs techniques peuvent être envisagées : le challenge bactérien ou viral consiste à infecter des individus par injection ou par balnéation. Cette technique est un moyen simple de phénotypage pour identifier des individus résistants dans une population (Travers et al., 2009). La réalisation de challenges par cohabitation avec des animaux infectés est une méthodologie conseillée parce qu'elle fait appel à tous les niveaux de défenses immunitaires des individus : mucus, tégument, branchie, hémolymphe, tube digestif (Gjedrem et Baranski, 2009). Bien qu'efficace pour plusieurs maladies à fortes pénétrances, cette méthode est souvent coûteuse en animaux et ne permet de répondre par sélection qu'à un seul pathogène à la fois. Aussi, il existe peu d'exemples de corrélations génétiques fortes pour la réponse à des maladies différentes. L'établissement d'une population résistante à un premier pathogène n'assure donc pas qu'il soit résistant à un second pathogène (Gjedrem et Baranski, 2009).

6.1.4 Mesure de la qualité organoleptique

En sélection animale, après une phase de sélection concentrée sur les caractères de production (par exemple, quantité laitière produite ou poids à un âge donné), des caractères de qualité des produits ont été ajoutés rapidement aux objectifs de sélection (Rauw et al., 1998). Ces caractères de qualités organoleptiques comme la couleur, la forme, la tendreté ou la composition du produit sont essentiels pour se différencier de la concurrence puisqu'ils

intéressent fortement le consommateur final (Gjedrem, 2000). Cependant, le développement de méthodes de phénotypage complexes et des outils de mesures spécifiques sont nécessaires à son élaboration. Concernant la couleur de la coquille et du pied, plusieurs méthodes permettent de la mesurer et de la sélectionner. Ainsi, Camara et Symonds, 2014 ont utilisé une échelle de notation visuelle pour leur permettre d'estimer l'héritabilité de la couleur chez *H. iris* (Figure 26). Une quantification de la couleur a été réalisée par traitement d'image chez *H. tuberculata* (Marchais et al., 2017; Roussel et al., 2013).



Figure 26 : Grille de notation réalisée sur le pied et la coquille d'*Haliotis iris* élevé dans un environnement commun (Camara et Symonds, 2014)

La composition biochimique du pied peut modifier les qualités organoleptiques de l'orveau. Un paramètre organoleptique important est la concentration en glucides dans le pied (Fluckiger et al., 2011). L'essentiel des réserves en sucres pour l'orveau est composé de glycogène qui peut représenter jusqu'à 40% du poids sec de l'animal (Braid et al., 2005). Une population élevée dans un même milieu peut présenter une forte variabilité de concentration en glycogène (CV 38%) (Fluckiger et al., 2011). Plusieurs techniques existent pour doser le glycogène dans le muscle. Le dosage peut être fait par des techniques biochimiques de type colorimétrique (Braid et al., 2005). Mais ces techniques présentent l'inconvénient d'être létale puisqu'elles nécessitent un prélèvement de chair, et sont coûteuses en temps. Des technologies comme le NIRS (Near Infrared Resonance Spectrometry) pourraient être intéressantes à développer pour permettre de mesurer plus rapidement ces caractères (Fluckiger et al., 2011).

La tendreté est une composante très importante de la valeur économique du produit. En France, l'orveau est traditionnellement frappé pour le rendre plus souple même si sa texture est moins élastique que d'autres gastéropodes comme la patelle *Patella vulgata*. Cette dureté, lorsque l'orveau est mal préparé, est un des principaux freins sur le marché français (Huchette,

communication personnelle). La mesure de la tendreté présente plusieurs difficultés. D'abord, la tendreté de la chair transformée et cuite n'est pas forcément liée à la tendreté du produit cru. Les processus de cuisson et d'attendrissement sont difficiles à standardiser pour l'orveau. Ensuite, cette mesure est pour l'instant invasive. Après découpe d'une partie du muscle, un texturomètre peut être utilisé pour étudier la dureté (capacité d'un corps à résister à la déformation), la force de déchirement (résistance à la pénétration) ou la cohésion d'un produit (degrés de conservation de la structure d'un produit après sa déformation par écrasement) (Gao et al., 2001; Hughes et al., 2016; Yoneda et al., 2000) (Figure 27).

Douze heures après la mort, la chair entre dans la phase de *rigor mortis* qui dure pendant environ 14H (Hughes et al., 2016). Après cette période, la chair est plus tendre. Plus les réserves en glycogène sont importantes, plus la phase de *rigor mortis* dure longtemps (Hughes et al., 2016). De même en été, la concentration de collagène semble baisser et la chair fraîche est moins dure (Olaechea Porturas et al., 1993). Le régime alimentaire a aussi un effet sur la dureté de la chair. Par exemple, une nutrition au wakamé *Undaria pinnatifida* rend la chair plus tendre qu'une nutrition à la gracilaire *Gracilaria gracilis* (Harada et al., 2012).



Figure 27 : Photo d'un texturomètre à compression utilisé en analyse sensorielle (Photo : <https://www.google.fr/search?q=texturomètre&source>)

6.2 Mesures des caractères physiologiques

L'état physiologique des orveaux est un paramètre important à suivre en élevage, en particulier lorsque ces animaux sont soumis à des agents stressants. En effet, l'énergie consommée pour la réponse d'un individu à un agent stressant rentre en compétition avec l'énergie qui pourrait être allouée à la croissance (Morash et Alter, 2016). Par conséquent,

obtenir des moyens efficaces pour évaluer l'état physiologique et la réponse au stress des animaux est un enjeu majeur en halioticulture (Ragg et Watts, 2015; Ragg et al., 2000).

6.2.1 Statut immunitaire

Parmi les caractères internes mesurables en lien avec l'immunité des ormeaux, il faut distinguer les caractères liés à l'hémolymphe ou au sérum et les caractères liés aux hémocytes (Travers, 2008). Il est possible de prélever l'hémolymphe d'un animal à l'aide d'une seringue insérée dans le sinus palléal (Figure 28).



Figure 28 : Prélèvement d'hémolymphe sur un ormeau d'élevage (Photo : SCEA France Haliotis)

L'ormeau est un animal osmo-conforme. La pression osmotique de l'hémolymphe est donc proche de celle de l'eau de mer et les équilibres ioniques y sont très importants. La mesure des équilibres ioniques présents dans l'hémolymphe permet d'obtenir des informations intéressantes sur l'équilibre interne de l'animal (Ragg et Watts, 2015). En particulier, le rapport sodium/potassium renseigne très bien sur le temps d'émersion et la survie après exondation (Ragg et Watts, 2015). Une autre composante intéressante du sérum est la concentration en HSP (Heat Shock Protein). Ces protéines joueraient un rôle majeur dans la résistance aux agents pathogènes et sont d'autant plus intéressantes que leur héritabilité est non nulle chez une population d'*H. rufescens* (Brokordt et al., 2015). Elles jouent également un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire chez les ormeaux (Brokordt et al., 2015).

Les hémocytes sont les cellules actives du système immunitaire qui sont également impliquées dans des fonctions telles que le transport de nutriments, la réparation tissulaire, la ponte et la résorption gonadique (Travers, 2008). De nombreuses observations montrent qu'ils peuvent varier en terme de concentrations et d'activités (Hooper et al., 2007). Deux variables sont notamment utilisées pour apprécier l'impact du stress en élevage : le nombre total d'hémocytes (THC, ou Total Haemocyte Count) et le taux de phagocytose. L'augmentation de THC après un stress peut se produire dans l'heure qui suit le stress et se prolonger jusqu'à 3

jours. Après le stress, le THC peut revenir au niveau de base (Hooper et al., 2014b) ou descendre en dessous de ce niveau pour se stabiliser ensuite (Travers et al., 2008a). Ce résultat a aussi été observé dans le cas d'une exondation (Cardinaud et al., 2014), d'un décollement suivi d'un transfert d'animaux (Cardinaud et al., 2014; Hooper et al., 2011), d'un choc thermique (Hooper et al., 2014c), d'une simulation de criblage (Malham et al., 2003) ou d'une ponte (Travers et al., 2008a). Un niveau bas de THC a aussi été associé à un état conduisant à l'augmentation de la sensibilité aux pathogènes pour l'ormeau (Cheng et al., 2004a). Des recherches complémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette augmentation après un stress aigu est signe de réponse positive à une agression ou si elle est la conséquence d'un déséquilibre causé par le stress.

La mesure du taux de phagocytose repose sur la capacité des hémocytes à phagocyter des corps étrangers inférieurs à sa taille. Des billes fluorescentes appelées zymozines peuvent être proposées à des hémocytes qui ont adhéré à des plaques. L'efficacité phagocytaire est alors mesurée comme le ratio du nombre d'hémocytes ayant phagocyté plus de trois billes fluorescentes sur le nombre total de cellules ayant phagocyté au moins une bille (Travers, 2008). Lorsque l'ormeau est perturbé par un stress, l'évolution de l'efficacité phagocytaire est souvent opposée à celle du THC. On constate le plus souvent une diminution et un retour au niveau basal en une semaine (Cardinaud et al., 2014; Cheng et al., 2004c; Hooper et al., 2011; Hooper et al., 2014b). Une seule étude fait exception à ce constat avec une augmentation de l'efficacité phagocytaire dans les 2 jours qui suivent le secouement (Malham et al., 2003). L'efficacité phagocytaire est néanmoins considérée comme un meilleur prédicteur de la condition immunitaire des ormeaux par rapport au THC (Hooper et al., 2007), d'abord parce qu'il fait l'objet d'une efficacité correspondant à un processus actif de défense, ensuite parce qu'il est beaucoup moins variable et dépend moins du contexte que les mesures de THC.

Au niveau pratique, la principale difficulté de ce protocole est la perforation d'un sinus de l'ormeau pour prélever de l'hémolymphe (Figure 28). Ce prélèvement, même s'il n'est pas toujours léthal, reste néanmoins très invasif pour les ormeaux, et n'est pas réalisable pour les ormeaux d'une taille inférieure à 3-4 cm. En outre, ces caractères sont extrêmement variables et nécessitent une étude de répétabilité pour pouvoir être utilisés en sélection (Brokordt et al., 2015). Aussi, ils peuvent varier selon la difficulté de prélèvement, les expérimentateurs, les saisons (Roussel, communication personnelle), les paramètres utilisés et les espèces. Il convient donc d'être prudent lors de la comparaison de différentes études entre elles.

6.2.2 Développement gonadique

Une autre fonction physiologique de l'orveau importante à étudier est la maturation sexuelle. Pour *H. tuberculata*, en cas de croissance rapide et de température élevée, la gonade peut se développer dès le deuxième été, en gonflant autour de la glande digestive. Une maturité précoce pourrait être néfaste en production puisqu'elle limiterait les croissances et placerait les populations dans un état immunodéprimé sur une période d'élevage potentiellement plus longue (Travers et al., 2008a). Une situation comparable a donné lieu à la nécessité d'une contre-sélection de la maturité chez le saumon dans le plan de sélection national norvégien (Gjedrem et Baranski, 2009). Cependant, même si l'énergie investie dans le développement gonadique rentre en compétition avec l'énergie allouable à la croissance somatique, le développement gonadique est une preuve de bon développement pour les orveaux adultes. En revanche, une ponte spontanée peut être le signe d'une réponse à un stress comme un arrêt d'eau, une exondation ou un choc thermique en élevage (Basuyaux, 1997). La ponte en elle-même représente un stress majeur pour les animaux et une dépense énergétique telle qu'elle peut être accompagnée de mortalité massive en élevage (Basuyaux, 1997).

Le développement de la gonade peut être observé de manière non létale chez l'orveau (Figure 29). Une grille qualitative avec 4 niveaux de développement gonadique, se basant sur son gonflement, a d'abord été utilisée pour estimer la maturité d'animaux adultes en conditionnement (Uki et Kikuchi, 1984b). Cette mesure a l'avantage d'être rapide et facilement répétable pour des observateurs expérimentés, mais ne permet pas d'être discriminante pour des animaux adultes matures en été. Un indice sur une échelle de 8 mesures a également été développé chez les juvéniles. Néanmoins, cet indice présente l'inconvénient d'être létal puisqu'il nécessite une dissection (McAvaney et al., 2004). Le poids de la gonade peut aussi être mesuré directement par dissection, en la séparant de la glande digestive qui est contenue dans le même tissu conjonctif (Bilbao et al., 2012). Cependant, les pertes en eau sont difficilement contrôlables, et suivant la période de l'année, la séparation peut se révéler compliquée.

Une autre difficulté pour apprécier le développement gonadique est que la maturité d'un orveau dépend de son historique alimentaire et des degrés de température accumulés chaque jour. Les mesures répétées de gonade doivent donc se faire dans un cadre zootechnique défini précisément pour permettre de réaliser des comparaisons annuelles (Bilbao et al., 2012; McAvaney et al., 2004; Uki et Kikuchi, 1984b). Il est donc important de pouvoir quantifier de

manière standardisée l'investissement gonadique pour voir s'il est croissant avec les cycles de sélection sur la croissance.



Figure 29 : Gonade femelle développée autour de la glande digestive (Source : personnelle)

6.2.3 Mesure du métabolisme

L'efficacité métabolique conditionne la capacité des animaux à convertir une biomasse alimentaire extérieure en une biomasse commercialisable (Morash et Alter, 2016). En aquaculture, l'efficacité alimentaire est le caractère du métabolisme le plus important pour la sélection puisque l'alimentation fait partie des coûts de production les plus importants. L'ormeau ne fait pas exception à cette règle. Les coûts liés à l'alimentation peuvent représenter jusqu'à 50% des coûts de production (Loubser, communication personnelle). Les méthodologies de phénotypage appliquées aux poissons comme l'analyse des effets des arrêts d'alimentation ou l'utilisation d'aliments marqués ne sont cependant pas utilisables pour l'ormeau. L'ormeau est très résistant au jeûne. Ainsi, aucune perte de poids n'est observable après 1 mois de jeûne pour l'hybride australien *H. laevigata***H. rubra* (Sheedy et al., 2016). Plusieurs autres variables permettent de mesurer l'activité métabolique des ormeaux comme le rythme cardiaque (Ragg et Watts, 2015), la consommation d'oxygène (Donovan et Taylor, 2008), la capacité à réaliser un effort physique (Donovan et Carefoot, 1997), ou l'excrétion (Chaperon 2017 in press). Une revue de littérature récente étudiant les effets de stress environnementaux ou d'élevage sur le métabolisme des ormeaux est disponible pour approfondir le sujet (Morash et Alter, 2016).

6.3 Connaissances et mesures de caractères comportementaux

6.3.1 Définition et importance de l'éthologie dans l'étude des populations d'élevage

Le comportement d'un animal peut être défini comme l'ensemble des réactions observables qu'un organisme exécute en réponse aux stimuli du milieu dans lequel il vit (Price, 1984). Le comportement a été une des premières composantes biologiques affectées par le syndrome de la domestication. La variabilité comportementale des populations sauvages est même probablement à l'origine d'une interaction possible entre l'homme et les animaux au début de la domestication (Vigne, 2002). Chez les mammifères, l'étude du comportement a permis de mieux appréhender les origines de la domestication, comprendre les réactions des animaux d'élevage soumis à des agents stressants, d'adapter les systèmes d'élevage au comportement des animaux et de quantifier leur bien-être. Ces points sont fondamentaux dans la recherche de performance en élevage. Le comportement offre aussi l'avantage d'être souvent le premier critère biologique observable en cas de réponse à une modification du milieu (Gautier, 1990).

L'étude comportementale des animaux d'élevage terrestres comme les mammifères est facilitée par le fait qu'ils partagent avec l'homme des niches sensorielles et des organisations sociales proches. L'observation du comportement permet de détecter facilement des états physiologiques, comme les chaleurs chez les vaches laitières par exemple. Des comportements, comme l'agressivité en présence de l'homme, peuvent être notés et sont déjà sélectionnés chez les bovins laitiers. De par le caractère récent de l'élevage d'orveau et du faible nombre de travaux sur ce sujet, la compréhension de son comportement en est encore à ses balbutiements.

L'éthologie est la science de l'étude du comportement des animaux. L'éthologie permet la quantification de ces réactions par la constitution d'éthogramme, c'est-à-dire une définition précise et exhaustive de comportements mesurables réalisés par un individu. Elle peut être abordée sous 4 angles : une approche fonctionnelle (le comportement est étudié en tant que mécanisme permettant de réguler l'homéostasie ou de maximiser la fitness d'une espèce), une approche évolutive (le comportement est envisagé dans son évolution au cours de processus de sélection naturelle et/ou intentionnelle), une approche causale (l'étude des causes impliquant

des réponses comportementales) et une approche ontogénique (le comportement est étudié au cours du développement des individus).

Plusieurs types de comportement ont été étudiés chez l'orveau. C'est le cas des comportements exploratoires dans le milieu naturel (Clavier, 1984; Shepherd, 1973) ou en laboratoire (Cenni et al., 2009; Werner et al., 1995), du comportement alimentaire (Allen et al., 2006; Fleming, 1995a; Harada et al., 1994), du comportement de réactivité suite à un retournement (Baldwin et al., 2007), du comportement de choix d'habitat en élevage (Cenni et al., 2010; Huchette et al., 2003) et de réponses à des stress d'élevage (Hooper et al., 2014b; Robinson et al., 2013). Les principaux comportements étudiés dans cette thèse sont le rythme d'activité, le comportement d'abritement dans un habitat, le comportement de fuite en présence d'un prédateur, la consommation alimentaire et la réactivité suite à un toucher ou à un retournement.

6.3.2 Activité et rythme circadien

Le rythme circadien est défini comme l'évolution de l'activité au cours des 24h d'une journée. L'étude du rythme circadien est un critère intéressant chez les mammifères d'élevage pour étudier l'effet des agents stressants chroniques (Rigalma et al., 2010). Chez les orveaux, cette approche est relativement récente et peu développée (Werner et al., 1995). Un orveau peut être considéré comme actif lorsqu'il se déplace ou lorsqu'il mange. Une position immobile dans un refuge est considérée comme une période d'inactivité. Cependant, le comportement de déplacement reste difficile à mesurer : il n'est visible que la nuit (Cenni et al., 2009) et dépendant des stress subis par les animaux dans les jours qui précèdent le relevé (Robinson et al., 2013). De plus, une forte variabilité individuelle est observée (Cenni et al., 2010). Des individus d'une même population, élevés dans les mêmes conditions peuvent rester immobiles durant toute une nuit tandis que d'autres se déplacent au contraire durant la totalité de la nuit, rendant difficiles les analyses par comparaison entre différents traitements (Werner et al., 1995). Le temps d'analyse des vidéos et les besoins en matériel limitent également très rapidement le nombre d'animaux phénotypés (Nakamura et Archdale, 2001)

6.3.3 Etude de la réactivité comportementale

La réactivité comportementale à des agents stressants en élevage est un champ d'étude couramment exploré pour mieux comprendre l'impact des pratiques d'élevage sur les animaux (Rigalma et al., 2010). Lorsque l'animal est soumis à un agent stressant, il peut répondre soit par une immobilité tonique, la fuite ou au contraire l'attaque. Ces réponses vont varier suivant

l'agent stressant, l'espèce de l'animal, l'état interne de l'animal, son expérience passée, etc... L'étude de la réactivité comportementale nécessite de définir des tests standardisés dont la mesure est répétable et rapide. Pour l'orveau, plusieurs tests ont été mis au point. Le premier test est le test du retournement. Il consiste à décoller un orveau de son support et de le placer sur sa coquille pour observer son retournement (Figure 30).



Figure 30 : Différentes étapes du retournement d'un orveau (Photo : France Haliotis)

Ce test est réalisé dans l'eau. La latence de retournement correspond au temps entre lequel l'orveau est placé sur le dos et le moment où l'ensemble de son pied est à nouveau en contact avec le substrat. Cette mesure présente l'avantage de la simplicité, de la rapidité et de la précision d'évaluation. Il a aussi l'avantage de correspondre à un comportement naturel de l'orveau qui peut se décoller d'un support pour tomber plus loin en réaction à un prédateur ou à une variation de facteurs physico-chimiques brutale (Hooper et al., 2011; Hooper et al., 2014c). Le test du retournement est utilisé dans la littérature comme prédicteur permettant de discriminer la capacité métabolique de différents orveaux (Baldwin et al., 2007) ou comme agent stressant pour simuler une manipulation d'élevage (Cardinaud et al., 2014). Un ralentissement de la rapidité du retournement a aussi été observé en cas de contamination d'une population par un contaminant chimique (Day et al., 1995b). Le test du retournement pourrait ainsi être une mesure indirecte, non invasive, permettant d'apprécier le niveau énergétique ou l'état physiologique de l'animal, même si des travaux doivent encore confirmer ces hypothèses.

La rétractation des épipodes et du pied en cas de contact d'un corps étranger avec l'orveau, comme ce qui est rapporté dans l'étude d'Allen et al. (Allen et al., 2006; Hooper et al., 2014c) pourrait être utilisée comme mesure pour étudier la réponse à un prédateur de type « crabe ». A notre connaissance, il n'existe pas d'études publiées sur la réaction au toucher ni d'impact des agents stressants sur cette réponse. De même, il est possible d'étudier la réponse individuelle des orveaux à leurs prédateurs comme l'étoile de mer (Day et al., 1995a).

6.3.4 Relation entre le comportement, la génétique et les performances en élevage

Parmi les évolutions biologiques des espèces soumises à un processus de domestication, le comportement est une composante évolutive majeure. Il est donc clair qu'une base génétique de la variabilité des caractères comportementaux existe. Cependant, les évolutions comportementales des espèces soumises à la domestication ne sont clairement visibles qu'après plusieurs générations. Leur étude nécessite un développement poussé des méthodes de phénotypage et des salles d'observation avec des paramètres physico-chimiques de l'environnement très contrôlés. Deux études réalisées chez le calamar *Euprymna tasmanica* soumis à des tests de prédation et de nutrition ont montré qu'il existait une héritabilité non nulle de comportement comme la peur et la réactivité à des stimuli extérieurs (Sinn et Moltshaniwskyj, 2005; Sinn et al., 2006). Pour l'orveau en particulier, une héritabilité non nulle a été observée sur le déplacement en réponse à un stress de prélèvement d'épipodes entre des orveaux issus de reproducteurs sauvages et des orveaux issus de populations d'élevage en troisième génération de sélection massale sur la croissance (Robinson et al., 2013). Cette étude a aussi montré que, suite à un stress, des animaux issus de populations sélectionnées parcouraient de plus longues distances que des animaux issus de reproducteurs sauvages. Ces travaux soulignent l'intérêt des tests comportementaux pour suivre l'évolution des populations récemment soumises à un processus de domestication et l'intérêt que peut représenter l'identification d'animaux mieux adaptés aux stress d'élevage. Dans un contexte plus large, par exemple dans le cadre de stratégies de repeuplement ou de sea-ranching (Christie et al., 2016; Hansen et Gosselin, 2013), plusieurs questions peuvent être soulevées sur la survie des orveaux issus de reproducteurs sélectionnés en élevage, mais également sur la capacité des orveaux élevés en captivité dans un milieu simplifié et sans prédateur, à répondre aux prédateurs. Des méthodes d'élevage ont été proposées pour obtenir des juvéniles plus adaptés au milieu sauvage et qualifiés de « wild type » sur le plan comportemental (Hansen et Gosselin, 2016; Straus et Friedman, 2009).

Conclusion : Il existe de multiples possibilités de phénotypage des différents aspects de la biologie des orveaux. L'étude des relations existantes entre les caractères de production, la physiologie et le comportement reste cependant un champ de recherche très ouvert. Peu d'informations sont disponibles concernant l'héritabilité de caractères physiologique ou comportemental chez l'orveau. L'acquisition de telles connaissances reste fondamentale pour suivre l'évolution des populations en cours de domestication.

7. Problématique et objectifs de thèse

Les premiers tests de production halioticole ont débuté en France dans les années 80 (Flassch et Aveline, 1984). Aujourd'hui, deux exploitations françaises produisent et commercialisent ce mets rare. Un système d'élevage performant est souvent caractérisé par de fortes densités, un apport alimentaire important et régulier, des températures élevées et des manipulations liées aux pratiques pouvant entraîner des stress chroniques. Ce contexte peut favoriser l'émergence de nouvelles maladies ou de problèmes comportementaux délétères pour la production (Travers, 2008). Ceci est d'autant plus vrai pour l'ormeau qui est une espèce très sensible aux variations de la qualité de son milieu et aux manipulations d'élevage, aboutissant souvent à des mortalités élevées (Cheng et al., 2004a; Hooper et al., 2011; Hooper et al., 2014c; Huchette et al., 2003). La sensibilité aux variations environnementales est un aspect commun à de nombreuses espèces marines. Cette caractéristique est accompagnée par une grande plasticité phénotypique et par une sélection non-intentionnelle facilitée par les fortes fécondités et les fortes variations du succès reproducteur individuel liées à des mortalités importantes dans les premiers stades de vie (Boudry et al., 2002; Lorenzen et al., 2012; Taxis et al., 2007). Dans ce contexte, une différenciation rapide entre population d'élevage et population sauvage pourrait survenir même à des stades précoces de domestication (Teletchea et Fontaine, 2014).

Le premier objectif de la thèse a été d'étudier les effets du processus de domestication mis en place à France Haliotis sur l'ormeau, avant l'établissement d'une sélection intentionnelle. Une population non sélectionnée ayant atteint la taille commercialisable a été comparée à une population sauvage sur des critères de croissance, de physiologie et de comportement. Ces informations peuvent être importantes si le marché du repeuplement se développe (Dixon et al., 2006; Hansen et Gosselin, 2016). Une deuxième expérimentation a consisté à étudier si les différences entre populations d'élevage et populations sauvages peuvent aussi résulter de phénomènes neutres (dérive génétique) ou non-neutres (réponse à la sélection). Ainsi, les progénitures provenant de reproducteurs sauvages, et de reproducteurs d'élevage non-sélectionnés ou sélectionnés sur le poids ont été étudiées.

Une sélection avec une pression importante sur un unique critère de production peut engendrer un progrès rapide et accélère le processus de différenciation entre une population sauvage et une population d'élevage. Cependant, un progrès trop rapide peut engendrer un déséquilibre de la biologie des populations d'élevage (Rauw et al., 1998). L'approche aujourd'hui conseillée en sélection est d'étudier préalablement la biologie de l'animal avec une

approche multicritères (Camara et Symonds, 2014; Elliott, 2008). La connaissance de relations phénotypiques et génétiques au sein d'une population peut permettre une sélection multicritères basée sur des caractères de production, et sur des caractères liés à la physiologie et au comportement (Rauw et al., 1998). Cette stratégie multicritères est déjà appliquée sur de nombreuses espèces domestiques terrestres telles que les porcins ou les bovins laitiers. Il en est de même en aquaculture où des méthodes de mesures de performances cardiaques et de capacité de nage sont développées sur la truite arc-en-ciel dans une perspective de co-sélection avec la croissance (Claireaux et al., 2015).

Chez l'ormeau, peu de connaissances sont aujourd'hui disponibles sur les relations entre des caractères physiologiques, comportementaux et de production (Allen et al., 2006; Cenni et al., 2009; Ragg et Watts, 2015; Travers et al., 2008b). L'étude de ces relations requiert l'utilisation de méthodes de phénotypage précises. **Dans ce cadre, le deuxième objectif de la thèse a été de développer des méthodes de phénotypage efficaces chez *H. tuberculata* : des mesures non invasives de caractères de production (taux de chair et gonade), et d'étudier la relation entre des variables zootechniques et des variables comportementales et physiologiques.**

Ces deux premiers objectifs portent sur une thématique de recherche innovante par rapport aux connaissances établies sur l'ormeau et a donné lieu à deux publications présentées dans le premier chapitre de la thèse et une publication en cours de rédaction, présentée en annexe.

Un plan de sélection est un investissement à moyen-long terme qui doit être adapté au système de production. Le coût d'opportunité de cet investissement peut être analysé dès lors que les différents paramètres génétiques (héritabilités et corrélations génétiques) des caractères d'intérêt sont connus dans le système d'élevage où sera mise en place la sélection (Vandeputte et Haffray, 2014). Plusieurs héritabilités de la croissance ont été estimées pour différents Halotidae (Difford et al., 2017), mais les corrélations génétiques entre des croissances mesurées à différents moments du cycle d'élevage, le taux de chair, l'investissement reproductif et des caractères physiologiques et comportementaux ne sont pas connus et peu documentés (Gerber, 2013; Robinson et al., 2013). Par exemple, une seule publication rapporte une estimation de l'héritabilité pour une réponse comportementale au stress (0,05-0,07) (Robinson et al., 2013). Aussi, il existe une forte variabilité des héritabilités sur la croissance pondérale (de 0,04 à 0,46) pour les différentes espèces d'ormeaux (Brokordt et al., 2014; Camara et Symonds, 2014; Gerber, 2013; Kube et al., 2007; Lucas et al., 2006; You et al., 2010c). Il est important de l'estimer sur l'espèce *H. tuberculata*, dans le système d'élevage de France

Haliotis. Le marquage précoce d'ormeau étant impossible du fait de leur petite taille jusqu'à 1 an, ces travaux ont comporté le plus souvent une phase d'élevage séparée qui peut biaiser les estimations d'héritabilité (Brokordt et al., 2014). Pour surmonter cette difficulté, le développement de marqueurs ADN permettant une assignation de parenté pour des familles élevées en mélange dans un environnement commun est recommandé (Vandeputte et Haffray, 2014). **Le troisième objectif de ma thèse a donc consisté à développer un jeu de marqueurs SNP permettant la réalisation d'assignation de parenté et l'estimation de paramètres génétiques sur des caractères classiques d'intérêt en production, ainsi que des caractères physiologiques et comportementaux.**

De nombreuses méthodes de sélection ont été appliquées en aquaculture. Les opportunités qu'elles offrent sont très dépendantes de la taille et de l'organisation des entreprises dans lesquelles elles sont implémentées. L'analyse des coûts de production, de la capacité d'investissement, de la maîtrise de la traçabilité et des ressources génétiques disponibles dans l'entreprise est primordiale pour proposer une stratégie adaptée. **Le quatrième objectif** a donc été d'intégrer les résultats de ces analyses et des paramètres génétiques trouvés en partie 2 pour **proposer un programme de sélection adapté à France Haliotis**. Il s'agira de définir la population de base, les efforts de sélection relatifs mis sur les différents caractères d'intérêt, le système d'élevage et de traçabilité permettant d'appliquer une pression de sélection et les pratiques de reproduction accompagnées de schémas de croisement planifiés.

Suite à cette introduction qui présente les enjeux et les objectifs de la thèse, deux chapitres et une discussion générale seront présentées. Le premier chapitre permettra de répondre aux deux premiers objectifs et se basera sur deux manuscrits acceptés dans les journaux *Aquaculture* et *Applied Animal Behaviour Science*, et d'un manuscrit en préparation dans l'annexe. Le deuxième chapitre permettra de répondre à l'objectif 3 avec un manuscrit soumis dans *Aquaculture* et d'un manuscrit en préparation. Enfin le 4^{ième} objectif sera étudié lors de la discussion, en proposant un plan de sélection génétique à France Haliotis.

Chapitre 1 : Etude des effets d'un processus de domestication à son commencement pour l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata*

Manuscrit 1 : Accepté dans « Aquaculture »

Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017b. **Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits.** Aquaculture. 467, 190-197.

Manuscrit 2 : Accepté dans « Applied Animal Behaviour Science »

Lachambre, S., Day, R., Boudry, P., Huchette, S., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017. **Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection.** Appl. Anim. Behav. Sci.

Annexe 1 : Manuscrit en préparation pour « Animal Behaviour ».

Roussel, S., **Lachambre, S.**, Bisch, T., Boudry, P., Gervois, J.L., Lambert, C., Huchette, S., Day, R., 2018. **Anti-predator response of *Haliotis tuberculata*: behaviour is modified after one generation of domestication**

Contexte et Objectifs

Une étude du processus de domestication a été réalisée pour l'ormeau européen dans le cadre de cette thèse, grâce notamment au financement du FEAMP, en collaboration avec plusieurs partenaires (UBO, Ifremer, SYSAAF, France Haliotis). Depuis les premiers essais de production réalisés par l'IFREMER en 1983, plusieurs entreprises ont élevé des ormeaux en captivité. En France, seule l'écloserie de France Haliotis est aujourd'hui en activité. L'examen des croisements réalisés depuis la création de cette entreprise en 2003 permet de mettre en évidence trois phases distinctes de gestion de la reproduction et de niveaux de domestication (Teletchea et Fontaine, 2014) s'étalant sur 4 générations (Figure 31). Lors de la première phase, la population d'élevage provenait de reproducteurs sauvages uniquement. La deuxième phase a duré 6 ans et correspond à une phase de croisements systématiques entre reproducteurs sauvages et reproducteurs d'élevage. Enfin, depuis le début de cette thèse, les cohortes sont produites à partir de croisements de reproducteurs d'élevage sélectionnés sur le poids à 4 ans avec une pression de sélection estimée autour de 5%.

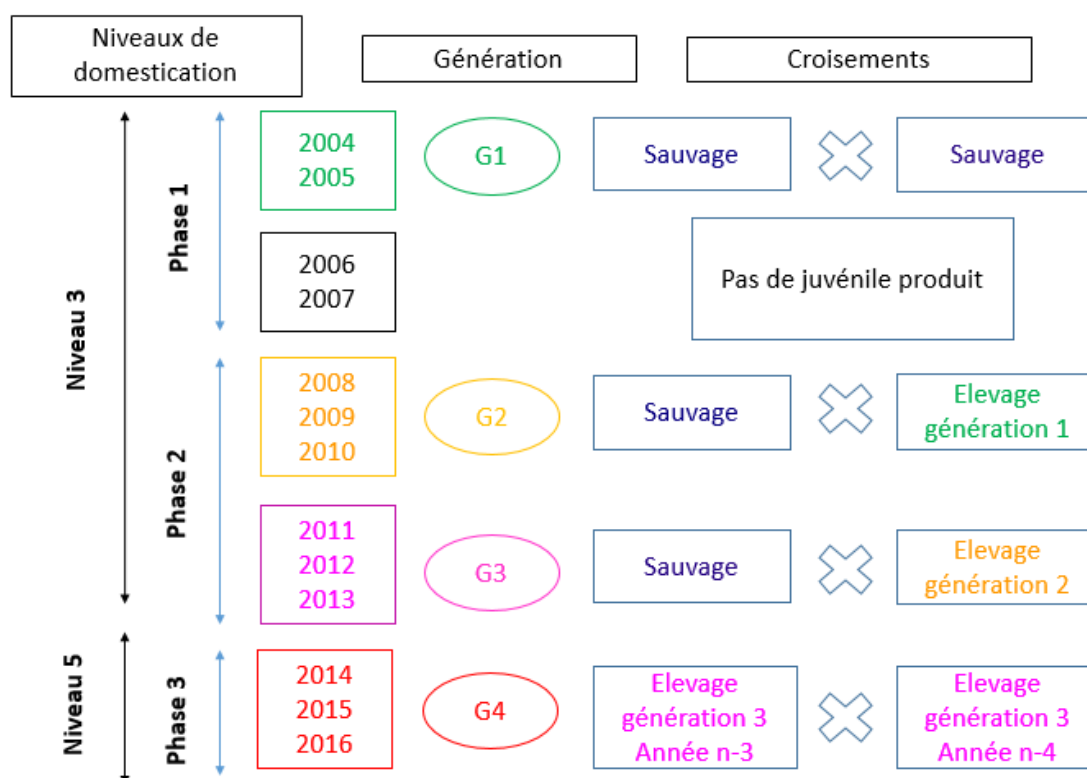


Figure 31 : Représentation des différents croisements effectués aux cours des 12 années de production au sein de l'entreprise France Haliotis, et niveaux de domestication (d'après Teletchea et Fontaine (2014))

Deux types de mécanismes rendent possible une différenciation des populations d'élevage vis-à-vis des populations sauvages. Le premier mécanisme est de type génétique. Les populations d'élevage sont des populations de petites tailles génétiques. Elles sont soumises à la dérive génétique pouvant expliquer une partie de leurs différenciations lorsqu'aucun reproducteur sauvage n'est utilisé pour constituer les populations d'élevage (Gautier, 1990). En parallèle de cette dérive, deux types de sélection peuvent faire évoluer la variabilité génétique de populations d'élevage : une sélection « naturelle ou induite » (i.e. non souhaitée ou induite par les conditions d'élevage), une sélection « artificielle » (i.e. intentionnelle, souhaitée par l'éleveur). Le deuxième mécanisme générant une différenciation entre population sauvage et population d'élevage est de type « ontogénique ». Dans un environnement d'élevage, des mécanismes modifient l'expression phénotypique de caractères pour un génotype donné pendant le développement de l'animal (Lorenzen et al., 2012). Les effets du milieu d'élevage de France Haliotis (sélection induite et effet d'ontogénie) ont pu modifier les populations produites dès 2004 (Figure 31). En revanche l'utilisation de reproducteurs sauvages depuis la création de l'écloserie jusque 2013 a probablement limité la transmission et l'accumulation de différenciation des populations d'élevage jusqu'en 2013. Les populations produites jusqu'en 2013 sont décrites dans la littérature comme étant de type « captif » (Lorenzen et al., 2012). Les effets d'une sélection intentionnelle ne s'appliquent que depuis les reproductions de 2014, moment où seuls des reproducteurs d'élevage ont été utilisés pour constituer les populations d'élevage. Cette utilisation rend possible la différenciation croissante de la population d'élevage vis-à-vis de leurs ascendants sauvages (Figure 31).

Dans ce cadre, conformément au premier objectif de la thèse, la problématique de ce chapitre a consisté à étudier si **le processus de domestication très récent de l'ormeau européen a engendré des évolutions biologiques pour différentes populations d'élevage de France Haliotis.**

Pour répondre à cette question, trois expérimentations ont été mises en œuvre. Les deux premières expérimentations ont consisté à comparer des populations d'élevage ne résultant pas d'une sélection intentionnelle (cohortes 2010, figure 31) à des populations sauvages, avec 2 objectifs. Le premier objectif était de se familiariser avec des méthodes de phénotypage et d'établir des références sur différents paramètres physiologiques, comportementaux et zootechniques avant la mise en place d'un processus de sélection intentionnelle (Manuscrits 1 et 2). Le deuxième objectif a consisté à étudier les effets de l'environnement d'élevage pendant l'ontogénie sur le processus de domestication (indépendamment d'un processus de sélection

intentionnelle) (Manuscrits 1 et 2). La troisième expérimentation a porté sur la comparaison des populations d'orreaux d'élevage à des niveaux de domestication différents et élevés dans des conditions similaires (Annexe 1): des orreaux issus de reproducteurs provenant de l'élevage et sélectionnés sur le poids à 4 ans (cohorte 2014, niveau de domestication 5), des orreaux issus de reproducteurs pris au hasard sur l'élevage (niveau de domestication 4), et des orreaux issus de reproducteurs sauvages (niveau de domestication 3). L'expérimentation s'est appuyée sur une approche comportementale, physiologique et zootechnique.

Méthodes utilisées

Expérimentations 1 et 2 : Comparaison de l'effet des conditions de vie (élevage ou milieu naturel) sur le comportement, la physiologie et la croissance en élevage (Manuscrits 1 et 2)

Des orreaux sauvages (n=60 pour l'expérimentation 1, n=30 pour l'expérimentation 2) et des orreaux d'élevage adultes de 4 ans issus de la cohorte 2010 résultant du croisement entre des reproducteurs sauvages et d'élevage (n=60 pour l'expérimentation 1, n=30 pour l'expérimentation 2) ont été collectés (Tableau 7). Chaque orreau de ces deux populations a été observé en laboratoire à l'aide de caméras et soumis à différents agents stressants rencontrés en élevage (changement d'environnement, forte densité, contact lors des manipulations, secouement, retournement). Cette phase d'observation a été décomposée en trois semaines. Le rythme circadien a été mesuré après une première semaine d'habituation dans un nouvel environnement (Manuscrit 1). La deuxième semaine, les orreaux ont été soumis à un stress chronique de surdensité, puis la troisième semaine, les orreaux ont subi un stress aigu de secouement et d'exondation. La réponse au toucher a été mesurée en situation basale, au bout de 5 jours d'habituation, et après 5 jours passés avec de fortes densités (Manuscrit 2). La réponse immunitaire a aussi été étudiée juste après et une semaine après l'application du stress aigu (Manuscrit 2). L'ensemble des animaux ont ensuite été soumis à un test de retournement avant d'être mis en élevage pour une durée de 6 mois. Cette phase a permis une comparaison des deux populations sur leur capacité de survie et de croissance en milieu d'élevage (Manuscrits 1 et 2).

Expérimentation 3 : Etude des effets d'un premier cycle de sélection sur les performances en élevage, le comportement et la physiologie de l'ormeau (Annexe 1)

Lors de la reproduction de 2014, 3 cohortes avec 3 origines génétiques différentes ont été produites : des cohortes issues de reproducteurs sauvages, de reproducteurs de la cohorte 2011 sélectionnés sur le poids avec une pression de sélection de 5% et de reproducteurs pris aléatoirement dans la cohorte de 2011. Les reproducteurs issus de la cohorte 2011 étaient constitués du croisement d'ormeaux sauvages et d'ormeaux d'élevage. Les ormeaux de ces trois traitements ont été ensuite induits à la ponte et croisés entre eux (Tableau 7). Cette procédure a été répétée à 4 reprises (4 périodes de ponte), et a permis de produire 12 lots d'animaux élevés dans 12 unités de production au sein de l'entreprise France Haliotis. Ces lots ont été élevés dans des environnements séparés en nurserie jusqu'à 16 mois. A l'issue de cette période, 75 ormeaux ont été placés dans une cage (25 ormeaux de chaque traitement provenant d'une même période de ponte), avec cette procédure répétée 3 fois, soit 12 cages au total. Cette phase d'élevage en mer a duré 18 mois supplémentaires. Elle a été conçue pour minimiser les effets de l'environnement sur les performances d'individus en les plaçant dans un environnement commun. A l'issue de ces 34 mois d'élevage, des mesures morphologiques, comportementales et physiologiques ont été effectuées afin de comparer les animaux issus des trois ascendances différentes et d'évaluer une réponse à la sélection.

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes populations comparées au sein des 3 premières expérimentations et des effets rentrant en jeu dans le processus de domestication des différentes populations.

	Origines	Niveau de domestication	Dérive génétique	Effet de la captivité sur l'ontogénie	Sélection induite par la captivité	Sélection intentionnelle
Manusrits 1 et 2	Sauvage pêchée	2	-	-	-	-
	Elevage issu de géniteurs sauvages et d'élevage	3	-	+	+	-
Annexe 1	Elevage issu de géniteurs sauvages	3	+ -	+	+	-
	Elevage issu de géniteurs d'élevage pris au hasard	4	+ -	+	+	-
	Elevage issu de géniteurs d'élevage sélectionnés	5	+ -	+	+	+

Le signe « - » signifie que le facteur étudié n'a pas impacté la population concernée, le signe « + » correspond à un facteur ayant impacté la population concernée.

Principaux résultats et discussions

Expérimentations 1 et 2: Comparaison de l'effet des conditions de vie (élevage ou milieu naturel) sur le comportement, la physiologie et la croissance en élevage

La comparaison d'ormeaux sauvages et d'ormeaux d'élevage en situation d'élevage n'a pas permis de mettre en évidence une différence de gains de performance des populations produites à France Haliois par rapport aux populations sauvages. D'abord, le taux de mortalité totale sur les 2 expérimentations a été très important au cours de l'expérimentation (> à 60% pour les deux populations). Un tel niveau de mortalité montre la grande sensibilité de l'ormeau aux agents stressants expérimentaux, pouvant aussi être rencontrés en élevage. Cette mortalité a été accompagnée d'une absence de croissance en taille et en poids sur les 3 mois qui ont suivi les manipulations, et ceci, quel que soit le traitement. Cette absence de croissance indique que les conséquences de stress aigus s'observent sur une longue période pour l'ormeau. Sur la deuxième période allant de 3 mois à 6 mois après l'application des agents stressants, la seule différence a été observée dans le cadre de l'expérimentation 2, avec des animaux provenant de l'élevage ayant une croissance un peu plus élevée que les animaux provenant du milieu sauvage, cette croissance étant par ailleurs très faible. Les performances de croissance et de survie post-stress des ormeaux en élevage ne semblent pas ou peu impactées par les conditions du milieu (naturel vs élevage).

Il est intéressant de noter que des différences de comportements et de réponses physiologiques aux agents stressants ont été observées entre les deux populations. Les ormeaux d'élevage étaient moins mobiles en situation basale et plus rapides à se retourner après trois semaines de stress. Ils étaient aussi moins réactifs au contact du doigt d'un expérimentateur (Manuscrit 2). De même, des différences de réactions immunitaires ont été observées après 3 semaines de stress : le nombre total d'hémocytes chez des ormeaux sauvages n'a pas augmenté après un stress de secouement et d'exondation alors que ce nombre a été en nette progression pour les ormeaux d'élevage, pour redescendre une semaine après le stress en dessous du niveau de base. Le taux de phagocytose des deux populations étudiées a chuté après le stress de secouement. Néanmoins, un retour au niveau basal en une semaine n'a été observé que chez les individus d'élevage. **Ces observations montrent qu'un développement en milieu d'élevage peut produire, sans sélection intentionnelle, une évolution comportementale et immunitaire des populations d'élevage par rapport aux populations sauvages.** Il n'a pas été possible de déterminer les causes de ces différences de réponses entre les deux populations.

Les ormeaux d'élevage pourraient être mieux adaptés ou moins sensibles aux agents stressant qu'ils ont déjà rencontrés lors de leur développement (fortes densités, secouement, exondations prolongées, manipulations, etc.). Des états physiologiques hétérogènes au départ de l'expérience pourraient aussi être à l'origine des différences de comportement.

La troisième observation importante de ce travail a été de montrer l'existence d'une forte variabilité des caractères mesurés. Cette variabilité nous a incités tout au long de la thèse à réfléchir aux biais et à la précision de nos méthodes de phénotypage. Elle permet aussi de poser la question étudiée en chapitre 2, de l'existence d'une part de variance d'origine génétique additive pour ces caractères. Enfin, des corrélations phénotypiques ont pu être établies au cours de cette étude : un développement gonadique plus important au début du printemps est associé à une plus faible croissance en été, indiquant que la croissance d'animaux adultes est probablement limitée par le développement gonadique.

La latence de retournement à l'issue de la période de stress et le nombre total de cellules de l'hémolymphe sont associés à une meilleure croissance et une meilleure survie post-stress. Une hypothèse consisterait à dire que ces caractères sont associés à une meilleure gestion individuelle des stress subis, ou à une plus grande réserve énergétique permettant une meilleure survie et une meilleure croissance post stress.

Expérimentation 3 :

Etude des effets d'un premier cycle de sélection sur les performances en élevage, le comportement et la physiologie de l'ormeau (Annexe 1)

Aucune différence de survie ou de croissance n'a été observée entre les 3 cohortes caractérisées par trois niveaux de domestication différents, de même qu'aucune différence n'a été observée sur le statut immunitaire entre les trois traitements. Cette absence de réponse à la sélection pourrait être expliquée par les difficultés liées à la standardisation des environnements d'élevage lors des 10 premiers mois d'élevage passés séparément en nurserie. En effet, même si les ormeaux ne présentaient pas de différence de taille à 10 et 16 mois, il est probable que des effets des micro-environnements liés par exemple à la densité de fixation et/ou la qualité des algues pendant les premiers mois de vie, ait une répercussion par la suite. La grande variabilité des conditions d'élevages intra-cohortes en nurserie pourrait masquer les différences existant entre les cohortes, et donc, biaiser l'analyse des progrès génétiques réalisés par la sélection. Les difficultés liées à la constitution et à la comparaison de cohortes élevées dans des

unités de production séparées sont assez classiques en aquaculture et leurs causes ont été présentées en introduction. **Il n’y donc pas d’évidence de progrès sur la croissance ou la survie grâce à un premier cycle de sélection réalisé sur le poids à 4 ans dans les conditions d’élevage à France Haliotis.**

Cependant, de manière complémentaire aux deux premières expérimentations, des différences ont été observées entre les animaux issus de reproducteurs sauvages, de reproducteurs d’élevage sélectionnés ou de reproducteurs d’élevage non-sélectionnés. Les ormeaux issus de reproducteurs d’élevage ont présenté des réponses de fuite moins importantes suite à un contact d’étoiles de mer par rapport à des ormeaux issus de reproducteurs sauvages. Une diminution de réponse au prédateur moins marquée mais néanmoins existante a aussi été mise en évidence pour les ormeaux issus de reproducteurs non-sélectionnés par rapport aux ormeaux issus de reproducteurs sauvages. Une rapide différenciation de la capacité de survie en milieu naturel pourrait donc exister entre des populations sauvages et des populations produites à partir de reproducteurs d’élevage. Des mécanismes similaires présentés en introduction ont été observés chez les poissons à la suite d’une génération de sélection. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la perspective de mise en place de stratégies de ranching ou de repeuplement et pourrait expliquer en partie les fortes mortalités observées lors des essais de repeuplement.

Conclusion

Ce chapitre a permis d’étudier un processus de domestication qui débute pour l’ormeau européen. La première différenciation existant entre la population sauvage et la population en cours de domestication est caractérisée par une baisse de la perception des stimuli et un comportement d’évitement des prédateurs plus réduit. L’absence de progrès réalisés par une sélection individuelle sur la croissance pose la question de l’existence d’une héritabilité de la croissance dans l’élevage de France Haliotis. Cette question sera traitée dans le chapitre suivant.

Manuscrit 1 : Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. Aquaculture. 467, 190-197.

Authors

Sébastien Lachambre^{a,b}, Sylvain Huchette^b, Rob Day^c, Pierre Boudry^d, Antoine Rio-Cabello^a, Timothée Fustec^e, Sabine Roussel^a

Affiliations

^a Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, IUEM, 29280, Plouzané, France

^b France Haliotis, 29880 Plouguerneau, France.

^c Department of zoology, Parkville, Melbourne University, Victoria, Australia 3010

^d Ifremer, Univ Brest, CNRS, IRD, LEMAR, IUEM, 29280, Plouzané, France

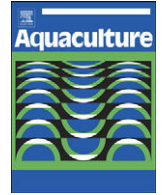
^e Institut Supérieur d'Agriculture, 48 boulevard Vauban, 59046 Lille, France.

Corresponding Author

Sabine Roussel

Phone (work): + 33(0)6 18 03 11 20

Email: Sabine.Roussel@univ-brest.fr



Relationships between growth, survival, physiology and behaviour – A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits



Sébastien Lachambre^{a,b}, Sylvain Huchette^b, Rob Day^c, Pierre Boudry^d, Antoine Rio-Cabello^a,
Timothée Fustec^e, Sabine Roussel^{a,*}

^a Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, IUEM, 29280 Plouzané, France

^b France Haliotis, 29880 Plouguerneau, France

^c Department of Zoology, Parkville, Melbourne University, Victoria 3010, Australia

^d Ifremer, Univ Brest, CNRS, IRD, LEMAR, IUEM, 29280 Plouzané, France

^e Institut Supérieur d'Agriculture, 48 boulevard Vauban, 59046 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Received in revised form 11 April 2016

Accepted 26 April 2016

Available online 3 May 2016

Keywords:

Haliotis tuberculata

Growth

Behaviour

Physiology

Multivariate analysis

Phenotyping

ABSTRACT

Abalone growth rate is often identified among important traits to improve through selective breeding. However, the rapid success of some selective breeding plans has sometimes led to negative effects in some aquaculture species due to trade-offs. One of them is the loss of homeostasis of selected animals which results in the inability to resist the stress experienced during the rearing process. In this context, this study aimed to analyze the phenotypic relationships between growth, and physiological and behavioural traits in *Haliotis tuberculata* under stressful conditions. Eleven traits related to growth, immunity, reproduction and behaviour were recorded under laboratory conditions. A total of 120 adults from wild or farm origin were first monitored during a 3-week stress period (high density and acute stress handling) during winter, followed by 6 months on-growing in sea-cages. Relationships between parameters were analyzed using a multi-factorial approach. Wild and farm stocks could only be discriminated on behaviour traits, confirming that the French abalone industry is in the beginning of the domestication process. After 3 weeks of chronic stress, the righting latency of an abalone was linked to better survival and faster growth. Abalones having the best growth after 6 months were characterized by higher activity during the previous winter period, whereas an early gonad maturation reduced the growth in summer. Our results provide a basis for the establishment of a multi-trait breeding program to improve the growth rate while controlling the evolution of physiological and behavioural traits.

Statement of relevance: The relationships of behavioural and physiological variables with survival and weight gain after application of important stressors were studied in order to provide a better understanding of *Haliotis tuberculata* biology during early domestication stage. This paper will give information on new targets and tools for selective breeding.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Abalones (*Haliotis sp.*) have been consumed in Asia for centuries as a part of traditional food and are currently consumed in many countries (Elliott, 2000). Worldwide demand has exceeded its supply. This has resulted in an excessive pressure on the stocks in many fisheries (Gordon and Cook, 2004) and a global decrease of the wild stocks (Huchette and Clavier, 2004). The high market value of abalone has allowed an impressive development of aquaculture production throughout the world in the last two decades (Lucas et al., 2006). The success of abalone

production is often consolidated by selective breeding plans that generate production gains (Camara and Symonds, 2014; Elliott, 2000).

Haliotis tuberculata is a European species that has been brought into aquaculture in the 2000s. This gastropod is nocturnal and grazes macro-algae found on the rock or drifting algae. It is a slow growing abalone: four years are necessary to reach a commercial size of 7–8 cm (Huchette and Clavier, 2004). The European abalone *Haliotis tuberculata* is a species sensitive to environmental changes (Cenni et al., 2010). *H. tuberculata* is gonochoric and starts its maturation at the end of winter in Brittany and is fully mature in the (Travers, 2008). No genetic improvements have yet been obtained through selective breeding or chromosome manipulations. This European industry would benefit from similar gains to those obtained for other abalone species worldwide (Rhode et al., 2012). However, in many animal production systems, individuals submitted to high productivity improvement seem to be more at risk from behavioural, physiological and immunological

Abbreviations: ANOVA, Analysis of Variance; PCA, Principal Component Analysis; SEM, Standard Error of the Mean.

* Corresponding author.

E-mail address: Sabine.Roussel@univ-brest.fr (S. Roussel).

issues (Rauw et al., 1998). To avoid that, the current selective breeding strategy is to more carefully define the trait to improve (Camara and Symonds, 2014; Elliott, 2008) and to have a multi-criteria approach, adding physiological, behavioural and metabolic traits to complement production traits (Camara and Symonds, 2014; Rauw et al., 1998). This methodology is used in agricultural production but requires a good biological knowledge and efficient phenotyping methodologies (Monget and Le Bail, 2009).

Domestication is a “long process by which a population of animals becomes dependent on and adapted to humans and to a captive environment by some combination of genetic changes occurring over generations and environmentally induced by events reoccurring in each generation” (Price, 1984). During the domestication process, animals are bred in captivity and encounter several stressors related to captivity environment such as high density or suboptimal conditions. The culture environment reduces the pressure of natural selection to adapt on many traits, but introduces new pressures on other traits (Lorenzen et al., 2012). Abalone is a sensitive species to stressors (Hooper et al., 2011; Travers, 2008; Travers et al., 2008a). High density (Huchette et al., 2003), high ammonia concentration (Cheng et al., 2004a), high temperature and heat shock (Cheng et al., 2004b; Hooper et al., 2014), manipulation (Hooper et al., 2011) and shaking (Malham et al., 2003) are well identified farm stressors that affect the abalone immune system and increase the diseases susceptibility to pathogens. Thus after a period of domestication, captive ‘type’ abalone might be already more adapted to the culture environment (Lorenzen et al., 2012).

All these previous studies emphasized the importance of linking farm stressors and husbandry practices to animal biology in order to understand growth and mortalities in farms. A biometric study has already been performed on *H. tuberculata* indicating that length, width, weight, meat yield and gonad weight ratio as well as different growth parameters are highly correlated (Basuyaux, 1997). In addition, an immune screening profile was also carried out on *H. tuberculata* (Travers et al., 2008c). For abalone, among many immune parameters, the phagocytosis efficiency (Hooper et al., 2007; Travers et al., 2008b, 2008c) seemed to be a key parameter to predict survival in a rearing system. A diminution of phagocytosis efficiency is often induced by manipulation and environmental condition changes. In addition, study has shown a relation between disease susceptibility and gonadic development (Travers et al., 2008a).

In complement to physiology, behavioural observations are also a useful tool to evaluate an animal’s adaptation to an aquaculture rearing system (Claireaux et al., 2015; Millot et al., 2010; Robinson et al., 2013). The righting test, which consists of measuring the time needed for an abalone to fully complete a righting movement after it has been placed upside down was used as a non-invasive tool to provide an evaluation of the energetic reserve of an abalone (Baldwin et al., 2007). Abalone species are generally sedentary, for example *H. iris* spend <6% of their time moving (Allen et al., 2006). *H. tuberculata* is characterized by two patterns of behaviour: “wanderer” abalone move and occupy hides, showing a more pronounced homing behaviour than “sedentary” abalone (Cenni et al., 2009). More movements were also observed during the 24 h following an acute stress (Robinson et al., 2013). In addition, this locomotion is negatively correlated with food availability (Allen et al., 2006).

This study presents a screening of the *Haliotis tuberculata* biology under farm stressors. The first aim was to describe production, physiological and behavioural traits of *H. tuberculata* comparing wild and unselected farm stocks. The second aim was to understand which behavioural and physiological traits were related to growth and survival capacity in stressful conditions, using multivariate analysis.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Farmed adult *H. tuberculata* ($n = 60$ abalones in total, 68 ± 4.0 mm total shell length, 3.5 years old) were sampled randomly from 9 sea-

based breeding structures of the France *Haliotis* abalone farm ($48^{\circ}36'46N$; $4^{\circ}33'30W$, Plouguerneau, France) in winter. This farm started in 2004. The France *Haliotis* stocks resulted from systematic mating between wild and farmed broodstock, mainly to avoid inbreeding. Wild adult *H. tuberculata* ($n = 60$ abalones in total, 71 ± 4.0 mm total shell length, age unknown) were also collected the same day by diving in two areas next to the cages, separated from them with at least 100 m of sandy bottom. In addition, farmed stocks could be easily identified with the green coloration at the apex, distinctive of juvenile feed with *Ulva lens* in France *Haliotis* hatchery. Both farmed and wild abalones were placed in bags containing circular black plastic oyster seed collectors (diameter: 140 mm) and transported to the land-based laboratory. They were placed in experimental tanks for 3 weeks before transferring them to sea-growing structure for 6 months.

2.2. Experimental set-up

The experimental tanks were 4 grey flat sub-square epoxy painted fibreglass tanks ($1.1 \times 1.1 \times 0.20$ m, water volume = 100 L) with rough plastic strips on the edges to prevent escape. Each tank was supplied with $75 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ of $3 \mu\text{m}$ mechanically filtered seawater (average $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and an aeration system was placed in each tank. Ten pairs of oyster seed collectors were uniformly distributed along the tank edges to be used as hiding places. The light dark regime was adjusted to the seasonal rhythm 10:14 h (Light from 08:30 to 18:30). To avoid stressful conditions during light changes, 30 min dawn (8:00 to 8:30) and dusk (18:30 to 19:00) transitions were regulated using a dimmer (Gold Star, Besser Elektronik, Italia). Tanks were cleaned twice a week using a hose and $25 \mu\text{m}$ filters changed every day. The algae *Palmaria palmata*, *Saccharina latissima*, *Laminaria digitata* and *Ulva lactuca* were placed *ad libitum* in plastic boxes in the middle of the tank. All tanks were continuously videotaped with 4 digital cameras (TS-WD6001HPSC, Sygonix GmbH, Germany), linked to a 24 h recording device (TVVR 40021, Abus, Germany). The righting tests were video-recorded for 4 min with a camcorder (Sony, HDR-XR155).

The sea-based growing experiment took place in Allibert. The growing structure was composed of 4 square compartments ($1 \text{ m} \times 1.2 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$) designed for abalone rearing. Each compartment contained 10 rows of 41 black plastic oyster collectors. Abalones were fed once a month with *Laminaria digitata*, distributed *ad libitum* in the compartment.

2.3. Experimental design

Behavioural and physiological measurements were performed in the laboratory from the end of December 2013 to February 2014 with 3 repetitions. For each repetition, 2 tanks containing farmed abalone and 2 tanks containing wild abalone ($n = 10$ abalone per tank) were used. After gently detaching the abalone with a spatula from the transport collectors, length and weight were measured and abalones were individually marked with a reflective tag and a numbered plastic tag attached with cyanoacrylate glue to their shell (Shepherd and Cannon, 1988) before they were placed in the experimental tank.

Observations were made during three stress periods that were imposed in the experimental tanks, corresponding to three stressors regularly experienced during husbandry procedures:

- Habituation period (day 1 to 7) corresponded to the period of recovery from transport and handling. This is considered a mild stress. Previous observations have shown that the shipping stress and the tagging stress have no impacts after 3 days (Hooper et al., 2011).
- Over-density period (day 8 to 15): 52 additional abalones were added day 8 in order to induce a high-density stress (62 abalones/m^2). The 52 non-experimental abalones were removed day 15.
- Post-acute stress period (day 15 to 21): on day 15, abalones were detached and shaken for 20 min in air, which is a common stressor

experienced by abalone during the screening process on farms (Hooper et al., 2011). After 1 h in air, they were returned to their tank. After the stress, the abalones were left undisturbed until day 21. The phagocytosis measurement and righting tests were performed on day 21 in order to evaluate the basal immunological status and behavioural response before returning to the sea-structures. A 5-day period is enough to get a return to phagocytosis basal situation after an acute stress (Hooper et al., 2011).

After the laboratory stress measurements (T0 = beginning of the growth period), abalones were placed in the sea growing structure with a low density (5 abalones/m²) for 2–3 months. The T0 is specific of the repetition (T0 of repetition 1: end of December; T0 of repetition 2: middle of January; T0 of repetition 3: beginning of February). In April (T3 = 2–3 growth months achieved), the sea-growing structure was brought to the farm. Abalones were gently detached. Weight, length, visual gonad index and survival were determined for each abalone before they were returned to the standard rearing density (50 abalones/m²) in the sea-growing structure. In June (T6 = 6 growth months achieved), they were brought back to the experimental set-up, measured for growth and kept for 10 days in the experimental tank before dissection (Fig. 1).

2.4. Growth, meat yield rate and mortality

Individual weight (W) was measured at T0, T3 and T6 to estimate growth. The first growth rate ($Gw \cdot m_{0-3}$) is related to the capacity for growth recovery after acute stressors, the second growth rate is related to the usual farm rearing conditions ($Gw \cdot m_{3-6}$).

$$Gw \cdot m_{0-3} = ((W_{T3} - W_{T0}) / \text{NbD}) \cdot 30$$

$$Gw \cdot m_{3-6} = ((W_{T6} - W_{T3}) / \text{NbD}) \cdot 30$$

Where: NbD is the number of days in the sea-growing structure, specific for each repetition according to the date of return to the sea-growing structures.

Abalones were dissected at T6, separating the foot from the viscera, the head was also removed from the foot. The foot was weighed (*Foot*). All the weights presented are wet weights. The meat yield rate (*FootR*) was determined using the formula (Geber, 2013):

$$\text{FootR} = \text{Foot} / W_{T6}$$

Mortalities were monitored over time. A rank variable was used with 5 modalities (*SurvivalR*): 0 = Abalone dead at the end of the 3-week laboratory period, 1 = abalone dead before T3, 2 = abalone dead between T3 and T6, 3 = abalone dead during summer observations, and 4 = abalone alive at the end of the experiment.

2.5. Behavioural measurement

The videos were analyzed with the software VLC mediaplayer. The movement behaviour was studied for 48 h over the 5th and 6th days of the habituation period. The total duration of movement per day ($\text{MoveD} \cdot \text{hour}^{-1}$) was measured. In addition, animals were attributed to one of two categories: 1 for “wanderer” with more than one hour of movement per day (which represented 50% of the abalone) and 0 for “sedentary” if they moved less (Cenni et al., 2009).

The righting test was performed on the last day of the post-acute stress period, just after a haemolymph sampling procedure (see below). Abalones were gently placed on their back in the center of a white 12-L bucket containing 5 L of sea water at the same temperature as the tanks. The righting movement latency ($\text{Rightinglatency} \cdot \text{min}^{-1}$) was measured from the time of the abalone’s placement in the bucket to when the abalone had fully turned over. If an abalone did not successfully turn over in a delay of 4 min, a latency of 4 min was recorded for this abalone.

2.6. Phagocytosis efficiency measurement

Haemolymph was collected on the last day of the 3-week laboratory experiment. Abalones were gently detached from the tank. Haemolymph (about 0.2 mL per individual) was collected from the pedal sinus using 1 mL syringes and 25 G x 1/2 needles in <1 min to avoid excessive stress. It was transferred into a vial and kept on ice. Samples were treated just after collection to avoid aggregation. To measure a phagocytosis efficiency, a protocol adapted from Travers et al. (2008c) was followed. In summary, 50 µl of haemolymph was deposited into a 24-well plate containing 50 µl of sterile seawater. Haemocytes were allowed to adhere for 15 min at 18 °C. Fluorescent beads (fluoresbrite YG Microspheres 2.00 µm, Playscale, 1:100 in distilled water) were added. After 2 h at 18 °C, supernatants were removed and 100 µl of trypsin (2.5 mg · mL⁻¹ in AASH) was added to detach the adherent cells. Plates were shaken for 10 min. Then 100 µl of 6% formalin was used to stop the reaction. The phagocytosis efficiency (*Phago*, %) was defined as the percentage of haemocytes that had engulfed 3 or more beads. The phagocytosis efficiency analyses were performed on a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, France) equipped with a 488 nm laser. Cells were counted for 60 s. Data analysis was done with WinMDI software.

2.7. Gonadic development measurement

Visual gonad index (*VGI*) was measured at T3 (*VGI3m*). The gonad was observed on the posterior of the ventral side, in the middle of the bilateral axis, using a modified protocol from Uki and Kikuchi (1982) (Table 1).

At T6, the gonadic tissue above the digestive gland was sliced off with a scalpel in order to separate the gonad from the digestive gland and weighed (*Gon*). A gonad weight ratio was calculated

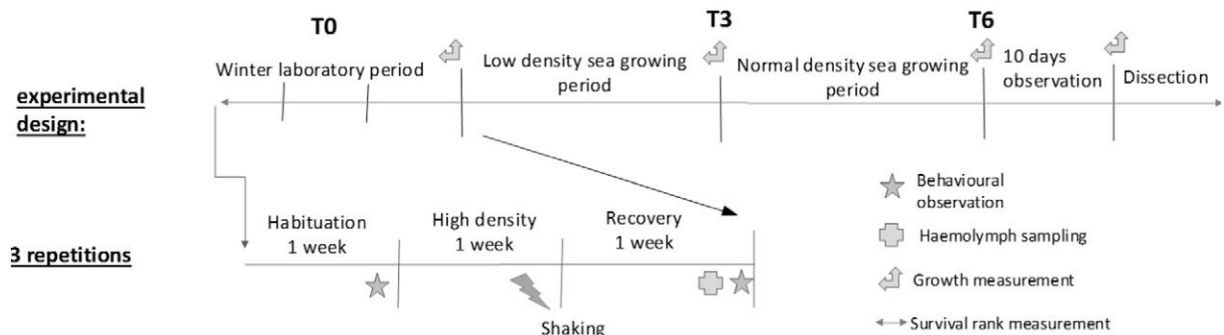


Fig. 1. Details of the experimental procedure during the laboratory period and sea growing period. The variables measured and used in the analysis are listed.

(GonR):

$$\text{GonR} = \text{Gon}/W_{T6}$$

2.8. Statistical analyses

Because the Shapiro-Wilk normality test and Levene's test for homogeneity of variances could not be verified, a bivariate Wilcoxon – Mann-Whitney test was used to compare the traits of the wild and farm populations. Because no difference was observed for most of the variables, data from wild and farm population were pooled for subsequent analysis (PCA and variation coefficient).

In order to compare the different quantitative traits, the mean and the coefficient of variation (standard error divided by the mean) were calculated.

Statistical analyses were performed with R 3.0.3 software, using the FactoMineR package to plot the Principal Component Analysis (PCA) output (Lé et al., 2008). All the variables were reduced and scaled before the implementation for the two PCA models. A regularized iterative imputation was performed with the package missMDA for missing data, representing 8% of the data (Josse et al., 2013). Iterative imputation can create false correlations in the dataset. To reduce this risk, the recommended methodology of Quinn and Keough (2002) was followed.

For the PCA performed on mortality, the complete data set was used with 120 individuals. The second PCA model performed on growth and dissection was implemented on the 43 individuals that survived after the 6 month experiment.

The PCA scores on the first and second component were recorded for all abalone and an ANOVA test was performed on the score in the PCA components to study the differences between origin (wild/farm) of the abalone. To control the meaning of relationships observed between two related traits in the PCA, a linear model was performed on the original dataset ($n = 120$) after a verification of the residual normality.

3. Results

3.1. Comparison between wild and farmed abalone

There were significant differences in total duration of movement per day and righting movement latency between wild and farmed abalone ($P < 0.001$): wild abalone moved on average 2.1 h per day while farm abalone moved for 1.1 h. Wild abalone took more time to do their righting movement than farmed ones ($P < 0.001$). No differences were observed between wild and farmed abalone for the other traits (Table 2).

The 3-week stress period resulted in a cumulative mortality of 45% at three months and 77% at six months. The two stocks had the same mortality profile during the experiment (Fig. 2).

Table 1

Visual gonad index (VGI_{3m}) measured on the posterior of the ventral side in the middle of the bilateral axes.

Adapted from Uki and Kikuchi (1982).

Value of VGI	Criteria description
0	No gonad can be observed on the digestive gland. The sex of the abalone cannot be determined
1	Gonad is observable but flat
2	Gonad is inflated and reach the level of the shell
3	Gonad is developed above the level of the shell
4	Gonad is observable without removing the foot of the abalone

3.2. Screening summary

Because no difference was observed for most of the variables, it was decided to present the screening summary as one set of data. The abalone moved on average for 6% of the day: 16% of the abalone did not move at all and 35% of the population moved for less than one hour per day while the other 49% moved on average for 2.5 h per day (Fig. 3).

The mean and coefficient of variation were calculated for each quantitative trait in order to determine the variability of a trait in the population studied (Table 2). The growth variables were the two most variable traits, followed by behavioural traits. The phagocytosis efficiency and dissection traits were the least variable (Table 2).

3.3. Relationships of traits with later survival in sea cages

A PCA model was performed with the variables recorded during the physiological and behavioural tests in winter and the survival rank during the next five months (Fig. 4). The first three components of the PCA explained 71% of the total variance (29% for the first component, 23% for the second component and 19% for the third component) (Fig. 4). The most important loadings on the first component were the phagocytosis efficiency (*Phago*, $\cos^2 = 0.53$), the initial weight (*WTO*, $\cos^2 = 0.43$) and the duration of movement (*Move·D*, $\cos^2 = 0.46$). This component may represent the immune and activity traits. The most important loadings on the second component were the latency of success in the turn over test (*Righting.latency*, $\cos^2 = 0.66$) and the survival rank of an abalone (*SurvivalR*, $\cos^2 = 0.30$). Abalones which had difficulties in turning over after the stress exposure were the quickest to die during the next 6 months. This component may indicate survival is associated with the energy level at the end of the stress period. Wild abalone had a higher average individual loading in the second component than farm abalone (ANOVA, $P < 0.05$) (Fig. 5). Wild abalone has in average a lower survival rank and a higher righting latency.

Phagocytosis efficiency and survival are not related in our data set. The map of individuals (Fig. 5) shows no clear discrimination between wild and farmed abalone based on these variables.

3.4. Relationship of traits with later growth in sea cages

A PCA model was performed on the 43 individuals who survived using the variables recorded during the physiological and behavioural tests in winter, the growth rates measured three months and 6 months after the winter stress period, and the dissection traits. The first three components of the PCA explained 61% of the total variance in the data set (27% for the first component, 22% for the second component and 11% for the third component) (Fig. 6). The most important loadings on the first component were the growth in weight during the first three months of rearing (*Gw·m₀₋₃*, $\cos^2 = 0.58$), the initial weight (*WTO*, $\cos^2 = 0.63$) and the movement duration per day (*Move·D*, $\cos^2 = 0.32$). The abalones with the highest growth in weight during the three months following the stress period were the ones characterized by a longer movement duration during the behavioural observation. This may represent an association between growth and movement traits. The most important loadings on the second component of the PCA model were the gonad weight ratio six months after the stress period (*GonR*, $\cos^2 = 0.54$), the visual gonad index three months after the stress period (*VGI_{3m}*, $\cos^2 = 0.39$), the phagocytosis efficiency at the end of the stress period (*Phago*, $\cos^2 = 0.39$) and the growth between three and six months after the stress period (*Gw·m₀₋₃*, $\cos^2 = 0.24$). This represents an association between immune competence, spring early gonad development, summer gonad maturity and summer growth.

Table 2
Mean (\pm SEM), and coefficient of variation of all the quantitative variables recorded in the study for the two stocks.

Variables	n (wild–farmed)	Wild	Farmed	Coefficient of variation (all abalones)	Origin effect
<i>Laboratory measurements</i>					
Weight at T0 (g)	60–60	49.5 \pm 1.57	48.7 \pm 0.85	0.2	NS
Righting movement latency (min)	53–57	1.3 \pm 0.06	1.0 \pm 0.05	0.7	$P < 0.001$
Total duration of movement per day (h/day)	60–60	2.1 \pm 0.20	1.1 \pm 0.13	1.0	$P < 0.001$
Phagocytosis efficiency (%)	50–48	24.2 \pm 0.92	26.3 \pm 0.78	0.8	NS
<i>3 and 6-month period measurements</i>					
Survival rank	60–60	2.1 \pm 0.12	2.4 \pm 0.12	0.5	NS
Visual gonad index at T3	30–42	1.4 \pm 0.72	1.7 \pm 0.67	0.4	NS
Gonad weight ratio (% of the total wet body mass)	18–26	7.0 \pm 2.03	8.9 \pm 1.86	7.3	NS
Meat yield rate (% of the total wet body mass)	18–26	30.2 \pm 2.15	34.3 \pm 3.36	3.9	NS
Growth rate between T0 and T3 (g.month)	30–42	−0.9 \pm 0.15	−0.8 \pm 0.10	1.4	Ns
Growth rate between T3 and T6 (g.month)	23–30	1.1 \pm 0.17	0.7 \pm 0.11	1.6	NS

3.5. Quantitative assesment of phenotypic relationships

The correlation between survival rank (*SurvivalR*) and righting latency (*Righting.latency*) was not significant. The linear model applied to the traits associated with later growth in the sea cages showed that the righting latency (*Righting.latency*) and the total movement duration per day (*Move*) were correlated with the growth rate in weight during the spring ($Gw \cdot m_{0-3}$) (respectively, $P < 0.02$ and $P < 0.05$). These two variables explained 11% of the total spring growth variance. The visual gonad index (*VGI3m*) was negatively correlated with the growth in the summer ($P < 0.02$) and a tendency existed between this summer growth and the gonad mass ratio (*GonR*) at the end of the experiment ($P = 0.057$). These two variables together explained 15% of the total summer growth variance.

4. Discussion

The mean values obtained for important traits (phagocytosis efficiency, gonad weigh ratio, meat yield rate) are close to those found in similar situations in *Haliotis tuberculata* (Basuyaux, 2000; Basuyaux et al., 1998; Travers et al., 2008b). However, the variance is high for several traits. The two growth traits present the highest variability, which could indicate there is a high potential gain for a future selective process, as has been the case for other abalones in the world (Elliott, 2000). Movement behaviour is another trait characterized by a high variability. In contrast, phagocytosis presented relatively little variation. The low variability observed may indicate that the selective pressure is high on this trait because it is related to disease susceptibility (Travers et al., 2008a) and to others important parameters such as acquisition and transportation of nutrients and metabolites, and elimination/repair of tissues.

Farm and wild abalones exposed to farm stressors could only be discriminated with two behavioural traits, suggesting that abalones are at the very beginning of their domestication process in the studied farm

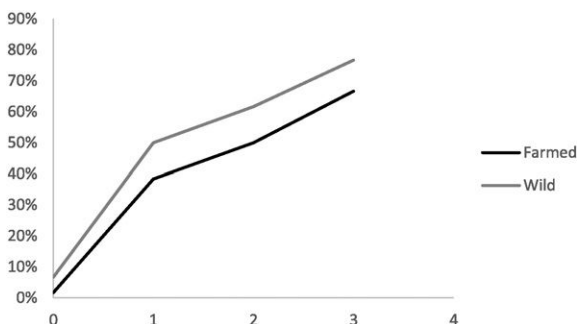


Fig. 2. Cumulative mortality in % for the two stocks during the experiment.

stock. Consistent behavioural changes are expected to be some of the first changes linked to culture condition responses (Huntingford, 2004). This is associated with the ‘domestication syndrome’ with a change in resource allocation towards growth and reproduction and away from predator avoidance and foraging activity, important in complex natural environments (Lorenzen et al., 2012; Thorpe, 2004). Wild abalone spent more time moving during the night period at the end of the habituation period and took more time to turn themselves over in the test at the end of the 3-week experimental period, before returning to sea-structure. This increased movement could be linked to a higher stress response to the new environment (Robinson et al., 2013). Movement in control situations can also be an indicator of foraging motivation. Wild abalone might be motivated to gain food either due to an active strategy of foraging, as is often observed in wild individuals in contrast to domesticated ones (Gustafsson et al., 1999). This difference can also result from an effect of reduced glucose level associated with hunger, leading to increased foraging activity (Carefoot et al., 1993). A scale of six levels of domestication can be used to classify the domestication rank of reared fish versus wild animals (Teletchea and Fontaine, 2014). Because farmed abalones were obtained with wild progenitors, they only reach the third level of the domestication process on this scale. In other words, these farm abalone can be considered as ‘captive types’ (Lorenzen et al., 2012) with domestication dominated by inadvertent responses to the culture conditions. Genetic changes are probably small due to the constant use of wild progenitors while alteration of development is probably the most important mechanism of domestication at that stage. This result has justified the production of a PCA model with the two populations pooled. Indeed, in the first PCA model, wild and farm stocks could not be discriminated. However different loadings for wild and farm stocks were obtained in the second component indicating that wild abalone moved twice as much and needed twice as much time to turn over than the farm abalone.

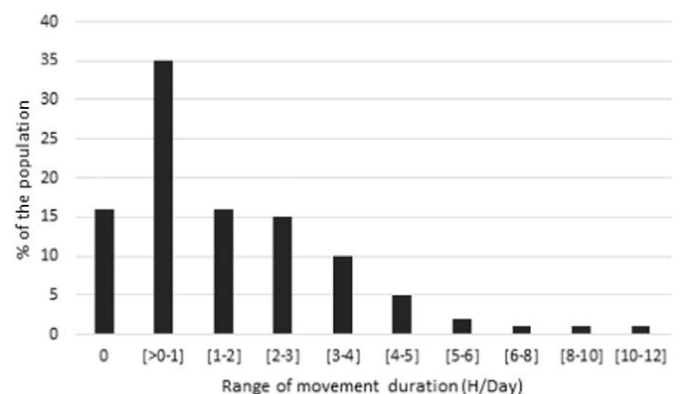


Fig. 3. The distribution of total duration of movement per day in the population ($n = 120$).

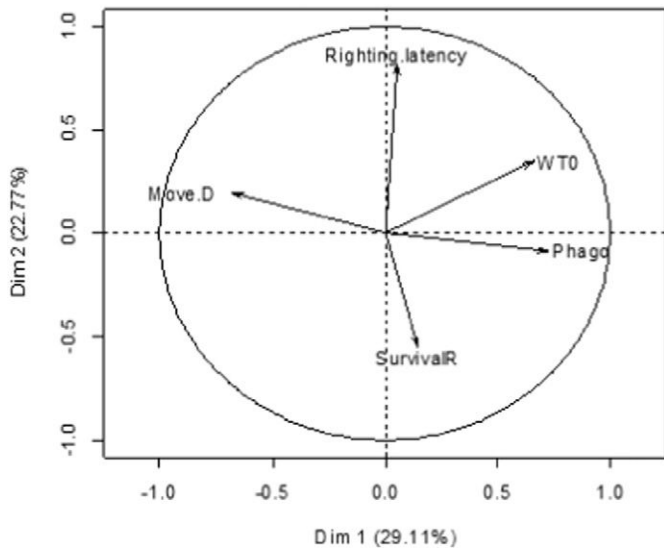


Fig. 4. Principal Component Analysis (PCA) plot of selected phenotypic parameters in relation to survival ($n = 120$): *SurvivalR* = survival rank, *Move.D* = average duration of movement per day, *WT0* = weight at the beginning of the experiment, *Righting latency* = time to realize a righting movement, *Phago* = phagocytosis efficiency at the end of the stress period.

A high mortality rate (45%) was observed in the first 3 months of the recovery period after the stress procedure. Wild and farmed abalones had the same cumulative mortality profile and no significant differences in survival rank were reported. Abalones are sensitive to farm stressors (Hooper et al., 2007; Travers, 2008) with high mortalities regularly observed following farm procedures. The stressors applied in this study are commonly encountered by abalone during farm processes. In addition, haemolymph sampling probably added a supplementary acute stress, strengthening these effects. Mortality is often observed after high-density condition exposure (Huchette et al., 2003; Travers et al., 2010), moving to a new environment and handling (Hooper et al., 2011; Ragg et al., 2000), and shaking (Malham et al., 2003). A rate of 45% mortality after normal aquaculture procedures also shows that European abalone is at the really early stage of his domestication process.

The probability of survival of abalone was related to the time to right themselves. In the literature, the righting test has been shown to be a good indicator to measure the metabolic capacity of an abalone (Baldwin et al., 2007). This result might indicate that after three

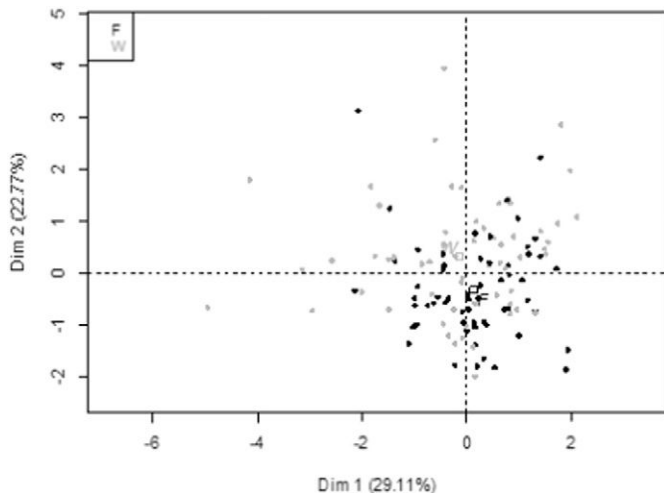


Fig. 5. Map of individual abalone in relation to the first two principal components. Wild abalone: grey dots; farmed abalone: black dots.

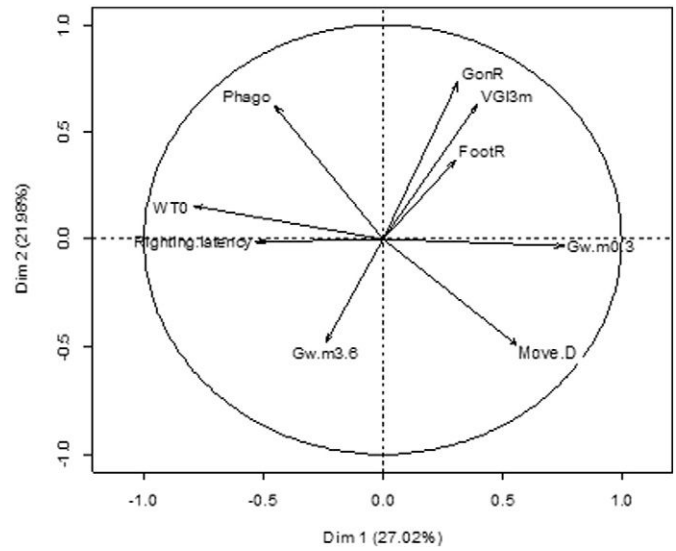


Fig. 6. Principal component analysis plot of selected phenotypic parameters: *Phago* = phagocytosis efficiency at the end of the stress period, *GonR* = the gonad weight ratio at T6, *VGI3m* = visual gonad index at T3, *FootR* = foot weight ratio, *Gw.m0_3* = growth in weight per month between T0 and T3, *Gw.m3_6* = growth in weight per month between T3 and T6, *Move.D* = total duration of movement per day, *Righting time* = time needed for abalone to turn themselves over at the end of the stress period, *WT0* = weight at the beginning of the experiment.

weeks of stress, abalone able to right themselves quickly in winter have a good energetic reserve and thus would be resistant to stressors and survive in the rearing process. The righting capacity may be a good proxy of stress resilience. The fact that there was no significant correlation between righting time and survival rank could be explained by the fact that this variable had only 5 ranks. It is possible that with a more precise measure of the mortality a better correlation would have been found. In addition, this test should be interpreted with some care in the context of our experiment. It was performed just after haemolymph sampling, which represent an acute stress. It represents an integrative proxy of the 3-week procedure and acute sampling stress procedure, before returning to sea-structure.

The phagocytosis rate after one week of stress recovery was unexpectedly not related to survival over a long period. This result is in contradiction with several results reported in the literature: phagocytosis depression was reported to be linked to increased mortality (Hooper et al., 2011, 2014; Travers et al., 2009). A decrease of phagocytosis efficiency has often been reported one hour after the application of a stressor (Cheng et al., 2004b; Hooper et al., 2011; Malham et al., 2003). This may be followed by an increase of phagocytosis efficiency above the basal level before it returns to the initial level within in a day after a shaking stress (Malham et al., 2003; Travers et al., 2009). In our case, the phagocytosis rate can be considered as a measure of the result of three weeks of important chronic and acute stress. It might reflect only the chronic stimulation of the immune system by stressors over this period, rather than a short term elevation above the basal level.

In the first three months of rearing in the farm structures, most of the abalone which had survived lost weight. This might be an indication of the mobilization of their foot reserves during the stress procedures. A loss in weight after a manipulation and fishing is usually observed for abalone (Gorfine, 2000; Ragg et al., 2000). It can still be observed 50 days after the manipulation (Day and Fleming, 1992). In this study, growth in weight in the first three months can be considered as a variable that indicates recovery capacity after the application of acute stressors. The growth observed the next three months indicates a complete stress recovery and corresponds to normal growth for mature adult *H. tuberculata* (Basuyaux, 1997).

Growth variables were positively related to the duration of movement per day observed in winter in the laboratory. To our knowledge, no previous studies have looked at the relationships between growth and daily activity in abalone. Two kinds of movement strategy have been observed in abalone. Some abalone stay in the same place and behave as “sedentary” while others move more frequently and behave as “wanderers” (Cenni et al., 2009). Here no clear categories were found. >50% did not move at all or moved for less than one hour per day. Thus it seems inappropriate to classify the population as wanderer/sedentary. High variability of movement was present in our experiment. More active abalone during the habituation period had a higher growth rate during the subsequent 6-month period. These animals might access more of the food in a cage and thus have better growth than more sedentary abalone. Another hypothesis is that abalones that were highly motivated for food moved more to get this food. Even if locomotion represents an important metabolic cost, adhering to the substratum appears to be costly as well (Donovan and Carefoot, 1998). Thus greater activity of abalone could signal that active abalone will be more valuable to the farm rearing, although the superiority of their trophic efficiency still needs to be studied. The hypothesis of a relationship between growth and the quantity of movement observed is supported by the fact that the offspring of animals selected on the basis of better growth seem to move more (Robinson et al., 2013). In this study no feeding behaviour was observed during the 48 h observation, probably due to the low winter temperature. A longer observation period or an analysis performed in spring or summer time might be more appropriate to study the exact relationship between activity strategy, feeding behaviour, feeding efficiency and growth.

Another behavioural variable, the time taken to right themselves after the 3 weeks of stress, was associated with a better growth during the first 3 months. As described above, the quickest abalones to right themselves were probably the abalone with the highest energy level and these were more able to resist the stress procedures (Baldwin et al., 2007).

A relation was observed between gonad development and the growth over 3-months in summer: animals which had the greatest gonad development were those with the lowest growth. This result is expected, as mature abalones allocate energy to gonad development, with a concurrent reduction of growth (Bilbao et al., 2012; Roussel et al., 2011). In addition, a positive relationship was observed between the visual gonad index (VGI) measured at the end of the spring and the weight of the gonad during summer. The early onset of gonad development is also probably linked with the intensity of energy allocation to the gonad during the summer. VGI may be a useful non-invasive measurement of *H. tuberculata* maturation (Uki and Kikuchi, 1982). It was found that mature abalone allocate 40% of their energy to gonad development, which may involve a high economic loss if the foot is the only part of the abalone sold (Peck et al., 1987). In order to boost the production of larger abalone, selecting abalone with delayed maturation and reduced VGI might be a useful selection strategy.

The analysis of the relationship between the growth, physiological and behavioural characteristics was performed only on the surviving abalone. This might have biased the results. However, the coherence of the relationship observed between phagocytosis efficiency and duration of movement in the two PCA models indicates that if a bias exists, it is relatively low. The initial weight was controlled at the beginning of the experiment but some differences remained between individuals. This variable was included in the analysis in order to test if bigger animals were also more mature, but this was not the case in this study.

5. Conclusion

The relationships of 10 behavioural and physiological variables with survival and weight gain after application of important stressors were studied in order to provide a better understanding of *Haliotis tuberculata* biology during early domestication stage. After a period of stress, the

capacity of an abalone to perform a righting movement was shown to be linked to better survival and was related to a smaller loss in weight during the recovery period. This test could be used to assess the resiliency of an abalone to farm stressors. Greater movement of abalone in winter was also linked with better growth. Active abalone may be more able to access the food in sea rearing structures. Even if the heritability of behavioural traits is commonly low, they were reported to be significantly different from 0 for Australian abalone farmed stock (Robinson et al., 2013). Behavioural traits could be used in a selective breeding plan in addition to production traits. Moreover, important individual variability was observed in this study which might indicate potential improvement if a selection process using these traits was implemented (Cenni et al., 2009).

Acknowledgements

The authors would like to thank the team of France Haliotis, Xavier Lesage, Frederic Laurans, Mickael Gleeson, Iain McKensy, and Maryvonne Leroux for the provision and the care of the animals, and the assistance during the experiment.

In addition, they would like to thank the LEMAR diving team for collecting wild abalone in difficult winter conditions.

Thanks also go to Prof Mick Keough who helped with the analysis.

This work was conducted in the context of a PhD partially funded by France Haliotis and ANRT (CIFRE No. 2014 0643).

References

- Allen, V., Marsden, I., Ragg, N., Gieseg, S., 2006. The effects of tactile stimulants on feeding, growth, behaviour, and meat quality of cultured Blackfoot abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture* 257, 294–308.
- Baldwin, J., Elias, J.P., Wells, R.M.G., Donovan, D.A., 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 342, 213–225.
- Basuyaux, O., 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi fermé, Syndicat mixte de l'équipement du Littoral. Université de Caen Basse Normandie, p. 239.
- Basuyaux, O., 2000. Growth rate of the European abalone, *Haliotis tuberculata*, fed an artificial diet (Adam & Amos) and macroalgae. Retrieved from http://www.adamos.com/olivier_basuyaux.htm (on 15/09/2014).
- Basuyaux, O., Mathieu, M., Day, C., 1998. Effects of salinity on diet and growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the abalone *Haliotis tuberculata*. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 123, 141–150.
- Bilbao, A., Uriarte, I., Viera, M.D., Sosa, B., Fernandez-Palacios, H., Hernandez-Cruz, C.M., 2012. Effect of macroalgae protein levels on some reproductive aspects and physiological parameters for the abalone, *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846). *J. World Aquacult. Soc.* 43, 764–777.
- Camara, M.D., Symonds, J.E., 2014. Genetic improvement of New Zealand aquaculture species: programmes, progress and prospects. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 48, 466–491.
- Carefoot, T.H., Qian, P.Y., Taylor, B.E., West, T., Osborne, J., 1993. Effect of starvation on energy reserves and metabolism in the northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture* 118, 315–325.
- Cenni, F., Parisi, G., Gherardi, F., 2009. Use of space and costs/benefits of locomotion strategies in the abalone, *Haliotis tuberculata*. *Ethol. Ecol. Evol.* 21, 15–26.
- Cenni, F., Parisi, G., Scapini, F., Gherardi, F., 2010. Sheltering behavior of the abalone, *Haliotis tuberculata* L., in artificial and natural seawater: the role of calcium. *Aquaculture* 299, 67–72.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004a. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 193–202.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C., 2004b. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235–243.
- Claireaux, G., McKenzie, D.J., Genge, A.G., Chatelier, A., Aubin, J., Farrell, A.P., 2015. Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 208, 1775–1784.
- Day, R.W., Fleming, A.E., 1992. The determinants and measurement of abalone growth. In: Shepherd, S.A., Tegner, M.J., Guzman Del Proo, S.A. (Eds.), *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 141–168.
- Donovan, D.A., Carefoot, T.H., 1998. Effect of activity on energy allocation in the northern abalone, *Haliotis kamtschatkana* (Jonas). *J. Shellfish Res.* 17, 729–736.
- Elliott, N.G., 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquac. Res.* 31, 51–59.
- Elliott, N., 2008. Abalone genetic research: Australian review and prospects. *J. Shellfish Res.* 27, 1005.

- Geber, M.E., 2013. Quantitative Assessment of Yield Traits Between Family Groups of the Cultured Abalone, *Haliotis midae*, During the Process of Canning. University of Stellenbosch, p. 74.
- Gordon, H.R., Cook, P.A., 2004. World abalone fisheries and aquaculture update: supply and market dynamics. *J. Shellfish Res.* 23, 935–939.
- Gorfine, H.K., 2000. Post harvest weight loss has important implications for abalone quota management. *J. Shellfish Res.* 19, 515.
- Gustafsson, M., Jensen, P., de Jonge, F.H., Illmann, G., Spinka, M., 1999. Maternal behaviour of domestic sows and crosses between domestic sows and wild boar. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 65, 29–42.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363–379.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., 2011. Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 315, 348–354.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., Goulias, J., 2014. Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevigata* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 432, 26–37.
- Huchette, S.M.H., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shellfish Res.* 23, 951–955.
- Huchette, S.M.H., Koh, C.S., Day, R.W., 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. *Aquaculture* 219, 457–470.
- Huntingford, F.A., 2004. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *J. Fish Biol.* 65, 122–142.
- Josse, J., Timmerman, M., Kiers, H.A., 2013. Missing values in multi-level simultaneous component analysis. *Chemom. Intell. Lab.* 129, 21–32.
- Lé, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 18.
- Lorenzen, K., Beveridge, M.C.M., Mangel, M., 2012. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biol. Rev.* 87, 639–660.
- Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W., Degnan, B.M., 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture* 259, 146–152.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool. A* 295A, 136–144.
- Millot, S., Péan, S., Leguay, S., Vergnet, A., Chatain, B., Bégou, M.-L., 2010. Evaluation of behavioral changes induced by a first step of domestication or selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach under repeated acute stress. *Aquaculture* 306, 211–217.
- Monget, P., Le Bail, P.-Y., 2009. Le phénotypage des animaux: le nouveau défi? *Renc. Rech. Ruminants* 16, 407–409.
- Peck, L.S., Culley, M.B., Helm, M.M., 1987. A laboratory energy budget for this ormer *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106, 103–123.
- Price, E.O., 1984. *Animal Domestication and Behavior*. CABI publishing ed.
- Quinn, G., Keough, M., 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Ragg, N.L.C., Taylor, H.H., Behrens, J., 2000. Stress and weight loss associated with handling in the blackfoot abalone, *Haliotis iris*. *J. Shellfish Res.* 19, 528–529.
- Rauw, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N., Grommers, F.J., 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56, 15–33.
- Rhode, C., Hepple, J.A., Jansen, S., Davis, T., Vervalle, J., Bester-van der Merwe, A.E., Roodt-Wilding, R., 2012. A population genetic analysis of abalone domestication events in South Africa: implications for the management of the abalone resource. *Aquaculture* 356, 235–242.
- Robinson, N., Smith, B., Cooke, I., Strugnell, J., 2013. A snail's pace: a preliminary analysis of the effects of stress and genetics on movement of *Haliotis*. *Aquaculture* 376, 25–35.
- Roussel, S., Huchette, S., Clavier, J., Chauvaud, L., 2011. Growth of the European abalone (*Haliotis tuberculata* L.) in situ: seasonality and ageing using stable oxygen isotopes. *J. Sea Res.* 65, 213–218.
- Shepherd, S.A., Cannon, J., 1988. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) X. Food and feeding in juveniles. *J. Malac. Soc. Aust.* 9, 21–26.
- Teletchea, F., Fontaine, P., 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish Fish.* 15, 181–195.
- Thorpe, N., 2004. European prehistory: a survey. *Antiquity* 78, 944–945.
- Travers, M.A., 2008. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université de Bretagne Occidentale.
- Travers, M.A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008a. Evidence of an immune depression in spawning period, at the basis of *Haliotis tuberculata* susceptibility to the pathogen *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800–808.
- Travers, M.A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800–808.
- Travers, M.A., da Silva, P.M., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008c. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Chang. Biol.* 15, 1365–1376.
- Travers, M.A., Meistertzheim, A.L., Cardinaud, M., Friedman, C.S., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 289–297.
- Uki, N., Kikuchi, S., 1982. Influence of food levels on maturation and spawning of the abalone, *Haliotis discus hannai* related to effective accumulative temperature. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* 45, 45–53.

Manuscrit 2 : Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection. Appl. Anim. Behav. Sci. 196, 13-21.

Authors

Sébastien Lachambre^{a,b}, Rob Day^{a,c}, Pierre Boudry^{a,d}, Sylvain Huchette^b, Antoine Rio-Cabello^a, Timothée Fustec^e, Sabine Roussel^a

Affiliations

^a LEMAR, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b France Haliotis, 29880 Plouguerneau, France.

^c School of Biosciences, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia 3010

^d Ifremer, UMR 6539 LEMAR (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Centre Bretagne, 29280 Plouzané, France

^e Institut Supérieur d'Agriculture, 48 boulevard Vauban, 59046 Lille, France.

Corresponding Author

Sébastien Lachambre

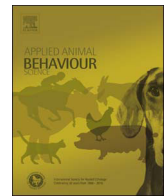
Phone (work): 0336 14 77 73 20

Email: les.lachambre@hotmail.fr



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Animal Behaviour Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/applanim

Review article

Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection

Sébastien Lachambre^{a,b,*}, Rob Day^{a,c}, Pierre Boudry^d, Sylvain Huchette^b, Antoine Rio-Cabello^a, Timothée Fustec^e, Sabine Roussel^a^a LEMAR, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifrer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France^b France Haliois, 29880 Plouguerneau, France^c School of Biosciences, University of Melbourne, Parkville, Victoria, 3010, Australia^d Ifremer, UMR 6539 LEMAR (UBO-CNRS-IRD-Ifrer), Centre Bretagne, 29280 Plouzané, France^e Institut Supérieur d'Agriculture, 48 Boulevard Vauban, 59046 Lille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Abalone aquaculture
Domestication syndrome
Behavioural adaptation
Responses to stress
Immune response
Farm stressors

ABSTRACT

Farming, and thus the domestication of *Haliotis tuberculata*, began recently. We compared the responses of unselected farmed and wild abalone to stressors that occur on farms. The aim was to determine if the farm environment had induced differences in the behavioural or physiological performances of the abalone. Thirty hatchery-born 3.5 year-old abalone and thirty wild ones were reared under standard farm conditions for 6 months and characterised for 19 traits related to growth, survival, behaviour and immunology. Behavioural and immunological responses to stressors differed between the two stocks. Farmed abalone retracted and swivelled less in reaction to a finger contact. Phagocytosis efficiency was reduced by shaking in abalone from both origins, but the farmed stock returned to the basal level after the recovery week, while wild abalone did not, and a rise of total haemocyte count after shaking and its return to a basal level after one week was only observed for the farmed stock. This indicates that both behaviour and immune responses following a stress have been affected by the farming practices. This suggests that a domestication process has already been initiated in the farmed stock. Our results may also be important for the success of any population enhancement based on hatchery-produced abalone as they raise the question of the capacity of abalone with a farmed origin to be adapted to the wild environment.

1. Introduction

Worldwide, farmed abalone stocks are in the early stages of their domestication process (Elliott, 2000). At the beginning of a domestication process, stocks may acquire specific traits to become more adapted to their captive environment as a result of the stressors or specific conditions in the farm environment (Lorenzen et al., 2012). As farming of these species has begun only recently, the study of behavioural and physiological responses to common stressors on farms may be useful both to improve the husbandry system and to study the domestication process.

Abalone are herbivorous marine gastropods that occur naturally in coastal waters of all continents. The European abalone *Haliotis tuberculata* is found on sheltered to exposed rocky shores between the intertidal and 10 m depth, where it leads a cryptic life (Forster, 1962). *Haliotis tuberculata* is exclusively nocturnal in the wild. It was reported

to move less than 10% of its time during the spring at 18 °C (Allen et al., 2006; Cenni et al., 2009). Like most abalone species, *Haliotis tuberculata* is highly sensitive to environmental changes (Cenni et al., 2010). Farm stressors, like high temperature or high density (Huchette et al., 2003; Hooper et al., 2014a), manipulations (Hooper et al., 2011a), shaking (Malham et al., 2003), high ammonia or low oxygen saturation (Cheng et al., 2004c) and air exposure (Ragg and Watts, 2015) are known to produce higher disease susceptibilities and subsequent mortalities or reduced growth. Abalone that can tolerate these rearing stressors are more suitable for producers (Robinson et al., 2013). But multiple stressors may occur in an abalone rearing system and their consequences are often observed after some delay. Thus it is important to observe abalone for a long enough period after the stress application when studying stress responses (Ragg et al., 2000; Ragg and Watts, 2015).

To quantify the degree of fish domestication in aquaculture, a 5-

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; PCA, principle component analysis; SEM, standard error to the mean; Df, degree of freedom; NS, non significant

* Corresponding author at: LEMAR, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifrer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

E-mail addresses: sebastien.lachambre@laposte.net, les.lachambre@hotmail.fr (S. Lachambre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2017.07.004>

Received 17 February 2017; Received in revised form 11 July 2017; Accepted 27 July 2017

0168-1591/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

level scale has been proposed (Teletchea and Fontaine, 2014). The level 0 is attributed to species that are only harvested by fisheries. 1, 2 and 3 are considered “pre-domestication phase” levels, where the life cycle is not closed in the farm. At level 3, the animals are grown in a farm, but wild animals are used as broodstock to produce larvae. At level 4, the larvae are produced using farm reared broodstock, and unintentional selection can occur progressively across the generations. At level 5, a selective breeding plan involving intentional selection is implemented leading to clear genetic differentiation between wild and farmed population.

For marine species in the pre-domestication phase, the impact of rearing environment on behaviour and physiology may be higher than for terrestrial species. Indeed most marine species have high phenotypic plasticity and rapid unintentional selection is facilitated by high fecundity and high mortality rates at early stages, imposed by the rearing system in the early phases of production (Taris et al., 2007; Lorenzen et al., 2012). Thus behavioural changes may occur quickly for these species. Indeed, immune and metabolic changes in fish, associated with differential expression of hundreds of genes have been observed after only one generation of domestication (Christie et al., 2016), and interestingly small changes of rearing environment with no intentional selection affect the behaviour differentiation between wild and farmed stock (Straus and Friedman, 2009). In Australia, abalone produced from broodstock selected for a high growth rate over three generations displayed higher mobility than wild specimens (Robinson et al., 2013). A loss of predator avoidance reactions in farm-reared abalone may explain the low survival success of some stock rebuilding or enhancement strategies, where farm-produced juveniles were used (Kojima, 1995). Experiments to investigate the feasibility of abalone enhancement strategies have underlined the importance of understanding their behaviour and ecology in order to maximize the chance of success (Dixon et al., 2006; Hansen and Gosselin, 2013). Predation has been identified as the highest source of mortality in outplanting strategies (Hansen and Gosselin, 2013), and hatchery stock of *Haliotis kamtchatkana* originating from wild broodstock showed an anti-predator behavioural deficit compared to wild stock (Hansen and Gosselin, 2016).

Previous work has shown that behavioural and physiological reactions to stressors are indicators of suboptimal conditions in abalone. For example, a deficit in calcium in the water can induce a reduction in sheltering behaviour (Cenni et al., 2010). Handling stressors like the sampling of an epipodium resulted in increased movement (Robinson et al., 2013). Physiological traits such as immunological parameters can also be used to assess the effect of such stress (Hooper et al., 2007; Ragg and Watts, 2015). In abalone, haemocytes are the main defense cells (Travers, 2008); the density of haemocytes in circulation and their phagocytic activity both vary after a stress. A shaking of fifteen minutes and heat stress both enhance phagocytosis rate, which then returns to the basal level within two days (Malham et al., 2003; Hooper et al., 2014a), and suboptimal rearing conditions or handling procedures induces a decreased phagocytosis rate, which returns to the control level within 5 days (Cheng et al., 2004b; Cheng et al., 2004c; Hooper et al., 2011a). Similarly, the total haemocyte count in samples of haemolymph was increased by shaking and heat stress (Malham et al., 2003; Hooper et al., 2011a; Hooper et al., 2014a), but decreased when the water quality decreased (Cheng et al., 2004a).

Based on this international research in abalone biology, the present study aimed to compare behavioural and physiological responses to farm stressors of farmed abalone (at domestication level 3) and wild European abalone (domestication level 0). Our objective was to assess if the early domestication process may have impacted abalone behaviour and physiology in a farming context. The eventual consequences on growth and mortality were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Farmed adult *H. tuberculata* ($n = 30$, 70.0 ± 4.0 mm total shell length, 3.5 years old) were sampled from 9 sea-based breeding structures of the company France Haliotis ($48^{\circ}36'46\text{N}$, $4^{\circ}33'30\text{W}$; Plouguerneau, France). Abalone were sampled randomly: an abalone was selected haphazardly, and then the 3rd closest neighbour to this animal was gently detached (“chipped”) from the surface and tagged. The animals of the experiment were the third generation bred in the farm, as a result of systematic mating in each generation between wild and farmed broodstock (either males or females were wild broodstock) to prevent any inbreeding. Thus this stock can be considered to be at domestication level 3 (Teletchea and Fontaine, 2014). A professional diver collected wild adults of similar size to the farmed ones ($n = 30$, 70.1 ± 4.0 mm total shell length, age unknown) on the same day, near to the sea-based rearing structures, separated from them by at least 100 m of sandy bottom. We assume that no genetic contamination occurs in this area because the biomass of abalone is low considering wild population and farm abalone are harvested before that they reach complete maturity (Clavier and Richard, 1986). Farm abalone have a green coloration at the apex, as a result of the juveniles feeding on *Uvella*. Shells of wild abalone were examined to make sure that they were not escapees from the farm. Individuals of this population can be considered at domestication level 0 at the beginning of the experiment (Teletchea and Fontaine, 2014). Both farmed and wild abalone were inspected when chipped, to ensure there were no cuts on the feet, and placed in bags containing circular black plastic oyster seed collectors as attachment surfaces (diameter: 140 mm). Wild abalone were transported to the laboratory in a 100 l seawater tank in less than one hour, to be held for 3 weeks in experimental tanks, during which time their responses to stressors were measured. Then they were transferred into sea-growing structures for 5 months.

2.2. Experimental tanks

The experimental tanks consisted of two grey, flat, sub-square, epoxy-painted fibreglass tanks ($1.10 \text{ m} \times 1.10 \text{ m} \times 0.20 \text{ m}$, water volume = 100 l) with rough plastic grass strips on the edges to prevent escapes. Each tank received 75 l h^{-1} of $3 \mu\text{m}$ mechanically filtered seawater at a temperature of $10^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ and an aeration system was placed in each tank. Ten pairs of oyster collectors as hides were uniformly distributed along the tank edges. Photoperiod was adjusted to the seasonal rhythm 10:14 h (light: 8:30 h to 18:30 h). To avoid stressful conditions during light changes, the light was adjusted slowly for 30 min during dawn (8:00 to 8:30 h) and dusk (18:30 to 19:00 h) using a dimmer (Gold Star, Besser Elektronik, Italia). Tanks were cleaned twice a week using a hose and the water filters were changed every day. *Palmaria palmata*, *Saccharina latissima*, *Laminaria digitata* and *Ulva lactuca*, algae that occur on the farm and on the Plouguerneau seashore, were placed in 4 plastic boxes in the middle of the tank. All tanks were continuously videotaped with 4 digital cameras (TS-WD6001HPSC, Sygonix GmbH, Germany), linked to a 24h-recording device (TVVR 40021, Abus, Germany).

2.3. Experimental stress factors

Growth, survival and behavioural and immunological traits were measured in the laboratory in three batches, from December to February. For each batch, 10 wild and 10 farmed abalone were carefully chipped with a spatula from their attachment surface, length and weight was measured and abalone were individually marked with a reflective tag and a numbered plastic tag attached with cyanoacrylate glue to their shell (Shepherd and Cannon, 1988). They were then placed by origin into two experimental tanks.

The laboratory observations (of responses to stressors) were made over three periods, corresponding to three stressors that are regularly experienced by abalone during husbandry procedures:

- The habituation period (days 1–7) corresponded to the period of recovery from the mild stress of transport and handling and living in the lab environment. Previous observations have shown that the stress of chipping and tagging has no impacts on assays of haemocytes after 3 days (Hooper et al., 2011b).
- The high density period (days 8–14): 52 additional individuals were added to each tank on day 8 in order to induce a high-density stress ($62 \text{ abalone m}^{-2}$) slightly higher than the densities normally used in the farm. This stress lasted one week, and the extra animals were removed on day 15.
- The post-acute stress period (days 15–21): on day 15, abalone were detached and shaken (three jolts per second of 3 cm height) with an oyster farm spat screener for 20 min in air, which mimicked the stress experienced by abalone during the screening process to separate sizes on farms (Hooper et al., 2011a). After one hour of emersion and shaking, they were put back into their tank. After the stress, the abalone were left undisturbed until day 21, when immunological parameters and righting time were measured.

When all batches were completed, the abalone were replaced in a grow-out sea-cage ($10 \text{ abalone m}^{-2}$) for 2.5 months (post-stress sea growing period, Fig. 1) at low density so that the maximum subsequent growth and survival would be expected. At the end of May (T3), the grow-out sea-cage was brought to the farm. Weight, length, visual gonad index and the survival of each abalone were determined before they were returned to the sea-cages at the normal rearing density ($50 \text{ abalone m}^{-2}$) for a summer growth period. In August (T6) after about 6 months of grow-out, they were brought back to the experimental tanks, measured to determine growth and observed for 10 days to measure survival capacity after the handling procedure in summer. This stress involved one hour of emersion due to the carrying of abalone from the sea to the hatchery and chipping to remove the abalone from the sea-cages and place them in the experimental tanks (Fig. 1).

2.4. Growth and survival

The variables are listed in Table 1 for reference. Length (L) was measured at T0, T3 and T6 for each batch of abalone and each origin

(Table 1). Growth and survival were calculated using the initial measurement times for each batch and period. The first growing period (G_{0-3}) is related to their ability to recover during and after acute stressors, the second growing period (G_{3-6}) occurred under the usual farm rearing conditions, although there is also a change between spring and summer between these growth periods.

$$G_{0-3} = 30 * (L_{T3} - L_{T0}) / (ND) \quad (1)$$

$$G_{3-6} = 30 * (L_{T6} - L_{T3}) / (ND) \quad (2)$$

Where: ND is the number of days between measurements.

Mortalities were recorded over time when abalone were found to be dead in the tanks or by the observation of empty shells in the rearing structures. A 5-level scale (*SurvRank*—see Table 1) was used for subsequent analysis.

2.5. Behavioural measurements

A reactivity test was performed on the last days of both the habituation period and the high density period between 16:30 and 19:00. It involved gently touching the abalone with a finger on the border of the abalone and running the finger clockwise around the abalone in 10 s. Reactions were observed before, during and for 5 s after touching the abalone.

- At rest, before touching the foot, the retraction of the foot was recorded as *Hab.RetractT0* for the habituation period and as *HighD.RetractT0* for the high density period (criteria: O if retracted, P if partially relaxed, N if relaxed). The foot was considered retracted when the shell was in contact with the edge or the bottom of the tank.
- While touching the abalone, the protective swivelling movement of the shell was recorded as *Hab.SwivellT1* for the habituation period and as *HighD.SwivellT1* for the high density period.
- After touching, the contraction of the foot was recorded as *Hab.RetractT2* for the habituation period and as *HighD.RetractT2* for the high density period.

A righting test was performed on day 21, the last day of the post-acute stress period, just after the haemolymph sampling procedure described below, in order to have a measure of the energy reserves of the abalone after the 3 weeks of stress and recovery (Baldwin et al.,

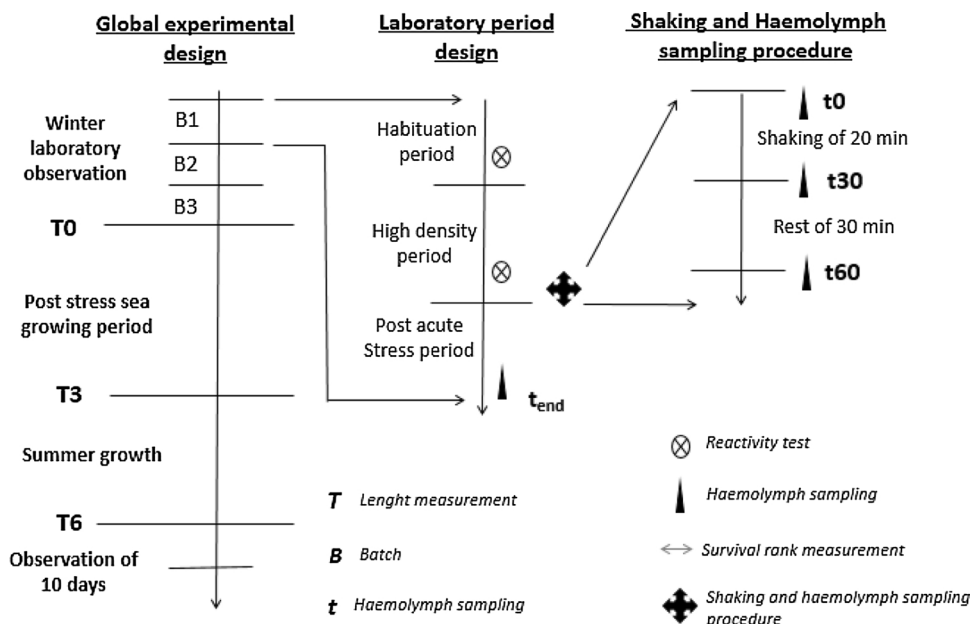


Fig. 1. Representation of the experimental design at three levels: the global experiment design, a batch of the laboratory period and the detail of shaking and haemolymph procedure.

Table 1
Description of the variables used in this study.

Variables categories	Variables names	Variables definitions	
Growth	<i>G₀₋₃</i>	Growth in length between T0 and T3, mm.month	
	<i>G₃₋₆</i>	Growth in length between T3 and T6, mm.month	
Survival	<i>SurvRank</i>	Survival Rank with 5 categories: 0 = Abalone dead during the laboratory period, 1 = abalone dead before T3, 2 = abalone dead between T3 and T6, 3 = abalone dead during the 10 days of summer observations, 4 = abalone alive at the end of the experiment	
Origin	<i>Origin</i>	Origin of the abalone study: farm abalone labelled F, and wild abalone W	
Behaviour	<i>Hab.RetractT0</i>	% of the population with a retracted foot, on day 7 of the habituation period (Hab.RetractT0.O = Abalone with foot retracted, Hab.RetractT0.N = Abalone with foot relax)	
	<i>Hab.SwivellT1</i>	% of the population that performed a swivelling movement in reaction to finger contact, on day 7 of the habituation period	
	<i>Hab.RetractT2</i>	% of the population that retracted the foot after a finger contact, on day 7 of the habituation period	
	<i>HighD.RetractT0</i>	% of the population with a retracted foot, on day 7 of the high density period	
	<i>HighD.SwivellT1</i>	% of the population that performed a swivelling movement in reaction to a finger contact, on day 7 of the high density period	
	<i>HighD.RetractT2</i>	% of the population that retracted the foot in reaction to a finger contact, on day 7 of the high density period	
	<i>Righting</i>	The time needed by the abalone to turn itself over when placed upside down	
	Physiology	<i>THC_{T0}</i>	Total haemocyte count before the shaking in cells/yL ⁻¹
		<i>THC_{T30}</i>	Total haemocyte count 30 min after the shaking in cells/yL ⁻¹
		<i>THC_{T60}</i>	Total haemocyte count 60 min after the shaking in cells/yL ⁻¹
<i>THC_{Tend}</i>		Total haemocyte count 6 days after the shaking in cells/yL ⁻¹	
<i>Phago_{T0}</i>		Phagocytosis efficiency before the shaking	
<i>Phago_{T30}</i>		Phagocytosis efficiency 30 min after the shaking	
<i>Phago_{T60}</i>		Phagocytosis efficiency 60 min after the shaking	
<i>Phago_{Tend}</i>	Phagocytosis efficiency 6 days after the shaking		

2007). The righting test was performed after the haemolymph sampling in order to have an unbiased measurement of the haemolymph parameters. Indeed handling can affect haemocyte parameters in less than 5 min and for up to 3 days (Malham et al., 2003; Hooper et al., 2011a). Abalone were gently placed on their back in the center of a white 12-L bucket containing 5 l of sea water at the same temperature as the tanks. The abalone were filmed for 4 min with a camcorder (Sony, HDR-XR155), to measure how long they took to right themselves, using the software VLC media player. The time to right themselves (*Righting*) was measured from the moment the abalone was placed in the bucket on its back to when it had fully turned over. If an abalone did not turn over in 4 min, a 4-min maximum time was recorded.

2.6. Immunological measurements

Measures of phagocytosis efficiency and total haemocyte count (THC) were performed on day 15, just before the shaking at the end of the high density period (*THC_{T0}*, *Phago_{T0}*), 30 min after the beginning of the shaking (*THC_{T30}*, *Phago_{T30}*) and 60 min after the beginning of shaking (*THC_{T60}*, *Phago_{T60}*). Final measures of THC and phagocytosis efficiency were also performed (*THC_{Tend}*, *Phago_{Tend}*) at the end of the experiment, on day 21. To reduce the direct impact of haemolymph sampling as a stressor, this measurement was performed by a single experienced person and if sampling was done in more than 1 min, the procedure was stopped in order to avoid excessive stress and mortality linked with the sampling.

Following the protocol of Duchemin et al. (2008), haemolymph (less than 0.2 ml per individual) was collected from the pedal sinus for these measurements, using a 1 ml syringe and fine needle. Each abalone was sampled in less than 2 min, by the same person. The sample was transferred into a vial and kept on ice. Samples were treated just after collection to avoid aggregation. Haemolymph was used for determining: (1) total haemocyte count (150 µl); (2) phagocytosis efficiency (50 µl). Both analyses were performed on a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, France) equipped with a 488 nm laser. Cells were counted for 60 s. The immunological parameters were calculated using WinMDI software.

For the THC samples, 150 µl of haemolymph was immediately added to 6% formalin (100 µl) and kept at 4 °C before analysis, when it was diluted into 200 µl of filtered and sterile seawater (FSSW) and incubated for 30 min in dark conditions with SYBR green fluorescent dye (4 µl, Molecular Probes, 10⁻³ dilution of the commercial stock

solution) before flow cytometry. Results were expressed as number of cells µL⁻¹.

To measure phagocytosis efficiency, a protocol adapted from Travers et al. (2008a) was followed. In summary, 50 µl of haemolymph was deposited into a 24-well plate containing 50 µl of sterile seawater. Haemocytes were allowed to adhere for 15 min at 18 °C. Then 30 µl of fluorescent beads (fluoresbrite YG Microspheres 2.00 µm, Plsyciences, 1:100 in distilled water) were added. After 2 h at 18 °C, supernatants were removed, 100 µl of trypsin (2.5 mgmL⁻¹ in AASH anti-aggregant solution) was added; and the plates were shaken for 10 min to detach the adherent cells. Then 100 µl of 6% formalin was used to fix the cells. Samples were kept at 4 °C before analysis by flow cytometry. The phagocytosis efficiency (*Phago*) was defined as the percentage of haemocytes that had engulfed three or more beads.

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R 3.0.3 software. After a verification of the assumptions of variance homogeneity and normal distribution, comparisons of growth measurements between the farmed and wild abalone were done using an ANOVA model with the origin as a fixed effect (wild versus farmed). Differences between the two origins on the qualitative behavioural variables were tested by a Fisher test. For each of the immunological variables, the first analysis was a repeated measure ANOVA to determine whether the timing of the measurement had an effect for each origin. A log transformation of the THC and a logit transformation of the percentage phagocytosis were used (Warton and Hui, 2011). The second step of this analysis was to compare the two origins at each time of measurement using a Kruskal-Wallis test (Day and Quinn, 1989) because the two variables did not satisfy the assumption of variance homogeneity.

A NMDS (non-parametric multi-dimensional scaling) was carried out with the package MASS on R 3.2.2, as a first step in a multi-dimensional analysis of the dataset. The aim of the NMDS was to select variables that discriminated the two groups (data not shown). Based on the ANOVAs of the variables for behaviour and immunology, those variables that were not significantly different between origins were progressively removed from the NMDS analyses, to find a combination of variables that clearly discriminated the origins at a stress level < 0, 05 with k = 2. The variable *SurvRank* was retained in the analyses, to see if there was any relationship between survival and the other variables. The second step was carried out by using the Factominer package

to plot two Multi Factorial Analyses (MFA) (Lé et al., 2008). The eight variables identified as discriminant in the NMDS analysis were reduced and scaled before the implementation of the two MFA models. The first analysis was focused on the 60 individuals observed in the laboratory period to study the survival process. This model was implemented with 4 quantitative variables (*SurvRank*, THC_{T60} , THC_{Tend} , $Phago_{Tend}$) and 1 qualitative variable (*Origin*). In this dataset 8% of the data were missing. In order to increase the degrees of freedom and use the information from all the individuals, a regularized iterative imputation was performed on the dataset, using the package *missMDA* (Josse et al., 2013). Iterative imputation can create false correlation in the dataset (Quinn and Keough, 2002). To reduce this risk, a recommended methodology was followed before the implementation of the analysis (Quinn and Keough, 2002). This imputation was carried out after an optimization step of noise reduction, in order to implement values by iteration independently of the noise and decrease the risk of creating false correlations (Josse et al., 2013).

The second MFA model was built to study the growth of the 21 individuals that survived after 6 months in the experiment, with 5 quantitative variables (G_{0-3} , G_{3-6} , THC_{T60} , THC_{Tend} , $Phago_{Tend}$) and one qualitative variable (*Origin*). The same imputation process was applied as 3% of the data were missing.

In the two MFA the quantitative variables were pooled in three groups in order to give the same weight to each group: the Growth (G_{0-3} ; G_{3-6}), the Survival (*SurvRank*), and the Immunology (THC_{T60} , THC_{Tend} , $Phago_{End}$).

3. Results

3.1. Behavioural traits

Overall, 62% of the abalone had a retracted foot before their reactivity test was initiated, and 80% after touching. No significant differences were observed between the habituation and high density periods for retraction before and after the foot was touched (Table 2). Foot retraction was not significantly different before touching between the farmed and wild abalone (Table 2). After touching however, wild abalone performed more swivelling movements and the foot was more often retracted than in farmed abalone, both after the habituation period and after the high density period (Table 2). No significant difference in the righting time was observed between farmed and wild abalone at the end of the post-acute stress period (Table 2).

3.2. Immunological traits

High individual variability was observed for both phagocytosis efficiency and total haemocyte count, with the standard deviation representing respectively 40% and 50% of the mean. The shaking stress generated a decrease in phagocytosis efficiency, with a maximum decrease 60 min after the end of the shaking period (Fig. 2a). After 6 days, the phagocytosis efficiency was back to a value close to the value

observed before the stress. The decrease between T0 and T60 was significant in abalone from both origins (Fig. 2a). THC values were relatively stable for the wild abalone before, 30 and 60 m after the shaking and 6 days later (around 3000 cells μL^{-1}), whereas they rose significantly for the farmed abalone and were at their highest level 60 min after the end of the stress period (Increase from 4000 to 5500 cells μL^{-1}) (Fig. 2b). Five days later, the THC for the farmed abalone had declined significantly (2200 cells μL^{-1}) (Fig. 2b).

For all times of measurement, no significant differences in the phagocytic efficiency were observed between the two origins, although the sample means differed at T60: wild abalone tended to have a lower phagocytosis efficiency than farmed abalone (respectively, 20 vs 24%, $K = 2.8$, $P = 0.09$). The THC values were, in contrast, significantly lower for wild abalone after the density stress before the shaking, and after the shaking stress at T60 compared to the farmed abalone (Fig. 2b). At the end of the post-stress period this difference was reversed: wild abalone had significantly higher THC values (Fig. 2b).

3.3. Survival and growth

The two origins presented similar mortality patterns, with a major mortality event observed in the first months of rearing after the stress. No difference of survival was observed between the wild and farmed abalone after 6 months of the experiment (Table 3). Almost no growth was observed during the post-stress period, so there was no difference between wild and farmed abalone. However, during the 3–6 month period, farmed abalone grew significantly faster than wild abalone (Table 3). Growth performances just after the stress period and in the later summer period were significantly correlated ($t = 2.68$, $df = 20$, $P = 0.01$).

3.4. 1st multivariate analysis: origin, immune parameters, and survival after stress

In the first MFA model, based on 60 individuals, the first two components explained 60% of the total variance (34% for the first, 26% for the second) (Fig. 3). The two groups were clearly discriminated by the analysis ($V_{test} > 2$) (Fig. 3,1). The most important loadings on the first component were the origin and the immunity parameters (Table 4). This component represents the differential immune responses of the two origins during the laboratory period. The THC_{T60} and the $Phago_{Tend}$ were associated and opposed to the THC_{Tend} (Fig. 3.2). The most important loading on the second component was the survival rate (Table 4) (Fig. 3). No immunological parameter had an important loading in this component. This indicates that abalone of the two origins were different from an immunological point of view, but their origin and the immune parameters seemed to be not related to their survival after the stress period (Fig. 3).

Table 2

Behaviour by farmed and wild abalone origin after touching the foot of abalone in a standardized manner (% of each population. Comparison by Fisher test, NS = Non significant differences) and a righting test.

	wild stock	farmed stock	N(wild, farmed)	Stat-Test	Pvalue
Habituation period					
Hab.RetractT0 (% of the population with foot retracted)	60%	63%	30, 30	3.8	NS
Hab.SwivelT1 (% of the population that swivelled in reaction to a finger contact)	33%	10%	30, 30	5.5	$P = 0,06$
Hab.RetractT2(% of the population that retracted the foot after a finger contact)	26%	10%	30, 30	6.3	$P = 0,03$
High density period					
HighD.RetractT0 (% of the population with foot retracted)	68%	66%	28, 29	0.12	NS
HighD.SwivelT1 (% of the population that swivelled in reaction to a finger contact)	25%	3%	28, 29	6.8	$P = 0,01$
HighD.RetractT2 (% of the population that retracted their foot after a finger contact)	21%	24%	28, 29	1.08	NS
Righting (Time to right in min)	1.6	1.3	25; 23	1.8	NS

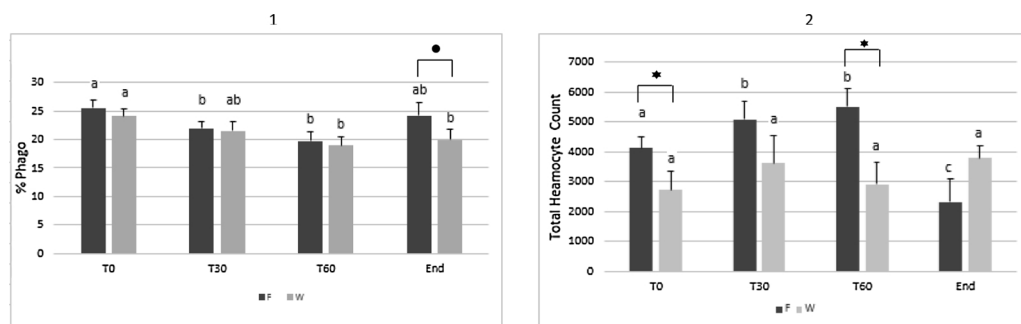


Fig. 2. The means and standard errors of a) the phagocytosis efficiency in% (*Phago*) and b) the THC in cells μL^{-1} (*THC*). Black bars: farmed origin. Grey bars: wild origin. The X axis shows the time of measurement after the shaking on day 15. T0: just after the shaking, T30: 30 min after, T60: 60 min after, End: on day 21 at the end of the 3 week stress period. a, b indicate the significance of differences between the times of measurement within each origin. Differences between origins at one time are represented by * when P value < 0.05 and ● when P value < 0,1.

3.5. 2nd multi-variate analysis: origin THC and growth

In the second MFA model based on 21 individuals still alive after 6 months of experiment, the first two components explained 64% of the total variance (42% for the first, 22% for the second) (Fig. 4). The two origins were clearly discriminated by the model on the first component ($V_{\text{test}} > 2$) (Fig. 4, 1). The most important loadings on the first component were the origin (*Origin*), the growth in the summer period (G_{3-6}) and the THC 60 min after the shaking (THC_{t60}) (Table 4). This component can be interpreted as the differential capacity of the two groups to react to the shaking stress and later growth in the normal rearing conditions (Fig. 4, 2). In the second component, the most important loadings were the THC at the end of the laboratory period ($THC_{T_{\text{end}}}$) and growth in the spring period (G_{0-3}) but this component was not associated with origin. This component may represent the resilience of individuals to the shaking stress in terms of post stress THC response and growth.

4. Discussion

The study was designed to assess the potential effects of early domestication on behaviour, physiology, and production traits, by comparing a farmed stock with a wild stock in a farm environment. We have found that farmed and wild abalone could be discriminated by several different traits related to rearing stressors early in the domestication process.

Firstly, during habituation and in the high-density period, wild abalone retracted their foot more frequently and did more swivelling movements than farmed ones in response to a finger contact. These results are consistent with other observations done in *H. kamtschakana* (Hansen and Gosselin, 2016). The swivelling shell movements have been described as responses to predator contact (Day et al., 1995; Allen et al., 2006) and heat stress (Hooper et al., 2014a). Two hypotheses can be proposed: either the farmed abalone were less stressed by a contact and did not react to it, or they have partially lost the capacity to react their foot in response to a contact. The testing of these hypotheses is important for any restocking programs for European abalone (Lorenzen et al., 2012) and can explain why outplanted hatchery stocks are subject to high predation mortality (Hansen and Gosselin, 2013). Further studies are required to determine if this result indicates a habituation to this stress or a loss of reflex for farm animals that were raised in an artificial environment, with no predators and frequent handling. These results show that abalone behavioural reactions to stress can be

Table 3

Comparison between wild and farmed abalone origins of the mean of survival and growth rates by ANOVA for length and growth, and Kruskal Wallis test for survival.

	wild	farmed	N(wild, farmed)	Stat Test	Df	Test
L_{T0} (Initial length in mm)	70,1 ± 1,45	70,0 ± 1,40	30, 30	0.19	1;58	NS
<i>SurvivalR.</i>	2.3 ± 0.26	1.9 ± 0.23	30, 30	0.73	1;58	NS
G_{0-3} (between T0 and T3, mm.month)	0.03 ± 0,09	0.18 ± 0,09	17, 14	1.3	1;20	NS
G_{3-6} (between T0 and T3, mm.month)	0.07 ± 0,10	0.36 ± 0;11	12, 10	4.6	1;20	P = 0,04

significantly modified by a single cycle of domestication. Such changes have been described in some farmed fish species (Millot et al., 2010). The first generation of hatchery salmon obtained with no intentional selection had a lower fitness in the wild than wild stocks, which highlights that a genetic adaptation to a captive environment can occur in a single generation with deleterious effects in the wild (Christie et al., 2012). This quick adaptation in response to unintentional selection can be explained by a large effective population size (Christie et al., 2012), and a high mortality rate in the first production stages in most farmed aquatic species (Taris et al., 2007). Conversely, wild and unselected farmed sea bass populations were reported to present similar reactions to stress (Millot et al., 2010).

In both farmed and wild abalone, 62% had a retracted foot during the day, before they were disturbed. The normal foot contraction during the day in wild abalone was not modified in the farmed abalone by the early domestication process. Donovan et al. (1999) proposed 2 hypotheses to explain the variation in foot position seen in an abalone population: (1) individuals with a relaxed foot might have lower energy consumption; and (2) individuals with a contracted foot may have higher energy consumption but less chance of being removed by predators. As abalone are nocturnal (Cenni et al., 2009), it would be interesting to perform these observations at night, when the frequency of individuals with retracted feet is expected to be lower (Cenni et al., 2010).

The second set of parameters that discriminated the two stocks were the immunological traits following the acute stress of 20 min of shaking coupled with an emersion of one hour. The phagocytosis rate of both stocks decreased after the shaking and had partly recovered by the end of the experiment. This result is not congruent with results reported by Malham et al. (2003) on the same species, but is in accordance with other studies showing that stress induces a reduction of phagocytosis capacity for some time after the stress (Cheng et al., 2004b; Hooper et al., 2014a) on other abalone species. The lowest values of phagocytosis rate were observed 60 min after the shaking period and were significantly different from the basal level for both stocks.

After one week of recovery, the phagocytosis rates were still lower than those measured just before the shaking stress for the wild abalone, indicating that wild abalone may need more than one week to completely recover from an acute shaking stress. The farmed stock had returned to the basal level, which may indicate a better adaptation to acute farm stressors, probably due to previous exposure to this stressor one or perhaps two times during the rearing process. This result suggests that a single cycle of domestication without intentional selection

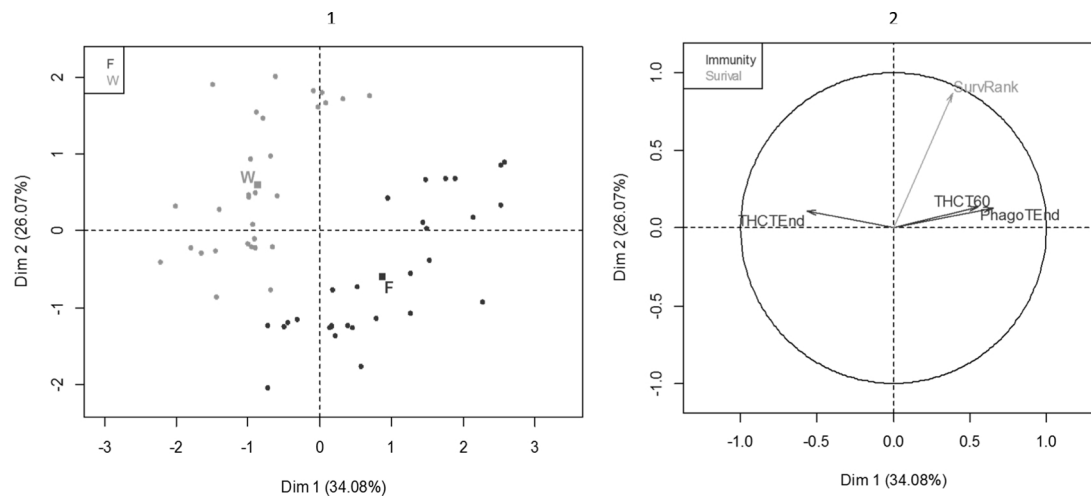


Fig. 3. Multiple factorial phenotype differentiation between wild and farmed abalone (n = 60): 1) **Individual map**: wild abalone in gray and farmed abalone in black, **Origin** (farmed abalone/wild abalone), 2) **Quantitative variable factor map**: **PhagoTend** = phagocytosis efficiency at the end of the stress period, **THCT60** = THC 60 min after the shaking, **THCTend** = THC at the end of the stress period; **SurvRank** = survival rank.

Table 4
Relationships between the variables and the MFA component (the values mentioned is the \cos^2 between the variables and the component).

MFA model 1:			MFA model 2		
Variables name	MFA component 1	MFA component 2	Variables name	MFA component 1	MFA component 2
Origin	0,63	0,43	Origin	0,94	0,03
PhagoTend	0,30	0,02	PhagoTend	0,21	0,18
THCT60	0,42	0,02	THCT60	0,53	0,08
THCTend	0,32	0,02	THCTend	0,20	0,46
SurvRank	0,14	0,75	G₀₋₃	0,20	0,37
			G₃₋₆	0,45	0,29

can alter the dynamic of the stress response, which is a key measure of the animal’s robustness and adaptation to the environment (Monget and Le Bail, 2009; Friggens et al., 2010).

The phagocytosis efficiency was similar to the one reported in summer in a previous study *H. tuberculata* (Travers et al., 2008b). The phagocytosis rate of *Haliotis tuberculata* observed in our study is also close to that reported in *Haliotis diversicolor* in Taiwan (Cheng et al., 2004b), but lower than in the Australian hybrid *Haliotis laevigata* *

Haliotis rubra (Hooper et al., 2011a; Hooper et al., 2014b), although there may be some differences due to the methods used. Phagocytosis efficiency at T60 and at the end of the stress procedures was unexpectedly not correlated with the later survival of the studied abalone. It has been proposed that a decrease of phagocytosis efficiency is related to an increase in disease susceptibility (Malham et al., 2003; Cheng et al., 2004a; Hooper et al., 2011a), but eventual subsequent mortality will likely depend on both the physiologic status of an individual and its likelihood to be infected by a pathogen in its environment (Travers, 2008; Lachambre et al., 2017). Pathogens were presumably not abundant during our stress period.

The Total Haemocyte Counts (THC) were measured to follow the immunological status of abalone, but haemocytes are also important in different functions like the carrying of energy reserves (Travers, 2008). In our study, different responses to shaking were observed in the two stocks. The wild abalone always showed lower total THC across all the measurements after the shaking. In contrast, THC in the farmed abalone rose after the shaking and decreased after one the week of recovery. The pattern of response in the farm abalone is consistent with previous observations (Malham et al., 2003). The increased response of farmed abalone may indicate that they were able to react more to the combined acute stress of shaking and emersion; and is consistent with what was observed for the phagocytosis efficiency. In further studies, it would be

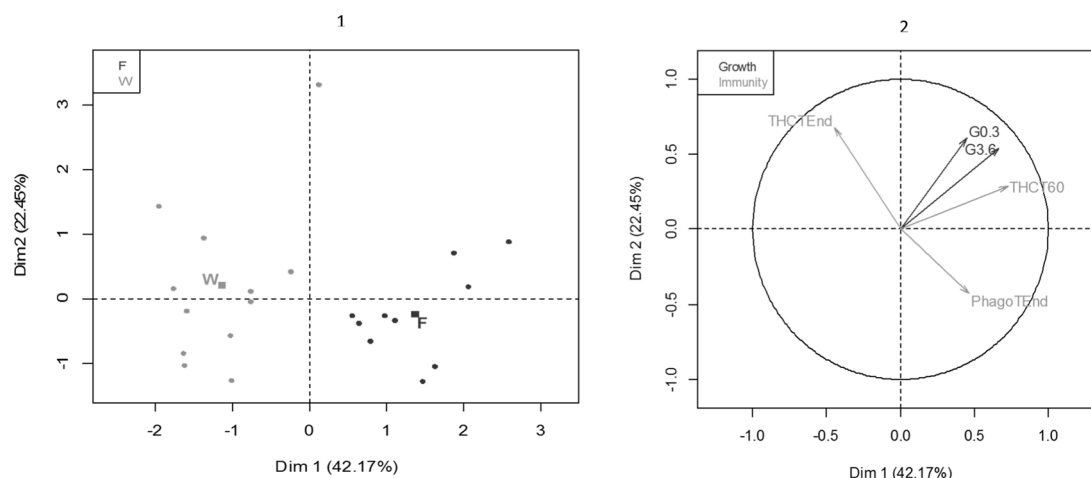


Fig. 4. Multiple factorial phenotype differentiation between wild and farmed abalone, in relation with growth rates: 1) **Individual map**: wild abalone in gray and farmed abalone in black and the barycentre of each group (W, F) 2) **Quantitative variable factor map**: **PhagoTend** = phagocytosis efficiency at the end of the stress period, **THCT60** = THC 60 min after the shaking, **THCTend** = THC at the end of the stress period; **G_{0.3}** Monthly growth in length in the spring at low density; **G_{3.6}** Monthly growth in length in the summer at normal density.

interesting to complete this observation with glucose or glycogen measurement in order to determine if these two response patterns are linked with physiological status or the availability of reserves in individuals. In our study, the differences between farmed and wild stock might be linked with energetic reserves available before the experiment. A farm environment is characterised by a high food availability (Travers, 2008). This hypothesis is consistent with the fact that wild abalone need more time to right themselves (Lachambre et al., 2017).

Our factor analysis showed that THC of individuals 60 min after the shaking was positively related with the phagocytosis at the end of the experiment and negatively related to THC at the end of the experiment. Consequently, the THC level observed one hour after the shaking and the depression in phagocytosis after the recovery week may be associated parameters that are part of the same stress reaction. The rise of THC after a stress has been proposed as a positive reaction to stress (Cheng et al., 2002; Cheng et al., 2004c; Travers, 2008). Farmed abalone have been shaken at least once or twice at juvenile age during husbandry rearing, so that their modified reaction may indicate phenotypic plasticity in response to the repeated stress.

The two MFA models show that abalone origin can be clearly differentiated, based on the immunological differences discussed above between the origins. Interestingly, these differences were not associated with significant differences in survival between the two origins. This suggests that immune differences observed in this study were not large enough to initiate mortality differences. It could be interesting to reproduce the same study with a less important stressor than a shaking stress together with one hour of emersion time to see if the differential reaction of the two stocks induce differences of growth in a higher survival context. The fact that THC₆₀ is associated with a better growth rate in the second MFA model and that growth rates in the post stress period and the summer period are correlated consolidates the idea that the rise of THC is a positive reaction to the acute stress.

Two hypotheses can be proposed to explain why that summer growth was higher in our farmed abalone than in the wild ones. Firstly, farm abalone may be better adapted to the rearing structures due to unintentional selection, or individuals in this cohort with higher growth performance may have been selected during the early stages of rearing. Secondly, farmed abalone may have had a better recovery from the stress period, as no differences were observed just after the stress. As the growth of wild individuals was close to 0, it is also possible that they were not able to recover from the stress period in winter and therefore stopped growing. Another hypothesis to explain the growth differences is that the wild abalone were not in the same physiological status as farm abalone at the beginning of the experiment because the farm abalone were fed in the winter and the availability of suitable algae is likely to be lower in the winter in the wild.

5. Conclusion

Our study suggests that a domestication process may have occurred in a single generation of rearing in the European abalone *H. tuberculata*. The farm environment seems to have modified the response to different stressors of our farmed stock compared to the wild one. The rise of THC after an acute stress, the return to a lower level of THC after one week of recovery and the return to a basal phagocytosis efficiency level appear to be positive reactions to stressors and these reactions characterised the response of farmed abalone. Interestingly the two stocks responded differentially to shaking and finger contact, but this was not associated with significant differences of later survival or post-stress growth. This suggests that the impact of the farm environment on the biology of our farmed stock did not have a huge impact in its agronomic performances and did not induce rapid economic gains. The effect of a captive environment and husbandry practice on the behaviour and immune response of abalone was unexpected, although this has been previously reported in salmon (Christie et al., 2012).

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank the team of France Haliotis, Xavier Lesage, Frederic Laurans, Mickael Gleeson, Iain McKensy, and Maryvonne Leroux for the provision and care of the animals, and assistance during the experiment. In addition, they would like to thank the LEMAR diving team for collecting wild abalone in difficult winter conditions. Thanks to Mick Keough, who helped with the analysis. This work was conducted in the context of a PhD partially funded by France Haliotis and ANRT (CIFRE N° 2014 0643). This work benefited from the support of the European Union (FEAMP) via the program 42 of the FEAMP “innovation in aquaculture” through the “GenOrmeau” project.

References

- Allen, V.J., Marsden, I.D., Ragg, N.L.C., Gieseg, S., 2006. The effects of tactile stimulants on feeding, growth, behaviour, and meat quality of cultured Blackfoot abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture* 257, 294–308.
- Baldwin, J., Elias, J.P., Wells, R.M.G., Donovan, D.A., 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 342, 213–225.
- Cenni, F., Parisi, G., Gherardi, F., 2009. Use of space and costs/benefits of locomotion strategies in the abalone, *Haliotis tuberculata*. *Ethol. Ecol. Evol.* 21, 15–26.
- Cenni, F., Parisi, G., Scapini, F., Gherardi, F., 2010. Sheltering behavior of the abalone, *Haliotis tuberculata* L., in artificial and natural seawater: the role of calcium. *Aquaculture* 299, 67–72.
- Cheng, W., Yeh, S.P., Wang, C.S., Chen, J.C., 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture* 203, 349–357.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004a. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 193–202.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C., 2004b. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235–243.
- Cheng, W., Li, C.H., Chen, J.C., 2004c. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 232, 103–115.
- Christie, M.R., Marine, M.L., French, R.A., Waples, R.S., Blouin, M.S., 2012. Effective size of a wild salmonid population is greatly reduced by hatchery supplementation. *Heredity* 109, 254–260.
- Christie, M.R., Marine, M.L., Fox, S.E., French, R.A., Blouin, M.S., 2016. A single generation of domestication heritably alters the expression of hundreds of genes. *Nat. Commun.* 7, 6.
- Clavier, J., Richard, O., 1986. Estimation du stock naturel d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) dans la région de Saint-Malo. In: *Institution des pêches maritimes* p. 11.
- Day, R.W., Quinn, G.P., 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecol. Monogr.* 59, 433–463.
- Day, R., Dowell, A., Sant, G., Klemke, J., Shaw, C., 1995. Patchy predation: foraging behaviour of *Coscinasterias calamaria* and escape responses of *Haliotis rubra*. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 26, 11–33.
- Dixon, C.D., Day, R.W., Huchette, S.M.H., Shepherd, S.A., 2006. Successful seeding of hatchery-produced juvenile greenlip abalone to restore wild stocks. *Fish. Res.* 78, 179–185.
- Duchemin, M.B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., Fournier, M., 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. *Environ. Pollut.* 153, 416–423.
- Elliott, N.G., 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquacult. Res.* 31, 51–59.
- Forster, G.R., 1962. Observations on the ormer population of Guernsey. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 42, 493–498.
- Friggens, N.-C., Sauvaut, D., Martin, O., 2010. Vers des définitions opérationnelles de la robustesse s'appuyant sur des faits biologiques: l'exemple de la nutrition. *Inra Prod. Anim.* 23, 43–52.
- Hansen, S.C., Gosselin, L.A., 2013. Do predators, handling stress or field acclimation periods influence the survivorship of hatchery-reared abalone *Haliotis kamtschatkana* outplanted into natural habitats? *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 23, 246–253.
- Hansen, S.C., Gosselin, L.A., 2016. Are hatchery-reared abalone naïve of predators? Comparing the behaviours of wild and hatchery-reared northern abalone, *Haliotis kamtschatkana* (Jonas, 1845). *Aquacult. Res.* 47, 1727–1736.
- Hooper, C., Hardy-Smith, P., Handlinger, J., 2007. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aust. Vet. J.* 85, 188–193.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorf, K., Handlinger, J., 2011a. Effect of

- movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 315, 348–354.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., 2011b. Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 315, 348.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., Goulias, J., 2014a. Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 432, 26–37.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., Goulias, J., 2014b. Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (*hybrid Haliotis laevis* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 432, 26.
- Huchette, S.M.H., Koh, C.S., Day, R.W., 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. *Aquaculture* 219, 457–470.
- Josse, J., Timmerman, M., Kiers, H.A., 2013. Missing values in multi-level simultaneous component analysis. *Chemometr. Intell. Lab.* 129, 21–32.
- Kojima, H., 1995. Evaluation of abalone stock enhancement through the release of hatchery-reared seeds. *Mar. Freshwat. Res.* 46, 689–695.
- Lé, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 18.
- Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017. Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — a multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture* 467, 190–197.
- Lorenzen, K., Beveridge, M.C.M., Mangel, M., 2012. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biol. Rev.* 87, 639–660.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cuff, A., Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool. Part A* 295A, 136–144.
- Millot, S., Péan, S., Leguay, S., Vergnet, A., Chatain, B., Bégou, M.-L., 2010. Evaluation of behavioral changes induced by a first step of domestication or selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach under repeated acute stress. *Aquaculture* 306, 221–227.
- Monget, P., Le Bail, P.-Y., 2009. Le phénotypage des animaux: le nouveau défi? *Renc. Rech. Ruminants* 16, 407–409.
- Quinn, G., Keough, M., 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Ragg, N.L.C., Watts, E., 2015. Physiological indicators of stress and morbidity in commercially handled abalone *Haliotis iris*. *J. Shellfish Res.* 34, 455–467.
- Ragg, N.L.C., Taylor, H.H., Behrens, J., 2000. Stress and weight loss associated with handling in the blackfoot abalone, *Haliotis iris*. *J. Shellfish Res.* 19, 528–529.
- Robinson, N., Smith, B., Cooke, I., Strugnell, J., 2013. A snail's pace: a preliminary analysis of the effects of stress and genetics on movement of *Haliotis*. *Aquaculture* 376, 25–35.
- Shepherd, S.A., Cannon, J., 1988. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) X: food and feeding in juveniles. *J. Malac. Soc. Aust.* 9, 21–26.
- Straus, K.M., Friedman, C.S., 2009. Restoration aquaculture of the pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana kamtschatkana* Jonas): impacts of rearing method on behaviour, growth and survivorship in the hatchery. *Mar. Freshwat. Res.* 60, 1021–1028.
- Taris, N., Batista, F.M., Boudry, P., 2007. Evidence of response to unintentional selection for faster development and inbreeding depression in *Crassostrea gigas* larvae. *Aquacult. Irel.* 272, 69–79.
- Teletchea, F., Fontaine, P., 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish. Fish.* 15, 181–195.
- Travers, M.A., da Silva, P.M., Le Goic, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008a. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800–808.
- Travers, M.A., 2008. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université de Bretagne Occidentale.
- Warton, D.I., Hui, F.K.C., 2011. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92, 3–10.

Chapitre 2 : Estimation de paramètres génétiques pour une cohorte d'élevage d'*Haliotis tuberculata*

Manuscrit 3 : Soumis dans « Aquaculture »

Ewan Harney^a, Sébastien Lachambre^{a,b}, Sabine Roussel^a, Sylvain Huchette^b, Florian Enez^c, Romain Morvezen^c, Pierrick Haffray^c, Pierre Boudry^{a,d} **First low density SNP panel from RNA seq for parentage assignment of a farm cohort of European abalone *Haliotis tuberculata* in a perspective of selective breeding implementation.**

Manuscrit 4 : A soumettre dans « Genetics Selection Evolution »

Sébastien Lachambre^{a,b}, Sabine Roussel^a, Sylvain Huchette^b, Louis Bourdonay^b, Kyle Chenevert^c, Christophe Lambert^a, Jérôme Bugeon^e, Anastasia Bestin^f, Florian Enez^f, Pierrick Haffray^f, Pierre Boudry^f 2018. **Heritability of a large diversity of biologic characters for the European abalone *H. tuberculata* in the context of its domestication and selective breeding implementation.**

Objectifs

L'introduction a pu montrer que l'établissement d'un programme de sélection nécessite de connaître plusieurs paramètres génétiques sur les populations à améliorer. La connaissance de la diversité génétique et de la taille génétique des populations en sélection sont deux informations essentielles. Elles aident à choisir la population permettant de démarrer un programme de sélection et à déterminer la stratégie de croisement garantissant la conservation d'une diversité génétique suffisante. Les variabilités phénotypiques, les héritabilités, et les corrélations génétiques existantes pour des caractères d'intérêt économique sont aussi des paramètres clefs pour établir les objectifs de sélection et estimer les gains espérés. L'obtention de ces paramètres nécessitent d'analyser des phénotypes pour des individus dont le pedigree est connu. Une option consiste à réaliser des croisements biparentaux et à élever les familles dans des bacs séparés jusqu'à ce qu'un marquage individuel soit possible. Cette option est coûteuse et génère des biais sur les estimations de paramètres génétiques en raison de la difficulté de mettre un grand nombre de familles dans un environnement standardisé pour les comparer. Une autre opportunité est de génotyper les parents et de réaliser des plans factoriels complets en mélangeant un grand nombre de familles pour les élever dans une même structure d'élevage. Cette méthodologie permet de mesurer des performances en réduisant l'effet des paramètres macro-environnementaux. L'assignation de parenté est réalisée à l'aide de marqueurs génétiques afin de reconstruire le pedigree de la population. Cette méthode n'a été expérimentée qu'une seule fois en halioticulture et l'héritabilité de caractères est très dépendante du milieu où elle est estimée. Il est donc nécessaire de refaire ces estimations dans le système de production où sera effectuée la sélection.

La problématique de ce chapitre est donc **d'estimer des paramètres génétiques sur une large diversité de caractères dans la perspective d'une mise en place de sélection sur la croissance**. Deux expérimentations ont été réalisées pour répondre à cette problématique. Des familles de plein-frères (2016) ont été élevées séparément et ont permis de sélectionner des marqueurs SNP pour rendre possible une assignation de parenté. Ce développement a été accompagné d'un prélèvement de tissus et d'un génotypage sur plusieurs types d'échantillons : le prélèvement d'ADN des reproducteurs des familles de plein-frères, et le prélèvement des reproducteurs et des descendants issus d'une même unité de production (2013). La sélection du jeu de marqueurs permettant l'assignation de parenté a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit soumis dans le journal « Aquaculture ». Un des objectifs de ce travail était aussi d'analyser l'efficacité de la transmission de la diversité génétique entre les reproducteurs et leurs

descendants en condition de production à France Haliois. Ce manuscrit a été écrit en partenariat avec Ewan Harney, chercheur postdoctoral du laboratoire LEMAR. Un deuxième travail a consisté à recueillir un grand nombre de phénotypes pour réaliser une estimation de leurs paramètres génétiques. Cette estimation a donné lieu à un article qui sera soumis en 2018 dans le journal « Genetic Selection Evolution ».

Méthodes utilisées

La réalisation d'un panel SNP a été permise par l'identification préalable à cette thèse d'un grand nombre de polymorphismes de type SNP dans une base de données RNA-Seq. Cette base de données avait été constituée à l'aide de transcriptomes d'individus sauvages et de larves issues de France Haliois. Plusieurs filtres sur la qualité de ces marqueurs ont permis de proposer une liste de 500 marqueurs appropriés à l'assignation de parenté. Un génotypage de qualité a été possible sur 318 marqueurs provenant de cette liste. Le génotypage des reproducteurs de 5 familles de pleins frères et de 10 de leurs descendants a permis de réaliser une ségrégation allélique sur ces 318 marqueurs. Un examen de la conformité de la ségrégation allélique au modèle mendélien a permis d'identifier 123 marqueurs à hauts potentiels d'assignation avec plus de 95% de génotypage pour les parents de la cohorte à assigner. La capacité d'assignation de ce jeu de marqueurs a été testée sur 945 individus d'une cohorte d'élevage (2013) constituée par le croisement en plan factoriel complet de 16 femelles et 24 mâles. Deux logiciels complémentaires, CERVUS et VITASSIGN ont été utilisés pour l'assignement de parenté. Le logiciel NE ESTIMATOR a permis d'estimer la taille génétique efficace de la cohorte étudiée.

Pour estimer les paramètres génétiques, la population résultant du croisement factoriel complet de 16 femelles et 24 mâles a été élevée dans un environnement commun pendant 24 mois. A 24 mois d'élevage, 1600 individus ont été mesurés et marqués. Ces 1600 individus ont été séparés en deux groupes de respectivement 900 et 700 individus, et ont été élevés dans deux cages en mer. Le premier groupe de 900 animaux a été ramené en laboratoire pour réaliser des observations morphologiques, comportementales et physiologiques à 30 mois. Un chantier de phénotypage réalisé en partenariat avec le SYSAAF a conduit à leur dissection et au recueil final de 70 phénotypes. Le deuxième groupe de 700 animaux a été mesuré à 42 mois lorsque la moitié des individus avait atteint la taille commercialisable. Le recueil de l'ensemble de ces caractères et la connaissance du pedigree au sein de ces animaux a permis de réaliser

l'estimation de paramètres génétiques. Ces estimations ont été faites au SYSAAF à Rennes à l'aide d'une chaîne de traitement (Koala) utilisant le logiciel VCE.

Principaux résultats et conclusions

Expérimentation 1 : Mise au point d'un jeu de marqueurs SNP permettant l'assignation de parenté pour une cohorte d'élevage (Manuscrit 3)

Le premier résultat de ce chapitre démontre qu'un jeu de 123 marqueurs SNP a été suffisant pour permettre une assignation de parenté avec un succès proche de 100%. Ce résultat est unique en halioticulture puisqu'aucun jeu de marqueurs SNP n'a été auparavant développé. Il a été montré que 96 marqueurs étaient suffisants pour atteindre un niveau d'assignation supérieur à 95%. Ce résultat permet d'envisager des coûts réduits pour réaliser une assignation de parenté à France Haliotis. L'ensemble des 318 marqueurs dont le génotypage a été possible reste publié dans cette thèse puisque la supériorité des 123 marqueurs conservés dans notre travail d'assignation pourrait être dépendante de la population étudiée. L'analyse de la méthodologie de croisements utilisés à France Haliotis est le deuxième résultat important permis avec la création de ce jeu de marqueurs.

L'étude du pedigree faisant le lien entre les 945 individus et leurs 40 parents met en évidence un bon équilibre de la représentation des pères dans la descendance. Cette observation valide la stratégie de fécondation séparée par chaque mâle d'un pool d'œufs mélangés. En revanche, il existe une grosse variance de la représentation des femelles. En effet, 3 femelles sur 16 ont généré 63% des descendants et 3 femelles n'ont eu qu'un seul descendant. La cause exacte de ce déséquilibre n'a pas pu être identifiée. Une mauvaise égalisation du nombre d'œufs produits par les femelles pourrait expliquer la variabilité de représentation des femelles dans la descendance. Le déséquilibre de représentation observé a été accompagné par le fait que seulement 49% des familles possibles étaient présentes dans la cohorte étudiée. Avec 40 reproducteurs, le N_e de la descendance a été estimé à 20 montrant qu'une perte de taille génétique de 50 % était occasionnée en une génération. Cette forte diminution entre le N et le N_e est classique en conchyliculture. Si ces performances sont reproduites en sélection sachant qu'il est conseillé d'avoir 100 reproducteurs efficaces pour constituer ces cohortes de sélection, une première approche aboutirait à conseiller l'utilisation de 200 reproducteurs par génération à France Haliotis.

*Expérimentation 2 : Estimation d'une large gamme de paramètres génétiques sur des caractères morphologiques, physiologiques et comportementaux pour *Haliotis tuberculata* dans l'environnement de production de France Haliotis (Manuscrit 4)*

L'expérimentation 2 a abouti à la plus haute estimation d'héritabilité jamais publiée pour la croissance d'ormeaux ayant atteint le stade commercialisable avec respectivement $h^2=0,54$ pour le poids et $h^2=0,49$ pour la taille à 42 mois. De manière classique, à un âge donné, la taille et le poids étaient corrélés génétiquement ($R>0,98$). Aussi, les héritabilités de la taille et du poids étaient croissantes avec le développement de l'animal. **Ces hautes héritabilités accompagnées d'une forte variabilité phénotypique ($CV=20\%$ pour le poids et $CV=10\%$ pour la taille) rendent possible un progrès de 31% tous les 4 ans et permettent d'envisager un doublement de la vitesse de croissance en trois générations (12 ans).** Les fortes héritabilités et corrélations génétiques estimées entre le poids à 32 mois et à 42 mois ($R>0,98$) laissent envisager que des mâles de 3 ans pourraient être croisés avec des femelles de 4 ans pour diminuer l'intervalle de génération. Les fortes corrélations génétiques estimées entre la taille à 25 mois et à 42 mois laissent envisager qu'une sélection pourrait être effectuée à 25 mois pour diviser l'intervalle de génération par 2. Cependant, la comparaison des progrès possibles à 42 mois en sélectionnant à 42 mois ou à 25 mois montre qu'une sélection précoce n'a pas d'intérêt ($h^2=0,25$ pour le poids à 25 mois).

Un autre résultat important est que d'autres caractères d'intérêt économique comme le taux de chair, la couleur du pied et de la coquille sont héréditaires (respectivement $h^2=0,34$, $h^2=0,31$, $h^2=0,71$). Ainsi, un progrès peut également être réalisé sur ces caractères. Un travail de développement de méthodes de phénotypage spécifique à ces trois caractères a été réalisé. Des notations de couleurs pour le pied et la coquille obtenues à l'aide de grilles de notation illustrées se sont montrées héréditaires et très fortement corrélées génétiquement aux mesures de couleurs réalisées par traitement informatique. La notation et le classement d'animaux par ces grilles de phénotypage est à la fois rapide, peu chère, et répétable pour les niveaux extrêmes. Elle permet donc une sélection assez simple après un tri sur la croissance. Concernant le taux de chair, sa mesure nécessite une pesée du poids de chair et une dissection létale pour l'animal. Un travail de recherche de prédicteurs non invasifs sur des photos d'échographie a donc été réalisé. Une photo d'échographie permet d'observer la surface interne de chair de l'animal. Le ratio entre la surface de chair sur l'ensemble de la surface interne de l'animal est fortement corrélé génétiquement avec la résiduelle du poids de chair sur le poids total. Le ratio de surface échographique permet de prédire l'aspect charnu de l'animal. Une

faible relation allométrique positive entre le poids total et le taux de chair a été trouvée. Elle est accompagnée d'une faible corrélation génétique positive. **Une sélection sur la croissance permettra une amélioration du taux de chair mais une amélioration indépendante plus importante du taux de chair est aussi possible dans une stratégie de sélection multicritères via une mesure échographique.** Il en est de même pour les couleurs, si une plus grande intensité de jaune pour le pied et une plus grande intensité de rouge pour la coquille sont souhaitées.

Une corrélation génétique entre le poids à 32 mois et le taux de gonade a montré qu'une amélioration du poids conduirait à une augmentation du taux de gonade. Ce caractère représente l'investissement reproductif d'un animal. Cette évolution corrélée pourrait produire des effets délétères si une plus grande maturité des animaux entraînait une plus grande fragilité de la population d'élevage ou une diminution de la qualité de la chair en été. **Un retrait des mâles présentant un fort investissement reproductif à 32 mois pourrait être une option pour limiter la coévolution des deux caractères.**

Globalement, les incertitudes autour des estimations d'héritabilités sont grandes (>0.1) dans notre étude. Ces incertitudes nous semblent plus liées au déséquilibre de représentation familiale qu'à un nombre trop faible de phénotypes recueillis dans cette étude. En effet, l'héritabilité de la taille à 25 mois ($h^2=0,24$) a été estimée par la mesure de 950 phénotypes (38 individus par père/contre 22 pour la plupart des caractères) et son incertitude reste élevée (0,07). Ce résultat indique que doubler le nombre de données n'aurait pas drastiquement réduit l'incertitude autour des estimateurs. Cette imprécision d'estimation ne nous a pas permis de déterminer si des caractères physiologiques et comportementaux comme le taux de glycogène, l'efficacité phagocytaire, la durée totale de mouvement ou d'ingestion en une nuit étaient héréditaires. Au manque de précision des phénotypes s'ajoutent possiblement la complexité de mesure ainsi que le manque de données recueillies. Ce constat est identique pour le poids de gonade et le poids de l'hémolymphe perdu en 15 minutes après dissection. Le poids de ces deux organes est difficile à mesurer de manière standardisée.

Enfin, un dimorphisme sexuel important a été observé lors des 3 premières années d'élevage. A 3 ans, les femelles étaient 15% plus lourdes que les mâles. La plus grande croissance des femelles a aussi été observée dans le cadre de l'expérimentation 3 (Annexe 1). Cette plus grande croissance a été accompagnée d'un taux de gonade plus faible et un taux de glycogène plus faible dans le muscle. Une hypothèse explicative serait que l'investissement gonadique des femelles est plus faible dans les 2 premières années d'élevage. Le taux de gonade ayant été

mesuré au printemps, il serait intéressant de voir si les femelles présentaient toujours un taux de gonade plus faible à la fin de l'été. Les ormeaux sont connus pour mobiliser le glycogène de leur chair pour constituer leurs gonades en été. L'absence de différence de poids à 3,5 ans pourrait être due à un plus fort investissement gonadique pour les femelles en troisième année qui auraient permis aux mâles de les rattraper. Des expérimentations spécifiques sont nécessaires pour étudier cette hypothèse. Il est intéressant de noter que ce dimorphisme a été accompagné d'une héritabilité du sex-ratio observée pour la descendance de reproducteurs de la cohorte étudiée. Cette héritabilité n'a, à notre connaissance, jamais été observée. Elle suggère l'existence d'un contrôle polygénique additif du sexe ratio et pourrait permettre l'augmentation de la proportion de femelles en élevage pour améliorer la croissance des populations produites à 3 ans.

Conclusion

Un jeu de marqueurs SNP performant a été développé et permet de réaliser une reconstruction de pedigree pour un grand nombre de familles élevées en mélange depuis la fécondation. Le poids et la taille d'animaux élevés dans un environnement commun est à la fois très variable et hautement héritable ce qui laisse envisager des progrès conséquents par simple sélection individuelle. Pour améliorer le poids à 4 ans, une sélection de géniteurs de 4 ans est plus efficace qu'une sélection à 2 ans, même si des corrélations génétiques fortes existent entre le poids et la taille d'un individu mesurés à des âges différents. Un nombre de 200 reproducteurs par génération devra être utilisé pour maintenir une taille génétique suffisante au cours des cycles de sélection. Une sélection sur la croissance entraînera une maturité plus importante des animaux qu'il faudra contrôler, et aura un effet positif sur le taux de chair. Ces derniers caractères présentant un part de variabilité génétique additive indépendante de la taille et du poids, une sélection multicritères devra être envisagée. Leur amélioration est d'autant plus possible que des moyens simples de phénotypage sur l'individu ont été développés. Une corrélation génétique positive entre le taux de gonade et le poids a été trouvée. Cette corrélation pourrait conduire à la fragilisation des populations ou à la baisse de la qualité du produit en période estivale, et doit donc être contrôlée. Le retrait des candidats sélectionnés sur le poids réalisant un investissement gonadique précocement et important à 3 ans pourrait être un moyen de limiter cette évolution.

Manuscrit 3 : First low density SNP panel from RNA seq for parentage assignment of a farm cohort of European abalone *Haliotis tuberculata* in a perspective of selective breeding implementation.

Soumis dans « Aquaculture »

Authors

Ewan Harney^a, Sébastien Lachambre^{a,b}, Sabine Roussel^a, Sylvain Huchette^b, Florian Enez^c
Romain Morvezen^c, Pierrick Haffray^c, Pierre Boudry^d

Affiliations

^a Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, University of Brest (UBO), Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b France Haliotis, 29880 Plouguerneau, France

^c Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF), 35000 Rennes, France

^d Ifremer, UMR 6539 LEMAR (UBO/CNRS/IRD/Ifremer), Centre Bretagne, 29280 Plouzané, France

Corresponding Author

Ewan Harney

Phone (work): +33 2 98 49 87 43

Email: ewan.harney@gmail.com

Abstract

Selective breeding strategies require pedigree information over generations, but many species produced in aquaculture are too small to be physically tagged at early stages. Consequently, maintaining a sufficient number of separate families is often needed but costly and logistically difficult. Alternatively, parentage assignment can be obtained using DNA markers. We developed a panel of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for the European abalone *Haliotis tuberculata* using an existing transcriptomic resource. An initial 2,176,887 SNPs were filtered to select 500 for high throughput genotyping. Of these, 298 SNPs were amplified in at least 90% of *H. tuberculata* samples, consisting of mixed family cohorts (40 parents and 945 offspring) and 5 full-sib training families. Based on amplification success among parents, minimum allele frequency and checks carried out against the training families, a subset of 123 markers was used to carry out parentage assignment for mixed family cohorts. Maximum likelihood and exclusion-based methods of parentage assignment yielded consistent results, allowing parentage to be assigned in 98.9% of individuals. Optimization of markers suggests that the 60 most informative SNPs may be sufficient for 95% assignment success in the studied progeny. The panel was also used to estimate effective population size, and revealed a low N_e , due to high variance of reproductive success. Our panel will be used to estimate genetic parameters of traits and will allow future mixed family selective strategies. It could also be useful tool in the context of monitoring stock enhancement and population genetics studies.

Keywords

Gastropod, parentage assignment, pedigree, selective breeding, RNA-Seq, SNP

Highlights

1. This is the first SNP panel developed for parentage assignment in an abalone species.
2. SNPs discovery was carried out using an existing transcriptomic data set, and yielded a panel of 298 SNPs with > 90% call success across >1000 genotyped individuals.
3. A subset of 123 SNPs was used to successfully assign parentage in 98.9% of 945 offspring from 40 parents and 189 families in a mixed family design.
4. Parent assignment revealed that broodstock reproductive success was highly variable, suggesting that breeding practices may need to be improved before implementing selective breeding programs.

List of figure

Fig. 1. Filtration steps applied to list of variants in order to produce 500 SNPs for high throughput genotyping, and subsequent selection of 123 informative SNPs following genotyping

Fig. 2. Change in single assignment rate with VITASSIGN for different level of allowed mismatch and an increasing number of SNPs, added in groups of 5 at a time based on their MAF.

Fig. 3. A) Number of offspring in the progeny for every dam and sire in the mating scheme, **B)** Representation of the mating scheme with dams in lines and sires in columns, when individuals of every possible cross are presented on the progeny, a dot with an area proportional to the number of offspring is presented.

Abbreviations

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

QTL: Quantitative Locus Traits

N_e : Effective population size

PIC: Polymorphic Information Content

Introduction

Abalone production is an emerging industry in Europe, and is mainly based on the European abalone *Haliotis tuberculata* (Huchette and Clavier, 2004), although *Haliotis discus hannai* and *Haliotis rufescens* have been introduced to Ireland (Hannon et al., 2013) and Iceland (Jonasson et al., 1999) respectively for aquaculture production. As with other abalone, *H. tuberculata* takes between 3 and 4 years to reach a minimal commercial size of 30g, and the stock are currently produced with no intentional selective process (Lachambre et al., 2017). This slow growth results in high production costs and increases the risk of accidents during the production cycle. To reduce growing time, many producers and breeders have adopted selective breeding program for the different abalone species farmed worldwide (Elliott, 2000). These programs require considerable investment in the long run, including dedicated research projects, special rearing facilities, precise traceability and phenotyping costs (Gjedrem and Baranski, 2010). Furthermore, as with many aquatic species, abalones are too small to be physically tagged in the early stage of production, which can complicate the implementation of family-based selective breeding programs (Vandeputte and Haffray, 2014). Either all the families are mixed at the larval stage, with individuals selected on the basis of their phenotype at the end of the rearing, or all the families are reared separately until physical tagging. These two strategies can generate improvements, but individual selective breeding cannot control for inbreeding, while separate rearing of families is costly and heritability estimates may be influenced by common environmental conditions between tanks (Gjedrem and Baranski, 2010).

Alternatively, DNA markers can be used to identify the pedigree of animals reared in mixed families under commercial conditions (Vandeputte and Haffray, 2014). Until recently, microsatellites were the most commonly used genetic marker for parentage analysis in non-model organisms (Jones et al., 2010; Weinman et al., 2015), including species of interest for aquaculture (Liu et al., 2017; Tr \u00f4 ng et al., 2013). Among different abalone species, several studies have used microsatellites to infer pedigree, resulting in at least 80% (Slabbert et al., 2009) and frequently 90-95% (Hara and Sekino, 2007; Lucas et al., 2006; van den Bergb and Roodt-Wilding, 2010) assignment success. Yet recent advances in gene sequencing and genotyping technologies have allowed the use of alternative markers, especially single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs have a number of advantages over microsatellites, including more accurate genotyping (Anderson and Garza, 2006), ubiquity throughout the genome and potential for quantitative trait loci (QTL) detection (Avia et al., 2017; Gutierrez et al., 2014), and the reduced occurrence of null alleles, which can result in assignment failure

(van den Bergb and Roodt-Wilding, 2010). Furthermore, SNPs can be derived from increasingly common expressed sequence data such as the short reads and transcriptomes generated during RNA-Seq experiments (De Wit et al., 2015), making the development of novel markers straightforward compared to microsatellites. Non-synonymous substitutions in SNPs from coding regions may even help to identify candidate genes for marker assisted selection (Merwe et al., 2013). Perhaps most importantly, studies comparing parentage assignment of microsatellites and SNPs have generally found SNPs to achieve better assignment than microsatellites (Sellars et al., 2014; Tr \u00f4 ng et al., 2013), especially when heterozygosity is low (Tokarska et al., 2009) or relatedness of parents is high (Weinman et al., 2015).

The number of markers required for successful parentage assignment will vary according to the heterozygosity of the markers in the population, but simulations (Glaubitz et al., 2003) and empirical tests (Liu et al., 2017) suggest that 6 SNPs have a similar capacity for assignment as one microsatellite. Previous microsatellite studies of abalone used 5-9 markers, suggesting that a carefully selected group of 30 to 54 SNPs may be enough to obtain more than 90% unambiguous assignment. In practice, the number of SNPs necessary for successful assignment appears is quite variable. For example, Liu et al. (2017) found that 50 SNPs allowed 100% assignment in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*; yet in another study of a different population of *C. gigas*, Lap \u00e8 gue et al. (2014) found that 150 SNPs were necessary for unambiguous parentage assignment. While assignment success for SNP panels is clearly influenced by numerous population genetic factors and by the quality of the markers, optimization approaches based on using the most polymorphic markers (Perez-Enriquez and Max-Aguilar, 2016) or testing subsets of SNPs from a larger panel (Holman et al., 2017) can help to determine smaller optimal panels for particular populations.

The assignment success of a panel may also be influenced by the method used to achieve it. Numerous methodologies for assigning parentage exist (Jones et al., 2010), but among the most widely used are exclusion-based methods and maximum likelihood-based methods. Exclusion-based methods are sensitive to genotyping errors whereas likelihood-based methods generally give higher assignment rates (especially with low power marker sets), but can give inconsistent results (Vandeputte and Haffray, 2014). Direct comparisons of the two methods (e.g. Perez-Enriquez and Max-Aguilar, 2016; Tr \u00f4 ng et al., 2013) showed similar levels of assignment were achieved with the same number of markers. Furthermore, Tr \u00f4 ng et al. (2013) found that likelihood-based methods could help resolve certain cases in which exclusion methods assigned multiple parents. Comparing the results from multiple methods can increase assignment

confidence (Morvezen et al., 2013), and help to determine the optimal number of markers necessary to assign parentage in a given population.

In the context of selective breeding programs, an important output of an SNP panel is its capacity to estimate effective size (N_e) of populations under selection (van den Bergb and Roodt-Wilding, 2010). The N_e of cultured populations is often lower than the number of parents, a fact that is especially true for aquatic species which are characterized by high fecundity and high variability in reproductive success (Boudry et al., 2002). In closed populations such as selected farm populations, low N_e (i.e. high genetic drift) can lead to a deleterious loss of diversity (Falconer and Mackay, 1996). If no temporal information is available, N_e can be calculated from the variability of reproduction success of the different parents contributing to a cohort (Chevassus, 1989). N_e can also be estimated from genetic parameters such as heterozygotes excess (Zhdanova and Pudovkin, 2008) or linkage disequilibrium (Waples and Do, 2008). Methods for estimating N_e with molecular markers are still in their infancy and different methods may lead to different results on the same dataset (Morvezen et al., 2016; Waples and Do, 2010); thus comparing different estimates of N_e can provide a measure of confidence in the value. In abalone hatcheries, N_e has been estimated at 18 to 75 for *H. rubra* farms in Australia (Evans et al., 2004), and, at 15-67 for *H. midae* following two generations of selection on farms in South Africa (Rhode et al., 2014). In *H. midae*, these N_e estimates were associated with elevated rates of inbreeding (5%), and thus assessing N_e is an important step in understanding loss of genetic diversity when implementing new breeding practices.

The first aim of this study was to design a panel of SNPs using data from a transcriptomic database for high throughput parentage assignment. The second aim was to test the panel's utility for parentage assignment in a real cohort reared during three years at an abalone farm. Finally the inferred pedigree was used to estimate N_e in this cohort.

Materials and Methods

2.1. Rearing of mixed families cohorts and bi-parental families

A total of 945 abalone were reared during 32 months at France Haliotis (48°36'46N, 4°33'30W; Plouguerneau, France), a commercial French hatchery. The studied progeny resulted from a full factorial mating of 24 males and 16 females randomly sampled from France Haliotis farmed stock. Two epipodia were sampled from each parent after the spawning and stored in 70° ethanol. Farm stock from France Haliotis was not under intentional selective pressure and animals were produced from systematic matings between wild and farmed individuals (either males or females were wild broodstock) in order to avoid inbreeding.

Progeny were reared under common conditions with the standard production system of a sea-based abalone farm. More details on hatchery procedure can be found in Daume et al. (2000). A full factorial mating design was created by fertilizing eggs from 16 dams with the sperm of 24 sires. Briefly, the males and female gametes were collected separately by individual spawning or sperm ejaculation in beakers. Eggs of the different dams were equalized in number and pooled. They were then divided between 24 buckets of 20 L, with each bucket fertilized by the sperm from a single male. After fertilization, all embryos were pooled and abalone larvae shared a common larvae tank. They were induced to settle in one nursery tank, where they were fed with seaweed cultured on plates, mainly *Ulva lens* and diatoms. Abalones were reared for 14.5 months in nursery tanks, after which 3000 juveniles were randomly chosen to be sent to sea cages. Limited mortality was observed during the cage rearing. Abalones were reared at standard farm density and fed monthly with macro-algae (mainly *Palmaria palmata* and *Laminaria digitata*) during 17 months in sea cages, during which time limited mortality was observed. After this rearing procedure (31 months in total), animals were brought back to the laboratory facility for tissue samples. For each individual, a piece of foot was cut and stored in 70° ethanol for DNA extraction.

In addition, a training set of five full sib families were produced separately. A piece of tissue was sampled by cutting a small fragment of the basal part of the foot from each parent at the time of spawning. Settlement plates were put in 20L buckets after two months in the nursery to prevent any mixing. The juveniles were reared during 4 months in the bucket with constant input of water and fed with dry powder of *Palmaria palmata* two times a week until a size of 8 mm. At that time the foot was sampled and stored in 70° ethanol for DNA extraction. DNA

samples from both mixed families and full sib families were sent to LGC Genomics (Hoddesdon, UK) for DNA extraction and genotyping.

2.2. SNP discovery

The transcriptomic data which served as the basis for SNP discovery are described in detail in Harney *et al.*, (2016), but a brief overview is provided here. The transcriptome comprised 2 distinct datasets: an experiment on early development in *H. tuberculata* consisting of 24 RNA-Seq libraries of several thousand pooled larvae reared under different environmental conditions; and an experiment on the immune response of adult *H. tuberculata* to the pathogen *Vibrio harveyi*, consisting of 24 RNA-Seq libraries derived from 12 individual hemolymph samples (a total of 48 libraries across 36 samples). Larval samples originated from the hatchery France Haliotis, while adult samples were from one of two wild populations: Molène (France, 48° 23' 40" N, 4° 57' 33" W) and Saint-Malo (France, 48° 38' 57" N, 2° 1' 32" W). Illumina sequencing generated more than 1.5 billion paired-end reads. Filtration of low quality reads left 1.3 billion high quality reads (790,015,978 for larvae and 544,556,316 for adults) which were used in the generation of a shotgun transcriptome assembly using TRINITY (Haas et al., 2013). Following filtration, this resulted in a transcriptome of 41,099 non-redundant contigs (i.e. not including potential splice variants or gene duplicates) with an average length of 1,015 base pairs. The raw sequence data and reference transcriptome are available from the NCBI under the accessions SRA303338 and GEAU01000000 respectively.

Variant detection followed the WGS workflow proposed by the creators of SAMTOOLS (<http://www.htslib.org/workflow/>, accessed 06/10/2017). Initially the *H. tuberculata* transcriptome was indexed using the BURROWS WHEELER ALIGNER (Li and Durbin, 2009). SAMTOOLS (Li et al., 2009) was then used to map the 1.3 billion high quality reads to the reference. PICARD was used to mark and remove duplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>, accessed 06/10/2017) and realignment was carried out with the GENOME ANALYSIS TOOLKIT (McKenna et al., 2010). Finally SAMTOOLS was used to combine reads from the same samples that were in different libraries, and to produce a variant call file.

2.3. SNP Filtration

The variant call file was initially subject to a heavy filtration using the filter argument in SAMTOOLS. All non-biallelic alleles and SNPs less than 50 base pairs from the start of the contig

were removed; furthermore, the 'thin' argument was set to 50, to prevent inclusion of SNPs that were less than 50 base pairs from one another. Any SNPs that were not present in at least 34 of the 36 samples from Harney et al. (2016) were also removed. Finally, SNPs with a minor allele frequency (MAF) less than 0.2 were also filtered. Although pooled samples do not provide accurate estimates of allele frequencies, this filtration step still allows SNPs with particularly high or low allele frequencies to be identified and removed.

Following this filtration, phred scaled quality scores and read depth were assessed to ensure only high quality SNP sequences remained. Because larval RNA samples had not been sequenced with strand specific primers, transcriptome assembly produced contigs with unknown sense. Sense was therefore inferred by running the open reading frame (ORF) detection program TRANSDECODER (Haas et al., 2013) against all the contigs remaining in the data set. In cases where contigs contained multiple ORFs of the same sense, this was taken to be the correct direction. To resolve cases where ORFs were found in both the sense and antisense direction, BLASTP (Altschul et al., 1990) was used to search for hits against the UniProt database. In the majority of cases, blast hits either matched ORFs in only one direction, or blast hit sense matched ORF sense, resolving the sense of the contig. In cases where ORF and blast hit senses did not correspond, contigs and the SNPs associated with them were removed from the analysis.

Following sense assessment, SNPs in which heterozygosity was low (no heterozygotes observed among the 12 adults genotyped) were removed, and linkage disequilibrium scores (LD) were assessed in cases where contigs carried multiple SNPs. As with AF estimation, LD for pooled samples is not strictly accurate, but still provides an indication of SNPs that are not in equilibrium. For SNP pairs with high LD scores ($r^2 > 0.1$), a single one was selected to take forward on the basis of one of the quality values (base quality bias score). Assay design required 50 base pairs either side of the SNP; therefore when SNPs were within 100 base pairs of each other on the same contig, a single SNP was taken forward on the basis of quality, and SNPs less than 50 base pairs from the end of the contig were excluded. Filtration to the final target of 500 SNPs was achieved by using quality scores provided by SAMTOOLS (for a list of the quality scores and thresholds used, see supplementary table 1). These 500 SNPs and the 50 bp flanking sequences either side of the SNP were sent to LGC Genomics for assay design.

2.4. Genotyping and selection of SNP subset

DNA extractions were performed by LGC genomics according to their standard protocol, with tissue lysis achieved using Proteinase K, and subsequent binding, washing and elution steps achieved using proprietary buffers. Following DNA extraction, LGC Genomics performed high throughput genotyping using KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) assays, allowing bi-allelic scoring of SNPs (Semagn et al., 2014). Following genotyping, clusterplots were assessed, and SNPs for which homozygote and heterozygote groups did not cluster clearly were removed. Furthermore, only SNPs with > 90% genotyping success among all samples (mixed cohort and training families) were retained for the panel of SNP markers.

In order to carry out the parentage assignment, a subset of this panel was selected. Only SNPs with MAF > 0.1 (among all samples) and with a call success rate of > 90% (among the parents of the mixed cohort families) were selected, as these would likely be the most informative. To assess the quality of the markers, we compared parent and offspring genotypes and SNP heredity among the five full-sib training families. At this point, any SNPs < 90% genotyping success among training family parents were removed. SNPs for which offspring genotypes did not match parental genotypes, or for which offspring genotypes were deemed improbable, were removed (although up to two genotyping ‘errors’ among offspring were allowed per SNP/family). Additionally, clusterplots for these SNPs were inspected using SNPVIEWER2 (LGC), and those with ambiguous clustering of heterozygotes (e.g. the presence of two groups of heterozygotes) were removed.

2.5. Parentage assignment

Parentage assignment for the mixed families using the SNP subset was performed with CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007) using a maximum likelihood based methodology and with VITASSIGN 8.5 (Vandeputte et al., 2006) using an exclusion based methodology. The outputs of the two programs were compared. A simulation was carried out to obtain a theoretical assignment power of the SNP panel with CERVUS with the following parameters: 10,000 offspring generated, 24 sires, 16 dams, 100% parents sampled, 99% of loci typed, 1% error rate. For each individual, assignment was awarded to the most probable pair of parents according to a log-likelihood ratio (LOD score). The observation of the mismatch distribution of offspring-dam-sire trios informed the decision to allow VITASSIGN up to 5 mismatches ($\approx 2\%$ of discordance within a trio). For both CERVUS and VITASSIGN, all crosses between the 24 sires and 16 dams were assumed to be possible.

2.6. Optimization of the SNP panel

The optimization of the SNP panel was carried out using the most conservative approach of parentage assignment, the exclusion method. In order to know the minimum number of markers required to obtain an assignment rate of 95%, SNPs were ordered by information content, represented by their MAF. Assignment rate was then calculated for the top five, 10, 15, 20 (etc., up to 120) best SNPs ranked by VITASSIGN, allowing zero, one, two, three, four, or five mismatches for each step.

2.7. N_e estimation methodologies

Effective population size (N_e) was estimated using both a basic formula and using linkage disequilibrium methods. The basic formula followed Chevassus (1989), and is expressed as:

$$N_e = \frac{4(N - 2)}{\left(K_s + \frac{V_s}{K_s}\right) + \left(K_d + \frac{V_d}{K_d}\right) - 2}$$

Where N is the total number of offspring, K_s and K_d are the mean numbers of offspring per sire and dam, and V_s and V_d are the variances in the number of offspring per sire and dam. N_e was then estimated with NEESTIMATOR V2.01 (Do et al., 2014) using linkage disequilibrium methods (Waples and Do, 2008). For this analysis, all SNPs with a minimum allele frequency (MAF) <0.05 were excluded (as advised by Waples & Do, 2008).

Results

3.1. SNP discovery and filtration *in silico*

The variant call file (vcf) output by SAMTOOLS identified a total of 2,176,887 SNPs in the *H. tuberculata* transcriptome. The initial heavy filtration removed nearly 99% of these, leaving 2,368 SNPs across 1,923 contigs, all of which had phred scaled quality scores above 200 and read depths between 150 and 310. TRANSDECODER identified 556 contigs with at least one ORF (a total of 986 ORFs), which in combination with BLASTP results allowed the sense of the contig to be resolved in most cases. Just 10 contigs contained ORF and blast hit senses that did not correspond, and so these contigs (and their associated SNPs) were removed from the analysis. This resulted in a list of 706 SNPs across 546 contigs. Following the removal of SNPs for which no heterozygous adult individuals were present, 639 SNPs on 478 contigs remained. A check for linkage disequilibrium and the removal of SNPs that were too close to each other, or to the end of the contig, reduced this to 582 SNPs across 478 contigs, from which 500 SNPs across

441 contigs were chosen based on Samtools quality scores (see supplementary table S1). Two SNP sequences that failed LGC Genomics' assay design were replaced with sequences from the list of 582 SNPs. Filtration steps are summarized in Fig. 1.

3.2. Selection of informative SNPs

From the 500 SNPs that were genotyped, 298 SNPs showed at least 90% genotyping success among all samples (parents and offspring from both mixed family cohorts and full sib training families), and the average call success for these SNPs was 98.4%. This novel panel of SNP markers is provided in supplementary table S2. Of these, 152 SNPs had an MAF > 0.1 among all samples, and a call success rate of $\geq 90\%$ among the 40 parents of the mixed-cohort families. Parent and offspring genotypes were assessed among the five full sib training families for these markers. For 21 of these SNPs, parent and offspring genotypes did not match in certain families (most likely because of genotyping errors among the parents), while for 8 SNPs, heterozygotes did not cluster as a single group in SNPVIEWER2 clusterplots. As a precaution, these 29 SNPs were also removed, leaving a subset of 123 SNPs for parentage assignment. The filtrations and quality controls used to produce this final group of SNPs are summarized in Fig. 1, and the subset of 123 SNPs used for parentage assignment is indicated in supplementary table S2.

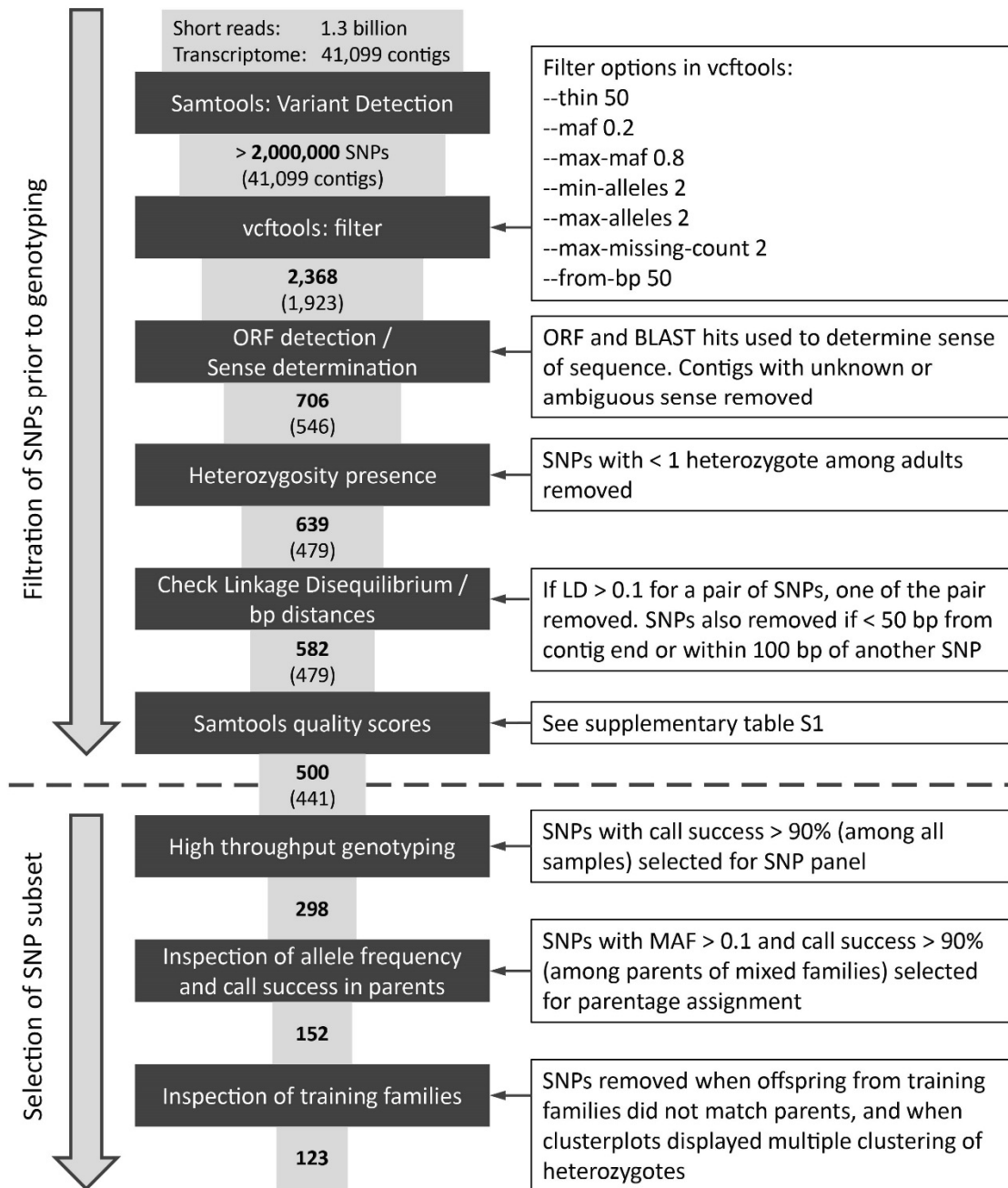


Fig. 1. Filtration steps applied to list of variants in order to produce 500 SNPs for high throughput genotyping, and subsequent selection of 123 informative SNPs following genotyping

3.3. Parentage assignment

The simulation carried out in CERVUS showed a potential estimation rate of 100% with the subset of 123 SNPs. Observed assignment rate of offspring from mixed family cohorts to a single pair of parents with CERVUS was 99.99%, with only two offspring with no probable parent pairs (negative LOD score). The exclusion method carried out by VITASSIGN gave 98.9% unambiguous assignment with 99% congruent parent pairs for these individuals compared to CERVUS. Four individuals were not assigned by VITASSIGN: the same two unassigned individuals found with CERVUS, and two individuals that had six mismatches with their most probable parent pair (and were therefore above our selected threshold of five mismatches). These individuals may have suffered from multiple genotyping errors. Seven other individuals were ambiguously assigned to two sires with an equal number of mismatches for either sire, illustrating a limitation of the exclusion method. Although the likelihood method could help with identification the correct sire, a conservative approach was chosen, and no sire was assigned to those individual in the final pedigree. Summary statistics for the 123 SNPs (observed and expected heterozygosities, PIC values and non-exclusion probabilities) from CERVUS are reported in supplementary table S3.

3.4. Optimization of SNP panel

VITASSIGN calculations showed that it was not possible to achieve 90% assignment with mismatch values of 0 and 1 (Fig. 2). However, with three, four or five mismatches allowed, 95% assignment was obtained with the 60 most informative SNPs. Furthermore, for four or five mismatches, increasing the number of markers (up to 100) improved assignment success to 98%. When considering four or five mismatches, increasing the number of markers beyond 100 did not result in large changes in assignment success. On the other hand, for lower mismatches (zero, one or two), genotype errors resulted in declining assignment success beyond 65 markers, and with a dramatic fall in assignment success associated with the 10 least informative markers (Fig. 2).

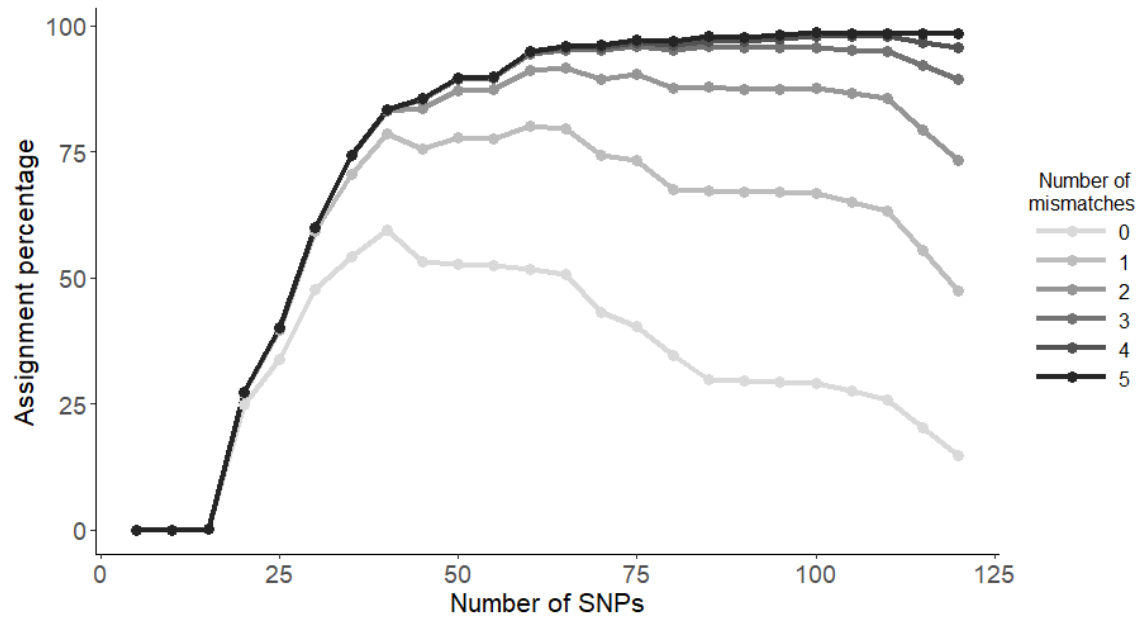


Fig. 2. Change in single assignment rate with VITASSIGN for different level of allowed mismatch and an increasing number of SNPs, added in groups of 5 at a time based on their MAF.

3.5. Variability of reproductive success and N_e estimates

The reproductive success of parents was highly variable (Fig. 3.A). The variability of contribution was higher for dams than for sires: the three dams with the highest reproductive success contributed to 63% of the progeny, while the three dams with the least reproductive success had less than five offspring in the progeny (<0.5%). Of the 384 families possible with our mating design, 189 (49%) were found in the progeny, with a high variability of number of individuals per family (Fig. 3.B). Variability in reproductive success resulted in N_e estimates that were smaller than the initial number of parents, but generally consistent across different methods. The calculation based on Chevassus's formula (1989) estimated N_e to be 18, while the estimate based on linkage disequilibrium using NEESTIMATOR ($N_e = 20.2$, CI = 19.4 – 21.1) was slightly higher, but noticeably consistent.

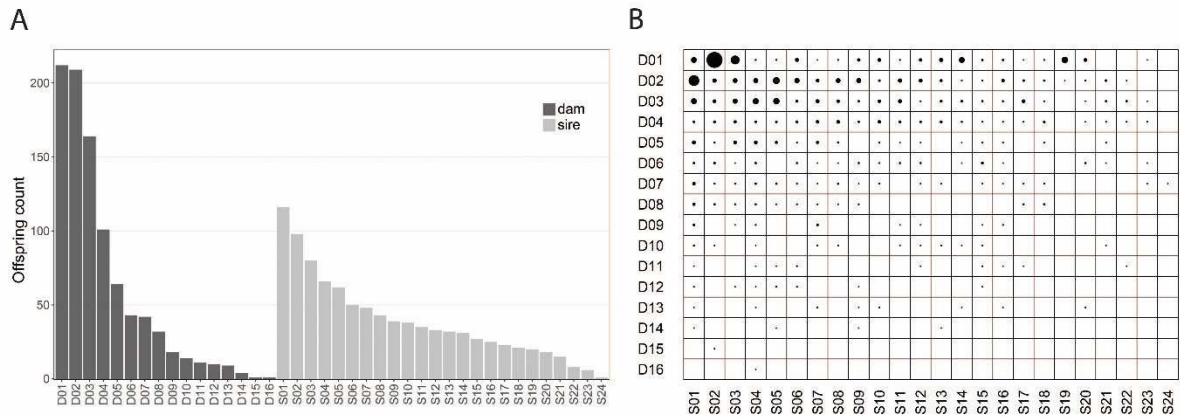


Fig. 3. A) Number of offspring in the progeny for every dam and sire in the mating scheme, **B)** Representation of the mating scheme with dams in lines and sires in columns, when individuals of every possible cross are presented on the progeny, a dot with an area proportional to the number of offspring is presented.

Discussion

In this study we successfully used a previously published transcriptomic dataset to generate a panel of informative SNPs for parentage assignment of the European abalone *H. tuberculata*. Comparing maximum-likelihood and exclusion-based methods to assign parentage yielded similar results and showed that a panel consisting of as few as 60 SNPs was enough to achieve more than 95% assignment success. The optimization of a panel of SNPs is of interest to reduce costs of genotyping particularly in aquaculture species with high fecundity (Vandeputte and Haffray, 2014).

We provide an example of the power of using existing transcriptomic resources for discovering SNPs for parentage assignment, and present a panel of 298 SNPs which were reliably genotyped in *H. tuberculata*. The success rate for SNP discovery was 59.6%, which is comparable to other recent studies in aquatic species which have developed novel SNP panels: Holman et al. (2017) successfully genotyped for 61.3% of tested markers in Atlantic salmon, while Gonçalves da Silva et al. (2015) were able to genotype 61.2% of SNPs in the orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). However, in both of these studies, SNP discovery was based on novel genomic sequencing carried out as part of the study. Our use of an existing transcriptome saved a considerable amount of time and money. Our success rate was somewhat lower than the success rates of 70.3% and 78.4% observed by Lapègue et al., (2014) in two species of oyster, where transcriptomic data was also used. However it is interesting to note that Lapègue et al., (2014)

used both an *in vitro* approach (i.e. using targeted sequencing for SNP discovery) approach and a purely *in silico* approach (similar to our own, using only existing transcriptomic data) for SNP discovery, and found broadly similar levels of genotyping success with both methods. Indeed, for the oyster *Ostrea edulis*, *in silico* SNP discovery was more reliable than *in vitro* SNP discovery (Lapègue et al., 2014). These results suggests that *in silico* SNP discovery using existing transcriptomic resources is a valid and cost-effective strategy for identifying polymorphic markers for parentage assignment.

To our knowledge this is the first SNP panel able to assign parentage in abalone. It demonstrates the utility of using low density SNP panels to achieve efficient assignment as observed in other aquatic species (Holman et al., 2017; Lapègue et al., 2014; Nolasco-Alzaga et al., 2018; Sellars et al., 2014). The assignment rate of 98.9% is higher than in previous studies that used microsatellites, which achieved 82% (Slabbert et al., 2009), 91% (van den Bergb and Roodt-Wilding, 2010), 93% (Evans et al., 2004) and 95% (Hara and Sekino, 2007) assignment. This highlights the utility of SNPs for parentage assignment in this genus. In our study, of the 11 individuals not assigned, two were clearly contaminants and two had six mismatches and were probably not assigned because of cumulative genotyping errors. Allowing up to 2% of alleles to mismatch within a trio (here, 5 mismatches) is commonly done (e.g. Nguyen et al., 2014; Rohrer et al., 2007; Trùng et al., 2013), and is necessary to avoid the strong effect of genotyping errors (Vandeputte et al. 2006).

In our study, the comparison of two main methods of assignment allowed the identification of seven individuals with high LOD scores in CERVUS but ambiguous assignment in VITASSIGN. The observation of the second pair of possible parents shows that this ambiguity derives from the sires. As these sires had a higher rate of missing data, this ambiguity does not seem to result from a weak power of exclusion for our SNP panel. It is unclear why certain males had more missing data, although if sires were related to one another, this may have complicated their assignment (Weinman et al., 2015).

Our optimization approach showed that a set containing the 60 best markers allowed more than 95% unambiguous assignment for this particular cohort. This is only slightly higher than the initial estimate of 30-54 SNPs based on the relative information value of SNPs to microsatellites in previous abalone studies, and we achieved higher rates of assignment than any previous parentage assignment based on microsatellites. It is only slightly higher than the 50 SNPs required to achieve successful assignment found in recent studies on whiteleg shrimp

Litopenaeus vannamei (Perez-Enriquez and Max-Aguilar, 2016) and the Pacific oyster *C. gigas* (Liu et al., 2017). Furthermore, 60 SNPs is congruent with the analysis of Holman et al (2017), who found that a subset of 60 SNPs from their panel of 94 total SNPs was sufficient for 100% assignment in 85% of simulations. These authors demonstrated considerable variation in the success of different panels of SNPs, highlighting the utility of optimization approaches for determining the most informative SNPs for a given population. Indeed, because allele frequencies and null alleles vary between populations, a cost-effective strategy for panel design may involve genotyping an initial group of individuals with all possible markers, carrying out an optimization step, and then selecting a subset of the most informative markers to genotype in the whole cohort.

Our study provides the first estimate of the variance of reproductive success in a fully factorial cross for the European abalone. In our mating design, eggs were equalized by eye, pooled, then split and fertilized with the sperm of an individual male. This procedure was conducted to limit variance in egg number, which can have a strong effect on reproductive success (Bilbao et al., 2012), and avoid sperm competition, which has been suggested to exist in the abalone *H. asinina* (Selvamani et al., 2001). Nevertheless, parentage assignment showed that overall variability of reproductive success was high, particularly in dams. The three dams with the highest reproductive success contributed to 63% of the progeny, and the three sires with the highest reproductive success contributed to 31% of the progeny. Conversely, we found three dams and three sires that each contributed less than 9 offspring (<1%) towards the total progeny. Variation in reproductive success of broadcast spawning marine invertebrates might arise due to differences in gamete quality (Boulais et al., 2015) or egg and sperm interactions during fertilization (Palumbi, 1999). This variation may also arise due to differential survival at later life stages; for example *C. gigas* families mixed during larval development show high variance in family representation in the post larval stage (Matson, 2010). High variability of reproductive success has also previously been reported in other abalone studies based on microsatellites (Hara and Sekino, 2007; Lucas et al., 2006). Variability was either balanced between the two sexes (Slabbert and Roodt-Wilding, 2006; van den Bergb and Roodt-Wilding, 2010), or higher between sires (Hara and Sekino, 2007) when sperm competition was possible (Boudry et al., 2002). This high variability of reproductive success led to the absence of 51% of possible parental combinations in our sampled progeny. In contrast, Lucas et al. (2006) observed 89% of parental combinations in a smaller experiment (6 dams and 14 sires) with *H. asinina*. Their spawning protocol involved carrying out separate fertilizations for each sire/dam combination,

which not only eliminated sperm competition, but may have reduced the effects of spawning asynchrony and variable egg quality on initial variability in reproductive success. Thus separate sire/dam fertilizations seem to be important for minimizing variance in reproductive success. Additionally, the effects of intra-gametic interactions and inter-familial variability in survival during the first three months of rearing have not previously been studied for abalone and cannot be excluded to explain the variability in reproductive success that we observed (Boudry et al. 2002).

High variance in reproductive success directly influenced the calculation of effective population size (Chevassus, 1989), although the similarity of N_e values calculated from variance in reproductive success and estimated from molecular information (Do et al., 2014) provide some confidence in these values. It is likely that high variability in reproductive success leading to low N_e/N ratios (N_e with respect to the census population size) is a common feature of marine broadcast spawning invertebrates (Hedrick, 2005), and in the context of abalone aquaculture, a low N_e has already been observed in several studies (Evans et al., 2004; Rhode et al., 2014; Slabbert et al., 2009). A temporal N_e estimate of 50, evaluated over two successive generations, was associated with an inbreeding increase of 5% per generation in a commercial South African population of *H. midae* (Rhode et al., 2014). This level is higher than the 1% that is generally recommended for a sustainable breeding strategy (Bentsen and Olesen, 2002). Our results confirm that the cohort study here is not large enough to support a selective breeding program in the long term. However, the SNP panel we have developed could be used for marker-assisted selection, ensuring a genetically diverse base population (Hayes et al., 2006; Loughnan et al., 2016) for future selective breeding programs that will maximize initial genetic variation. Markers can also be used to determine optimal breeding strategies that will reduce the relatedness of subsequent crosses (Hely et al., 2013; Herbinger et al., 1995).

Conclusion

Here we present a novel panel of 298 SNP markers for the European abalone *H. tuberculata*. The panel was developed using an existing transcriptomic database and demonstrated comparable success rates to SNP discovery experiments based on purpose collected genomic data. A subset of 123 markers had a theoretical potential assignment of 100%, and provided 98.9% assignment in a real farm cohort. The 60 most-informative markers were sufficient to achieve more than 95% assignment. The use of the markers to observe the variability of

reproductive success suggests that farmers should improve breeding practices, particularly with respect to equalization of eggs.

Acknowledgements

The authors would like to thank Xavier Lesage, Frederic Laurans, Michael Gleeson, Iain McKensy, and Maryvonne Leroux, from the production team of France Haliois, for the 4 year rearing of the mixed cohort families. Abims (Analysis bioinformatics for marine science, Roscoff Marine Station) provided server space for bioinformatic analyses. In addition, the authors would like to thank Anastasia Bestin and Anne-Sophie Tiriau from the SYSAAF for help with phenotyping, and Thomas Bisch and Amy Courant for help with the demanding work of tissue sampling. This work was conducted in the context of a PhD partially funded by France Haliois and ANRT (CIFRE N° 2014 0643) and benefiting from the support of the European Union via program 42 of the FEAMP: “innovation in aquaculture”.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anderson, E.C., Garza, J.C., 2006. The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics* 172, 2567–2582. doi:10.1534/genetics.105.048074
- Avia, K., Coelho, S.M., Montecinos, G.J., Cormier, A., Lerck, F., Mauger, S., Faugeron, S., Valero, M., Cock, J.M., Boudry, P., 2017. High-density genetic map and identification of QTLs for responses to temperature and salinity stresses in the model brown alga *Ectocarpus*. *Sci. Rep.* 7, 43241. doi:10.1038/srep43241
- Bentsen, H.B., Olesen, I., 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. *Aquaculture* 204, 349–359. doi:10.1016/S0044-8486(01)00846-8
- Bilbao, A., Uriarte, I., del Pino Viera, M., Sosa, B., Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., 2012. Effect of macroalgae protein levels on some reproductive aspects and physiological parameters for the abalone, *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846). *J. World Aquac. Soc.* 43, 764–777. doi:10.1111/j.1749-7345.2012.00617.x
- 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, 283–296. doi:10.1016/S0044-8486(01)00841-9
- Boulais, M., Corporeau, C., Huvet, A., Bernard, I., Quere, C., Quillien, V., Fabioux, C., Suquet, M., 2015. Assessment of oocyte and trochophore quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 437, 201–207. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.025
- Chevassus, B., 1989. Aspects génétiques de la constitution de populations d'élevage destinées au repeuplement. *Bull. Français la Pêche la Piscic.* 146–168. doi:10.1051/kmae:1989010
- Daume, S., Krsinich, A., Farrell, S., Gervis, M., 2000. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Appl. Phycol.* 12, 479–488. doi:10.1023/a:1008110828581
- De Wit, P., Pespeni, M.H., Palumbi, S.R., 2015. SNP genotyping and population genomics from expressed sequences -current advances and future possibilities. *Mol. Ecol.* 24, 2310–2323. doi:10.1111/mec.13165
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J., Ovenden, J.R., 2014. NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 209–214.

doi:10.1111/1755-0998.12157

- Elliott, N.G., 2000. Genetic improvement programmes in abalone: What is the future? *Aquac. Res.* 31, 51–59. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00386.x
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P., Elliott, N.G., 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* 233, 109–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.037
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th edition, Fourth Edi. ed. Longman, London, UK.
- Gjedrem, T., Baranski, M., 2010. *Selective Breeding in Aquaculture: an Introduction*. Vol. 10. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., Dewoody, J.A., 2003. Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Mol. Ecol.* 12, 1039–1047. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01790.x
- Gonçalves da Silva, A., Barendse, W., Kijas, J.W., Barris, W.C., McWilliam, S., Bunch, R.J., McCullough, R., Harrison, B., Hoelzel, A.R., England, P.R., 2015. SNP discovery in nonmodel organisms: Strand bias and base-substitution errors reduce conversion rates. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 723–736. doi:10.1111/1755-0998.12343
- Gutierrez, A.P., Lubieniecki, K.P., Fukui, S., Withler, R.E., Swift, B., Davidson, W.S., 2014. Detection of quantitative trait loci (QTL) related to grilising and late sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Biotechnol.* 16, 103–110. doi:10.1007/s10126-013-9530-3
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M.G., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084
- Hannon, C., Officer, R.A., Le Dorven, J., 2013. Review of the technical challenges facing aquaculture of the European abalone *Haliotis tuberculata* in Ireland. *Aquac. Int.* 21, 243–254. doi:10.1007/s10499-012-9584-7
- Hara, M., Sekino, M., 2007. Parentage testing for hatchery-produced abalone *Haliotis discus hannai* based on microsatellite markers: Preliminary evaluation of early growth of selected strains in mixed family farming. *Fish. Sci.* 73, 831–836. doi:10.1111/j.1444-

2906.2007.01403.x

- Harney, E.D., Dubief, B., Boudry, P., Basuyaux, O., Schilhabel, M.B.M.B., Huchette, S., Paillard, C., Nunes, F.L.D., 2016. De novo assembly and annotation of the European abalone *Haliotis tuberculata* transcriptome. *Mar. Genomics* 28, 11–16. doi:10.1016/j.margen.2016.03.002
- Hayes, B., He, J., Moen, T., Bennewitz, J., 2006. Use of molecular markers to maximise diversity of founder populations for aquaculture breeding programs. *Aquaculture* 255, 573–578. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.038
- Hedrick, P., 2005. Large variance in reproductive success and the N_e/N ratio. *Evolution* (N. Y.) 59, 1596–1599. doi:10.1038/438753a
- Hely, F.S., Amer, P.R., Walker, S.P., Symonds, J.E., 2013. Optimised parent selection and minimum inbreeding mating in small aquaculture breeding schemes: a simulation study. *Animal* 7, 1–10. doi:10.1017/S1751731112001371
- Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Pitman, E.R., Paquet, D., Mesa, K.A., Morris, D.B., Wright, J.M., Cook, D., 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137, 245–256. doi:10.1016/0044-8486(95)01109-9
- Holman, L.E., Garcia de la Serrana, D., Onoufriou, A., Hillestad, B., Johnston, I.A., 2017. A work flow used to design low density SNP panels for parentage assignment and traceability in aquaculture species and its validation in Atlantic salmon. *Aquaculture* 476, 59–64. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.04.001
- Huchette, S., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shellfish Res.* 23, 951–955.
- Jonasson, J., Stefansson, S.E., Gudnason, A., Steinarsson, A., 1999. Genetic variation for survival and shell length of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *J. Shellfish Res.* 18, 621–625.
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A., Ratterman, N.L., 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 6–30. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
- Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017. Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria

- approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture* 467, 190–197. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.04.028
- Lapègue, S., Harrang, E., Heurtebise, S., Flahauw, E., Donnadiou, C., Gayral, P., Ballenghien, M., Genestout, L., Barbotte, L., Mahla, R., Haffray, P., Klopp, C., 2014. Development of SNP-genotyping arrays in two shellfish species. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 820–830. doi:10.1111/1755-0998.12230
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
- Liu, T., Li, Q., Kong, L., Yu, H., 2017. Comparison of microsatellites and SNPs for pedigree analysis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquac. Int.* 25, 1507–1519. doi:10.1007/s10499-017-0127-0
- Loughnan, S.R., Smith-Keune, C., Jerry, D.R., Beheregaray, L.B., Robinson, N.A., 2016. Genetic diversity and relatedness estimates for captive barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch) broodstock informs efforts to form a base population for selective breeding. *Aquac. Res.* 47, 3570–3584. doi:10.1111/are.12807
- Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W., Degnan, B.M., 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture* 259, 146–152. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.039
- Matson, S.E., 2010. Development, Evaluation and Application of a Mixed-family Selective Breeding Method for the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). Oregon State University.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriell, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110.20
- Merwe, A.B. Der, Blaauw, S., Plessis, J. Du, Roodt-wilding, R., 2013. Transcriptome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) for abalone (*Haliotis midae*): Validation and application using GoldenGate medium-throughput genotyping assays. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 19341–19360. doi:10.3390/ijms140919341
- Morvezen, R., Boudry, P., Laroche, J., Charrier, G., 2016. Stock enhancement or sea ranching? Insights from monitoring the genetic diversity, relatedness and effective population size in a seeded great scallop population (*Pecten maximus*). *Heredity* 117, 1–7.

doi:10.1038/hdy.2016.42

- Morvezen, R., Cornette, F., Charrier, G., Guinand, B., Lapègue, S., Boudry, P., Laroche, J., 2013. Multiplex PCR sets of novel microsatellite loci for the great scallop *Pecten maximus* and their application in parentage assignment. *Aquat. Living Resour.* 26, 207–213. doi:10.1051/alr/2013052
- Nguyen, T.T.T., Hayes, B.J., Ingram, B.A., 2014. Genetic parameters and response to selection in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using a SNP-based pedigree. *Aquaculture* 420–421, 295–301. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.11.021
- Nolasco-Alzaga, H.R., Perez-Enriquez, R., Enez, F., Bestin, A., Palacios-Mechetnov, E., Haffray, P., 2018. Quantitative genetic parameters of growth and fatty acid content in the hemolymph of the Whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 482, 17–23. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.09.015
- Palumbi, S.R., 1999. All males are not created equal: fertility differences depend on gamete recognition polymorphisms in sea urchins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12632–12637. doi:10.1073/pnas.96.22.12632
- Perez-Enriquez, R., Max-Aguilar, A., 2016. Pedigree traceability in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using genetic markers: A comparison between microsatellites and SNPs. *Ciencias Mar.* 42, 227–235. doi:10.7773/cm.v42i4.2662
- Rhode, C., Maduna, S.N., Roodt-Wilding, R., Bester-Van Der Merwe, A.E., 2014. Comparison of population genetic estimates amongst wild, F1 and F2 cultured abalone (*Haliotis midae*). *Anim. Genet.* 45, 456–459. doi:10.1111/age.12142
- Rohrer, G.A., Freking, B.A., Nonneman, D., 2007. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Anim. Genet.* 38, 253–258. doi:10.1111/j.1365-2052.2007.01593.x
- Sellars, M.J., Dierens, L., Mcwilliam, S., Little, B., Murphy, B., Coman, G.J., Barendse, W., Henshall, J., 2014. Comparison of microsatellite and SNP DNA markers for pedigree assignment in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquac. Res.* 45, 417–426. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03243.x
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Degnan, B.M., 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: Parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 3, 478–485. doi:10.1007/s1012601-0062-X
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S., Olsen, M., 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 33, 1–14. doi:10.1007/s11032-013-

- Slabbert, R., Bester, A., D'Amato, M., 2009. Analyses of genetic diversity and parentage within a South African hatchery of the abalone *Haliotis midae* Linnaeus using microsatellite markers. *J. Shellfish Res.* 28, 369–375. doi:http://dx.doi.org/10.2983/035.028.0220
- Slabbert, R., Roodt-Wilding, R., 2006. Non-destructive sampling of juvenile abalone using epipodial tentacles and mucus: method and application. *African J. Mar. Sci.* 28, 719–721. doi:10.2989/18142320609504221
- Tokarska, M., Marshall, T., Kowalczyk, R., Wójcik, J.M., Pertoldi, C., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., Gregersen, V.R., Bendixen, C., 2009. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity* 103, 326–332. doi:10.1038/hdy.2009.73
- Trọng, T.Q., van Bers, N., Crooijmans, R., Dibbits, B., Komen, H., 2013. A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion. *Aquaculture* 388–391, 14–23. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.01.004
- van den Bergb, N.C., Roodt-Wilding, R., 2010. Parentage assignment in *Haliotis midae* L.: A precursor to future genetic enhancement programmes for South African abalone. *Aquac. Res.* 41, 1387–1395. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02428.x
- Vandeputte, M., Haffray, P., 2014. Parentage assignment with genomic markers: A major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. *Front. Genet.* 5, 432. doi:10.3389/fgene.2014.00432
- Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Mol. Ecol. Notes* 6, 265–267. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01167.x
- Waples, R.S., Do, C., 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: A largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.* 3, 244–262. doi:10.1111/j.1752-4571.2009.00104.
- Waples, R.S., Do, C., 2008. LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 753–756. doi:10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x
- Weinman, L.R., Solomon, J.W., Rubenstein, D.R., 2015. A comparison of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for analysis of parentage and kinship in a cooperatively breeding bird. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 502–511. doi:10.1111/1755-0998.12330

Zhdanova, O.L., Pudovkin, A.I., 2008. Nb_HetEx: A program to estimate the effective number of breeders. *J. Hered.* 99, 694–695. doi:10.1093/jhered/esn061

Manuscrit 4 : Estimation of genetic parameters of growth, morphologic, immune and behavioral traits in the European abalone *H. tuberculata* in the context of its domestication and implementation of selective breeding to improve growth.

A soumettre dans « Genetics Selection Evolution »

Authors

Sébastien Lachambre^{a,b}, Sabine Roussel^a, Sylvain Huchette^b, Kyle Chenevert^c, Christophe Lambert ^a, Jérôme Bugeon^e, Anastasia Bestin^f, Romain Morvezen^f, Florian Enez^f, Pierrick Haffray^f, Pierre Boudry^d

Affiliations

^a **LEMAR**, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b **France Haliotis**, 29880 Plouguerneau, France.

^c **University of North Carolina Wilmington**, Center for Marine Science, 5600 Marvin K. Moss Lane, Wilmington, NC 28409, USA.

^d **Ifremer**, UMR 6539 LEMAR (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Centre Bretagne, 29280 Plouzané, France

^e **INRA**, UR1037, LPGP, SFR Biosit, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, France

^f **SYSAAF**, Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français, 35000 Rennes, France

Corresponding Author

Pierre Boudry

Phone (work): +332 98 22 44 02

Email: Pierre.Boudry@ifremer.fr

Abstract

In the context of an increasing demand and declining supply from fisheries, aquaculture production of abalone has greatly increased in the last decades. Selective breeding has been initiated to improve growth in major abalone species, this trait being the main constraining one to increase aquaculture production. Among abalone species, *Haliotis tuberculata* is in its early domestication stage. No estimates of heritability and genetic correlations are yet available its growth-related traits. In this context, weight, length morphology, immunity and behavior traits were recorded on 945 offspring from a cohort generated by a full factorial mating of 24 sires and 16 dams reared under standard aquaculture conditions. SNPs were used to assign parentage of this cohort. BLUP was used to estimate additive genetic components and genetic correlations between traits. Size and weight between 14.5 and 42 months exhibited moderate to high heritability estimates (From 0.13 to 0.54). Variation of foot color and bled meat yield were also proved to be heritable, suggesting a potential genetic improvement on these economically important traits. No heritability were found for behaviour and immunologic traits. Novel phenotyping methods such as ultra-sound pictures to estimate meat yield were developed and evaluated as potential tools for selection. A strong positive genetic correlation between weight and gonad yield was observed, suggesting a trade-off between reproductive effort and meat yield. The sex ratio of the cohort studied was balanced but exhibited a variation between paternal half-sib families. Females were heavier at 32 month-old but no differences were found when 42 month-old. A low but significant heritability of sex ratio was observed and moderate genetic correlations were estimated between sex ratio of families and weight when 32 and 42 month-old. These observations rise the question of sex determinism in *H. tuberculata*. Our study provides essential information to initiate selective breeding to improve growth-related traits in the European abalone.

Keywords :

Heritability Genetic correlation, Multi-trait approach, SNP, Selective breeding, Physiology, Behavior.

Abbreviations

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

BLUP: Best Linear Unbiased Predictor

QTL: Quantitative Locus Traits

MAS: Marker Assisted Selection

Introduction

Aquaculture production is globally increasing (FAO 2015) and halioticulture is one of its fastest growing industries. Abalone production grew from 8700 MT to more than 120000 MT from 2002 to 2016 (Cook, 2016). Abalone are produced worldwide and demand has constantly outweighed the supply in the last decades (Cook, 2016). The different abalone species produced worldwide are at early domestication stages (Elliott, 2000). To support the increase of production, selective breeding programs have been initiated in most producing countries: Australia, Chili, China, Japan, New Zealand, South Africa and South Korea (Difford et al., 2017). Slow growth was clearly identified as the main limiting trait for the profitability of abalone aquaculture (Elliott, 2000). Precise estimation of heritability and genetic correlations of growth-related traits are necessary to predict gains that would result from a selection program.

Growth results from numerous biologic functions. In abalone, heritability estimates for both shell length and total weight at commercial sizes were between 0.2 to 0.5 in different *Haliotis* species (Brokordt et al., 2014; Camara et Symonds, 2014; Difford et al., 2017; Fariás et al., 2017; Jonasson et al., 1999; Liu et al., 2015b; Robinson et al., 2013; You et al., 2010a), allowing cumulative growth gains between 3 to 15% per generation with selective pressures between 3 to 5% (Elliott, 2000; Liu et al., 2015b; You et al., 2010b). Metabolic efficiency, food conversion ratio, immune capacity, resilience to farm stressors directly affect growth or meat quality of farmed animals. The monitoring of such traits is more difficult than weight or size at age requires to establish standardized and efficient measurements which may need extensive research works (Friggens et al., 2010; Monget et Le Bail, 2009). Consequently, little is yet known considering additive component variance of such traits for abalone. Meat yield of *Haliotis iris* were shown to present a medium (0.3) and foot color presented a high heritability (0.56) (Camara et Symonds, 2014). Improvement of meat yield could have an important economic impact. Because its measurement is lethal, it cannot be improved by individual selection. This difficulty was notably faced by the French trout industry, leading to the development of a combination of ultra-sound measurements that were proved to be a good predictor of meat yield (Haffray et al., 2013). To our knowledge, no ultra-sound picture methodology has yet been used in abalone. No significant heritability for *H. rufescens* were observed for heat shock proteins (Brokordt et al., 2015). Interestingly, the resistance to withering syndrome caused by the *rickettsia*-like organism (WS-RLO) was found to be heritable, suggesting that immune parameters may have additive genetic components (Brokordt et al., 2017). Behavioral traits are also important to

monitor, in relation with the adaptation of animals to their farm environment. A low heritability (0.09) of stress response on the movement was reported when comparing wild control and third generational selected farm animals for growth rate in *Haliotis laevis* (Robinson et al., 2013). However, the design of rapid and repeatable measurement is a key issue, problematic to deal with immune, physiological and behavioural measurements (Gonzalez et al., 2010).

Like many other aquatic species, abalone cannot be physically tagged at early stage to establish a pedigree because of the considerable number of offspring per family and the size of larvae (Vandeputte and Haffray, 2010). In this context, a common method is to rear families in different standardized nursery tanks and to mix them when they reach a size which allows individual tagging. As it is difficult to standardize culture practices, especially in nursery where abalone are feed fresh seaweed (Daume et al., 2004), the common environment of a single family can explain a large part of the observed phenotypic variation. This fact could lead to an overestimation of the heritability, confounding the tank effect with the additive genetic effect on the full sib similarity analysis (Brokordt et al., 2014), or reduced heritability if the common environment effect is added in the estimation model (Kube et al., 2007). To avoid this, the alternative methodology is to rear mixed family cohorts in a common environment and use DNA markers for posterior pedigree analysis (Vandeputte et Haffray, 2014). For abalone, only one study using microsatellites markers has followed this approach, reporting a high heritability (0.48) of shell length at 12 months for juvenile *Haliotis asina* (Lucas et al., 2006). A recent SNP panel was shown to be highly effective to assign parentage in *Haliotis tuberculata* and was used in our study to allow a mixed family design strategy (Harney et al. submitted).

A negative change of untargeted traits in response to selection is known as a genetic trade-off (Rauw et al. 1998). It can ultimately lead to economic loss and can be predicted by estimating correlations. Trade-offs are extensively described in mammal production, such as the reduction of fertility in dairy cattle selected for high milk production (Hoekstra et al. 1994). In aquaculture, some trade-offs observed include heart failure of salmon selected for improved growth (Torude et al. 2004). Selective breeding for growth has also induced higher rate of early maturity for the salmon (Gjedrem et Baranski, 2009). In abalone, some genetic correlations have been estimated between growth-related traits, showing that total weight are strongly correlated (Brokordt et al., 2014; Jonasson et al., 1999; Liu et al., 2015a) but eventual trade-offs remain to be documented.

Abalone production is an emerging industry in Europe. Abalone are currently mainly produced in France comprising a single species, the European abalone, *Haliotis tuberculata* (Huchette et

Clavier, 2004). *Haliotis discus hanai* has been introduced for aquaculture production in Spain and Ireland and *Haliotis rufescens* in Iceland. *H. tuberculata* requires 3 to 4.5 years of rearing to reach the minimal commercial weight of 30 g. In France, farmed stocks are currently produced with no intentional selective process (Lachambre et al. 2017b). Thus, the French abalone aquaculture industry is analyzing the opportunity of implementing a selective breeding program to improve growth. This analysis requires estimation of genetic parameters in the current production system. Growth has been reported to be highly variable in sea cage grow out system (Lachambre et al., 2017a). For *H. tuberculata*, only one study has estimated large sense heritability for the shell length (0.37) and the total wet weight (0.3) (Roussel et al., 2013). Variability of immune, behavioral and morphological traits of *H. tuberculata* have recently been phenotypically characterized (Lachambre et al., 2017b). Like other abalone species *H. tuberculata* is a gonochoric species (Travers, 2008). An experimented operator can easily discriminate female from male by visual observation of the gonad tissue coloration when abalone are matured (i.e. yellow for male and green, grey, or black for female, (Bilbao et al., 2012)). The sex ratio of wild and farmed *H. tuberculata* populations has always been observed to be closed to 1:1 (Basuyaux, 1997; Clavier, 1984; Cochard, 1980) even for triploids populations of *H. rubra* (Liu et al., 2009) and *H. laevigata* (Dunstan et al., 2007). Although no sexual chromosomes have been reported in this species to our knowledge, balance sex-ratios suggest that *H. tuberculata* sex determination may follow a simple genetic determinism. Under hatchery conditions, the first maturation take place at two years old for males (20-40mm) and at three years old for females (40-50) (Cochard, 1980). Although Basuyaux (1997) reported that females had a consistent higher growth than male from 16 (i.e. 35 mm and 8g) to 36 month old (i.e. 70 mm and 50g), little information is available regarding sexual dimorphism in the species. In this context, the present study presents different phenotyping methods to estimate genetic parameters of a wide range of traits in the European abalone *H. tuberculata*. Our objective was to estimate genetic parameters for growth-related traits and identify eventual trade-offs.

Material and Methods

2.1 Animals and rearing procedure

A total of 1800 abalone were reared for this study in the commercial company France Haliotis (48°36'46N, 4°33'30W; Plouguerneau, France). Studied abalone resulted from a full factorial cross of 24 sires and 16 dams randomly sampled in the France Haliotis farmed population. Broodstock resulted from systematic mating between wild and farmed animals, in order to avoid inbreeding, corresponding to domestication level 3 defined by (Teletchea et Fontaine, 2014) (entire life cycle closed with wild inputs).

The rearing structure in the nursery consisted of tanks of 3.5 m³ (6 x 1.4 x 0.6 m, l x w x h) with 22 baskets of 20 PVC plates (0.6 x 0.3 m). The nursery tank was supplied by a constant input of 25 µm filtered seawater allowing two changes of water per day. The two sea cage structures consisted of Alibert plastic box (1*0.65*0.65 m) containing 900 abalone each. Extensive descriptions of the structure of the sea cages are given in Lachambre et al. (2017b).

Abalone were produced and reared in a common environment with the classic production system benefitting a sea based abalone farm as presented by Harney et al. (submitted). Briefly, abalone larvae were first reared in a single larval tank of 300L with a constant input of water at 18°C filtered at 1 µm. After five days, larvae were induced to settle in one nursery tank where they were fed *Ulvelia lens* cultured on plates. More details on hatchery procedure can be found in Daume et al. (2000b). The nursery phase lasted 14.5 months (Figure 1). At this stage, the 23,000 abalone in the nursery tank were removed and 3000 juveniles were randomly sampled to be put in the sea cage rearing structure. At sea, they were fed monthly, with a diet mainly consisting of the macroalgae *Palmaria palmata* and *Laminaria digitata*. At 25 months, the cage with 3000 individuals was brought back to the laboratory facilities, where 900 abalone were randomly selected, given the designation “Group 1”, measured, weighed and identified with Hallprint® tags glued with liquid cyanoacrylate. They were then put back in rearing structures for an additional growth period at classic farm rearing density until 30 months of age (Figure 1). A second group of 700 abalone were randomly sampled, measured, and identified by tagged before to place them with 200 untagged animals of similar size, to create the same rearing density as the first group. They were fed with the same procedure as for group 1, and were brought back to the farm at 42 months, when the abalone reached commercial size (30 g) These 700 abalone were called “Group 2”.

2.2 Measurement organization

At 30 months 867 abalone of the first group had survived and were brought back to the laboratory facility for behavioral observation, immunological sampling and dissection, starting from the least invasive to the most invasive measures (Figure 1). On arrival, 73 abalone were distributed in 12 cages (0.8x0.3x0.2), placed in the nursery tank, and fed once a week. Behavioral observations were performed for 621 abalone, with 9 series of 69 abalone, with a 5-days experimental period for each group. At the end of this period, Visual Gonad Index (VGI) and immune measurements were performed on 720 individuals. Finally, dissection and tissue samples for DNA extraction were performed using a standardized procedure (n =580 animals). For schedule reason, the behavioural, immune and dissection measured could not be performed for all the individuals. Behavioural and immune measurements had enhanced a mortality rate of 12% preventing to collect the DNA of all abalone phenotypes for these traits. However, each 580 abalone studied in the dissection procedure and 103 abalone still alive after behavioural and immune measurement procedure and not dissected, a piece of muscle (roughly 200 mg) was stored in 70% ethanol for DNA analysis (Figure 1) for SNP parental assignment.

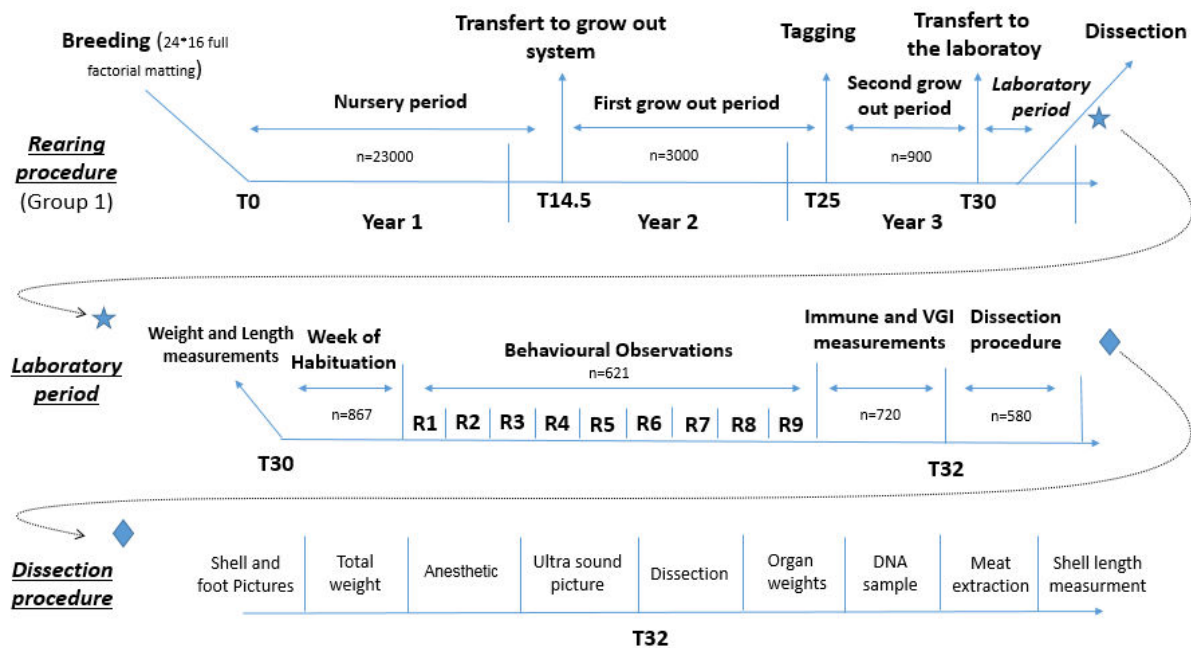


Figure 1: Three-year rearing of “Group 1”, laboratory and dissection procedure for measurements done at 31-32 months

At 42 months, the second group was brought back to the laboratory on the 683 abalone which had survived 325 were measured, weighted, sexed and sampled for DNA extraction 8 animals could not be sexed because of a lack of gonad development.

2.3 Phenotyping

2.3.1 Production and dissection traits

The different length measurements were recorded using calipers at the narrowest mm. Individual shell length was recorded *a posteriori* at 14.5 months of age with visual shell observation. The stress of transfer from the nursery to the sea-growing structure induced a discontinuity of the shell edge that could be measured *at posteriori*. All the weights were recorded with an electronic balance sensitive to 0.01 g. All the animal total weights were taken after a gentle compression of the whole animals in absorbent paper in order to remove the majority of the water in the gill cavity (Basuyaux, 1997). For each individual, weight and length were measured at 14.5, 25, 32 months for the first group, with an additional measurement at 42 months for the second group. Weight and Length measurements were recorded as $W_{T(age)}$ and $L_{T(age)}$ at the different ages of measurements to simplify table in the results part.

A visual sex determination were realized, the sex of one abalone could not be determined by lack of gonad development. The dissection procedure was comparable to the one reported in Lachambre et al (2017b) and was performed at 32 months on group 1. Briefly, soft tissues were separated from the shell by an incision in the abductor muscle. The foot was separated from other tissues and put in a pre-weighted petri dish to let the hemolymph drain. A delay of 15 minutes was observed before the weighting of the foot and hemolymph. Preliminary measurements showed that this delay is sufficient to reach a stable weight for both tissues (data not shown). Gonads were separated from the digestive gland and placed on a pre-weighted aluminum sheet by repeated incisions on the external gonad tissue. After the dissection protocol, the shells were kept and allowed for a *posteriori* measurement of length at 32 months.

2.3.2 Behavioral traits

The laboratory facility for studying behaviour was composed of 69 glass aquaria (15-L, 35 x 20 x 25 cm, l x w x h), used to observe the abalone's individual circadian rhythm (Figure 1). These aquaria were equipped with a ceramic hiding place (20 x 6 x 6 cm, l x w x h) and a ceramic ring maintaining the alga *Palmaria palmata* opposite the hiding place. Each tank received 20 L.h⁻¹ of 3 µm mechanically filtered seawater at a constant temperature of 15°± 0.5°C. The photoperiod was adjusted to the seasonal rhythm with 14h of light and 10h of night.

To avoid stressful conditions during light changes, the light was adjusted slowly for 30 minutes during dawn (7:00 to 7:30 h) and dusk (21:00 to 21:30 h) using a dimmer (Gold Star, Besser Elektronik, Italia). Tanks were cleaned one a week. All tanks were continuously videotaped with 6 digital cameras (TS-WD6001HPSC, Sygonix GmbH, Germany), linked to a 24h-recording device (TVVR 40021, Abus, Germany).

After being detached from the circular black plastic oyster seed collectors placed as hiding place in the cages, abalone were placed on their back in the centre of the aquarium. The righting latency was measured from the abalone placement time in the aquarium to the full turn over. After a 4 days habituation period in the aquarium, video-recording was performed during 24 h in order to measure the total duration of movement and the duration of feeding for each individual following the protocol of Lachambre et al. (2017b). Videos were analyzed afterward in order to measure 3 behavioral parameters; the capacity of righting, the total duration of movement and the duration of consumption over night following the protocol of Lachambre et al. (2017b).

2.3.3 Immunological traits

Hemolymph samples were extracted from the pedal sinus, using a 1 ml syringe and 25 G x 5/8 needles. To limit the stress caused to the animal, extraction was only attempted twice, and limited to one minute handling. The extraction was successful for 70% of the individuals (n = 676 abalone). The hemolymph was processed following the protocol of Lachambre et al. (2017b). In summary, 0.1 ml of hemolymph was extracted, and 25 μ l were deposited into a 24-well plate containing 100 μ l of sterile seawater. Haemocytes were allowed to adhere for 15 min at 18°C. Then, 30 μ l of fluorescent beads (fluoresbrite YG Microspheres 2.00 μ m, Plysciences, 1:100 in distilled water) were added. After 2 h at 18°C, supernatants were removed, 100 μ l of trypsin (2.5 mg.mL⁻¹ in AASH anti-aggregant solution) was added; and the plates were shaken for 10 min to detach the adherent cells. Then 100 μ l of 6% formalin was used to fix the cells. Samples were kept at 4°C before analysis by flow cytometry. The phagocytosis efficiency was defined as the percentage of haemocytes that had engulfed 3 or more beads. All the measurements were done the day following the extraction with a flow cytometer (Becton, Dickinson, France). All samples containing less than 300 cells were excluded the analysis (14% of the data).


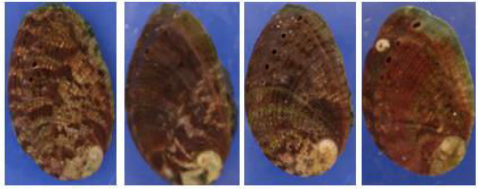

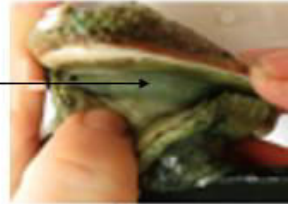
2.3.4 External morphologic traits

Multiple external measurements were realized using the pictures taken at the beginning of the dissection procedure (Figure 1). The red coloration of the shell and the yellow coloration of the foot were measured following the methodology described in Marie-Orleach et al. (2014). Abalone were allowed to settle on a petri dish and were placed inside a (Photoflex® Literoom) to obtain reflection-free lighted images. We took pictures of both ventral (pictures of the foot) and dorsal face (picture of the shell) with a digital camera (Canon EOS1000D). Every day, pictures of a color checker (GretagMacbeth) and uniform grey background control were taken for calibration. The images were analyzed using VISIOLOG 6.6 (Noesis). Firstly, images were normalized by the uniform background picture and the grey color patch, to correct for any variation of light during the five days of dissection procedures. Secondly, the color checker picture was used to transform RGB into XYZ by means of linear regression model and then a nonlinear XYZ-L*a*b* color space transformation was performed. Previous observations shown that the a* dimension was associated with the red color intensity of the shell and b* dimension with the yellow intensity of the foot. These picture analyses provided a continuous value for each individual of shell color (**Shell color (a*)**) and foot color (**Foot color (b*)**). Then a single person gave a discrete visual color score on every abalone shell and foot pictures using a phenotypic grid (Table 1). The scoring was conducted after multiple measurements of the same 30 abalone until the scores were consistent. The patterns on the shell were also scored.

A visual gonad index scoring was done by direct observation on live animals at 32 months during the hemolymph sampling procedure (Figure 1). A score grid of 4 levels with 0.5 point precision was adapted from Lachambre et al (2017b). This methodology generated 8 score levels and was done by the same experimenter.

A direct observation of the gonad allowed for visual gonad index scoring on live animals at 32 months. A score grid of 4 levels was adapted from Lachambre et al (2017b).

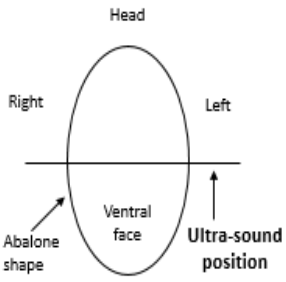

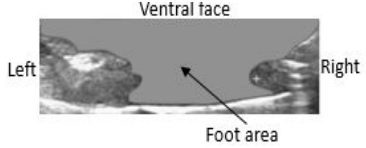

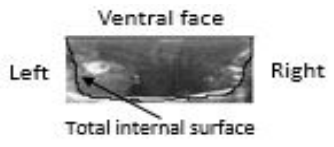
Table 1: External morphology traits appreciated by visual assessment

<u>Phenotypic traits observed</u>	<u>Notation</u>	<u>Criteria observed</u>	<u>Type of variables</u>
Shell color score	1=Dark black, 2=Gris, 3=Brown, 4=Orange, 5= Red	<p>Scoring= 5 Scoring= 3 Scoring= 1</p> 	Qualitative (class of color)
Patterns on the shell	1=Continuous color, 2=Zebra pattern on the shell produced during the nursery period, 3= Zebra pattern on one part of the shell, 4= Zebra pattern on all the shell	<p>Scoring= 4 Scoring= 3 Scoring= 2 Scoring = 1</p> 	Qualitative/Quantitative The more the shell is covered by zebra, the higher the notation is
Foot color score	1=White, 2= Beige, 3=Clear yellow, 4=Dark yellow, 5=Yellow-Orange	<p>Scoring= 5 Scoring= 3 Scoring= 1</p> 	Quantitative (The stronger the orange coloration is, the higher the notation is)
Visual gonad index score (VGI)	<p>0= No gonad was observed on the digestive gland;</p> <p>1= Gonad tissue was present on the appendix cone of the digestive gland but didn't cover it integrally</p> <p>2=Gonad recovered all the digestive gland</p> <p>3=Gonad was inflated</p>	<p>VGI=3 Gonad inflated ♀</p> 	Quantitative (The more developed the gonad appears, the higher the notation is)

2.3.3 Internal morphological traits

Ultra-sound pictures were captured before the dissection (Figure 1). Five minutes earlier, abalone were anesthetized with sulfate magnesium 14 g.L in order to relax the foot and facilitate the image capture. One picture of the middle of the anteroposterior axes of the animal gave a transversal image of the foot (Table 2). The software ImageG was then used to measure the total internal surface and the foot surface characterized by a darker color (Figure 2). These measurements allowed to calculate the ratio of the foot surface on the total surface measured with ultra-sound pictures.

Table 2: Relation between variables, tissue and ultra-sound pictures and measurement

Ultra-sound picture position	Variable name	Ultra-sound pictures	Ultra-sound deduced surface
	foot surface		
	Total internal surface		

2.5 parentage assignment

A panel of 123 SNP was used to determine parentage of the abalone studied individuals (Harney et al. submitted). This panel allowed 98.9% assignment rate, revealing that all genitors contributed to the studied progeny but with a high variation of individual reproductive success (Harney et al. submitted). The studied cohort was constituted of 189 full sib families on the 384 possible and 40 half-sib families with a mean number of 25 individuals (from 1 to 185).

2.6 Data management and statistical analyses

All the phenotypes along the rearing procedure were recorded and saved in an ACCESS database. The first step of the analysis was to control the normality of every variable with a distribution plot and a Shapiro-Wilk test. Variables which were too far from the normality distribution were log transformed. Five fixed effects were identified in our study: the sex, the group of abalone (Group 1/Group2), the days of hemolymph sampling (day 1 to 4), the behavioral repetitions (behavioral repetition 1 to 9), and the day of dissection (day 1 to 5). Fixed effects were tested with an ANOVA, and included in the models used for genetic parameters estimations when significant effects on performance were found. Pearson phenotypic correlations were computed in R for all pairs of traits recorded. The numbers of male and female per paternal and maternal half-sib families were counted. Chi² tests were used to test for parental effects on these proportions by their comparison with uniform proportions considering the sex ratio of the whole population. For this test and calculation of average and variability of sex ratio per half sib families, 3 parental and 7 maternal half-sibs with less than 12 progeny were not included in the analysis in order to avoid bias.

Before genetic parameters estimation, all recorded quantitative traits were centered by their average and scaled by their standard errors for normalization. The analysis methodology used in our study was adapted from Haffray et al. (2013). Heritability was estimated using Vce6 software (Gronevelved et al. 2008) with a univariate animal model for each continuous trait. A threshold model were used for discrete performances as color score or VGI.

$$Y = \mu + Za + Xb + \varepsilon$$

Where Y is the vector of observations, μ is the mean performance in the population studied, a is the vectors of random additive genetic effect, b is the vector of fixed effects, Z and X are the corresponding incidence matrices, and ε is the vector of residual random effect. For each single univariate model, the log-likelihood was recorded and the analysis was realized again with maternal common environment effect where dams were considered as a random effect (n=16). If the difference between the two likelihoods was higher than 3, the maternal effect would have been kept in the model, but it was never the case in our dataset.

Following the approach presented in Vandeputte et al. (2007), sex was analysed as a threshold trait with a polygenic basis with the software Threshold model. It heritability was thus estimated with a threshold single-trait model as it was done for the other discrete variable. Genetic correlation between sex (coding as 1 for male and 2 for females) and growth related traits were estimated with a bivariate models using Vce6 software, the 9 animals which could not be sexed were removed of this analysis.

Considering the restricted number of data, the multi-variate models could not converge. Thus, genetic correlations and their standard errors were estimated on Vce6 with a bi-variate animal model. As the first aim of this study was to identify trade off related with a selection procedure on growth genetic correlations were only estimated between growths related traits and the other traits measured in this study. A linear relationship were observed between bled meat weight and the total weight of the animal. Considering the recommendation of Haffray et al. (2013), the residual of a linear regression of the foot weight on the total weight and of the ratio of the foot surface on the total internal surface measured with ultra-sound pictures were calculated. These residual were used to estimate genetic correlation between bled meat yield and ultra-sound measurements. The relationships between gonad weight and gonad weight were not linear which has prevented to work with residual for this trait.

Results

3.1 Growth and survival during the experiment

Almost no mortality (<5%) was observed for the two groups during the rearing process from 14 months until 30 months for group 1 and from 14.5 months to 42 months for group 2. Shell length increased linearly over time with a mean value of 1.4 mm/month (Figure 2). Total weight seemed to follow an exponential model, the mean weight of group 2 reached the commercial size (28g) when 42 month-old and presented a high phenotypic variation (CV=27%) (Figure 2, B). All the morphological measurements were phenotypically correlated with length and weight at 32 months (data not shown).

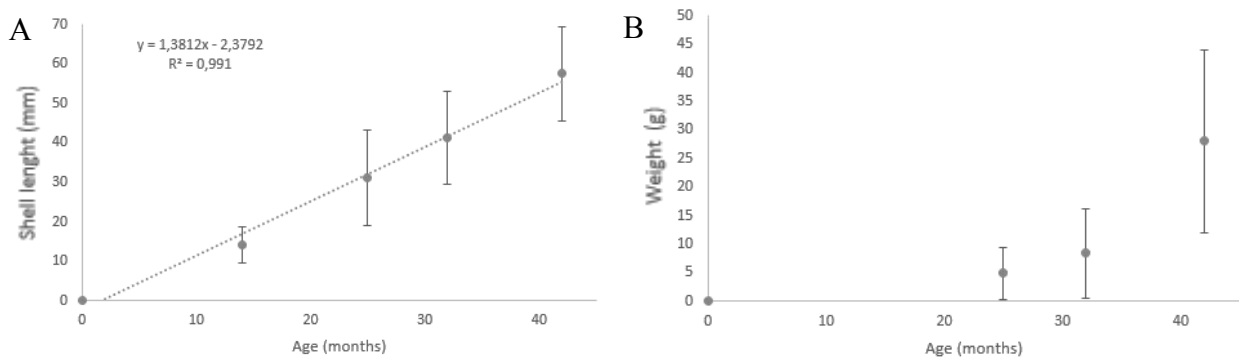


Figure 2: A) Length (mm), B) Wet weight (g) of abalone during the 42 month experiment. Dots represent the average mean of the population studied (n=363 to 1600), with standard deviations.

3.2 Sexual dimorphism in the whole progeny

The sex had a significant impact on a large number of growth related traits (Table 3). Females were bigger (from 10 to 15%, $p < 0.05$) and longer (from 3 to 4%, $p < 0.05$) from 14.5 to 32 months. No differences were found at 42 months. Gonad yield was 22% lower in females at 32 months ($p < 0.001$), the foot color lighter ($p < 0.001$) and phagocytosis efficiency higher ($p < 0.05$) compared to males (Table 3). No significant behavioural differences were observed between the two sexes.

Table 3: Sexual dimorphism for the different traits measured in this study

Traits	Mean	N♀-N♂	Mean ♀	Mean ♂	% Mean difference (♀-♂)	F	Pvalue
Length at 14.5 months (mm)	14.0	450-416	14.21	13.86	3%	4.2	*
Length at 25 months (mm)	30.8	619-572	31.27	30.18	4%	6.0	*
Length at 32 months (mm)	41.3	301-278	42.23	40.4	4%	12.0	***
Length at 42 months (mm)	57.7	161-156	57.0	58.0	-2%	NS	NS
Weight at 25 months (mm)	4.50	619-572	4.91	4.41	11%	7.0	*
Weight at 32 months (g)	8.40	301-278	9.02	7.8	15%	13.0	***
Weight at 42 months (g)	28.0	161-156	27.97	28.29	-1%	NS	NS
Bled meat weight (g)	2.67	301-278	2.86	2.49	14%	10.0	**
Bled meat yield (%)	31.4	301-278	31.59	31.39	1%	NS	NS
Gonad weight 32 m (g)	0.50	301-278	0.48	0.51	-6%	NS	NS
Gonad yield (%)	5.23	301-278	4.69	5.83	-22%	33.0	***
Shell weight (g)	2.39	301-278	2.56	2.22	14%	14.0	***
Digestive gland weight (g)	0.65	301-278	0.73	0.56	26%	37.0	***
Haemolymph weight (g)	0.40	301-278	0.43	0.39	10%	5.02	*
Shell color (a*)	2.10	301-278	2.1	2.2	-5%	NS	NS
Foot color (b*)	2.80	301-278	2.96	2.6	13%	20.5	***
Patterns on the shell (Score)	3.35	301-278	3.38	3.33	1%	NS	NS
Phagocytosis efficiency (%)	17.9	351-324	18.59	17.19	8%	4.0	*
Righting latency (min)	0.91	322-304	0.88	0.96	-9%	NS	NS
Total movement duration over night (h)	2.80	322-304	2.7	2.9	-7%	NS	NS
Total feeding duration over night (h)	1.50	322-304	1.6	1.4	13%	NS	NS

ANOVA test with the sex as fixed effect, NS was added when the sex effect was not significant, *, **, *** correspond respectively to Pvalue <0.05, <0.01, <0.001. NS : non-significant.

3.3 Sex ratios

The observation of sex in the overall population allowed to determine that 52% of the animals studied were female. Percentage of females greatly varied between maternal and paternal half-sib families: 10 to 67% (CV=29%) and 36% to 67% (CV=18%) respectively (Appendix A). χ^2 tests showed significant effects of the sire in paternal half-sib families sex ratio ($\chi^2=42$, $df=20$, $P<0.01$) but no effect on the dams in maternal half-sib families sex ratio ($\chi^2=11$, $df=9$, $P>0.05$).

3.4. Heritability estimates

Most traits presented a high phenotypic variability and significant heritability estimates (Table 4). All growth-related traits exhibited significant heritability estimates, ranging from 0.17 ± 0.07 to 0.53 ± 0.17 , except the length at 14.5 month-old (Table 4). All heritability estimates of growth-related traits increased over time. Meat yield was less variable, but exhibited a moderate heritability (0.36 ± 0.11). Gonad yield which was not significantly heritable. The colors of the foot and the shell were highly and moderately variable and heritable: 0.31 ± 0.10 and 0.71 ± 0.14 respectively. Weights of meat, shell, gonad and digestive gland were moderately heritable, ranging from 0.16 ± 0.07 to 0.42 ± 0.11 , whereas hemolymph weight was not heritable. Standard errors were more than half of the mean for physiological and behavioral traits, thus was not possible to determine if these traits were heritable.

Table 4: Estimates of the heritability with the standard deviation, the mean and the coefficient of variation for different biologic component of *H. tuberculata*.

Traits	n	cv	h²
Length at 14.5 months (mm)	900	0.17	0.13 ± 0.07
Length at 25 months (mm)	1600	0.20	$0.23 \pm 0.07^*$
Length at 32 months (mm)	580	0.14	$0.37 \pm 0.11^*$
Length at 42 months (mm)	325	0.11	$0.49 \pm 0.16^*$
Weight at 25 months (mm)	900	0.56	$0.25 \pm 0.09^*$
Weight at 32 months (g)	580	0.46	$0.42 \pm 0.11^*$
Weight at 42 months (g)	325	0.27	$0.53 \pm 0.17^*$
Bled meat weight (g)	580	0.48	$0.42 \pm 0.12^*$
Bled meat yield (%)	580	0.09	$0.36 \pm 0.11^*$
Gonad weight 32 m (g)	580	0.78	$0.16 \pm 0.07^*$
Gonad yield (%)	580	0.45	0.09 ± 0.06
Shell weight (g)	580	0.43	$0.43 \pm 0.12^*$
Digestive gland weight (g)	580	0.51	$0.29 \pm 0.10^*$
Haemolymph weight (g)	580	0.82	0.15 ± 0.08
Shell color (a*)	580	1.01	$0.71 \pm 0.14^*$
Foot color (b*)	580	0.32	$0.31 \pm 0.10^*$
Patterns on the shell (score)	580	0.43	$0.56 \pm 0.13^*$
Phagocytosis efficiency (%)	676	0.48	0.15 ± 0.08
Righting latency (min)	621	1.33	0.10 ± 0.07
Total movement duration over night (h)	621	0.77	0.08 ± 0.07
Total feeding duration over night (h)	621	0.91	0.13 ± 0.07
Sex ratio (s+d)	1183	0.40	$0.25 \pm 0.11^*$

* added for every significant heritability, n: number of phenotype recorded per traits.

3.5. Genetic correlations between growth-related traits and other traits

At each age, length and weight were highly phenotypically and genetically correlated, with mean correlation coefficients ranging from 0.72 ± 0.24 to 0.99 ± 0.02 (Table 5). At 25 month-old, shell length and wet weight was genetically correlated with shell length and wet weight at 42 months (Respectively 0.94 ± 0.04 , 0.91 ± 0.05). These correlations were higher and more accurate than the one found between the weight at 25 months and the length and weight at 42 months (Respectively 0.76 ± 0.17 ; 0.81 ± 0.21).

Table 5: Heritability estimates with their standard deviation (on the diagonal), genetic with standard deviation (above the diagonal) and phenotypic (under the diagonal) correlations for growth-related traits at the different times of measurement.

	L.14	L.25	L.32	L.42	W.25	W.32	W.42
L.14	<i>0.13±0.07</i>	0.93±0.05	0.87±0.10	0.72±0.24	0.92±0.07	0.85±0.10	0.78±0.24
L.25	0.85	<i>0.23±0.07</i>	0.96±0.20	0.94±0.04	0.99±0.01	0.98±0.02	0.91±0.05
L.32	0.8	0.95	<i>0.37±0.11</i>	0.77±0.16	0.91±0.03	0.98±0.01	0.87±0.16
L.42	NA	NA	NA	<i>0.49±0.16</i>	0.76±0.17	0.89±0.12	0.99±0.02
W.25	0.81	0.95	0.92	NA	<i>0.25±0.09</i>	0.99±0.02	0.81±0.21
W.32	0.73	0.92	0.95	NA	0.95	<i>0.42±0.11</i>	0.98±0.09
W.42	NA	NA	NA	0.93	NA	NA	<i>0.54±0.17</i>

All the separated tissue weights were genetically correlated with weight and length at 32 months, ($R>0.8$, data not shown). Genetic correlation between weight and length measurements and some morphologic, immune and behavioral traits are presented in Table 6. A high genetic correlation was found between weight at 32 months and gonad yield (0.83 ± 0.19 and 0.72 ± 0.23). Low genetic correlations were found between weight and length, foot color and meat yield. No other significant genetic correlations between growth-related traits and other traits were observed (Table 6).

Table 6: Genetic correlations between length and weight at 32 months and variables of different other variables of this study

	Bleed meat.yied	Gonad.yied	Shell color	Foot color	Phagocytosis efficiency	Total movement duration over night	Total feeding duration over night
L.32	0.30±0.21*	0.72±0.23*	0.23±0.21*	0.37±0.19*	0.19±0.30	0.15±0.30	0.34±28
W.32	0.30±0.21*	0.83±0.19*	0.14±0.22	0.34±0.21*	0.18±0.29	0.15±0.30	0.54±0.20

Association between different predictors and their related traits are presented in Table 7. The heritability of the color scores of the foot (0.25 ± 0.09) and the shell (0.60 ± 0.14) were lower than

the measurement realized by image analysis but still significant. They presented a moderate ($R=0.6$) for the shell and a high ($R=0.84$) phenotypic correlations with the informatics measurements. Both predictors presented a high genetic correlation with the pictures analysis measurements (Table 7).

Moderate heritabilities were observed for ultrasound measurements (Between 0.27 ± 0.1 to 0.3 ± 0.1). Ratio of the foot surface on the total surface measured with ultra-sound pictures was genetically correlated with meat yield (0.92 ± 0.27) (Table 7). Visual gonad index was moderately heritable ($h^2 = 0.40$) it was moderately correlated to gonad yield and genetically correlated with gonad yield (0.92 ± 0.08).

Table 7: Heritability, phenotypic and genetic correlations between spredictors and their related traits.

Predictor variable names	n	h^2 of the predictor	Traits related with the predictor	Phenotypic correlations	Genetic correlation estimates
Shell color score	566	$0.60\pm 0.14^*$	Shell colour a*	0.6	$0.90\pm 0.06^*$
Foot color score	566	$0.25\pm 0.07^*$	Foot colour b*	0.84	$0.98\pm 0.02^*$
Total surface'	560	$0.27\pm 0.1^*$	NA	NA	NA
Foot surface'	560	$0.29\pm 0.1^*$	Foot weight	0.87	$0.90\pm 0.10^*$
Ratio of foot surface on the total surface'	560	$0.21\pm 0.09^*$	Bled Meat Yield (i.e residual of the foot weight on the total weight)	0.58	$0.93\pm 0.27^*$
Visual gonad index	566	$0.40\pm 0.1^*$	Gonad Yield	0.61	$0.92\pm 0.08^*$

* Significant estimation, 'ultra-sound measurements

A moderate genetic correlations were observed between wet weight and sex ratio and weight at 32 months (0.54 ± 0.20) and at 42 months (0.64 ± 0.20). The mean individual weight per paternal half-sib families was also variable with a CV of 17%. The mean weight at 32 and 42 months per paternal half-sib family was also related to the proportion of females (Figure 3).

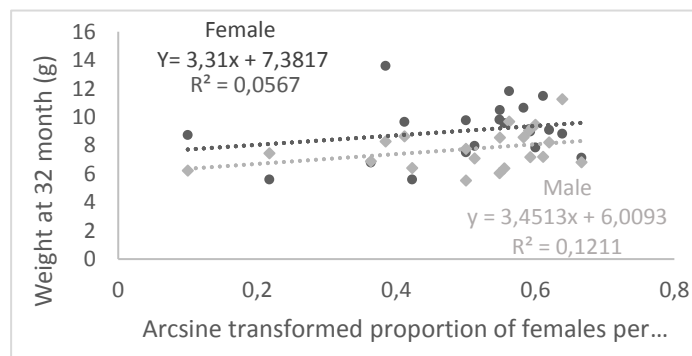


Figure 3: Relationship between the arcsine-transformed proportion of females in paternal half families and mean weight at 32 months for both male and females of the progeny.

Discussion

The aim of our study was to provide the first estimates of quantitative genetic parameters for a broad range of biological traits in the European abalone *H. tuberculata*. This was achieved through the rearing of a cohort over 4 years under standard aquaculture conditions, phenotyping of a large variety of traits based on existing and novel methods (Lachambre et al., 2017) and parentage assignment using a recently developed panel of SNPs (Harney et al. 2017 submitted). In our study, growth was relatively low compared with others (*H. tuberculata* (1.9 cm.month) (Basuyaux, 1997), *H. iris* (1.7 cm.month) (Camara et Symonds, 2014) and *H. midae* (1.9 cm.month) (Difford et al., 2017) but survival was high in the growing period, avoiding potential confusing phenotypic or genetic effects between growth and survival performances.

The first important results of our study are the moderate to high heritability estimates for growth-related traits. Our heritability estimates for shell length and total weight in 42 month-old individuals are the highest ever reported in abalone (Difford et al., 2017). Live weight consistently exhibited higher heritability estimates than shell length at the same age. This is consistent with one previous study on *Haliotis diversicolor* (You et al., 2010a) but different from three others *Haliotis spp.* (Brokordt et al., 2014; Farías et al., 2017; Lucas et al., 2006). This may result from a higher variability in shell length measurements when individuals are injured due to manipulations, or imprecision of length measurements using calipers compared to scale recorded live weight. Our results would suggest to favor selecting on the basis of live weight rather than shell length at age, despite high genetic correlations between the two groups of traits. In any case, the use of size or weight grading machines can greatly facilitate selection of individuals and therefore decide on the best selection criteria.

Interestingly, the heritability estimates found in our study increase constantly over time, suggesting that selection would more efficient on older animals. This is consistent with the majority of genetic parameters previously reported in different abalone species, based on families reared separately at nursery stage and then tagged and mixed together (Difford et al., 2017; Farías et al., 2017; Jonasson et al., 1999; Liu et al., 2015b). However Brokordt et al., (2014) reported a decrease of estimated heritability of live weight and shell size up to 51 month-old because of the decreasing impact of the common environmental effect over time. In our study, growth-related traits recorded when 25 and 42 month-old were highly phenotypically and genetically correlated. In our data, genetic correlations estimated when 25 month-old for shell lengths are higher and more precise than those for live weights (0.94 ± 0.02 versus

0.81±0.21). This is likely because shell lengths were measured on the same individuals when 25 and 42 month-old, while it was on different - but related - ones for the live weight measurements. This data is of interest to determine the optimal age at which is most efficient to select for improved growth. This is even more important when growth is slow (in our case 1.3 mm/month) and generation time is long (in our case, first reproductive maturity when 2-3 years). In our study, on the basis of the standard formula for phenotypic gain for individual selection (Falconer and McKay, 1996), a selective pressures of 3% would lead to a 36% gain at 42 months (i.e. 4 years) if selecting weight at 42 months versus only 13% when selecting at 25 months for the same 4-year period. Early selection could also benefit from marker assisted selection as suggested in a simulation study for the Australian abalone industry (Hayes et al., 2007).

A second important result of our study is that other economically important traits show moderate to high heritability. The bled meat yield is a particularly important trait, notably when abalone are sold canned after an evisceration process (Camara et Symonds, 2014). In our study, heritability for this trait was moderate (0.36±0.11) and consistent with the one reported by (Camara et Symonds, 2014). Interestingly, a low positive genetic correlation (0.33±0.23) was found in our study between weight and bled meat yield, suggesting that selection for improved live weight would also improve the bled meat yield. However, an opposite result was reported for 4-year-old *H. iris* by Camara and Symonds (2014). Sign reversal of genetic correlation may be due to different environmental conditions, as notably observed in Pacific oysters between growth and reproductive effort according to food abundance (Ernande et al., 2004).

A new phenotypic methodology was developed to estimate meat yield for this experiment. We used, for the first time on abalone to our knowledge, ultra-sound imaging to estimate the total surface of animals and the surface of their foot. The ratio between these two parameters proved to be a good non-lethal phenotypic and genetic estimator of bled meat yield. This ratio was indeed heritable (0.21±0.09 versus 0.36±0.11 for the bled meat yield) and highly correlated with the bled meat yield (0.93±0.27). Genetic improvement of bled meat yield could be similarly efficient by selecting on sib performance for this trait or directly on candidates for their ultra-sound image ratio. Ultra-sound phenotyping has already been used for 30 years in the pig breeding industry and is in constant development (Lucas et al., 2017). It has also been recently developed in rainbow trout (Haffray et al., 2013). Comparative costs and improvement

benefits between indirect individual selection of meat yield using ultra-sound pictures or family selection using invasive evaluation of relatives requires extensive analysis (Haffray et al., 2013).

In our study, color and pattern of shell and color of foot were also heritable. A $1^*a^*b^*$ transformation allowed for continuous quantification of the yellowness and redness for the foot and the shell respectively. The shell redness intensity was highly variable and heritable (0.71 ± 0.14) indicating that high improvement can be done on this trait. The patterns present on the shell were also heritable indicating that differentiation can also be realized on the type of shell ornament. To our knowledge, the shell color heritabilities are the first ones presented for *Haliotidae*. Similar high heritability of dark intensity of the shell color was recently published for the oyster *Crassostrea gigas* (Xu et al., 2017). The heritability of the foot yellowness was moderate (0.31 ± 0.10). High heritability for the foot darkness was already reported in *Haliotis iris* (Camara et Symonds, 2014). Interestingly, a low but significant genetic correlation (0.37 ± 0.19) was found between the weight at 32 months and the yellowness intensity of the foot.

In our study reproductive investment measured by the gonad yield was not heritable whereas gonad weight exhibits a low heritability (0.16 ± 0.07). This low heritability for the gonad weight is surprising because as all other tissue except the hemolymph weight were heritable. The gonad weight exhibited a high phenotypic (0.86) and genetic correlation (0.83 ± 0.19) with the weight at 32 months. The low heritability estimates of gonad and hemolymph weights might result from technical difficulties in weighting such small liquid or soft tissues. Further improvement phenotyping methods would be necessary to better estimate the heritability of these traits. A high genetic correlation (0.92 ± 0.08) was found between gonad yield and visual gonad index adapted from Lachambre et al. (2017b) for younger and lower maturity levels on *H. tuberculata*. This suggests that a simple observation of the gonad could allow one to identify and select animals which do not perform early reproductive investment. Another important finding is that strong phenotypic correlation ($r^2 = 0.83$) and genetic correlation (0.83 ± 0.19) was observed between weight at 32 months and gonad yield. The gonad yield observed on 32 month-old abalone only reflects their early reproductive investment, fully maturity being reached when 4 year-old (Lachambre et al., 2017b). This suggests that a selection on growth might induce earlier reproductive maturity. This trade-off led the salmon industry to select to delay age at first maturity in lines previously selected for growth (Gjerde et al., 1994). This is also of

importance in abalone because *H. tuberculata* is known to be immuno-deficient in reproductive period (Travers et al., 2008a), leading to a trade-off between survival and reproductive effort.

Heritability estimates of immune and behavioural traits were not significant and exhibit large estimations inaccuracies. For our study, this inaccuracies could be due to the lack of precision in recording these traits. The observation of confidence intervals around the estimators suggest that the heritability of these traits are low to moderate. A previously published study, focusing on heat shock proteins heritability, exhibited similar results (Brokordt et al., 2015). In this study, individual repeatability of measurements at two developmental stages was found to be close to 0, which could explain large inaccuracy for this heritability estimation. For further studies, it would be of interest to perform repeated measures the phagocytosis efficiency at different development stages and seasons to evaluate their impacts on individual phenotypes. A recent publication, on *H. rufescens* finds a heritability of the resistance of the withering syndrome suggesting that immune mechanism could have a genetic additive variance but resistance against pathogens is more integrative than single immune parameter measurement (Brokordt et al., 2017). Considering behavioural traits, a significant heritability for movement distance after a stress was observed for *H. laevigata* by comparing stress reaction response of growth-selected abalone and controls (Robinson et al., 2013). In this study, selected animals moved lower distances after a stress generated by the sampling of an epipodium. They were probably better adapted to manipulation.

Another important result of our study is the observations of sexual dimorphism. Female *H. tuberculata* were reported to grow faster than males (Basuyaux, 1997) but limited information was available on this. In our study, this was confirmed up to 32 months but not in 42 months old animals. As Males are known to mature earlier than females, they might have invested more energy to reproduction than females between month 32 and month 42, leading to a leverage of growth-related traits when 42 month old. Between 32 to 42 months gonad investment of female could have been higher though the month of July, August and September this would explain why no difference was observed between male and female at 42 months (Bilbao et al., 2012; Cochard, 1980). Interestingly, sex ratio in paternal half-sib family's exhibits a low heritability and low accuracy (0.25 ± 0.11) and this trait was genetically positively correlated with weight in 32 and 42 month old abalone (0.5 to 0.65). This suggests that selecting from high family sex-ratio might contribute to improve growth. Further studies are needed to determine if sex is a

polygenetic trait in the European abalone (Vandeputte et al., 2007) and if the observed correlations are due to a different timing and cost of reproductive allocation between males and females.

For the other traits all the significant heritability estimations of this study confirm that mixed families reared in a common garden and posterior pedigree reconstruction allow genetic additive effects to explain a large part of the total variance. On the contrary, early common environment effects on families reared in separate tanks took a large part of variance for growth relative traits. This explains low heritability when taken into account as a fixed effect in the animal model (Brokordt et al., 2014). Precision of heritability estimates were relatively high for heritable traits (0.07 to 0.17). They were consistent with the ones found in a previous comparable study (Lucas et al., 2006). The number of individuals phenotyped for the majority of traits (Target of 20 individuals per sire) on a full factorial mating of 40 genitors are enough to allow estimation of heritability's. This empirical result is consistent with models performed on fish genetic parameters (Dupont-Nivet et al., 2006; Vandeputte et al., 2001). The comparison of estimation precision for traits like weight at 25 months with 1600 phenotypes and weight at 32 months with 580 phenotypes indicates that a larger number of phenotype couldn't reduce the standard deviation around the mean estimation. This could be linked with the fact that the matting scheme of the progeny was unbalanced. Indeed 3 dams have generated 62% of the progeny of the population studied (Harney et al 2017, submitted).

Conclusion

Growth related-traits had previously been shown to be heritable in different abalone species. Our study provide the first genetic parameters for different morphologic, physiologic and behavioral traits in *H. tuberculata*. Heritability of weight at age was the highest ever reported on *Haliotidae*, confirming that mixed family rearing and posterior parentage assignment is a powerful methodology to estimate heritability. It was also shown that new phenotyping methodologies such as scoring grids for color, motifs on the shell, visual gonad index, and ultrasound measurements are heritable and highly genetically correlated with some production traits. This provides fundamental understanding that will help breeders to implement selective breeding in this species. A trade-off between early reproductive investment and growth was observed. Our results also rose the question of sex determinism in abalone in relation with the observed but temporary sexual dimorphism.

Acknowledgement

The authors would like to thank the production team of France Haliotis, Louis Bourdonay, Xavier Lesage, Frederic Laurans, Mickael Gleeson, Iain McKensy, and Maryvonne Leroux for the 3 years rearing of the families studied in this manuscript. In addition, they would like to thank the SYSAAF, and France Haliotis teams which have provided help for the demanding work of phenotype recording (Jaison Arivalagan, Matthieu Guevel, Valentin Courant, Amy Courant). We thank also Mathilde Dupont-Nivet for her help in analysis and results interpretation. This work was conducted in the context of a PhD partially funded by France Haliotis and ANRT (CIFRE N° 2014 0643) and benefited from the support of the European Union (FEAMP) via the program 42 of the FEAMP “innovation in aquaculture”.

Appendix A: Sex ratio and total number of progeny of the different half-sib families

Sires	N Offspring	% Dams	% Sire	Dams	N Offspring	% Dams	% Sire
S1	20	10%	90%	D1	25	36%	64%
S2	23	22%	78%	D2	30	40%	60%
S3	44	36%	64%	D3	89	47%	53%
S4	13	38%	62%	D4	162	50%	50%
S5	17	41%	59%	D5	33	52%	48%
S6	26	42%	58%	D6	185	54%	46%
S7	16	50%	50%	D7	128	58%	42%
S8	80	51%	49%	D8	52	63%	37%
S9	90	52%	48%	D9	12	67%	33%
S10	31	55%	45%	D10	5	NA	NA
S11	27	56%	44%	D11	11	NA	NA
S12	50	56%	44%	D12	1	NA	NA
S13	32	56%	44%	D13	7	NA	NA
S14	12	58%	42%	D14	4	NA	NA
S15	22	59%	41%	D15	7	NA	NA
S16	27	59%	41%	D16	1	NA	NA
S17	69	61%	39%				
S18	18	61%	39%				
S19	50	62%	38%				
S20	35	66%	34%				
S21	39	67%	33%				
S22	1	NA	NA				
S23	5	NA	NA				
S24	5	NA	NA				

N: Animals of the study which were phenotyped, and genotyped

References

- Basuyaux, O., 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi fermé, Syndicat mixte de l'équipement du Littoral. Université de Caen Basse Normandie, pp. 239.
- Bilbao, A., Uriarte, I., Viera, M.D., Sosa, B., Fernandez-Palacios, H., Hernandez-Cruz, C.M., 2012. Effect of macroalgae protein levels on some reproductive aspects and physiological parameters for the abalone, *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846). J. World Aquacult. Soc. 43, 764-777.
- Brokordt, K., González, R., Farías, W., Winkler, F.E., Lohrmann, K.B., 2017. First insight into the heritable variation of the resistance to infection with the bacteria causing the withering syndrome disease in *Haliotis rufescens* abalone. J. Invertebr. Pathol. 150, 15-20.
- Brokordt, K.B., González, R.C., Farías, W.J., Winkler, F.M., 2015. Potential Response to Selection of HSP70 as a Component of Innate Immunity in the Abalone *Haliotis rufescens*. PLoS ONE. 10, e0141959.
- Brokordt, K.B., Winkler, F.M., Far, W.J., Gonzalez, R.C., Castano, F., Fullsack, P., Herbinger, C.M., 2014. Changes of heritability and genetic correlations in production traits over time in red abalone (*Haliotis rufescens*) under culture. Aquac. Res., 1–12.
- Camara, M.D., Symonds, J.E., 2014. Genetic improvement of New Zealand aquaculture species: programmes, progress and prospects. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 48, 466-491.
- Clavier, J., and Richard, O., 1984. Etude Expérimentale Du Déplacement De L'ormeau (*Haliotis tuberculata*) dans Le Milieu Naturel. Rev. Trav. Inst. Pêches marit.,. 46, 315-326.
- Cochard, J.C., 1980. Recherches sur les facteurs déterminant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. en rade de Brest. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 167.
- Daume, S., Krsinich, A., Farrell, S., Gervis, M., 2000. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. J. App. Phycol. 12, 479-488.
- Daume, S., Huchette, S., Ryan, S., Day, R.W., 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. Aquaculture. 236, 221.

- Difford, G.F., Vlok, A.C., Rhode, C., Brink, D., 2017. Heritability of growth traits in South African Abalone (*Haliotis midae* L.) using the 'internal reference' method. *Aquaculture*. 468, Part 1, 451-457.
- Dunstan, G.A., Elliott, N.G., Appleyard, S.A., Holmes, B.H., Conod, N., Grubert, M.A., Cozens, M.A., 2007. Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) to market size: Commercial implications. *Aquaculture*. 271, 130-141.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Haffray, P., Chevassus, B., 2006. Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs. *Aquaculture*. 252, 161-170.
- Elliott, N.G., 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquac. Res.* 31, 51-59.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Fariás, W.J., Winkler, F.M., Brokordt, K.B., 2017. Genotype by environment interactions, heritabilities and genetic correlations for productive traits of *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*. 473, 407-416.
- Friggens, N.-C., Sauvant, D., Martin, O., 2010. Vers des définitions opérationnelles de la robustesse s'appuyant sur des faits biologiques : l'exemple de la nutrition. *Inra Prod. Anim.* 23, 43-52.
- Gjedrem, T., Baranski, M., 2009. *Selective breeding in aquaculture: an introduction*. Springer, Dordrecht.
- Gjerde, B., Simianer, H., Refstie, T., 1994. Estimates of genetic and phenotypic parameters for body weight, growth rate and sexual maturity in Atlantic salmon. *Livest. Prod. Sci.* 38, 133-143.
- Gonzalez, G.G., Brokordt, K.B., Winkler, F.E., 2010. Repeatability of physiological traits in juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Mar. Biol.* 157, 2195-2203.
- Haffray, P., Bugeon, J., Rivard, Q., Quittet, B., Puyo, S., Allamelou, J.M., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., 2013. Genetic parameters of in-vivo prediction of carcass, head and fillet yields by internal ultrasound and 2D external imagery in large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 410-411, 236-244.
- Hayes, B., Baranski, M., Goddard, M.E., Robinson, N., 2007. Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding programs. *Aquaculture*. 265, 61-69.

- Huchette, S.M.H., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shellfish Res.* 23, 951-955.
- Jonasson, J., Stefansson, S., Gudnason, A., Steinarsson, A., 1999a. Genetic variation for survival and shell length of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *J. Shellfish Res.* 18, 621-625.
- Jonasson, J., Stephansson, E., Gudnason, A., Steinarsson, A., 1999b. Genetic variation for survival and shell length of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *J. Shellfish Res.* 18, 621-625.
- Kube, P.D., Appleyard, S.A., Elliott, N.G., 2007. Selective breeding greenlip abalone (*Haliotis laevis*): Preliminary results and issues. *J. Shellfish Res.* 26, 821-824.
- Lachambre, S., Day, R., Boudry, P., Huchette, S., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017a. Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection. *Appl. Anim. Behav. Sci.*
- Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017b. Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture.* 467, 190-197.
- Liu, J., Lai, Z., Fu, X., Wu, Y., Bao, X., Hu, Z., Lai, M., 2015a. Genetic parameters and selection responses for growth and survival of the small abalone *Haliotis diversicolor* after four generations of successive selection. *Aquaculture.* 436, 58-64.
- Liu, J.Y., Lai, Z.F., Fu, X.L., Wu, Y., Bao, X.F., Hu, Z.G., Lai, M.L., 2015b. Genetic parameters and selection responses for growth and survival of the small abalone *Haliotis diversicolor* after four generations of successive selection. *Aquaculture.* 436, 58-64.
- Liu, W., Heasman, M., Simpson, R., 2009. Growth and reproductive performance of triploid and diploid blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814). *Aquac. Res.* 40, 188-203.
- Lucas, D., Brun, A., Gispert, M., Carabús, A., Soler, J., Tibau, J., Font-i-Furnols, M., 2017. Relationship between pig carcass characteristics measured in live pigs or carcasses with Piglog, Fat-o-Meat'er and computed tomography. *Livest. Sci.* 197, 88-95.
- Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W., Degnan, B.M., 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture.* 259, 146-152.
- Marie-Orleach, L., Roussel, J.-M., Bugeon, J., Tremblay, J., Ombredane, D., Evanno, G., 2014. Melanin-based coloration of sneaker male Atlantic salmon is linked to viability and emergence timing of their offspring. *Biol. J. Lin. Soc.* 111, 126-135.

- Monget, P., Le Bail, P.-Y., 2009. Le phénotypage des animaux : le nouveau défi ? Renc. Rech. Ruminants. 16, 407-409.
- Robinson, N., Smith, B., Cooke, I., Strugnell, J., 2013. A snail's pace: A preliminary analysis of the effects of stress and genetics on movement of *Haliotis*. Aquaculture. 376, 25-35.
- Roussel, V., Charreyron, J., Labarre, S., Van Wormhoudt, A., S., H., 2013. First steps on technological and genetic improvement of European abalone (*Haliotis tuberculata*) based on investigations in full-sib families. Open J. Genet. 3, 224–233.
- Teletchea, F., Fontaine, P., 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. Fish. Fish. 15, 181-195.
- Travers, M.A., 2008. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université de Bretagne Occidentale.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. Fish Shellfish Immunol. 25, 800-808.
- Vandeputte, M., Haffray, P., 2014. Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. Front. Genet. 5.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chatain, B., Chevassus, B., 2001. Setting up a strain-testing design for the seabass, *Dicentrarchus labrax*: a simulation study. Aquaculture. 202, 329-342.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Chatain, B., 2007. A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Genetics. 176, 1049-1057.
- Xu, L., Li, Q., Yu, H., Kong, L., 2017. Estimates of Heritability for Growth and Shell Color Traits and Their Genetic Correlations in the Black Shell Strain of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biotech.
- You, W., Ke, C., Luo, X., Wang, D., 2010a. Heritability of Growth Traits for Small Abalone *Haliotis diversicolor* Estimated from sib Matings. J. Shellfish Res. 29, 705-708.
- You, W.W., Ke, C.H., Luo, X., Wang, D.X., 2010b. Divergent selection for shell length in two stocks of small abalone *Haliotis diversicolor*. Aquac. Res. 41, 921-929.

Discussion générale

L'objectif de cette thèse était d'apporter des connaissances et des outils nécessaires à la mise en place d'un programme de sélection génétique à France Haliotis, en développant des expérimentations en partenariat avec des scientifiques et ingénieurs impliqués dans la sélection génétique des espèces aquacoles et la biologie des ormeaux. Dans ce cadre général, le premier objectif de mon travail a été d'étudier les premières étapes de la domestication de l'ormeau européen, en développant des méthodes de phénotypage sur un nombre important de caractères. Ce travail visait à étudier la différenciation phénotypique entre des populations d'ormeaux en élevage (ayant fait l'objet ou non de sélection consciente) et de populations sauvages, ceci avant la mise en place d'un programme de sélection. Le deuxième objectif de cette thèse a été d'estimer les paramètres génétiques dans les conditions de production à France Haliotis, pour des caractères dont les méthodes de mesure ont été développées en première partie. Ce travail visait à quantifier la variance génétique additive pour des caractères d'importance économique afin de prédire la réponse à une future sélection pour améliorer la croissance et d'autres caractères corrélés génétiquement. La première partie de cette discussion aura pour objectif d'analyser les résultats des expérimentations menées sur le processus de domestication. La deuxième partie intégrera l'ensemble des résultats obtenus en génétique dans le deuxième chapitre pour proposer un programme de sélection génétique à France Haliotis. Enfin, une troisième partie définira les perspectives de recherche ouvertes par cette thèse.

1. Etude d'un processus de domestication à son commencement

1.1 Domestication récente n'ayant pas généré une amélioration de la productivité des populations d'élevage

La domestication a été définie comme un long processus par lequel une population sauvage devient adaptée aux conditions d'élevage aux cours des générations successives. Ce processus est rendu possible par la combinaison d'évolutions génétiques de caractères héréditaires induites par l'environnement ou intentionnellement sélectionnées (Price, 1984). Une telle définition implique qu'un processus de domestication peut s'initier dès lors qu'une population est élevée dans un environnement anthropisé (Gautier, 1990). L'adaptation d'une

population sauvage à un environnement d'élevage conduit progressivement à sa différenciation par rapport à la population sauvage d'origine. Le fait d'utiliser uniquement des reproducteurs d'élevage volontairement sélectionnés sur un ou plusieurs caractères pour produire la prochaine génération est indéniablement un facteur accélérant cette différenciation (Lorenzen et al., 2012). Ce constat a permis de définir trois niveaux de domestication pour les poissons qui permettent de qualifier des populations en élevage. Le niveau 3 correspond à une population produite au moins en partie avec des reproducteurs sauvages. Au niveau 4, la population est produite avec des reproducteurs d'élevage sans sélection intentionnelle, et au niveau 5 par des reproducteurs d'élevage sélectionnés (Teletchea et Fontaine, 2014).

Des cohortes d'ormeaux se situant à ces trois différents niveaux de domestication ont pu être comparées entre elles à France Haliotis et avec des cohortes sauvages (niveau de domestication 1). Ces comparaisons démontrent une absence de gain de productivité pour les populations élevées jusqu'en 2012 au niveau 3 de domestication. Les animaux de ces cohortes, en particulier de la cohorte 2011, se sont montrés très sensibles aux manipulations tout comme les animaux sauvages observés dans les mêmes conditions (Manuscrits 1 et 2). La très grande sensibilité des ormeaux aux manipulations est un phénomène largement décrit dans la littérature (Hooper et al., 2011; Hooper et al., 2014b; Ragg et al., 2000). Etant donné que des reproducteurs sauvages étaient intégrés à chaque croisement jusqu'en 2014, ce résultat n'est pas surprenant (Lorenzen et al., 2012). En revanche, une absence de réponse à la sélection massale sur le poids à une pression de 5% (comparaison de la cohorte au niveau 5 de la domestication avec les cohortes issues du niveau 3 et 4) pose la question de l'existence d'une héritabilité de ce caractère (Annexe 1). Plusieurs autres expériences de sélection familiale, réalisées sur d'autres espèces d'ormeaux ont également montré de faibles héritabilités, et peu ou pas de progrès sur la croissance en première génération pour des ormeaux asiatiques (Kube et al., 2007; Liu et al., 2015a) ainsi que pour des ormeaux sud-africains (M. Joubert, pers com.). L'effet d'un environnement commun sur la croissance de familles élevées en milieu séparé reste en effet observable deux années après mélange et marquage. Cet effet de l'environnement biaise l'estimation de paramètres génétiques et diminue la précision de la sélection (Brokordt et al., 2014; Kube et al., 2007). Nos résultats du chapitre 2, basé sur un mélange des familles dès la phase larvaire et une assignation de parenté par empreinte génétique montrent à l'inverse que la croissance est hautement héritable (Manuscrit 4). Ce résultat permet d'estimer des progrès de 50% pour le poids à 4 ans en une génération de sélection. Des estimations comparables ont été obtenues sur d'autres espèces d'ormeaux pour des familles également élevées en mélange

dès la phase larvaire avec pédigrée reconstruit à l'aide de marqueurs génétiques (Lucas et al., 2006; Robinson et al., 2010; Robinson et al., 2013). L'absence de réponse à la sélection observée en chapitre 1 est donc probablement due à une phase d'élevage séparée des différentes populations, difficile à standardiser (Annexe 1). Cette phase d'élevage séparée peut être à l'origine d'une variabilité intra-traitement supérieure aux gains liés à la sélection génétique sur la croissance. Lors de la première année d'élevage, plusieurs paramètres environnementaux sont difficiles à contrôler, comme par exemple la densité et la qualité de l'alimentation. L'influence de ces paramètres sur la croissance d'orveau est bien connue et pourrait être à l'origine des effets d'environnement précoce observés sur les performances des orveaux tout au long de leur cycle de production (Huchette et al., 2003; Vicoise et al., 2010; Viera et al., 2011). De manière similaire, ces effets expliquent également les faibles héritabilités estimées par la comparaison de familles élevées séparément jusqu'à une taille suffisante pour permettre un marquage individuel.

La domestication est un processus qui s'établit généralement sur de longues durées. Les éleveurs et sélectionneurs devront répéter leur travail au cours des générations avant d'obtenir des gains qui auront l'avantage d'être le plus souvent cumulatifs et réguliers (Falconer et Mackay, 1996). Ainsi, le progrès peut généralement être observé après 2 ou 3 générations de sélection (Liu et al., 2015b). Cependant, ce processus est coûteux car il nécessite la mobilisation et la standardisation de procédures d'élevage souvent plus contraignantes que celles nécessaires pour un élevage sans sélection. Une proposition de programme de sélection individuelle sera donc développée dans la deuxième partie de cette discussion.

1.2 Différenciation des populations sauvages et des populations d'élevage sur le plan comportemental et physiologique

Les différentes populations étudiées pendant cette thèse n'ont pas présenté de différences de performances en élevage. Les populations issues de reproducteurs provenant de l'élevage (sélectionnés ou non) ont néanmoins des réponses comportementales différentes des populations sauvages ou des populations issues de reproducteurs sauvages lorsqu'elles sont soumises à des agents stressants (Manuscrits 1, 2, annexe 1). Les animaux ayant grandi en élevage ont montré une moins grande sensibilité à différents agents stressants communément rencontrés en élevage par rapport aux orveaux provenant du milieu naturel (Manuscrits 1 et 2), mettant ainsi en évidence une meilleure adaptation de ces orveaux ayant grandi en élevage. Un

travail réalisé en Australie comparant une population d'élevage issue de 3 générations de sélection massale sur le poids à la commercialisation a aussi mis en évidence une réponse moins importante à un stress de prélèvement d'épipodes que la population issue de reproducteurs sauvages (Robinson et al., 2013). Considérant les résultats du premier et deuxième manuscrit, il n'était cependant pas possible de déterminer si la plus faible réaction au stress observée pour les populations d'élevage est d'origine développementale ou si elle est liée à une sélection non-intentionnelle induite par le système d'élevage. En effet, après certaines manipulations d'élevage dans les premiers stades de production, de très fortes mortalités sont fréquemment observées. En moyenne, seules 10% des larves produites atteignent un mois dans l'élevage. Une mortalité de 50% après le transfert des animaux de la nurserie vers les cages en mer est aussi couramment observée à France Haliotis. Notre troisième expérimentation (Annexe 1) a permis de répondre en partie à cette question. En effet, les juvéniles pour cette expérimentation ont été élevés dans des environnements similaires contrairement aux expérimentations 1 et 2, permettant de mieux identifier le rôle de la sélection consciente et non-intentionnelle. Les ormeaux issus de reproducteurs d'élevage sélectionnés sur la croissance présentaient un comportement d'abritement ainsi qu'un comportement de réponse au prédateur moins important que les ormeaux issus de reproducteurs sauvages. Le milieu d'élevage est caractérisé par une quasi absence de prédation, ce contexte pourrait générer en une seule génération une diminution de la capacité de réponse à la prédation. Ce résultat a déjà été observé sur une autre population d'ormeaux d'élevage chez *H. kamtschatkana* (Hansen et Gosselin, 2016) et pourrait contribuer au faible succès des plans de repeuplement et de ranching (Hansen et Gosselin, 2013). Dans ces études, des animaux d'élevage de 4 ans répondaient moins aux prédateurs lorsqu'ils étaient remis dans le milieu naturel que des ormeaux d'élevage de 1 an. Ce résultat suggère que le temps passé dans un environnement d'élevage diminue la capacité de réaction à un prédateur, même si l'effet de l'âge ne peut pas être dissocié du temps passé en élevage dans le cas de cette expérimentation. De même, lorsque des populations de saumon produites en écloserie ont été remises dans le milieu naturel, une plus faible survie des familles issues de reproducteurs d'élevage comparés à des reproducteurs sauvages a été observée (Christie et al., 2012; Christie et al., 2016). Si France Haliotis souhaite produire des ormeaux adaptés à des plans de repeuplement ou de ranching, il apparaît donc préférable, au-delà des éventuelles questions de variabilité génétique, de produire des juvéniles à partir de reproducteurs sauvages. Cette thèse aura contribué à documenter pour la première fois le processus de domestication à son commencement chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. La première évolution observée est d'ordre comportementale et est caractéristique d'une baisse de perception de

certaines stimuli environnementaux et d'un comportement d'évitement des prédateurs plus réduit comme observé chez les poissons (Yamamoto et Reinhardt, 2003). Cette observation est cohérente avec le syndrome de domestication mis en évidence par l'équipe de Belyaev en Russie, chez le renard argenté (Gautier, 1990).

En réponse à l'absence de progrès observés sur les performances en élevage à court terme, un programme de sélection s'étalant sur le long terme doit donc être mis en œuvre pour accélérer le processus de domestication et augmenter la rentabilité des productions.

2. Mise en place d'un programme de sélection génétique pour améliorer la croissance des ormeaux

Comme exposé en introduction de cette thèse, les principaux pays producteurs d'ormeaux ont mis en place des plans de sélection afin d'améliorer les performances de croissance. Une croissance lente a été identifiée comme le principal frein à la rentabilité économique des élevages (Difford et al., 2017; Elliott, 2000). De même, cette thèse avait pour but la mise en place d'un programme de sélection réduisant les coûts de production à France Haliotis par l'amélioration des performances de croissance en élevage. Dans la partie 4 de l'introduction de cette thèse, différents types de sélection ont été présentés avec leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 5). Il est proposé que France Haliotis mette en œuvre un programme de sélection individuelle. Un plan de sélection familiale en élevage séparé a rapidement été exclu. En effet, cette option est très coûteuse et inenvisageable à France Haliotis car elle nécessite le suivi et la standardisation d'un grand nombre d'unités de production. De plus, l'efficacité de ce type de sélection pour l'ormeau peut être faible ou nulle, comme constaté après deux générations sur l'ormeau sud-africain (M. Joubert, com. pers.). La sélection familiale a fait ses preuves chez d'autres espèces aquacoles, comme par exemple le saumon atlantique. Elle ne semble pas aussi bien adaptée à l'ormeau (Gjedrem et Baranski, 2009). La possibilité de réalisation d'une sélection généalogique par l'intermédiaire d'utilisation de marqueurs génétiques sera discutée ci-dessous (partie 3.1).

2.1. Etapes de réflexion menant à la mise en place d'un programme de sélection individuelle

La mise en place d'un programme de sélection individuelle nécessite de répondre à plusieurs questions (Figure 32). Les différentes sections de cette partie proposeront des réponses en mobilisant les informations bibliographiques et les résultats recueillis au cours de cette thèse. L'intégration de ces réponses et de l'étude du fonctionnement de France Haliotis ont permis de construire une proposition adaptée à son système de production.

<

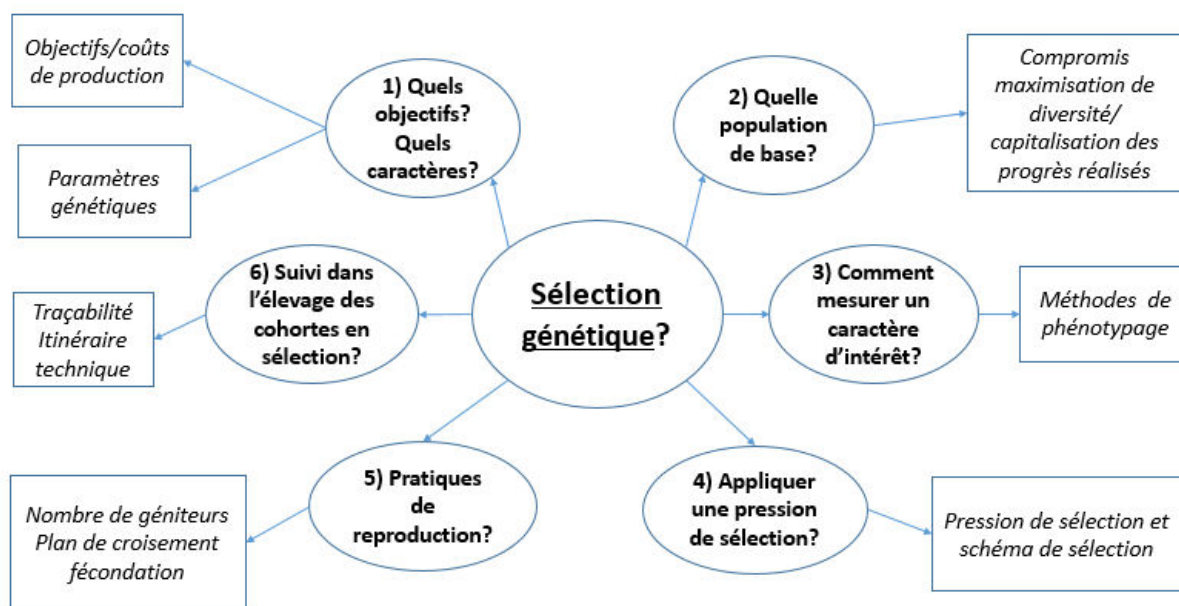


Figure 32 : Différentes étapes du questionnement associé à la mise en place d'un programme de sélection individuelle.

2.2. Objectifs de la sélection et caractères à sélectionner

Dans le cadre d'une sélection basée sur plusieurs caractères, plus le nombre de caractères est important, plus l'effort de phénotypage et donc le progrès réalisé sur chacun des caractères sera faible. Il est par conséquent important d'identifier les caractères permettant des gains de rentabilité dans le système d'élevage considéré et de hiérarchiser l'effort de sélection à porter sur chacun d'eux (Besson et al., 2014; Phocas et al., 2005).

2.2.1 Cycle de production à France Haliotis

Entre 2014 et 2017, France Haliotis a commercialisé en moyenne 5T d'ormeaux par an avec un poids individuel moyen de 38g et un minimal de 28g. L'examen du cycle de production (Figure 16) et du schéma de production d'une cohorte (Figure 33) montre que la durée nécessaire pour atteindre un poids supérieur à 28g est en moyenne de 4 ans. La plupart des productions d'ormeaux se font également sur des cycles de production entre 3 et 4 ans (Brokordt et al., 2014; Camara et Symonds, 2014; Difford et al., 2017). Des croissances plus rapides permettent d'atteindre des poids individuels compris entre 60 et 150g dans ces systèmes de production à terre. Le cycle de production de France Haliotis est également impacté par des mortalités importantes aux stades précoces et suite au transfert dans les structures en mer (30 à 60%) (Figure 33). Les mortalités aux premiers stades de vie sont communes à tous les élevages d'ormeaux (Zuniga-Jara et Marin-Riffo, 2014) alors que les mortalités lors de la deuxième année d'élevage semblent propres au système de production de France Haliotis. En effet, la

mortalité à l'issue de la première année pour différents pays producteurs est rapportée comme comprise entre 5 et 25% (Pérez et al., 2012; Robinson et al., 2010; Zuniga-Jara et Marin-Riffo, 2014). Cette différence peut s'expliquer par l'absence de manipulations lourdes lors du transfert entre le pré-grossissement et le grossissement qui se font le plus souvent dans des structures connexes dans les systèmes de production à terre (Hooper et al., 2011).

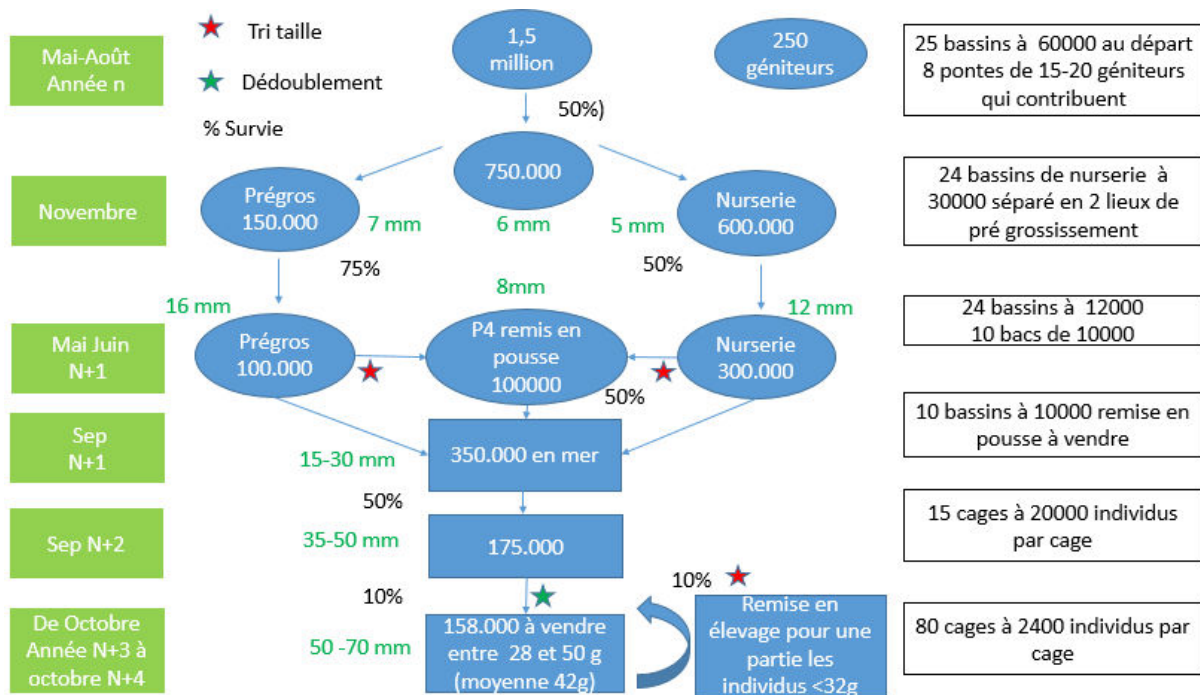


Figure 33 : Schéma de production d'une cohorte de la ponte à la vente

2.2.2 Analyse des coûts de production

L'analyse des coûts de production à France Haliotis montre que l'essentiel des coûts de production sont des coûts fixes liés à la main d'œuvre (CDI) et aux coûts d'amortissements des structures de production. La récolte d'algues de rives à la main et la nutrition d'ormeaux en mer ainsi que l'achat et l'entretien de matériels lourds nécessitent beaucoup de main d'œuvre (Figure 34). Cette situation est originale en halioticulture. A France Haliotis, l'aliment nécessaire au grossissement est produit en interne et le grossissement est réalisé en mer. La plupart des autres élevages affichent donc des charges fixes moins importantes et des charges opérationnelles plus importantes que France Haliotis du fait des dépenses énergétiques liées à la circulation de l'eau à terre et à l'achat d'aliments (Zuniga-Jara et Marin-Riffo, 2014).

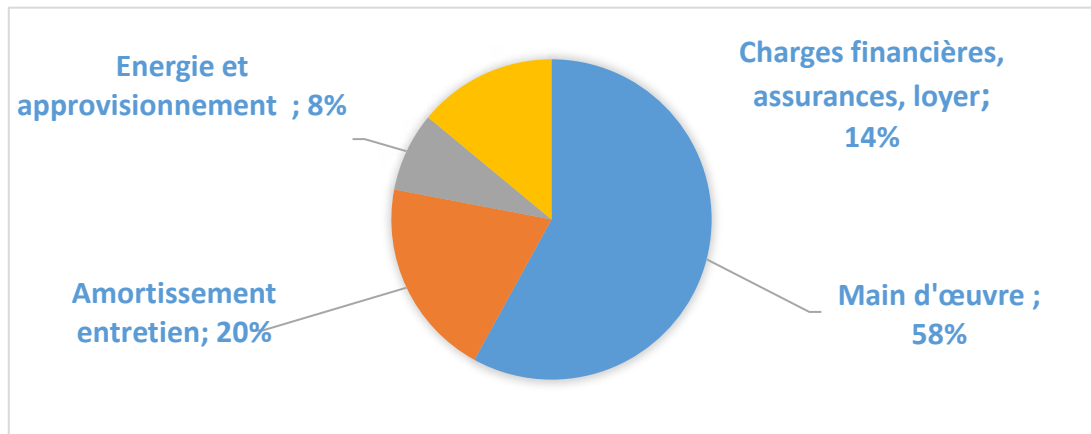


Figure 34 : Répartition en % des différents coûts de production sur l'ensemble des coûts de production (Source personnelle)

2.2.3 Détermination de l'objectif de sélection à France Haliotis

La réduction des coûts de production par kg d'ormeaux produits à France Haliotis peut être atteinte par la diminution des coûts de production à volume de production constant, ou par une augmentation globale de la production à coûts constants. L'importance relative des coûts fixes de production de l'entreprise conduit à privilégier la seconde approche. L'amélioration de la croissance individuelle par sélection génétique devrait donc permettre une augmentation de production à coût constant à terme. L'examen du cycle de production montrant que la croissance et la survie aux manipulations sont les deux premiers facteurs limitant la production chez les ormeaux (Elliott et al., 2000), il est donc proposé que ces deux facteurs soient améliorés.

La survie suite aux manipulations d'élevage devrait pouvoir être améliorée au cours des générations de manière indirecte en utilisant des reproducteurs d'élevage ayant survécu à ces manipulations au cours du processus de domestication (Gjedrem et Baranski, 2009). Nous n'avons pas estimé l'héritabilité de ce caractère dans le cadre de cette thèse mais il apparaît difficile à sélectionner spécifiquement. Il est clairement dépendant des techniques de production utilisées et est donc améliorable par la zootechnie (Allen et al., 2006; Hooper et al., 2011; Hooper et al., 2014c; Stone et al., 2014).

La croissance individuelle est un caractère facile à sélectionner. En l'améliorant, elle permettra d'augmenter la production totale par 2 mécanismes : soit par une rotation des populations dans les structures de production plus rapide, soit par une vente d'animaux à un poids moyen plus important. Une augmentation de la biomasse produite à moyens humains

constants permettrait de diminuer les coûts fixes de main d'œuvre et d'amortissement associés au kilo d'ormeau produit. L'amélioration de la croissance peut se faire par l'amélioration d'une croissance en taille ou en poids. Les résultats menés dans cette thèse ont permis de montrer qu'à 42 mois, ces deux critères de sélection sont fortement corrélés. Le poids est plus variable et plus héritable que la taille dans les conditions d'élevage de France Haliotis. Son phénotypage est rapide et répétable, d'autant plus qu'une calibreuse à plateau est disponible à France Haliotis (Introduction, Figure 18). Cet outil de phénotypage permettrait de réaliser une pression de sélection élevée (3 heures pour trier 2400 animaux à 2 personnes). Le poids serait donc le caractère le plus approprié à sélectionner à France Haliotis.

L'amélioration du poids est d'autant plus intéressante qu'à France Haliotis les ormeaux sont vendus entiers, et qu'ils sont plus faciles à vendre s'ils sont plus gros (Huchette Com. pers.). Aussi, étant donné qu'un élevage en mer implique des risques importants de perte de cages en hiver ou de mortalités estivales, la réduction du temps d'élevage pour arriver à un poids moyen de commercialisation de 28 g est un enjeu important. Ceci est d'autant plus vrai que les animaux se nourrissent d'algues fraîches, qui se décomposent rapidement lorsqu'elles ne sont pas consommées après la récolte, et qui sont distribuées *ad libitum* chaque mois. Une réduction du temps d'élevage pourrait donc entraîner une diminution de la quantité d'algues distribuées totale pour produire un kilo d'ormeaux.

Bilan : Dans un premier temps, l'augmentation du poids moyen des animaux à 4 ans nous semble être le point le plus important de l'objectif de sélection. Si tous les animaux d'une cage à 4 ans avaient un poids individuel supérieur à 28g, un gain de temps et d'efficacité serait engendré par l'absence de nécessité de remise en pousse d'une partie de la cohorte (Figure 32). Une étude client pourrait nous permettre de dire s'il est plus intéressant de rester sur un poids moyen de vente de 32 g ou s'il est plus intéressant d'augmenter le poids moyen des animaux au même âge pour faciliter la commercialisation.

2.3.4 Vers une sélection multi-caractères ?

Le deuxième chapitre de cette thèse a mis en évidence une héritabilité de plusieurs caractères ainsi que la variabilité de ces caractères au sein de la cohorte étudiée (Tableau 8). Des méthodes de phénotypage permettent d'obtenir des prédicteurs non invasifs des caractères à améliorer sur l'individu (Grille de phénotypage, ratio obtenus par l'analyse d'images échographiques, index visuel gonadique). Ces capacités de phénotypage sur les caractères

candidats à la sélection rendent donc possible l'amélioration de ces caractères dans un programme de sélection individuelle assisté par marqueurs. Après la croissance et la survie, le taux de chair pourrait être le paramètre ayant le plus d'importance économique. Cependant, la prise et l'analyse d'images échographiques nécessitent du temps, un équipement et des expérimentateurs expérimentés (Haffray et al., 2013). L'amélioration des couleurs par grilles phénotypiques serait plus simple et plus envisageable à court terme. Elle pourrait répondre à une volonté de différenciation entre l'ormeau d'élevage et l'ormeau sauvage. La couleur du produit est déjà identifiée comme caractère d'intérêt par d'autres sélectionneurs en conchyliculture (Xu et al., 2017). Des études consommateurs seraient nécessaires pour savoir si cette évolution est souhaitable.

Un des résultats important du chapitre 2 est la corrélation génétique positive entre le poids à 32 mois et l'effort reproductif, estimé par le taux de gonade. Une augmentation du taux de gonade des animaux à 3 ans pourrait en effet conduire à une plus grande sensibilité des populations à des agents pathogènes en été (Travers, 2008). Un tel effet négatif indirect a été observé pour des populations de saumons sélectionnées pour une meilleure croissance (Gjedrem et Baranski, 2009). Une façon de gérer ce trade-off serait de trier les candidats mis en conditionnement pour ne sélectionner que les individus ayant le plus faible VGI en deuxième ou en troisième année.

Tableau 8 : Prospective de création d'un programme de sélection multi-caractères

Caractères	Moyen de phénotypage disponible	Importance économique	Variabilité phénotypique	Héritabilité	Rapidité du phénotypage	Précision et répétabilité du phénotypage
Taille à 42 mois	Mesure par pied à coulisse	+++	+	++	+	+++
Poids à 42 mois	Mesure par calibreuse	+++	++	+++	+++	++
Couleur du pied	Mesure par notation visuelle	+	++	+	++	++
Couleur coquille	Mesure par notation visuelle	+	+++	+++	++	++
Taux de chair	Mesure par échographie	++	+	++	-	+
Taux de gonade	Mesure par notation visuelle	--// ?	++	+	++	-

Bilan : Les deux principaux caractères en sélection seront la résistance aux manipulations d'élevage et la croissance en poids. En fonction du temps qui pourra être accordé à l'effort de phénotypage, d'autres caractères pourront être sélectionnés.

2.3. Définition de la population de base pour l'établissement d'un programme de sélection

Une fois l'objectif de sélection défini, une deuxième étape consiste à définir la population qui sera sélectionnée. Trois options sont envisageables :

- a. Prélever les reproducteurs sauvages dans différents sites pour maximiser la diversité génétique. Ce choix a été fait en Afrique du Sud (Rhode et al., 2012).
- b. Utiliser des populations sauvages avec des particularités liées à leur biotope présentant éventuellement un avantage pour l'élevage. Une population en Normandie pourrait par exemple être choisie pour sa résistance à *Vibrio harveyi* (Dubief, 2017).
- c. Utiliser des populations d'élevage pour bénéficier d'éventuels gains de productivité déjà établis. Ces populations doivent avoir une diversité génétique suffisante (Rhode et al., 2014) et présenter une variabilité génétique additive pour permettre du progrès (Kube et al., 2007).

Une sélection individuelle sur le poids des animaux a été initiée depuis 2014 à France Haliois (Figure 31). Cette sélection est réalisée par des croisements de générations chevauchantes en utilisant des mâles de 3 ans et des femelles de 4 ans (Figure 31). Les structures de production sont ramenées à terre pour la vente lorsque les animaux ont entre 3,5 et 4,5 ans. A ce moment un calibrage est effectué et permet de sélectionner sur le poids les individus de 4 ans. Les animaux de 3 ans étaient sélectionnés directement sur les cages en mer par observation visuelle. Les reproducteurs utilisés à France Haliois étaient renouvelés chaque année, et la réalisation de croisement de deux années consécutives permettait donc de réduire les risques d'augmentation de la consanguinité dans la population d'élevage par rapport à une stratégie de croisements de reproducteurs d'une même année. Elle permet aussi un meilleur brassage de la diversité génétique aux cours des générations de sélection.

A partir de 2018, la sélection qui sera établie permettra la constitution d'une deuxième génération issue de sélection individuelle. Bien qu'aucune réponse à la sélection n'ait pu être observée sur la première cohorte sélectionnée, le travail fait depuis 2014 est important et

pourrait porter ses fruits en deuxième génération de sélection (Liu et al., 2015b). D'autre part, une large variabilité phénotypique et génétique additive pour de nombreux caractères d'intérêt économique a été mise en évidence pour la population d'élevage à l'origine de cette sélection individuelle (cohorte 2013) (Manuscrit 4). Des progrès importants pourraient être possibles pour cette population. Enfin, l'examen du rapport N/N_e de la cohorte 2013 (Manuscrit 3) nous indique qu'avec 40 reproducteurs, la descendance présente un N_e égal à 20. Un programme de sélection s'appuyant sur 4 cohortes équivalentes non apparentées sur 4 années avec un N_e de 20 représenterait donc un N_e de 80. Cette taille efficace est proche de la recommandation classique de 100 (Bentsen et Olesen, 2002). Les résultats de la thèse montrent donc qu'il est possible de baser le programme de sélection de France Haliois sur les 4 cohortes d'élevage issues d'une première génération de sélection individuelle (cohortes 2014, 2015, 2016, 2017).

Bilan : il est proposé que la sélection à France Haliois s'appuie sur les 4 dernières cohortes d'élevage constituées en cohortes 2014, 2015, 2016, 2017. Plus de détails sur les modalités de croisement du programme de sélection intergénérationnel sont présentés en partie 2.5.

2.4 Application d'une pression de sélection

2.4.1 Evolution du nombre de candidats au cours de l'élevage

En comparant la réponse à la sélection des cohortes élevées en mélange jusqu'à 16 mois et l'estimation d'héritabilité de la croissance sur une cohorte multi-familiale, les résultats obtenus au cours de cette thèse suggère qu'il est important de sélectionner des animaux élevés dans un environnement commun plutôt que dans des structures d'élevage séparées. L'élevage en milieu commun permet d'éliminer les biais induits par l'effet du macro-environnement sur les performances des candidats à la sélection (Brokordt et al., 2014). La perte d'un bassin de nurserie ou d'une cage en mer est en revanche possible suite à un accident technique ou à une tempête. Chaque année, il est donc important que deux cohortes de sélection soient élevées dans au moins 2 structures d'élevage. Une structure d'élevage de nurserie produit en moyenne 12.000 animaux d'une taille de 9 mm à 12 mois. A cet âge, les animaux pourront être transférés en mer dans une cage de maille de 4 mm à raison de 3000 individus par compartiment. Une cage en mer permet d'élever 12.000 animaux jusqu'à l'âge de 2 ans. Pour des raisons de densité,

ils doivent être ensuite dédoublés à ce stade et mis à 2400 par cage pour atteindre en moyenne le poids commercialisable à 3,5 ans.

2.4.2 Evaluation de l'opportunité d'une sélection précoce

Dans le cadre d'une sélection intergénérationnelle, il est possible de croiser des animaux d'âges différents. Les mâles peuvent être matures dès 2 ans et la quantité de sperme produite n'est pas limitante dans la réalisation des croisements (Bilbao et al., 2012). Une sélection précoce à 25 mois rendrait possible une diminution de l'intervalle de génération. Le manuscrit 4 a montré que les poids à 25, 32 et 42 mois étaient tous hératables. En partant de l'hypothèse qu'il faut sélectionner 100 candidats par structure de production pour obtenir 200 candidats par an, une estimation des progrès sur le poids à 42 mois a été réalisée en comparant plusieurs stratégies (Tableau 9) :

1. Une sélection sur le poids à 42 mois
2. Une sélection précoce sur le poids à 25 mois
3. Une sélection sur le poids à 32 mois

Pour ces différentes stratégies, plus la sélection est précoce et plus la pression de sélection applicable peut être importante, et plus l'intervalle de génération est court. Dans le cas simple d'une estimation de progrès sur 4 ans, une sélection à 25 mois avec 4 mois de conditionnement permet deux générations alors qu'une sélection à 42 mois n'en permet qu'une. Les gains par génération permettent d'estimer le progrès sur 4 ans grâce à la formule du gain génétique présentée en introduction (Partie 4.4). L'équivalence entre pression de sélection et intensité de sélection est donnée par Falconer et Makay (1996).

Tableau 9 : Estimation des gains possibles en g et % par rapport à la moyenne en 4 ans sur le poids à 42 mois par différentes stratégies de sélection

caractère à améliorer	caractère en sélection	P	i	h ²	Moy	CV	R.gen	Gain de moyenne par génération	Nombre de génération en 4 ans	% progrès en 4 ans par rapport à la moyenne
Poids 42 mois (g)	Poids 42 mois	4%	2,15	0,53	28	0,27		8,61	1,00	31%
Poids 42 mois (g)	Poids 25 mois	1%	2,66	0,25	28	0,27	0,81	3,25	2	23%
Poids 42 mois (g)	Poids 32 mois	3%	2,26	0,42	28	0,27	0,98	3,73	1,5	20%

P = Pression de sélection, i = intensité de sélection déduite de la pression, h²= hérabilité du caractère sur laquelle est exercée la sélection trouvée en chapitre 2, Moy = Moyenne du caractère à améliorer, CV = coefficient de variation du caractère à améliorer, R.gen = coefficient de corrélation génétique trouvé entre les différents caractères de croissance.

Le pourcentage de progrès en 4 ans par rapport à la moyenne actuelle montre qu'il est plus intéressant de réaliser une pression de sélection à 42 mois. Une sélection précoce apparaît donc peu intéressante. Les estimations réalisées dans cette thèse suggèrent que le poids moyen pourra être doublé en trois générations par sélection génétique individuelle à 42 mois. Des résultats du même ordre de grandeur ont été rapportés aux USA (Elliott, 2000). A 4 ans, la population atteindrait donc un poids moyen de 47 g en deux générations de sélection. Etant donné que le chapitre 2 fait état d'une croissance linéaire en taille et que des animaux d'élevage de 47 g font 65 mm, il est possible de trouver que le seuil de 60 mm et 28 g sera atteint 6 mois plus tôt (à 36 mois) après ces deux générations de sélection. Une sélection à 32 mois pour améliorer le poids à 42 mois est aussi possible et permet une amélioration importante du poids à 42 mois du fait du haut niveau d'héritabilité et de corrélations génétiques existantes entre les deux caractères. Une sélection à 32 mois pour une amélioration du poids à 32 mois ne permettrait pas d'atteindre le poids seuil de commercialisation de 28 g en deux générations. Les différentes pressions de sélection utilisées pour les estimations de progrès de ce paragraphe seront justifiées en partie 2.6.

Bilan : Une sélection sur le poids pourra être effectuée lorsque les individus auront atteint le poids minimum requis pour la commercialisation. Des progrès entre 20 et 40% sont attendus par génération. Les progrès en croissance pourront être utilisés soit pour augmenter de poids moyen à 4 ans soit pour réduire la durée du cycle de production en fonction des demandes des consommateurs et de la facilité de vente.

2.5 Pratiques de reproduction

A pression de sélection égale, plus le nombre de reproducteurs à utiliser est grand, plus le nombre de candidats à évaluer doit être grand (Falconer et Mackay, 1996). Par conséquent, plus le nombre de reproducteurs est grand, plus le programme de sélection sera coûteux en phénotypage ou en infrastructures contrôlées pour la sélection (Pérez et al., 2012). Deux paramètres doivent être alors définis :

1. Le nombre de reproducteurs à rentrer en conditionnement chaque année.
2. La manière dont ils seront croisés.

2.5.1 Nombre de reproducteurs à reproduire chaque année pour les cohortes de sélection

Dans une entreprise aquacole impliquée dans un programme de sélection génétique, il peut exister deux types de reproducteurs : des reproducteurs « élites » utilisés pour générer la prochaine génération du programme de sélection et les multiplicateurs permettant de diffuser le progrès génétique et générer les stocks destinés à la vente. Parallèlement aux reproducteurs utilisés pour la sélection génétique, un certain nombre de reproducteurs devront être également sélectionnés pour générer l'ensemble des cohortes de production. A France Haliotis, hors sélection, 200 reproducteurs étaient utilisés pour générer l'ensemble des 8 à 10 cohortes de production par an (Figure 34). Au cours d'une saison de ponte, de mai à fin septembre, les reproducteurs peuvent pondre deux fois. La réussite des élevages en nurserie étant très aléatoire, certaines pontes peuvent aboutir à une production nulle ou quasi nulle en cas de difficultés de fixations ou de mortalités hivernales ou de mortalités massives suites au transfert en mer. Par sécurité, il est serait donc préférable de réaliser 2 pontes de sélection répétées en juin et en septembre avec les reproducteurs élites. Les 2 meilleures cohortes en nurserie pourront être conservées par la suite pour constituer deux cohortes sorties dans deux cages en mer chaque année. Pour réaliser 4 pontes de sélection il faut prévoir au minimum 80 reproducteurs élites (20 mâles et 20 femelles par ponte) qui permettront d'assurer la réussite des deux pontes de sélection par an. Les 6 autres pontes de production nécessaires à la constitution du stock d'élevage pourront être réalisées par 120 reproducteurs. Pour ces pontes de production, 10 mâles et 10 femelles de 4 ans sont suffisantes pour générer assez de larves nécessaires à la constitution du stock d'élevage.

Bilan : Le mode d'élevage et de sélection devrait donc permettre de réunir au minimum 200 candidats à la sélection chaque année sur le poids à 3 et 4 ans. Parmi ces candidats, 80 reproducteurs seront choisis pour reformer les cohortes de sélection. L'ensemble de ces candidats pourront être conditionnés dans 33 bassines pendant 4 mois à raison de 6 individus de même sexe par structure.

2.5.2 Mode de croisement des reproducteurs et gestion de la variabilité génétique

La sélection au sein d'une population avec une taille génétique efficace trop faible peut conduire à une dérive génétique et à terme une augmentation trop rapide de la consanguinité (Falconer et Mackay, 1996). En aquaculture, des effets délétères sur la productivité de

population d'élevage liés à la consanguinité ont été observés après seulement quelques générations de sélection (Pante et al., 2001; Su et al., 1996). Si l'intervalle de génération du programme de sélection est de 4 ans, le nombre minimal de reproducteurs utilisés sur 4 ans pour la sélection serait de 320 (4 années, avec 2 pontes de 40 reproducteurs).

La taille génétique efficace de cette population dépendra à la fois du succès d'induction à la ponte, du mode croisement des reproducteurs et de la variabilité des succès reproducteurs. Le succès d'induction à la ponte est généralement proche de 80% à France Haliotis. Sur ces 80%, un mode de croisement factoriel complet pourra être effectué par l'isolement de chaque reproducteur à la ponte (Figure 36). Ce type de croisement permet de maximiser la transmission de diversité génétique d'une génération à l'autre (Dupont-Nivet et al., 2006). La variance du succès reproducteur est une source importante de la perte de diversité génétique chez les mollusques (Boudry et al., 2002). Le manuscrit 3 de cette thèse a permis de montrer que 3 femelles parmi les 16 représentés peuvent constituer les 2/3 d'une cohorte. Ce type de résultats a été plusieurs fois observé en halioticulture (Slabbert et al., 2009; Van den Bergb et Roodt-Wilding, 2010). En conséquence, il pourrait être utile d'égaliser le nombre d'ovocytes de mêmes qualités par les femelles préalablement à la fécondation. Pour les 4 pontes nécessaires à la reconstitution des cohortes de sélection, l'égalisation pourrait se faire après un comptage sous microscope en triplicata. Une compétition spermatique pour la fécondation peut aussi exister pour l'ormeau (Selvamani et al., 2001). Il est donc important de maintenir un mode de fécondation séparé pour que les mâles puissent féconder chaque femelle après mélange des œufs afin de produire un plan de croisement factoriel complet. Pour réussir ces croisements, une attention particulière devra être portée sur le conditionnement pour que les animaux soient bien synchronisés lors de la ponte. En cas de non-synchronisation des pontes, des plans de croisements factoriels restreints pourront être mis en place (Figure 36). Un travail de modélisation sur les poissons montre que si le nombre de reproducteurs utilisés est important, la perte de diversité entre un plan de croisement factoriel complet et un plan semi factoriel est faible (Dupont-Nivet et al., 2006). De nombreux travaux d'optimisation montrent qu'il y a peu à gagner au-delà de 100 reproducteurs en sélection générant 200 à 300 familles, tant au niveau du progrès génétique que de l'évolution de la consanguinité (Gjedrem et Baranski, 2009).

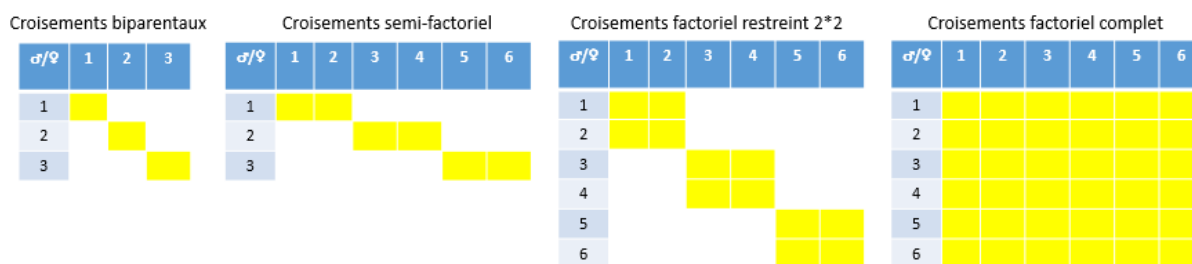


Figure 35 : Différents plans de fécondation envisageables à France Haliotis

Bilan : Le manuscrit 3 a montré que 40 reproducteurs croisés selon un plan factoriel complet conduit à une cohorte avec une taille efficace égale à 20. Avec un intervalle de génération de 4 ans, 8 pontes de même ampleur sont proposées par génération de sélection. Ces paramètres devraient donc conduire à une taille génétique efficace supérieure à 80 pour l'ensemble des cohortes de sélection.

2.5.3 Prévisionnel des croisements à réaliser jusqu'en 2021

Il est donc proposé que des mâles de 3 ans sélectionnés à 32 mois seront croisés avec des femelles de 4 ans sélectionnées à 42 mois. Il est en effet plus intéressant d'avoir des femelles plus grosses car elles produisent plus d'œufs, la quantité de sperme fournis par les mâles n'étant pas limitante (Bilbao et al., 2012). Conformément ce qui est présenté en chapitre 2 (Figure 31), un prévisionnel des croisements des cohortes peut être fait sur la base du programme de sélection proposé dans cette discussion (Figure 36).

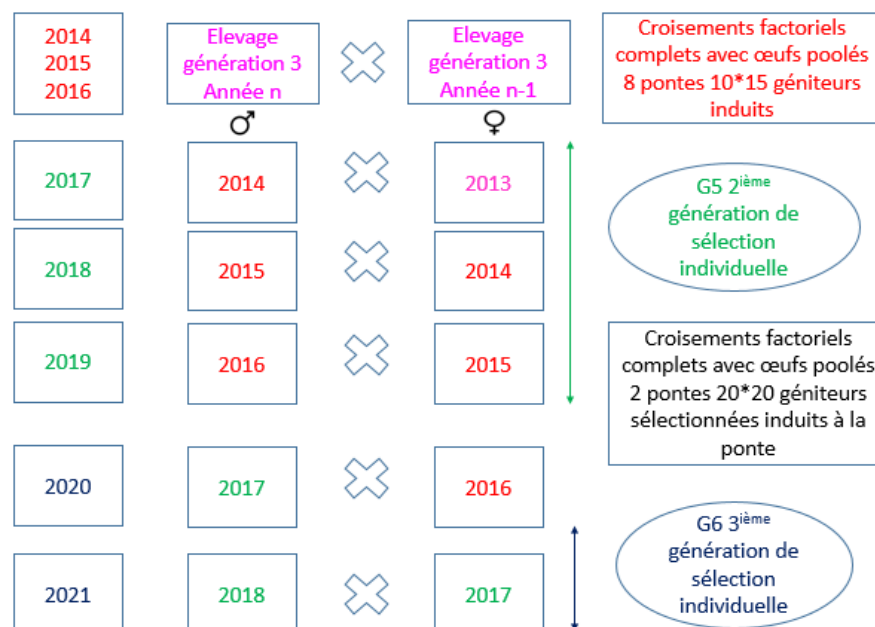


Figure 36 : Prévisionnel des croisements à réaliser à France Haliotis jusqu'en 2021

2.6 Stratégie d'élevage à adopter

Les interactions génétique-environnement sont *a priori* faibles pour des ormeaux sélectionnés dans un environnement de production et élevés dans différents environnements d'élevage (Fariás et al., 2017; Jonasson et al., 1999). Elles ne pourront cependant qu'augmenter avec les cycles de sélection et l'adaptation grandissante des cohortes en sélection à leur environnement de sélection (Falconer et Mackay, 1996). L'environnement de sélection doit donc être le plus proche possible de l'environnement de production. Il doit aussi être standardisé pour que la sélection s'exerce dans un même cadre au cours des générations (Figure 37). Conformément au schéma de production, les mâles pourront être sélectionnés au moment où la densité des cages sera diminuée à 2,5 ans. Une pression de sélection de 3% sur les mâles est alors possible. Les 100 meilleurs mâles sur le poids dans une cage de 3000 ormeaux seront retenus (la cage compte 12000 individus à sa mise en charge en sortie de nurserie, avec l'hypothèse que la survie lors de la première année en mer sera de 50% et que le sex-ratio sera de 50%). Au moment du sexage des individus et de la sélection des mâles, les 2400 meilleures femelles sur les 6000 restantes seront placées dans une structure d'élevage pour 1 an de grossissement supplémentaire. Les 100 meilleures femelles seront retenues sur une cage de 2400 permettant d'exercer une pression de 4% sur ces femelles. La nécessité de pouvoir sexer les animaux oblige à la réalisation d'un criblage fin septembre, moment où les gonades sont encore développées pour éviter d'éventuelles erreurs de sexage. Ce protocole permet de rassembler le nombre minimal de candidats à la sélection déterminé à la partie précédente (2.5).

Itinéraire technique de production pour 1 pont de sélection

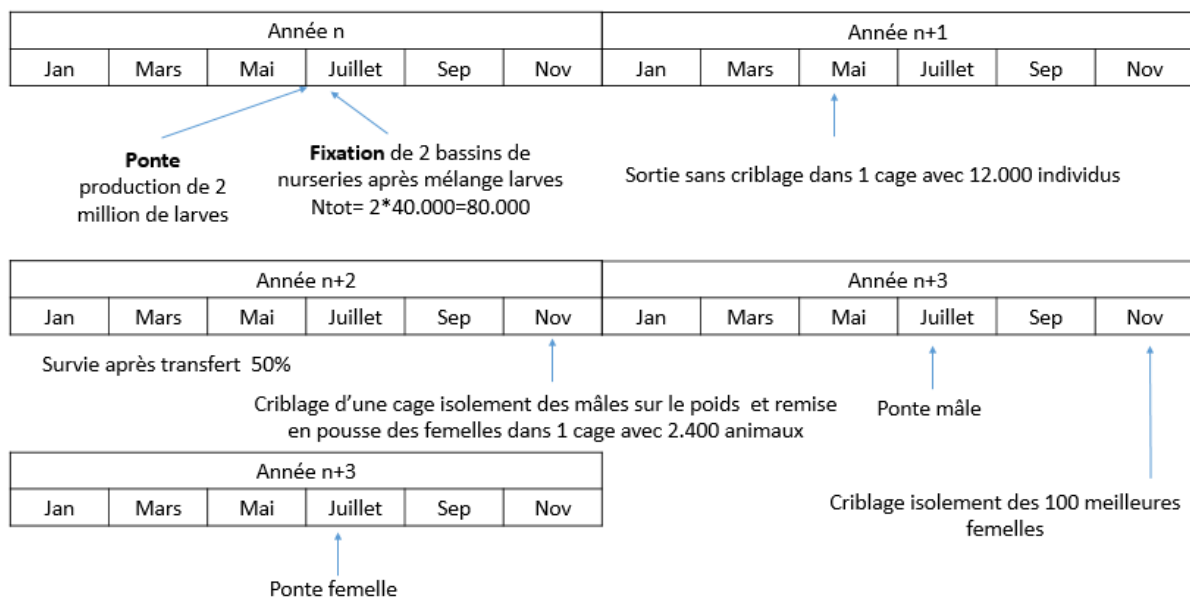


Figure 33 : Itinéraire technique d'une cohorte supportant la sélection sur ses 4 ans d'élevage

Les deux cages contenant les cohortes de sélection chaque année pourront suivre l'itinéraire technique présenté (Figure 36). Il s'agira chaque année de cribler 2 cages pour isoler des mâles de 3 ans et des femelles de 4 ans (Figure 37). Cette stratégie induit que chaque année 200 mâles et 200 femelles seront retenus sur le poids à une pression de sélection respective de 3 et 4% (Figure 38). Il a été calculé que d'augmenter les pressions de sélection sur le poids sur les deux cages n'apportait pas de progrès beaucoup plus important sur le poids. En revanche une deuxième étape de sélection pourra se faire. Parmi les 400 candidats isolés, les reproducteurs élités pourront être par exemple retenus sur une VGI plus faible au printemps. Une pression de 20% pourra alors être effectuée. Une marge de sécurité pourra aussi être prise sur les multiplicateurs pour en retenir 180 au lieu de 120.

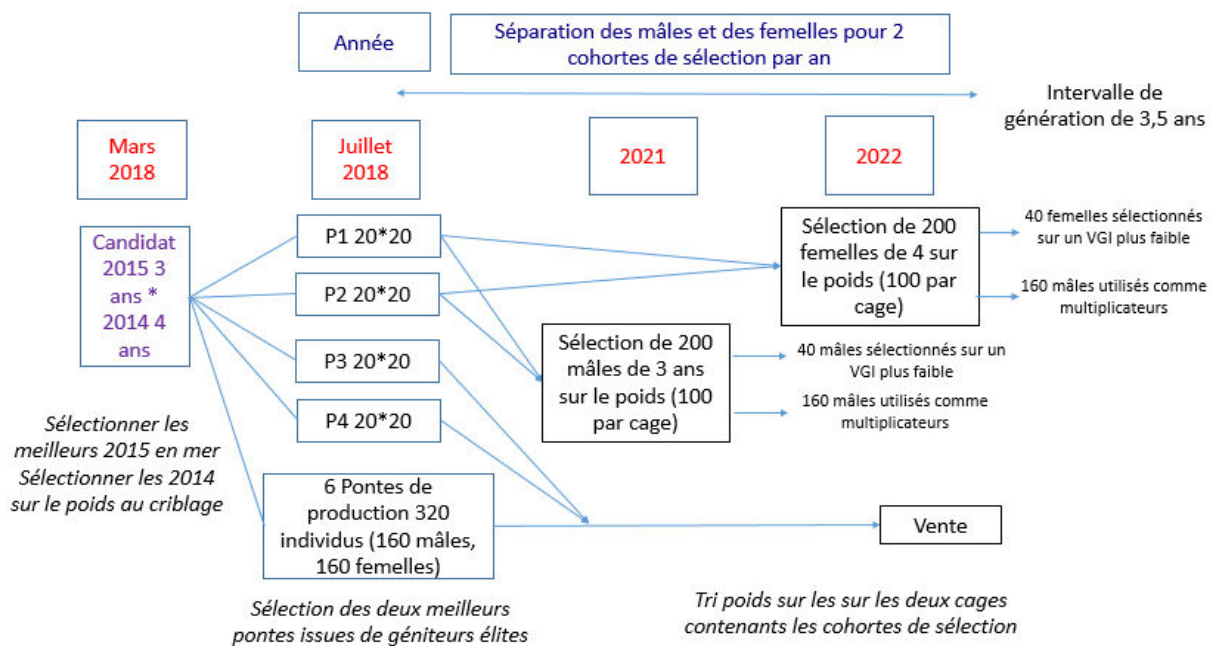


Figure 38 : Schéma de la stratégie à suivre à partir des cohortes de sélection qui seront produites en 2018. La répétition de ce schéma permettra l'obtention d'un progrès continu sur la croissance (P1, P2, P3, P4 désigne les 4 pontes réalisées par an à partir des 80 reproducteurs élités. Seules deux de ces pontes seront conservées pour la sélection)

Bilan : Une sélection sur le poids à 3 ans pour les mâles et à 4 ans pour les femelles sur 2 cages permettra d'obtenir deux fois le nombre de reproducteurs minimum nécessaire pour établir la sélection. Une étape de sélection pour un développement gonadique moins précoce pourra être faite. Une marge de sécurité pourra être observée par la conservation de 180 multiplicateurs. Au total, 260 reproducteurs répartis dans 43 unités de conditionnement devront être prévu.

3. Perspectives d'évolution pour la sélection génétique de l'orveau européen

3.1 Ajout de caractères d'intérêt pour la sélection

L'historique classique des programmes de sélection conduit à une augmentation du nombre de caractères au fil du temps. Cette augmentation est faite pour répondre à une volonté de différenciation du produit vis-à-vis des produits concurrents. Elle est aussi conditionnée par une diversification progressive de la demande des transformateurs et des consommateurs (Rauw et al., 1998). Le programme de sélection proposé ici est centré sur l'amélioration de la croissance en poids. Une pression de 20% pourrait également être exercée pour sélectionner un investissement reproductif plus faible. L'évolution de ce caractère devra être suivi au cours des générations. S'il augmente trop, la pression de sélection sur la voie mâle pourrait être abaissée de 3 à 6% pour obtenir 400 candidats et effectuer une pression de sélection de 10% pour retenir 40 mâles élites par cohorte avec un investissement reproductif à 3 ans plus faible.

Améliorer le taux de chair pourrait aussi être très intéressant. Des animaux plus charnus pourraient être souhaités par les consommateurs finaux. La variabilité et l'héritabilité pour le taux de chair à 32 mois sont comparables à celles trouvées pour la taille. Ces paramètres ont été observés sur d'autres espèces *H. iris* et *H. midae* et rendent possible un progrès sur ce caractère (Camara et Symonds, 2014; Gerber, 2013). L'utilisation de mesures échographiques est une piste pour permettre une estimation non létale du taux de chair et son phénotypage en sélection individuelle. Une perspective de R&D intéressante serait de pouvoir automatiser l'analyse d'image pour un phénotypage direct comme c'est aujourd'hui le cas pour mesurer l'épaisseur du lard dorsal des cochons (Lucas et al., 2017). Cette méthode devrait donc continuer à être développée et la corrélation génétique trouvée au chapitre 2 doit être confirmée pour des animaux plus âgés, plus gros et avec des plus forts taux de chair. Le taux moyen chair

observé dans le manuscrit 4 est plus faible (31%) que les valeurs obtenues sur des ormeaux de 70 mm étudiés dans le chapitre 1 (36%), plus en adéquation avec des valeurs obtenues pour des animaux d'élevage de 3 ans en système avec température contrôlée (40-50%) (Basuyaux, 1997). Il serait aussi intéressant de pouvoir décrire visuellement les traits d'un animal charnu pour permettre de construire une grille de phénotypage permettant la notation des animaux. Au cours de cette thèse, 4 grilles de phénotypage ont permis de réaliser un classement des animaux (couleur de la coquille, motif de la coquille, couleur du pied, indice gonadique visuel) avec des niveaux d'héritabilité exploitables en sélection individuelle. Une tentative a été réalisée sur le taux de chair mais n'a pas abouti à un résultat intéressant.

Dans le chapitre 2, une corrélation phénotypique et génétique positive a été présentée entre le poids à 28 mois et le taux de chair. Ce résultat est intéressant car une sélection sur un meilleur poids entraînera une légère augmentation du taux de chair. Cependant, ce résultat pourrait être dépendant de la population étudiée. En effet, plusieurs travaux chez d'autres espèces d'ormeaux montrent des corrélations génétiques négatives entre le poids total et le taux de chair (Camara et Symonds, 2014; Gerber, 2013). Une diminution du taux de chair par l'amélioration du poids serait une réponse non souhaitable. Cette différence pourrait venir du fait que des animaux plus gros sont étudiés dans ces travaux. Ainsi, il serait donc intéressant d'évaluer une corrélation génétique entre le taux de chair à 42 mois et le poids à 42 mois.

L'amélioration des méthodes de phénotypage est importante si une stratégie de sélection multi-caractères est envisagée (Monget et Le Bail, 2009). En effet, cette thèse n'a pas permis d'estimer précisément des caractères liés à la qualité de la chair de l'ormeau comme la tendreté et le taux de glycogène de la chair. D'éventuelles études de répétabilité et de précision permettront de déterminer les potentialités d'estimation de variabilité génétique additive pour différentes méthodes de phénotypage de ces caractères. Ce type de démarche est déjà en cours de développement sur l'ormeau pour des caractères immunologiques (Brokordt et al., 2015), physiologiques (Gonzalez et al., 2010) et métaboliques (Winkler et al., 2007), ainsi que pour le taux de glycogène (Fluckiger et al., 2011) et la tendreté du muscles (Hughes et al., 2016). Des comparaisons dans le temps nous permettront de pouvoir observer si une sélection sur la croissance a entraîné des évolutions de ces paramètres de qualité.

Avec la mise en place d'un programme de sélection multi-caractères, il est important de lancer des démarches d'études sensorielles et commerciales auprès des consommateurs pour

savoir ce qu'ils désirent pour le produit. Il faudra ensuite étudier la part de réponses que peut apporter la sélection génétique à ces différentes exigences. De même, des études reliant les propriétés organoleptiques des produits aux goûts et aux textures perçues par les consommateurs sont fondamentales pour lier la mesure phénotypique à une propriété perceptible par le consommateur (Harada et al., 2012).

3.2 Etude de l'opportunité de mise en place d'un programme de sélection généalogique pour l'ormeau

Une opportunité développée dans cette thèse est l'utilisation de marqueurs pour reconstituer les pédigrées des individus composant les cohortes en sélection et réaliser une sélection généalogique. Cette méthodologie a pour avantage d'optimiser les croisements pour maintenir au plus bas le taux d'apparement dans la population en sélection. Elle permet également de réaliser des challenges indépendants sur des lots dérivés et d'établir un index de sélection pour un programme de sélection multi-caractères (Vandeputte et Haffray, 2014). Cependant, cette stratégie nécessite un programme de sélection qui doit être adapté à la taille de la filière. La valeur du progrès génétique faite sur des reproducteurs sélectionnés est proportionnelle au gain individuel fait par leurs descendance (Robinson et al., 2010). Dans le cas de France Haliotis, 200 000 juvéniles sont produits chaque année. Une sélection généalogique multi-caractères nécessiterait au minimum le génotypage de 20 individus par famille de demi-frère et par cohorte en sélection (Vandeputte et al., 2001). Elle impliquerait dans le cas du programme de sélection proposé plus haut 800 ($2 \times 20 \times 20 = 800$) génotypages au minimum par an pour un coût de 12 000 euros en prenant 15 euros de génotypage par individu (Vandeputte et Haffray, 2014). Ce prix dépasse largement l'actuel budget de R&D total de l'entreprise. L'utilisation de marqueurs n'est donc pas envisageable à ce stade. La baisse du coût de génotypage attendue dans les prochaines années pourrait permettre de reconsidérer cette question. Un modèle précis des coûts de production et du système agronomique de France Haliotis devra alors être fait pour étudier l'impact économique d'une amélioration de la croissance et éventuellement d'autres caractères. Ce genre de modèle pourrait constituer des outils d'aide à la décision pour permettre de choisir la meilleure option parmi plusieurs choix de sélection possible. Il en existe au moins 3 en halioticulture pour des exploitations à terre (Pérez et al., 2012; Robinson et al., 2010; Zuniga-Jara et Marin-Riffo, 2014). Ces modèles nécessitent un gros travail de modélisation qui n'a pas été possible de réaliser au cours de cette thèse.

3.3 Poursuite de l'étude des effets de la domestication mise en place à France Haliotis

La sélection de plusieurs caractères ouvre plusieurs perspectives d'études de l'impact du processus de domestication sur la biologie de l'ormeau. La comparaison d'ormeaux issus de reproducteurs d'élevages sélectionnés et de reproducteurs sauvages permettra de suivre l'évolution des populations d'élevage au cours des générations.

D'un point de vue fondamental, cette démarche permettra d'étudier la séquence d'apparition des caractères associés au syndrome de la domestication (Gautier, 1990). Suite aux premières évolutions comportementales observées, des évolutions d'ordre physiologique et métabolique sont attendues. Les études du comportement de déplacement et de nutrition permettront alors de voir quel type de comportement est favorisé par le processus de sélection. Il serait par exemple, intéressant de savoir si les animaux sélectionnés consomment plus d'algues que des animaux non sélectionnés sur une période donnée, ou si une meilleure efficacité alimentaire est observée pour la population en sélection. L'efficacité alimentaire est un paramètre fondamental pour un élevage où la nutrition des animaux est active et représente un coût important en main d'œuvre. Il est très probable qu'une augmentation de la croissance permettant de vendre des animaux à un poids moyen plus important à 4 ans nécessitera une alimentation plus importante sur le même temps d'élevage. Chez les saumons, 5 générations de sélections familiales sur le poids ont généré 40% d'augmentation de la consommation (Gjedrem et Baranski, 2009). Même si plusieurs études montrent l'existence de corrélations génétiques entre la croissance et l'efficacité alimentaire pour le saumon (Kolstad et al., 2004), il n'est pas garanti que cette corrélation existe pour les ormeaux. Ces caractères devront donc être suivis dans le temps. En revanche, il est certain qu'une augmentation de croissance utilisée pour réduire le cycle de production engendrera une diminution du gaspillage et augmentera l'efficacité alimentaire à l'échelle de l'exploitation (Gjedrem et Baranski, 2009).

D'un point de vue appliqué, les comparaisons de performances entre les populations sélectionnées après une ou deux générations, et les populations sauvages pourront nous permettre de juger dans le temps la stratégie proposée dans ce manuscrit. En cas d'apport par la sélection, ces études apporteront une valeur spécifique aux juvéniles produits à France Haliotis. Elles pourront ainsi avoir un impact économique important. La réduction du cycle d'élevage et les diminutions des risques associés pourront avoir un effet bénéfique sur la filière

de production et permettre à des éleveurs intéressés d'expérimenter plus facilement la production d'ormeau.

3.4 Amélioration de la productivité d'élevage par d'autres méthodes que la sélection individuelle

Au cours de cette thèse, deux expérimentations ont permis un suivi de croissance d'individus marqués et sexés. Alors que le sexe des individus est présumé ne pas changer au cours de leur développement, un dimorphisme sexuel important sur la croissance a été mis en évidence dans ces deux expérimentations. Les femelles présentent un poids moyen supérieur aux mâles de 10 à 20% pour des mesures entre 16 et 36 mois pour des animaux de 1 à 30 g. Elles présentent aussi une taille supérieure de 3 à 5%. Un dimorphisme sexuel identique de 3,5% sur la taille avait été observé sur une cohorte d'*Haliotis tuberculata* élevée à terre en élevage contrôlé jusqu'à 34 mois pour des animaux de 50 g (Basuyaux, 1997). Etonnamment, une mesure à 42 mois (Manuscrit 4) ne montre plus ce dimorphisme sexuel. Une explication possible serait que les mâles ont un investissement gonadique plus précoce que les femelles (Uki et Kikuchi, 1982). Ceci est cohérent avec des poids de gonade et des taux de gonade plus faibles pour les femelles que pour les mâles au démarrage du développement gonadique à 32 mois et expliquerait une moins bonne croissance des mâles jusqu'à 32 mois. L'absence d'un dimorphisme à 42 mois pourrait être due au fait que les femelles au cours de la troisième année d'élevage réaliseraient un investissement gonadique plus important par rapport aux mâles et perdraient l'avance qu'elles ont en poids et en taille. Une résorption gonadique plus importante pour les mâles pourrait aussi être à l'origine d'une croissance compensatrice à l'automne de la troisième année d'élevage. Les ormeaux étudiés à l'âge de 3 ans sur la réponse à la sélection (Annexe 1) faisaient en moyenne 30g à 36 mois et présentaient un dimorphisme sexuel à l'avantage des femelles alors que les ormeaux étudiés dans le deuxième chapitre pesaient 28 g à 42 mois. Il semblerait donc que les différences de cinétique de croissance entre mâles et femelles sont plus liées à l'âge qu'aux poids des animaux. D'autres expérimentations permettant de suivre le développement gonadique et la croissance de mâles et de femelles sur 3 ans d'élevage sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

Si la croissance s'accélère au cours des générations de sélection, il sera intéressant de suivre l'évolution du dimorphisme sexuel à taille commerciale. Les gains espérés dans cette étude prévoient que les cohortes de production atteignent en moyenne le poids seuil de commercialisation à 36 mois après deux générations de sélection. Il serait intéressant de savoir

si les femelles seront toujours 15 à 20% plus lourdes à cet âge. Auquel cas, il pourra être envisagé de mettre en place des programme de R&D pour n'avoir que des femelles en production. A notre connaissance, le dimorphisme sexuel est peu étudié sur les autres espèces d'ormeaux et le déterminisme du sexe chez les ormeaux n'est pas connu. Il semblerait avoir lieu au cours des 16 premiers mois de vie des animaux (Cochard, 1980). Il est communément proposé que le sexe de l'ormeau ne change pas au cours de sa vie puisque de tels changements n'ont jamais été décrits. D'autres expérimentations doivent être réalisées pour confirmer l'existence d'une variabilité polygénique additive permettant d'augmenter la proportion de femelles dans la population d'élevage. Une autre opportunité ouverte par les résultats du chapitre 2 (Manuscrit 3) serait de réaliser une sélection conjointe des mâles sur leurs croissances et le sex-ratio de leurs descendance. Une telle stratégie de sélection est envisageable pour le bar Européen *Dicentrarchus labrax* (Vandeputte et al., 2007). Cette sélection reste difficile à mettre en place et nécessite l'utilisation de marqueurs génétiques. Etant donné que des corrélations génétiques ont été trouvées entre le sex-ratio et la croissance de famille, il sera intéressant de suivre le sex-ratio des cohortes d'élevage au cours des générations de sélection.

Une autre opportunité serait de travailler sur les mécanismes de déterminisme précoce du sexe dans le but d'obtenir des cohortes constituées uniquement de femelles. Une partie de la production française de truite arc en ciel est déjà réalisée par la constitution de cohortes constituées uniquement de femelles. Ces cohortes sont générées par l'inversion hormonale de femelles produisant des spermatozoïdes. Ces femelles sont appelées néo-mâles (Ojolic et al., 1995). A notre connaissance, aucune méthode efficace de production de population tout-femelle n'a été développée pour l'ormeau (Elliott, 2000).

Enfin, s'il est confirmé que l'investissement reproductif explique le retard de croissance des mâles par rapport aux femelles, il sera intéressant d'étudier l'impact d'une triploïdisation sur la croissance. Le sexe d'animaux triploïdes est toujours observable mais le développement gonadique est limité. Le sex-ratio des cohortes triploïdes est de 1:1 (Dunstan et al., 2007; Liu et al., 2009). Les gains associés à cette méthode cytogénétique sont dépendants de l'espèce (Liu et al., 2009; Okumura et al., 2007). La triploïdisation offre l'avantage de permettre de limiter la pollution génétique occasionnée par des populations d'élevage sur des populations sauvages. Elle est aussi un moyen de conserver les gains génétiques réalisés au sein de l'entreprise (Elliott, 2000). Etant donné qu'elle peut se faire par blocage du deuxième globule polaire, l'obtention de triploïde peut se faire par croisement de diploïdes sélectionnés. La triploïdisation ne remettrait pas en cause le programme de sélection proposée dans ce manuscrit. Le

développement de cette technique chez *H. tuberculata* devrait être accompagné d'un suivi important de son impact sur la qualité du produit et sur l'image du produit.

Conclusion générale

Une différenciation sur des critères comportementaux entre populations sauvages et populations d'élevage a été mise en évidence dans le chapitre 1. Une meilleure adaptation des animaux d'élevage au stress induit par le système de production a aussi été mise en évidence, avec probablement des mécanismes développementaux et/ou génétiques impliqués. De plus, des animaux sélectionnés ou issus de reproducteurs d'élevage montrent un comportement de réponse à un prédateur moins développé que des individus issus de reproducteurs d'élevage. Cependant, après un cycle de sélection, aucune amélioration des performances agronomiques n'a pu être observée pour la population d'élevage sélectionnée. Un cycle de sélection massale avec 5% de pression sur le poids n'a pas permis un progrès en termes de croissance et de survie. Ce résultat peut paraître paradoxal avec la forte héritabilité de la croissance trouvée pour une cohorte multifamiliale élevée dans un environnement commun qui laisse en effet penser qu'une sélection individuelle sur le poids à 4 ans pourrait permettre une augmentation de 31% de progrès tous les 4 ans. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que même si la même algue *Ulvella lens* était utilisée comme alimentation en nurserie, des différences de micro-environnement peuvent impacter fortement les résultats de croissance jusqu'à 3 ans. Par exemple, les densités des fixations peuvent être très variables et difficiles à contrôler, même si par ailleurs les conditions de température, de luminosité, d'absence de prédateurs, etc... étaient égales. Les effets d'un environnement d'élevage difficile à standardiser, en particulier pendant le développement ontogénique pourrait limiter l'efficacité de la sélection ou masquer les éventuels gains issus de cette sélection. La variabilité de ces résultats montre que les progrès ne pourront être faits que par la répétition d'une sélection au cours des générations. Elle incite aussi à proposer une stratégie de sélection où l'élevage est standardisé et où la sélection est faite sur des familles élevées en mélange dans un environnement commun tout au long de leur vie.

Une sélection généalogique est rendue possible par la construction dans cette thèse d'un jeu de marqueurs SNP permettant la reconstruction d'un pedigree pour des familles élevées en mélange. Cette perspective est intéressante même si les coûts de génotypages associés sont à ce jour trop important pour France Haliois. La proposition faite est donc la mise en place d'un programme de sélection individuelle sur le poids. Un mode de croisement intergénérationnel

permettra d'isoler 200 mâles de 3 ans et 200 femelles de 4 ans chaque année avec une pression de 3,5% sur le poids. Ces 400 reproducteurs permettront d'assurer l'ensemble de la production à France Haliotis. Parmi ces 400 animaux, 80 reproducteurs élités pourront faire l'objet d'une sélection pour un développement gonadique moins précoce et des couleurs de pieds et de coquilles désirées. Les perspectives d'évolution pour ce programme de sélection sont le développement de méthodes de phénotypage automatisées et standardisées sur plusieurs caractères d'intérêt économique tel que le taux de chair. Ce caractère présente déjà l'intérêt d'être héritable et d'être en lien direct avec la rentabilité de l'élevage.

Liste des annexes

Annexe 1: Anti-predator response of *Haliotis tuberculata*: behaviour is modified after one generation of domestication

Cet article correspond à une expérimentation, qui a démarré en 2014 et qui a duré 3 ans, et pour laquelle j'ai eu la responsabilité de l'élevage des ormeaux pendant les 16 premiers mois, ainsi que de la réalisation de mesures à 3 ans comme la couleur de la coquille. Cette expérimentation s'inscrit parfaitement dans le sujet de thèse puisqu'elle vise à mesurer une réponse à une sélection massale sur le poids d'animaux de 4 ans. Les principaux résultats ont été discutés dans le chapitre 1, ainsi que dans la discussion.

Annexe 2: Conséquence du prélèvement d'épipodes et du marquage de la coquille sur la croissance et la mortalité d'une population d'ormeaux de 2 ans

Comme plusieurs expérimentations de la thèse nécessitaient de marquer et de prélever des tissus pour accéder à des phénotypes individuels ou à l'ADN des animaux, une expérimentation a été réalisée pour apprécier les conséquences sur la croissance et la survie des animaux. Les principaux résultats sont présentés dans cette annexe.

Annexe 3: Recherche d'un prédicateur non invasif du taux de chair et du taux de gonade

Préalablement à la réalisation du chantier de phénotypage qui a permis de rassembler les données présentées dans le chapitre 2, plusieurs travaux d'optimisation de protocoles ont été réalisés. Cette étude avait pour but d'étudier les corrélations phénotypiques entre des mesures d'échographie et le poids de différentes parties de l'ormeau. Ce travail montre qu'une mesure par échographie prise sur une coupe transversale de l'animal permettrait d'évaluer le poids de chair obtenu après dissection. Il a constitué la première étape permettant l'obtention d'une variable permettant de prédire de manière non-invasive le taux de chair utilisable en sélection et présenté dans le chapitre 2.

Annexe 4: Lexique

Une définition des notions abordées dans le cadre de cette thèse sont présentées dans cette annexe. Les définitions sont classées par grands thèmes et par ordre alphabétique à l'intérieur de chaque thème.

Annexe 1: Anti-predator response of *Haliotis tuberculata*: behaviour is modified after one generation of domestication

En preparation pour Animal Behaviour

Authors

Sabine Roussel^a, **Sébastien Lachambre**^{a,e}, Thomas Bisch^{a,b}, Jean-Lou Gervois^e, Pierre Boudry^d, Christophe Lambert^a, Sylvain Huchette^e, Rob Day^c

Affiliations

^a LEMAR, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

^c School of Biosciences, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia 3010

^d Ifremer, UMR 6539 LEMAR (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Centre Bretagne, 29280 Plouzané, France

^e France Haliotis, 29880 Plouguerneau, France.

Corresponding Author

Sabine Roussel

Phone: +336 18 03 11 20

Email: sabine.rousseau@univ-brest.fr

Abstract

Domestication of *Haliotis tuberculata* in farms began recently. During the process, abalone acquire behavioural and physiological traits more adapted to their captive environment. These modifications may result from intentional selection of production traits, or unconscious and unintentional selection due to conditions experienced in the farm environment. To study this process, progeny of 3 different broodstock origins were sampled. They were obtained from wild parents, from farmed stock chosen for faster growth with 5% selection pressure and from randomly selected farmed abalone. Farmed abalone were the third generation of abalone resulting from systematic mating between wild and farmed broodstock (either males or females were wild broodstock), without intentional selection. After rearing for 16 months in separate tanks (3 treatments, 4 replicate spawnings, n= 12 tanks in total), randomly selected offspring from the 3 progenies were individually tagged and placed together in sea-cages at a density of 75 abalone per cage. After 3 years, aspects of their behaviour were studied (circadian rhythm and feed intake, righting, predator and hiding behaviour), then immune status after a stress. Mortality and growth were also recorded. No differences were observed in terms of survival, growth or immune status traits between the 3 progeny groups. However, significantly more offspring of selected broodstock did not perform the complete sequence of anti-predation behaviour, and took more time to reach their hides compared to the offspring of wild broodstock. In addition, the shell colours of the selected broodstock were more orange and had more stripes compared to the brown-green colour of the offspring of the wild broodstock. Randomly selected abalone had intermediate responses between wild and selected offspring. These results show that associated behavioural trade-offs can take place after only one generation of selection on weight. This should be taken into consideration when using farm stock for ranching or stock enhancement programs.

Declaration of interest

This experiment was conducted in the France Haliotis abalone nursery farm. Animals and some part of the set-up were supplied by the farm. Two persons, employed by France Haliotis, were involved in this experiment: Sylvain Huchette, PhD, manager of the farm, and Sébastien Lachambre, PhD student funded by the farm. The apparatus used in this study were funded by the FEAMP grant (Innovation in aquaculture - GENORMEAU), and the researchers were paid by the French government.

Highlights

- Selection of abalone on weight reduced offspring behavioural responses to predators after only one generation.
- Quantitative as well as qualitative behavioural responses were modified.
- Color and patterns of the shells of offspring were affected by unintentional selection

Keywords

Predation, hiding behaviour, domestication, selection, captive, abalone, *Haliotis tuberculata*

Introduction

Abalone are marine gastropods found in all continents, with more than 56 species described worldwide (Geiger 2000). These gastropods inhabit rocky habitats (Clavier and Chardy 1989; Poore 1972; Shepherd 1973). Depending on the species, they can be found on rocks, in narrow crevices or under boulders. During their first months of development, settled post-larvae graze on diatoms on the surfaces of rocks and kelp blades, and progressively switch to microscopic stages of macro-algae (Won et al. 2010) when developmental changes in the structure and function of the digestive and radula system allow them to change to a macro-algal diet (Johnston et al. 2005). Juvenile (< 30 mm) abalone are mainly grazers, feeding primarily on encrusting algae or macroalgae (Won et al. 2010; Wood and Buxton 1996). However, this feeding behaviour is species-dependent, with some species such as *H. laevigata* feeding mainly on drift algae, *H. roei* only grazing, and *H. rubra*, *H. scalaris*, *H. cyclobates*, and *H. midae* performing both behaviours opportunistically (Shepherd 1973; Wood and Buxton 1996). Abalone show strong photonegative behaviour, with movement and feeding mainly observed during the night (Momma and Sato 1969). Three types of activity have been described: the “moving type” in which abalone leave their hiding places during the night and do not return to them, the “homing type” where abalone leave their refuge (often a ‘home scar’) and return to it before daytime, and the “staying type” which do not leave their refuge even in the nighttime (Momma and Sato 1969). This pronounced behavioural rhythm has been interpreted as an efficient way to avoid predators (Shepherd 1973). Indeed, abalone have numerous predators such as sea-otters (Hines 1982), crabs, stingrays, fish (Griffiths and Gosselin 2008; Shepherd 1973), and starfish (Cox 1962; Day et al. 1995). Day et al. (1995) described escape responses exhibited by *Haliotis rubra* when attacked by starfish: an extension of their tentacles to detect the predator is followed by a retraction of the tentacles when contact is made with the starfish tube feet, then lifting its shell followed by violent twists of the shell from one side to the other to break the starfish’s grip, almost always followed by a “running” response. In addition, abalone often ejects a mucus which probably helps masking the direction of escape and might have repellent properties (Bancalà 2009). Parsons and Macmillan (1979) described this escape behaviour as a fixed action pattern. If some sub-units of the escape response are expressed in the wrong order, the escape behaviour might be less efficient. The response is specific to the type of contact. In contrast to the response to starfish, a clamp down responses is observed when the abalone is in contacted by foreign objects such as a crab claw or human finger (Bullock 1953).

Price (1984) defined domestication as “the process by which a population of animals becomes adapted to man and to the captive environment by genetic changes occurring over generations and environmentally induced developmental events reoccurring during each generation. In fish, Teletchea and Fontaine (Teletchea and Fontaine 2014) defined it as the consistent control of reproduction over successive generations, involving maintaining and breeding fish in captivity, with broodstock management and rearing of the larvae and juveniles. Terrestrial domesticated animals are often characterized by a change in quantitative rather than qualitative behavioural responses (Price 1999). The same process is described in marine animals, with for example in fish, a wide range of behavioural traits being modified: foraging and anti-predator behaviour are reduced in complexity and effectiveness, territorial behaviour is partly suppressed for species raised in high density and risk-taking/aggressive fish prevail under intensive culture, depending on the circumstances (Huntingford and Adams 2005). Indeed, a shift is observed from resource conservation, foraging and predator avoidance functions (Thorpe 2004) toward resource allocation to growth and reproduction. In mollusks, behavioural consequences are far less known, probably due to the limited behavioural repertoire of bivalves, the major cultivated species.

Two mechanisms can induce a change from a wild form to a domesticated form. The « development » mechanism affects the expression of phenotypic traits within a given genotype (Lorenzen et al. 2012). Developmental mechanisms are particularly pertinent in marine mollusks and fish, due to a high level of phenotype plasticity (Thorpe 2004). The « genetic » mechanism can result from selection, inbreeding, drift or genetic engineering. In some species, conscious selection can be implemented by targeting traits desirable in aquaculture, focusing mainly on growth rate and improvement in disease resistance (Gjedrem 2012). As for many species of abalone cultured around the world (Rhode et al. 2012; Robinson et al. 2010), domestication of the European species *H. tuberculata* started only recently. However, the effect of domestication on behaviour has rarely been studied (Robinson et al. 2013). A first series of experiments on this species showed that wild abalone spent about twice as much time moving during the day, and took longer to right themselves after being turned upside down (Lachambre et al. 2017), and responded more to touching the foot (Lachambre et al. Accepted) compared to farmed abalone. However, because wild and farmed abalone were not raised in the same conditions, it was not possible differentiate developmental from genetic effects.

Even if the relative contribution of genetic changes to the domestication process is often difficult to assess, exposing abalone of different genotype to a common environment can provide clues about the effect of genetic based differentiation (Conover 1998). The present experiment aimed at understanding the consequences of a selection program on the behaviour of the offspring. Feeding behaviour, circadian rhythm and responses to several challenging situations such as predation and being turned upside down were studied in offspring born from 3 different origins, corresponding to 3 different level of domestication (Teletchea and Fontaine 2014): offspring born from wild broodstock (entire life cycle closed with wild inputs, level 3), offspring born from randomly selected broodstock (entire life in captivity without wild inputs and without a selective breeding program, level 4) and offspring born from broodstock selected on weight (selective breeding focusing on specific goals, level 5). All these offspring were raised in a similar environment and studied at 3-years of age. This experiment allowed the evaluation of the behavioural trade-off associated with selection on weight, the most frequent selection criterion used on farmed abalone. The other objective was to estimate the behavioural consequences of selection or captivity on the behaviour of offspring that might be used in a stock enhancement or a ranching program.

Materials and methods

2.1. Animals and rearing procedure

Abalone (*Haliotis tuberculata*) were obtained from 3 different origins: wild abalone, farmed abalone selected on weight (5% selection pressure) and randomly selected farmed abalone. Farmed abalone broodstock came from the France Haliotis farm (48°36'46N, 4°33'30W; Plouguerneau, France). These broodstock were the third generation bred on the farm and were the result of systematic mating between wild and farmed broodstock (either males or females were wild broodstock) in each generation. This strategy aimed to avoid inbreeding. In 4 sea-cages of 600 abalone, 15 males and 15 females per cage were selected on the basis of being the heaviest 5% of males and females for the selected broodstock, and the same number of abalone were randomly collected from the sea-cage for the randomly selected broodstock. The wild broodstock consisted of 40 males and 40 females collected from coastal areas of Northern Brittany by professional divers. Abalone were kept in 15-L conditioning buckets, with 4 to 8 abalone from the same treatment in a bucket, for approximately 5 months. Maturity of the broodstock was checked during routine hatchery operations before the induction of reproduction. All abalone were regarded as suitable for reproduction. An average of 90% of the

abalone in each group spawned after induction using a temperature shock of +4°C and UV-irradiated sea water. During spawning, females of each origin were grouped in one container while males were separated into individual containers. Within 2 h of spawning, pooled oocytes were subdivided according to the number of males having spawned, and fertilized with the sperm of each male diluted to a target concentration of 10 spermatozoa per egg. The success rates of fertilisation and hatching were estimated to be 80 %. Following 5 days of rearing through incubation, hatching and the various larval stages, 200 000 larvae from each treatment were allowed to settle in each nursery tank (1.4 m x ¼ m x 0,6 m) containing 120 plastic plates (0.6 m x 0.3 m) covered with *Ulvelia lens* (Daume et al. 2004). In total, this spawning procedure was repeated 4 times between July and September 2014 (the 17th, the 21th, the 28th of July, and the 15th of September) with different farmed and wild abalone each time.

After 10 months, when the juveniles reached approximately 10-mm in mean shell length, they were anesthetized using 3.5% ethanol and density was adjusted to 300 juveniles per tank. In November 2015, at the age of 16 months, juveniles were transferred into sea-cage structures. Each sea-cage structure contained 75 abalone: 25 abalone from wild parents, 25 abalone from parents selected on weight and 25 abalone whose parents were randomly selected, each cage corresponding to a spawning period. There were 3 technical replicates for each spawning period (n = 12 cages in total). Abalone from each treatment were individually marked with 2 coloured plastic tags (2 mm x 2 mm) fixed with cyanoacrylate glue. Due to high mortality during the winter rearing period, only 13 juveniles from the randomly selected broodstock were added per cage for the third spawning. Following a winter storm, one replicate cage from the first spawning was lost.

The commercial rearing procedure of the France Haliotis farm was applied to the abalone in the cages (for more detailed procedure, see Lachambre et al., 2017) with one fresh-algae feeding per month until May 2017. The algae provided were mainly composed of *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata* and *Saccharina latissima*, depending on the season.

2.2 Experimental procedure

When the abalone were 34 months old, the sea-cages were brought back to the laboratory facilities. The cages were placed in a tank (6 x 1.4 x 0.6 m, l x w x h) next to the laboratory until further analysis. Abalone were out of the water for a maximum of 1h during the transport from the seacage concession area. Fresh, filtered seawater was then provided. Apart from

abalone used to record circadian rhythm (see below), animals were left 10 days in the tank before physiological and behavioural measurements were carried out. Special attention was taken not to handle them in order to prevent any stress.

In order to evaluate the effect of domestication on behaviour and physiology, several tests were performed: Immune status measurements, righting, hiding and predator tests. Circadian rhythm was studied in aquaria after one month of habituation to the laboratory conditions. Growth and survival measurements were performed during the 3-year rearing period.

2.3. Behavioural measurements

2.3.1. Circadian rhythm and feed intake

To study the circadian rhythm, a total of 33 glass-aquaria (20 x 35 x 20 cm, w x l x h) containing 15-L of seawater were used. In addition, 3 supplementary aquaria were used to control for algal degradation without abalone. The two extremities of these aquaria were devoted to shelter or feeding: shelter was provided in the form of a ceramic hide (6 x 20 x 6 cm, w x l x h), while a ceramic ring was used to hold the alga *Palmaria palmata* in the feeding area. The quantity of algae was adjusted to ensure *ad libitum* feeding (at least one third of the initial quantity was remaining at the end of each period). Each tank received 20 L.h⁻¹ of 3 µm mechanically filtered seawater at a temperature of 15 ± 0.5°C. Photoperiod was adjusted to the seasonal rhythm 14:11h (light: 6:30 h to 20:30 h). To avoid stressful conditions during light changes, the light was adjusted slowly for 30 minutes during dawn (6:00 to 6:30 h) and dusk (20:30 to 21:00 h) using a dimmer (Gold Star, Besser Elektronik, Italia). Tanks were cleaned twice a week using a siphoning hose and the water filters were changed every day. All tanks were continuously videotaped using 3 digital cameras (TS-WD6001HPSC, Sygonix GmbH, Germany), linked to a 24h-recording device (TVVR 40021, Abus, Germany). All the behavioural analyses were performed using the Observer program (Observer©XT, Noldus).

Just after transport from sea, 3 abalone from each treatment were randomly sampled from each cage and placed in 11 aquariums (1 aquarium per cage, n = 33 abalone in total per treatment). They were gently detached, measured and weighed. A phosphorescent tag was glued to the shell with cyanoacrylate gel in order to record their night time behaviour. Previous observations have shown that the stress of chipping and tagging has no impacts on assays of haemocytes after 3 days (Travers et al. 2010) and on circadian rhythm (Roussel, pers. comm). After one month of habituation, the circadian rhythm was video-recorded during 2 consecutive days, including both

day and night-measurements. The videos were analyzed at 16 times normal speed and slowed to 4 times when necessary. To avoid bias during video analysis, a number was assigned to each feeder, so that aquaria were not identified in terms of treatments. Individual behaviour was followed using the individual shell tags. The percentage of time spent hiding (under the ceramic hiding place), moving in the open zone, immobile in the open zone, and eating the algae (less than 2 cm from the algae with small movements of the algae observed) were calculated for each aquarium by averaging the behaviour of the 3 individuals during the 2 days of observations.

Feed intake was measured during the one month period. Fresh *P. palmata* was placed in the ceramic ring every 3-4 days. Fresh and remaining algae were dried with absorbent paper and weighed each time. The ingested quantity of algae was calculated in grams per gram of wet abalone, taking into account algal degradation in the 3 supplementary aquaria.

2.3.2 Predator, hiding and righting tests

For the righting and hiding tests, 15-L glass aquaria were used (20 x 35 x 20 cm, w x l x h), equipped with a ceramic hide for the hiding test, and nothing for the righting test. For the predator test, a 150 L plastic tank (0.4 x 2.5 x 0.15 m, l x w x h) was used with 10 x 10 cm square grid printed on the bottom and on the side of the tank. The aquariums and tanks were cleaned at least 3 times, and seawater at the same temperature as the rearing tank was replaced between each individual abalone tested, in order to remove any alarm cues possibly associated with abalone mucus (Bancalà 2009)

For each test, an abalone was randomly selected from a cage, gently detached and immediately placed in the experimental aquarium or tank (for each test, n = 1 or 2 abalone per treatment and per sea-cage structure, n= 19 abalone minimum in total per treatment). Abalone were replaced in their cage only when all the abalone from the same cage had been tested in order to reduce the effect of stress chemical cues on other individuals.

2.3.3 Righting test

Abalone were individually placed on their back in the centre of the aquarium. The righting latency was measured from the time the abalone were placed in the aquarium until they had fully turned over. If an abalone did not successfully turn over within 4 min, a latency of 4 min was recorded. The number of attempts to turn over (defined as the number of time the abalone placed its foot on the bottom and contracted its muscle) was also recorded.

2.3.4. Hiding test

An individual abalone was placed on its foot at one side of the aquarium. The latency of the first movement, the latency to reach the hiding place and the latency before complete hiding were recorded, with a maximum latency of 15 min if abalone did not hide.

2.3.5. Predator test

An abalone was placed in the center of the 150-L tank. When the abalone had a semi-relaxed or relaxed foot attached to the bottom of the tank, most of the time between 30 and 60 sec, a starfish (*Marthasterias glacialis*, 20 cm width) was held in contact with the abalone foot for 10 sec. While the starfish touched the abalone, any protective swivelling movement of the abalone shell was recorded as well as any mucus release, any turn-around behaviour and the latency of escape movement (defined as movement straight forwards). The number of abalone that performed these 4 escape behaviours was calculated. In addition, the time spent moving, the number of squares crossed and the latency of the first movement were measured during the 5-min period of the test. The *M. glacialis* were collected on the outside of abalone sea-cages, placed in a 30-L aquarium, and fed with dead non-experimental abalone twice a week during the 2-weeks experimental period. The starfish were then released in the same area where they were collected at the end of the experiment.

2.4. Immune function measurements

Phagocytosis efficiency and total haemocyte count (THC) were measured after 20-min of shaking and a further 40-min of exposure to air. Two abalone per treatment and per cage were used. One hour after the beginning of the stress period, haemolymph was collected in less than 1 minute from the pedal sinus, by the same experimenter for each abalone, using a refrigerated 2 ml syringe and 25 G x 5/8 needles. The haemolymph was transferred into a vial on ice. Samples were treated just after collection to avoid aggregation. To measure phagocytosis efficiency, a protocol adapted from Travers et al. (Travers et al. 2008) was followed using 2 replicates of 25 µl of haemolymph (for the detailed procedure, see Lachambre et al. 2017). The phagocytosis efficiency was defined as the percentage of haemocytes that had engulfed 3 or more beads. The number of beads engulfed per cell was calculated also. The phagocytosis efficiency analyses were performed on a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, France), equipped with a 488 nm laser. Data were analysed with WinMDI software (Windows, Multiple Document Interface for flow cytometry). For the THC samples, 2 replicates of 25 µl of haemolymph were immediately added to 3.4% formalin (175 µl) in a 96-well plate and kept

at 4°C before analysis. It was diluted and incubated for 30 min in dark conditions with SYBR green fluorescent dye (4 µl, Molecular Probes, 10⁻³ dilution of the commercial stock solution) before flow cytometry. Results were expressed as number of cells per µl.

2.5. Growth, survival and reproduction

2.5.1 Size and weight at 10 and 16 months

Maximum shell length was measured to the nearest millimeter using Vernier callipers and weights were recorded to the nearest 0.01 g at 10 months for 75 abalone per tank (n = 300 abalone per treatment). These abalone were removed from the experiment. This procedure was performed again at 16 months of age when transferring the animals in the sea-cage structure (n = 264 minimum per treatment).

2.5.2. Size, weight, survival, and reproduction at 34 months of age

Survival at sea was obtained from the numbers of remaining live abalone in each treatment at 34 months versus their numbers at 16 months of age.

Randomly selected abalone were dissected in June, corresponding to the period of reproduction for the species in this area (n = at least 4 abalone per treatment and per cage, n = minimum 49 abalone per treatment in total). Muscle, gonad, digestive system and shell indices were calculated as the foot, gonad, digestive system and shell weights expressed as a percentage of the wet body weight. Length and total weight were measured both on the dissected abalone and the remaining undisturbed abalone at 34 months of age (n = 63 abalone minimum per treatment).

2.6. Shell colour and pattern

Shell colour and pattern were assessed visually by a trained experimenter (Figure 1) for each dissected abalone. The lighter colour of the juvenile part of the shell was not included in this assessment. The shell colour was classified into 2 categories (Liu et al. 2009) : a green shade category comprising shells ranging from dark brown to green, and an orange category comprising shells with an orange to red colour. There were 3 categories of shell pattern: homogenous colour, a discoloration in one part of the shell (less than 1/3 of the shell), and stripes in at least 1/3 of the surface of the shell (Figure 1)

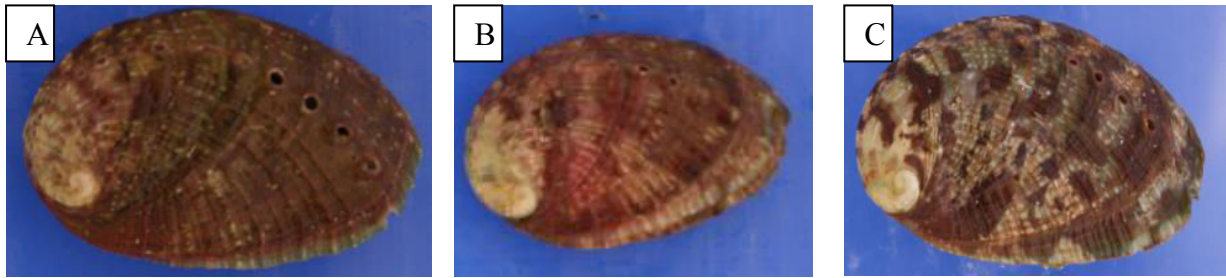


Figure 1: shell patterns of abalone with homogenous color (a), discoloration in one part of the shell (b) and stripes in at least 1/3 of the shell (c)

2.7. Statistical analysis

The behavioural, physiological, survival and growth measured at 3 years of age were analysed by a linear mixed effects analysis using the lmerTest package (Bates et al. 2012) of the R program (R Core Team, 2012) and using the methodology described by Winter (2013). Differences of least squares means and the Satterthwaite's approximation to degrees of freedom were calculated using the 'diffsmeans' function.

The model included the factors treatment (wild, selected or randomly selected) and spawning (1 to 4) as fixed effects, and cage (1 to 11) as a random factor. For the growth data in the nursery, the model included the treatment (wild, selected or randomly selected) and spawning (1 to 4) as fixed effects, and tank (1 to 12) as a random factor. Because spawning effect was never significant, it has not been presented in the results.

When assumptions of homogeneity of variance and normal distribution of the residuals were not verified, a $\log(x + 1)$, $\text{inverse}(x)$, or square root transformation was used before carrying out the analysis. If the conditions were not satisfied by the transformed data, a Kruskal-Wallis test was performed. A Chi-square test was used for the analysis of frequency data. All data are presented as least square means (lsmean) \pm standard errors (SE) except when otherwise stated.

Results

3.1. Behavioural measurements

3.1.1. Righting test

No differences in mean righting latency ($F = 2.28$, $P > 0.05$) nor in the number of attempts to turn over ($H = 3.99$, $df = 2$, $P > 0.05$) were observed between the offspring born from wild, weight- selected and randomly selected broodstock (Table 1).

3.1.2. Hiding test

An effect of the broodstock origin was observed on the latency of the first movement ($F = 4.02$, $P < 0.05$) and the latency to reach the hiding place ($H = 6.53$, $df = 2$, $P < 0.05$) but not for the latency before becoming fully hidden ($H = 4.04$, $df = 2$, $P > 0.05$). Offspring from selected broodstock took longer before the first movement and longer to reach the hiding place compared to the offspring born from wild broodstock ($p < 0.05$). Offspring from randomly selected broodstock had intermediate latencies (Table 1).

3.1.3. Predator test

No effects of broodstock origin were observed on the latency of the first movement ($F = 2.58$, $P > 0.05$), the time spent moving ($F = 0.04$, $P > 0.05$) or the number of squares crossed ($F = 0.10$, $P > 0.05$). However, a broodstock effect was observed for the numbers of mucus release ($F = 4.10$, $P < 0.05$): offspring born from wild broodstock released mucus more often compared to selected ($P < 0.05$) and randomly selected ($P < 0.05$) abalone. In addition, a trend for a broodstock origin was observed for the numbers of abalone in each treatment that performed the 4 escape behaviours ($H = 5.20$, $df = 2$, $P < 0.10$): more offspring from the wild broodstock origin performed the complete behavioural anti-predation sequences compared to offspring from the selected broodstock origin ($p < 0.05$), while randomly selected abalone were intermediate but not different (Table 1).

Table 1 : Behavioural responses during a righting test of offspring born from 3 different broodstock origins (wild, farmed selected on weight and farmed randomly selected broodstock, n = 19 abalone minimum per treatment) (Mixed model except otherwise stated, Lsmean \pm s.e.m)

Parental origin :	Wild	Selected on weight	Randomly selected	Origin effect	
				F/H/χ^2	P
Righting test					
Number of attempt to return δ	2.4 \pm 0.46	1.6 \pm 0.44	1.2 \pm 0.48	3.99	NS
Righting latency (s) α	63.3 \pm 6.79	54.4 \pm 6.66	42.8 \pm 7.13	2.28	NS
Hiding test					
Latency of the first movement (s) α	30 ^a \pm 5.0	48 ^b \pm 5.0	39 ^{ab} \pm 6.1	4.02	*
Latency to reach the hiding place (s) δ	60 ^a \pm 28.3	132 ^b \pm 28.5	79 ^{ab} \pm 35.0	6.53	*
Latency before complete hiding (s) δ	242 \pm 58.6	231 \pm 59.2	94 \pm 72.4	4.04	NS
Predator test					
Latency of the first movement (s)	11.8 \pm 2.29	14.3 \pm 2.31	14.9 \pm 2.50	2.58	NS
Time spent moving (sec)	198 \pm 12.2	193 \pm 12.3	194 \pm 13.3	0.04	NS
Number of squares crossed	12.6 \pm 0.98	12.0 \pm 0.99	12.5 \pm 1.07	0.10	NS
Number of mucus release	2.2 ^a \pm 0.26	1.5 ^b \pm 0.26	1.4 ^b \pm 0.28	4.10	*
Number of abalone that performed the 4 escape behaviours χ	12 out of 21 ^a	5 out of 21 ^b	6 out of 18 ^{ab}	5.20	\circ

α log transformation, δ Kruskal Wallis test, χ Chi-square test

3.1.4. Circadian and feed intake

No effects of broodstock origin were observed on the circadian rhythm during the night and day periods (Table 2), nor for the quantity of algae ingested per gram of abalone during the one month of the experiment ($H = 1.48$, $df = 2$, $P > 0.05$) (Table 2).

Table 2: Circadian rhythm observed during 48-hours and feed intake observed during 1-month of offspring born from 3 different broodstock origins (wild, farmed selected on weight and farmed randomly selected, n = 11 aquaria per treatment, with 3 abalone in each) (Mixed model except otherwise stated, Lsmean \pm s.e.m)

Parental origin: -	Wild	Selected on weight	Randomly selected	Origin effect F / χ^2	P
Day period					
Percentage of time hiding (%) δ	99.9 \pm 2.09	96.3 \pm 1.94	99.7 \pm 2.09	1.06	NS
Percentage of time immobile in open zone (%) δ	0.3 \pm 2.04	3.2 \pm 1.89	0.03 \pm 2.04	1.27	NS
Night period					
Percentage of time hiding (%)	56.1 \pm 6.46	48.3 \pm 6.02	54.4 \pm 6.46	0.53	NS
Percentage of time immobile in open zone (%) δ	6.7 \pm 2.36	6.9 \pm 2.19	4.3 \pm 2.36	1.05	NS
Percentage of time eating (%) α	18.1 \pm 3.43	21.1 \pm 3.19	19.8 \pm 3.43	0.26	NS
Percentage of time moving (%)	18.9 \pm 2.92	23.6 \pm 2.72	21.6 \pm 2.92	0.94	NS
Feed intake during 4 weeks					
Quantity of algae ingested per gram of abalone (g wet algae.g ⁻¹ abalone.month ⁻¹) δ	0.67 \pm 0.064	0.80 \pm 0.067	0.80 \pm 0.064	1.48	NS

α Square root transformation, δ Kruskal Wallis test

2. Immune function

No effects of broodstock origin were found on phagocytosis efficiency ($F = 0.17$, $P > 0.05$), number of beads engulfed per cell ($H = 0.59$, $df = 2$, $P > 0.05$) or total haemocyte count ($F = 0.93$, $P > 0.05$) (Table 3).

Table 3: Immunity parameters after shaking and air exposure stress in offspring born from 3 different broodstock origins (wild, farmed selected on weight and farmed randomly selected, n = 16 abalone minimum per treatment) (Mixed model except otherwise stated, LSmean \pm s.e.m)

Parental origin :	Wild	Selected on weight	Randomly selected	Origin effect F / H	P
Phagocytosis efficiency (%)	13.3 \pm 1.15	14.2 \pm 1.21	14.3 \pm 1.56	0.17	NS
Number of beads engulfed per cell δ	5.3 \pm 0.16	5.2 \pm 0.15	5.3 \pm 0.18	0.59	NS
Total haemocyte count (cell / μ l)	3396 \pm 800.6	3611 \pm 886.0	1861 \pm 1152.9	0.93	NS

δ Kruskal Wallis test

3.2. Reproduction, growth and survival

3.2.1. Length and weight at 10 months and 16 months of age

At 10 and 16 months, no effects of broodstock origin were observed on length ($F = 3.24$, $P > 0.05$ at 10 months; $F = 0.01$, $P > 0.05$ at 16 months) and weight ($H = 3.2$, $df = 2$, $P > 0.05$ at 10 months of age; $F = 0.08$, $P > 0.05$ at 16 months) (Table 4).

3.2.2. Length, weight and survival at 34 months of age

No effects of broodstock origin were observed on length ($F = 0.04$, $P > 0.05$) and weight ($F = 0.10$, $P > 0.05$) at 34 months of age. In addition, no difference in survival rate was observed during the sea-rearing period ($F = 0.92$, $P > 0.05$) (Table 4). For the dissection data, no effects of broodstock origin were observed on the muscle, gonad or shell index (respectively, $F = 0.45$, $P > 0.05$; $H = 0.33$, $df = 2$, $P > 0.05$; $F = 1.81$, $P > 0.05$). A treatment effect was observed on the digestive system index ($F = 6.00$, $P < 0.01$): offspring born from wild broodstock had a higher digestive system index than those from broodstock selected on weight ($t = -3.26$, $P < 0.01$) and randomly selected broodstock ($t = -2.80$, $P < 0.01$) (Table 4).

Table 4: Length, weight and survival at 10, 16 and 34 months of age of offspring born from 3 different broodstock origins (wild, farmed selected on weight and farmed randomly selected., $n = 300$ abalone per treatment at 10 months, $n = 264$ abalone per treatment minimum at 16 months, $n = 63$ minimum per treatment for length and weight at 34 months, $n = 49$ minimum per treatment for dissection measures at 34 months of age.) (Mixed model except otherwise stated, Lsmean \pm s.e.m)

Parental origin	Wild	Selected	Randomly selected	Origin effect	
				F	P
10 months					
Length (mm) ^α	10.2 \pm 0.42	9.05 \pm 0.42	10.4 \pm 0.42	3.24	NS
Weight (g) ^δ	0.17 \pm 0.024	0.14 \pm 0.024	0.19 \pm 0.024	3.20	NS
16 months					
Length (mm)	24.2 \pm 0.94	24.3 \pm 0.94	24.3 \pm 0.95	0.01	NS
Weight (g) ^α	1.71 \pm 0.190	1.72 \pm 0.190	1.79 \pm 0.191	0.08	NS
34 months					
Length (mm)	60.5 \pm 1.00	60.3 \pm 0.93	60.5 \pm 1.02	0.04	NS
Weight (g)	28.3 \pm 1.45	28.6 \pm 1.34	28.8 \pm 1.47	0.10	NS
Survival rate (%)	80.7 \pm 4.62	83.6 \pm 4.62	75.0 \pm 4.62	0.92	NS
Muscle index (%) ^β	35.0 \pm 0.34	39.9 \pm 0.30	34.6 \pm 0.37	0.45	NS
Gonad index (%) ^δ	9.5 \pm 0.45	9.5 \pm 0.40	9.5 \pm 0.48	0.33	NS
Digestive system index (%) ^α	6.2 \pm 0.19 ^a	5.3 \pm 0.17 ^b	5.4 \pm 0.20 ^b	6.00	**
Shell index (%) ^β	25.6 \pm 0.47	26.4 \pm 0.42	26.4 \pm 0.49	1.81	NS

^α Square root transformation, ^β Inverse transformation, ^δ Kruskal-Wallis test

3.2.3. Shell color

A broodstock origin effect was found on shell pattern ($\chi^2= 10.8, P < 0.05$), and a trend on shell color ($\chi^2= 5.0, P < 0.10$) (Table 5). Offspring born from wild origin parents had less stripes and more homogenous shell color compared to offspring born from broodstock selected on weight ($P \leq 0.01$) and compared to randomly selected broodstock ($P < 0.05$) (respectively, 36.7% vs 63.5% vs 62.0% of the shells with stripes). For the shell color, more offspring born from wild origin parents had a brown-green shell color compared to broodstock selected on weight ($P < 0.05$) and more randomly selected broodstock tended to be this color ($P < 0.10$) (respectively, 79.6 % vs 60.3 % vs 64.0% of the shells with dark brown –green color).

Table 5: shell pattern and shell color of offspring born from 3 different broodstock origins (wild, farmed selected on weight and randomly selected farmed, n = 49 abalone minimum per treatment) (Chi-square test)

Parental origin	Wild	Selected	Randomly selected	Origin effect χ^2	P
Shell pattern					
Homogenous color	22	13	12	10.8	*
Discoloration	9	10	7		
Stripes	18	40	31		
Shell color					
Dark brown - green	39	38	32	5.0	°
Orange-red	10	25	18		

Discussion

The aim of the experiment was to understand the consequences of the domestication process and genetic selection on the growth, behaviour and physiological responses of the offspring. While no effect of broodstock origin was observed on growth, offspring from the broodstock selected on weight showed an alteration of hiding behaviour and responses to a predator, both in quantitative terms but also in the qualitative nature of the responses. Effects were less marked for offspring from the randomly selected broodstock, but were still present.

Abalone born from broodstock selected on weight and randomly selected broodstock emitted mucus less frequently on contact with a predator compared to abalone born from wild broodstock. In addition, fewer offspring from parents selected on weight completed the full escape behaviour scheme (the protective swivelling movement of the shell, the mucus release, the turn-around and finally the movement directly away from the predator), showing a reduction in terms of effective escape compared to abalone from wild parents. The sequences of these subunits are stereotyped and depend on the predator type (Bullock 1953). For example, if abalones are in contact with foreign objects other than starfish tube feet, they will clamp down rather than twist and move away. If the subunits of the escape response to starfish are expressed in the wrong order or context, they appear to be less efficient (Parsons and Macmillan 1979). In addition, a reduction of the number of mucus ejections was observed in the abalone born from the weight-selected and randomly selected farm parents. Mucus has been described as an acid-secretion on the skin of naked marine gastropods that defends them against fish (Thompson 1960) and from mantle of limpets using acid mucus to repel starfish competitors (Branch and Branch 1980). However, no repulsion responses have been observed in the starfish exposed to *H. tuberculata lamellosa* (Bancalà 2009) or from the cloud of mucus through the holes in the shell in *H. rubra* (Day *et al.* 1995). Mucus is thought to be associated with an interference mechanism with starfish's olfactory system to obscure the abalone's escape direction. Several hypotheses can explain the in lower quantity of mucus released, perhaps due to a reduction in the production of mucus glands or to an increased stimulation threshold required to trigger mucus releases in offspring of selected broodstock as compared to offspring of wild origin.

Most of the *Haliotis spp* are photophobic species. They stay in dark places, under boulders or in crevices, and will move only during nighttime to collect food (Momma and Sato 1969, 1970; Shepherd 1973). This strong photonegative behaviour is likely a way to avoid predators, and

was observed in our experiment, with abalone spending at least 96% of their time hiding during the daytime. However, when exposed to an illuminated place during the hiding test, abalone born from selected broodstock and randomly selected broodstock took longer to make the first movement and to reach the hiding place compared to offspring born from wild abalone. Several hypotheses can explain this result. Abalone perceive light via their retinas (Tasaki and Tsukahara 1971). A longer latency before moving could result from a structural change in the photoreceptive cells of the retina (Kataoka and Yamamoto 1981). However, these effects of selection have not been reported in other domesticated animals. Another hypothesis could be a lower energy level in offspring from the weight-selected broodstock compared to offspring from wild abalone. Two other results from the experiment allow us to refute this hypothesis: abalone from weight-selected parents ingested the same quantity of algae per gram of abalone as the other ones during the one-month circadian rhythm measurements, and no differences were observed during the righting test, which is a good indirect indicator of metabolic and energetic status (Baldwin et al. 2007) as well as abalone survival (Lachambre et al. 2017). The third hypothesis and probably the most plausible is a change in the stimulus threshold required to trigger a response to a dangerous situation (i.e. being exposed in the light to predator). An increase in response thresholds above normal levels of stimulation is often reported in domesticated animals (Price 1984), with a reduced sensitivity and increased adaptability to environmental changes. As for response to predators, abalone sensitivity may be reduced as a consequence of selection on weight.

Three types of activity have been described for abalone in the literature: the “homing type”, the “moving type” and the “staying type” (Momma and Sato 1969). The abalone movement at night is mainly linked to their foraging behaviour. Because abalone were selected on growth, an expected side effect might be an increased foraging activity of the progeny compared to abalone born from wild broodstock, but this was not the case in our experiment. No feeding differences were observed between the progeny of the 3 origins, and also no circadian rhythm difference. In contrast, faster feeding was reported in domesticated fish after 30 years of domestication as compared to fish collected in the wild (Yamamoto and Reinhardt 2003). Huntingford (2004) also reported a modification of food preferences and feeding efficiency in fish. No change of circadian rhythm has been reported in the literature as a direct effect of domestication. As most captive animals are dependent on humans to provide appropriate diets on a daily and seasonal basis, the major differentiation is the provision of food at a single location that led to a reduction

of the time and energy spent in feeding relative to what is experienced by their wild counterparts either in fish or in terrestrial domesticated animals (Price 1999).

More offspring from weight-selected broodstock had an orange colored and striped shell compared to offspring from wild broodstock and randomly selected broodstock, which had a more homogenous and brown - greenish color. Shell color is affected by abalone diet (Marchais et al. 2017). However, in our case, for most of the rearing period, the abalone received a monospecific type of algae, depending on the season. No feeding choice was possible in the cages. The color differentiation observed thus had a genetic origin. Another study, on *H. discus hannai*, highlighted this genetic control, and reported a new variant with orange shell coloration, distinguishable from the wild green-shelled abalone (Liu et al. 2009). This variability of external morphological characteristics has often been reported during the domestication process, with an alteration of fur and plumage colors, and with an increased frequency of white and spotted color morphs (Jensen 2006). The changes may develop rapidly in only few generations. The most famous example is the work of the Belyaev team, who selected silver foxes on fearfulness towards humans. These foxes rapidly developed changes in fur color such as piebaldness (Belyaev 1979). In the case of the Belyaev experiment, these morphological modifications were co-selected traits with tameness. In our experiment, even though the relaxed selection that accompanies the transition from field to captive environments might explain some the variation, another hypothesis should be considered. Abalone were selected on weight but an unintentional or unconscious selection for shells with a brighter color and nicer looking pattern cannot be excluded. Personal preferences often influence the selection of breeding stock, and these biases may be very subtle and most of the time unconscious (Price 1999). In addition, the fact that shell color is one of the most heritable traits (Lachambre, in prep.) supports the rapid changes of color observed between generations. However, this modification of the shell color and pattern would probably impair selective advantages in camouflage and predator avoidance of the wild color and pattern, which highlights how important it is to control possible unconscious selection if animals are produced for ranching or a stock enhancement program (Hansen and Gosselin 2013).

One of the major hypotheses of this experiment was that offspring from selected broodstock should be heavier than offspring of wild and randomly selected broodstock. No weight or size differences were observed at 10, 16 and 34 months. Numerous studies have shown that growth is an heritable trait in *Haliotis* spp (Brokordt et al. 2015; Camara and Symonds 2014; Lucas et al. 2006; Robinson et al. 2013; Roussel et al. 2013), even if the estimation of heritability varies

widely among species and for the same species. However, even if growth in weight is a heritable trait, improved growth of the F1 generation is not always observed. A reduced or a lack of a selective effect on growth rate in the F1 generation has often been reported in selected species, with selection responses being identified only after two generations of domestication (Falconer and Mackay 1996). The phenotype variability is the physical expression of what a particular gene or set of genes (the genotype) will produce under particular environmental conditions (Elliott 2000). The survival of early juvenile abalone as well as the quality of the algae and diatoms used for juvenile feeding are difficult to control, especially after settlement of the larvae, because every procedure during this fragile period might induce high mortality (Daume et al. 2004). Temperature, light exposure, handling and predation were similar between the treatments, as well as food quality at settlement, and density and food quality after the age of 10 months. But the possibly cannot be excluded that variability of density and food during the first 10-months of development might have compromised the expression of the genetic potential in terms of growth in the offspring of weight-selected broodstock. The smaller digestive system observed in the adults born from the selected broodstock may partly confirm this hypothesis, and may indicate food deprivation during early development. Some studies have shown in abalone that the type of food ingested during the early juvenile stage may modify enzyme activity, even though no effect was reported on the morphological development of the digestive system at the age of 5 months (Johnston et al. 2005). However, little is known in marine animals about the mechanisms affecting the ontogeny of digestive physiology (Ronnestad et al. 2013). A study of broiler chickens reported an effect of type of food during the first 7 days of age on the morphology and size of the digestive system at a later age (Tremarin and Sakamoto 2017), but even in terrestrial animals, studies are scarce. Further studies need to be performed to better understand the role of early environment on the development of morphological, physiological and behavioural traits at adult age in abalone.

According to Price (1997), domestication is based on three processes. First, there is an intensified selection of traits preferred by humans. Second, the transition from the wild to a captive environment can be expected to be accompanied by relaxed natural selection such as predation and starvation. The third domestication process described by Price (1987) is inadvertent selection under captivity, which can lead to adaptation. Another mechanism that needs to be controlled to better understand the domestication process is the importance of maternal effects (Conover 1998). In mollusks, maternal effects have been shown on survival and growth of juveniles, and growth at the adult age in scallops (Wang and Cote 2012).

Maternal variability was also reported in egg diameter of abalone, with probably some consequences in term of abalone development (Huchette et al. 2004). In other terrestrial animals, several experiments have shown that stressors such as feed-restriction or fear experienced during gestation can modify the behaviour of the offspring (Laporte-Broux et al. 2011; Roussel et al. 2005; Roussel et al. 2008). More recently, epigenetic mechanisms have been highlighted corresponding to the control of gene expression during development on physiology and metabolism (Symonds et al. 2009) as well as on behaviour regulation (Jensen 2015; Lester et al. 2011). During our experiment, this maternal effect was at least controlled, because broodstock were conditioned in similar condition for approximately 4-5 months, with similar food, temperature and light control, and a minimum of handling. However, because a difference in stress response has been shown in wild abalone compared to farmed abalone (Lachambre et al. Accepted; Lachambre et al. 2017), the impact of the stress during egg preparation cannot be completely excluded.

While domestication of terrestrial animals probably results from selection of tame and non-aggressive animals, domestication of marine animals is recent and based mainly on growth or meat yield (Lorenzen et al. 2012). Numerous studies have shown that the domestication process, even if based on growth selection in marine animals, modified behavioural traits such as responses to predators, responses to novelty, and aggressivity (Huntingford and Adams 2005). Behaviour as well as other traits such as physiology and growth are probably polygenic and would show a quantitative inheritance pattern (Jensen 2006), even for molluscs. For example, a significant heritability ($h^2 = 0.2 - 0.8$) has been shown for antipredator behaviour in squid (Sinn et al. 2006) and scallop ($h^2 = 0.36 - 0.57$) (Brokordt et al. 2012). Foraging behaviour heritability had less additive genetic value and greater residual ($h^2 = 0.05 - 0.08$) in squid. In abalone, heritability of distance travelled after a stress has also been shown to have a significant but a very weak heritability ($h^2 = 0.05$) (Robinson et al. 2013). Quantitative traits locus analysis (QTL-analysis) development allowed a better understanding of the association between the control of polygenic traits and specific chromosomal areas. Experiments performed on poultry have demonstrated that a large proportion of the difference in growth rate between the jungle fowl (the ancestor of all domestic chickens) and the white leghorn was explained by a limited number of QTLs (Kerje et al. 2003). These QTLs were located on a chromosome associated with egg production and also different aspects of behaviour such as tonic immobility and fear-related behaviour (Jensen 2006). Pleiotropic QTLs like the ones in chickens may be one of the

mechanisms that rapidly lead to domestication changes in marine animals (Lorenzen et al. 2012).

Certain important behaviours for survival in nature (i.e. food finding, predator avoidance, hiding behaviour...) lose their adaptive significance in captivity. For example, after a 6-generation selection process, farmed Atlantic salmon juveniles left cover sooner after a simulated predator test compared to juveniles from wild parents (Einum and Fleming 1997). In addition, farm salmon showed a reduced flight reaction to the first aerial predation threat compared with wild fish when exposed to simulated heron attacks (Johnsson et al. 2001). Differences were also found between Masu salmon resulting from 30 years of the farming and selection process, Masu salmon collected in the wild and sea-ranched Masu salmon: farmed fish emerged from shelter faster than offspring of wild fish after exposure to predator fish odour and Masu salmon body homogenate (Yamamoto and Reinhardt 2003). The abalone offspring from the selected, randomly selected and wild broodstock were bred in similar environments, and were not submitted to any predator pressure. In comparison to fish experiments, the reduction of the response to predation and hiding behaviour was very fast, after only one generation of growth selection.

Inadvertent selection under captivity can lead to adaptation of captive animals to farm conditions. It can be due to several factors during abalone farming: the metamorphosis stage where fast developing larvae are favoured as observed in *Crassostrea gigas* (Taris et al. 2007), the selection of abalone that cope with high-density (Travers et al. 2010) and handling during grading practices (Hooper et al. 2011). The list may be long. These farm rearing conditions imply that even progeny from wild parents, studied at 3 years of age, were already submitted at least partly to inadvertent selection. The selection processes during captive rearing probably explain an important part of the differences observed between the farmed abalone and wild *H. tuberculata* where abalone from farm origin showed a reduced retraction in reaction to finger contact and quicker immune recovery after a stress compared to wild abalone (Lachambre et al. Accepted) and spent less time moving at night (Lachambre et al. 2017) compared to farmed abalone. In the field, similar results were observed with ouplanted hatchery-reared abalone showing less response to nearby movement and to physical contact with an inert probe than wild abalone (Hansen and Gosselin 2016). In addition to selection of abalone able to survive to farm stressors, acclimation to farm stressors may explain those differences. Even if it has never being demonstrated in abalone, these species have probably learning skills allowing them to adapt to their environment as observed in fish (Sehgal et al. 2013). In contrast to these

experiments, the progeny were bred in the same environment and were submitted to very similar conditions during our experiment. Thus inadvertent selection and behavioural acclimation was probably very similar. The effects observed for the progeny from the random selected broodstock might probably result from the inadvertent selection mechanism for their broodstock, even if further studies are needed to evaluate it.

Conclusion

Domestication is a complex process with several mechanisms implicated in the transition from wild to farmed animals. Marine animals that produce very large numbers of offspring and may have phenotypic plasticity to allow for different environments encountered by settling larvae, may show many rapid changes. It is difficult to untangle the effect of the environment from the genetics. By controlling the environment during parental conditioning and by placing the offspring in a very similar environment, the genetic effects of domestication were studied here. The offspring from this study were at different levels of domestication (Teletchea and Fontaine 2014). The offspring born from wild broodstock spent their entire life cycle in captivity, where natural selection was absent (relaxed selection), and inadvertent selection due to the farm environment was probably significant. This group probably represents the first step of domestication process. The offspring born from randomly selected farmed broodstock (resulting from a wild and farmed broodstock) showed some differences from the offspring of the wild broodstock in terms of shell pattern and color, resulting probably from unconscious selection. Small differences in terms of responses to a predator were also found, showing that these traits may be changed in less than 2 generations in a farming context. While no effects of selection were detected on offspring length and weight, modifications of the responses to a predator, of hiding behaviour and of shell color and pattern were observed, either in quantity or in quality. These results indicate that conscious selection can modify the behaviour and appearance of abalone undergoing a domestication process in only one generation. The degree of domestication of farm animals is likely to affect their fitness in the context of ranching or stock-enhancement operations.

Acknowledgements

The authors would like to thank the team of France Haliotis, Xavier Lesage, Frederic Laurans, Mickael Gleeson, Iain McKensy, and Maryvonne Leroux for the provision and care of the animals, and assistance during the experiment. This work was conducted in the context of a PhD partially funded by France Haliotis and ANRT (CIFRE N° 2014 0643). This work benefited from the support of the European Union (FEAMP) via the program 42 of the FEAMP “innovation in aquaculture” through the “GenOrmeau” project.

References

- Baldwin, J., Elias, J. P., Wells, R. M. G. & Donovan, D. A. 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne: Comparisons with temperate abalone species. *Journal of Experimental Marine Biological Ecology*, 342, 213-225.
- Bancalà, F. 2009. Function of mucus secretion by lamellose ormer, *Haliotis tuberculata lamellosa*, in response to starfish predation. *Animal Behaviour*, 78, 1189-1194.
- Bates, D. M., Maechler, M. & Bolker, B. 2012. Lme4 : Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-0.
- Belyaev, D. K. 1979. Destabilizing selection as a factor in domestication. *Journal of Heredity*, 70, 301-308.
- Branch, G. M. & Branch, M. L. 1980. Competition between *Cellana tramoserica* (Sowerby) (Gastropoda) and *Patiriella exigua* (Lamarck) (Asteroidea), and their influence on algal standing stocks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 48, 35-49.
- Brokordt, K., Farias, W., Lhorente, J. P. & Winkler, F. 2012. Heritability and genetic correlations of escape behaviours in juvenile scallop *Argopecten purpuratus*. *Animal Behaviour*, 84, 479-484.
- Brokordt, K. B., Winkler, F. M., Farias, W. J., González, R. C., Castaño, F., Fullsack, P. & Herbinger, C. M. 2015. Changes of heritability and genetic correlations in production traits over time in red abalone (*Haliotis rufescens*) under culture. *Aquaculture Research*, 46, 2248-2259.
- Bullock, R. H. 1953. Predator recognition and escape responses of some intertidal gastropods in presence of starfish. *Behaviour*, 5, 130-140.
- Camara, M. D. & Symonds, J. E. 2014. Genetic improvement of New Zealand aquaculture species: programmes, progress and prospects. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48, 466-491.

- Cardinaud Marion. Etude multi-factoriel de la vibriose chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* : bases génomiques et physiologiques de la survie aux mortalités estivales. Zoologie des invertébrés. Université de Bretagne Occidentale Brest 2013, 253 pp.
- Clavier, J. & Chardy, P. 1989. Investigation into the ecology of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.), factors influencing spatial distribution. *Aquatic Living Resources*, 2, 191-197.
- Conover, D. O. 1998. Local adaptation in marine fishes: Evidence and implications for stock enhancement. *Bulletin of Marine Science*, 62, 477-493.
- Cox, K. W. 1962. Review of the abalone of California. *Fish Bulletin*, 188, 1-133.
- Daume, S., Huchette, S., Ryan, S. & Day, R. W. 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. *Aquaculture*, 236, 221-239.
- Day, R., Dowell, A., Sant, G., Klemke, J. & Shaw, C. 1995. Patchy predation: Foraging behaviour of *Coscinasterias calamaria* and escape responses of *Haliotis rubra*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 26, 11-33.
- de Vicose, G. C., Viera, M. P., Huchette, S. & Izquierdo, M. S. 2012. Improving nursery performances of *Haliotis tuberculata coccinea*: Nutritional value of four species of benthic diatoms and green macroalgae germlings. *Aquaculture*, 334, 124-131.
- Einum, S. & Fleming, I. A. 1997. Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 50, 634-651.
- Elliott, N. G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Research*, 31, 51-59.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996. *Introduction to quantitative genetics. 4th edition*: Longman, London, UK.
- Geiger, D. L. 2000. Distribution and biogeography of the Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda) world-wide. *Bollettino malacologico*, 35, 57-120.
- Gjedrem, T. 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture*, 344, 12-22.
- Griffiths, A. M. & Gosselin, L. A. 2008. Ontogenetic shift in susceptibility to predators in juvenile northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360, 85-93.
- Hansen, S. C. & Gosselin, L. A. 2013. Do predators, handling stress or field acclimation periods influence the survivorship of hatchery-reared abalone *Haliotis kamtschatkana* outplanted into natural habitats? *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, 23, 246-253.

- Hansen, S. C. & Gosselin, L. A. 2016. Are hatchery-reared abalone naive of predators? Comparing the behaviours of wild and hatchery-reared northern abalone, *Haliotis kamtschatkana* (Jonas, 1845). *Aquaculture Research*, 47, 1727-1736.
- Hines, A. H., and Pearse, J. S. 1982. Abalones, shells, and sea otters: dynamics of prey populations in Central California. *Ecology*, 63, 1547-1560.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K. & Handler, J. 2011. Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture*, 315, 348-354.
- Huchette, S. M. H., Soulard, J. P., Koh, C. S. & Day, R. W. 2004. Maternal variability in the blacklip abalone, *Haliotis rubra* leach (Mollusca : Gastropoda): effect of egg size on fertilisation success. *Aquaculture*, 231, 181-195.
- Huntingford, F. & Adams, C. 2005. Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 142, 1207-1221.
- Huntingford, F. A. 2004. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology*, 65, 122-142.
- Jensen, P. 2006. Domestication - From behaviour to genes and back again. *Applied Animal Behaviour Science*, 97, 3-15.
- Jensen, P. 2015. Adding 'epi-' to behaviour genetics: implications for animal domestication. *Journal of Experimental Biology*, 218, 32-40.
- Johnsson, J. I., Hojesjo, J. & Fleming, I. A. 2001. Behavioural and heart rate responses to predation risk in wild and domesticated Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, 788-794.
- Johnston, D., Moltschanivskyj, N. & Wells, J. 2005. Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets. *Aquaculture*, 250, 341-355.
- Kataoka, S. & Yamamoto, T. Y. 1981. Diurnal changes in the fine-structure of photoreceptors in an abalone, *norditis-discus*. *Cell and Tissue Research*, 218, 181-189.
- Kerje, S., Carlborg, O., Jacobsson, L., Schutz, K., Hartmann, C., Jensen, P. & Andersson, L. 2003. The twofold difference in adult size between the red junglefowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. *Animal Genetics*, 34, 264-274.
- Lachambre, S., Day, R., Boudry, P., Huchette, S., Rio-Cabello, A., Fustec, T. & Roussel, S. Accepted. Differential behavioural and immunological responses after stress for wild and farmed European abalone, correlation of some responses with survival and growth. *Applied Animal Behaviour Science*.

- Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T. & Roussel, S. 2017. Relationships between growth, survival, physiology and behaviour - A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture*, 467, 190-197.
- Laporte-Broux, B., Roussel, S., Ponter, A. A., Perault, J., Chavatte-Palmer, P. & Duvaux-Ponter, C. 2011. Short term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology, metabolism and behavior. *Journal of Animal Science*, 89, 2154-2163.
- Lester, B. M., Tronick, E., Nestler, E., Abel, T., Kosofsky, B., Kuzawa, C. W., Marsit, C. J., Maze, I., Meaney, M. J., Monteggia, L. M., Reul, J., Skuse, D. H., Sweatt, J. D. & Wood, M. A. 2011. Behavioral epigenetics. In: *Annals Meeting Reports* (Ed. by Braaten, D. & Cooney, R. E.), pp. 14-33.
- Liu, X., Wu, F. C., Zhao, H. G., Zhang, G. F. & Guo, X. M. 2009. A novel shell color variant of the pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino subject to genetic control and dietary influence. *Journal of Shellfish Research*, 28, 419-424.
- Lorenzen, K., Beveridge, M. C. M. & Mangel, M. 2012. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biological Reviews*, 87, 639-660.
- Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S. M., Knibb, W. & Degnan, B. M. 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture*, 259, 146-152.
- Marchais, V., Jolivet, A., Herve, S., Roussel, S., Schone, B. R., Grall, J., Chauvaud, L. & Clavier, J. 2017. New tool to elucidate the diet of the ormer *Haliotis tuberculata* (L.): Digital shell color analysis. *Marine Biology*, 164.
- Momma, H. & Sato, R. 1969. The locomotion behavior of the disc abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, and the Siebold's abalone, *Haliotis sieboldi* Reeve, in the fishing grounds. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 20, 150-157.
- Momma, H. & Sato, R. 1970. The locomotion behavior of the disc abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in a tank. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 21, 20-25.
- Parsons, D. W. & Macmillan, D. L. 1979. Escape response of abalone (Mollusca, Prosobranchia, Haliotidae) to predatory gastropods. *Marine Behaviour and Physiology*, 6, 65-82.
- Poore, G. C. B. 1972. Ecology of New Zealand abalones, *Haliotis* species (Mollusca: Gastropoda). 2. Seasonal and diurnal movements. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 6, 246-258.
- Price, E. O. 1984. Behavioural aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology*, 59, 1-32.

- Price, E. O. 1999. Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science*, 65, 245-271.
- Rhode, C., Hepple, J. A., Jansen, S., Davis, T., Vervalle, J., Bester-van der Merwe, A. E. & Roodt-Wilding, R. 2012. A population genetic analysis of abalone domestication events in South Africa: Implications for the management of the abalone resource. *Aquaculture*, 356, 235-242.
- Robinson, N., Li, X. X. & Hayes, B. 2010. Testing options for the commercialization of abalone selective breeding using bioeconomic simulation modelling. *Aquaculture Research*, 41, 268-288.
- Robinson, N., Smith, B., Cooke, I. & Strugnell, J. 2013. A snail's pace: A preliminary analysis of the effects of stress and genetics on movement of *Haliotis*. *Aquaculture*, 376, 25-35.
- Ronnestad, I., Yufera, M., Ueberschar, B., Ribeiro, L., Saele, O. & Boglione, C. 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture*, 5, S59-S98.
- Roussel, S., Boissy, A., Montigny, D., Hemsworth, P. H. & Duvaux-Ponter, C. 2005. Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Hormones and Behavior*, 47, 256-266.
- Roussel, S., Hemsworth, P. H., Boissy, A. & Duvaux-Ponter, C. 2008. Repeated transport and isolation during pregnancy in ewes: Differential effects on emotional reactivity and weight of their offspring. *Applied Animal Behaviour Science*, 109, 275-291.
- Roussel, V., Charreyron, J., Labarre, S., Van Wormhoudt, A. & S., H. 2013. First steps on technological and genetic improvement of European abalone (*Haliotis tuberculata*) based on investigations in full-sib families. *Open Journal of Genetics*, 3, 224-233.
- Sehgal, M., Song, C., Ehlers, V. L. & Moyer, J. R., Jr. 2013. Learning to learn - Intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 186-199.
- Shepherd, S. A. 1973. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). I. Ecology of five sympatric species. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 24, 217-257.
- Sinn, D. L., Apiolaza, L. A. & Moltshaniwskyj, N. A. 2006. Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1437-1447.
- Symonds, M. E., Sebert, S. P., Hyatt, M. A. & Budge, H. 2009. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 604-610.

- Taris, N., Batista, F. M. & Boudry, P. 2007. Evidence of response to unintentional selection for faster development and inbreeding depression in *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture Ireland*, 272, S69–S79.
- Tasaki, K. & Tsukahara, Y. 1971. Receptor potential and spike activity in molluscan retina. *Vision Research*, 11, 1194.
- Teletchea, F. & Fontaine, P. 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish and Fisheries*, 15, 181-195.
- Thompson, T. E. 1960. Defensive acid-secretion in marine gastropods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 39, 115-122.
- Thorpe, J. E. 2004. Life history responses of fishes to culture. *Journal of Fish Biology*, 65, 263-285.
- Travers, M. A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M. & Paillard, C. 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 800-808.
- Travers, M. A., Meistertzheim, A. L., Cardinaud, M., Friedman, C. S., Huchette, S., Moraga, D. & Paillard, C. 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, 289-297.
- Tremarin, J. & Sakamoto, M. L. 2017. Feeding Programs for Broiler Breeders in the Start Phase. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 125-129.
- Wang, C. D. & Cote, J. 2012. Heterosis and combining abilities in growth and survival in sea scallops along the Atlantic coast of Canada. *Journal of Shellfish Research*, 31, 1145-1149.
- Winter, B. 2013. Linear models and linear mixed effects models in R with linguistic applications. arXiv:1308.5499. [<http://arxiv.org/pdf/1308.5499.pdf>].
- Won, N.-I., Kawamura, T., Takami, H., Noro, T., Musashi, T. & Watanabe, Y. 2010. Ontogenetic changes in the feeding habits of the abalone *Haliotis discus hannai*: field verification by stable isotope analyses. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67, 347-356.
- Wood, A. D. & Buxton, C. D. 1996. Aspects of the biology of the abalone *Haliotis midae* (Linne, 1758) on the east coast of South Africa. 1. Feeding biology. *South African Journal of Marine Science*, 17, 61-68.
- Yamamoto, T. & Reinhardt, U. G. 2003. Dominance and predator avoidance in domesticated and wild masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries Science*, 69, 88-94.

Annexe 2: Conséquence du prélèvement d'épipodes et du marquage de la coquille sur la croissance et la mortalité d'une population d'ormeaux de 2 ans

Introduction

Un des aspects pratiques importants de la mise en place d'un plan de sélection aquacole est le marquage et le prélèvement l'ADN d'individus de manière précoce (Vandeputte et Haffray, 2014). Un marquage permet de recueillir des données individuelles et de conserver la traçabilité d'une origine génétique en cas d'absences de marqueurs génétiques permettant la reconstruction de pédigrée. Une technique classiquement utilisée pour marquer des ormeaux est le collage de morceaux de plastique de quelques millimètres sur la coquille (Brokordt et al., 2014). Il a été montré pour *H. midae* que le prélèvement de mucus et d'épipodes permettait de prélever une quantité d'ADN suffisante pour un génotypage individuel (Slabbert et Roodt-Wilding, 2006). Le prélèvement d'épipodes est actuellement utilisé pour plusieurs espèces (Brokordt et al., 2017; Lucas et al., 2006; Roussel et al., 2010). Cette pratique induit un stress chez *H. laevigata*, une espèce australienne et augmente la distance parcourue par les ormeaux prélevés jusqu'à 24H après le prélèvement (Robinson et al., 2013).

Le chapitre 1 de cette thèse nous a permis de montrer que des manipulations induisent de fortes mortalités et des croissances réduites (Manuscrit 1 et 2). Afin de mieux estimer les effets du marquage et du prélèvement d'ADN effectués lors du génotypage (Manuscrit 3 et 4), **la croissance, la survie et le développement gonadique d'*H. tuberculata* ont été étudiés après avoir soumis les animaux à différentes situations de marquage et de prélèvements d'ADN.** Si l'impact de ces manipulations était trop important, il compromettrait la possibilité de marquage précoce et l'estimation de paramètres génétiques sur des caractères à plusieurs stades de développement de l'ormeau.

Matériels et méthodes

Pour répondre à cette question, 375 animaux d'élevage provenant de la cohorte 2013 ont été prélevés et soumis à un des 5 traitements correspondants à 5 niveaux de manipulation en novembre 2015. Au total, 75 animaux par traitement ont été répartis dans 3 structures de production à raison de 25 ormeaux par unité de production. Les 5 traitements correspondent à des niveaux de manipulations croissantes :

1. Ormeaux témoins (**Control**) (animaux mesurés, exondés pendant 15 minutes mais pas décollés du support)
2. Ormeaux décollés (**Handle**) (animaux décollés avec une spatule, exondés pendant 15 minutes et mesurés)
3. Ormeaux marqués (**Tag**) (animaux décollés avec une spatule, exondés pendant 15 minutes, mesurés, et marqués avec un tip-tag (Hallprint®) à la glue liquide sur la coquille)
4. Ormeaux prélevés (**Sample**) (animaux décollés avec une spatule, exondés pendant 15 minutes, mesurés et prélevés de 2 épipodes à l'aide d'un ciseau de dissection)
5. Ormeaux marqués et prélevés (**Tag Sample**) (animaux décollés avec une spatule, exondés pendant 15 minutes, mesurés, marqués par un collage sur la coquille et prélevés de 2 épipodes)

Après ces manipulations effectuées en laboratoire, les animaux ont été remis en mer pendant 6 mois et soumis à la procédure d'élevage. A l'issue de cette période de croissance, ils ont été ramenés en laboratoire pour être mesurés et pesés. Un indice visuel gonadique a été mesuré en utilisant la grille de notation présentée dans Lachambre et al. (2017). Plusieurs variables ont ainsi été mesurées:

6. La croissance en taille (**G.L**) exprimée en mm.mois
7. La croissance en poids (**G.W**) exprimée en g.mois
8. L'indice de condition (**Ic**) calculé comme le ratio du poids individuel sur la taille au cube
9. L'indice visuel gonadique (**VGI**) réalisé au début du printemps
10. Le % de mortalité observé par cage (**% Morta**)

Un test de Kruskal Wallis a été réalisé pour mesurer l'effet du niveau de manipulation sur ces différentes variables.

Résultats et discussion

Les différents niveaux de manipulations n'ont eu aucun effet sur la mortalité qui était faible pour tous les traitements (entre 5 et 7%) ($p > 0,05$). Ce niveau de mortalité correspond au niveau minimal de mortalité causé par le retour d'une cage à terre.

De même, aucun effet du traitement n'a été constaté sur la croissance en poids. L'ensemble de croissances observées (entre 2,1 et 2,3 mm par mois) correspondent à des croissances très importantes sur une période hivernale (1,1 mm pour les mêmes animaux étudiés dans le chapitre 2 au même moment). Ces croissances ont probablement été permises par les faibles densités pratiquées lors de cette expérimentation. La double manipulation : (marquage et prélèvement) a engendré une croissance en taille plus faible. Les animaux qui ont subi le marquage et le prélèvement ont aussi un indice visuel gonadique plus faible que les animaux du traitement témoin. Cette plus faible maturation pourrait être due à une croissance en taille plus faible ou à une moins grande réserve énergétique au début du printemps. Elle pourrait résulter du stress subi par les animaux de ce traitement. La reproduction serait donc une des premières fonctions à être impactée par des manipulations.

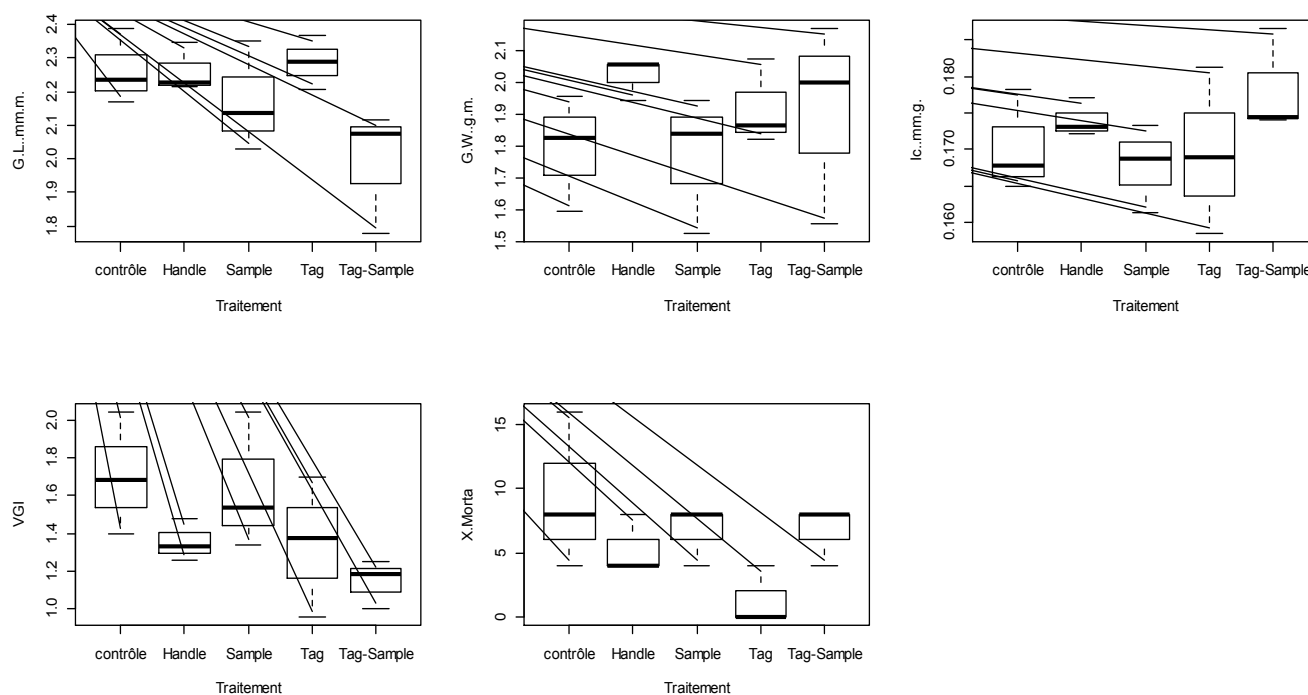


Figure 35 : Blox-plot de la croissance en taille (G.L. mm.m), en poids (G.W. g.m), de l'indice de condition (Ic mm.g), du Indice visuel gonadique (unité), et de % de mortalité (%.Morta) pour les différents niveaux de manipulations testés

Figure 36 : Blox-plot de la croissance en taille (G.L. mm.m), en poids (G.W. g.m), de l'indice de condition (Ic mm.g), du Indice visuel gonadique (unité), et de % de mortalité (%.Morta) pour les différents niveaux de manipulations testés

Bilan

- 1. L'aspect relativement non invasif de la procédure de marquage et du prélèvement d'épipodes a été validé au mois de novembre.**
- 2. Les performances mesurées dans le chapitre 2 ont probablement été peu impactées par le marquage effectué à 25 mois.**
- 3. L'effet réduit de cette double manipulation en novembre sur la croissance en taille et le développement gonadique a permis de montrer que le stress du marquage et du prélèvement d'ADN pourrait être limité à cette époque de l'année. Cependant, l'évitement de cumul avec d'autres agents stressants lors de cette procédure est primordiale (criblage par secouement par exemple).**

Annexe 3 : Recherche d'un prédicteur non invasif du taux de chair et du taux de gonade



Ultra-sound, a promising tool to find non-invasif proxy of foot weight and gonad development of *Haliotis tuberculata* ?

Lachambre S.^{1,2}, Haffray P.³, Bestin A.³, Enez F.³, Huchette S.², Boudry P.⁴, Roussel S.²

¹ LEMAR, UMR 6530 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29200 Plouzané, France
² France Haliotis, 20880 Plougarnec, France
³ Syraaf, Syndicat des Sélectionneurs Arcoles et Aquicoles Français, Rennes, France
⁴ Ifremer, UMR 6530 LEMAR (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), Centre Bretagne, 29200 Plouzané, France

Context

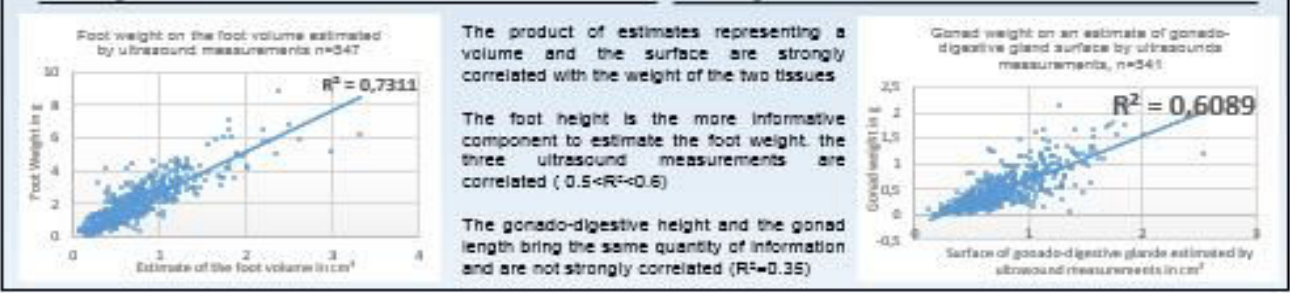
Abalone industry lacks of tools to perform non-invasive measurements of the foot and the gonad weights which are two traits economically important. Ultrasound approach has been used in research in order to access morphology of specific tissues on alive animals. It is currently applied in several breeding programs to select a trait related to meat yield (trout) or meat quality (pork). The aim of this experiment was to assess if ultrasound measurements on mature abalone can estimate their gonad and foot weight.

Material and Methods

- Study performed on 580 mature 3 years old abalone (41 mm) reared in common garden
- 5 measures in 4 ultrasound pictures on the ventral side of anaesthetized abalone
- D1 : foot height (F.Height) D2 : adductor muscles length (Ab.Length)
- D3 : adductor muscle width (Ab.Width) D4 : gonad maximal length (Gon.Length)
- D5 : gonado-digestive gland height (Gon.dig.Height) Estimate Foot Volume = $D1 \times D2 \times D3$
- Dissection to measure the foot and the gonad weight Estimate Gonado-digestive Surface = $D4 \times D5$

Results

	Foot Weight (g)	Ad.Width (mm)	Ad.Length (mm)	F.Height (mm)	Estimate F.Volume in cm ³	*** Slope of the linear regression between Foot Weight and Estimate Foot Volume	Gonad Weight (g)	Gon.Length (mm)	Gon.dig.Height (mm)	Estimate Gon.dig.Surface in cm ²
Mean	2	8.1	10.7	7.8	0.74		0.5	20.8	1.7	0.78
Std.Error	0.06	0.09	0.08	0.07	0.02		0.02	0.21	0.05	0.02
Relative.Std.Error %	03	22	23	21	61		78	27	22	44
R ² linear regression coefficient with the Foot Weight	1	0.48 ***	0.58 ***	0.68 ***	0.73 ***		1	0.46 ***	0.48 ***	0.61 ***



Discussion and conclusion

Ultrasound is promising tool to be used in a selective breeding programs, with a good compromise between precision and the possibility to keep the animal alive for later reproduction. Estimation of the heritability and genetic correlation are in progress. However, these estimates could probably be improved by integrating complementary measures such as the surface of gonadic tissue to measure the gonad surface independently of the digestive gland and the thickness of the mantle to better estimate the foot volume. In addition, it is necessary to verify if these results are consistent at different reproductive stages. This technic could also be used to follow the maturation to follow the dynamic of maturation of an abalone group from the early spring to the summer.

Annexe 4: Lexique

Les définitions des notions abordées dans le cadre de cette thèse ont été classées par thème.

Comportement

Challenge : Contrainte imposée à laquelle l'animal doit faire face.

Comportement : Ensemble des réactions observables adaptatives qu'un organisme généralement doté d'un système nerveux exécute en réponse aux stimuli provenant du milieu dans lequel il vit.

Ethogramme : Liste de patrons comportementaux décrits et définis de manière à pouvoir être utilisés dans une étude.

Ethologie : Science qui étudie le comportement des animaux.

Homéostasie : Processus de régulation par lequel un être vivant maintient constantes les différentes variables de son milieu intérieur.

Personnalité : Différence de réponses comportementales constantes pour des individus placés dans des situations différentes.

Robustesse : Propriété permettant à un animal de s'adapter aux perturbations de son environnement.

Rythme circadien : Cycle de 24H dans les processus biochimiques, physiologiques, ou comportementaux des êtres vivants.

Stress : Réactions neuroendocriniennes non spécifiques en présence d'une situation qui menace l'homéostasie.

Domestication

Domestication : Long processus par lequel une population sauvage devient adaptée aux cours des générations à un environnement anthropisé par la combinaison d'évolutions génétiques et ontogéniques induites par l'environnement d'élevage ou intentionnellement sélectionnées.

Espèces domestiquées : Espèces exploitées par l'homme et dépendantes de son exploitation et du milieu anthropisé dans lequel elle évolue.

Génomique

Allèle : Information variable portée par un gène ou un locus.

Centimorgan cM : Unité de distance entre deux gènes calculée par la probabilité de recombinaison entre 2 marqueurs (1 cM = 1 recombinaison toutes les 100 méioses).

Déséquilibre de liaison : Présence d'un allèle à un locus dépendant de la présence d'un autre allèle à un autre locus.

Gène : Locus portant une information traductible et transmissible.

Génome : Ensemble du matériel génétique d'une espèce.

Génotype : Le génotype est l'ensemble de l'information génétique d'un individu. Le génotype d'un individu est donc la composition allélique de tous les gènes de cet individu.

Haplotype : Combinaison d'allèles à différents locus sur le même brin d'ADN.

Locus : Emplacement précis sur un chromosome qui peut contenir un gène.

Micro-satellite : Séquence d'ADN non codante contenant un enchaînement de nucléotides répétés avec un fort polymorphisme.

Panel SNP : Ensemble de marqueurs SNP utilisés en interaction avec un objectif donné.

Polymorphisme au niveau du locus : Nombre d'allèles d'un locus pour des individus d'une population donnée

Polymorphisme d'une population : Fréquence allélique d'un locus pour une population donnée.

Quantitative Traits Locus QTL : Locus dont la variation allélique impacte de manière détectable la performance des individus sur un caractère.

Sélection génomique : Sélection à partir des allèles portés par les candidats.

Single Nucléotide Polymorphism SNP : Variation sur une séquence d'ADN d'un seul nucléotide pour une population donnée.

Taille de génome : Nombre de paires de base composant le génome d'un individu.

Taux de recombinaison : Probabilité que 2 allèles sur le même brin ne soient pas transmis ensembles.

Zone flanquante : Zone d'une cinquantaine de paires de base qui entourent une séquence d'ADN ou un marqueur.

Génétique Quantitative

BLUP : Best Linear Unbiased Predictor, modèle mixte permettant de traiter simultanément et sans biais les paramètres génétiques en effet aléatoire et les paramètres environnementaux en effets fixes pour estimer par l'intermédiaire d'une matrice d'apparentement les paramètres génétiques d'une population pour un ou plusieurs caractères (valeur génétique, héritabilité, corrélation génétique).

Caractères quantitatifs : Phénotypes qui présentent une variation continue et mesurable au sein de la population.

Coefficient d'apparenté : Fait de posséder des ancêtres communs. Le coefficient d'apparenté est calculé comme la probabilité pour deux individus d'avoir des allèles en commun sur un locus.

Coefficient de consanguinité : Chez les organismes diploïdes, le coefficient de consanguinité est la probabilité pour que deux allèles que possède un individu en un locus quelconque soient identiques par descendance.

Consanguinité : Degré d'apparenté entre deux individus ;

Corrélation environnementale : Corrélation d'un effet environnemental sur deux caractères d'individus d'une population donnée.

Corrélation génétique : Corrélation des valeurs génétiques additives pour deux caractères d'individus d'une population donnée ;

Corrélation phénotypique : Corrélation entre les valeurs phénotypiques de deux caractères pour des individus d'une population donnée. Elle dépend des effets combinés de corrélations génétiques et environnementales.

Diversité génétique d'un stock : Nombre moyen d'allèles par locus pour les individus d'une population donnée.

Épistasie : Interaction entre plusieurs gènes à différent locus. Il y a épistasie quand un gène favorise ou inhibe l'expression d'un autre gène sur un autre locus.

Génétique : Science de la transmission des caractères héréditaires.

Héritabilité au sens large : Part de la variabilité phénotypique observée dans une population qui est imputable à des facteurs génétiques additifs.

Héritabilité au sens étroit : Rapport de la variance génétique additive et de la variabilité phénotypique par de la variabilité héritable. En génétique, lorsque l'héritabilité est désignée sans précision il s'agit de l'héritabilité au sens étroit.

Milieu : Ensemble des causes non génétiques de variation d'un caractère pour une population donnée.

Modèle polygénique additif infinitésimal : Modèle qui explique la variation d'un caractère au sein d'une population par l'action cumulée et infinitésimale d'un grand nombre de locus.

Pléiotropie : Effet d'un gène sur plusieurs caractères.

Taille génétique efficace : Nombre d'individus non apparentés qui devraient être croisés dans un plan factoriel complet avec une contribution égale pour reproduire la diversité génétique observée dans une population.

Valeur génétique : Différence entre la valeur phénotypique moyenne des individus portant le génotype considéré avec la valeur moyenne de l'ensemble de la population.

Valeur génétique additive : Fraction de la valeur génétique dont la transmission peut être facilement prédite.

Valeur phénotypique : Résultat de la mesure effectuée sur un caractère pour un individu. En génétique animale, la valeur phénotypique peut être appelée performance.

Sélection génétique

Cohorte : Ensemble d'individus d'une population étant issus d'un même pool de reproducteurs croisés à un moment donné.

Critères de sélection : Caractères mesurables et héréditaires associés aux aptitudes animales à améliorer.

Différentiel de sélection : Différences de moyenne phénotypique entre les individus sélectionnés et la valeur phénotypique moyenne d'une population.

Espèce : Ensemble d'individus interféconds dont la descendance n'est pas stérile.

Familles : Ensemble d'individus descendant d'un même couple de parents.

Hétérosis : Supériorité, pour un caractère donné de la moyenne des hybrides par rapport à la moyenne des deux populations parentales.

Hybridation : Union d'individus provenant de deux espèces différentes, le produit de cette union étant appelé un hybride.

Intensité de sélection : Différentiel de sélection exprimé en unité d'écart type

Lignée : Population constituée dans le cadre d'un programme de sélection avec un objectif donné.

Lot : Ensemble d'individus d'une cohorte ayant été élevés dans une structure de production commune.

Population : Ensemble d'individus de la même espèce se reproduisant effectivement entre eux.

Plan de fécondation factoriel complet : Plan de fécondation où l'ensemble des croisements possibles entre mâles et femelles sont réalisés.

Programme de sélection : Choix économique planifié sur plusieurs générations qui vise à augmenter le potentiel génétique d'une population.

Progrès génétique : Différence entre d'une part, la valeur génétique moyenne des descendants issus des reproducteurs sélectionnés et celle obtenue si les reproducteurs avaient été pris au hasard au sein d'une population. Il peut être estimé par le produit d'une intensité de sélection, d'une héritabilité et de la variabilité phénotypique d'un caractère considéré.

Race : Ensemble d'individus de la même espèce présentant entre eux plusieurs caractères héréditaires communs.

Sélection : Choix d'individus au sein d'une population pour produire une nouvelle génération.

Sélection individuelle ou massale : Sélection qui se base sur les performances des individus.

Sélection familiale : Sélection basée sur les performances moyennes d'individus d'une même famille.

Sélection généalogique : Sélection basée sur les performances moyennes d'individus apparentés

Statistique

Coefficient de variation : Rapport de l'écart type sur la moyenne. Valeur adimensionnelle exprimée en %.

Covariance : Permet de quantifier le degré de dépendance de deux variables aléatoires. C'est l'espérance du coproduit des deux variables centrées.

Coefficient de corrélation : Covariance de deux traits sur le produit des écarts types. Mesures de degrés de liaison entre deux variables.

Ecart type : Racine carrée de la variance.

Répétabilité : Corrélacion entre deux performances du même animal définie par un même génotype et l'aspect permanent de certains effets d'environnement non contrôlés.

Résiduelle : Ecart entre une observation et un modèle. La résiduelle du poids de chair sur le poids total est l'écart entre la mesure du poids de chair d'un individu et le poids de chair qui était modélisé à partir de l'information de son poids total.

Variance : Moyenne des carrés des écarts à la moyenne, mesure servant à caractériser la dispersion d'un échantillon.

Bibliographie

- Adachi, K., Okumura, S.I., 2012. Determination of genome size of *Haliotis discus hannai* and *H. diversicolor aquatilis* (Haliotidae) and phylogenetic examination of this family. Fish. Sci. 78, 849-852.
- Allen, V.J., Marsden, I.D., Ragg, N.L.C., 2000. The use of stimulants as an aid to wean fishery-caught blackfoot abalone (*Haliotis iris*) to artificial food. J. Shellfish Res. 19, 647-651.
- Allen, V.J., Marsden, I.D., Ragg, N.L.C., Giese, S., 2006. The effects of tactile stimulants on feeding, growth, behaviour, and meat quality of cultured Blackfoot abalone, *Haliotis iris*. Aquaculture. 257, 294-308.
- Andersson, M., Nordin, E., Jensen, P., 2001. Domestication effects on foraging strategies in fowl. Appl. Anim. Behav. Sci. 72, 51-62.
- Arbach Leloup, F., Desroy, N., Le Mao, P., Pauly, D., Le Pape, O., 2008. Interactions between a natural food web, shellfish farming and exotic species: The case of the Bay of Mont Saint Michel (France). Estuar, Coast and Shel. Sci. 76, 111-120.
- Baldwin, J., Elias, J.P., Wells, R.M.G., Donovan, D.A., 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 342, 213-225.
- Bancalà, F., 2009. Function of mucus secretion by lamellose ormer, *Haliotis tuberculata lamellosa*, in response to starfish predation. Anim Behav. 78, 1189-1194.
- Bansemer, M.S., Qin, J.G., Harris, J.O., Howarth, G.S., Stone, D.A.J., 2016. Nutritional requirements and use of macroalgae as ingredients in abalone feed. Aquaculture. 8, 121-135.
- Baranski, M., Rourke, M., Loughnan, S., Hayes, B., Austin, C., Robinson, N., 2008. Detection of QTL for growth rate in the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) using selective DNA pooling. Anim Genet. 39, 606-614.
- Basuyaux, O., 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi fermé, Syndicat mixte de l'équipement du Littoral. Université de Caen Basse Normandie, 239 pp.
- Bentsen, H.B., Olesen, I., 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. Aquaculture. 204, 349-359.
- Besson, M., Komen, H., Aubin, J., de Boer, I.J.M., Poelman, M., Quillet, E., Vancoillie, C., Vandeputte, M., van Arendonk, J.A.M., 2014. Economic values of growth and feed efficiency for fish farming in recirculating aquaculture system with density and nitrogen

- output limitations: a case study with African catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Anim. Sci.* 92, 5394-5405.
- Bilbao, A., Uriarte, I., Viera, M.D., Sosa, B., Fernandez-Palacios, H., Hernandez-Cruz, C.M., 2012. Effect of macroalgae protein levels on some reproductive aspects and physiological parameters for the abalone, *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846). *J. World Aquacult. Soc.* 43, 764-777.
- Boudry, P., Barre, M., Gerard, A., 1997. Genetic improvement and selection in shellfish : a review based on oyster research and production, Seminar on Genetics and Breeding in the Mediterranean Aquaculture Species CIHEAM-FAO.
- 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, 283-296.
- Braid, B.A., Moore, J.D., Robbins, T.T., Hedrick, R.P., Tjeerdema, R.S., Friedman, C.S., 2005. Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 219-231.
- Brokordt, K., González, R., Farías, W., Winkler, F.E., Lohrmann, K.B., 2017. First insight into the heritable variation of the resistance to infection with the bacteria causing the withering syndrome disease in *Haliotis rufescens* abalone. *J. Invertebr. Pathol.* 150, 15-20.
- Brokordt, K.B., González, R.C., Farías, W.J., Winkler, F.M., 2015. Potential Response to Selection of HSP70 as a Component of innate immunity in the abalone *Haliotis rufescens*. *PLoS ONE.* 10, e0141959.
- Brokordt, K.B., Winkler, F.M., Far, W.J., Gonzalez, R.C., Castano, F., Fullsack, P., Herbinger, C.M., 2014. Changes of heritability and genetic correlations in production traits over time in red abalone (*Haliotis rufescens*) under culture. *Aquac. Res.*, 1–12.
- Bullock, R.H., 1953. Predator recognition and escape responses of some intertidal gastropods in presence of starfish. *Behaviour* 5, 130-140.
- Byron, C., Link, J., Costa-Pierce, B., Bengtson, D., 2011. Calculating ecological carrying capacity of shellfish aquaculture using mass-balance modeling: Narragansett Bay, Rhode Island. *Ecol. Model.* 222, 1743-1755.
- Camara, M.D., Symonds, J.E., 2014. Genetic improvement of New Zealand aquaculture species: programmes, progress and prospects. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 48, 466-491.

- Cardinaud, M., Offret, C., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., 2014. The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 1-8.
- Cenni, F., Parisi, G., Gherardi, F., 2009. Use of space and costs/benefits of locomotion strategies in the abalone, *Haliotis tuberculata*. *Ethol. Ecol. Evol.* 21, 15-26.
- Cenni, F., Parisi, G., Scapini, F., Gherardi, F., 2010. Sheltering behavior of the abalone, *Haliotis tuberculata* L., in artificial and natural seawater: The role of calcium. *Aquaculture.* 299, 67-72.
- Chen, N., Luo, X., Gu, Y., Han, G., Dong, Y., You, W., Ke, C., 2016. Assessment of the thermal tolerance of abalone based on cardiac performance in *Haliotis discus hannai*, *H. gigantea* and their interspecific hybrid. *Aquaculture.* 465, 258-264.
- Cheng, W., Li, C.H., Chen, J.C., 2004a. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture.* 232, 103-115.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004b. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 193-202.
- Cheng, W., Yeh, S.P., Wang, C.S., Chen, J.C., 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture.* 203, 349-357.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C., 2004c. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235-243.
- Chevassus, B., Quillet, E., Krieg, F., Hollebecq, M.-G., Mambrini, M., Fauré, A., Labbé, L., Hiseux, J.-P., Vandeputte, M., 2004. Enhanced individual selection for selecting fast growing fish: the "PROSPER" method, with application on brown trout (*Salmo trutta fario*). *Genet. Sel. Evol.* 36, 643.
- Christie, M.R., Marine, M.L., French, R.A., Waples, R.S., Blouin, M.S., 2012. Effective size of a wild salmonid population is greatly reduced by hatchery supplementation. *Heredity.* 109, 254-260.
- Christie, M.R., Marine, M.L., Fox, S.E., French, R.A., Blouin, M.S., 2016. A single generation of domestication heritably alters the expression of hundreds of genes. *Nat. Commun.* 7, 6.

- Claireaux, G., McKenzie, D.J., Genge, A.G., Chatelier, A., Aubin, J., Farrell, A.P., 2015. Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J Exp Biol.* 208, 1775-1784.
- Clavier, J., Richard, O., 1986a. Estimation du stock naturel d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) dans la région de Saint-Malo. Institution des pêches maritimes pp. 11.
- Clavier, J., Richard, O., 1986b. Growth of juvenile *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Gastropoda) in their natural environment. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 66, 497-503.
- Clavier, J., Richard, O., 1986c. Growth of juvenile *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda) in their natural environment. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 66, 497-503.
- Clavier, J., and Richard, O., 1984. Etude expérimentale du déplacement de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) dans le milieu naturel. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 46, 315-326.
- Cochard, J.C., 1980. Recherches sur les facteurs déterminant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. en rade de Brest. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 167 pp.
- Cochard, J.C., Flassh, J.P., 1981. Review on the abalone (*Haliotis tuberculata*). Ocean ranching and restocking. Aquaculture extensive et repeuplement, Centre Natl. pour l' Exploitation des Océans, France, pp. 55-59.
- Cook, P.A., 2016. Recent Trends in Worldwide Abalone Production. *J. Shellfish Res.* 35, 581-583.
- Cook, P.A., Gordon, H.R., 2010. World abalone supply, markets, and pricing. *J. Shellfish Res.* 29, 569-571.
- Cox, K.W., 1962. California Abalones, Family *Haliotidae*. *Fish Bulletin.* 118, 1-133.
- Crofts, D.R., 1929. *Haliotis*. L.M.B.C. Memoir. 24, 174 pp.
- Dang, V.T., Li, Y., Speck, P., Benkendorff, K., 2011. Effects of micro and macroalgal diet supplementations on growth and immunity of greenlip abalone, *Haliotis laevis*. *Aquaculture.* 320, 91-98.
- Daume, S., Ryan, S., 2004. Nursery culture of the abalone *Haliotis laevis*: Larval settlement and juvenile production using algae or formulated feed. *J. Shellfish Res.* 23, 1019.
- Daume, S., Brand, S., Woelkerling, W.J., 1997. Effects of post-larval abalone (*Haliotis rubra*) grazing on the epiphytic diatom assemblage of coralline red algae. in: Shepherd, S.A., McShane, P.E., Wells, F.E. (Eds.), *Molluscan Research*. The Malacological Society of Australasia, pp. 119-130.
- Daume, S., Krsinich, A., Farrell, S., Gervis, M., 2000b. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Appl. Phycol.* 12, 479-488.

- Daume, S., Huchette, S., Ryan, S., Day, R.W., 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. *Aquaculture*. 236, 221.
- Daume, S., Krisinich, A., Farrell, S., and Gervis, M., 2000. Settlement and early growth of the abalone *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Shellfish Res.* 19, 506-507.
- Daume, S., Krsinich, A., Farrell, S., and , Gervis, M., 2000. Growth and survival of *Haliotis rubra* post-larvae feeding on different algal species. *J. Shellfish Res.* 19, 506.
- Day, R., Dowell, A., Sant, G., Klemke, J., Shaw, C., 1995a. Patchy predation: Foraging behaviour of *Coscinasterias calamaria* and escape responses of *Haliotis rubra*. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 26, 11-33.
- Day, R.W., Williams, M.C., Hawkes, G.P., 1995b. A comparison of fluorochromes for marking abalone shells. *Mar. Freshwat. Res.* 46, 599-605.
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P., 2010a. Summer mortality of hatchery-produced pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture*. 299, 21-29.
- Dégremont, L., Boudry, P., Ropert, M., Samain, J.-F., Bédier, E., Soletchnik, P., 2010b. Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 299, 44-50.
- Difford, G.F., Vlok, A.C., Rhode, C., Brink, D., 2017. Heritability of growth traits in South African Abalone (*Haliotis midae* L.) using the ‘internal reference’ method. *Aquaculture*. 468, 451-457.
- Dixon, C.D., Day, R.W., Huchette, S.M.H., Shepherd, S.A., 2006. Successful seeding of hatchery-produced juvenile greenlip abalone to restore wild stocks. *Fish Res.* 78, 179-185.
- Dominik, S., Henshall, J.M., Kube, P.D., Elliott, N.G., 2013. Can greenlip (*Haliotis laevigata*) abalone breeding programs tolerate fluctuations in reproductive performance? *J. Shellfish Res.* 32, 155-160.
- Donovan, D., Carefoot, T., 1997. Locomotion in the abalone *Haliotis kamtschatkana*: pedal morphology and cost of transport. *J. Exp. Biol.* 200, 1145-1153.
- Donovan, D.A., Taylor, H.H., 2008. Metabolic consequences of living in a wave-swept environment: Effects of simulated wave forces on oxygen consumption, heart rate, and activity of the shell adductor muscle of the abalone *Haliotis iris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 354, 231-240.

- Dubief, B., 2017. Variabilité de la capacité de résistance des populations de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* face à *Vibrio harveyi*, IUEM Institut Universitaire Européen de la Mer. Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, 162 pp.
- Dubief, B., Nunes, F.L.D., Basuyaux, O., Paillard, C., 2017. Immune priming and portal of entry effectors improve response to *vibrio* infection in a resistant population of the European abalone. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 255-264.
- Dunstan, G.A., Elliott, N.G., Appleyard, S.A., Holmes, B.H., Conod, N., Grubert, M.A., Cozens, M.A., 2007. Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) to market size: Commercial implications. *Aquaculture.* 271, 130-141.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., 2011. Is avoiding full sib matings really worthwhile in a breeding program? *Aquaculture.* 314, 277-281.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Haffray, P., Chevassus, B., 2006. Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs. *Aquaculture.* 252, 161-170.
- Elliott, N., 2008. Abalone genetic research: Australian review and prospects. *J. Shellfish Res.* 27, 1005-1005.
- Elliott, N.G., 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquac. Res.* 31, 51-59.
- Elliott, N.G., Evans, B., Conod, N., Bartlett, J., Officer, R., Sweijid, N., 2000. Application of molecular genetics to the understanding of abalone population structure - Australian and South African case studies. *J. Shellfish Res.* 19, 510.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Evans, B., White, R.W.G., Elliott, N.G., 2000. The use of microsatellite markers for parentage analysis in Australian blacklip and hybrid abalone. *J. Shellfish Res.* 19, 511.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijid, N., Cook, P., Elliott, N.G., 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture.* 233, 109-127.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, Longman, Scientific & Technical ; Wiley, Burnt Mill, Harlow, Essex, England; New York. 4th ed.

- Farias, W.J., Winkler, F.M., Brokordt, K.B., 2017. Genotype by environment interactions, heritabilities and genetic correlations for productive traits of *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*. 473, 407-416.
- Ferra, C., Bitaud, G., Borie, F., Braud, J.P., 2008. *Aquaculture*. Vuibert.
- Flassch, J.P., Aveline, C., 1984. Production de jeunes ormeaux à la station d'expérimentale d'Argenton, Publication du C.N.E.X.O. rapport scientifique et technique, pp. 50-68.
- Fleming, A.E., 1995a. Digestive efficiency of the Australian abalone *Haliotis rubra* in relation to growth and feed preference. *Aquaculture*. 134, 3-4.
- Fleming, A.E., 1995b. Growth, intake, feed conversion efficiency and chemosensory preference of the Australian abalone, *Haliotis rubra*. *Aquaculture*. 132, 3-4.
- Fleming, A.E., Hone, P.W., 1996a. Abalone aquaculture. *Aquaculture*. 140, 1-2.
- Fleming, A.E., Van Barneveld, R.J., Hone, P.W., 1996b. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture*. 140, 5-53.
- Fluckiger, M., Brown, M.R., Ward, L.R., Moltschaniwskyj, N.A., 2011. Predicting glycogen concentration in the foot muscle of abalone using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Food Chem.* 126, 1817-1820.
- Forster, G.R., 1967. The growth of *Haliotis tuberculata*: results of tagging experiments in Guernsey, 1963-65. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.* 47, 287-300.
- Forster, G.R., Potts, G.W., Swinfen, R., 1982. Changes in the ormer populations of Guernsey and Jersey. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.* 62, 717-727.
- Franchini, P., Slabbert, R., Merwe, M.V.D., Roux, A., Roodt-Wilding, R., 2010. Karyotype and Genome size estimation of *Haliotis midae*: Estimators to assist future studies on the evolutionary history of *Haliotidae*. *J. Shellfish Res.* 29, 945-950.
- Friggens, N.-C., Sauvaut, D., Martin, O., 2010. Vers des définitions opérationnelles de la robustesse s'appuyant sur des faits biologiques : l'exemple de la nutrition. *Inra Prod. Anim.* 23, 43-52.
- Gallardo-Escarate, C., Del Rio-portilla, M., 2007. Karyotype composition in three california abalones and their relationship with genome size. *J. Shellfish Res.* 26, 825-832.
- Gao, X., Ogawa, H., Tashiro, Y., Iso, N., 2001. Rheological properties and structural changes in raw and cooked abalone meat. *Fisheries Science.* 67, 314-320.
- Gautier, A., 1990. *La Domestication : et l'homme créa ses animaux / Achilles Gautier*. Paris : Editions Errance, 270 pp.
- Geiger, D.L., 1999a. Distribution and Biogeography of the Recent *Haliotidae* (*Gastropoda: Vetigastropoda*) World-wide. *Boll. Malacol.* 35, 5-12.

- Geiger, D.L., Owen, B., 2012. Abalone: World-wilde Haliotidae, Hackheneim. Germany.
- Geiger, D.L., and Groves, L. T., 1999b. Review of fossil abalone (*Gastropoda: Vetigastropoda: Haliotidae*) with comparison to recent species. *J. Paleontol.* 73, 872-885.
- Gerber, M.E., 2013. Quantitative assessment of yields traits between family groups of the cultured abalone, *Haliotis midae*, during the process of canning. 84.
- Gitterle, T., Johansen, H., Erazo, C., Lozano, C., Cock, J., Salazar, M., Rye, M., 2007. Response to multi-trait selection for harvest weight, overall survival, and resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture.* 272, Supplement 1, S262.
- Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H., Lozano, C., Arturo Suárez, J., Gjerde, B., 2005. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture.* 243, 83-92.
- Gjedrem, T., 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac. Res.* 31, 25-33.
- Gjedrem, T., Baranski, M., 2009. Selective breeding in aquaculture: an introduction. Springer, Dordrecht, 248 pp.
- Gjerde, B., Simianer, H., Refstie, T., 1994. Estimates of genetic and phenotypic parameters for body weight, growth rate and sexual maturity in Atlantic salmon. *Livest. Prod. Sci.* 38, 133-143.
- Gobet, A., Mest, L., Caralp, C., Coulombet, C., Dittami, S., Huchette, S., Michel, G., Perennou, M., Roussel, S., Leblanc, C., 2015. Fluctuations of abalone's digestive microbiota with algal diet over a year in: *Eco-Système*, B.M. (Ed.), Conférences Jacques Monod, Roscoff (Brittany), France.
- Gonzalez, G.G., Brokordt, K.B., Winkler, F.E., 2010. Repeatability of physiological traits in juvenile pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Mar. Biol.* 157, 2195-2203.
- Gordon, H.R., Cook, P.A., 2004. World abalone fisheries and aquaculture update: Supply and market dynamics. *J. Shellfish Res.* 23, 935-939.
- Gordon, H.R., Cook, P.A., 2013. World Abalone Supply, Markets, and Pricing: 2011 Update. *J. Shellfish Res.* 32, 5-7.
- Haffray, P., Bugeon, J., Rivard, Q., Quittet, B., Puyo, S., Allamelou, J.M., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., 2013. Genetic parameters of in-vivo prediction of carcass, head and fillet yields by internal ultrasound and 2D external imagery in large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 410-411, 236-244.

- Hannon, C., Officer, R.A., Le Dorven, J., Chamberlain, J., 2014. Culture methods of live algal feeds for European aquaculture: optimising culture conditions for *Ulveella lens*. *Aquac. Int.* 22, 1813-1822.
- Hansen, S.C., Gosselin, L.A., 2013. Do predators, handling stress or field acclimation periods influence the survivorship of hatchery-reared abalone *Haliotis kamtschatkana* outplanted into natural habitats? *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 23, 246-253.
- Hansen, S.C., Gosselin, L.A., 2016. Are hatchery-reared abalone naïve of predators? Comparing the behaviours of wild and hatchery-reared northern abalone, *Haliotis kamtschatkana* (Jonas, 1845). *Aquac. Res.* 47, 1727-1736.
- Harada, K., Miyasaki, T., Tamura, Y., 1994. Chemoattractant effects of sugars and their related compounds on black abalone *Haliotis discus*. *Comp. Biochem. Physiol., A*, 111-115.
- Harada, Y., Kumagai, T., Syozen, K.-I., Yokoi, K.-J., 2012. Quality of the meat of cultured F1-hybrid abalone fed with three different diets: kelp, seaweed or artificial diet. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 78, 945-950.
- Hauck, M., Gallardo-Fernández, G.L., 2013. Crises in the South African abalone and Chilean loco fisheries: shared challenges and prospects. *Mar. Stu.* 12, 3.
- Hayashi, I., 1980. The reproductive biology of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *J. Mar. Biol. Ass., U.K.* 60, 415-430.
- Hayes, B., Baranski, M., Goddard, M.E., Robinson, N., 2007. Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding programs. *Aquaculture.* 265, 61-69.
- Henderson, C.R., 1953. Estimation of variance and covariance components. *biometrics.* 9, 226-252.
- Henshilwood, C.S., d'Errico, F., van Niekerk, K.L., Coquinot, Y., Jacobs, Z., Lauritzen, S.-E., Menu, M., García-Moreno, R., 2011. A 100,000-year-old ochre-processing workshop at Blombos Cave, South Africa. *Science.* 334, 219-222.
- Holman, L.E., Garcia de la serrana, D., Onoufriou, A., Hillestad, B., Johnston, I.A., 2017. A workflow used to design low density SNP panels for parentage assignment and traceability in aquaculture species and its validation in Atlantic salmon. *Aquaculture.* 476, 59-64.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363-379.

- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., 2011. Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture*. 315, 348-354.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., 2014a. Histopathology and haemolymph biochemistry following anaesthesia and movement in farmed Australian abalone (*Haliotis rubra* x *Haliotis laevis*). *Aquaculture*. 422, 202-210.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., Goulias, J., 2014b. Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* x *Haliotis rubra*). *Aquaculture*. 432, 26-37.
- Huchette, S.M.H., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shellfish Res.* 23, 951-955.
- Huchette, S.M.H., Koh, C.S., Day, R.W., 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. *Aquaculture*. 219, 457-470.
- Hughes, B.H., Perkins, L.B., Yang, T.C., Skonberg, D.I., 2016. Impact of post-rigor high pressure processing on the physicochemical and microbial shelf-life of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*). *Food Chem.* 194, 487-494.
- Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Ruiz, C.A., Cruz, P., Avila, S., 1999. Realized heritabilities and genetic correlation after dual selection for total weight and shell width in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture*. 175, 227-241.
- Johnston, D., Moltshaniwskyj, N., Wells, J., 2005. Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets. *Aquaculture*. 250, 341-355.
- Jonasson, J., S., S. E., Gudnason, A., and Steinarsson, A., 1999. Genetic variation for survival and shell length of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *J. Shellfish Res.* 18, 621-625.
- Kang, J.H., Appleyard, S.A., Elliott, N.G., Jee, Y.J., Lee, J.B., Kang, S.W., Baek, M.K., Han, Y.S., Choi, T.J., Lee, Y.S., 2011. Development of genetic markers in abalone through construction of a SNP database. *Anim. Genet.* 42, 309-315.
- Kobayashi, T., Kijima, A., 2010. Effects of inbreeding depression in pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Shellfish Res.* 29, 643-649.
- Kolstad, K., Grisdale-Helland, B., Gjerde, B., 2004. Family differences in feed efficiency in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 241, 169-177.

- Kube, P.D., Appleyard, S.A., Elliott, N.G., 2007. Selective breeding greenlip abalone (*Haliotis laevis*): Preliminary results and issues. *J. Shellfish Res.* 26, 821-824.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367-379.
- Lachambre, S., Day, R., Boudry, P., Huchette, S., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017a. Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection. *Appl. Anim. Behav. Sci.*
- Lachambre, S., Huchette, S., Day, R., Boudry, P., Rio-Cabello, A., Fustec, T., Roussel, S., 2017b. Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture.* 467, 190-197.
- Langdon, C., Evans, F., Jacobson, D., Blouin, M., 2003. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) improved after one generation of selection. *Aquaculture.* 220, 227-244.
- Lapègue, S., Harrang, E., Heurtebise, S., Flahauw, E., Donnadiou, C., Gayral, G., Ballenghien, M., Genestout, L., Barbotte, L., Mahla, R., Haffray, P., Klopp, C., 2014. Development of SNP genotyping arrays in two non-model shellfish species. Accepted in *Mol. Ecol. Resources.*
- Le Petit, M., 2009. Monographie et étude de la dynamique de population d'*Haliotis tuberculata* au Sénégal. Ecole national vétérinaire d'Alfort, 91 pp.
- Lillehammer, M., Meuwissen, T.H.E., Sonesson, A.K., 2013. A low-marker density implementation of genomic selection in aquaculture using within-family genomic breeding values. *Genet. Sel. Evol.* 45, 39-39.
- Liu, J., Lai, Z., Fu, X., Wu, Y., Bao, X., Hu, Z., Lai, M., 2015. Genetic parameters and selection responses for growth and survival of the small abalone *Haliotis diversicolor* after four generations of successive selection. *Aquaculture.* 436, 58-64.
- Liu, W., Heasman, M., Simpson, R., 2009. Growth and reproductive performance of triploid and diploid blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814). *Aquac. Res.* 40, 188-203.
- Lorenzen, K., Beveridge, M., Mangel, M., 2012. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biol. rev.* 87, 639-660.
- Lucas, D., Brun, A., Gispert, M., Carabús, A., Soler, J., Tibau, J., Fonti-Furnols, M., 2017. Relationship between pig carcass characteristics measured in live pigs or carcasses with piglog, fat-o-meat'er and computed tomography. *Live. Sci.* 197, 88-95.

- Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W., Degnan, B.M., 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture*. 259, 146-152.
- Luo, X., Ke, C., You, W., 2013. Estimates of correlations for shell morphological traits on body weight of interspecific hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* and *Haliotis gigantea*). *J. Shellfish Res.* 32, 115-118.
- Mai, K., Mercer, J.P., Donlon, J., 1994. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. II: Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value. *Aquaculture*. 128, 115-130.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J. exp. zool. Part. A*. 295A, 136-144.
- Marchais, V., Jolivet, A., Hervé, S., Roussel, S., Schöne, B.R., Grall, J., Chauvaud, L., Clavier, J., 2017. New tool to elucidate the diet of the ormer *Haliotis tuberculata* (L.): Digital shell color analysis. *Mar. Biol.* 164, 71.
- Marie-Orleach, L., Roussel, J.-M., Bugeon, J., Tremblay, J., Ombredane, D., Evanno, G., 2014. Melanin-based coloration of sneaker male Atlantic salmon is linked to viability and emergence timing of their offspring. *Bio. J. Lin. Soc.* 111, 126-135.
- Masuda, R., Tsukamoto, K., 1996. Stock enhancement in Japan: Review and perspective, Proc. 1. William R. and Lenore Mote Int. Symp. in Fisheries Ecology Marine Stock Enhancement: A New Perspective, Sarasota, Florida USA.
- Mazoyer, M., Roudart, L., 2002. Histoire des agricultures du monde: du néolithique à la crise contemporaine. Seuil. 705 pp.
- Mazurié, J., Thébault, A., LE Mao, P., Véron, G., Tigé, G., Richard, O., 1999. Les mortalités d'ormeaux en Bretagne Nord en 1998 - Synthèse des observations et analyses, La Tremblade. 14 pp.
- McAvaney, L.A., Day, R.W., Dixon, C.D., Huchette, S.M., 2004. Gonad development in seeded *Haliotis laevigata*: growth environment determines initial reproductive investment. *J. Shellfish Res.* 23, 1213-1218.
- Momma, H., Sato, R., 1970. The locomotion behavior of the disk abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in a tank. *Tohoku J. Agric. Res.* 21, 20-25.
- Monget, P., Le Bail, P.-Y., 2009. Le phénotypage des animaux : le nouveau défi ? *Renc. Rech. Ruminants*. 16, 407-409.

- Morash, A.J., Alter, K., 2016. Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Reviews in Aquaculture*. 8, 342-368.
- Nakamura, K., Archdale, M.V., 2001. Activity patterns of abalone under experimental conditions. *Aquac. Res.* 32, 169-179.
- Nguyen, T.T.T., Hayes, B.J., Ingram, B.A., 2014. Genetic parameters and response to selection in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using a SNP-based pedigree. *Aquaculture*. 420–421, 295-301.
- Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 35-43.
- Ojolick, E.J., Cusack, R., Benfey, T.J., Kerr, S.R., 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*. 131, 177-187.
- Okumura, S.I., Senbokuya, H., Arai, K., Sakai, M., Furukawa, S., Yamamori, K., 2007. The characterization of survival, growth, and male gamete in the triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture*. 272, Supplement 1, S297.
- Olaechea, R.P., Ushio, H., Watabe, S., Takada, K., Hatae, K., 1993. Toughness and collagen content of abalone muscles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 6-11.
- Ottaviani, E., Franceschi, C., 1996. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* 48, 421-440.
- Pante, M.J.R., Gjerde, B., McMillan, I., 2001. Effect of inbreeding on body weight at harvest in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 192, 201-211.
- Pérez, E.P., Araya, A., Araneda, M., Zúñiga, C., 2012. Bioeconomic effect from the size selection in red abalone intensive culture *Haliotis rufescens* as a production strategy. *Aquac. Int.* 20, 333-345.
- Periquet, J., 2010. Diversité des formes domestiques de poules., <http://volaillepoultry.pagesperso-orange.fr/index1.html>.
- Phocas, F., Donoghue, K., Graser, H.U., 2005. Investigation of three strategies for an international genetic evaluation of beef cattle weaning weight. *Genet. Sel. Evol.* 37, 361.
- Price, E.O., 1984. *Animal domestication and behavior*, CABI publishing ed. 204 pp.
- Ragg, N.L.C., Watts, E., 2015. Physiological indicators of stress and morbidity in commercially handled abalone *Haliotis iris*. *J. Shellfish Res.* 34, 455-467.
- Ragg, N.L.C., Taylor, H.H., Behrens, J., 2000. Stress and weight loss associated with handling in the blackfoot abalone, *Haliotis iris*. *J. Shellfish Res.* 19, 528-529.

- Rauw, W., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E., Grommers, F., 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56, 15–33.
- Rhode, C., Maduna, S.N., Roodt-Wilding, R., Bester-van der Merwe, A.E., 2014. Comparison of population genetic estimates amongst wild, F1 and F2 cultured abalone (*Haliotis midae*). *Anim. Genet.* 45, 456–459.
- Rhode, C., Der Merwe, A., E, V.B., Roodt-Wilding, R., 2017. An assessment of spatio-temporal genetic variation in the South African abalone (*Haliotis midae*), using SNPs: implications for conservation management. *Conservation Genetics.* 18, 17-31.
- Rhode, C., Hepple, J.A., Jansen, S., Davis, T., Vervalle, J., Bester-van der Merwe, A.E., Roodt-Wilding, R., 2012. A population genetic analysis of abalone domestication events in South Africa: Implications for the management of the abalone resource. *Aquaculture.* 356, 235-242.
- Rigalma, K., Duvaux-Ponter, C., Deiss, V., Charles, C., Deveaux, L., Deschamps, F., Roussel, S., 2010. Effects of stray voltage on the physiology of stress, growth performance and carcass parameters in Romane male lambs. *Small Ruminant Res.* 94, 125-131.
- Robinson, N., Li, X.X., Hayes, B., 2010. Testing options for the commercialization of abalone selective breeding using bioeconomic simulation modelling. *Aquac. Res.* 41, e268-e288.
- Robinson, N., Smith, B., Cooke, I., Strugnell, J., 2013. A snail's pace: A preliminary analysis of the effects of stress and genetics on movement of *Haliotis*. *Aquaculture.* 376, 25-35.
- Roodt-Wilding, R., Slabbert, R., 2006. Molecular markers to assist the South African abalone industry. *S. Afr. J. Sci.* 102, 99-102.
- Roussel, S., Huchette, S., Clavier, J., Chauvaud, L., 2011. Growth of the European abalone (*Haliotis tuberculata* L.) in situ: Seasonality and ageing using stable oxygen isotopes *J. Sea Res.* 65, 213-218.
- Roussel, V., Huchette, S., Van Wormoudt, A., 2010. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in the European abalone, *Haliotis tuberculata*. *Mol. ecol. Resour.* 10, 751-754.
- Roussel, V., Charreyron, J., Labarre, S., Van Wormhoudt, A., S., H., 2013. First steps on technological and genetic improvement of European abalone (*Haliotis tuberculata*) based on investigations in full-sib families. *Op. J. Gen.* 3, 224–233.
- Saito, K., 1984. Ocean ranching of abalones and scallops in northern Japan. *Aquaculture.* 39, 1-4.

- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Degnan, B.N., 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: Parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 3, 478-485.
- Sheedy, J.R., Lachambre, S., Gardner, D.K., Day, R.W., 2016. ¹H-NMR metabolite profiling of abalone digestive gland in response to short-term starvation. *Aquac. Int.* 24, 503-521.
- Shepherd, S.A., 1973. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). I. Ecology of five sympatric species. *Aust. J. Ma. Fresh. Res.* 24, 217-257.
- Sinn, D.L., Moltschaniwskyj, N.A., 2005. Personality traits in dumpling squid (*Euprymna tasmanica*): Context-specific traits and their correlation with biological characteristics. *J. Comp. Psychol.* 119, 99-110.
- Sinn, D.L., Apiolaza, L.A., Moltschaniwskyj, N.A., 2006. Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *J. Evol. Biol.* 19, 1437-1447.
- Slabbert, R., Roodt-Wilding, R., 2006. Non-destructive sampling of juvenile abalone using epipodial tentacles and mucus: method and application. *Af. J. Mar. Sci.* 28, 719-721.
- Slabbert, R., Bester, A.E., D'Amato, M.E., 2009. Analyses of genetic diversity and parentage within a south african hatchery of the abalone *Haliotis midae linnaeus* using microsatellite markers. *J. Shellfish Res.* 28, 369-375.
- Sonesson, A.K., Meuwissen, T.H.E., 2009. Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genet. Sel. Evol.* 41, 37-37.
- Stepo, N.K., Cook, P.A., 1998. Induction of triploidy in the South African abalone using cytochalasin B. *Aquac. Int.* 6, 161-169.
- Stone, D.A.J., Bansemmer, M.S., Lange, B., Schaefer, E.N., Howarth, G.S., Harris, J.O., 2014. Dietary intervention improves the survival of cultured greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) at high water temperature. *Aquaculture.* 430, 230-240.
- Strain, L.W.S., Borowitzka, M.A., Daume, S., 2006. Growth and survival of juvenile greenlip abalone (*Haliotis laevis*) feeding on germlings of the macroalgae *Ulva spp.* *J. Shellfish Res.* 25, 239-247.
- Straus, K.M., Friedman, C.S., 2009. Restoration aquaculture of the pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana kamtschatkana* Jonas): impacts of rearing method on behaviour, growth and survivorship in the hatchery. *Mar. Freshw. Res.* 60, 1021-1028.
- Su, G.-S., Liljedahl, L.-E., Gall, G.A.E., 1996. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 142, 139-148.
- Suja, C.P., Dharmaraj, S., 2005. In vitro culture of mantle tissue of the abalone *Haliotis varia Linnaeus*. *Tissue Cell.* 37, 1-10.

- Takahashi, K., Koganezawa, A., 1988. Mass culture of *Ulvelia lens* as a feed for abalone *Haliotis discus hannai*. NOAA Technical report NMFS. 70, 29-36.
- Taris, N., Batista, F.M., Boudry, P., 2007. Evidence of response to unintentional selection for faster development and inbreeding depression in *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture Ireland*. 272, 69–79.
- Taris, N., Ernande, B., McCombie, H., Boudry, P., 2006. Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 333, 147-158.
- Teletchea, F., Fontaine, P., 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish. Fish.* 15, 181-195.
- Toro, J.E., Alcapán, A.C., Vergara, A.M., Ojeda, J.A., 2004. Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquac. Res.* 35, 56-61.
- Travers, M.A., 2008. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université de Bretagne Occidentale, 266 pp.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008a. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800-808.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008b. Evidence of an immune depression in spawning period, at the basis of *Haliotis tuberculata* susceptibility to the pathogen *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800-808.
- Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goic, N., Huchette, S., Nicolas, J.L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biol.* 15, 1365-1376.
- Travers, M.A., Silva, P.M.d., Goic, N.L., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008c. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400.
- Uki, N., Kikuchi, S., 1981. Technical study on artificial spawning of abalone, Genus *Haliotis*. VII. Comparative examinations of rearing apparatus for conditioning adult of abalone. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. lab.* 43, 47-51.
- Uki, N., Kikuchi, S., 1984a. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis (Gasteropoda)* by external environmental factors. *Aquaculture.* 39, 247-261.

- Uki, N., Kikuchi, S., 1984b. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*. 39, 247-261.
- Valenzuela-Munoz, V., Araya-Garay, J.M., Gallardo-Escarate, C., 2013. SNP discovery and high resolution melting analysis from massive transcriptome sequencing in the California red abalone *Haliotis rufescens*. *Mar. Genom.* 10, 11-16.
- Van den Bergb, N.C., Roodt-Wilding, R., 2010. Parentage assignment in *Haliotis midae* L.: a precursor to future genetic enhancement programmes for South African abalone. *Aquac. Res.* 41, 1387-1395.
- Vandeputte, M., Haffray, P., 2014. Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. *Frontiers in Genetics*. 5, 1-8.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chatain, B., Chevassus, B., 2001. Setting up a strain-testing design for the seabass, *Dicentrarchus labrax*: a simulation study. *Aquaculture*. 202, 329-342.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Chatain, B., 2007. A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics*. 176, 1049-1057.
- Verdal, H., Mekki, W., Lind, C.E., Vandeputte, M., Chatain, B., Benzie, J.A.H., 2017. Measuring individual feed efficiency and its correlations with performance traits in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 468, Part 1, 489-495.
- Viant, M.R., Rosenblum, E.S., Tjeerdema, R.S., 2003. NMR-Based Metabolomics: A powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism Health. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4982-4989.
- Vicose, G.C., Viera, M., Bilbao, A., Izquierdo, M., 2010. Larval settlement of *Haliotis tuberculata coccinea* in response to different inductive cues and the effect of larval density on settlement, early growth, and survival. *J. Shellfish Res.* 29, 587-591.
- Viera, M.P., de Vicose, G.C., Gomez-Pinchetti, J.L., Bilbao, A., Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2011. Comparative performances of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve) fed enriched vs non-enriched macroalgae: Effect on growth and body composition. *Aquaculture*. 319, 423-429.
- Vigne, J.-D., 2002. Les débuts de l'élevage Le Pommier ed, 189 pp.
- Vosloo, A., Vosloo, D., 2006. Routes of water loss in South African abalone (*Haliotis midae*) during aerial exposure. *Aquaculture*. 261, 670.

- Werner, I., Flothmann, S., Burnell, G., 1995. Behaviour studies on the mobility of two species of abalone (*Haliotis tuberculata* and *H. discus hannai*) on sand -- implications for reseeded programmes. *Mar. Freshwat. Res.* 46, 681-688.
- White, J., 2011. The ancient history of the maori, his mythology and traditions. Cambridge, 485 pp.
- Wild, V., Simianer, H., Gjøen, H.M., Gjerde, B., 1994. Genetic parameters and genotype × environment interaction for early sexual maturity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 128, 51-65.
- Winkler, F.M., González, G.V., Valencia, M.P., Brokordt, K.B., 2007. Repeatability and heritability (h²) of physiological traits in juveniles of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Int. Physiol.* 148, Supplement 1, S22.
- Xu, L., Li, Q., Yu, H., Kong, L., 2017. Estimates of heritability for growth and shell color traits and their genetic correlations in the black Shell Strain of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biot.*
- Yamamoto, T., Reinhardt, U.G., 2003. Dominance and predator avoidance in domesticated and wild fish masu salmon *Onchorhynchus masou*. *Fish. Sci.* 69, 88-94.
- Yoneda, C., Ahsan, M.N., Nakaya, M., Matsubara, Y., Ebihara, T., Irie, S., Uno, Y., Hatae, K., Watabe, S., 2000. Abalone collagens: immunological properties and seasonal changes of their mRNA levels. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 126, 59-68.
- You, W., Ke, C., Luo, X., Wang, D., 2010a. Heritability of growth traits for small abalone *Haliotis diversicolor* estimated from sib matings. *J. Shellfish Res.* 29, 705-708.
- You, W., Guo, Q., Fan, F., Ren, P., Luo, X., Ke, C., 2015. Experimental hybridization and genetic identification of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* and green abalone *H. fulgens*. *Aquaculture*. 448, 243-249.
- You, W.W., Ke, C.H., Luo, X., Wang, D.X., 2010b. Divergent selection for shell length in two stocks of small abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquac. Res.* 41, 921-929.
- You, W.W., Ke, C.H., Luo, X.A., Wang, D.X., 2010c. Heritability of growth traits for small abalone *Haliotis diversicolor* estimated from sib matings. *J. Shellfish Res.* 29, 705-708.
- Zheng, H., Zhang, G., Liu, X., Zhang, F., Guo, X., 2004. Different responses to selection in two stocks of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313, 213-223.
- Zuniga-Jara, S., Marin-Riffo, M.C., 2014. A bioeconomic model of a genetic improvement program of abalone. *Aquac. Int.* 22, 1533-1562.

Mise en place d'un plan de sélection génétique pour l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*

Résumé

Le développement de l'halioticulture est récent et a été très rapide au niveau mondial. Il s'explique par une demande supérieure à l'offre et par un épuisement des stocks dans le milieu naturel. Pour soutenir leur développement, la plupart des filières de production halioticoles ont récemment mis en place des programmes de sélection génétique. En France, la filière ormeaux peine à se développer. Cette thèse CIFRE, cofinancée par France Haliotis, seule éclosérie d'ormeau en France, a donc été initiée afin de définir les bases d'un programme de sélection pour améliorer la rentabilité de son élevage. La thèse s'est déroulée en deux étapes : l'étude des effets du processus de domestication observés sur les ormeaux issus de cette éclosérie, et l'estimation de paramètres génétiques dans son système de production. Deux expérimentations comparant une population sauvage et une population d'élevage ont permis de montrer que les ormeaux produits sur l'élevage jusqu'en 2013 présentaient des performances égales à celles des ormeaux sauvages. A l'âge adulte, les ormeaux d'élevage ont néanmoins montré une moins grande sensibilité aux manipulations d'élevage et un comportement d'évitement des prédateurs réduit par rapport aux ormeaux sauvages.

L'estimation de paramètres génétiques a pu être effectuée grâce à la constitution d'un jeu de 123 marqueurs SNP permettant la reconstruction du pedigree de familles élevées en mélange pendant 4 ans. L'estimation de l'héritabilité de différents caractères associés à la croissance montre que des progrès importants pourraient être obtenus par sélection sur le poids à 42 mois. En revanche, les caractères comportementaux et physiologiques étudiés dans cette thèse n'apparaissent pas ou peu héritable. Un programme de sélection adapté au système de France Haliotis a donc été proposé pour améliorer le poids des animaux à 4 ans. L'analyse des corrélations génétiques suggère qu'une sélection multicritères pour améliorer conjointement la croissance, le taux de chair et contrôler l'évolution du développement gonadique, pourrait également être envisagée.

Mots clefs : Sélection génétique, ormeaux, croissance, physiologie, comportement

Selective breeding implementation for the European abalone *Haliotis tuberculata*

Abstract

In the context of an increasing demand and a declining supply from fisheries, worldwide aquaculture production of abalone has greatly increased in the last decades. Selective breeding has been initiated to improve growth in major abalone species. In France, the abalone production was initiated 30 years ago and struggles to develop. This CIFRE PhD co-financed by France Haliotis, the only French hatchery in activity, was initiated to study early domestication process of farmed abalone population and to provide knowledge required to design a selective breeding program adapted to this company. Wild and farmed populations were compared, showing that, until 2013, farmed and wild abalone presented similar performances. However, lower physiological and behavioural responses to farm stressor were observed, as well as less response to predator contact.

Estimations of genetic parameters were performed using a novel set of 123 SNP markers in order to successfully assign parentage in a single cohort resulting from the reproduction of 40 broodstock reared under common conditions over 4 years. Heritability estimates were obtained for a large number of production traits, indicating that individual selection of live weight when 42-month-old would lead to significant gains. A selective breeding program suitable for France Haliotis production system has been proposed to improve the weight at 4 years. The analysis of genetic correlations suggest that a multi-criteria and selective breeding program to improve growth, meat yield and to control reproductive allocation could also be established, but would be more complex to implement.

Key words : Selective Breeding, abalone, growth, physiology, behaviour.