

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

THÈSE DE DOCTORAT

(Spécialité : Océanologie Biologique)

Présentée par

Martha Rosalia Enríquez-Díaz

Pour obtenir le titre de Docteur de
l'Université de Bretagne Occidentale

Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Soutenue le 23 juin 2004 devant la commission d'examen :

Marcel LE PENNEC,	Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France	Directeur de Thèse
Stéphane POUVREAU,	Chercheur IFREMER Argenton, France	Directeur scientifique
Carlos CACERES-MARTINEZ,	Professeur à l'Université Autonome de Basse Californie Sud, La Paz, B.C.S., Mexique	Rapporteur
Philippe GOULLETOUER,	HDR, Directeur de laboratoire IFREMER - La Tremblade, France	Rapporteur
René ROBERT,	HDR, Chercheur IFREMER - Argenton, France	Rapporteur
Jacques CLAVIER,	Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France	Examineur
Jean Claude COCHARD,	Chercheur IFREMER – Taravao, Tahiti, - Polynésie française	Examineur

à mes chers parents...

à mes sœurs et frères

à Carlitos

à Ger

Quand vous dites : « Telle chose est supportable au sage, telle autre ne l'est pas », vous mettez des limites déterminées à sa grandeur d'âme ; vous avez tort.

Sénèque

De la constance du sage

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance au Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Mexique (CONACyT) pour m'avoir accordé une bourse pour la réalisation de mes études de doctorat à l'Université de Bretagne Occidentale, France.

Je souhaiterais remercier en premier lieu et conjointement messieurs, Dr. Marcel Le Pennec, professeur à l'UBO, et Dr. Stéphane Pouvreau, chercheur à l'IFREMER, pour avoir dirigé ma thèse et m'avoir prodigué leurs conseils.

Je tiens à remercier la disponibilité des membres du jury messieurs, Dr. Philippe Gouletquer, Dr. René Robert et Dr. Carlos Cáceres qui ont accepté de lire et de critiquer ce manuscrit en qualité de rapporteurs, ainsi que Dr. Jacques Clavier et Dr. Jean Claude Cochard qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens également à remercier messieurs Dr. Jean Claude Cochard, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins à l'IFREMER/Brest, et Dr. Jean François Samain, pour m'avoir permis de collaborer dans le programme MOREST.

J'aimerais également remercier l'ensemble de techniciens et stagiaires d'Argenton qui ont su m'apporter en toutes circonstances leur soutien et avec qui j'ai eu le plaisir à travailler. Aussi, je remercie toutes les personnes des différents centres IFREMER (Brest, La Tremblade, La Trinité sur Mer, Port en Bessin) et de l'Université de Caen, qui ont participé de loin ou de près au développement de cette thèse.

J'ai un merci spécial à Stéphane Pouvreau, pour tout le temps dédié à cet étude.

Je voudrais remercier la famille Le Pennec, Marcel, Josiane et Gaël pour leur accueil, leur amitié et les bons dîners chez eux. Également, je remercie Jorge, Gude, Koke et Lalo Chávez, pour leurs accueils dès mon arrivé en France, pour leurs amitiés et leurs conseils.

J'ai une grand reconnaissance envers mes amies Analbery Monteiro, Tanja, Breining, Anna Cébula, Marie Prudence, Leila Hamida, Maria Pita-Siebert, Sandrine Lorient, Hélène Moussard, Élodie Coquard et bien sur, mes amis Loïc Kersaudy, Bertrand Le Roy, Pierrick Le Souchu, Luis Fidalgo, Humberto Bracamontes, Jimmy Andriamizeza et Julien Pommier. Mille merci à Carlos Pallares pour sa patience, son hospitalité et son amitié.

Finalement, je fais un grand merci à Gerardo Gutiérrez-Sánchez, qui m'a accompagné tout au long de cette aventure en France, qui m'a soutenue dans des moments les plus difficiles, et avec qui j'ai partagé de ci beaux paysages, tant en Amérique qu'en Europe.

SOMMAIRE

Introduction générale

L'ostréiculture française	1
Tonnage et production	2
Le problème des mortalités estivales de <i>Crassostrea gigas</i> et le programme MOREST	4
La maîtrise de la reproduction et la production en écloserie	5
Objectifs de la thèse	6

Synthèse

A. Mise en évidence de la variabilité de la gamétogenèse

1. Synthèse bibliographique	9
1.1 Généralités	9
1.2 Revue bibliographique	10
1.3 Notre action de recherche	16
2. Approche <i>in situ</i>	17
2.1 Préliminaire	17
2.2 Matériels et méthodes	17
2.2.1 Les sites d'étude, les prélèvements et la biométrie	17
2.2.2 L'analyse histologique	19
2.2.3 L'analyse qualitative	20
2.2.4 Les analyses quantitatives	21
2.3 Résultats	22
2.3.1 La croissance et la sex-ratio	22
2.3.2 La gamétogenèse: approche qualitative	23
2.3.3 La gamétogenèse: approche quantitative	24
2.4 Discussion	27
2.4.1 La méthodologie	27
2.4.2 La flexibilité dans la gamétogenèse	28
3. Approche expérimentale	30
3.1 Préliminaire	30
3.2 Matériels et méthodes	30
3.2.1 La population expérimentale	30
3.2.2 Le conditionnement	31
3.2.3 Le prélèvement et la biométrie	32
3.3 Résultats	33
3.3.1 La croissance	33

3.3.2 La gamétogenèse	33
3.3.3 L'analyse qualitative	33
3.3.4 Les analyses quantitatives	35
3.4 Discussion	38
3.4.1 Conclusions	40

B. Implication de la reproduction dans le syndrome des mortalités estivales

4. Synthèse bibliographique	41
4.1 Le phénomène des mortalités estivales	41
4.2 Bioénergétique et reproduction	42
4.3 Génétique et reproduction	45
4.4 Notre action de recherche	46

5. Aspects bio-énergétiques

5.1 Préliminaire	47
5.2 Introduction	47
5.3 Matériels et Méthodes	48
5.3.1 Matériel biologique et conditionnement des huîtres	48
5.3.1.1 L'acquisition des données écophysologiques	49
5.3.1.2 Les prélèvements	49
5.3.1.3 Le dispositif expérimental	49
5.3.2 Mesures écophysologiques	51
5.3.2.1 La filtration	51
5.3.2.2 L'efficacité d'absorption	52
5.3.2.3 La consommation d'oxygène	52
5.3.2.4 Le potentiel de croissance	53
5.4 Résultats	53
5.4.1 La filtration	53
5.4.2 La consommation	54
5.4.3 L'efficacité d'absorption	55
5.4.4 La consommation d'oxygène	56
5.4.5 Bilan énergétique et scope for growth	57
5.5 Discussion	59
5.5.1 Relations entre nourriture, écophysologie et gamétogenèse	59
5.5.2 Coût de la reproduction et mortalités estivales	62

6. Aspects génétiques

6.1 Préliminaire	63
------------------	----

6.2 Introduction	63
6.3 Matériels et Méthodes	64
6.3.1 L'origine des huîtres	64
6.3.2 Les prélèvements et la biométrie	64
6.3.3 L'histologie	64
6.4 Résultats	65
6.4.1 La croissance générale	65
6.4.2 La reproduction	65
6.5 Discussion	69
6.5.1 La reproduction chez <i>C. gigas</i> : une stratégie génétique-dépendante	69
6.5.2 Mortalités estivales	71
6.5.2.1 Des causes bioénergétiques liées à la gamétogenèse ?	71
6.5.2.2 Des causes bioénergétiques et infectieuses liées à l'émission des gamètes ?	72
6.5.3 Conclusion	73

CHAPITRE I

Gametogenesis, reproductive effort and spawning behavior of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy

Abstract	74
Introduction	76
Materials and Methods	77
Study sites, sampling and biometry	77
Histological analysis	79
Qualitative analyses	80
Quantitative analyses	80
Results	81
Somatic growth	81
Sex ratio	83
Gametogenic cycle: qualitative approach	84
Gametogenic cycle: quantitative approach	86
Discussion	89
Methodology	89
Flexibility in the gametogenic cycle	91
Effect of environmental factors on reproductive cycle	92
Conclusion	94

CHAPITRE II

Influence of food quantity on the reproductive behavior of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: an experimental approach

Abstract	97
Introduction	99
Materials et Methods	100
Experimental procedure	100
Experimental population and set-up	100
Conditioning	101
Sampling and biometry	102
Histological analysis	102
Qualitative analyses	103
Quantitative analyses	103
Statistical methods	104
Results	105
General growth	105
Reproductive cycle	107
Sex ratio	107
Qualitative analysis	108
Quantitative analysis	110
Discussion	114
Methodological approach	114
Food effect on gametogenic cycle	115
Food effect on spawning behaviour	116
Food effect on resorption period	117
Reproductive effort and energy allocation	118
Broodstock conditioning	119
Conclusion	119

CHAPITRE III

The cost of gametogenesis in *Crassostrea gigas*: an approach over a complete reproductive cycle

Abstract	122
Introduction	124
Materials and Methods	126
Biological material and oysters conditioning	126
Ecophysiological data acquisition	127

Sampling procedure	127
Experimental design	128
Ecophysiological data processing	129
Clearance rate	129
Absorption efficiency	130
Oxygen consumption rate	130
Scope for growth	131
Statistical analysis	131
Results	132
Clearance rate	132
Consumption rate	132
Absorption Efficiency	133
Oxygen consumption rate	134
Bio-energetic and Scope For Growth	135
Discussion	138
Relationships between feeding, metabolism and gametogenesis	138
Cost of reproduction and summer mortality	140

CHAPITRE IV

Reproduction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Evidence of a genotype-dependent strategy

Abstract	143
Introduction	145
Materials and Methods	146
Oysters origin	146
Sampling and biometry	147
Histology	147
Qualitative analysis: sex ratio and histological stage	147
Quantitative analysis: gonadal area and oocytes size frequency	148
Statistical analysis	149
Results	149
General growth	149
Sex ratio	151
Reproductive cycle	152
Qualitative analysis	152
Quantitative analysis	154
Discussion	157
Evidence of a genetic-dependent strategy	157

Reproductive behavior and summer mortality	158
Bio-energetic reasons	158
Post-spawning reasons	160
Implication in term of genetic selection	160
Conclusion	161

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale	
Méthodologie	163
Histologie	163
Ecophysiologie	163
Cycle reproducteur	163
Dans le milieu naturel	164
En milieu contrôlé	164
Ecophysiologie	165
Génétique	166
Mortalités estivales	166
Perspectives	167

Bibliographie

Annexes

I. La détermination des sexes et le stade de maturation	184
II. Estimation de la biomasse gonadique	185
III. Détermination de l'aire d'occupation de la gonade	186
IV. Détermination de la taille des ovocytes	187
V. Répertoire des tableaux	188
VI. Répertoire des figures	189

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'ostréiculture française

Le littoral français a été propice à l'établissement de divers gisements d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, qui ont été exploités intensément, par simple collecte à marée basse, pendant des siècles.

L'ostréiculture des huîtres creuses a commencé en France en 1867 avec l'arrivée accidentelle de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, dans l'estuaire de la Gironde. Les individus les plus résistants s'acclimatèrent et s'y reproduisirent, puis supplantèrent rapidement l'huître plate indigène, *Ostrea edulis*. Ainsi, près d'un siècle plus tard, au début des années 1960, la production d'huîtres creuses portugaises atteignait 100 000 tonnes et celle de l'huître plate n'était que de 15 000 tonnes. Cependant, *C. angulata* a aussi été victime d'une épizootie, la maladie des branchies, infection virale engendrée par un agent pathogène de type iridovirus, qui provoqua le déclin de cette espèce et sa disparition dans les années 1970 (Deslous-Paoli, 1982 ; Grizel et Héral, 1991).

Devant cette nouvelle catastrophe économique, le Comité National de la Conchyliculture a pris la décision d'introduire, en vue d'un élevage intensif, une autre espèce capable de résister à ces maladies : l'huître asiatique *Crassostrea gigas*, Thunberg (1975). De ce fait, l'introduction de l'huître, dite japonaise (Japon, Chine, Corée), a permis la reprise de l'ostréiculture. Dans ce but, des géniteurs furent importés du Canada et des naissains collés sur des coquilles, à partir du Japon (Grizel et Héral, 1991). Progressivement, la culture de l'huître creuse japonaise s'est développée sur tout le littoral français et, en quelques années, la production de *C. gigas* a largement suppléé celle de *O. edulis*, d'autant que cette dernière a dû faire face à des agressions de pathogènes, à la fin des années 1960 et 1970, avec le protozoaire parasite du système digestif *Martelia refrigens* et le protozoaire parasite des cellules sanguines, *Bonamia ostreae* (Grizel et Héral, 1991).

La majeure partie (80 %) de l'approvisionnement en naissains se fait en milieu naturel par captage pendant l'été. Deux sites sont principalement concernés: Arcachon et Marennes-Oléron. Les naissains sont collectés sur divers substrats. Ceux, traditionnellement faits de pierres ou de tuiles, sont aujourd'hui remplacés par des collecteurs en plastique. Après 6 à 18 mois selon la croissance, les juvéniles sont détachés des collecteurs. Les jeunes huîtres sont grossies dans les bassins de production depuis la Basse-Normandie jusqu'en Méditerranée. Les techniques d'élevage sont diverses selon la région, mais se résument à trois procédés : soit les animaux reposent sur le sol, soit ils sont disposés dans des poches en plastique ajouré, fixé sur des tables de fer ou ils sont collés par leur coquille sur des cordes. Après 2 à 4 années, les huîtres atteignent un poids de 70 grammes à partir duquel elles peuvent être commercialisées. A Marennes-Oléron, elles sont affinées en claires où une diatomée, *Navicula ostrearia*, provoque le verdissement des branchies, ce qui leur vaut d'être commercialisées à un prix plus élevé.

Tonnage et Production

La production mondiale d'huîtres creuses a été estimée à 4 406 millions de tonnes en 2001 (FAO, 2004) et l'huître est actuellement la première espèce animale produite par aquaculture. Plus de 96,5% des huîtres produites dans le monde viennent de cinq pays: La Chine, Le Japon, Les Etats Unis, La Corée et la France (fig. 1).

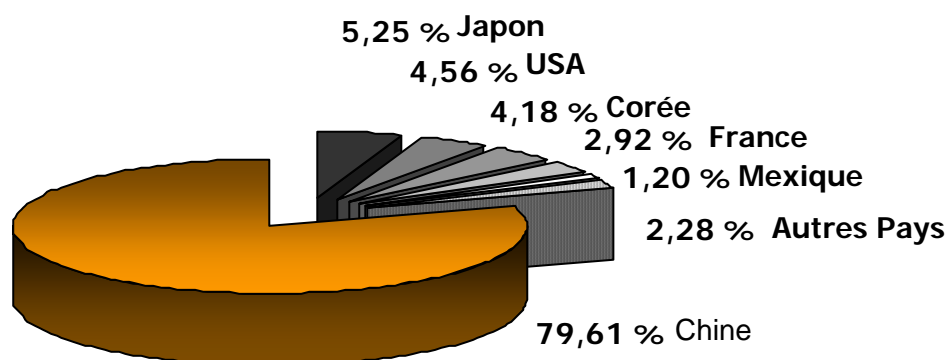


Figure 1. Production mondiale d'huîtres en 2001. Pays ayant une production supérieure à 52 000 tonnes (FAO, 2004).

Le tableau 1 retrace l'évolution de la production d'huître creuse en France, dans les différentes régions productrices. Depuis trois ans, le volume de production est stable, autour de 128 000 tonnes. La figure 2 indique la production française d'huître creuse par sites producteurs en 2003 (CNC, 2004).

Tableau 1. Évolution de la production (tonnes) de *Crassostrea gigas* en France (CNC, 2004)

SITES	1986	1999	2002
Normandie	10 200	30 000	27 000
Bretagne Nord	6 200	15 000	16 000
Bretagne Sud	10 600	15 000	20 000
Pays de la Loire	19 000	25 000	18 000
Poitou-Charente	40 000	35 000	25 000
Aquitaine	11 000	14 000	10 000
Méditerranée	7 800	10 000	10 500

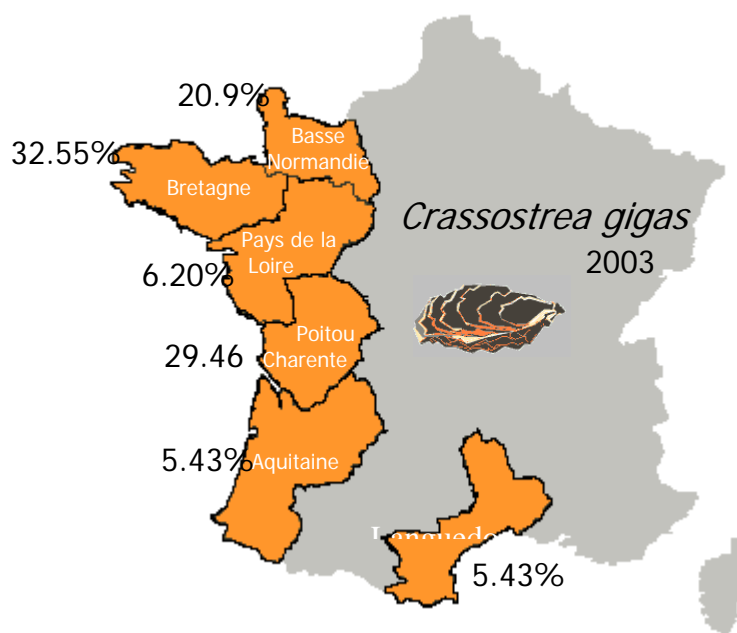


Figure 2. Sites de production de *Crassostrea gigas* en France (Barret, 2001; CNC, 2004).

Le problème des mortalités estivales de Crassostrea gigas et le programme MOREST

Des mortalités estivales de 10% à 60%, affectent l'huître japonaise, depuis une dizaine d'années, dans plusieurs sites tout au long de la côte atlantique. Les causes exactes de ce phénomène ne sont pas encore clairement élucidées et les causes sont d'origine multifactorielles. Différentes hypothèses parfois contradictoires sont invoquées: 1) la capacité trophique des bassins d'élevage en raison de l'augmentation accrue dans les années 1980-1990 de l'activité ostréicole; 2) une détérioration progressive due à la pollution organique (agriculture intensive) et chimique (rejets industriels); 3) une eutrophisation accrue entraînant un dérèglement de la gamétogenèse.

D'une façon générale, il ressort cependant que les forts évènements de mortalités se produisent généralement quelques semaines pendant l'été quand les huîtres sont en pleine période de reproduction. Cette période est en effet considérée comme difficile pour les animaux : en état reproductif, l'organisme de l'huître est plus sensible aux infections par des pathogènes lorsque le milieu environnant est défavorable. Notre étude s'est donc concentrée

sur cette période clés en essayant d'analyser les besoins physiologiques que cette espèce présente au cours de sa saison de reproduction: de l'initiation de la gamétogenèse à l'émission et éventuellement la régression des gamètes.

Ce travail s'inscrit pour partie dans le programme MOREST, dont le responsable IFREMER est le DR JF samain. Ce programme est ciblé sur l'étude des mortalités estivales des juvéniles de *Crassostrea gigas*, compte tenu de l'impact économique de ce bivalve marin. Cette problématique nationale, abordée par différentes équipes de recherche, en différentes régions ostréicoles, a débuté en 2001 et se poursuivra jusqu'à la fin 2005. Jusqu'à présent, la responsabilité d'un agent pathogène n'a pas clairement été démontrée, c'est pourquoi l'hypothèse actuelle qui est retenue par les biologistes travaillant dans ce programme est que ces mortalités sont le résultat d'interactions entre l'environnement, l'hôte et les pathogènes. C'est pourquoi MOREST fédère des études dans différentes disciplines comme la génétique, la physiologie, l'immunologie, la pathologie, l'écotoxicologie. En outre, des structures professionnelles y sont impliquées. A terme, ces travaux permettront de fournir des mesures pouvant réduire les mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas* (Samain, 2003).

La maîtrise de la reproduction et la production en écloserie

Une petite partie de l'approvisionnement en naissain (20%) provient des écloséries françaises (au nombre de 6). Les techniques de production de naissain sont satisfaisantes mais reposent encore sur des bases empiriques. Le conditionnement des géniteurs, par exemple, ne peut se faire toute l'année et le succès n'est pas systématiquement garanti. Aussi, en focalisant sur la reproduction, ce travail souhaite aussi fournir des éléments supplémentaires utiles aux écloséries. Cette thèse s'inscrit donc dans un programme de collaboration entre organismes : le GDR « reproduction de l'huître creuse », dont le responsable IFREMER est le Dr Jean Claude Cochard et le responsable LEMAR est le Pr Marcel Le Pennec.

Objectifs de la thèse

Afin de pouvoir déterminer et comprendre les causes externes de la variabilité des gamétogenèses chez *C. gigas* (fig. 3), nous nous sommes fixé plusieurs objectifs:

(1) Premièrement, il nous a fallu mettre au point une méthodologie permettant d'estimer quantitativement le développement des gamétogenèses males et femelles et donc l'effort que consacre cette espèce à sa reproduction. Pour cela, le meilleur indicateur nous a semblé être la mesure de l'aire occupée par le tissu gonadique. Pour mener à bien cette mesure sur une espèce à gonade diffuse telle que l'huître et afin de quantifier l'évolution respective des compartiments gonadiques au cours de la gamétogenèse, l'utilisation couplées de techniques d'histologie et d'analyses d'image est nécessaire.

(2) Ensuite, nous avons pu appliqué cette méthodologie comme outil commun d'analyse sur différentes populations placées dans différents environnements afin d'essayer de comprendre la variabilité de la réponse reproductive de *C. gigas* élevée en milieu naturel et en milieu contrôlé.

Ainsi, en milieu naturel, nous avons réalisé des suivis sur trois sites ostréicoles: le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime), la rivière d'Auray (Morbihan) et la baie des Veys (Basse-Normandie).

En condition contrôlée, un cycle de reproduction 'artificiel' a été mis en place sur une base annuelle à la Station Expérimentale d'Argenton. En outre, il a permis l'analyse des fonctions écophysiologiques au cours d'un cycle de gamétogenèse, chose impossible à l'heure actuelle en condition *in situ*.

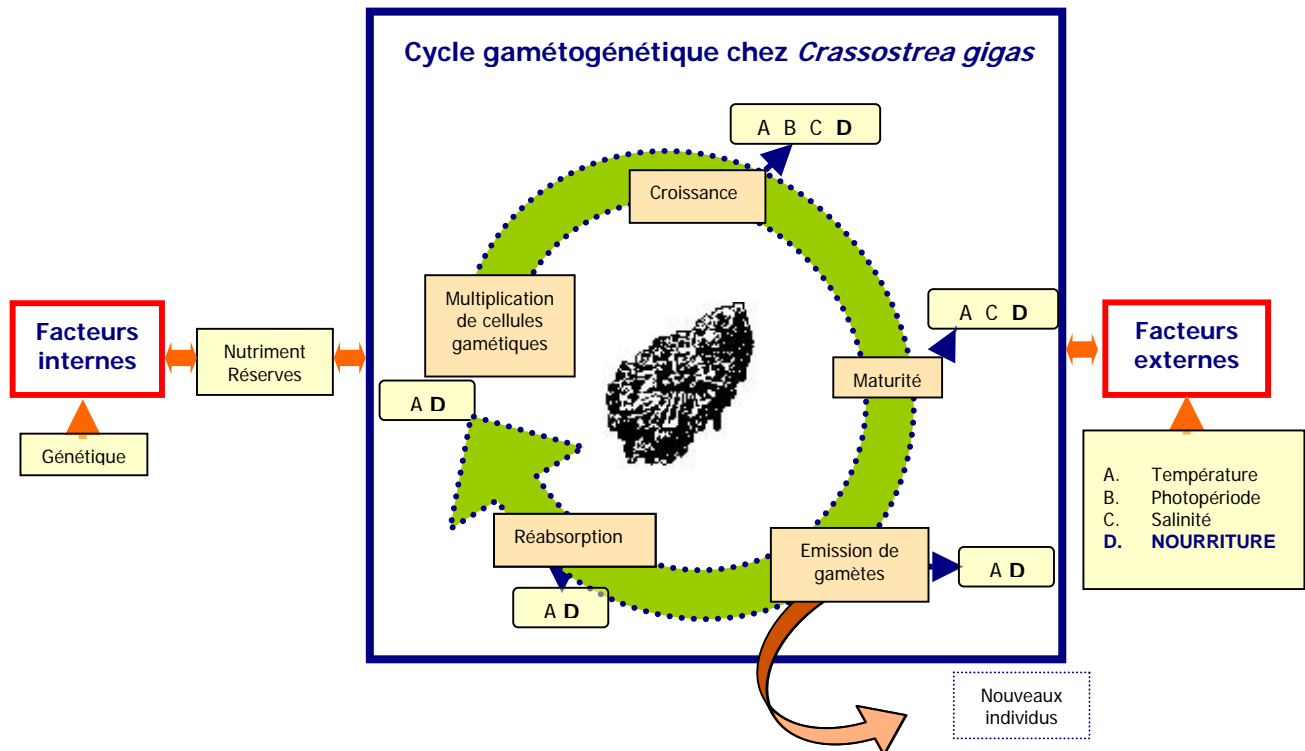


Figure 3. Représentation schématique des principaux facteurs internes et externes rapportées dans la littérature qui interviennent dans le processus de reproduction chez l'huître creuse.

Nous espérons que les résultats apportés par ces recherches permettront une meilleure optimisation des techniques de conditionnement des géniteurs en éclosérie. Lors de travaux antérieurs, deux paramètres ont été testés (Lango-Reynoso, 2000 et Chávez-Villalba, 2001) : la température et la photopériode et, pour compléter l'étude des paramètres (l'impact des facteurs extérieurs), nous montrerons ici comment la nourriture inter-agit sur la quantité de gamètes que peut produire une huître.

Aussi, dans le cadre du programme MOREST, nous essayons d'apporter des clés permettant de comprendre les mécanismes de l'allocation d'énergie pendant la période reproductive, époque où les phénomènes des mortalités estivales se mettent en place.

Ainsi, en dehors de la partie introductive, ce mémoire de thèse comprend une synthèse, quatre chapitres et une conclusion :

(1) Dans la synthèse, deux parties sont traitées : dans la première, nous rappellerons la bibliographie traitant du cycle de reproduction de *C. gigas* et les résultats obtenus sur des expériences menées tout au long de ce travail, en milieu naturel ou contrôlé. La deuxième partie porte sur la variabilité génétique et la bioénergétique de la reproduction, en apportant des résultats utiles pour analyser le rôle de la reproduction dans le syndrome des mortalités estivales. Nous donnerons en outre un résumé des principaux résultats obtenus tout au long de nos recherches.

(2) Les chapitres 1, 2, 3 et 4 sont écrits sous forme d'articles scientifiques afin de faciliter leur soumission pour publication. Dans les chapitres 1, 2 et 4, le cycle reproductif de *C. gigas* est suivi. L'influence de facteurs hydrobiologiques (chapitre 1), l'effet de la quantité de nourriture (chapitre 2) et les facteurs génétiques (chapitre 4) sont évalués sur le processus de développement gonadique (période d'émission de gamètes, effort de reproduction, période de régression). Le chapitre 3 traite plus spécifiquement du bilan énergétique de l'huître en rapport avec l'acquisition de la nourriture et la période reproductive.

(3) Dans la conclusion, nous reprenons les principaux résultats obtenus afin de montrer comment ils apportent de nouvelles améliorations pour le conditionnement des géniteurs en écloserie et, d'autre part, et comment ils mettent en évidence les facteurs susceptibles d'influencer la survie de l'huître creuse dans le milieu naturel.

SYNTHESE

A. Mise en évidence de la variabilité de la gamétogenèse

A. Mise en évidence de la variabilité de la gamétogenèse

1. Synthèse bibliographique

1.1. Généralités.

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, à l'instar de beaucoup d'autres organismes ectothermes, la plupart des étapes spécifique du cycle de la vie, *i.e.* le développement, la croissance et la reproduction, sont intimement liées aux phénomènes de saisonnalité, *i.e.* aux changements de conditions physiques et de disponibilité en nourriture.

On s'accorde à admettre que la température est un facteur déterminant de la reproduction, notamment au niveau de la gamétogenèse, de la fécondité et sur du développement larvaire. La température affecte aussi toutes les autres fonctions biologiques de l'huître telles que l'alimentation, la respiration, l'utilisation des réserves et la croissance. Outre des variations de température, les huîtres subissent aussi l'action d'autres facteurs environnementaux tels que les variations de nourriture, de turbidité, de concentration en oxygène, de salinité, de pH....

Plus spécifiquement, et en ce qui concerne la reproduction, deux paramètres hydrobiologiques jouent un rôle déterminant : la température et la nourriture. Ainsi, les faibles températures et le manque de nourriture inhibent la gamétogenèse (Stelle et Mulcahy, 1999 ; Ruiz et al., 1992).

L'étude de l'écophysiologie de la reproduction des bivalves marins est fondée sur l'analyse des corrélations existant entre les variations d'un ou de plusieurs facteurs du milieu (température, nourriture, salinité, etc.) et certains événements caractéristiques du cycle reproductif (initiation de la gamétogenèse, maturation, émission de gamètes, régression...).

Les observations laissent montrer que la durée de la gamétogenèse, l'intensité des émissions de gamètes et la présence d'une période de régression varient d'un site de culture à l'autre.

1.2. Les données de la bibliographie

La température est considérée comme le facteur principal affectant le développement gonadique chez les bivalves marins. Plusieurs études, chez *C. gigas*, ont été réalisées afin de mettre en relation la gamétogenèse et la température du milieu ambiant (Mann, 1979; Deslous-Paoli *et al.*, 1982; Muranaka et Lannan, 1984; Chávez-Villalba *et al.*, 2003a). Il est désormais admis que les périodes de gamétogenèse et d'émissions gamétiques sont directement sous la dépendance de la température de l'eau. L'action de ce paramètre sur l'organisme induit différentes réponses selon la période de reproduction.

Lubet (1976) et Chávez-Villalba *et al.* (2003a) ont observé l'initiation de la gamétogenèse chez *C. gigas* à partir d'une température minimale de 8-9°C en Manche et, en particulier, de 10°C en baie des Veys. Ce phénomène est également fonction de la localisation géographique (Deslous-Paoli *et al.*, 1982; Perdue et Erikson, 1984; Dinamani, 1987; Ruiz *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'émission des gamètes est induite par une valeur seuil de température (> 19-20°C). Bien évidemment, cette valeur est atteinte différemment selon la région de culture, et donc la période d'émission de gamètes peut être plus ou moins retardée, voire inexistante. Néanmoins, il a toujours été observé que la période de libération des gamètes a lieu au cours de la période estivale (tableau 2), période à partir de laquelle généralement la température de l'eau, la disponibilité trophique et la salinité assurent le bon développement et la survie des larves.

Plus précisément, en conditionnement, Mann (1979) a observé qu'une température absolue minimale est nécessaire pour déclencher l'émission des gamètes et que cette température est plus haute que celle exigée pour stimuler la gamétogenèse. En général, cette dernière démarre au printemps à une température supérieure à 10°C en moyenne et

les gamètes sont émis en période estivale (généralement en juillet), entre 18 et 20°C. En conséquence, la vitesse et la durée du cycle reproductif paraissent être fortement influencées par la température. Paniagua-Chávez et Acosta-Ruiz (1995) ont observé que des températures considérées comme basses (17,5°C) à La Boca, au nord du Mexique, ont empêché une émission massive de gamètes de *C. gigas*, de même que Steelle et Mulcahy (1999) ont observé que, même si les huîtres en Irlande arrivent au stade de maturation, elles ne pondent pas en raison d'une température trop basse (17,5°C). Le même constat (Chavez-villalba *et al.*, 2001) peut être dressé pour les sites producteurs de la région des Abers (Finistère Nord).

En général, le cycle reproductif de *C. gigas* présente un caractère saisonnier avec des périodes de gamétogenèse et des périodes d'émissions de gamètes (fraie) bien précises, commun à celui de beaucoup d'autres invertébrés marins des environnements tempérés. Ces différentes périodes impliquent des phases bien identifiées que sont : i) le stockage hivernal (facultatif) de réserves (sous forme de glycogène) pour soutenir la gamétogenèse printanière; ii) la prolifération et la différenciation des cellules sexuelles; iii) la maturation des gamètes; iv) l'émission des gamètes matures et; v) une éventuelle résorption des gamètes non émis (appelé abusivement 'régression') pour permettre un rétablissement du cycle et/ou une période courte de repos (*e.g.* Berthelin *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque les températures augmentent au printemps, l'épithélium germinal prolifère puis le développement et la maturation des gamètes commencent. Chez les femelles, la mise en place de la vitellogenèse et la présence de gamètes à maturité sont concomitantes dans les acini gonadiques avant la période de libération des gamètes. Chez les mâles, on peut observer tous les stades cellulaires en cours de printemps dans le même acini. Mais plus la période estivale arrive, plus les acini sont remplis de gamètes matures. Après l'émission des gamètes, les follicules se rétrécissent et sont envahis par des cellules (phagocyte) qui résorberont les gamètes non émis, surtout dans le cas d'émissions partielles. Il s'en suit

généralement une période de 'repos' sexuel, où l'accumulation de nouvelles réserves en glycogène a lieu.

Tableau 2. Principales données de la littérature concernant la reproduction chez *Crassostrea gigas* en condition naturelle. P= protéines, L= lipides, G = Glucides

Etudes	Site	Durée de l'étude	Histologie	Biochimie	Période d'émissions gamétiques
Ren <i>et al.</i> , 2003	Marlboroug Sounds Nouvelle Zélande	Juin 98- Janv 2000	Qualitative Quantitative	P, L, G	
Chávez-Villalba <i>et al.</i> , 2001	Aber Benoît France	Dec 98 – Janv 2000	Quantitative		Septembre – Octobre
Berthelin <i>et al.</i> , 2000	Marennes-Oléron France	Janv - Dec 97	Qualitative Quantitative	P, L, G	Juillet - Août
Li <i>et al.</i> , 2000	Onagawa bay Japon	Avril – Oct 95		P, L, G	Août – Septembre
Lango-Reynoso <i>et al.</i> , 2000	Rade de Brest France	Fév 96 – Fév 98	Qualitative		Juillet
Lango-Reynoso <i>et al.</i> , 1999	Rade de Brest, Marennes-Oléron France	Fév 96 – Fév 98	Qualitative		Juillet
Massapina <i>et al.</i> , 1999	Algarve Portugal	Avril – Sept 95	Qualitative	P, L, G	
Steele et Mulcahy, 1999	Cork, Dungarvan Irlande	Avril 96 – Dec 97	Qualitative		Août
Barber, 1996	Chesapeake bay USA	Mars – Oct 92	Qualitative		Juillet – Août
Paniagua-Chávez & Acosta-Ruiz, 1995	La Boca, Mina Vieja Mexique	Avril 85 – Mars 86	Qualitative		Août – Septembre
Ruiz <i>et al.</i> , 1992	Galice Espagne	Sep 88 – Déc 89	Qualitative	P, L, G	Juin - Juillet
Dinamani, 1987	Northland Nouvelle Zélande	Nov 83 – Déc 84	Qualitative		Octobre – Décembre
Maurer et Borel, 1986	Bassin d'Arcachon France	Mars 83- Mars 84		L, G	Juillet
Perdue & Erickson, 1984	Washington State USA	Mars – Oct 81	Qualitative	Glucides	Août
Deslous-Paoli <i>et al.</i> , 1982	Marennes-Oléron	1979 – 1981		P, L, G	Juillet
Neudecker, 1981	German Baltic Sea Allemagne	1976 – 1977	Qualitative		Été
Mori, 1979	Matsushia Bay Japon	1963 – 1966	Qualitative Quantitative	P, L, G	Juillet – Août
Yakovlev, 1977	Peter the Great Bay Japon	Janv 75 – Déc 76	Qualitative		Juillet

Ainsi, il apparaît clairement que la stratégie de reproduction chez *C. gigas* peut être considérée comme une véritable réponse phénotypique aux conditions environnementales. Cependant, la température a trop souvent été identifiée comme le seul facteur déterminant la gamétogenèse. L'huître creuse montre, pour sa reproduction, un déterminisme et des caractéristiques plus complexes, pour lesquels la nourriture semble jouer un rôle tout aussi prioritaire. Si les travaux dans ce domaine sont moins fréquents, il ressort néanmoins différents résultats concordants, que nous nous proposons de confirmer dans notre travail.

Ainsi, en milieu naturel, la reproduction semble sous la dépendance des efflorescences phytoplanctoniques saisonnières (Mori, 1979; Deslous-Paouli, 1982; Maurer et Borel, 1986; Kang *et al.*, 2000; Chávez-Villalba, 2001). Plus précisément, les principales actions où s'exerce l'alimentation sont les suivantes : i) Deslous-Paoli (1982) et Maurer et Borel (1986) suggèrent que la nourriture potentiellement présente en fin d'hiver et début de printemps joue un rôle prépondérant dans l'accumulation de réserves permettant la formation de gamètes; ii) Robinson (1992) et Chávez-Villalba *et al.* (2001) émettent l'hypothèse que la non-résorption des gamètes à la fin du cycle gamétogénétique est liée à une abondance de ressources trophiques qui retarderaient probablement le début du cycle reproductif suivant; et iii) dans le cas de zones trophiques très riches dite 'eutrophe' le développement gonadique de l'huître peut être amplifié menant à une hypertrophie de la gonade pouvant conduire à des désordres physiologiques (Mori, 1979; Kang *et al.*, 2000). En contre partie, une déficience dans la nourriture printanière peut retarder la maturation des gonades. Les conséquences sont alors un risque dans le décalage de la ponte (Deslous-Paoli *et al.*, 1982).

Cependant, d'un point de vue quantitatif, l'effet de la nourriture sur la reproduction reste encore trop peu connu pour permettre une bonne conceptualisation et donc un bon fonctionnement des modèles écophysologiques (Ren et Ross, 2001).

Bien sûr, en dehors des paramètres hydrobiologiques, d'autres facteurs vont aussi influencer la réponse reproductive. Ainsi, le rôle des réserves est avancé, bien que encore controversé. Si pour certains, la diminution du glycogène est lié à son utilisation pour la gamétogenèse (e.g. Deslous-Paoli, 1982 ; Berthelin et al., 2000 ; Li *et al.*, 2000), d'autres suggèrent que le glycogène est converti en glucose en réponse aux demandes métaboliques de plus en plus élevées, avec ou sans gamétogenèse (Maurer et Borel, 1986).

Le rôle des polluants est aussi à considérer comme pouvant affecter la croissance et le succès de la reproduction des bivalves marins (Neudecker, 1981; Steele et Mulcahy, 1999). Les cultures des huîtres à Cork Harbour, en Irlande, ont été affectées par des niveaux élevés de tributyl étain et par la prolifération du polychète *Polydora sp.* (Steele et Mulcahy, 1999). D'un point de vue pathologique, Barber (1996) a comparé le cycle gamétogénétique entre deux espèces d'huîtres, *C. virginica* et *C. gigas*, et a mis en évidence que la différence entre les cycles pouvait être corrélée à la différence de sensibilité aux infections parasitaires de *Haplosporidium nelsoni* et *Perkinsus marinus*. L'huître creuse serait plus résistante à ces parasitoses que *C. virginica*.

Parallèlement à la reproduction et au captage naturel, la production des écloséries commerciales est, elle aussi, saisonnière. Les premiers élevages larvaires sont réalisés en janvier à partir de reproducteurs conditionnés (Robert et Gérard, 1999). Le conditionnement de reproducteurs de bivalves décrit dans la littérature reste encore méconnu en plusieurs étapes (Lubet *et al.*, 1976; Le Pennec, 1998 ; Chávez-Villalba *et al.*, 2002; 2003a). Il consiste, pour l'essentiel, à placer des animaux adultes en conditions de températures estivales (19 à 24°C pour *C. gigas*) et à leur fournir une alimentation importante sous la forme d'un mélange de microalgues cultivées (Lubet *et al.*, 1976). Le temps nécessaire à l'obtention des gamètes dépend alors de la saison, mais aussi de l'état initial des reproducteurs. En milieu contrôlé, le développement des gonades et la maturation des gamètes ont peu été étudiés (Muranaka et Lanan, 1984). Seul des travaux très récents

(Chávez-Villalba *et al.*, 2001, 2002, 2003a,b; Uriarte *et al.*, 2004) fournissent une bonne description de la gamétogenèse de *C. gigas* en conditionnement (tab. 3).

Tableau 3. Données de la littérature concernant la reproduction chez *Crassostrea gigas* en conditions contrôlées. P= protéines, L= lipides, G = glucides

Etudes	Paramètre	Biochimie	Histologie
Uriarte <i>et al.</i> , 2004	Nourriture	P, L, G	
Chávez-Villalba <i>et al.</i> , 2003b	Température Nourriture	P, L, G	Qualitative Quantitative
Chávez-Villalba <i>et al.</i> , 2003a	Nourriture		Qualitative Quantitative
Chávez-Villalba <i>et al.</i> , 2002	Température Origine des huîtres		Qualitative Quantitative
Robinson, 1992	Température Salinité		Qualitative Quantitative
Whyte <i>et al.</i> , 1990	Nourriture	P, L, G	Quantitative
Muranaka et Lannan, 1984	Température Salinité Nourriture		Quantitative
Mann, 1979	Température	% Carbone % Nitrogène, G	Qualitative

1.3. Notre action de recherche

Notre travail se place dans la continuité d'un programme de recherche commun (GDR) à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) et à l'IFREMER portant sur la meilleure connaissance de la biologie de la reproduction de *C. gigas* et celui concernant l'optimisation du conditionnement de reproducteurs d'huîtres initiés par Lango-Reynoso (1999) et Chávez-Villalba (2001). Chávez-Villalba (2001) a étudié la variabilité de la réponse de la reproduction en fonction de la température. Afin de compléter son travail, nous nous sommes intéressés à cette même réponse en fonction de la quantité de nourriture. En effet, comme le montre la synthèse précédente, la stratégie de la reproduction adoptée par *C. gigas* est clairement sous la dépendance de deux facteurs environnementaux clés : la température et les conditions alimentaires.

Ainsi, au cours de notre étude, nous avons analysé la réponse reproductive de *C. gigas* aux variations d'un paramètre du milieu: la quantité de nourriture. Afin d'être la plus complète possible, notre approche, menée sur un cycle annuel, s'est réalisée à la fois en condition naturelle (sites conchylicoles de la baie des Veys et de Marennes-Oléron) et en condition contrôlée (Station Expérimentale d'Argenton).

La reproduction a été suivie à l'aide de méthodes d'histologie qualitative classique et d'histologie quantitative plus récente dites « stéréologiques ». Le développement gonadique chez *C. gigas* est, en effet, complexe à analyser en raison du caractère diffus de la gonade autour de la masse viscérale. L'évaluation de la croissance gonadique ne peut se faire qu'en distinguant les deux tissus dans une approche quantitative en utilisant des méthodes d'analyse d'images analogues à celles développées par Morvan et Ansell (1988) et plus complète que les approches semi-quantitatives proposées par Lango-Reynoso (1999), Heude-Berthelin (2000) et Chávez-Villalba (2001). L'approche qualitative classique a eu pour objectif de déterminer précisément les périodes d'émission des gamètes et de caractériser le cycle de reproduction de *C. gigas*. En parallèle, l'approche quantitative visait à quantifier les

différentes phases du cycle de reproduction: *i)* la mise en réserve intervenant pendant la période de repos sexuel; *ii)* la croissance gonadique proprement dite; *iii)* l'émission de gamètes et *iv)* la longueur de la période de régression. Systématiquement, ces suivis ont été associés à celui des paramètres environnementaux connus pour réguler l'activité reproductrice: les facteurs abiotiques (température et salinité) et biotiques (quantité et qualité nutritives). Les mesures environnementales de terrain nous ont été procurées par les Laboratoires Côtiers de l'Ifremer de Normandie et de Charente-Maritime.

2. Approche *in situ*

2.1 Préliminaire

Le travail réalisé est présenté en détail dans le chapitre I, intitulé "*Gametogenesis, reproductive effort and spawning behaviour of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: evidence of an environment-dependent strategy*". Une synthèse en français est fournie ci-après.

Dans cette étude, nous présentons, sur un cycle annuel, une approche quantitative de la gamétogenèse de l'huître *C. gigas* au sein de deux environnements géographiques différents, la baie des Veys (BDV) et le bassin de Marennes-Oléron (BMO). Ces deux sites ont été choisis en raison des fortes différences de conditions trophiques. En effet, la baie des Veys est eutrophe (Ropert, 1998) tandis que le bassin de Marennes Oléron se caractérise par une capacité de charge trophique limitée (Héral, 1989).

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Les sites d'étude, les prélèvements et la biométrie

Cette étude a été réalisée à partir de naissains produits à l'écloserie de Mollusques de La Tremblade/IFREMER, en février 2001, et pré-grossis pendant un an à la nurserie du Laboratoire Conchylicole de Bouin/IFREMER. En février 2002, les huîtres ont été séparées en deux groupes; le premier lot a été placé dans la partie sud du bassin de Marennes-Oléron en Charentes maritimes, tandis que le second l'a été dans la partie est de la baie des Veys en

Normandie (fig. 4). Ces deux emplacements ont des caractéristiques différentes: le bassin de Marennes Oléron, situé sur la côte atlantique, au nord de Bordeaux, est propice à la récolte de naissains et l'élevage des adultes (Soletchnik *et al.*, 1998). Cependant, les croissances sont relativement lentes car la capacité de charge de ce bassin est limitée. La baie des Veys, située du côté oriental de la Manche, est un endroit où la croissance des huîtres et les taux d'engraissement sont les plus forts observés en France (Ropert, 1998).

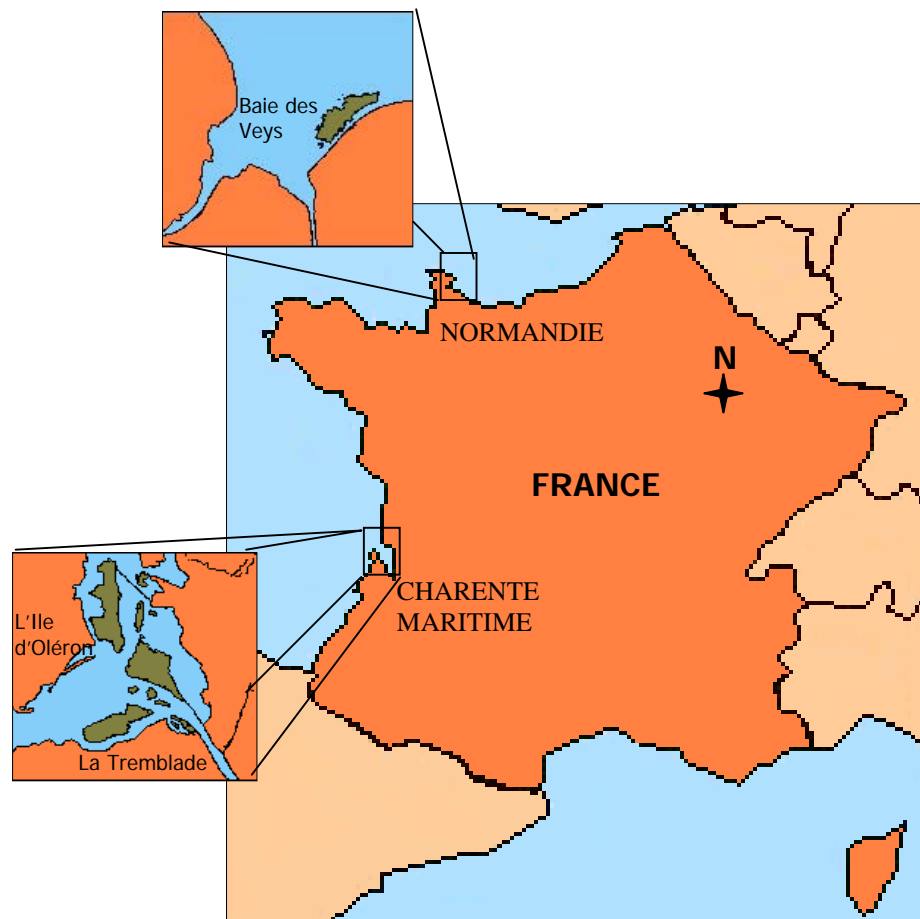


Figure 4. Localisation des sites d'étude: bassin de Marennes-Oléron (BMO) et baie des Veys (BDV).

■ Sites de culture

Le cycle reproducteur de *C. gigas* dans les deux baies a été suivi pendant un an, de mars 2002 à février 2003. Un échantillon a été régulièrement prélevé puis envoyé à la

Station Expérimentale d'Argenton (IFREMER), où la biométrie, les dissections et les analyses histologiques ont été réalisées. Les prélèvements ont été effectués mensuellement de décembre à avril, et tous les 15 jours de mai à novembre. A chaque prélèvement, dix huitres de chaque site ont été analysées (soit au total 188 huitres de BMO et 180 huitres de BDV).

La masse totale (coquille + chair) et la longueur de la coquille (axe antéro-postérieur) de tous les spécimens ont été déterminés. La masse (W) de chair totale a été estimée après égouttage. Après dissection, la masse de l'ensemble 'glande digestive + gonade' a été évaluée et notée MV(= masse viscérale) puis préparée pour l'analyse histologique.

Comme nous l'avons signalé, la gonade de *C. gigas* est diffuse autour de la glande digestive et mélangée au tissu de réserve. Par conséquent, les tissus reproducteurs et somatiques ne peuvent pas être correctement séparés (Heffernan et Walker, 1989; Urban et Riascos, 2002), induisant un risque d'erreur dans l'évaluation des paramètres quantitatifs de la gamétogenèse tels que l'index gonado-somatique ou la composition biochimique. Ceci nous a amené à développer une méthode quantitative spécifique pour estimer le développement de la gonade en nous référant aux préparations histologiques et à l'analyse d'image quantitative.

2.2.2 L'analyse histologique

Pour chaque huitre, la longueur de la masse viscérale a été mesurée, puis l'organe a été divisé en trois parties égales. Ces trois sous-échantillons ont été immergés dans la solution de fixation de Davidson (Shaw et Battle, 1957), déshydratés dans une série croissante de bains d'alcool et finalement inclus dans de la paraffine. Des sections de 5 μ m ont été réalisées en trois endroits précis du corps de l'animal (fig. 5) : le premier, ou section antérieure, a été réalisé juste après les palpes labiaux, le deuxième, ou section centrale, au centre de la masse viscérale, et le troisième ou section postérieure, juste en amont de la

cavité péricardique. Les coupes ont été colorées par l'hématoxyline de Harris et l'éosine Y d'après la méthode standard proposée par Martoja et Martoja-Pierson (1967).

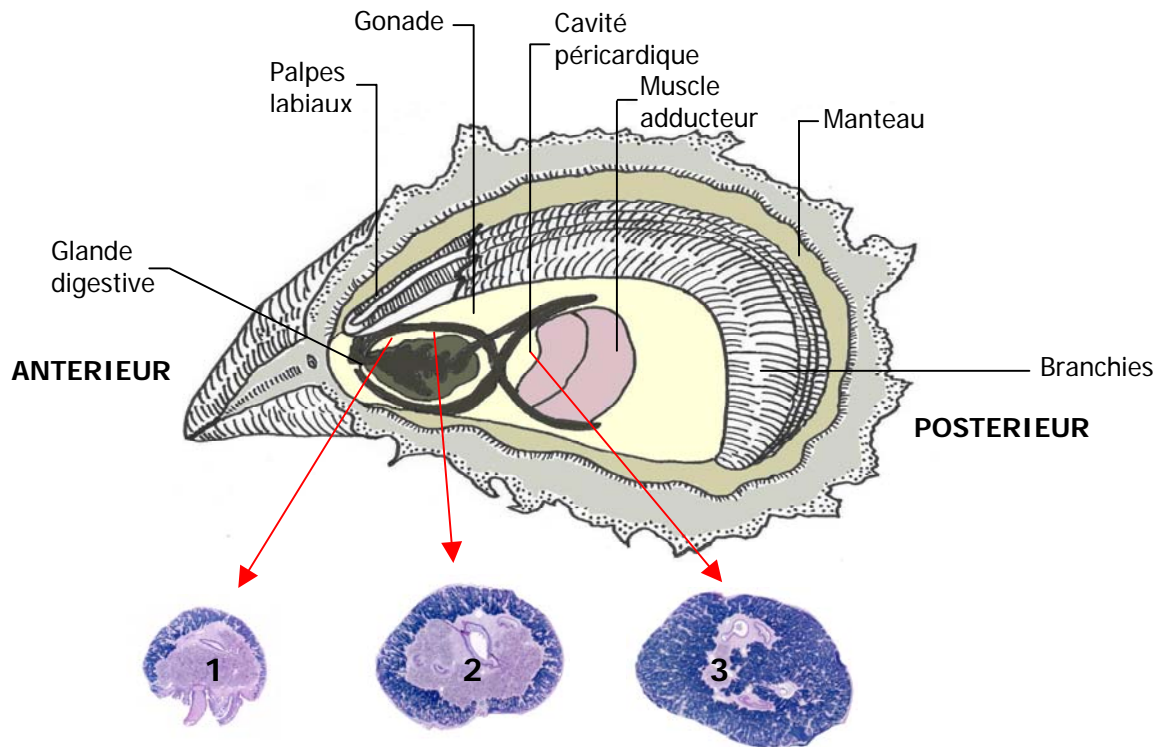


Figure 5. Dessin de *Crassostrea gigas* (adapté de Barillé *et al.*, 1997) situant les trois niveaux dans la masse viscérale où les coupes histologiques ont été effectuées. 1: section antérieure; 2: section médiane et 3: section postérieure. La direction des axes du corps a été prise d'après l'approche anatomique comparative proposée par Stasek (1963).

2.2.3 L'analyse qualitative

Des analyses qualitatives ont été réalisées sur chaque lame. Chacune a été examinée sous le microscope pour la détermination du sexe. La présence de spermatozoïdes, d'ovocytes ou l'absence de gamètes nous a permis de définir le sexe des individus en tant que mâles (m), femelles (f), hermaphrodites (hp) ou sexuellement indifférenciés (u).

Une échelle du développement gonadique a été utilisée et un niveau a été assigné pour chaque huître sur la base des descriptions proposées par Lubet (1959), Kennedy et Battle (1964) et Mann (1979) :

- **Stade 0** : phase de repos sexuel
- **Stade I** : initiation ou reprise de la gamétogenèse
- **Stade II** : développement intense des gamètes
- **Stade III** : période de maturité sexuelle
- **Stade IV** : émission des gamètes matures (ponte) et/ou résorption

2.2.4 Les analyses quantitatives

Les pourcentages d'occupation de la gonade et de la glande digestive (respectivement AG et GD) ont été déterminés sur chaque section histologique. Les lames ont été numérisées à l'aide d'un scanner digital (scanjet 7400c de HP). Les images ont été sauvegardées et stockées sous format tiff. Les différentes aires des tissus (AG et GD) ont été quantifiées en employant un logiciel d'analyse d'images (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.). La biomasse gonadique (BG) a été déterminée par extrapolation (principe de stéréologie établi par Versterby, 1993) comme suit:

$$BG = P_h \times AG / 100$$

où BG = biomasse gonadique en g (masse humide); AG = pourcentage moyen de tissu gonadique (moyenne des trois sections pour chaque individu) et P_h = masse humide de la masse viscérale (gonade + glande digestive, en g).

La production totale de la chair (P, en g) et de la gonade (Pr, en g) ont été calculées sur une base temporelle (entre t et t_1) selon :

$$P = W(t) - W(t_1) \text{ et } Pr = BG(t) - BG(t_1).$$

L'effort de reproduction (ER, en %) où la part de la production assignée à la gonade a été alors calculé comme suit :

$$ER = Pr/P$$

Par ailleurs, l'intensité de la ponte a été déterminée en analysant des échantillons juste avant ($ts_{.1}$) et après la ponte (ts). La production de gamètes (Prs , en g) a été estimée à partir des pertes de masse humide de la gonade, comme suit :

$$Prs = GB(ts) - GB(ts_{.1}).$$

La comparaison entre Pr et Prs nous permet de décrire la ponte comme étant partielle ou complète.

2.3 Résultats

2.3.1 La croissance et la sex-ratio

La croissance générale montre une augmentation progressive au cours de l'année. Le taux de croissance est d'environ $4,7 \text{ g.mois}^{-1}$ (*i.e.* $57,0 \text{ g.an}^{-1}$) pour BDV contre $2,5 \text{ g.mois}^{-1}$ (*i.e.* $30,0 \text{ g.an}^{-1}$) pour BMO. Les croissances de coquille et de chair montrent un schéma similaire d'évolution temporelle.

A Marennes Oléron, la sex-ratio parmi les 188 huîtres examinées est la suivante : 80 (soit 43%) étaient sexuellement indifférenciées (u), 48 (soit 25%) étaient de sexe femelle (f), et 59 (soit 31%) étaient de sexe mâle (m) soit une sex-ratio de 1F-1,22M. En Baie des Veys, cinquante-cinq parmi les 180 huîtres prélevées, (*i.e.* 31%) étaient sexuellement indifférenciées, 46 (25%) étaient femelles et 78 (43%) étaient mâles, soit une sex-ratio de 1F-1,69M. Néanmoins, la différence dans la sex-ratio entre les huîtres de BMO et BDV n'est pas significative sur une base annuelle ($p = 0,116$, $z = 1,198$, Z-test). Par contre, sur une base saisonnière, une grande variation est observée. Ceci peut s'expliquer par une prédominance des huîtres de sexe indifférencié en hiver alors que la sex-ratio est quasiment équilibrée en été. L'incidence des hermaphrodites est généralement limitée ($< 1 \%$). Sur la

base de la détermination du sexe, il semble évident que le cycle gamétogénétique s'initie plus tôt dans la saison à BMO qu'à BDV.

2.3.2 Gamétogenèse: approche qualitative

Sur une période annuelle, l'analyse histologique des gonades permet l'identification des cinq étapes typiques du cycle gamétogénétique (fig. 6). A Marennes-Oléron, les huîtres ont une activité gamétogénétique très faible (stade 0) au printemps. Les stades I et II sont observés en mai: de nombreux spermatocytes et ovocytes sont présents dans le tissu gonadique. Ils sont suivis du stade de maturation (stade III), s'étendant jusqu'à début août. Ce stade est caractérisé par un développement maximal des acini. L'émission des gamètes (stade IV) est observée de début juillet jusqu'en fin août. La résorption des gamètes a lieu à partir de septembre et s'achève en novembre. De décembre à février, les huîtres reprennent leur gamétogenèse (fig. 6). En Baie des Veys, 80% des huîtres sont sexuellement indifférenciées en mars. Les stades de croissance I et II sont tardifs, à partir de mars et jusqu'en juillet. En juillet et août, le reste de la population atteint le stade de maturation maximal. La libération de gamètes commence en août. Il est à noter que quelques huîtres en période d'émission des gamètes et aussi des huîtres matures sont observées ultérieurement. Des gamètes non émis sont retrouvés dans les gonades tout au long de l'hiver. De même, on peut noter la présence des stades de résorption et de repos au cours de cette période (fig. 6).

Dans les deux baies, l'activité gamétogénétique est clairement établie au cours de l'année avec un cycle reproducteur saisonnier bien défini. Le stade IV d'émission de gamètes et de résorption est clairement plus prolongé en Baie des Veys : il a lieu de l'été jusqu'à la mi-automne.

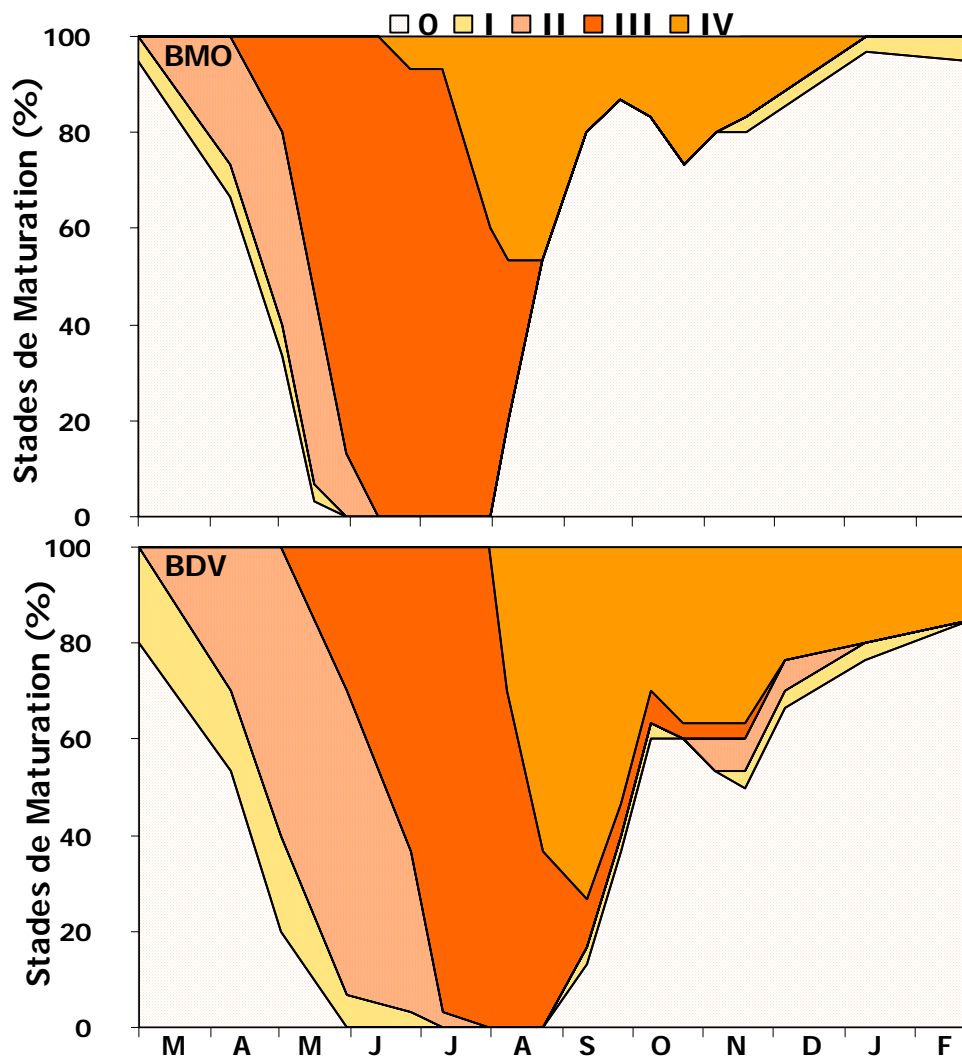


Figure 6. Variations saisonnières dans les stades de maturation chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV). 0 = Stade de repos sexuel; I= Reprise de la gamétogenèse; II= Développement des gamètes, III= Stade de maturité sexuelle, IV= Période d'émission de gamètes et/ou résorption.

2.3.3 Gamétogenèse: approche quantitative

Le pourcentage d'occupation gonadique dans la masse viscérale (AG) des huîtres, dans les deux baies, est de 20 à 30% jusqu'en mai. Il s'accroît en mai et juin (approximativement de 30 à 70%) avec des différences temporelles significatives entre les deux sites. Début juillet, dans le lot de BMO, le tissu de la gonade représente environ 74-

75% de la masse viscérale; le lot de BDV atteint la même valeur maximale un mois plus tard. En juillet, une légère réduction d'environ 10% affecte les huîtres de BMO, vraisemblablement en raison d'une émission partielle de gamètes. Cette diminution de tissu gonadique début juillet n'a pas été observé dans les huîtres de BDV. Début août, une seconde émission de gamètes accompagnée d'une diminution très rapide est observée dans le groupe BMO. Cette diminution rapide est retardée de deux semaines dans le groupe de BDV. Ces déclin rapides sont sans aucun doute le résultat d'une ponte complète et synchrone dans la population. En septembre, l'aire de la gonade est autour de 2% dans le groupe BMO contre 30% dans le groupe de BDV. Cette différence significative entre les deux baies ($p < 0,035$, test de Mann-Whitney) suggère une émission de gamètes complète dans le groupe de BMO et seulement partielle dans les huîtres de BDV (fig. 7).

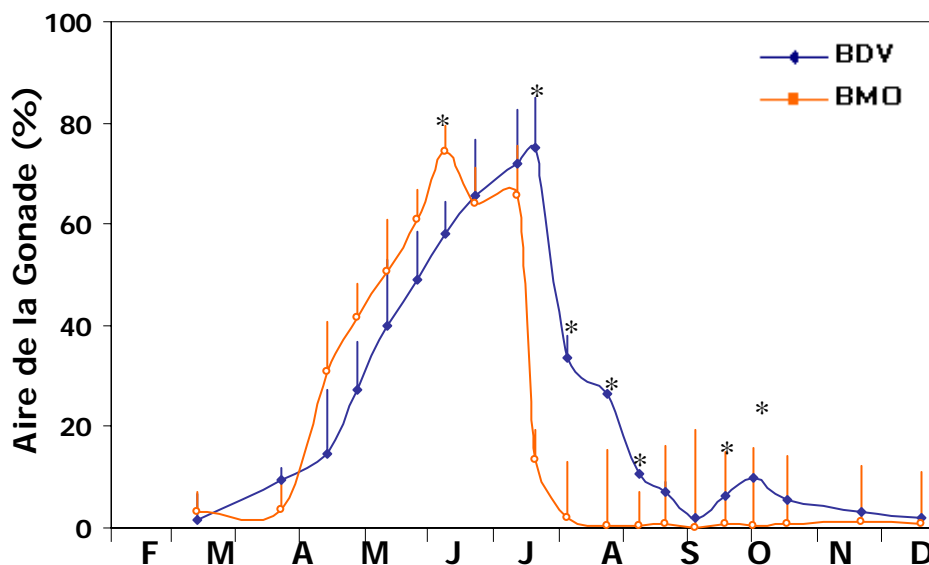


Figure 7. Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV) : (Moyenne \pm SD). * = différences significatives.

Sur la figure 8 on peut noter des différences significatives dans l'évolution de la biomasse estimée de la gonade (BG) entre les deux groupes d'huîtres. De mars à juin, les valeurs de BG sont semblables dans les deux sites de culture, mais, en juillet la croissance gonadique des huîtres de BMO s'arrête et stagne aux environs de $1,9 \pm 0,7$ g jusqu'à

l'émission de gamètes principale observée en août. En outre, chez les huîtres de BDV, la croissance gonadique continue en juillet jusqu'à atteindre environ $6,1 \pm 1,5$ g juste avant la libération totale de gamètes en août. De juillet à décembre, les différences dans la biomasse gonadique entre les deux sites sont statistiquement significatives ($p < 0,025$, test de Mann-Whitney).

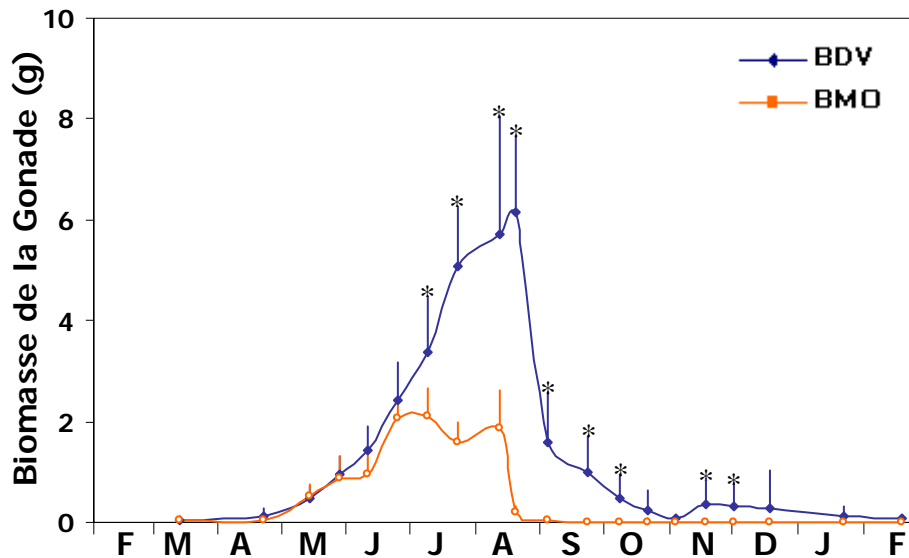


Figure 8. Variations saisonnières de la biomasse estimée de la gonade chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV) : (Moyenne \pm SD). * = différences significatives.

Ces données permettent d'estimer l'émission des gamètes, Prs, exprimée en g. Après la ponte principale d'août, la valeur moyenne de Prs est d'environ 1,8 g pour des huîtres de BMO contre 4,5 g pour les huîtres de BDV. En septembre, les gonades des individus de BMO sont complètement vides, tandis qu'approximativement 28% de gamètes restent dans les gonades des huîtres de BDV. Cette observation indique que l'émission de gamètes en BDV n'est pas complète et/ou non synchronisée. Sur une base annuelle, l'effort de reproduction calculé (ER, en %) est beaucoup plus élevé pour les huîtres de BDV que dans ceux de BMO, soit respectivement 86 et 53%.

2.4 Discussion

2.4.1 La méthodologie

Afin de surmonter la subjectivité des méthodes "qualitatives" généralement basées sur des critères du développement des stades de maturation utilisés pour des observations macroscopiques (Mason, 1958) ou microscopiques (Quayle, 1969; Yakovlev, 1977), plusieurs auteurs ont proposé des méthodes "quantitatives". Selon Barber et Blake (1991), l'approche la plus complète devrait, au moins, se fonder sur l'association de méthodes qualitatives et quantitatives.

Dans la présente étude, afin de compléter des données qualitatives, nous avons développé une méthode quantitative pour évaluer le cycle reproducteur des mâles et des femelles en nous basant sur l'observation de lames histologiques. Bien que la méthode fournit seulement la biomasse extrapolée de la gonade, sa précision est, néanmoins, suffisante pour donner une bonne description du cycle gamétogénétique et pour détecter des différences parmi les stocks d'huîtres dans les caractéristiques des émissions et dans la valeur de l'effort de reproduction.

2.4.2 La flexibilité de la gamétogenèse

D'un point de vue général, l'activité gamétogénétique des huîtres présente un caractère saisonnier clairement défini dans les deux sites de culture. Les données qualitatives de l'examen histologique des tissus prouvent que le cycle gamétogénétique est plus précoce et plus rapide chez les huîtres de BMO que chez celles de BDV, mais aussi en ce qui concerne la croissance, les stades de maturation et les émissions de gamètes. Dans le groupe de BMO, les premières huîtres ont émis leurs gamètes un mois plus tôt que dans le groupe de BDV. Les données quantitatives démontrent de fortes différences dans le cycle de développement des gamètes entre les deux groupes. Elles concernent principalement la

production de gamètes, les caractéristiques de ponte et la période de résorption des éléments sexuels restants. Ces décalages temporels sont à relier à la différence de température existants entre les deux baies (fig. 9).

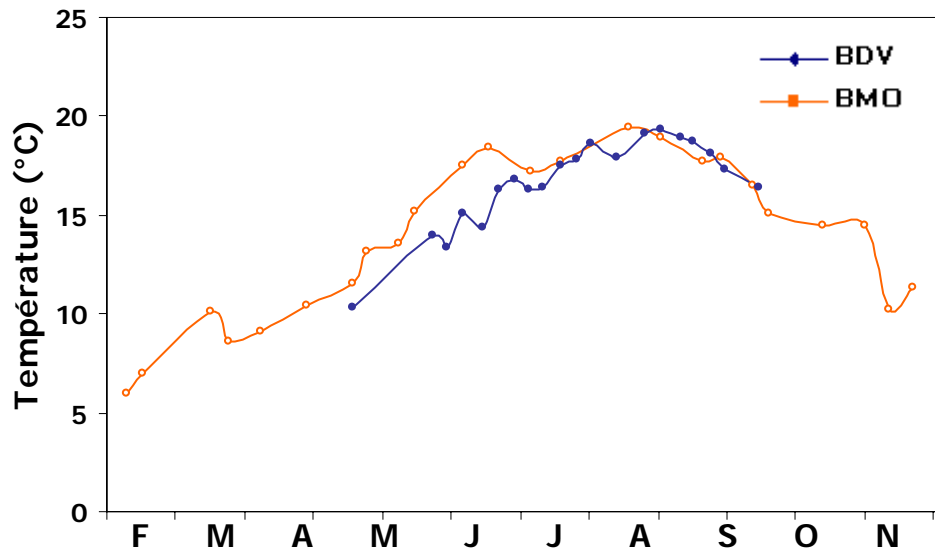


Figure 9. Variations saisonnières en température (T°C) à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV).

Au sujet de la production gamétique, déterminée à partir de l'évaluation de la biomasse, les huîtres de la BDV produisent trois fois plus de gamètes que celles de BMO (6,1 g contre 1,9 g). En terme d'effort reproducteur, sur la période considérée, les huîtres de BDV consacrent plus de 86% de leur croissance aux gamètes contre 53% dans celles de BMO. L'intensité de l'émission de gamètes diffère également entre les deux groupes: les huîtres de BMO montrent des émissions complètes et synchrones des gamètes (autour de 1,8 g) contre une émission de gamètes partielle et/ou asynchrone (autour de 4,5 g) observée dans le groupe de BDV. En conséquence, les huîtres de BMO entament un processus de dégénérescence gamétique, appelé résorption ou atrésie, accompagnée d'une réduction automnale progressive de leur masse gonadique, que les huîtres de Marennes Oléron n'ont pas à engager. Ces différences quantitatives entre les deux baies sont à relier aux différences de concentrations en phytoplancton (fig. 10).

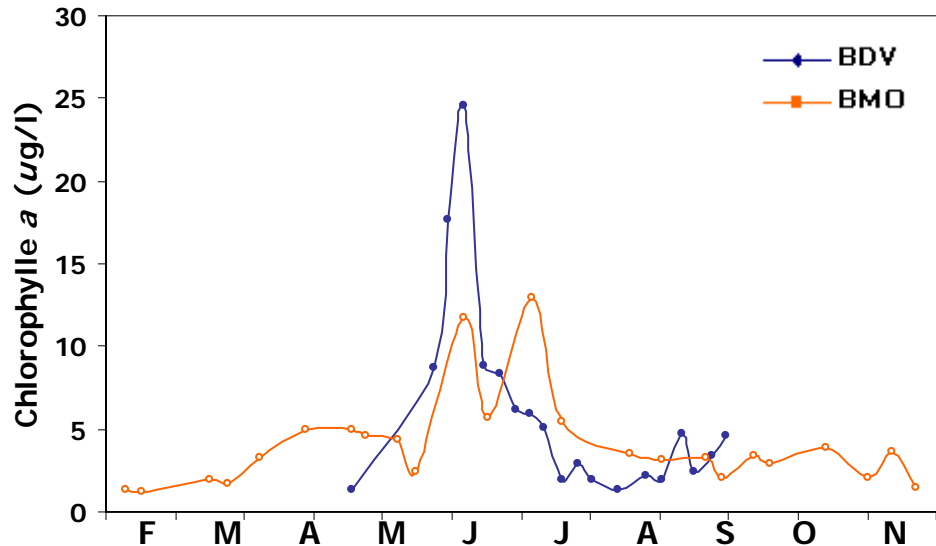


Figure 10. Variations saisonnières en Chlorophylle *a* ($\mu\text{g/l}$) en Marennes-Oléron (BMO) et la baie des Veys (BDV).

D'une façon générale, les bivalves tendent particulièrement vers une stratégie de reproduction «*r*» ce qui implique une période reproductrice courte avec fécondité élevée et caractéristique des environnements instables. Ceci a été décrit par Lubet et Mann (1987) à propos d'organismes dont le cycle de reproduction dépend fortement des efflorescences phytoplanctoniques saisonnières. L'huître creuse, *C. gigas*, rentre dans cette catégorie. Nous avons montré lors de cette étude que la stratégie reproductrice de l'huître est fortement affectée par les conditions environnementales, et particulièrement par la température et le niveau de nourriture. Il nous apparaît désormais très clair que (1) la température de l'eau régule la vitesse et donc la durée de la gamétogenèse, tandis que (2) son intensité est influencée par la quantité de nourriture disponible. La source de nourriture dans les écosystèmes côtiers est fortement variable et dépend souvent du niveau d'eutrophisation.

Nous avons démontré qu'un niveau élevé de phytoplancton au printemps et en début d'été peut induire: (1) un développement très élevé (hypertrophie) de la gonade; (2) des modifications dans l'intensité de ponte; et (3) une augmentation de la période nécessaire aux processus de résorption gonadique pendant l'automne. Cette stratégie reproductrice dépendante de l'environnement mise en place par *C. gigas* est vraisemblablement un mécanisme d'adaptation lui permettant de réussir dans tous types d'habitats.

3. Approche expérimentale

3.1 Préliminaire

Le travail réalisé est présenté en détail dans le chapitre II, intitulé "*Influence of food quantity on the reproductive behaviour of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: an experimental approach*". Une synthèse en français est donnée ci-après.

Dans cette partie, nous présentons le suivi en condition contrôlée de la reproduction d'une population d'huîtres creuses au cours d'un cycle annuel. La population, de même origine génétique que celle de l'approche *in situ*, a été placée dans deux conditions de nourriture différentes afin de confirmer, en condition contrôlée, les relations entre le niveau de nourriture et l'intensité de la gamétogenèse.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 La population expérimentale

Cette étude a été réalisée à partir de naissains produits à l'écloserie de mollusques de La Tremblade/IFREMER, en février 2001, et pré-grossis pendant un an à la nurserie du Laboratoire Conchylicole de Bouin/IFREMER. En février 2002, les huîtres âgées de 1 an (n = 1600) ont été transférées à la Station Expérimentale d'Argenton. Après une acclimatation de

15 jours, le stock d'huîtres a été réparti en deux sous-groupes de 800 individus chacun (fig. 11), alimentées respectivement par un régime algal différent, comme décrit après.



Figure 11. Salle de géniteurs. Les 800 huîtres sont mises dans chacun deux bacs de conditionnement, Station Expérimentale d'Argenton.

3.2.2 Le conditionnement

Les huîtres ont été élevées dans ces bacs pendant un cycle annuel complet. La température de l'eau et la photopériode journalière suivent un cycle saisonnier moyen basé sur la moyenne des dix dernières années relevée dans le bassin de Marennes-Oléron. La salinité et la saturation en oxygène sont maintenues constantes à 34 ppt et 90-100% respectivement. Les huîtres sont alimentées avec deux concentrations de nourriture, à partir d'un régime équilibré de micro-algues (fig. 12) composé de: *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis* aff. *galbana* (T-iso) et *Tetraselmis chui*.



Figure 12. Salle de production des micro-algues : Station Expérimentale d'Argenton.

Le niveau le plus pauvre en nourriture ou LFL (Low Food Level) correspond à un apport quotidien équivalent à 4% du poids sec d'algues par g de chair sèche d'huître. Ce niveau se traduit dans les bacs par une concentration moyenne de chlorophylle *a* autour des huîtres équivalente à 3-5 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Le niveau le plus élevé ou HFL (High Food Level) correspond à une ration quotidienne équivalente à 12% du poids sec d'algues par g de chair sèche d'huître. Ce niveau se traduit dans les bacs par une concentration moyenne de chlorophylle *a* autour des huîtres équivalente à 15-20 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

La libération de gamètes a été induites à deux périodes : à la mi-juillet et la mi-août.

3.2.3 Le prélèvement et la biométrie

Les prélèvements ont été effectués mensuellement de décembre à avril, et tous les 15 jours de mai à novembre. A chaque prélèvement, dix huîtres de chaque condition ont été analysées.

La masse totale (coquille + chair) et la longueur de la coquille (axe antéro-postérieur) de tous les spécimens ont été déterminés. La masse (*W*) de chair totale a été estimée après égouttage. Après dissection, la masse de l'ensemble 'glande digestive + gonade' ont été évaluées (*mv* = masse viscérale) et finalement préparées pour l'analyse histologique.

Pour faciliter la lecture, la méthodologie appliqué pour réaliser les analyses d'histologie, qualitatives (détermination du sexe) et quantitatives (définition des stages de maturation, aire et biomasse de la gonade), a été mise en annexe (I, II, III, IV).

3.3 Résultats

3.3.1 La croissance

La croissance totale (masse totale et longueur de la coquille) n'est pas sensiblement affectée par les différents régimes alimentaires. La croissance annuelle a montré un schéma d'évolution temporelle sans différence significative. Les huîtres en condition LFL ont eu une croissance de $1,45 \text{ g.mois}^{-1}$ et celles de la condition HFL $1,68 \text{ g.mois}^{-1}$ ($17,4 \text{ g.an}^{-1}$ et $20,1 \text{ g.an}^{-1}$ pour LFL et HFL, respectivement). Par contre, la croissance en chair et particulièrement celle de la masse viscérale diffèrent de manière significative selon les niveaux de nourriture. En effet, en condition LFL, la croissance de la masse viscérale est seulement $0,79 \text{ g.an}^{-1}$ contre $3,31 \text{ g.an}^{-1}$ quand la nourriture est abondante (condition HFL).

3.3.2 Le cycle reproducteur

Parmi les 170 huîtres soumises à un régime pauvre (LFL), 41% sont des mâles, 23% sont des femelles et 35% sont sexuellement indifférenciés. Pour le régime riche (HFL), sur les 170 huîtres prélevées, 45% d'entre elles sont des mâles, 33% sont des femelles et 21% sont indifférenciées. Aucune différence significative n'est trouvée pour le sexe ratio entre les conditions (1F:1,74M et 1F:1,33M). Pour chaque niveau de nourriture, des hermaphrodites occasionnels (< 1%) sont observés en mai-juin.

3.3.3 L'analyse qualitative

Au début de l'expérience, en mars, la majeure partie de la population a déjà commencé sa gamétogenèse (fig. 13) et seulement moins de 10% des huîtres sont sexuellement indifférenciées (stade 0). Entre mars et mai, les huîtres sont principalement en période de croissance, stade I et II. Début juin, les différences entre les conditions deviennent significatives : plus de 80% des huîtres en condition HFL sont au stade III, contre 40% pour des huîtres en condition LFL. Dans les deux régimes, le pic de maturité

sexuelle survient en juillet. De façon surprenante, le pourcentage d'émission de gamètes des huîtres en condition LFL (86%) s'avère plus efficace que celle en HFL (60%). A partir de cette date, et en raison d'un long processus de résorption dans le groupe HFL, la comparaison entre les deux régimes montre des différences significatives: plus de 50% des huîtres HFL atteignent le stade IV jusqu'à décembre contre seulement 25% dans l'autre groupe. En outre, les huîtres en condition HFL initient un nouveau cycle de gamétogenèse début décembre, permettant l'observation d'huîtres au stade I de croissance.

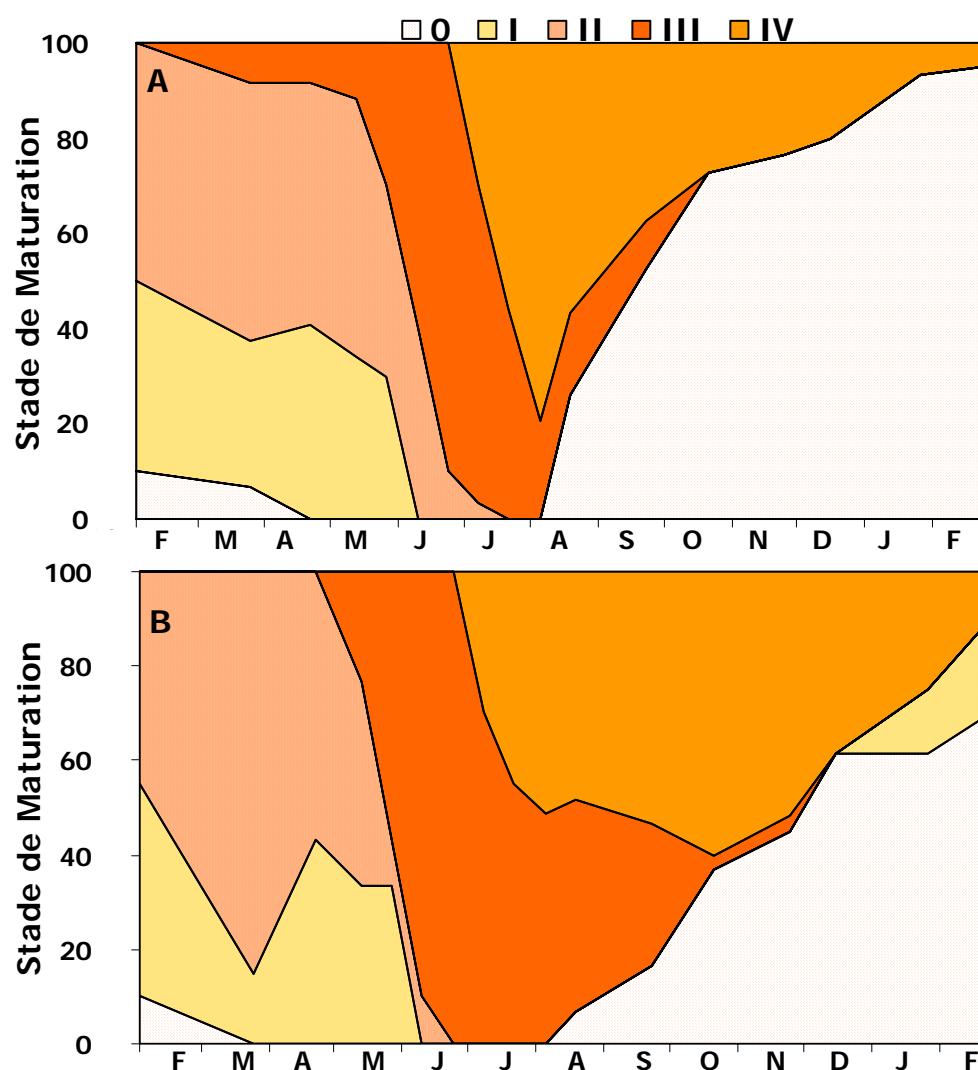


Figure 13. Variations saisonnières dans les stades de maturation chez l'huître creuse cultivée à deux niveaux de nourriture. A) Huîtres nourries en condition trophique faible (LFL) et B) huîtres nourries en condition trophique forte (HFL). 0 = Stade de repos sexuel; I= Reprise de la gamétogenèse; II= Développement des gamètes, III= Stade de maturité sexuelle, IV= Période de ponte et/ou résorption.

3.3.4 Les analyses quantitatives

La figure 14 montre clairement que l'on peut reproduire, en condition expérimentale, un schéma saisonnier du développement gonadique (AG) dans les deux groupes. Au printemps, la gonade occupe moins de 2% de la masse viscérale. Mais, en juin, la croissance de la gonade diffère de manière significative entre les deux populations. En effet, des huîtres alimentées en LFL montrent une occupation gonadique de 28% contre 43% pour ceux en HFL. Au maximum de la gamétogenèse (mi-été), les pourcentages d'occupation de gonade sont sensiblement différents entre les groupes LFL et HFL (49 et à 66%, respectivement).

La première émission de gamètes, induite en juillet, est clairement démontrée par la chute de l'occupation gonadique : le pourcentage d'occupation gonadique tombe à 8% pour les huîtres en condition LFL contre 34% pour celles en condition HFL. La différence significative entre ces deux valeurs indique que l'efficacité de la ponte n'est pas semblable dans les deux régimes. Après l'émission de gamètes, l'occupation ré-augmente légèrement dans les deux populations pour atteindre 23% dans le groupe de LFL et 48% pour HFL. La seconde libération de gamètes est induite au mois d'août. Dans ce cas, le pourcentage d'occupation de la gonade des huîtres de LFL atteint 6%, contrairement aux huîtres en condition HFL, très peu réceptives à ce deuxième stimulus. Dans les deux groupes, le procédé de résorption commence en septembre, mais avec différences marquées dans la durée et l'intensité: il est d'importance majeure dans le groupe HFL.

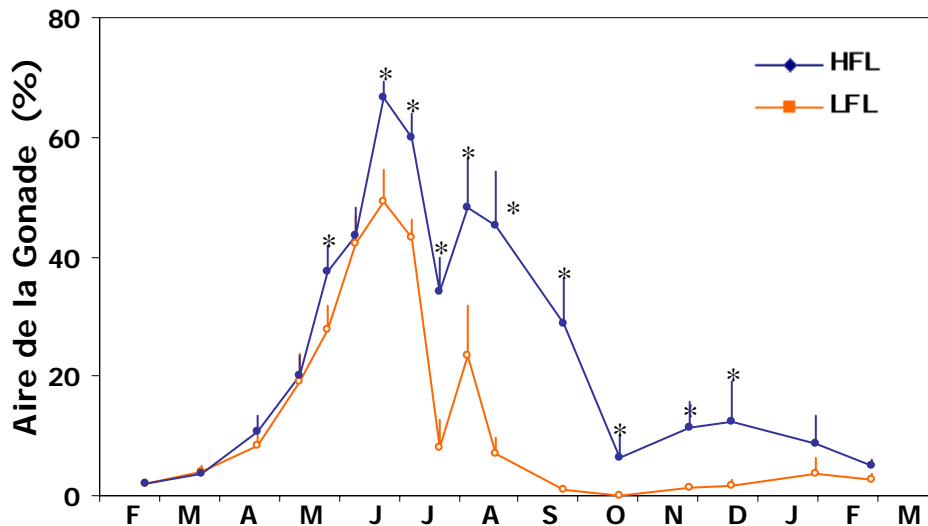


Figure 14. Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse. Huîtres nourries en condition trophique faible (LFL) et huîtres nourries en condition trophique forte (HFL). (Moyenne gonadique, *i.e.* % de l'aire occupée par la gonade \pm SE). * = différences significatives.

De la même manière, on constate que le schéma saisonnier de croissance gonadique est semblable dans les deux groupes d'huîtres, cependant des différences significatives dans l'intensité sont observées (fig. 15). Au printemps, la biomasse gonadique représente respectivement 0,25 et 0,30 g dans les groupes LFL et HFL. En mai, la gonade démarre lentement sa maturation. Juste avant l'émission des gamètes, le groupe HFL montre une biomasse gonadique maximale (1,53 g), deux fois plus élevée que celle observée dans les huîtres du LFL (0,64 g). Après la première émission des gamètes, le poids de la biomasse gonadique diminue jusqu'à 0,10 g dans les huîtres du LFL et à 0,61 g dans celles de HFL. Au cours des semaines suivantes, les deux groupes d'huîtres montrent un rétablissement, plus marqué dans le groupe de HFL (1,80 g contre 0,35 g pour LFL). Suite à la deuxième émission des gamètes, la biomasse gonadique des huîtres du LFL se trouve en dessous de 0,10 g, marquant le commencement de la période de repos. Dans le cas de la population de HFL, la période d'émission de gamètes se prolonge jusqu'en octobre et est suivie d'une longue période de résorption des gamètes en automne et en hiver.

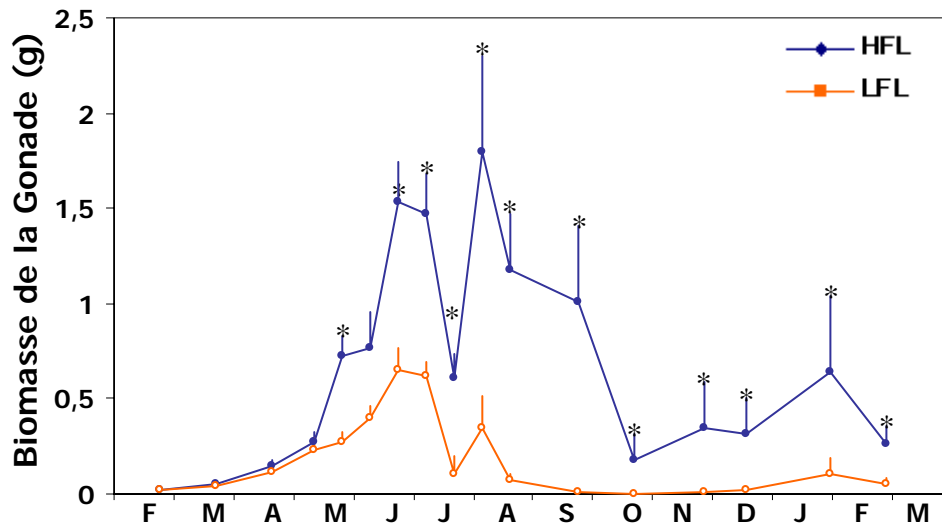


Figure 15. Variations saisonnières dans la biomasse de la gonade chez l'huître creuse Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = Différences significatives.

L'efficacité à émettre ses gamètes a été calculée pour les huitres des conditions LFL et HFL. En juillet, première période d'émission de gamètes, l'efficacité est de 83 % et 60 %, respectivement en condition LFL et HFL. Par contre, en terme de production de gamètes (P_r), les huitres alimentées en LFL produisent environ 0,51 g de gamètes contre 0,90 g pour ceux en HFL pendant la première émission (mi-juillet). Au cours de la seconde ponte, un mois plus tard, les P_r calculés sont de 0,28 g pour le groupe de LFL et de 0,60 g pour celui de HFL. Ces données expérimentales indiquent que les gonades des huitres de LFL se vident après la seconde ponte contrairement à celles du groupe de HFL qui contient toujours 33% de gamètes résiduels. L'effort reproducteur observé en juillet dans les deux populations est deux fois supérieur à celui observé en août.

3.4 Discussion

En raison de l'insuffisance d'un système de classification simple pour décrire la variabilité de la stratégie reproductrice parmi les huîtres, des méthodes semi-quantitatives ont été développées pour décrire les processus reproducteurs (Mann, 1979; Morvan et Ansell, 1988; Laruelle *et al.*, 1994). Mais, jusqu'ici, seulement Lango-Reynoso *et al.*, (2000) et Chávez-Villalba *et al.*, (2001, 2002) ont employé une méthode semi-quantitative basée sur la fréquence de la distribution de diamètres des ovocytes chez les huîtres creuses. Pour compléter ce type d'études, notre méthode donne une estimation de l'aire occupée par le tissu gonadique et après extrapolation, la biomasse de la gonade est estimée. L'estimation du pourcentage du tissu gonadique semble être un très bon traceur du cycle reproducteur, puisqu'il décrit la continuité des stades de développement (Newell *et al.*, 1982).

Concernant *C. gigas*, cette étude démontre clairement, en condition expérimentale, que la température et la nourriture constituent des paramètres clefs qui commandent la gamétogenèse. La durée de chaque étape est entièrement déterminée par la température. Même dans nos conditions expérimentales, nous avons pu constater que, pour les deux groupes d'huîtres (LFL et HFL), les cycles de reproduction suivent le même modèle saisonnier qu'en conditions naturelles. Une telle relation a déjà été décrite: (1) en milieu naturel, la reproduction chez *C. gigas* montre un cycle saisonnier marqué, lié aux variations saisonnières de la température (*e.g.* Deslous-Paoli, 1982 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999); et (2) en milieu expérimental, Chávez-Villalba *et al.* (2002) ont clairement démontré que le facteur thermique amplifie le processus gamétogénétique. Cependant, le résultat principal de notre travail confirme précisément l'effet de la ration de nourriture sur le développement du cycle et du comportement reproducteur des huîtres.

Nous avons établi qu'une ration élevée de nourriture favorise un développement gonadique plus rapide et plus intense. Les observations dans le milieu naturel corroborent nos résultats. Par exemple, selon Mori (1979), les huîtres de *C. gigas* élevées dans des

conditions eutrophiques montrent une hyper-maturation de la gonade. De la même manière, Soniat et Ray (1985) ont trouvé un rapport positif entre la quantité de nourriture et les index gonadiques ainsi qu'une re-maturation évidente de la gonade en été en raison d'une plus forte disponibilité de nourriture au printemps et en été. Ces auteurs ont pointé l'importance des approvisionnements alimentaires à cette période de l'année pour la gamétogenèse et la ponte.

L'émission des gamètes a été artificiellement induite car les conditions d'élevage présentent pas assez de variations susceptibles de déclencher l'émission des gamètes (choc thermique, par exemple). La première ponte induite a eu lieu en juillet, période où la température de l'eau était à 20°C et des huîtres étaient en étape de maturation. Cette période correspondait également à la période d'émission naturelle moyenne des gamètes des huîtres élevées dans le bassin de Marennes-Oléron. Après cette première période de libération des gamètes, l'occupation gonadique a brusquement chuté, mais sans indiquer une émission de gamètes complète. Début août, des valeurs d'occupation gonadique élevées sont encore enregistrées dans les deux groupes, vraisemblablement dues à une re-maturation. Par conséquent, une deuxième ponte a été induite. Cette émission des gamètes a conduit à une vidange complète des gonades pour les huîtres faiblement nourries. Cependant, lorsqu'elles sont abondamment nourries, l'émission des huîtres est restée incomplète une fois de plus. Des follicules renfermant des produits phagocytés résiduels aussi bien qu'un stade de régression inachevé précédent le début du cycle de développement suivant ont été observés. L'efficacité de l'émission de gamètes était paradoxalement inférieure dans le groupe HFL (60%) par rapport au groupe LFL (83%).

La base physiologique d'une telle inhibition d'émission des gamètes alors que le niveau de nourriture est élevé n'est pas claire, mais nos données expérimentales corroborent des observations faites dans le milieu naturel concernant la croissance gonadique et les émissions des gamètes dans la population de *C. gigas* cultivée en la baie des Veys.

Quand l'animal a fini de libérer ses gamètes et que des gamètes restent dans la gonade, le processus de dégénération des gamètes, connu principalement sous les termes de résorption ou d'atrésie, démarre (Steele et Mulcahy, 1999). Les huîtres auxquelles un régime alimentaire pauvre est fourni et, qui ont totalement libéré leurs gamètes, présentent une courte période de résorption des gamètes tandis que celles nourries à partir d'un régime riche pondaient partiellement et restaient en période de résorption gamétique pendant plusieurs mois (automne-hiver). La résorption des gamètes peut être considérée comme un processus "autonettoyant" correspondant à une lyse massive des gamètes. C'est aussi une phase nécessaire à la préparation de la gonade pour un nouveau cycle sexuel. Le résultat de cette phagocytose peut être soit réutilisé pour satisfaire les besoins du métabolisme basal (Beninger et Le Pennec, 1991), soit pour générer des réserves de glycogène qui seront utilisées pendant l'hiver dans un nouveau cycle gamétogénétique.

Finalement et d'un point de vue pratique, si la température peut moduler le processus reproducteur, le niveau de nourriture peut également le faire (concentration de phytoplancton) au niveau de: (1) la production de gamètes; (2) l'efficacité de ponte; (3) la durée de la période de résorption. Ces trois étapes sont d'importance majeure dans la gestion de géniteurs. La production de gamètes peut facilement être contrôlée par le niveau de nourriture et notre travail suggère que le fait de fournir aux géniteurs du phytoplancton à une concentration avoisinant $10-15 \mu\text{g chlo } a.l^{-1}$ pendant le conditionnement, assure une production satisfaisante des gamètes. En outre, cette condition permettra de conserver les huîtres matures jusqu'à l'automne et, aux écloseurs, de produire des larves plus tardivement dans l'année.

3.4.1 Conclusions

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette étude. Il s'avère clairement que la stratégie reproductrice de *C. gigas* est flexible et est étroitement dépendante des facteurs

environnementaux. Parmi ceux-ci, la quantité de nourriture (concentration de phytoplancton) au printemps et en été joue un rôle clef dans la reproduction autant que la température. Ce dernier facteur trophique détermine (1) la production de gamètes au printemps, (2) l'efficacité de ponte en été, (3) l'intensité de résorption à l'automne et (4) probablement le niveau de stockage des réserves en hiver.

SYNTHESE

B. Implication de la reproduction dans le syndrome des mortalités estivales

B. Implication de la reproduction dans le syndrome des mortalités estivales

4. Synthèse bibliographique

4.1 Le phénomène des mortalités estivales

L'huître est l'un des mollusques-bivalves le plus cultivé le long de la côte ouest des Etats Unis, au Japon, en Chine, en Corée et en France (Perdue *et al.*, 1981; FAO, 2004). Depuis quelques années, des mortalités massives surviennent périodiquement menaçant la production commerciale. Les premières mortalités estivales massives ont été enregistrées en 1945 au Japon et, en 1965, aux Etats Unis (Glude, 1975; Perdue, 1981). En France, celles-ci ont été enregistrées depuis 1988 (Soletchnik, 1997; Gouletquer, 1998 ; Samain, 2003).

Il est désormais admis que ce phénomène est généralement associé à (1) certains facteurs environnementaux tels que les températures élevées de l'eau de mer et le niveau d'eutrophisation (Cheney *et al.*, 2000), (2) des facteurs physiologiques comme la période de reproduction (Mori, 1979; Perdue *et al.*, 1981; Soletchnik *et al.*, 1997; Gouletquer *et al.*, 1998; Berthelin *et al.*, 2000; Cheney *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2003) et aussi (3) certaines pratiques culturelles (Lodato, 1997). D'autres études signalent des épisodes de mortalités reliés à des agents pathogènes (Lipovsky et Chew, 1972; Friedman et Hedrick, 1990; Friedman *et al.*, 1991) sans pour autant identifier un seul pathogène responsable, mais une série de pathogènes opportunistes (Le Roux *et al.*, 2002). Différents programmes de sélection génétique ont réussi à mettre en évidence l'existence d'un facteur génétique à ce phénomène (*e.g.* Beattie *et al.*, 1980; Hershberger *et al.*, 1984 ; Collet, 1998 ; Ernande, 2001; Dégremont, 2003). Toutes ces études indiquent une étiologie complexe incluant plusieurs facteurs : conditions environnementales, agents infectieux, physiologie et génétique de l'huître. Néanmoins, il en ressort clairement que la reproduction est une

période physiologique clé de la mise en place du phénomène des mortalités estivales. Pourtant, peu d'études établissent de façon évidente la relation entre gamétogenèse et mortalités estivales chez l'huître creuse, que ce soit d'un point de vue bioénergétique (Soletchnik *et al.*, 1997) ou d'un point de vue génétique.

4.2 Bioénergétique et reproduction

Le syndrome des mortalités massives d'huîtres survient au cours de l'été, saison, pendant laquelle l'huître est en phase ultime de gamétogenèse. A cette période, la dépense énergétique occasionnée par l'ensemble des processus de la reproduction s'accroît et il est émis l'hypothèse d'un animal plus fragile vis à vis d'une quelconque agression extérieure (*e.g.* pathogène, brusques variations du milieu, mauvaise zootechnie...) (Goulletquer, 1998, Samain, 2003).

Si il y a un consensus général concernant la corrélation du cycle de la reproduction avec les fluctuations saisonnières de l'environnement, la compréhension des interactions entre les facteurs environnementaux, la reproduction et les mortalités estivales reste partielle. À cet égard, une approche quantitative du problème pourrait être réalisée en analysant les coûts énergétiques associés à la reproduction et leurs variations en fonction des facteurs environnementaux.

Chez les organismes vivants, la mesure des différents paramètres écophysologiques de la nutrition et de la respiration permet d'établir un bilan énergétique de la matière assimilée. Chez les bivalves, ce bilan est généralement exprimé sous la forme d'un potentiel de croissance ou « scope for growth, SFG » (Bayne, 1976). En s'appuyant sur les fonctions écophysologiques telles que la filtration, la consommation, l'absorption et la respiration (tab. 4) qui sont connues pour varier en fonction de l'environnement, le bilan énergétique fournit en quelque sorte « une estimation » du statut physiologique de l'animal à différentes périodes de sa vie et en fonction des paramètres environnementaux.

Plus précisément, le calcul du bilan énergétique d'un organisme consiste à dresser un bilan des gains et des pertes d'énergies, en faisant l'hypothèse que la quantité d'énergie acquise par la nourriture lors de l'assimilation est utilisée pour le maintien, la croissance et la reproduction de l'animal, selon la relation suivante (Bayne, 1976):

$$\mathbf{SFG = C - (PF + F + R + U)}$$

avec C: Consommation, PF: Production de pseudo-fèces, F: production de fèces, R: Respiration et U: Excrétion.

Si ce bilan est positif, c'est à dire si l'acquisition d'énergie est supérieure aux dépenses, l'animal utilise l'énergie assimilée pour les biosynthèses (croissance des tissus somatiques ou reproducteurs) et la mise en réserve. Par contre, si le bilan est négatif, c'est à dire si l'acquisition d'énergie est trop faible face aux dépenses énergétiques, l'animal est obligé de puiser dans ses réserves pour satisfaire son métabolisme et assurer son maintien, au détriment de la croissance et probablement au détriment de son système de défense. Si les réserves sont épuisées, et que les conditions environnementales défavorables perdurent, l'affaiblissement énergétique de l'animal peut vraisemblablement être à l'origine de sa mort. Il a effectivement été établi que les individus à forte demande métabolique (*i.e.* forte respiration) sont généralement moins résistants que des individus à demande métabolique réduite (Collet, 1998).

Tableau 4. Paramètres physiologiques du bilan énergétique calculés dans le présente étude

Paramètres	Sigle	Unité	Formule	
Clearance Rate Taux de filtration	CR	$l.h^{-1}.ind^{-1}$	$CR = F(C_0 - C_1)/C_0$	F = débit de l'eau dans le système C_0 = concentration de fluorescence à la sortie de l'aquarium témoin C_1 = concentration de fluorescence à la sortie de l'aquarium de l'huître
Consumption Rate Consommation	C	$mg.h^{-1}.ind^{-1}$	$C = CRs \times POM$	CRs= clearance rate standardise POM=matière organique particulaire
Absorption Efficiency Efficacité d'absorption	AE	%	$AE = 100 (F - E / [(1 - E) \times F])$	F = teneur organique de la nourriture E = teneur organique des fèces
Respiration Consommation d'oxygène	R	$mg.O_2.h^{-1}.ind^{-1}$	$R = F \times (O_0 - O_1)$	F = débit de l'eau dans le système O_0 = concentration d'oxygène à la sortie de l'aquarium témoin O_1 = concentration d'oxygène à la sortie de l'aquarium de l'huître
Absorption rate	A	$mg.h^{-1}.ind^{-1}$	$A = AE \times C$	AE= efficacité d'absorption C= consommation
Scope for growth Potentiel de croissance	SFG	$J.h^{-1}.ind^{-1}$ après conversion	$SFG = A - R$	A= absorption (AE \times C) R= respiration

D'une façon générale, chez *C. gigas*, les valeurs moyennes des principales fonctions physiologiques sont relativement bien connues (tab. 5). Il est aussi admis, que ces fonctions et donc, par conséquent le SFG, sont dépendantes à la fois de facteurs intrinsèques tels que la taille ou le statut reproducteur et de facteurs externes tels que la température ou la quantité de nourriture disponible. Néanmoins, l'expression quantitative de telles relations est peu détaillée, reste encore soumise à controverse et constitue « le talon d'Achille » de la plupart des modèles écophysologiques construits chez *C. gigas*. (e.g. Ren et Ross, 2001).

C'est notamment la relation tripolaire entre paramètres environnementaux, SFG et gamétogenèse qui est la moins détaillée. Ainsi et à titre d'exemple, si Gerdes (1983) suggère qu'en plus de la température, le cycle gamétogénétique pourrait être responsable des variations saisonnières de la consommation d'oxygène, seuls Soletchnik *et al.* (1997) ont tenté d'évaluer l'influence du stade de maturation sexuelle sur les fonctions écophysologiques (filtration, absorption, respiration) et ont donc établi un lien entre SFG et gamétogenèse chez *C. gigas*. En d'autres termes, la bioénergétique de la reproduction chez les mollusques-bivalves demeure un champ de recherche peu investi jusqu'à maintenant. Pourtant, il est raisonnable de penser qu'une amélioration des connaissances des besoins

énergétiques de l'animal en période de reproduction puisse contribuer à une meilleure compréhension du phénomène des mortalités estivales.

Tableau 5. Taux de filtration et de respiration observés chez *C. gigas*

Références	T°C	CR	Respiration
Barillé <i>et al.</i> , 2003	20°C	4,1 L.h ⁻¹ .g ⁻¹ 5,9 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	13,5 J.h ⁻¹
Ren & Ross, 2000	20.7°C	1,7 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	0,4 mL O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹
Soletchnik <i>et al.</i> , 1997	21°C	1,8 L.h ⁻¹ .g ⁻¹ 2,4 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	1,8 mL O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ 1,8 - 2,2 mL O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹
Bougrier <i>et al.</i> , 1994	20°C	4,4 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	1,0 mL O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹
Barillé <i>et al.</i> , 1994		2,2 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	
Gerdes, 1983	20°C	2,7 L.h ⁻¹ .g ⁻¹	0,7 mL O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹

4.3 Génétique et reproduction

Si les aspects bioénergétiques de la relation entre reproduction et mortalités estivales restent pour l'instant peu abordés dans la littérature concernant l'huître creuse, il en est de même pour les aspects génétiques.

D'une façon générale, en production animale, la sélection génétique est employée pour relever nombre de défis, tels que la résistance des maladies, la tolérance aux manipulations, l'augmentation de la conversion alimentaire, la vitesse de croissance, la manipulation des périodes d'émission des gamètes, et en dernier lieu, la survie. Ce sont autant de secteurs qu'il est nécessaire d'approcher pour permettre une «domestication» productive (Dunham *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les aspects génétiques reliant survie et reproduction, Hershberger *et al.* (1984) montrent que les mortalités estivales coïncident avec le développement gonadique et suggèrent qu'un programme de sélection établi sur la base du temps de développement gonadique pourrait peut-être diminuer la sensibilité à tout stress du milieu.

Plus récemment, Ernande (2001) souligne les effets d'un programme de sélection génétique sur les caractères de croissance, de survie et d'effort reproducteur. Il observe que les corrélations phénotypiques entre (1) croissance et survie et (2) croissance et effort reproductif sont négatives. Il note aussi que la corrélation entre la survie et l'effort reproductif devient significativement positive en milieu riche, mais significativement négative en milieu pauvre.

L'analyse des performances de survie obtenues sur les triploïdes confirment aussi clairement la relation négative entre reproduction et mortalités estivales (Shpigel *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1996). En général, les huîtres triploïdes ne produisent pas de gonades et, en parallèle, il est toujours observé une bien meilleure survie en période estivale. Cette méthode présente cependant l'inconvénient que, parfois, la stérilisation génétique est incomplète, car quelques individus triploïdes peuvent présenter une réversion d'une partie de leurs cellules de nouveau vers l'état diploïde (Allen, *In* Dunham, 2000).

4.4 Notre action de recherche

Cette partie est une des actions de MOREST. Ces mortalités dites estivales ont lieu entre juin et septembre. Cette période est celle de la reproduction, période au cours de laquelle l'organisme dirige la plupart de son énergie vers le compartiment gonadique pour la maturation des gamètes. Il est alors obligé d'utiliser ses dernières réserves pour sa survie, ce qui le rend fragile à n'importe quels stress environnementaux ou à n'importe quelle agression de pathogènes.

Cette étude visent à atteindre deux objectifs:

1- L'évaluation de l'état physiologique des reproducteurs de *C. gigas* en condition contrôlée simulant un cycle saisonnier naturel (soumis à deux niveaux de nourriture, voir Synthèse A, « approche expérimentale ») ;

2- La caractérisation du cycle reproducteur de *C. gigas*, génétiquement sélectionnés selon leur caractère de survie, en organismes résistants (R) ou sensibles aux mortalités (S).

Au cours de ce travail, nous évaluerons l'état énergétique (SFG) des organismes soumis à différentes conditions d'alimentation, et leur réponse physiologique sera caractérisée par la mesure de la filtration et de la respiration (gain et perte d'énergie). Ceci nous permettra d'établir le bilan énergétique de l'organisme pendant une année.

Par ailleurs, le cycle reproductif sera suivi au moyen de l'histologie qualitative et quantitative (comme pour les chapitres précédents), dans deux familles d'huîtres issues d'un programme de sélection génétique, ce qui permettra en outre d'observer la plasticité de la stratégie reproductive de *C. gigas*.

5. Aspects bio-énergétiques

5.1 Préliminaire

Le travail réalisé est présenté en détail dans le chapitre III, intitulé "*The cost of gametogenesis in Crassostrea gigas: an approach over a complete reproductive cycle*" Une synthèse en français est fournie ci-après.

5.2 Introduction

En 2001, l'IFREMER a initié un programme multidisciplinaire de recherche sur l'huître creuse dans lequel il nous a été demandé de nous impliquer. Ce programme est majoritairement orienté sur l'étude des mortalités estivales (MOREST, <http://www.ifremer.fr/morest/>). Jusqu'à présent, l'explication avancée de ces mortalités liées

à un seul facteur n'a pas été possible et le programme MOREST devrait permettre de valider une hypothèse d'interactions entre l'huître, son environnement et les agents pathogènes (Hershberger *et al.*, 1984 ; Cheney *et al.*, 2000).

Lors d'un travail de synthèse, Cheney *et al.* (2000) établissent effectivement que le phénomène des mortalités serait dû au coût énergétique élevé lié au processus de reproduction, associé à l'augmentation de température et à la réduction de disponibilité de nourriture. En d'autres termes, ils émettent l'hypothèse que chez *C. gigas*, une combinaison de températures élevées et de raréfaction de la nourriture pendant la période de reproduction seraient à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des individus. Par conséquent, une compréhension quantitative de l'acquisition de nourriture (*i.e.* filtration, ingestion et absorption) et de la perte métabolique (*i.e.* consommation d'oxygène) au cours d'un cycle reproducteur complet serait utile pour déterminer les variations du statut physiologique de l'huître vis à vis de la reproduction.

Le but de cette étude est donc d'évaluer, sur une base annuelle, la variation saisonnière du scope for growth (SFG) des huîtres en relation avec le cycle de reproduction. Afin de tenir compte du fait que, d'un point de vue quantitatif, la reproduction est sous la dépendance de la nourriture (chapitre I et II), notre évaluation du SFG en relation avec la reproduction a été réalisée sur deux populations d'huîtres nourries selon deux niveaux de phytoplancton.

5.3 Matériels et Méthodes

5.3.1 Matériel biologique et conditionnement des huîtres

L'origine et conditionnement des huîtres ont été décrits dans la synthèse A «approche expérimentale» (p. 30-31).

5.3.1.1 L'acquisition des données écophysiological

La Station Expérimentale d'Argenton est équipée d'un système d'écophysiological individuelle permettant de mesurer simultanément le débit de filtration (CR, l.h⁻¹) et le taux de consommation de l'oxygène (R, mg O₂.h⁻¹) de façon individuelle dans six aquariums, en circuit ouvert ou "open-flow". Le système permet aussi, à l'issue des mesures, la collecte des biodépôts (fèces) permettant d'estimer l'efficacité d'absorption du régime (AE, %).

5.3.1.2 Prélèvements

Tous les taux physiologiques (filtration, ingestion, absorption et respiration) ont été mesurés sur un échantillon de six huitres, de chaque groupe (LFL et HFL) dans les aquariums. Des mesures ont été conduites à intervalles mensuels pendant la reproduction, de mars à août, et tous les deux mois en dehors de cette période, de septembre à février.

5.3.1.3 Le dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 16. Lors de chaque période de mesures, six huitres sont placées individuellement dans six aquariums fermés hermétiquement tandis que deux autres aquariums sont laissés vides servant ainsi de références. Le volume de chaque aquarium est de 1250 mL et le taux de renouvellement par aquarium est ajusté à 120 mL.min⁻¹. La température de l'eau, la concentration en oxygène et la concentration en nourriture y sont strictement identiques à celles des bacs de conditionnement, où est maintenue la population expérimentale.

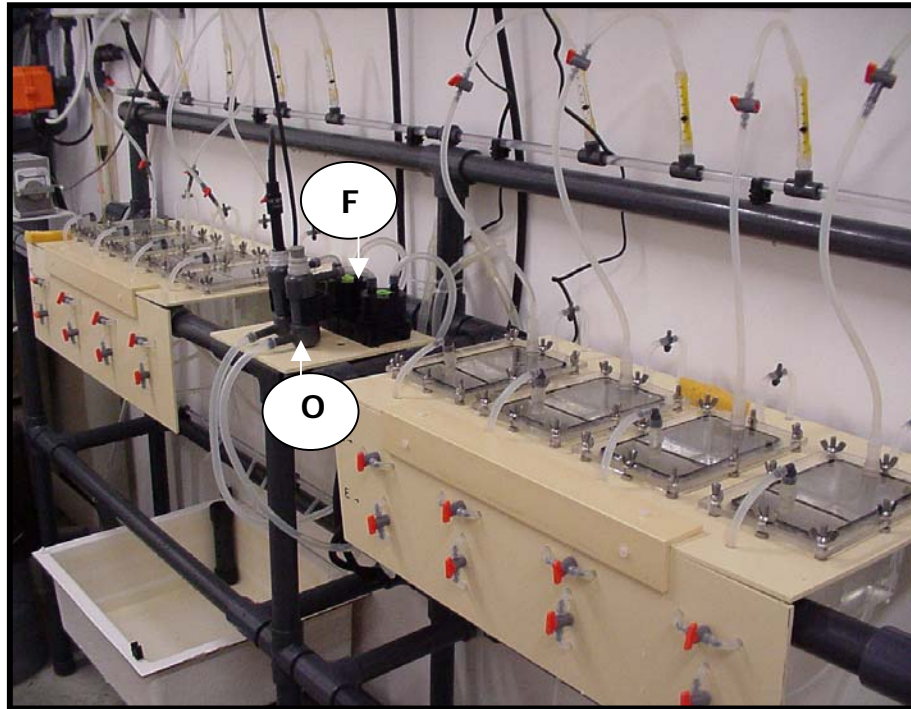


Figure 16. Banc d'écophysiologie utilisé pour mesurer les taux de filtration et de consommation d'oxygène; F = sonde fluorimétrique, O = sonde d'oxygène.

Les huîtres sont laissées sans perturbation pendant au moins une heure dans chaque aquarium avant le début de la mesure. Chaque mesure dure une heure. L'arrivée de l'eau dans l'aquarium est située à côté du siphon inhalant de l'huître tandis que l'évacuation est située près du siphon exhalant (fig. 17).

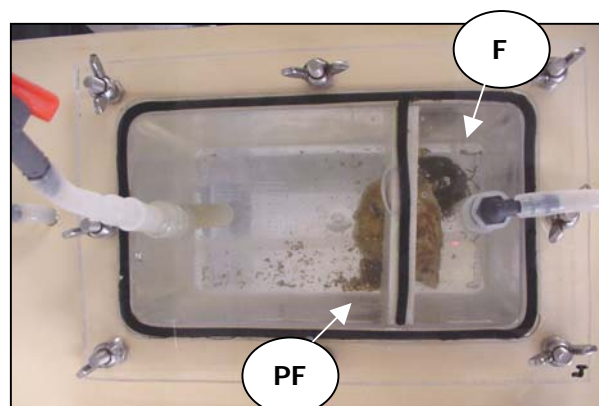


Figure 17. Détail d'un aquarium expérimental et du positionnement de l'huître. PF = pseudo-fèces ; F = fèces.

Une cloison est utilisée pour réduire au minimum le recyclage de l'eau par les huîtres. Les concentrations d'algues et d'oxygène sont mesurées en continu à la sortie de chaque aquarium à l'aide, d'un fluorimètre (Seapoint sensors corp. ©) et d'un oxymètre (WTW corp.©) reliés à une station d'acquisition de données Ethernet (Fieldpoint, National Instruments corp. ©) piloté par un logiciel de programmation (Labview 6.0, National Instruments corp. ©). Le débit de filtration et la consommation de l'oxygène sont alors calculés par les différences observées entre l'aquarium témoin et l'aquarium contenant l'huître.

5.3.2 Mesures écophysiologiques

5.3.2.1 Le débit de filtration ou clearance rate

Le débit de filtration, ou "clearance rate" CR est défini comme le volume d'eau épuré des particules qu'il contient par unité de temps (Widdows et Johnson, 1988). Il est estimé par la formule suivante: $CR = F \times (C_0 - C_1) / C_0$; où CR = débit de filtration; F = débit de l'eau dans le système; C_0 = concentration de fluorescence à la sortie de l'aquarium témoin; C_1 = concentration de fluorescence à la sortie de l'aquarium de l'huître. Afin de comparer entre eux des individus de masse différente, la valeur de CR est standardisée par la relation: $CR_s = CR / W^{0,67}$, où W est la masse sèche d'un individu; 0,67 le coefficient d'allométrie moyen (e.g. Pouvreau *et al.*, 1999; Ren et Ross, 2001; Riisgard, 2001).

La consommation standardisée (C, mg.h⁻¹.ind⁻¹) est calculée à partir des valeurs de filtration standardisées et des concentrations moyennes de matière organique particulaire autour de l'huître (POM, mg.l⁻¹) comme suit: $C = CR_s \times POM$.

5.3.2.2 L'efficacité d'absorption

L'efficacité d'absorption, *i.e.* efficacité avec laquelle le matériel organique ingéré est absorbé lors du transit digestif, est estimée par le rapport de Conover (1966) en mesurant la teneur organique de la nourriture et des fèces et en considérant la matière minérale comme un traceur conservatif. La formule est la suivante : $AE = 100 \times \frac{F - E}{(1 - E) \times F}$; où AE = efficacité d'absorption (%); F = teneur organique de la nourriture (fraction); E = teneur organique des fèces (fraction).

Les fèces sont récoltées dans les aquariums à l'aide d'une pipette à la fin de chaque expérience, puis concentrés par centrifugation. En parallèle, la nourriture (aliquote de 200 ml du mélange algal) est, elle aussi, concentrée par centrifugation : 3500 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C. Pour déterminer le contenu en matière organique des échantillons de fèces (E) ou des microalgues (F), les précipités (culot) obtenus sont lavés deux fois avec du formiate d'ammonium (0,3 M) pour enlever les traces de sel et re-centrifugés entre chaque rinçage. Les précipités sont séchés sur des nacelles d'aluminium à 65°C pendant 24 h pour éliminer le formiate d'ammonium et sont finalement pesés afin d'estimer la masse de matière sèche. Incinérés ultérieurement pendant 4 h à 460°C dans un four à moufle, les résidus restant sont pesés afin de déterminer leur teneur en matière organique.

5.3.2.3 La consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène (R, mgO₂.h⁻¹) est estimée par la formule suivante: $R = F \times (O_0 - O_1)$, où F = débit d'eau dans le système; O₀ = concentration d'oxygène à la sortie de l'aquarium témoin; O₁ = concentration d'oxygène à la sortie de l'aquarium de l'huître. Cette valeur est ensuite standardisée de la façon suivante $R_s = R/W^{0.75}$; où W est le poids de chair sèche d'huître et le coefficient d'allométrie moyen est de 0,75. Cette valeur est issue de la bibliographie (*e.g.* synthèse in Savina et Pouvreau, 2004).

5.3.2.4 Le potentiel de croissance

Le potentiel de croissance a été calculé après avoir converti toutes les valeurs physiologiques dans la même unité standard d'énergie, *i.e.* le joule. Les facteurs de conversion sont donnés dans le tableau 1. Ensuite, le SFG ($J.h^{-1}$) est estimé comme étant la différence entre l'énergie assimilée et l'énergie perdue lors du métabolisme, métabolisme mesuré par la respiration, selon la formule suivante : **SFG = A - R = C x AE - RE** ; où A = l'énergie absorbée de la nourriture ($J.h^{-1}$); C = consommation ($J.h^{-1}$); AE = efficacité d'absorption (%); R = énergie perdue dans la respiration ($J.h^{-1}$).

5.4 Résultats

5.4.1 Le débit de filtration

D'une façon générale, le débit de filtration, CR, des huîtres en condition HFL est significativement inférieur à celui des individus maintenus dans la condition LFL. La valeur moyenne annuelle du CR en condition HFL est autour de $0,7 I.h^{-1}.ind^{-1}$ tandis qu'elle se situe aux environs de $1,9 I.h^{-1}.ind^{-1}$ en condition LFL. Sur une base temporelle, la filtration montre un modèle saisonnier bien défini pour les deux groupes d'huîtres (fig. 18). Le CR augmente progressivement de mars à juillet dans les deux groupes (de $1,0$ à $3,7 I.h^{-1}.ind^{-1}$ en condition LFL et de $0,3$ à $1,4 I.h^{-1}.ind^{-1}$ en condition HFL). Dès le mois d'août, les valeurs de CR diminuent progressivement en l'automne et l'hiver atteignant une valeur minimale voisine de $1,6 I.h^{-1}.ind^{-1}$ en condition LFL et $0,3 I.h^{-1}.ind^{-1}$ en condition HFL. Il est important de noter que ces variations sont mal corrélées avec la température.

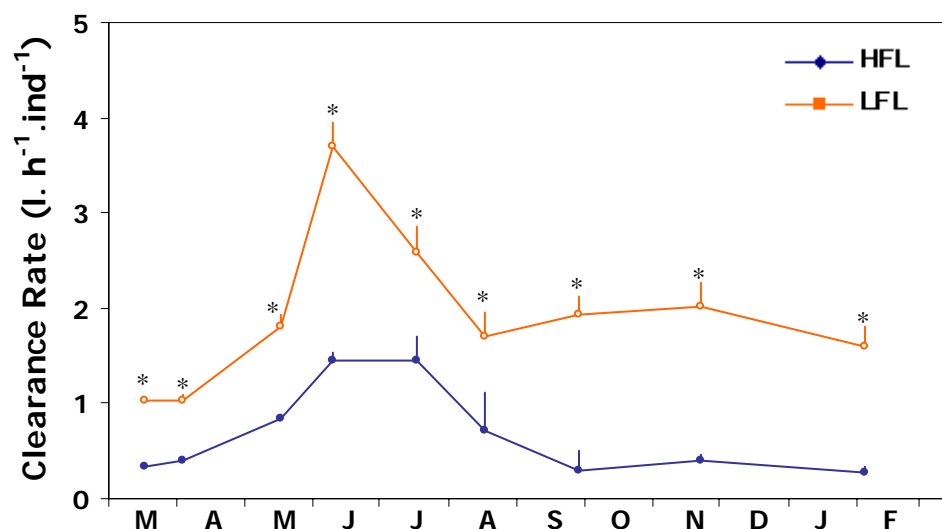


Figure 18: Variation saisonnière du débit de filtration, CR ($l \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de *C. gigas* selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.

5.4.2 La consommation

La consommation des deux groupes d'huîtres suit également un modèle saisonnier avec des valeurs plus élevées en été (fig. 19). Néanmoins, des particularités sont à noter pour chacune des conditions : (1) pendant la période de croissance des gonades, de mars à juin, aucune différence de consommation entre les deux groupes n'est observée ; (2) au mois de juin, les valeurs sont maximales et les huîtres en condition HFL consomment $12,9 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ contre $11,0 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ en condition LFL. Cependant, le taux de consommation, pour le groupe du LFL, montre une diminution forte jusqu'en août. Puis se stabilise jusqu'en février. Pour le groupe HFL, le taux de consommation décline après juillet (soit un mois plus tard que LFL) et, ce déclin est plus intense ($-10,3 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$) que dans le groupe LFL ($-5,9 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$). En octobre, alors que la consommation du groupe FL est de $5,9 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$, celle du groupe HFL descend même à $3,0 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$ en l'hiver.

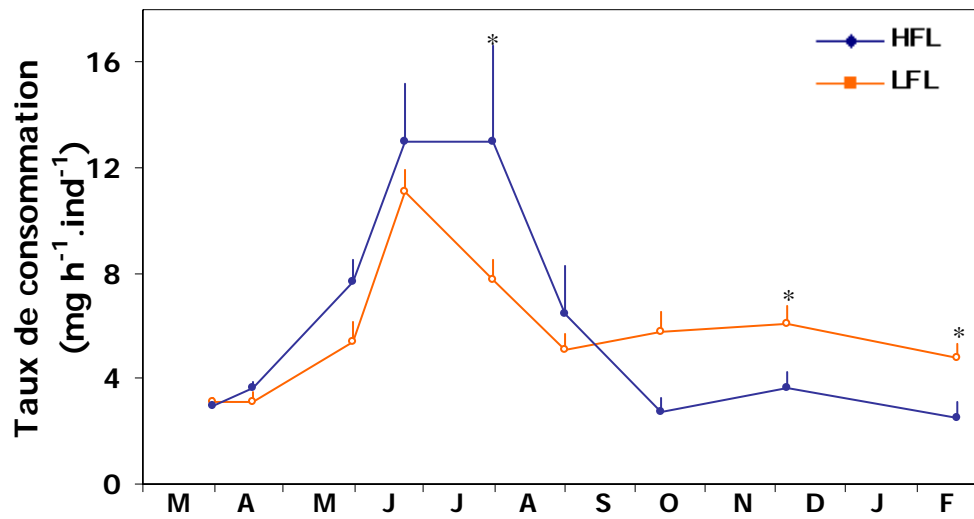


Figure 19: Variation saisonnière de la consommation, C ($\text{mg h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) de *C. gigas* selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.

5.4.3 L'efficacité d'absorption

L'efficacité d'absorption, AE (en %), suit un schéma saisonnier pour les deux groupes d'huîtres, avec des valeurs maximales au printemps et des valeurs minimales en été (fig. 20). A l'inverse de CR et de C , AE diminuent progressivement à partir de mars et ce jusqu'en juillet pour des huîtres en condition LFL (de 54 à 37%) et jusqu'en août pour des huîtres en condition HFL (de 54 à 22%). Une légère augmentation d'AE est observée en automne. L'efficacité d'absorption de l'huître en condition LFL est toujours plus élevée qu'en condition HFL. Ces différences sont principalement significatives à partir de fin mai et jusqu'au début octobre.

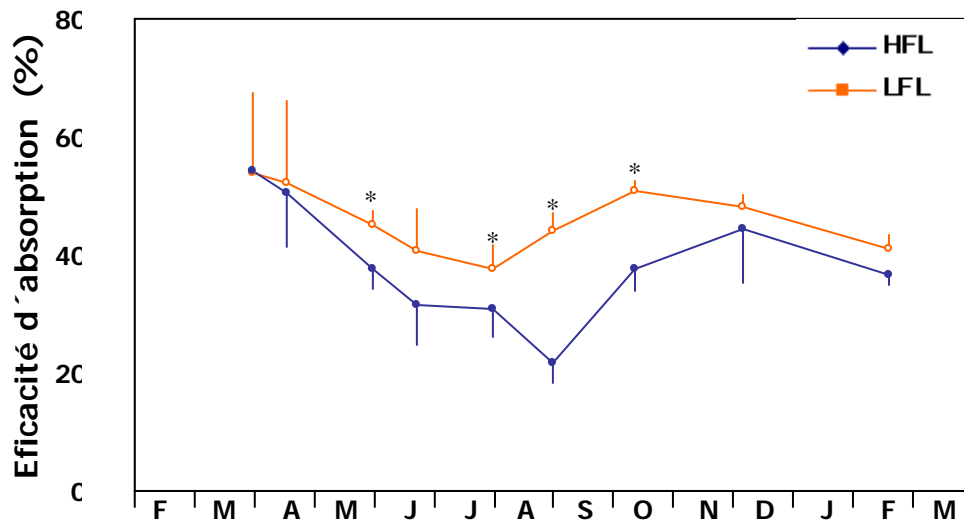


Figure 20: Variation saisonnière de l'efficacité d'absorption, AE (%) de *C. gigas* selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.

5.4.4 La consommation d'oxygène

Dans les deux groupes d'huitres, la consommation d'oxygène, R , $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$, suit un modèle saisonnier bien défini et, contrairement au CR et à l'AE, le taux de respiration est significativement bien corrélé à la température (fig. 21). Il augmente lentement de mars à mai dans les deux groupes d'huitres, de 0,17 à 0,59 $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ dans HFL et de 0,33 à 0,57 $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ pour LFL, puis fortement en juin et juillet, où il triple pour les huitres de HFL (1,48 $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) et double pour les huitres de LFL (1,22 $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) en comparaison des valeurs de mai.

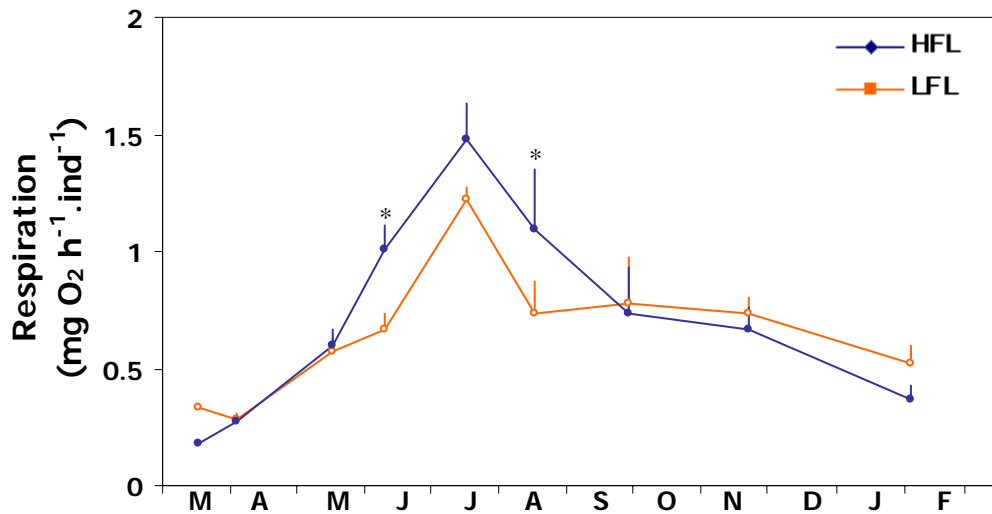


Figure 21: Variation saisonnière de la consommation d'oxygène, R ($\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) de *C. gigas* selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.

5.4.5 Bilan énergétique et scope for growth

Après homogénéisation des unités en joules, on observe sur la figure 22 de façon concomitante, les variations saisonnières d'EA et de R estimées pour les deux niveaux de nourriture. Il apparaît clairement que si la quantité d'énergie absorbée présente un maximum au printemps autour $16,0 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ dans les deux conditions, elle diminue brusquement pendant l'été alors qu'inversement, le métabolisme respiratoire présente, un pic très net à cette période autour de $17,1 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ en condition LFL et $20,8 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ en condition HFL. Ce décalage temporel entre l'acquisition printanière de la matière et les besoins métaboliques accrus en été engendre un déficit estival. Dans les deux conditions, cette situation déficitaire se rétablit progressivement en automne.

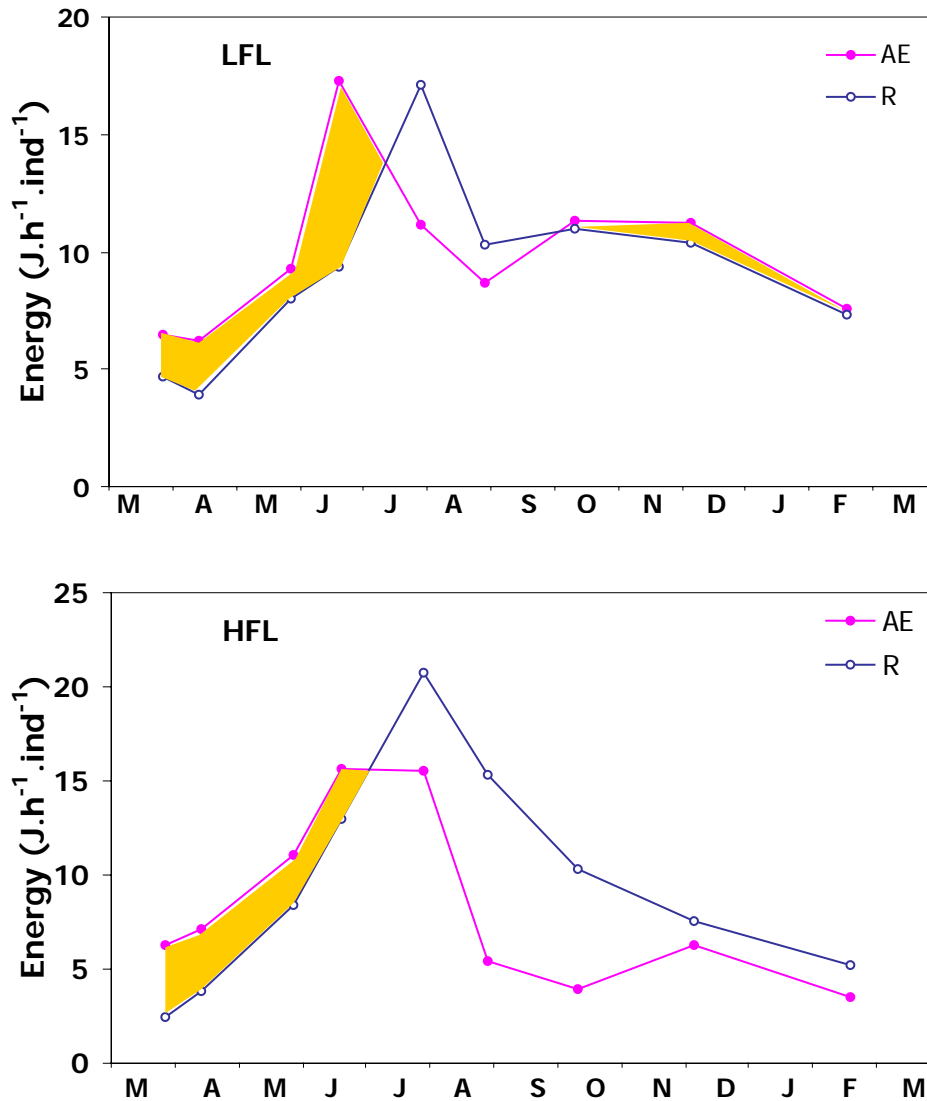


Figure 22: Variation saisonnière de l'assimilation ($\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) et de la respiration ($\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) de *C. gigas* élevées selon deux conditions de disponibilité de nourriture. A) huîtres nourries en condition trophique faible (LFL); B) huîtres nourries en condition trophique forte (HFL).

De telles différences dans les tendances saisonnières entre catabolisme et anabolisme induisent un modèle saisonnier marqué par les valeurs de SFG (fig. 23). Dans les deux conditions, le potentiel de croissance est positif au printemps, mais il diminue brusquement en fin de printemps. Pour le groupe HFL, la baisse est amplifiée pendant l'été et se prolonge en automne et hiver. Pour le groupe LFL, ce paramètre décroît en période estivale, puis se rétablit de l'automne. Il est évident que, quel que soit le niveau de nourriture, les huîtres ne

peuvent pas maintenir un potentiel de croissance positif en été lorsque leur gamétogenèse est à son maximum.

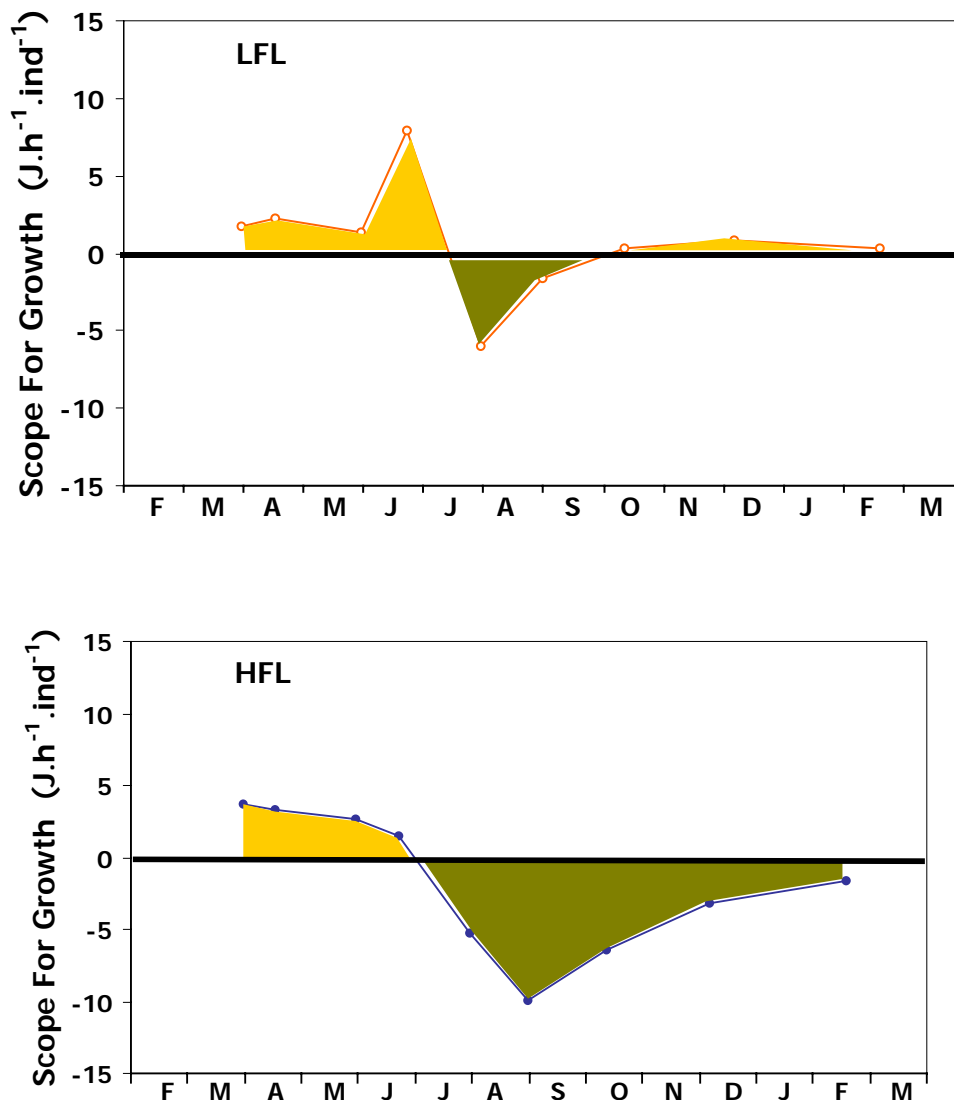


Figure 23: Variation saisonnière du SFG ($J.h^{-1}.ind^{-1}$) de *C. gigas* élevées selon deux conditions de disponibilité de nourriture. Huitres nourries en condition trophique faible (LFL); huitres nourries en condition trophique forte (HFL).

5.5 Discussion

5.5.1 Relations entre nourriture, écophysiologie et gamétogenèse

Dans leur étude sur les fonctions écophysiologiques de *C. gigas*, Ren et Ross (2001) considèrent qu'il existe un fort besoin de recherche quantitative en bioénergétique associée à la reproduction. Travaillant sur l'effet de la température sur les fonctions de filtration et de

respiration chez *C. gigas*, Bougrier *et al.* (1995) concluent que les modèles qu'ils proposent sont probablement "non applicables pendant la période de reproduction". Deux ans plus tard, Soletchnik *et al.* (1997) fournissent la première étude détaillée sur l'évaluation du budget énergétique de l'huître à différents stades de gamétogenèse. La présente étude complète ces premiers travaux et fournit une évaluation du bilan d'énergie et de ses composantes (filtration, absorption et respiration) sur l'ensemble d'un cycle de reproduction.

Concernant les débits de filtration, les variations saisonnières observées au cours de ce travail, sont clairement influencées par la gamétogenèse, plus que par l'effet de la température. Nous avons observé les valeurs maximales de CR au moment de la période la plus active de la gamétogenèse (juin, Chapitre III). Alors que, en août, lorsque les valeurs de température sont maximales, les valeurs de CR ont déjà très fortement diminué, l'activité gamétogénétique commençant à se réduire (Chapitre III). Bien que ce suivi mériterait d'être confirmé *in situ*, notre étude indique que la gamétogenèse stimule l'acquisition printanière de la nourriture par l'huître, comme cela a été montré par Soletchnik *et al.* (1997).

A ce sujet, Ren *et al.* (2000) soulignent que l'alimentation chez *C. gigas* montre de grandes différences dans les études (Gerdes 1983; Barillé *et al.*, 1994; Bougrier *et al.*, 1995; Soletchnik *et al.*, 1997). Ils proposent l'idée que cette variation des taux physiologiques pourrait être due à des artefacts expérimentaux et/ou à des différences génétiques entre population. En accord avec le travail de Soletchnik *et al.* (1997) et, en nous basant sur les résultats de ce travail, cette variation peut également être due au stade de maturation de l'huître.

Chez les bivalves, l'acquisition d'énergie peut aussi être régulée pendant l'absorption intestinale. Dans notre étude, les valeurs moyennes de l'efficacité d'absorption (AE, %) s'étendent entre 20 et 57% selon (1) le niveau de nourriture et (2) la saison. En ce qui concerne le premier point, il apparaît effectivement que les valeurs d'AE sont significativement inférieures en niveau riche de nourriture indiquant une régulation sélective

au niveau de la digestion. Deuxièmement, AE présente aussi une tendance saisonnière claire pour les deux groupes avec des valeurs plus basses en été et des valeurs plus élevées au printemps et à l'automne. Aucune corrélation entre la température et l'efficacité d'absorption ne s'avère satisfaisante pour expliquer une telle tendance, mais au contraire, et conformément aux travaux de Soletchnik *et al.* (1997), un effet négatif de la gamétogenèse sur AE est fortement supposé. En été, quand les gonades sont à leur maximum de développement, AE est à sa valeur minimale. Si cette relation inversée est claire, l'explication d'un tel résultat n'est pas évidente et n'a pas été retrouvée dans la littérature.

Concernant la consommation d'oxygène, nous observons également une variation saisonnière claire dans la même gamme que celle déterminée par Bougrier *et al.* (1995) et Soletchnik *et al.* (1997). Par contre, dans ce cas, les variations saisonnières sont sensiblement corrélées avec la température de l'eau. Il est connu que la température est un paramètre déterminant dans le contrôle du métabolisme des organismes aquatiques poikilothermes. Et, chez les bivalves, la dépense métabolique augmente clairement avec la température (Bayne et Newel, 1983 ; Le Gall et Raillard, 1988).

En outre, nos résultats indiquent également que, pendant l'été, la consommation d'oxygène est sensiblement plus élevée en condition HFL qu'en condition LFL. Puisque les huîtres en condition HFL développent plus de gonade que les huîtres en condition LFL (voir le chapitre précédent), nous pouvons formuler que cette différence de consommation d'oxygène pourrait être liée à la biosynthèse des gamètes. Ce "coût de gamétogenèse ou coût de la reproduction" (Honkoop, 2003) est encore très mal connu chez les mollusques bivalves. Dans un sens restrictif, le coût de gamétogenèse, *e.g.* l'oxygène consommé comme combustible de la reproduction, est effectivement mal documenté (voir revue de Honkoop, 2003). Il est néanmoins admis que la consommation d'oxygène augmente de manière significative avec le gain de poids lié à la maturation de l'huître (Soletchnik *et al.*, 1997). Cette corrélation positive entre la consommation d'oxygène et le développement de la

gonade a été déjà rapportée pour d'autres bivalves, par exemple chez *Mytilus edulis* (Bayne et Widdows, 1978), *Cerastoderma edule* (Newell et Bayne, 1980), *Modiolus modiolus* (Navarro et Thompson, 1996) et *Chorus giganteus* (Navarro *et al.*, 2002).

5.5.2 Coût de la reproduction et mortalités estivales

L'énergie dépensée pour la reproduction est supposée avoir une influence considérable sur l'énergie restante pour le fonctionnement et la croissance somatique d'une huître (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001). Et, comme pour la moule (Bayne *et al.*, 1976), nous observons dans les deux groupes d'huîtres étudiées qu'une demande métabolique de routine est plus sensible à la température quand les gonades sont entièrement développées, juste avant la ponte.

L'augmentation de la consommation d'oxygène observée en été, sans aucun accompagnement d'augmentation de la consommation de phytoplancton ou de l'efficacité d'assimilation (Thompson et Bayne, 1974 ; Navarro *et al.*, 2002) engendre une diminution du potentiel de croissance. Cela est clairement démontré dans ce présent étude par l'analyse du SFG qui diminue progressivement pendant le développement de la gamétogenèse et qui devient négatif lorsque la maturité est à son maximum.

Un "scope for growth" négatif indique généralement que l'environnement n'a pas pu apporté l'énergie requise par l'animal (Bayne et Newell, 1983). En hiver, ce raisonnement semble être valable. Cependant, une attention particulière pour apportée afin de maintenir un apport constant de nourriture. Ainsi, les valeurs négatives de SFG obtenues en été ne sont pas imputables à l'environnement, mais bien à la physiologie de l'huître et plus précisément à sa reproduction. Il ressort ainsi de cette étude que la reproduction se traduit par une période de SFG négatif en été. Cette période est plus ou moins intense et longue selon l'intensité et la durée de la gamétogenèse, qui sont-elles mêmes dépendantes de la quantité de nourriture au printemps. Cette étude confirme et complète par des aspects

quantitatifs les travaux de Soletchnik *et al.* (1997). Il est désormais nécessaire de mener ce type d'analyse *in situ*. Néanmoins, il apparaît d'ores et déjà que les causes de mortalités estivales sont à rechercher à la fois dans les conditions environnementales de l'été et dans l'intensité de la gamétogenèse, mais aussi dans les conditions d'élevage printanières.

6. Aspects génétiques

6.1 Préliminaire

Le travail réalisé ici est présenté en détail dans le chapitre IV, intitulé "*Reproduction in the Pacific oyster, Crassostrea gigas: Evidence of a genotype-dependent strategy*". Une synthèse en français est fournie ci-après.

6.2 Introduction

Nous venons d'apporter un certain nombre d'informations sur le rôle de la reproduction, associé aux paramètres de l'environnement (nourriture et température), dans le phénomène des mortalités estivales. Néanmoins, des travaux montrent dans certains cas l'existence d'une base d'origine génétique (Beattie *et al.*, 1980; Perdue *et al.*, 1981; Hershberger *et al.*, 1984) dans ce phénomène. A ce titre, et dans le cadre du programme MOREST, le Laboratoire de Génétique et Pathologie d'IFREMER La Tremblade a réussi à sélectionner des familles d'huîtres, les unes sensibles et les autres résistantes à la mortalité estivale (Degrémont *et al.*, 2003). Le but de ce quatrième chapitre est donc d'analyser les différences physiologiques entre ces familles, notamment en ce qui concerne la reproduction. L'existence de telles différences devraient permettre d'éclairer plus spécifiquement les causes physiologiques des mortalités estivales en relation avec la reproduction.

6.3 Matériel et méthodes

6.3.1 L'origine

Les huîtres utilisées dans cette étude ont été produites en 2001 par le Laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie (La Tremblade, Charente Maritime). Des géniteurs issus du bassin de Marennes-Oléron ont participé à la production de familles biparentales (G1) suivant un plan de croisement de type hiérarchisé par les mâles. Chaque mâle a été croisé avec plusieurs femelles afin de générer des familles de plain- et demi-frères. Cette génération a été conçue dans un schéma sélectif basé sur le caractère de survie. Des différences significatives de survie sur le terrain ont été établies entre les familles, ce qui a permis de caractériser des progénitures de type résistant « R » et de type sensible « S » aux mortalités estivales (Degremont, 2003).

6.3.2 Les prélèvements et la biométrie

Ces pro-génies ont été élevées pendant un an à la nurserie du Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (IFREMER/Bouin, Vendée). En février 2002, deux groupes R et S ont été constitués à partir du mélange des familles les plus résistantes et les plus sensibles. En mars 2002, ces deux groupes d'huîtres ont été transférés et mis en élevage à "Fort Espagnol" dans le golfe du Morbihan (sud Bretagne). De mai 2002 à février 2003, quinze huîtres par groupe ont été collectées mensuellement pendant l'hiver et deux fois par mois pendant l'été et disséquées par les biologistes du Laboratoire Conchylicole de Bretagne (IFREMER/La Trinité, Morbihan). La masse totale (chair + coquille, en g), la masse humide de la chair (g) et celle de la masse viscérale (g) ont été estimées pour chaque individu.

6.3.3 L'histologie

Une fois disséquée, la masse viscérale a été fixée dans la solution de Davidson pendant 48 h. Pour chaque individu, une section transversale standard située au-dessus de

la région péricardique a été réalisée. Celle-ci a été déshydratée et incluse en paraffine. Des coupes de 5 μm d'épaisseur ont été effectuées au microtome, puis colorées à l'hématoxyline d'Harris et l'éosine Y. Ces coupes ont été envoyées à la Station Expérimentale d'Argenton/IFREMER (Finistère) pour des analyses histologiques.

6.4 Résultats

6.4.1 La croissance générale

La croissance générale des huîtres résistantes et sensibles montre la même augmentation progressive tout au long de l'étude, de mai 2002 jusqu'en février 2003. À la fin de l'étude, les huîtres présentent un biomasse totale équivalente dans les deux lots, de 62,3 g dans le lot S et 64,8 g dans le lot R. Le taux moyen de croissance mensuelle est autour 3,6 $\text{g}\cdot\text{mois}^{-1}$ dans les deux groupes. En revanche, des différences significatives sont observées dans la masse humide de la chair et particulièrement dans celle de la masse viscérale. Ces différences ont été principalement identifiées au cours de la gamétogenèse, *i.e.* de fin juin à début octobre.

6.4.2 La reproduction

La détermination du sexe pour 209 huîtres analysées dans le groupe S donnait sur une base annuelle : 44 % de femelles, 43% de mâles et 12% de sexuellement indifférenciées. Parmi les 209 huîtres du groupe résistant, 35% sont femelles, 34% mâles et 30% étaient sexuellement indifférenciées. La sex-ratio mâle:femelle des deux groupes d'huîtres n'est pas significativement différente de 1F:1M. Par ailleurs, l'incidence des hermaphrodites reste limitée (< 1 %).

En ce qui concerne le cycle de reproduction, cinq stades de développement des gamètes ont été observés dans les deux groupes (fig. 24). C'est à ce niveau que commencent à apparaître les fortes différences entre le lot R et S. Les stades de croissance I

et II sont présents à partir de mai et jusqu'en juin chez les huîtres « S » et à partir de mai et jusqu'en juillet chez les huîtres « R ». Ensuite, le stade III s'observe dans la majorité des huîtres à partir de mai et ce jusqu'en décembre chez les huîtres S, alors qu'il disparaît dès septembre chez les huîtres R. Le stade IV, indiquant la phase d'émission des gamètes et de résorption, est observé à partir de juillet dans le groupe R, mais majoritairement en août, alors qu'en septembre, ce stade disparaît complètement au profit du stade indifférencié. Le schéma est très différent pour le groupe S, pour lequel, même si le stade IV est observé en juillet et en août, il l'est dans une moindre proportion que pour le groupe R. En revanche, on observe encore ce stade en décembre et janvier.

La période de faible activité sexuelle (stade 0) des huîtres R débute immédiatement après la ponte (fin août) et cette période se prolonge jusqu'en février. À partir d'octobre, 100% des huîtres R présentent le stade 0. En revanche, chez le groupe S, en septembre, ce stade n'est observé que chez peu d'individus (7% en moyenne) et sa proportion n'augmente que très lentement pour atteindre seulement 60% en février. Les 40% restants des huîtres S présentent encore une « activité sexuelle » de résorption principalement.

Il apparaît ainsi, sur la base de ces informations qualitatives que la gamétogenèse est très différente entre les huîtres du lot S et celles du lot R.

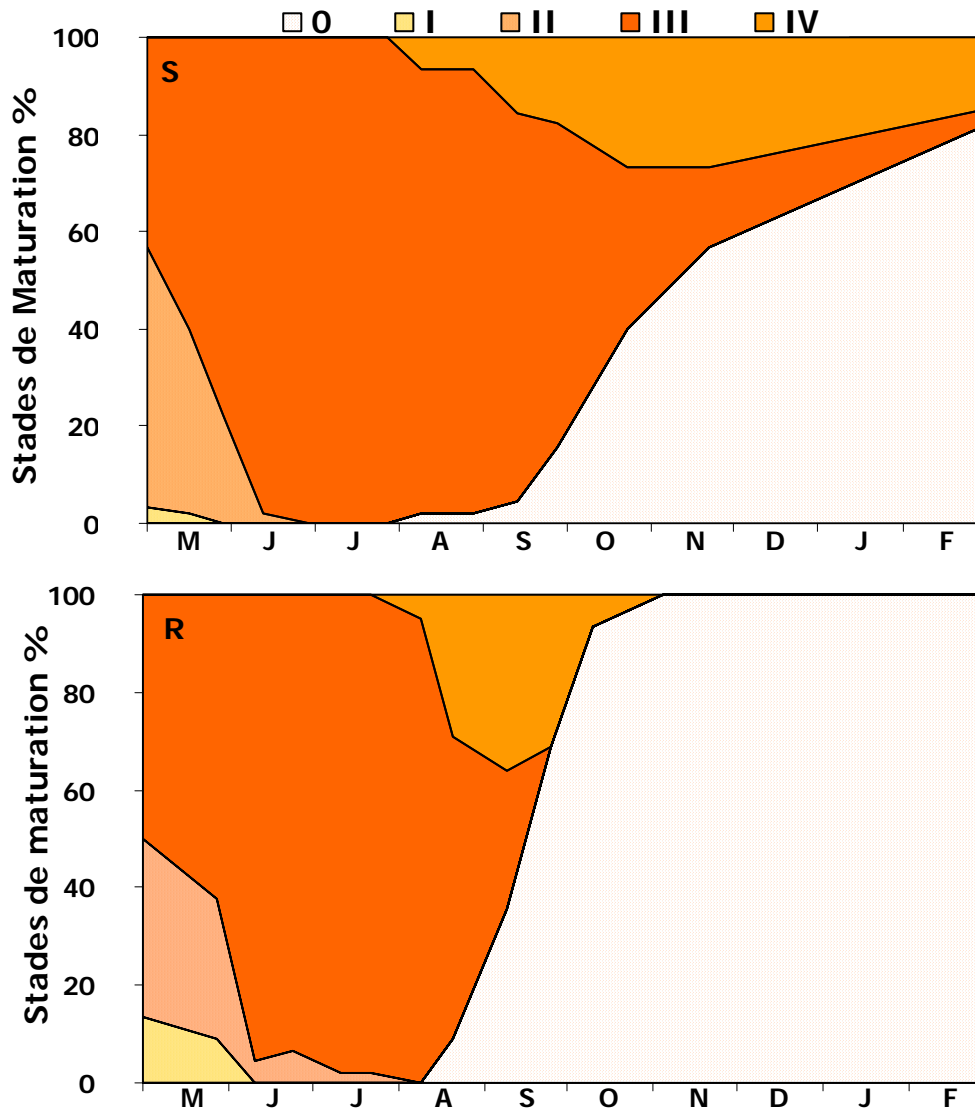


Figure 24: Evolution saisonnière des stades de maturation chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol. S = Sensibles , R = Résistants.

Cette forte différence dans le cycle de reproduction des lots R et S est encore plus évidente lors de l'analyse quantitative de la gamétogenèse. Effectivement, d'un point de vue quantitatif, l'occupation de la gonade (AG, %) suit un modèle saisonnier très différent dans les deux groupes (fig. 24).

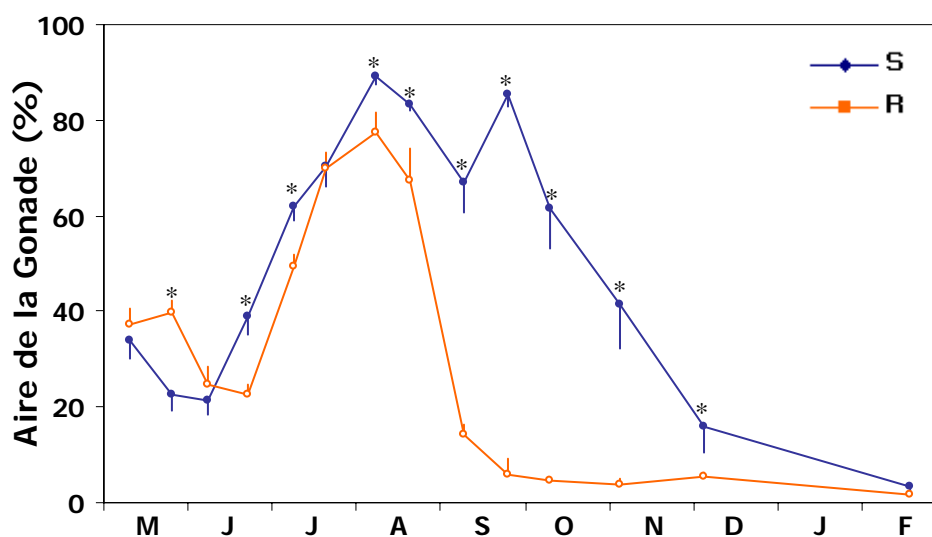


Figure 25: Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol (Moyenne \pm SE). Huitres du lot résistant (R) et huitres du lot sensible (S). * = différences significatives.

Le groupe « S » présente dès Juin des valeurs de AG plus élevées que dans le groupe R. En juillet, une légère inflexion des valeurs de AG chez le groupe S remet à égalité les deux populations. Néanmoins, dès août, les valeurs de AG sont à nouveau plus élevées dans le groupe S et le pic atteint par AG est de 89% contre 76% chez les huitres R. Une très forte chute des valeurs de AG a lieu entre fin août et début septembre, chez les huitres R, indiquant une ponte synchrone et complète. La valeur de AG tombe alors à 5% pour attendre jusqu'à en fin d'expérience 1,8% en février. Pour le lot S, cette chute des valeurs de AG est beaucoup plus ténue, caractérisant une ponte très partielle en août (la valeur d'AG ne diminue qu'à 66%). Une nouvelle augmentation de AG est observée en septembre, pour atteindre 85%. Ensuite, à partir d'octobre, un lent processus de résorption des gamètes se met en place et l'occupation gonadique est encore de 15% en décembre. C'est seulement en février que le pourcentage d'AG des huitres Sensibles est proche de celui des huitres Résistant, autour de 3,5%.

Cette forte différence dans le modèle de gamétogenèse entre les deux groupes est également confirmée en comparant la taille des ovocytes chez les femelles. En juin, la

croissance ovocytaire des huîtres du groupe S est significativement plus avancée que chez celles du groupe R, un écart de $3\mu\text{m}$ en moyenne entre les deux courbes de fréquence de tailles ovocytaires peut être observé au début et à la fin de la courbe. Les huîtres sensibles présentent 24% d'ovocytes en croissance ($12\text{-}30\ \mu\text{m}$) contre 35% chez les huîtres 'résistantes', et 16% d'ovocytes en stade d'atrésie ($41\text{-}60\mu\text{m}$) contre seulement 5% pour les huîtres R. En revanche, en août, pendant la phase maximale d'activité gamétogénétique, aucune différence significative dans la taille des ovocytes n'est remarquée: les deux groupes montrent strictement le même profil ovocytaire. En septembre, des différences significatives entre les deux groupes sont à nouveau notées. Après avoir pondu, les femelles du groupe S possèdent encore des ovocytes résiduels dont le diamètre est supérieur à celui des ovocytes émis et qui commencent à être résorbés, tandis que celles du groupe R possèdent des ovocytes résiduels au stade de croissance (stade II). Ce stade n'a pas été repéré dans la classification en stades de maturation ce qui est dû à la faible sensibilité de la technique. L'histologie semi-quantitative fournit en effet plus de détail que la seule observation des stades de maturation.

6.5 Discussion

6.5.1 La reproduction chez *C. gigas* : une stratégie génétique-dépendante

Peu d'études détaillent la variabilité phénotypique du cycle reproducteur de *C. gigas*. La sélection naturelle est basée sur l'existence de différences de phénotypes entre les individus impliquant un succès reproducteur et/ou une survie différentielle (Ernande, 2001). Dans cette étude, les deux groupes d'huîtres sélectionnées pour leur sensibilité différente aux phénomènes de mortalité estivale, montrent une très forte différence dans leur stratégie de reproduction. A notre connaissance, aucune étude chez les mollusques-bivalves ne relate de telles différences dans une stratégie de reproduction (fig. 26).

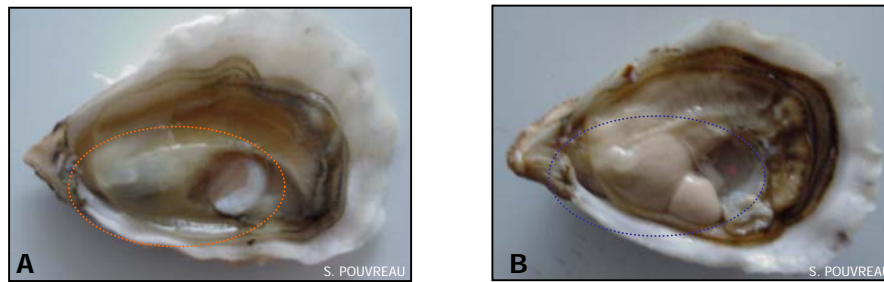


Figure 26. Différence de croissance gonadique chez une huître *Crassostrea gigas* résistant (a) et sensible (b).

Ces différences ont été mises en évidence par des approches qualitatives, complétées par des mesures quantitatives d'occupation gonadique et de taille ovocytaire. D'une façon générale, il ressort clairement que ces différences se manifestent à plusieurs niveaux du cycle de reproduction : (1) la gamétogenèse commence plus tôt et plus rapidement dans le lot S et, par conséquent, le stade III de maturation est atteint plus tôt chez les S ; (2) si la ponte commence à la même date dans les deux groupes, elle est totale et synchrone dans le groupe R, mais très partielle dans le groupe S ; (3) en automne, les huîtres S qui n'ont pas ou peu pondu, commencent un long processus de dégénérescence gamétique (résorption ou atrésie), tandis que toutes les huîtres R entrent en repos sexuel ou tout au moins en activité sexuelle très réduite.

La résorption ou l'atrésie de gamètes non émis est bien décrite pour d'autres espèces de mollusques (Lubet et Mann, 1987; Dorange et Le Penneç, 1989) et à notre connaissance pour *C. gigas* seulement par Steele et Mulcahy (1999). Il semble que ces atrésies ovocytaires surviennent majoritairement chez les huîtres en limites géographiques de leurs aires de reproduction, les plus fortes températures de l'eau de mer étant insuffisantes pour provoquer la libération des gamètes.

Ainsi, il apparaît que les huîtres du lot résistant suivent un modèle saisonnier bien défini et "classique" de la gamétogenèse de *C. gigas* (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Berthelin

et al., 2000), tandis que les huîtres du lot sensible ont une gamétogenèse plus exacerbée mais une émission de gamètes inefficace entraînant une longue période de résorption. La base physiologique pour expliquer de telles différences n'est pas évidente, mais ces résultats sont à rapprocher de nos observations originales réalisées dans les chapitres I et II, montrant que des huîtres élevées en milieu riche développent une gonade hypertrophiée, mais présentent une ponte généralement fragmentaire.

6.5.2 Mortalités estivales

6.5.2.1 Des causes bioénergétiques liées à la gamétogenèse ?

Les résultats de notre étude montrent que les huîtres creuses peuvent développer différentes stratégies d'allocation des ressources selon leur base génétique. La répartition des ressources peut être plastique, ainsi le maintien et la survie sont généralement assurés dans les environnements trophiques pauvres, tandis que la reproduction et la croissance sont favorisées quand les ressources de nourriture sont abondantes (Cheney *et al.*, 1998; Myrand *et al.*, 2000). Ce schéma est complété en montrant que pour un même niveau de nourriture, l'allocation énergétique n'est pas identique entre deux lots d'origine génétique différente.

Gouletquer *et al.* (1998) émettent l'idée qu'un effort reproducteur élevé de *C. gigas* peut être lié à la mortalité estivale. La même conclusion a été obtenue pour *M. edulis* par Tremblay *et al.* (1998) et Myrand *et al.* (2000). Dans le présent travail, il est effectivement constaté que le premier événement significatif de la mortalité estivale observée pendant le stade de maturité (début juillet) est plus intense chez les huîtres sensibles (22 %) (fig. 27). Cette sensibilité différentielle est bien évidemment à rapprocher du comportement reproducteur. L'hypothèse d'une allocation énergétique vers la reproduction trop importante chez le lot S et probablement d'une demande métabolique plus élevée (cf chapitre III) est tentante pour expliquer les différences de mortalités observées. Par son comportement

reproducteur, l'huître s'est sensibilisée vis à vis de toute forme d'effort stressant (Cheney *et al.*, 1998).

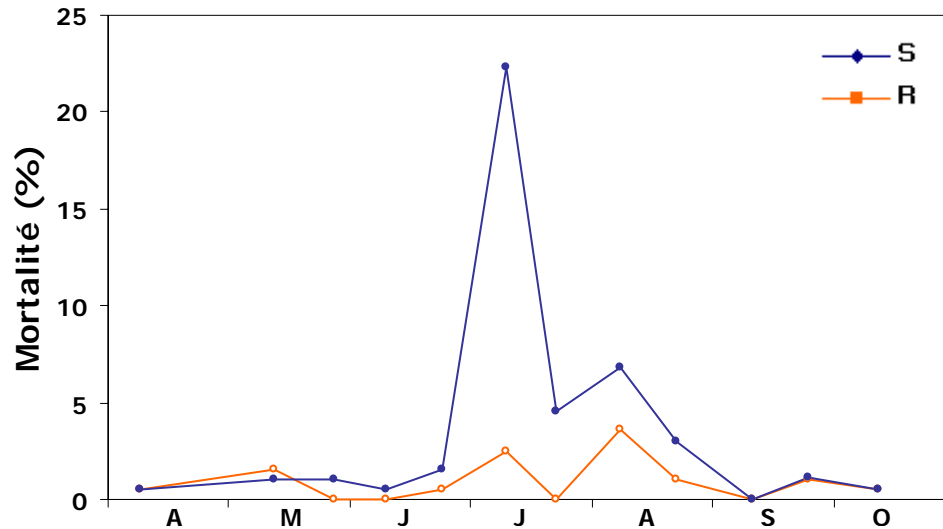


Figure 27. Pourcentage de mortalité chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol. Huîtres du lot résistant (R) et huîtres du lot sensible (S). * = différences significatives.

En général, le facteur génétique qui provoque l'hypertrophie de la gonade joue un rôle sélectif chez les huîtres sensibles. Ces animaux deviennent plus fragiles vis à vis des changements du milieu (Mori, 1979; Ernande, 2000). Par ailleurs, des différences génotype-dépendantes dans des cycles de reproduction et de stockage peuvent affecter les processus physiologiques et biomécaniques de l'organisme (Secor *et al.*, 2001). Ces différences pourraient aussi affecter des taux génotype-dépendants de survie (Ernande, 2001). Par exemple, Secor *et al.*, (2001) montrent qu'une moule qui a trop puisé dans ses réserves énergétiques pour se reproduire ne peut pas allouer assez de ressources pour maintenir une force d'attachement du byssus suffisante.

6 5.2.2 Des causes bioénergétiques et infectieuses liées à l'émission des gamètes ?

En complément, il faut noter que nous observons également d'autres événements de mortalités, de moindre intensité, juste après l'émission des gamètes du mois d'août.

Berthelin *et al.* (2000) et Beattie *et al.* (1980) observent que les huîtres *C. gigas* montrent effectivement un état fragile dû à la dépense énergétique engendrée par les événements de ponte. Chez les huîtres, la libération des gamètes implique la coordination de l'activité des marges du manteau, des branchies et principalement des contractions du muscle adducteur (Foigil et Taylor, 2000). L'énergie dépensée pour l'émission de gamètes par les contractions du muscle adducteur pourrait être plus grande chez les huîtres présentant une gonade hypertrophiée. Ceci pourrait affecter l'animal, le privant de ressources nécessaires pour maintenir les valves fermées, ce qui induirait une dégradation de la santé des animaux (Poulet *et al.*, 2003). Par ailleurs, les observations histologiques montrent systématiquement après l'émission des gamètes un tissu très lâche et désorganisé, probablement propice à une infection bactérienne, mais pour l'instant pas clairement mis en évidence.

6.5.3 Conclusion

Ce travail démontre l'existence d'une stratégie de reproduction pour *C. gigas* fortement dépendante du génotype. Le groupe sensible montre une activité gamétogénétique plus précoce et plus intense, avec une émission des gamètes faible et une période de résorption (atrésie) plus longue. Au contraire, le groupe résistant montre un cycle gamétogénétique clair et restreint avec une émission de gamètes intense et totale. Cette différence physiologique principale pourrait expliquer la survie différentielle observée entre les deux groupes et constitue un élément de réponse possible au problème des mortalités estivales.

CHAPITRE I

Gametogenesis, reproductive effort and spawning behavior of the Pacific oyster, Crassostrea gigas: evidence of an environment-dependent strategy

Gametogenesis, reproductive effort and spawning behavior of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy

ABSTRACT

The reproductive cycle of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was studied monthly over one year (March 2002 – February 2003) in two French marine areas, the Marennes-Oléron Bay and Bay of Veys (BOV); both are characterized by different hydrobiological conditions. We assessed seasonal changes in the reproductive cycle through the measurement of gonad evolution area by quantitative histology technique. From a qualitative point of view, both oyster groups displayed the same seasonal gametogenic cycle, which was clearly affected by the temperature cycle. Furthermore, their spawning period was not synchronized, but was associated with a temperature of 19°C reached in August in the two areas. Marennes-Oléron oysters showed a partial spawning in July when the temperature was above 18.5°C; it was quickly stopped to restart a month later and became total when the temperature reached and stabilized at 19°C. The Bay of Veys oysters presented a long and asynchronous spawning, (August-November). Strong differences in gametogenesis duration and intensity were observed in both groups. The gonads of oysters cultivated within Bay of Veys were more developed than those of individuals from Marennes-Oléron Bay (6.1 and 1.9 g in total weight, respectively). We attributed the differences noticed between both gametogenic cycles to those in phytoplankton concentrations (chlorophyll *a* levels) in both bays. This study evidenced a more important reproductive effort in Bay of Veys oysters than in Marennes-Oléron ones, 86% against 53%, respectively.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Gametogenesis; Image analysis; Pacific oysters; Reproductive effort; Stereology.

In collaboration with Stéphane POUVREAU, Patrick SOLETCHNIK, Michel ROPERT and Marcel

LE PENNEC. Submitted to Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

Introduction

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), was introduced in France in 1969 after the mass mortality event that decimated the native and farmed species, *Crassostrea angulata* (Deslous-Paoli, 1982; Grizel and Héral, 1991). Its production, more than a thousand metric tons in 2003, has become now a major industry in the French aquaculture. The most important production areas are the Bay of Veys (BOV) in Normandy, (*e.g.* Kopp *et al.*, 1997) and the Marennes-Oléron bay (MOB) in Charente-Maritime (*e.g.* Soletchnik *et al.*, 1998).

Reproduction is one of the most important physiological processes in bivalves life. In the Pacific oyster, the developed gonad may account for more than 50% of the soft body; its long period of development extends from March to October. Many authors, especially Paniagua-Chávez and Acosta-Ruíz, (1995) and Lango-Reynoso *et al.*, (1999) have thoroughly investigated gonad development from a qualitative point of view, but quantitative approaches on the gametogenic cycle such as gonad development intensity and cost of gametes maintenance, are scarce (Ruiz *et al.*, 1992). Consequently, deterministic relationships between environment and reproduction processes are poorly known. As a consequence, one should be aware that: i) the cost of reproduction in bivalves remains virtually unknown (Honkoop, 2003), which prevents anyone from really testing the connection as for energy between gametogenesis and summer mortality and ii) reproduction control in hatchery, *i.e.* broodstock conditioning, is still empirical (Chávez-Villalba *et al.*, 2002) and zootechnic methods are not optimized.

Here, through a quantitative approach we studied, in various environments, the relationship(s) between hydrobiological conditions, gametogenesis and mortality in *Crassostrea gigas*. Our investigations were focused on oysters from BOV and MOB because

of the strong differences in the trophic conditions within these two geographical areas: indeed, the former is an eutrophic bay (Ropert, 1998) whereas the latter is characterized by a limiting trophic carrying capacity (Héral, 1989).

Materials and Methods

Study sites, sampling and biometry

This study was performed on individuals coming from a single population: spats were produced in an IFREMER shellfish hatchery (La Tremblade, France) in February 2001 and reared during one year in the IFREMER shellfish nursery (Bouin, France). In February 2002, the oysters were separated in

two groups: the first one was set in the South part of the Marennes-Oléron bay, whereas the second one was placed in the east part of the Bay of Veys (Fig. 1).

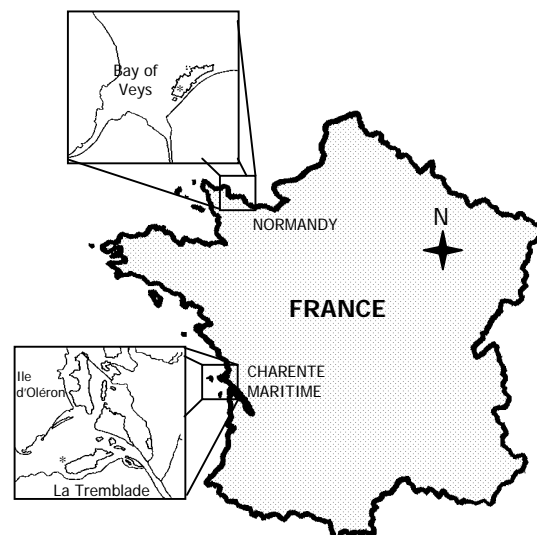


Figure 1. Location of the field-study sites (*): Marennes-Oléron bassin and Bay of Veys.

Due to differences in their hydrobiological conditions (Tab. 1), these two sites are dissimilar: the MOB area located on the Atlantic coast, North of Bordeaux, is used for spat collection and rearing of adults (Soletchnik *et al.*, 1998) and is characterized by a limiting carrying capacity due to the important biomass (about a thousand tons) present in this site. BOV, situated in the Eastern part of the Channel, is a place of high oyster productivity with growth and fattening rates between the highest observed in France (Ropert, 1998).

Table 1. Notes to describe the local habitat of oysters at two sites in French coast.

Site	Brief description of environmental conditions
*Marennes-Oléron Bay	Coastal site. The bay is an open ecosystem under the influence of oceanic water masses. Seasonal temperatures (minimum in winter 6°C and maximum in summer 19°C), with summer algal blooms of 13 µg/l around (3-7 µg/l on average from May to August).
**The Veys Bay	Estuarine site. Seasonal temperatures (minimum in winter 5°C and maximum in summer 19.8°C); salinity range 32-34‰; chlorophyll <i>a</i> concentrations variable, with peaks of 24.6 µg/l in summer (4-11 µg/l on average from May to August)

* Soletchnik *et al.*, 1998; Gouletquer *et al.*, 1998 ; Razet, D. pers. com.

** Ropert, M., 1998; Daniel, A., 2002.

The reproductive cycle of *C. gigas* in both sites was followed during 1 year, from March 2002 to February 2003, through a systematic sampling scheme. Sampling was performed monthly from December to April, and twice a month from May to November. Each time, ten Pacific oysters were collected from each site by IFREMER coastal laboratories, LCPC in Charente-Maritime, and LCN in Normandy; as a whole, 188 oysters from MOB and 180 oysters from BOV were examined in this study. After field collection, the samples were sent to our laboratory (IFREMER Shellfish Physiology Laboratory) for measurement, dissection and histological analysis.

For all specimens, shell length (antero-posterior axis) was first measured to the nearest mm prior to dissection. Soft tissues, *i.e.* total flesh, were then removed from the shell, drained 5-min on absorbent paper and weighted to the nearest g (W). After flesh dissection, individual visceral mass (digestive gland + gonad) was weighted (W_{vm} in g) and prepared for histological analysis.

The gonad of *C. gigas* is fused with digestive gland and mixed with storage tissue. Consequently, reproductive and non-reproductive tissues cannot be properly separated (Heffernan and Walker, 1989; Urban and Riascos, 2002), and thus quantitative parameters such as gonado-somatic index and biochemical composition are roughly assessed. This led us to develop a specific quantitative method to estimate the gonad development from histological preparation and quantitative image analysis.

Histological analysis

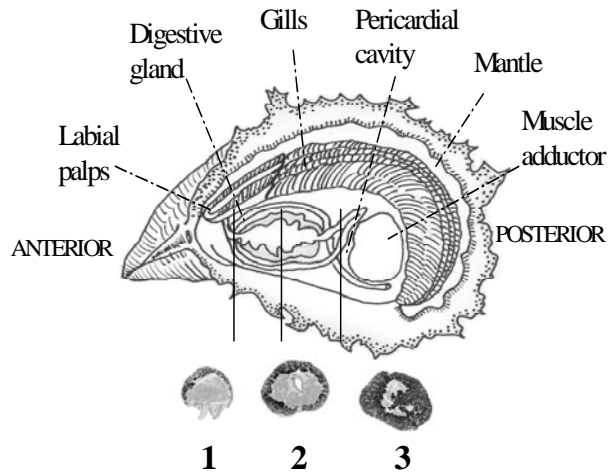


Figure 2. Drawing of *Crassostrea gigas* (adapted from *Crassostrea gigas*, Barillé *et al.*, 1997) showing the three levels in which the cuts were done for image analysis. 1: Anterior section; 2: Middle section and 3: Posterior section. Directional body axes based on the comparative anatomy approach proposed by Stasek (1963).

For each oyster, the length of the visceral mass was measured, and then the mass was divided in three equal portions. These three sub-samples were fixed in Davidson's

These tissue samples mainly contained outer epithelial, connective and storage tissues, gonadal and digestive tissue layers. The three sections were mounted and stained in Harris hematoxylin and counter-stained in eosin Y following the standard method proposed by Martoja and Martoja-Pierson (1967).

solution (Shaw and Battle, 1957) and dehydrated in an ascending alcohol series for wax embedding. Sections of 5µm were cut at representative body levels from each portion: the first one, or anterior section, was realized just behind the labial palps, whereas the next one, or middle section, was cut apart just at the mid visceral level, and the last one, or posterior section, just before the pericardial cavity (Fig. 2).

Qualitative analyses

Each slide was first examined under light microscope for sex determination. Presence of sperm, oocytes or missing gametes allowed us to define individuals as male (M), female (F), hermaphrodite (HP) or sexually undifferentiated (U) . The observed sex ratios were tested with Wilks' G^2 test ($\alpha = 0.05$) and Z test ($\alpha = 0.05$).

Each oyster was assigned a stage of gonadal development on the basis of descriptions made by Lubet (1959), Kennedy and Battle (1964) and Mann (1979) as follows:

- Stage 0 (resting stage): there is no trace of sexuality; follicles are non-existent or elongated and consist in undifferentiated germinal epithelium;
- Stage I (early growth stage): follicles are small and isolated with numerous spermatogonia or oogonia;
- Stage II (late growth stage): follicles are actively developing with primary gametes and some free (secondary) oocytes and spermatozoa;
- Stage III (maturation stage): near ripe or ripe follicles are densely packed with maturing gametes; presence of oocytes with distinct nucleus and nucleolus, spermatozoa oriented with tails toward the follicle lumen; and
- Stage IV (spawning and reabsorbing stages): follicles are distended, and some of them broken. However, numerous gametes may still remain. In some cases, redevelopment takes place with increased number of primary oocytes and spermatocytes. For other cases, gametes are refractory, re-development is not obvious, and phagocytes are present.

The percentage of individuals in the five developmental stages throughout the annual cycle was tested with Wilks' G^2 test ($\alpha = 0.05$) among the sites on each sampling data.

Quantitative analyses

Percentages of gonad and digestive areas (GA and GD, respectively) were determined on each histological section. Slides were, first, scanned with a digital scanner (hp scanjet 7400c). Scanned images were saved and stored in TIFF format. Tissue areas were measured by using an image analysis software (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.).

The gonadal biomass (GB) was determined by extrapolation (stereology principle by Versterby, 1993) as follows: $GB = W_{vm} \times GA / 100$ where GB = Gonadal Biomass in g (wet weight); GA = Mean percentage of gonadal area in % (mean of the 3 sections for each individual) and W_{vm} = Visceral mass (Gonad + digestive gland) in g (wet weight).

Total soft tissue production (P , in g) and gonad production (Pr , in g) were calculated on a temporal basis (between t and $t-1$) as follows: $P = W(t) - W(t-1)$ and $Pr = GB(t) - GB(t-1)$. The reproductive effort (ER, %), *i.e.* the part of production allocated to gonad, was then calculated as follows: $ER = Pr/P$.

The spawning intensity was determined by analyzing samples just before ($ts-1$) and after the spawning event (ts). Gamete spawning (Prs , g) was estimated from gonad wet weight losses, as follows: $Prs = GB(ts) - GB(ts-1)$. The comparison between Pr and Prs allowed us to describe the spawning event as being partial or complete. The gonadal biomass values were analyzed with the Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$)

Results

Somatic growth

The general growth pattern showed a progressive rise during the year (Figs. 3 A, 3 B and 3 C). Body weight increased from 13 g in March 2002 to approximately 43 g for individuals from MOB and 70 g for BOV oysters in February 2003 (Fig. 3 A). The total growth rate was around 4.7 g.month^{-1} (*i.e.* 57.0 g.y^{-1}) in BOV against 2.5 g.month^{-1} (*i.e.* 30.0 g.y^{-1}) in MOB and exhibited seasonal variations with higher values in summer. The differences between the two oyster groups were significant ($U = 76$, $z = 1.965$, $p < 0.014$, Mann-Whitney U test). The shell and flesh growths displayed similar patterns of evolution versus time (Figs. 3 B and 3 C).

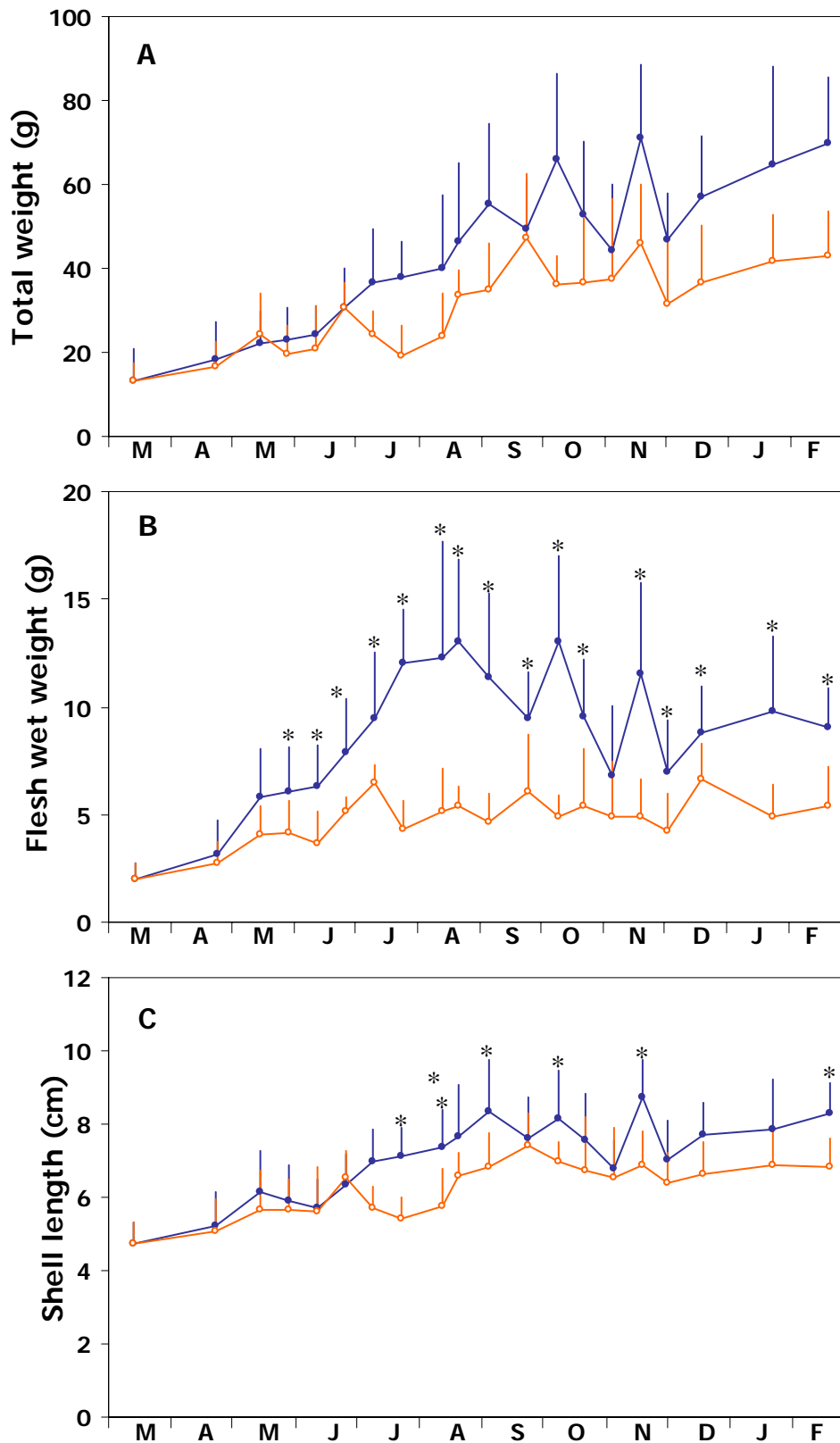


Figure 3. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Total weight (shell and flesh); B: Flesh wet weight and C: Shell length (antero-posterior axis). In orange Marennes-Oléron Bay and in blue Bay of Veys. (mean \pm SD). * = Significant difference.

Sex ratio

Among the 188 oysters examined in MOB, 80 (43%) were sexually undifferentiated (U), 48 (25%) were female (F), and 59 (31%) were male (M) (Fig. 4 A). The female-to-male sex ratio was around 1F-1.22M. Fifty five among the 180 oysters sampled from BOV, (*i.e.* 31%) were sexually undifferentiated, 46 (25%) were female and 78 (43%) were male (Fig. 4 B). The general sex ratio was around 1F-1.69M. Nevertheless, difference in sex ratio between MOB and BOV was not significant on an annual basis ($p = 0.116$, $z = 1.198$, Z-test).

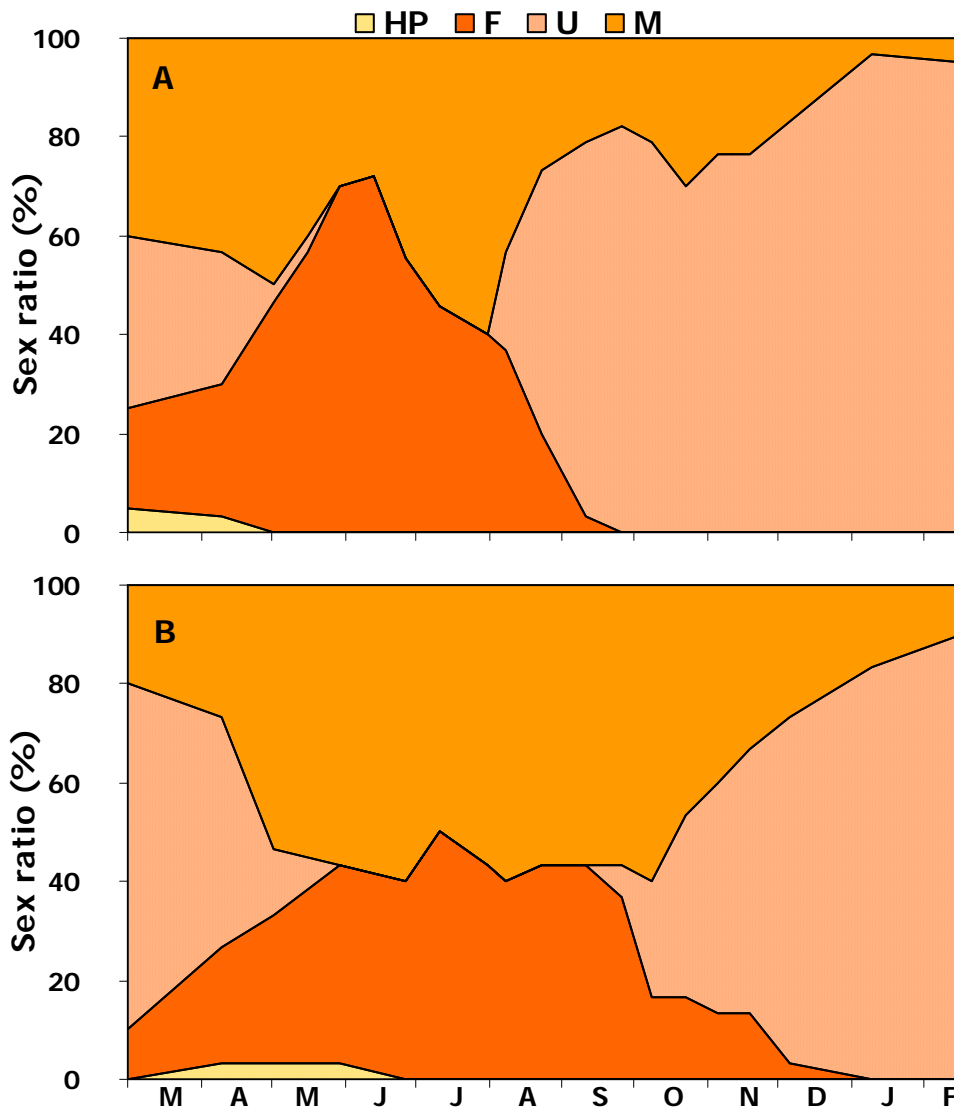


Figure 4. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys. F = Female; M = Male; U = Undifferentiated; HP = Hermaphrodite.

On a seasonal basis, the pattern of sex ratio showed great variation with a predominance of undifferentiated oysters in winter, and a sex-ratio near the equilibrium in summer. Incidence of hermaphrodites was generally low (< 1 %): indeed, only one hermaphrodite was reported from each site and was found in spring during the seasonal sex change (Figs. 4 A and 4 B). Differences between both sites were significant, especially at the end of the summer and in autumn for the female population ($p = 0.009$, Wilks' G^2 test), in early spring and summer for undifferentiated organisms ($p = 0.001$, Wilks' G^2 test). In June, females were more numerous in MOB than in BOV. However, after the spawning event, in September, females from BOV were larger than the MOB one. On the basis of sex determination, it appeared that the gametogenic cycle was earlier in MOB than in BOV. For MOB, most of the organisms were sexually differentiated in spring while most of the BOV population was still undifferentiated.

Gametogenic cycle: qualitative approach

On an annual period, analysis of histological changes in oyster gonads evidenced five typical stages in gametogenic cycle (Figs. 5 A and 5 B). In MOB, oysters exhibited a very low gametogenic activity (stage 0) in early spring; the gonad displayed a well-developed inter-follicular storage tissue. Stages I and II were mainly observed in May when the gonad tissue contained numerous spermatocytes and oocytes. They were followed with the maturation stage (stage III), which lasted until early August. This stage was characterized by a maximal development of acini. The spawning stage (stage IV) began slightly in early July and lasted till August, *i.e.* at the time of a complete and synchronized spawning. The resorption of gametes took place from September to November. From December to February, oysters reinitiated their gametogenesis, but the sexes were undistinguishable (Fig. 5 A).

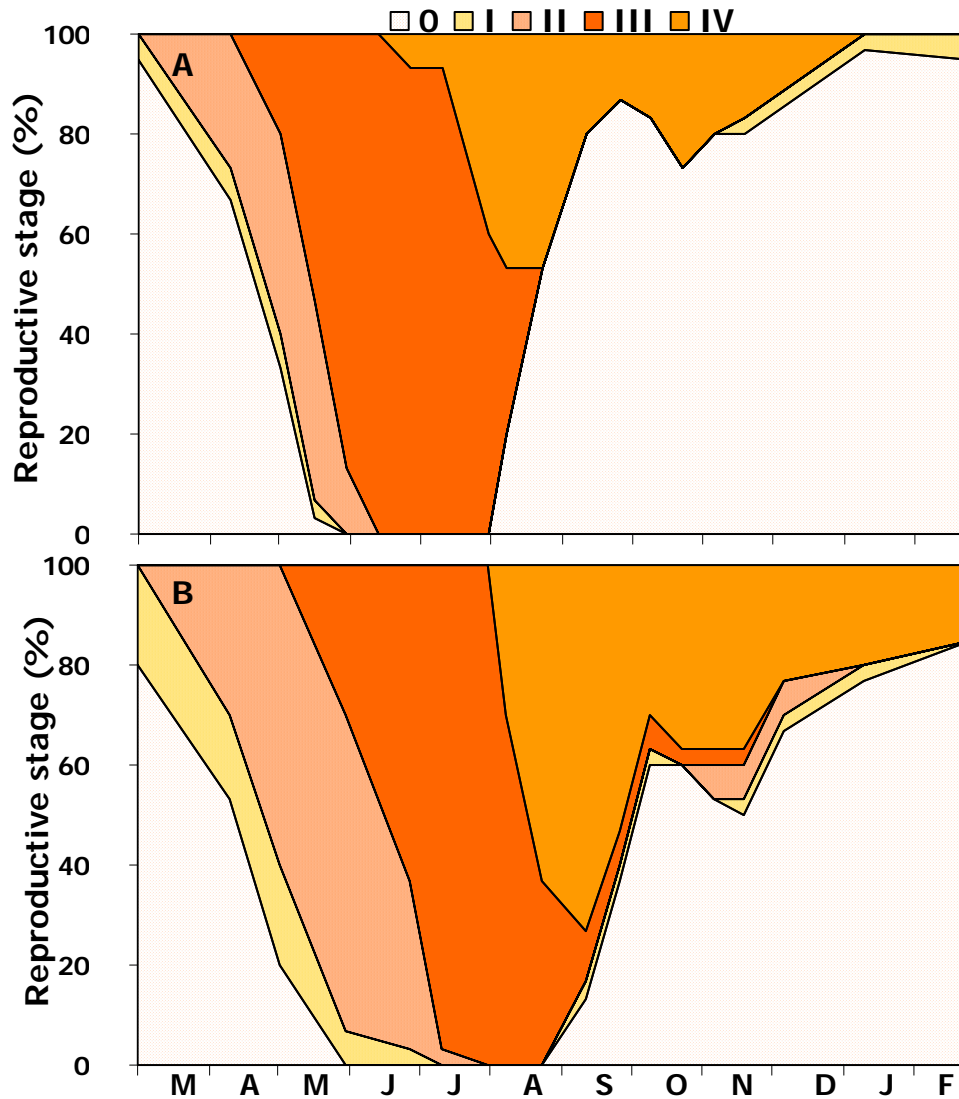


Figure 5. Seasonal changes in the maturity stages of Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys. 0 = Resting stage; I= Early growth stage; II= Late growth stage, III= Maturation stage, IV= Spawning and reabsorbing stages.

Within BOV, 80% of oysters presented gonad with undifferentiated sex in March. The early and late growth stages were observed from March to July. In July and August, the rest of the population was at the maturation stage. Individuals in spawn condition began to appear in August, and were observed till late November; occasionally ripe and late spawning oysters were observed after this time. Unspawned gametes were found in their gonads throughout winter, as were resorption and resting stages (Fig. 5 B).

In both sites, gametogenic activity was evident most of the year (especially for male individuals) with well-defined seasonal reproductive cycle. The spawning season was clearly extended from summer until mid autumn.

Gametogenic cycle: quantitative approach

Figures 6 A, 6 B, 7 A and 7 B complete the description of the reproductive cycle detailed above by providing quantitative information. The digestive gland occupation (DG, %) presented a seasonal development with significant differences ($p < 0.021$, Mann-Whitney test) between the two oysters groups. During spring, the occupation percentage decreased in both sites to approximately 5% at the end of summer. In autumn, DG started to rise in both oysters groups up to an occupation of 30% in MOB and 20% in BOV. Differences between both sites were significant. In winter, the two oysters groups displayed a slight increase of the DG occupied area; it passed from 23 to 27% and 13 to 16% in MOB and BOV, respectively (Figs. 6 A and 6 B).

Biomass evolution in the digestive gland presented a seasonal pattern in both sampling sites. Figures 7 A and 7 B show that its growth was stopped in summer and that it decreased from 0.73 to 0.47 g in BOV oysters and from 0.47 to 0.26 g in MOB ones. Between the two oyster groups, the differences in digestive gland tissue growth were significant ($U = 5$, $z = -3.135$, $p < 0.01$, Mann-Whitney U test).

Concerning the gonadal occupation area in the visceral mass (GA, %), on both sites it slowly rose to 20-30% until May, then its increase became faster in May and June (from approx. 30 to 70%) with significant temporal differences between the two field-sites. At the beginning of July, in MOB group, the gonad area accounted for about 74-75% of the visceral mass; on the other hand, the BOV group reached the same maximal value more than a month later. In July, a slight reduction of about 10% of this percentage affected the MOB group, presumably as a result of a partial and unsynchronized gametes discharge (early

July). This decrease in gonadal area in early July was not evidenced in BOV group. At the beginning of August, a second and very rapid decrease was observed in the MOB group. This rapid decrease in GA and was delayed by two weeks in the BOV group. These rapid declines are likely a result of a complete, or nearly complete, spawning. In September, GA was around 2% in MOB group against 30% in BOV group; this significant difference between both sites ($U = 13$, $z = -2.797$, $p < 0.003$, Mann-Whitney U test) suggests a complete spawning event in MOB group, and only a partial one in BOV oysters.

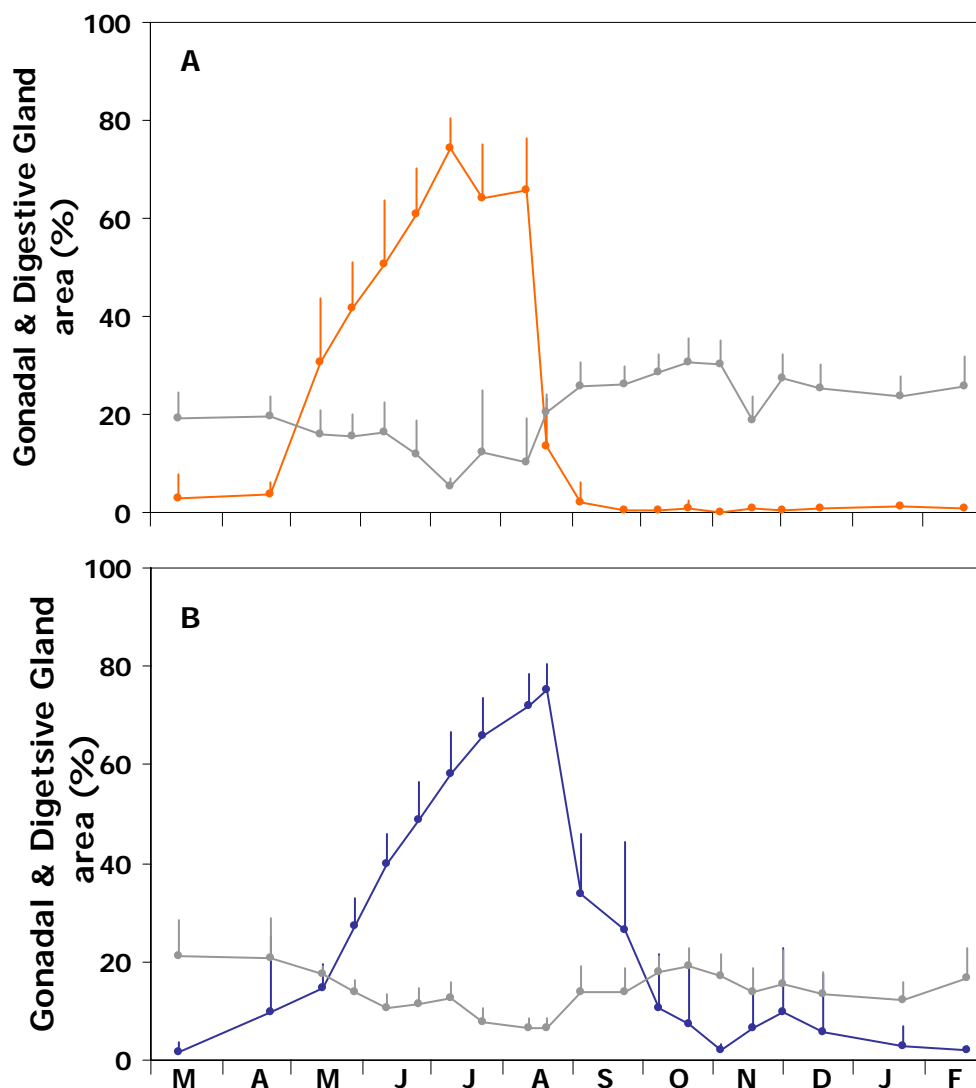


Figure 6. Seasonal variations in gonadal and digestive gland occupied area in Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys, (mean gonad and digestive gland area, *i.e.* % of field occupied by gonad or digestive gland \pm SD). In orange gonadal area of MOB and in blue gonadal area of BDV; in gray gland digestive area. * = Significant difference.

In autumn, oysters from both field-sites still displayed a high difference in their gonadal occupation areas. In BOV group the gonad area decreased slowly to a minimum value (GA~2%) in February; however, some occasional ripe oysters (GA > 10%) were still found in December. In MOB group, GA reached minimum gonad area values (GA < 1%) in September and remained low through February (Figs. 6 A and 6 B).

Figures 7 A and 7 B exhibit striking differences in the evolution of the estimated gonad biomass, GB, between the two populations. From March to June, GB values were alike in both field-sites. But, in July the gonad growth of MOB oysters stopped and remained at around 1.9 ± 0.7 g till the main spawning event in August (Fig. 7 A). One should, however, note that a slight partial spawning was detected in early July. On the other hand, in BOV oysters, the gonad growth continued in July to reach about 6.1 ± 1.5 g just before the spawning event in August (Fig. 7 B). From July to December, differences in gonadal biomass between both sites were statistically significant (U = 76, z = 1965, $p < 0.025$, Mann-Whitney U test).

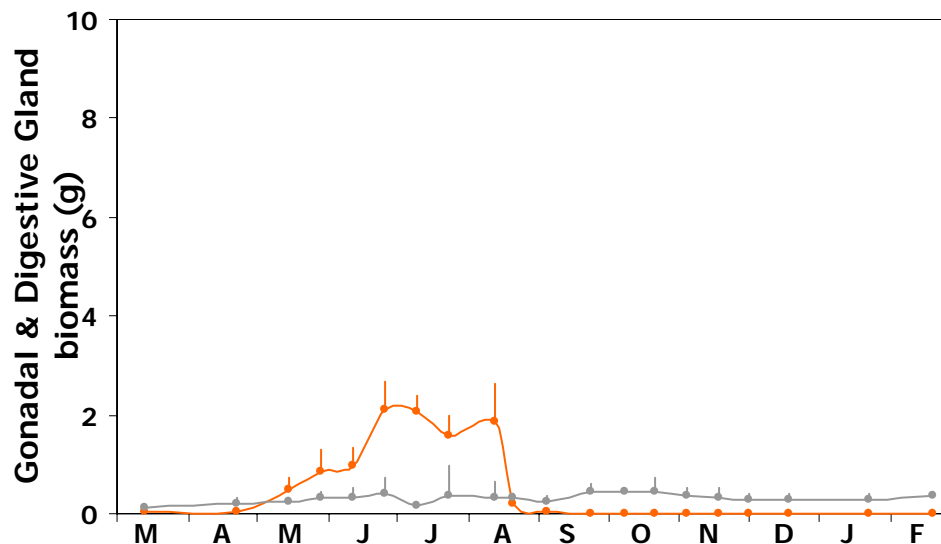


Figure 7 A. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters cultivated in Marennes-Oléron Bay (mean gonad and digestive gland biomass \pm SD). In orange gonadal biomass, and in gray digestive gland biomass. * = Significant difference.

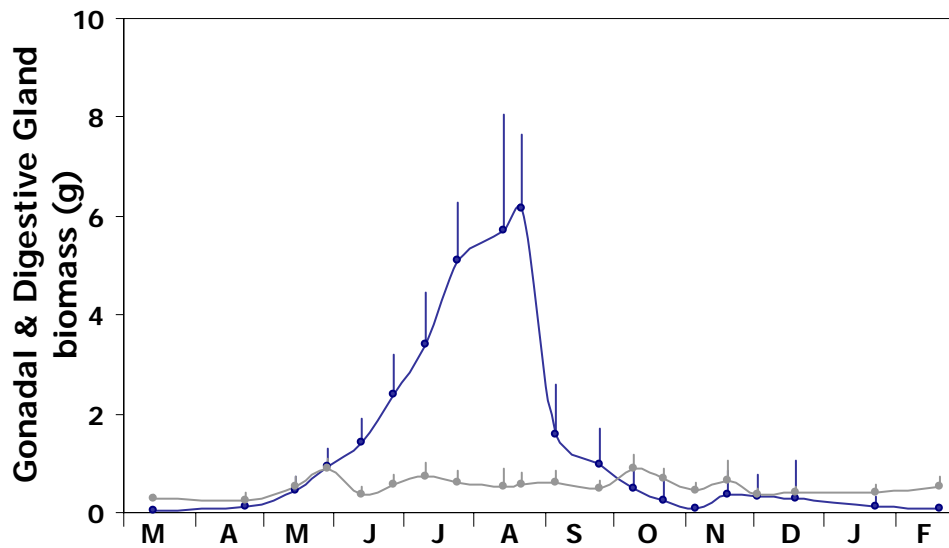


Figure 7 B. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters cultivated in Bay of Veys (mean gonad and digestive gland biomass \pm SD). In blue gonadal biomass, and in gray digestive gland biomass. * = Significant difference.

These data allowed us to estimate the gamete release, Prs, expressed in g. Over the main spawning event (in August), Prs-mean value was around 1.8 g for MOB oysters against 4.5 g for the BOV ones. By September, the gonads of MOB individuals were completely empty, whereas approximately 28% of gametes remained in the gonads of BOV oysters. This observation indicates that spawning, as the BOV site was not complete and/or not synchronized.

On an annual basis, the reproductive effort (ER, %) calculated was higher in BOV oysters than in MOB ones, 86 and 53%, respectively.

Discussion

Methodology

The variety of techniques used by researchers to study the reproductive cycle of bivalve molluscs ranges from dissection and brief biometry to accurate histological

description, image analysis or biochemical composition. All these methods provide either qualitative or quantitative information. The "qualitative" methods are generally based on developmental stage criteria used for macroscopic (*e.g.* Mason, 1958) or microscopic observations (*e.g.* Quayle, 1969; Yakovlev, 1977), which results in a subjective classification. In an effort to overcome subjectivity of these former methods and to avoid information losses, several "quantitative" methods have been proposed by several authors.

For example, the gonadal index determined from gravimetric gonad measurements follows gonad weight increase associated to the total weight of the animal. This parameter is frequently used for molluscs that display a gonad separated from the rest of the body (*e.g.* Ansell, 1974; Hughes-Games, 1977; Grant and Tyler, 1983, Bodoy *et al.*, 1986). Assessment of oocyte number and size (Kennedy and Battle, 1964; Newell *et al.*, 1982; Murankana and Lannan, 1984; Lango-Reynoso *et al.* 2000) and measurement of the gonadal area (Brousseau, 1978; Lannan, *et al.*, 1980; Barber and Blake, 1983; Heffernan and Walker, 1989) are also commonly used. According to Barber and Blake (1991), the most complete approach should, at least, rely on the association of a qualitative method with a quantitative one.

In the present study, to supplement qualitative data, we made an effort to develop a quantitative method to accurately assess the reproductive cycle of males and females from classical histological slides. It provided only extrapolated gonad biomass. But, its precision was, nevertheless, sufficient to give a good description of the gametogenic cycle and detect differences in reproductive effort among oysters stocks.

All the former and above-mentioned methods are destructive, rather time-consuming and expensive. In an attempt to avoid dissection and other former problems, new quantitative techniques, especially NMR imaging, are currently developed for studying the gametogenic cycle in bivalves (Pouvreau *et al.*, submitted).

Flexibility in the gametogenic cycle

From a general point of view, the gametogenic activity of oysters showed a clearly defined seasonal pattern in both sites; the whole cycle was, indeed, split into five well-distinctive stages in agreement with studies by Lango-Reynoso *et al.*, (2000) and Heude-Berthelin, (2000). These stages are: i) early gametogenesis (early spring), ii) growing (spring), iii) mature and spawning (summer), iv) resorption (autumn) and v) storage (winter). Qualitative data from histological examination of tissues showed that the gametogenic cycle was earlier and faster in MOB group than in the BOV one, especially for the growing, mature and spawning stages. In MOB group, the first spawned oysters effectively appeared a month earlier than in the BOV group. Quantitative data evidenced strong differences in gametogenesis between both groups; they mainly concerned the gametes production, the spawning characteristics and the resorption stage. About gametes production from biomass assessment, on average BOV oysters produced 3-times more gametes than those from MOB (6.1 against 1.9 g).

In term of reproductive effort defined as gamete production over total production for a defined period, oysters dedicated more than 86% of their growth to gametes in BOV oysters against 53% in MOB ones. The spawning intensity also differed between both groups: MOB oysters displayed complete and synchronous gametes losses (around 1.8 g) contrarily to the partial and/or asynchronous ones (around 4.5 g) shown by the BOV group. Consequently, MOB oysters started a process of gametic degeneration, called resorption or atresia, accompanied with a progressive autumnal reduction of their gonad weight. Though not well-known yet, resorption process is supposed to be a "self-cleaning" stage that prepares the gonads for a new sexual cycle (Dorange and Le Pennec, 1989; Steele and Mulcahy, 1999). Our study highlighted differences in the oocyte resorption delay and spawning intensity between both sites.

Thus, a same stock of oysters placed in two different environments at the start of a new gametogenic cycle (early spring) may develop a very different reproductive strategy. In *C. gigas*, the phenotypic plasticity of reproduction appears to be very high.

Effect of environmental factors on reproductive cycle

In ectothermic species, the reproductive cycle and its synchronization among a population are the result of a synergy between endogenous rhythms in the organism and exogenous signals from the environment. Among the latter, temperature, quantity and quality of food supply, photoperiod and salinity are known to affect the growth and reproduction of marine bivalves. From qualitative approaches, many authors have described how these multiple environmental factors affect the cycle of reproduction in the marine invertebrates (Lubet and Choquet, 1971, Sastry, 1979, Lubet, 1980, Giese and Kanatani, 1987; Le Pennec and Le Pennec, 2003). According to experimental data reported in the literature, *e.g.* Dinamani, 1987; Ruiz *et al.*, 1992; Steele and Mulcahy, 1999, *C. gigas* compares to other bivalves in which gametogenesis-intensity, -rate (speed), -duration and time of spawning are affected by local environmental conditions. From a quantitative approach, our study clearly evidenced differences in reproductive cycle between two environments and confirms a high flexibility in the reproductive cycle of *C. gigas*. The hydrobiological measurements simultaneously performed in 2002 (Figs. 8 A and 8 B) in both bays (MOB and BOV) (Daniel, 2002; Razet, pers. com.) showed nearly similar seasonal cycles of temperature, with the exception of spring when temperature at MOB was slightly higher than at BOV (Fig. 8 A).

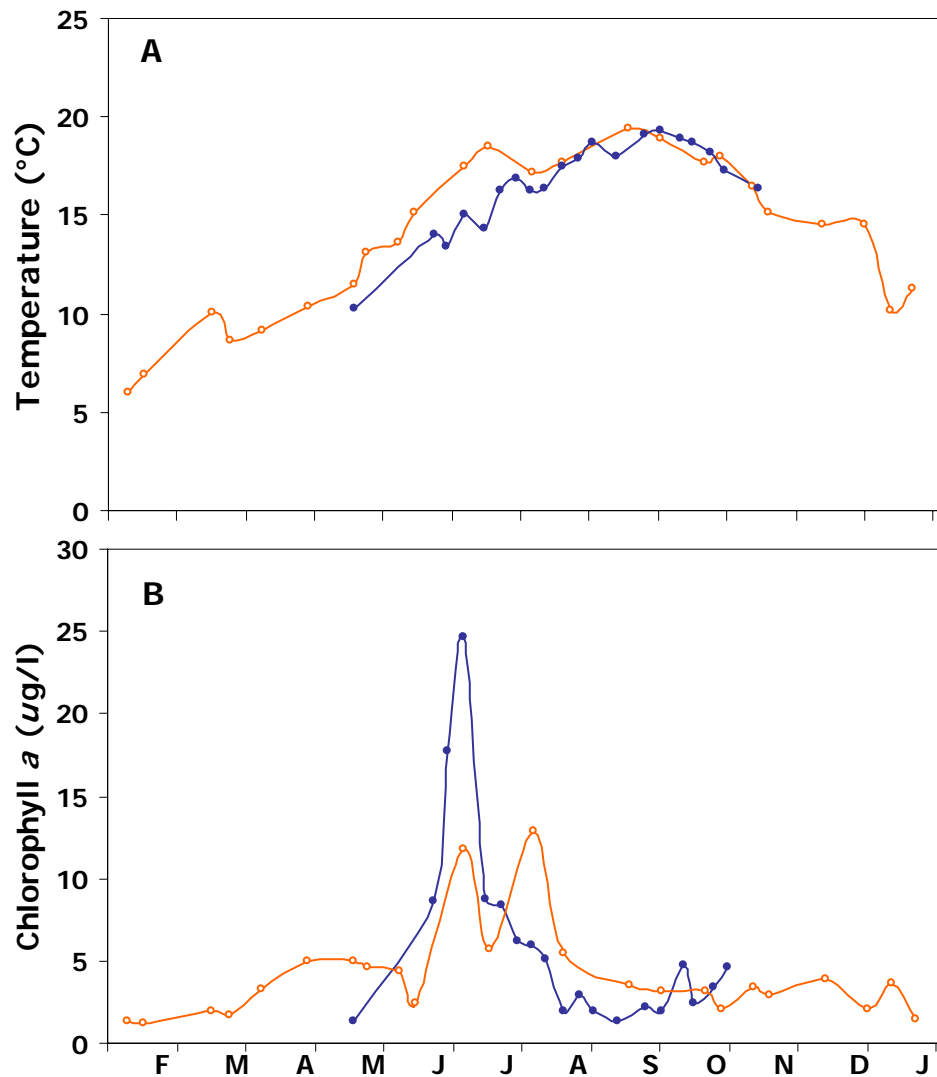


Figure 8. A) Temperature ($T^{\circ}\text{C}$) and B) Chlorophyll *a* ($\mu\text{g/l}$) seasonal patterns in sampling sites. In orange Marennes Oléron Bay (Auger, cultivated site) and in blue Bay of Veys (Géfosse, cultivated site).

Further more, gonadal development; especially the rate of gametogenesis is mainly affected by the water temperature (Thompson *et al.*, 1996; Robinson, 1992). In our study, the highest summer temperature for MOB waters was about 19.4°C in mid August, whereas BOV ones reached only 19.2°C a fortnight later. In both sites, the time of spawning seems to be correlated to these temperature peak values. Nevertheless, one cannot reasonably think that this factor alone is responsible for the difference in gametogenesis intensity observed between both field-sites.

A part of the food supply (the phytoplankton) was also followed during one year in both sites through chlorophyll *a* measurement (Fig. 8 B). Primary productivity was significantly higher at BOV in comparison with the lower carrying capacity of the MOB site. The former was characterized by a high level of chlorophyll *a* (phytoplanktonic bloom) with maximal concentration around 25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ in June as compared to less than 13 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for the latter. Although chlorophyll *a* levels may not always fully represent food availability for the oyster, this difference between both sites is presumably also in the same order for the other compartments of the suspended organic matter, *i.e.* the potential food for oysters (Protozoa, Bacteria, Zooplankton, Detritic matter...). We therefore think that the differences noticed in the reproductive cycle of oysters cultivated in MOB and in BOV, *i.e.* in gametes production, spawning intensity and resorption duration, mainly resulted from differences in food level availability (Maurer and Borel, 1986; Ruiz *et al.*, 1992).

Conclusion

Coastal marine organisms, especially bivalves, tend toward an *r* strategy; which involves a short reproductive period with high fecundity and is characteristic of unstable environments. It has been described by Lubet and Mann (1987) in organisms whose reproduction cycle depends strongly on seasonal phytoplanktonic blooms. The Pacific oyster, *C. gigas*, falls into this category. We showed in this study that its reproductive strategy is strongly affected by the environmental conditions, and especially the food level under favorable temperature conditions. Indeed, the water temperature regulated the time and speed of gametogenesis, whereas its intensity is more influenced by the quantity of available food. The food resource is highly variable over coastal ecosystems and often depends on the eutrophication level. We demonstrated that a high phytoplankton level in spring and early summer can induce (1) a very high development (hypertrophy) of gonad, (2) modifications in spawning intensity, and (3) a necessary increase in the autumnal gonadal resorption

process. This environment-dependent strategy displayed by *C. gigas* is presumably an adaptation mechanism to succeed in several habitats. Nevertheless, in some cases, this strategy appears to constitute a potential cause of summer mortality events. In the event of a more extensive eutrophication and more numerous events in relation with climate warming, such mortality episodes would become more and more numerous and of paramount importance for oyster culture.

Further studies will be carried out in other sites to complete this approach and get a better insight on the quantitative relationships between reproductive cycle and environment in *C. gigas*.

Acknowledgements

This study was financially supported by IUEM/IFREMER and was integrated to the MOREST French program (2001-2004, IFREMER program, Dr. J. F. Samain coordinator). We wish to thank Dr. J. C. Cochard for providing facilities at the Argenton Shellfish Laboratory (IFREMER-Brest, LPI). We are sincerely grateful to B. Dubois, K. Costil, M. Ropert and P. Soletchnik for animal collections at the tidal flats and their subsequence dispatching. We wish to thank M. Ropert (IFREMER-Port en Bessin, LCN) and D. Razet of RAZLEC hydrobiologic data network for Marennes-Oléron Bay (IFREMER-La Tremblade, LCPC) for providing environmental data. We also want to thank M. P. Friocurt for the last reading of the English version. M. Enríquez-Díaz was supported by a Ph.D. fellowship from CONACyT/Mexico Scholarship Program.

CHAPITRE II

Influence of food quantity on the reproductive behavior of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: an experimental approach.

Influence of food quantity on the reproductive behavior of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: an experimental approach.

Abstract

The variability in gonadal development and reproductive effort was evaluated in a population of Japanese oysters conditioned within the Argenton shellfish laboratory (IFREMER); their daily food ration was either 12% of dry meat weight in dry weight of food (high level) or 4% (low level). Reproductive activity was described on the basis of gonad stereological analysis. The oysters submitted to a high food ration (HFL) displayed a rate growth in flesh wet weight and visceral mass higher than the one exhibited by the low-fed level group (LFL). Gonadal biomass was assessed from gonadal area. Gametogenesis intensity was influenced by the food ration. The high food ration group produced more gametes than the other group (0.9 and 0.51 g, respectively). However, spawning efficiency was only 60% in HFL group against 83% in LFL group, consequently, the reproductive effort was 29% in the former and 20% in the latter.

The differences between these two groups of *C. gigas* suggest the existence of a mechanism of adaptation a different food levels, which have a significant role in the intensity in the gonadal maturation processes.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Food ration; Reproductive effort, Spawning efficiency.

In collaboration with Stéphane POUVREAU and Marcel LE PENNEC

to be submitted to Aquaculture

Introduction

The farming of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has become the major source of shellfish production in France (more than 128 000 tons per year) (CNC, 2004; FAO, 2004). The main part of this production comes from collection of the natural spat carried out on the Atlantic coast of France (Marennes-Oléron Bay and Arcachon basin). Concurrently, a significant part of hatchery-produced spat (around 15%) is progressively increasing. Nevertheless, the role of the six French oyster hatcheries remains precarious because of their inability to offer the amounts of spat required by oyster growers (Robert and Gérard, 1999).

Broodstock conditioning plays a key-role in larvae production in hatchery (Lannan *et al.*, 1980), nevertheless knowledge on the reproductive physiology of *C. gigas* remains limited (Chávez-Villalba *et al.*, 2002, 2003). Consequently, handling and conditioning of broodstock are still empirical (*e.g.* Wilson *et al.*, 1996; Utting and Millican, 1997). Reproductive activity in bivalve molluscs results from interactions between exogenous factors (temperature, food availability, salinity, light...) and endogenous ones (age, storage, genetic traits...).

In order to elucidate precisely the mechanisms involved in the co-ordination of *C. gigas* reproductive response and ensure a clear understanding of this environment-dependent strategy, our approach is to progressively develop a generic and deterministic model of growth and reproduction. It will be aimed at predicting the growth and reproduction of this bivalve under varying conditions. Such models (*e.g.* Van Haren et Kooijman, 1993; Barillé *et al.*, 1997; Pouvreau *et al.*, 2000; Ren et Ross, 2001) are based on a bio-energetic approach, and are, therefore, built from available quantitative data. Literature contains numerous reports about temperature effects on gonadal development

and spawning, which are nowadays well known (*e.g.* Muranaka and Lannan, 1984; Chávez-Villalba *et al.*, 2002).

On the other hand, the relationship between gametogenesis and food level is poorly documented (Kang *et al.*, 2000) especially on a quantitative approach. In the experimental survey reported here, a population of Pacific oysters was followed during one year to cover a complete reproductive cycle in order i) to document the relationship between food level and gametogenesis intensity, *i.e.* reproductive effort, and ii) to evaluate the biological implications of the findings relative to not only broodstock conditioning, but also natural farming.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental procedure

2.1.1. Experimental population and set-up

The present survey was carried out on a population of Pacific oysters produced at the Ifremer hatchery (La Tremblade, France) from 30 wild broodstock collected in the Marennes-Oléron Bay (France). Then, spat was reared at the Ifremer nursery (Bouin, France). One-year-old oysters ($n = 1600$) were then kept at the Ifremer shellfish laboratory (Argenton, France). After a 15-day acclimation, the initial group of oysters was split in two sub-groups of 800 oysters each to be fed with different diets as described hereafter. Then, each sub-group was divided in two and placed in two raceways (A and B). The first one (A) served for sampling, whereas the second one (B) constituted the oyster stock: thus, each oyster removed from A was immediately replaced with one oyster from B.

The volume of seawater and its renewal (20- μm -filtered running seawater) for each raceway were both determined from the oyster biomass, and fixed at $1 \text{ l g}^{-1} \text{ Fdw}$ and $0.33 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ Fdw}$ (Fdw = Flesh dry weight), respectively. Seawater mixing, homogenized food

distribution and oxygenation were performed through an airlift system. Raceways were totally emptied and cleaned twice a week.

2.1.2. Conditioning

The whole population of oysters was reared in these raceways over a year. The water temperature and day-length were both controlled to follow the mean natural seasonal cycles observed over the last ten years in the Marennes-Oléron Bay (a great shellfish area in France) (Fig. 1).

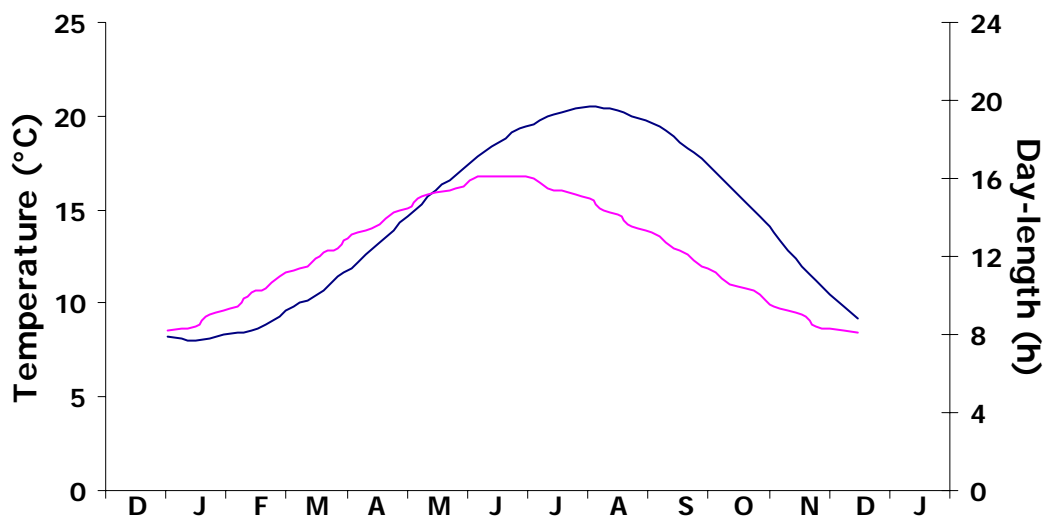


Figure 1. Mean temperatures and day length observed during ten years (1990-2000) in the Bay of Marennes-Oléron (unpublished data). Blue line: temperature (T°C), and pink line: day length (hours = h).

Salinity and oxygen saturation were kept constant at around 34 ppt and 100%, respectively. Oysters were fed with a balanced diet composed of the microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, *Isochysis* aff. *galbana* (T-iso) and *Tetraselmis chui*. The Low Food Level (LFL) corresponded to a daily ration equivalent to 4% of the oyster flesh dry weight (Fdw) in dry weight of algae and was the third of the High Food Level (HFL) (12%). The concentration of chlorophyll *a* around oysters was around 5 µg chlo *a.l*⁻¹ in LFL condition and 15 µg chlo *a.l*⁻¹ in HFL condition. On mid-July and mid-August, spawning was induced by

progressively elevating the seawater temperature from 18 to 25°C and by a concomitant addition of sperm or egg suspension.

2.1.3. Sampling and biometry

The reproductive cycle of *C. gigas* was followed from February 2002 to February 2003. From early May to late September sampling was realized every 15 days, and monthly during the rest of the year. Each time, and whatever the food diet (LFL and HFL), 10 oysters were randomly collected. Before dissection, their individual total weight and shell length (antero-posterior axis) were measured and respectively expressed in g and mm. Then, the oysters were opened at the hinge, and the soft tissues removed from their shell, drained for 5 min on absorbent paper and weighted (flesh wet weight, in g). After flesh dissection, the visceral mass per individual (digestive gland + gonad) was also weighted (W_{mv} in g) and prepared for histological analysis.

2.2. Histological analysis

For each oyster, three transverse sections were cut, at representative body levels, from the visceral mass: the first one was realized just behind the labial palps, the next one was cut at the mid visceral level, and the last one just before the pericardial cavity. These three sections were fixed in Davidson's solution for 48 h, and then dehydrated in an ascending ethanol series (75, 95 and 100% ethanol) before clearing in histosol. Then, they were embedded in paraffin. Each sample was cut in 5- μ m sections and mounted on glass slides, then stained with hematoxylin and eosin for subsequent histological examination.

2.2.1. Qualitative analyses

Each slide was, first, examined for sex determination under light microscope. The oysters were defined as male, female, hermaphrodite or sexually undifferentiated. A stage of gonadal development was assigned as follows to each oyster according to descriptions made by Lubet (1959), Kennedy and Battle (1964) and Mann (1979):

- *Stage 0 (resting stage)*: undifferentiated; follicles contain germ cells.
- *Stage I (early growth stage)*: follicles contain large numbers of oogonia and/or spermatogonia.
- *Stage II (late growth stage)*: follicles contain few oogonia or spermatocytes and spermatids, and great number of spermatozoa and/or vitellogenic oocytes.
- *Stage III: (maturation stage)*: follicles contain almost exclusively ripe oocytes (with distinct nucleus and nucleolus) or spermatozoa (oriented with tails toward the follicle lumen).
- *Stage IV (spawning and reabsorbing stages)*: follicles were distended and some of them broken. Numerous gametes may still remain. For other cases, follicles contain phagocytes, germ cells and oogonia and/or spermatogonia.

2.2.2. Quantitative analyses

Each slide was scanned at magnification X400 with a slide system-equipped scanner (HP Scanjet 7400c®, locality, France). The resulting image was saved in tiff file format. Gonad area (GA, %) and gland digestive area (GD, %) with respect to the total surface of the visceral mass were both determined from histological slides with the image analysis software IMAQ Vision Builder (National Instrument, Le Blanc Mesnil, France).

This image analysis was based on the intensity of the tissue-specific coloration. The analysis was performed using the defined following script: (1) The colored image was transformed in a grey level image with the "color extraction" function; (2) the outlines of the histological section were defined freehandedly by drawing with the "image mask" function; (3) the area of each tissue (gonad or digestive gland) was determined by adjusting the grey level threshold specific of this tissue; (4) then, the area of the tissue was automatically calculated in pixels. For each section, percentages of the tissue occupied by gametes or

digestive gland were then calculated. Gonadal biomass (GB) and digestive gland biomass (GDB) were estimated by extrapolation from the following relations (stereology principle, *e.g.* Versterby, 1993):

$$GB = W_{vm} \times GA / 100; \quad DGB = W_{vm} \times DGA / 100,$$

where GB is the Gonadal Biomass in g (wet weight), W_{vm} is the Visceral mass (Gonad + digestive gland) in g (wet weight), GA is the Mean percentage of gonadal area (mean of the 3 sections for each individual), DGB is the Digestive Gland Biomass in g (wet weight) and DGA is the Mean percentage of digestive gland area (mean of the 3 sections for each individual).

Total soft tissue production (P, in g) and gonad production (Pr, in g) were calculated on a temporal basis (between t and t-1) as follows:

$$P = W_{(t)} - W_{(t-1)} \quad \text{and} \quad Pr = GB_{(t)} - GB_{(t-1)}.$$

Reproductive Effort (RE, %), *i. e.* the portion of net reproduction dedicated to reproduction (Brown and Russel Hunter, 1978; Navarro and Iglesias, 1995), was determined from the following relation:

$$RE = (Pr / P) \times 100.$$

Spawning intensity and efficiency were assessed d by analyzing samples just before (t_{s-1}) and after the spawning event (t_s). Gamete spawning (Prs, g) was estimated from losses on gonad wet weight as follows: $Prs = GB_{(t_s)} - GB_{(t_{s-1})}$. The comparison between Pr and Prs allowed us to describe the spawning event as being partial or complete. Spawning efficiency was determined as:

$$SE = [100 \times (GB_{(t_{s-1})} - GB_{(t_s)}) / GB_{(t_{s-1})}].$$

2.3. Statistical methods

The growth rate (shell length, total weight and flesh wet weight), the gonadal area and biomass values were analyzed with the Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$). The observed sex

ratios and the percentage of oysters in maturation stages were tested using the Wilks' G^2 contingency test ($\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. General growth

Surprisingly, external growth was not significantly affected by the differences in diet (Tab. I). Total growth rates over the year under LFL and HFL conditions were 17.4 g (± 2.9 SD) and 20.1 g (± 5.5 SE), respectively. Over the same period of time and conditions, shell growth rates were equal to 13.0 (± 2.1 SE) and 12.8 g (± 3.9 SE), respectively. Figure 2 A also evidences the lack of difference in the seasonal shell growth (in length) between the two experimental food level conditions.

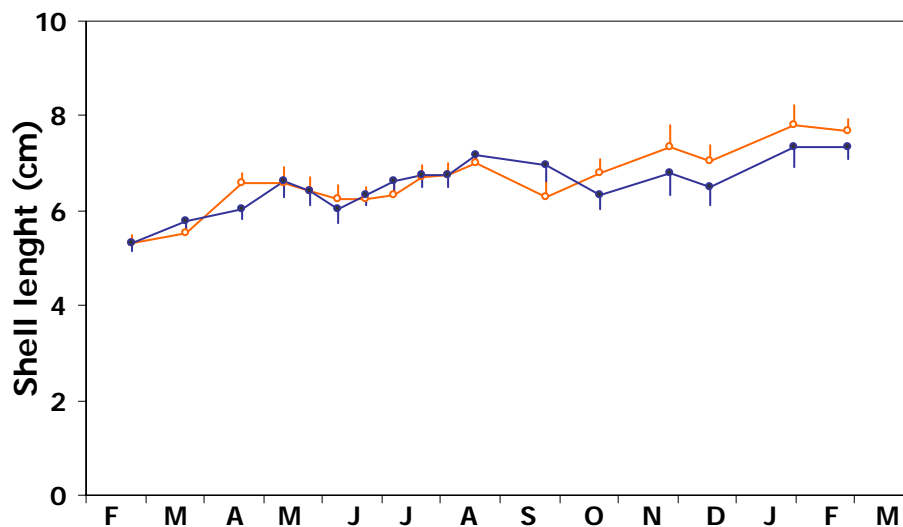


Figure 2 A. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Shell length (antero posterior axis) Orange: low food level group and blue: high food level group. (mean \pm SE).

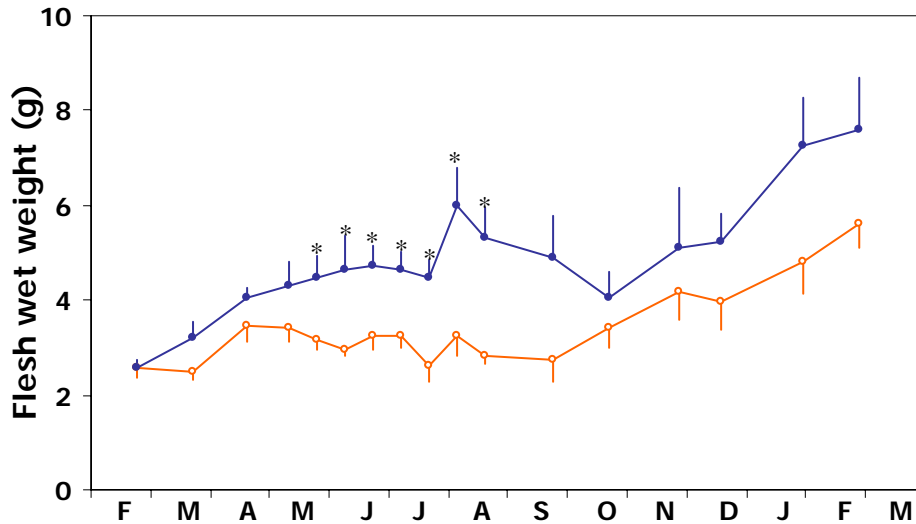


Figure 2 B. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. B: Flesh wet weight. Orange: low food level group and blue: high food level group. (mean \pm SE). * = Significant difference.

On the contrary, flesh wet weight, and especially visceral mass weight, significantly differed with food levels. Indeed, at low diet, the mass visceral growth was only 0.79 g.y^{-1} against 3.31 g.y^{-1} (Tab. 1)($U = 17, z = -2.075, p < 0.019$, Mann-Whitney U test) when food was abundant. At the end of this study, the LFL- and HFL-fed oysters had a flesh wet weight of 5.56 and 7.57 g, respectively (Fig. 2 B).

Table 1. Growth rate for *Crassostrea gigas* conditioning in two food rations: LFL = Low food level; HFL = High food level.

Growth Rate	Shell length (cm.y ⁻¹)	Shell weight (g.y ⁻¹)	Total weight (g.y ⁻¹)	Flesh wet weight (g.y ⁻¹)	Mass visceral weight (g.y ⁻¹)
LFL	2.3 \pm 0.23	13.0 \pm 2.14	17.4 \pm 2.87	3.06 \pm 0.98	0.79 \pm 0.26
HFL	2.0 \pm 0.30	12.8 \pm 3.91	20.1 \pm 5.52	5.04 \pm 3.01	3.31 \pm 2.25

3.2. Reproductive cycle

3.2.1 Sex ratio

Among the 170 oysters submitted to a low diet (LFL), 41% were males, 23% were females and 35% were undifferentiated (Fig. 3 A). For HFL condition, 170 oysters were sampled: 45% of them were males, 33% were females and 21% were undifferentiated (Fig. 3 B). Whatever the diet, no significant difference was found between the expected female-to-male sex ratio and the theoretical one (1F:1.74M $p = 0.922$ and 1F:1.33M, $p = 0.578$ contingency G^2 test) despite the predominance of males.

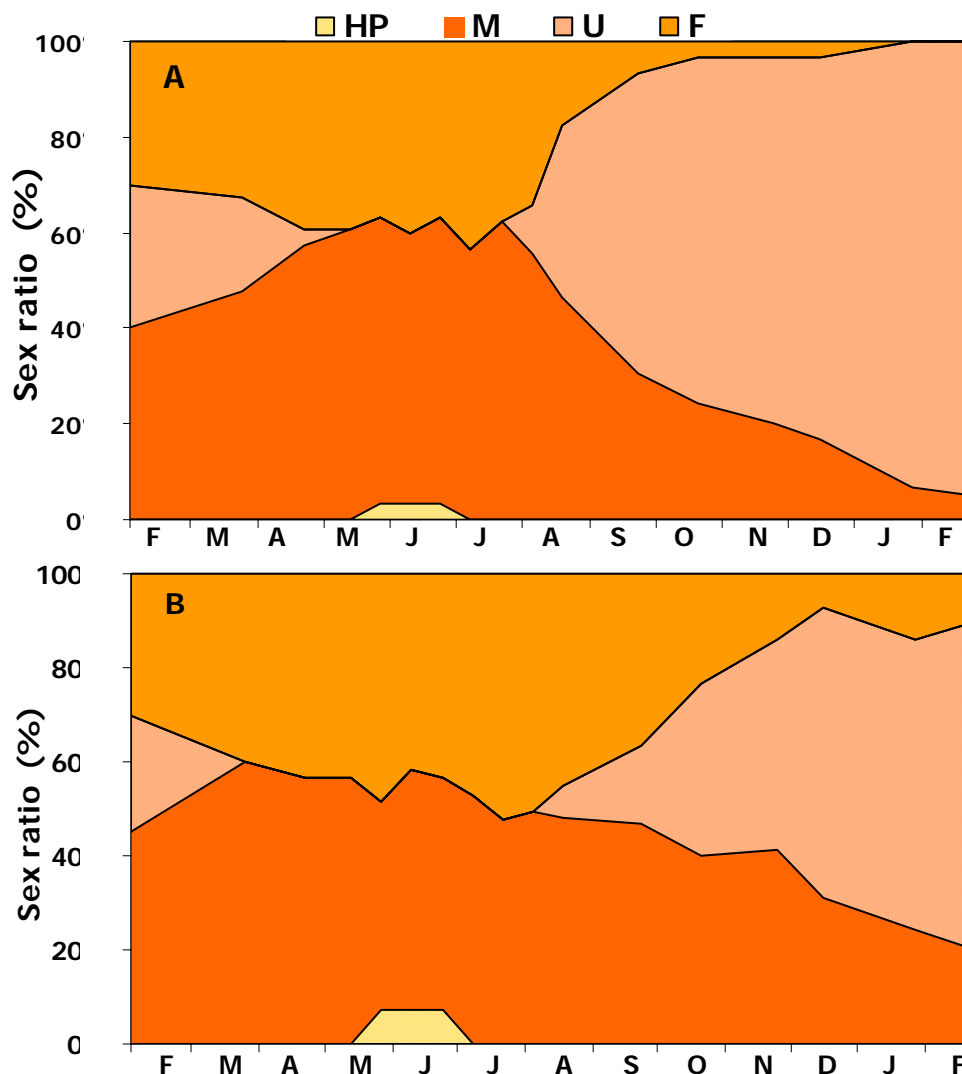


Figure 3. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters submitted to low food (A) or high food (B); *F* = Female; *M* = Male; *U* = Undifferentiated; *HP* = Hermaphrodite.

Concerning the evolution of sex-ratio versus time. Figure 3 shows clearly that undifferentiated oysters were mainly observed in autumn and winter, whereas males and females predominated in summer. For each diet condition, occasional hermaphrodites (< 1%) were only observed in May-June. Sex ratio differences between the two diets became significant during autumn and especially in winter. In February, the LFL group (Fig. III-3 A) contained nearly no differentiated oysters, whereas more than 30% of individuals in the HFL group (Fig. 3 B) were either male or female ($p = 0.483$, contingency G^2 test).

3.2.2. Qualitative analysis

Figures 4 A and 4 B illustrates the temporal evolution of the maturation stages. At the start of experiment, in March, most of the population had already begun their gametogenesis, and thus less than 10% oysters were still undifferentiated (stage 0). Between March and May, the oysters were mainly distributed in growth stages I and II. In early June, differences between conditions became significant: 80%, or even more, of HFL-group oysters were in stage III; this percentage needs to be compared to less than 40% for the LFL-fed oysters ($p = 0.137$, contingency G^2 test). In both diets, the peak of sexual maturity appeared in July, and new undifferentiated oysters were observed from August, after the first spawning induction. LFL-fed oysters were found to spawn more efficiently than HFL ones, which explains why the percentage of undifferentiated organisms was higher after spawning under LFL condition.

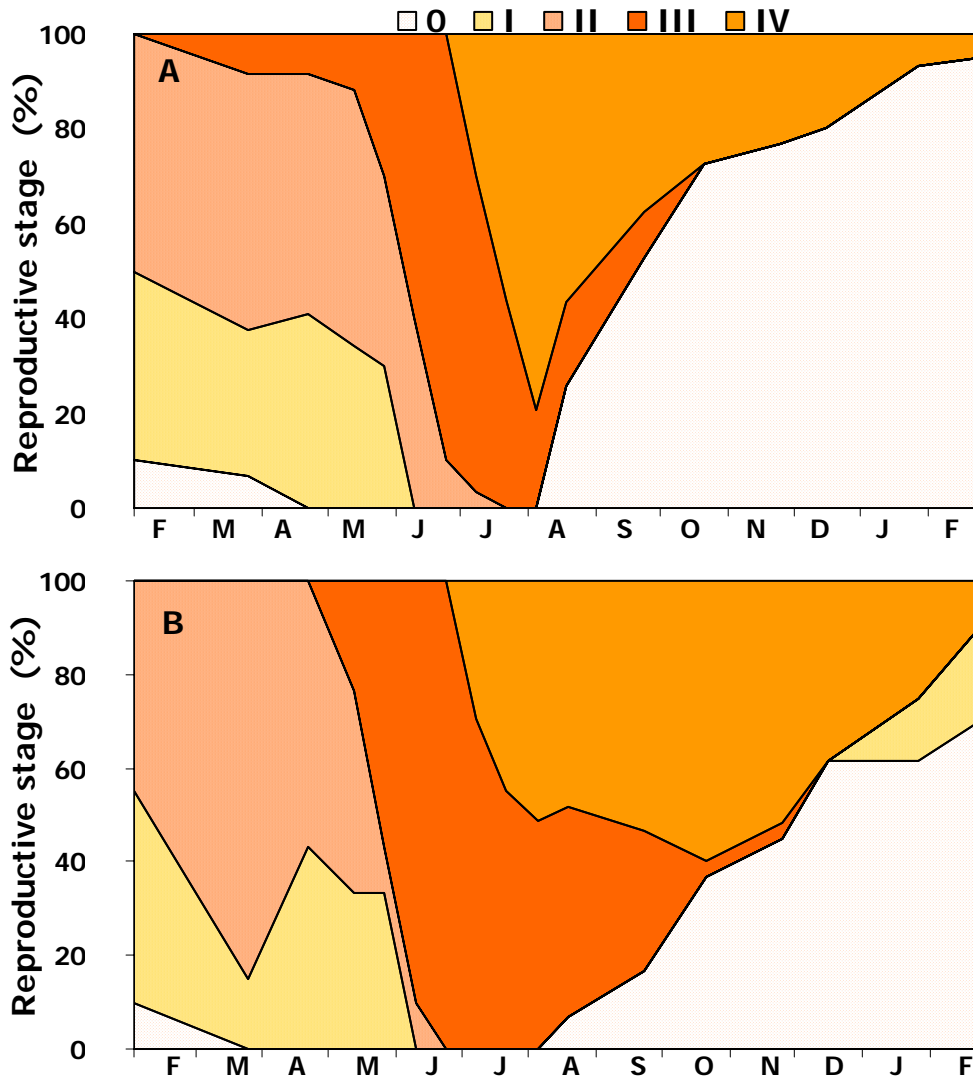


Figure 4. Seasonal changes in the maturity stages of Pacific oysters submitted to low food (A) or high food (B); 0 = Resting stage; I = Early growth stage; II = Late growth stage, III = Maturation stage, IV = Spawning and reabsorbing stages.

From this time, and as a result of a long spawning process and resorption in HFL group, comparison between both diets showed significant differences: more than 50% of the HFL-fed oysters were in stage IV until December against only 25 % in the other group ($p = 0.105$, contingency G^2 test). Furthermore, the former started a new cycle in early December, which allowed us, from this time, to observe oysters in growth stage I.

3.2.3. Quantitative analysis

Figures 5 A and 5 B clearly demonstrate a seasonal pattern in the variations of gonadal and digestive gland areas (GA and GD, respectively) of oysters whatever their diet. In spring the digestive gland and the gonad respectively occupied about 27% and less than 2% of the visceral mass. In June, the gonad growth differed significantly between the two populations ($U = 18$, $z = -2.419$ and $p = 0.014$, Mann-Whitney test): indeed, LFL-fed oysters displayed a gonadal occupation of 28% against 43% for those under HFL condition. At the maximum of gametogenesis (mid summer), the gonad areas in LFL and HFL groups were significantly different ($U = 19$, $z = -2.343$ and $p = 0.010$, Mann-Whitney U test) and equal to 49 and 66%, respectively.

Spawning was induced in July to simulate the natural reproductive cycle; it was clearly evidenced by the percentage of gonadal occupation: GA dropped down to 8% for LFL oysters against 34% for HFL ones. The significant difference between these two values indicated that spawning efficiency was not alike in both diets. Just after spawning, GA in both populations slightly increased to reach 23% for LFL group and 48% for HFL one. A second spawning was induced in August, and the gonad area of LFL oysters dropped down to 6% contrarily to HFL ones condition. These different patterns clearly demonstrated the great and surprising differences noticed in spawning behavior in both conditions. In both groups resorption process started in September, but with differences in duration and intensity: it was of major importance in HFL group.

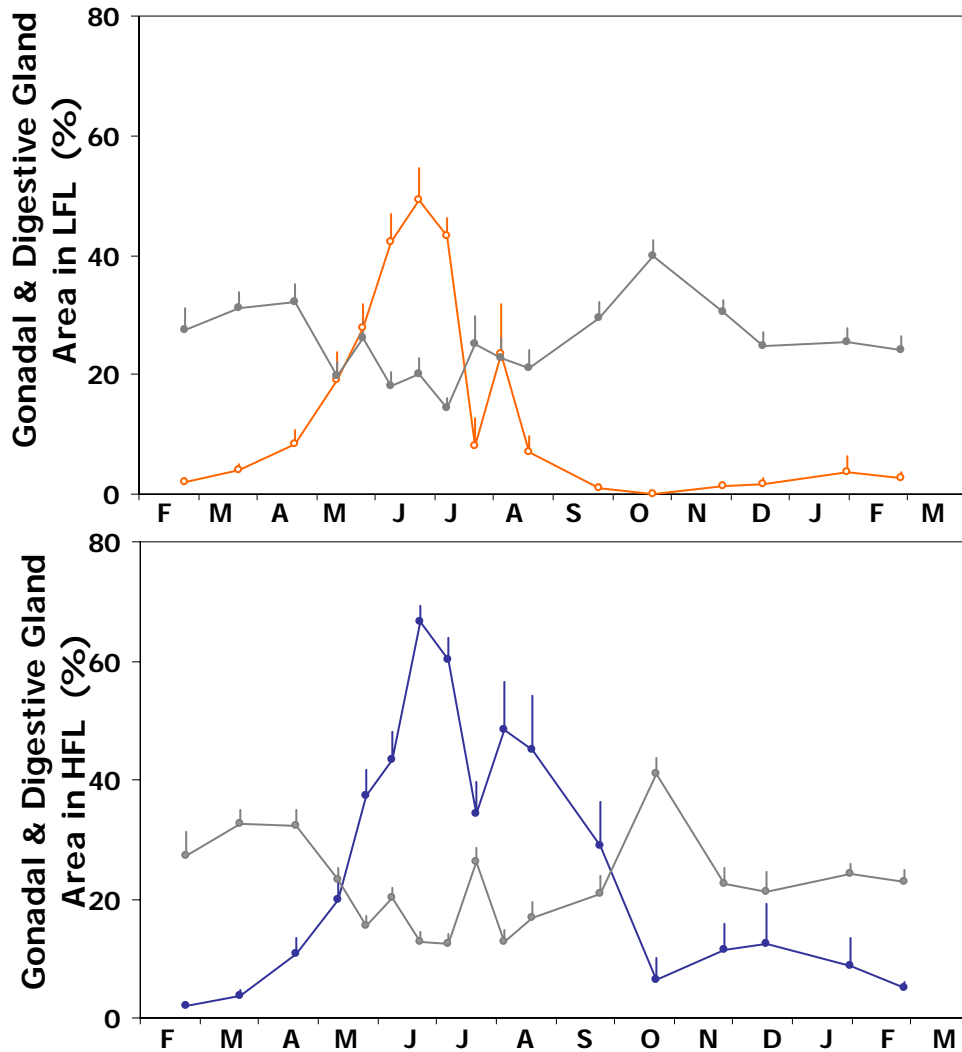


Figure 5. Seasonal variation in gonadal and digestive gland occupied area in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Orange: gonadal area in LFL and blue: gonadal area in HFL; gray: digestive gland area.

The digestive gland area showed also seasonal changes. In spring, the digestive gland occupied 30% of the visceral mass area, whereas in summer, when gonadal development was maximum, it accounted for about 18% for LFL and 16% for HFL. In both populations, this gland underwent a slight increase in late autumn (up to 40%) followed with a 15% reduction in winter. In general, the two populations displayed no significant differences in their percentage of occupation of digestive gland.

Gonadal biomass pattern was similar in both groups of oysters, though significant differences in intensity ($U = 21, z = -2.192, p < 0.014$, Man-Whitney U test) were observed

(Figs. 6 A and 6 B). In spring, gonadal biomass accounted for 0.25 and 0.30 g in LFL and HFL groups, respectively. In May, the gonad slowly started to develop. Just before spawning, HFL group exhibited a maximum in gonadal biomass, which was more than twice the one observed in LFL-fed oysters: 1.53 g and 0.64 g, respectively.

After the first spawning at the origin of weight loss, gonadal biomass decreased to 0.10 g in LFL and 0.61 g in HFL. Over the next weeks, both groups of oysters showed a recovery, which was more marked in HFL group (1.80 g) than in the LFL one (0.35 g). Further to the second spawning, the gonadal biomass of LFL oysters fell below 0.10 g, which initiated the resting period. In the case of HFL population, the period of spawning extended to October and was followed with a period of resorption in autumn and winter. The evolution of gonad biomass in LFL and HFL groups presented significant differences ($U = 20$, $z = -1.810$ and $p = 0.035$, Mann-Whitney test).

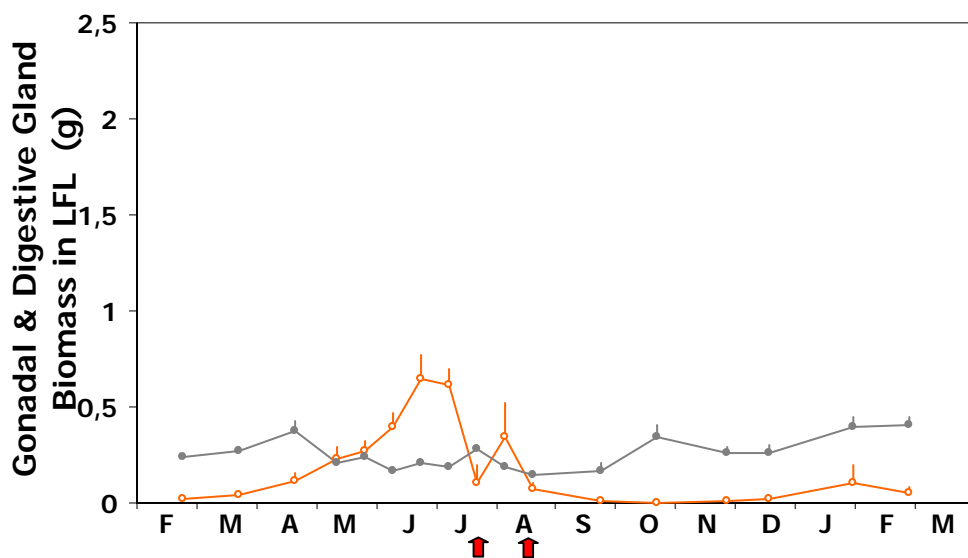


Figure 6 A. Seasonal variation in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Orange: gonadal biomass of LFL oysters; gray: digestive gland biomass. The arrows show the date of spawning induction.

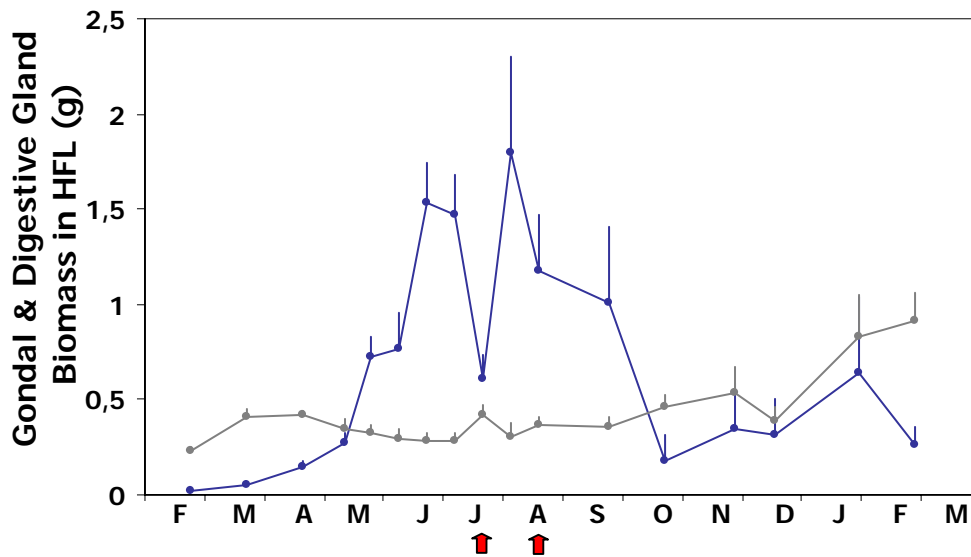


Figure 6 B. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Blue: gonadal biomass of HFL oysters; gray: digestive gland biomass. The arrows show the date of spawning induction.

LFL group showed no variation of digestive gland biomass. In spring, it reached 0.24 g in average to slightly decrease to 0.20 g over the summer (active gametogenesis). In October, it slightly rose to 0.30 g and remained around this level till the end of experiment (February). In HFL digestive gland biomass felt within 30 and 33% from spring through autumn, then showed a slow, but continuous, elevation to 0.91 g till February (end of experiment).

The spawning efficiency (SE) was calculated for LFL and HFL oyster groups. In July, at the time of the first spawning, efficiency of released gametes in LFL and HFL groups was 83 % and 60%, respectively. Further to the induction of the second spawning in August, efficiency was nearly the same in LFL group (81%), but minor in HFL one (34%). The gamete production (Prs) was calculated for both spawning events: over the first spawning (mid July) LFL-fed oysters produced about 0.51 g of gametes against 0.9 g for HFL ones. Over the second spawning (a month later) the calculated Prs was 0.28 g for LFL group and 0.6 g for HFL one. These experimental data indicate that the gonads of LFL oysters were

empty after the second spawning contrarily to those of HFL group that still contained 33% of residual gametes within their gonads.

The Reproductive Effort observed in July in both populations was twice the one observed in August with 20% against 10% for LFL oysters and 25% against 12% for HFL ones.

4. Discussion

Methodological approach

The gonad in *Crassostrea gigas* is usually a diffuse branching organ around the visceral mass, between the digestive gland and reserve tissue. It originates at the region of the esophagus extending to the pericardial area. The gametic tissue is realized over detriment of reserve tissue in which they develop, consequently, the quantitative analyze of reproductive effort becomes difficult.

To calculate the surface of a specific tissue surrounded by others tissues, the stereology take place. The first stereological approximations in molluscs bivalves are based in the Cavalieri (1635 *in* Massa, 1994) and Delesse (1847 *in* Cáceres-Martínez, 1994) principle's, both methods provides the basis for estimating the volume of non-classically shaped objects based on their profile areas. Today, the method more used in the mollusc reproduction estimation, is the Weibel reticulate (Weibel, 1979). But, since 1980, new techniques are developed for the application to the stereological methods like dissector, fractionator, etc. (utilized techniques based in grid, points, lines...), all these methods are known like "The point counting methods" and "The tracing methods"; for all these methods the use of a software to image analysis (thresholding, edge enhancement, zooming), facilitates the determination of measures and analysis of the surface of interest tissue (individually of the rest of tissues) in the histological cuts.

Due to inadequacy of a simple classification system for describing the variability of reproductive strategy found among oysters, semi-quantitative methods were developed to describe reproductive processes (*e.g.* Mann, 1979, Morvan and Ansell, 1988; Laruelle *et al.*, 1994). It allows a more accurate characterization of the gametogenic cycle than the other classic histological methods. Quayle (1969), Yakovlev (1977) and Steele (1998) between others have evaluated qualitatively the gametogenic cycle of *C. gigas*. But, to date, only Lango-Reynoso *et al.* (2000) and Chávez-Villalba *et al.* (2001, 2002) have used a semi-quantitative method based on the frequency of oocyte size distribution in Pacific oysters. In complement, our method gives an assessment of the area occupied by gonad and after extrapolation an estimation of the gonad biomass. Gonadal area appears to be a very good descriptor of reproductive cycle, since it describes the continuity of development stages (Newell *et al.*, 1982). However, it gives no cellular detail about the gametogenic cycle (Chalkey, 1943), and can only estimate the quantity of gonadal material produced (Hilbish and Zimmerman, 1988). Several authors have proposed to combine the measurement methods (frequency distribution of oocyte size, or their number, together with the gonadal area) in order to obtain the most detailed description of reproductive activity in bivalves (Bayne *et al.*, 1982; Lowe and Pipe, 1987; Morales-Alamo and Mann, 1989).

Food effect on gametogenic cycle

Investigations about oyster reproduction need to be undertaken in order to enhance hatcheries performances and to get a better insight on the reproductive behaviour and its implication in natural populations. Concerning *C. gigas*, this study demonstrates clearly that temperature and algal supplementation constitute key-parameters that control actively the gametogenic activity in experimental condition.

As a general case, the reproductive pattern of bivalves includes growth, maturation, spawning, resorption and resting stages (Sastry, 1975; Soniat and Ray, 1985 and Lango-

Reynoso *et al.*, 2000). The duration of each step is completely control by temperature. Even under our experimental conditions, the reproductive cycle displayed by both group of Pacific oysters (LFL and HFL conditions) highlighted the same general and seasonal pattern. Such a temperature-dependent relation is well-known : (1) at field, reproduction in *C. gigas* displays a marked seasonal cycle related to temperature seasonal variations (*e.g.* Deslous-Paoli, 1982; Lango-Reynoso *et al.*, 1999); and (2) in experimental condition, Chávez-Villalba *et al.* (2002) showed clearly that the temperature factor boosts the gametogenic process in term of duration.

But the main result of our work concerns more precisely the effect of food ration on the reproductive performance and behavior of oysters. We showed that a high food ration promoted a faster and higher gonadal development. Observation at field corroborates our findings. For example, according to Mori (1979), *C. gigas* oysters cultivated under eutrophic conditions display an intensive over-maturation of the gonad. In the same way, Soniat and Ray (1985) found a positive relationship between food and gonadal indices as well as evidence of the re-ripening of the gonad in summer due to the availability, in spring and summer, of high levels of food. They concluded about the importance of food supply at this time of year for gametogenesis and spawning.

Food effect on spawning behaviour

In our study, spawning was artificially induced because the Pacific oysters presented no sign of stress liable to trigger a natural one. The first induced spawning was in July when water temperature was about 20°C and *C. gigas* was in maturation stage. This period corresponded also to natural spawning period of the oyster cultivated in Marennes-Oléron Bay. After this initial spawning period, the gonadal occupation dropped sharply, but without reaching zero, which indicates an incomplete spawning for this group of oysters. Again, on early August, high gonadal occupation values were recorded in both groups presumably du

to re-ripening, and then a second spawning was induced. It led to a complete spawning for the low ration-fed-oysters as evidenced by their very low gonadal biomass in September. However, in HFL, one more time, an incomplete release of gametes was observed in this second spawning.

The spawned individuals of HFL group displayed follicles with a lot of residual products and phagocytes as well as an incomplete regression stage before the start of the next development cycle. In quantitative term, spawning efficiency was paradoxically lower in HFL group (60%) than in LFL group (83%). The physiological basis for such an inhibition of spawning at high food level in *C. gigas* is still unclear, but our experimental data corroborate field observations about gonad growth and spawning in *C. gigas* population cultivated in Bay of Veys, France (M. Enríquez-Díaz, 2004, unpublished data). We are not aware of such result among existing literature, except in Chávez-Villalba *et al.* (2001) or in Steele and Mulcahy (1999). The first ones showed that oysters reared in Aber Benoit (France), an eutrophic estuary, were very mature during more than half of the year, and exhibited only a partial and weak spawning in the end of June followed by a re-maturing period, without any more spawning. Working in Ireland, Steele and Mulcahy (1999) leads to same conclusion. But authors gave no clear explanation concerning this weakness in spawning, except that “something other than temperature could influence the lack of spawning and resorption of gametes”. In their conclusion, they suspected a contamination by TBT. Nevertheless, this hypothesis is not valuable in Chávez-Villalba *et al.* (2001) and in the present study.

Food effect on resorption period

Ripen oyster that fail to spawn are forced to start a process of gametic degeneration known as resorption or atresia (*e.g.* Steele and Mulcahy, 1999). This was clearly demonstrated in our study: LFL oysters spawned totally and were in resorption stage during a short period in September, whereas the HFL oysters that exhibited only partial spawning in

summer were in resorption stage during several month in autumn and winter. There is very few published studies on the process of gametic degeneration in *C. gigas* except in Steele and Mulcahy (1999) and no studies on the bio-energetic cost and the yield of such a process. Resorption is supposed to be a self-cleaning process by a massive lysis of gametes (phagocytosis), which prepares the gonad for a new sexual cycle. The gamete material is recycled by this process and is supposed to be use to satisfy basal metabolism (Benninger and Le Pennec, 1991) but the quantitative demonstration of such a relation is not available. This materiel can presumably also be transform into glycogen in order to build the storage that will be used by the new gametogenic cycle, at the end of winter. The lack of knowledge concerning resorption is prejudicial, because in some case, the period of resorption may take a long time and consequently may be of primary importance in the life cycle of *C. gigas*.

Reproductive effort and energy allocation

For an exothermic organism, the distribution of energy between somatic and reproductive lines are of primary importance to explain the cyclic nature of reproduction observed in temperate area. But rules that govern " energy partition or allocation" are not well-known (*e.g.* Navarro and Iglesias, 1995). Concerning *C. gigas* and on the basis of this study and other data accumulated since four years, we believe that the allocation model for this species is the following: (1) in winter, energy in excess of maintenance is used for glycogen storage (2) in spring and in summer, surplus of energy is then shared between somatic and reproductive compartments whereas (3) in autumn, shell and somatic growth seems to be privileged. Nevertheless, these are only assumptions that need to be confirmed and quantified. But allocation data are still very scarce and are generally strongly variable between study. For example, the reproductive effort, *i.e.* the part of production allocated to gonad growth (Navarro and Iglesias, 1995) may vary in great proportion : between 30-60% in mussels (Mathiew and Lubet, 1993), 20-60% in clams (Laruelle *et al.*, 1994) and 20-80%

for *C. gigas* (Deslous-Paoli *et al.*, 1982, M. Enríquez-Díaz 2004, unpublished data). We will focused on this problem in future works.

Broodstock conditioning

On a practical point of view, our work brought some useful information on the broodstock conditioning in hatchery. We show that, in addition with temperature, food level (phytoplankton concentration) can also modulate the reproductive process in term of (1) gametes production, (2) spawning efficiency and (3) duration of the ripeness period. This three step are of major importance in broodstock conditioning. Gametes production can easily be controlled by food level, our work suggests that maintaining concentration of phytoplankton at 10-15 $\mu\text{g chlo } a.l^{-1}$ around broodstock during conditioning ensures a satisfying production of gametes. Spawning will be probably partial but eggs production is generally not a limiting factor in hatchery. Besides, this condition will permit to keep ripened oysters until autumn without any difficulty and would allow hatcheries to produce larvae later in the year. However, conditioning and diet have still to be improved since an alike stock of oysters placed in their natural environment in the Bay of Veys exhibited a growth and an effort of reproduction twice those displayed by the high food level group.

Conclusion

Several conclusions can be drawn from this study. It appears clearly from our work that the reproductive strategy of *C. gigas* is flexible and extremely dependent on environmental factors. Among them, food quantity (phytoplankton concentration) in spring and summer plays a key-role on reproduction as much as temperature: this factor determines (1) the gametes production in spring, the spawning efficiency in summer and consequently the resorption intensity in autumn and presumably the future storage level in

winter. On the basis of these observation, several practical conclusions are given to hatchery in order to optimize the broodstock conditioning.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by IFREMER/MOREST project and a collaboration program between IFREMER and IUEM (Brest, France). We thank Dr J.C. Cochard for providing facilities at the Argenton/Ifremer Shellfish Research Laboratory. We special thanks P. Le Souchu for hatchery technical assistance, J. P. Connan and B. Le Roy for food oysters production. We appreciated the efforts of S. Pierre and E. Coquard for their contribution to laboratory work. We also want to thank M. P. Friocourt for the last reading of the English version. M. Enríquez-Díaz was supported by a grant from the CONACYT/MEXICO.

CHAPITRE III

***The cost of gametogenesis in Crassostrea gigas:
an approach over a complete reproductive cycle.***

The cost of gametogenesis in *Crassostrea gigas*: an approach over a complete reproductive cycle.

Abstract

In a experimental hatchery *Crassostrea gigas* (18 months) were fed during 1 year with two different food rations: low food level (LFL) and high food level (HFL), 4% and 12% of the oyster flesh dry weight in dry weight of algae respectively) during one year. The clearance rate (CR), respiration rate (Rr), food absorption efficiency (AE), and scope for growth (SFG) of the oysters were estimated monthly during spring and summer (reproductive period) and bimonthly the rest of the year. The CR, Rr and AE displayed a seasonal pattern correlated to temperature. During summer months the clearance rates reached a higher increase in LFL ($3.69 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) than HFL ($1.44 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$), and its differences were statistically significant throughout of study. However, the absorption efficiency of LFL and HFL oysters groups was lower during summer. Unexpectedly, absorption efficiencies were significantly higher for oysters in low food level. The respiration rate increased whit food level and was significantly higher during summer for oysters fed in high food level. The SFG among both oysters groups showed a negative period during summer, these negative values were correlated to temperature, food level and reproductive period, for instance HFL oyster group displayed a energy loss of -10 J.h^{-1} while LFL oyster group displayed a energy loss of -5 J.h^{-1} during mature and spawning period.

Keywords: Clearance Rate, *Crassostrea gigas*, food quantity, Oxygen Consumption Rate, Reproductive Effort, Scope For Growth.

In collaboration with S. Pierre, M. Le Pennec, J.P. Connan, P. Le Souchu,

B. Le Roy and S. Pouvreau to be submitted to Aquaculture

Introduction

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is among the most widely cultivated mollusc bivalves in the world. Its fast growth and environmental adaptability have encouraged efforts to culture this species in Europe. France is the first European oyster's producer with nearly 16,980 ha of coastal cultivated area and 128 000 tons of production (CNC, 2004; FAO, 2004). Actually, this species have a great socio-economical value. However, during the last ten years, this commercial production remaining threatened by the occurrence of massive summer mortalities. This syndrome has been present in the Pacific coast from 60s; sometimes the losses have reached up to 50% of the harvest oysters production (Cheney *et al.*, 2000).

In France, hatchery and farming industry have begun to interest in the search of diagnostic methods allowing the evaluation and detection of weakened animals before mortality occurs in order to promote design and implementation of preventive measures.

An energetic cost theory related to reproduction process associated with high temperature and food availability has been continually advanced to explain this mortality syndrome in USA (Cheney *et al.*, 2000). In general, in marine bivalves, seasonal variations in physiology have been linked to annual cycle of food availability, temperature, salinity, oxygen dissolved and reproduction (Bayne *et al.*, 1976). Concerning *C. gigas*, it is supposed that a combination of high temperatures and sub-optimal food conditions may increase the susceptibility of oysters, especially during reproductive activity. Hence, a quantitative understanding of food acquisition (*i.e.* clearance, ingestion and absorption rates) and metabolic loss (*i.e.* oxygen consumption rate) during a complete reproductive cycle would be useful to determine the variations of the physiological status of the oyster according to reproduction. In bivalves, the physiological index of energy balance commonly used is the scope for growth (*e.g.* Bayne and Newell, 1983; Thompson and McDonald, 1991). The SFG

represents the total energy available for reproductive output, somatic tissue growth and shell production. It can range from positive values, under conditions when there is optimum food concentration, to negative values, when the animal is severely stressed and is forced to utilise its body reserves for maintenance metabolism (*e.g.* Bayne and Newel, 1983; Widdows and Johnson, 1988). In that case, the animal is supposed to be more sensitive to any external agent.

Despite the considerable amount of research that focuses on molluscan physiological energetics and SFG, the studies realised in *Crassostrea gigas* are scarce (Gerdes, 1983; Barillé *et al.* 1994; Bougrier *et al.*, 1995) and, to our knowledge, the relationship between energetic (SFG) and reproduction in *C. gigas* have been measured in only one study (Soletchnik *et al.*, 1997). Moreover, most of these laboratory studies are of short terms and experimental approaches over a long period are still lacking.

Consequently, the aim of this study was to evaluate, on an annual basis, the seasonal variation in the physiological energetic status of oysters in correlation with the reproduction cycle. In order to obtain a range of responses, we experimentally studied two populations reared under two level of food. The practical aim of this work was to identify on an energetic point of view "critical period" that could constitute a favorable land to mortality event.

Materials and Methods

Biological material and oysters conditioning

This study was carried out on a population of Pacific oysters produced at the Ifremer hatchery (La Tremblade, France) from 30 wild broodstock collected in the Marennes-Oléron Bay (France). They were grown at the Ifremer nursery (Bouin, France) and sent to Ifremer shellfish laboratory (Argenton, France) before this experimental work. Upon arrival, the population constituted by 1600 oysters of one year-old that were placed in filtered seawater. The volume of seawater and its renewal (20- μ m-filtered running seawater) for each raceway were both determined from the oyster biomass, and fixed at 1 l g⁻¹ Fdw and 0.33 l h⁻¹g⁻¹ Fdw (Fdw = Flesh dry weight), respectively. Seawater mixing, homogenized food distribution and oxygenation were performed through an airlift system. Raceways were totally emptied and cleaned twice a week.

The water temperature and the day-length were regulated to follow the mean seasonal cycles of Marennes-Oléron observed during the last ten years (Fig. 1). The salinity and oxygen saturation were kept constant around 34 ppt and 100 %, respectively. Population of oysters were separated in two sub-populations (800 oysters for each one), respectively fed in two food levels with a balanced micro-algae diet composed of *Chaetoceros calcitrans*, *Isochysis* aff. *galbana* (T-iso) and *Tetraselmis chui*. In low food level (LFL), the daily ration was equivalent to 4% of the oyster flesh dry weight in dry weight of algae. The daily ration was threefold in high food level (HFL, 12%). The concentration of chlorophyll *a* around oysters was around 5 μ g chlo *a*.l⁻¹ in LFL condition and 15 μ g chlo *a*.l⁻¹ in HFL condition.

On mid-July and mid-August, spawning was induced by progressively elevating the seawater temperature from 18 to 25°C and by a concomitant addition of sperm or egg suspension. This experimental population was reared during one year in those conditions (from march 2002 to february 2003).

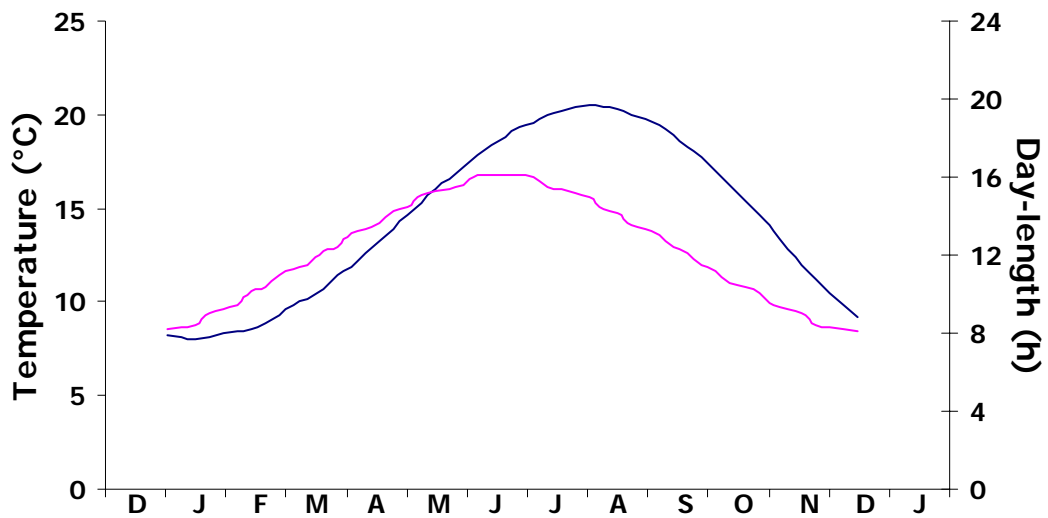


Figure 1. Mean temperatures and day length observed during ten years (1990-2000) in the Bay of Marennes-Oléron (unpublished data). Blue line: temperature ($T^{\circ}\text{C}$), and pink line: day length (hours = h).

Ecophysiological data acquisition

The Ifremer Shellfish laboratory at Argenton is fitted with an ecophysiological system, which allows the simultaneous monitoring of the clearance rate (CR , $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) and oxygen consumption rate (R , $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) in individual open-flow chambers, for 6 individuals. Furthermore, the system allows the collection of biodeposits at the end of the measure in order to estimate the absorption efficiency of the diet (AE , %).

Sampling procedure

All the physiological rates (clearance, ingestion, absorption and respiration) were measured on a sub-sample ($n=6$) of each population in ecophysiological and individual chamber. These rates were measured at each food level (LFL and HFL conditions). Measurements were conducted at monthly intervals during reproductive period (March-August) and every two months during resting period (September-February).

Experimental design

The experimental design is presented on Figure 2 A. At each period of measurement, the six oysters were placed into six hermetic chambers (one oyster by chamber) whereas two other hermetic chambers were left empty as control. Volume of each chamber was equal to 1250 ml and the renewal rate through each chamber was adjusted at $120 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Water temperature, oxygen concentration and food concentration were strictly the same than those in the conditioning tanks.

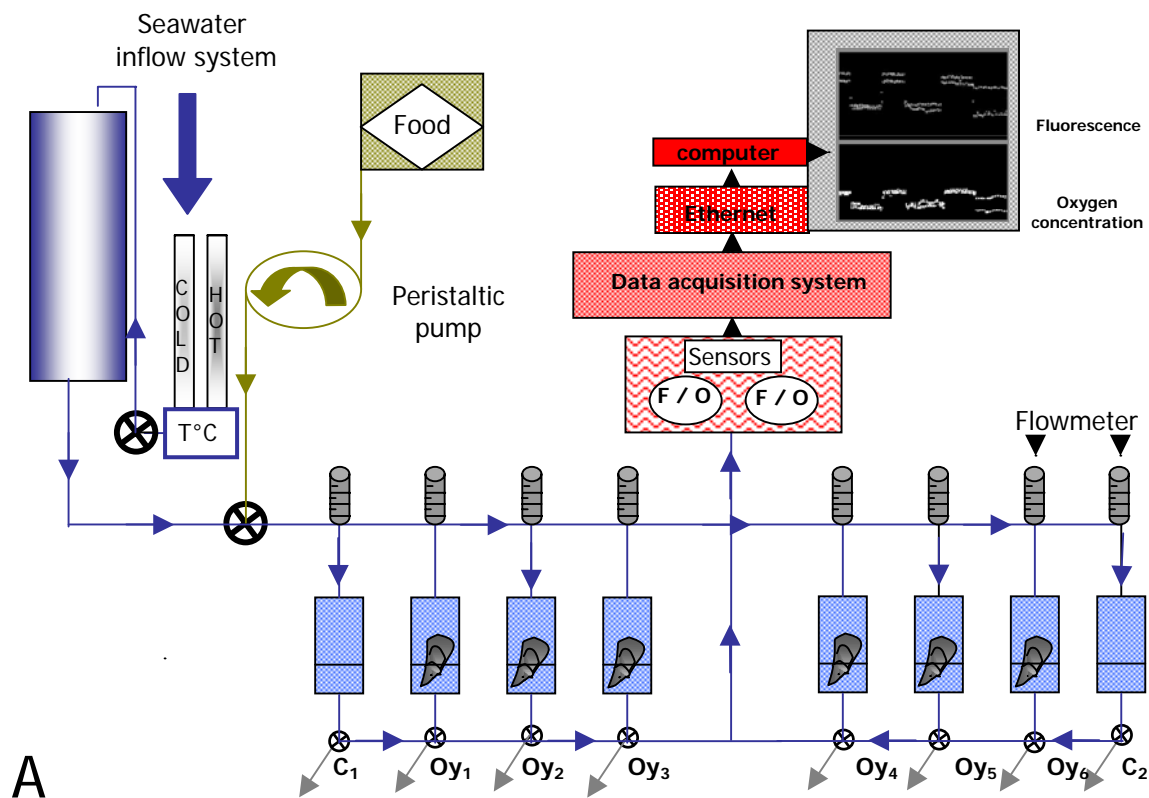


Figure 2 A. Set-up used to measure clearance and oxygen consumption rates. Flow-through system, the arrows showed the seawater flow direction; F = Fluorimetry captor, O = Oxygen captor; C₁ and C₂ = Control chambers, Oy₁ to Oy₆ = Experimental chamber (Oyster 1...). ▲ Exit system, ▲ Measure system.

Oysters were left undisturbed for at least 1 h (until valves opening) prior to start of measurement, and each oyster measurement lasted for 1 h. The inflow of water into the chamber was adjacent to the oyster inhalant aperture whereas the outflow was located near

the oyster exhalant (Fig. 2 B). A baffle was utilized to minimize recirculation of water by the oysters (*i. e.* no recirculation of once filtered water). The algal and oxygen concentrations were monitored in the outflow of each chamber by continuously measuring *in vivo* fluorescence.

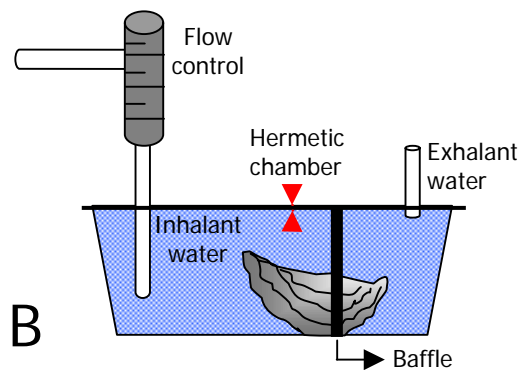


Figure 2 B. Oyster position within experimental hermetic chamber.

They were determined using an oxymeter (WTW corp. ©) and a fluorimeter (Seapoint sensors corp. ©) respectively, both connected to a data acquisition Ethernet

station (Fieldpoint model, National Instruments corp. ©) and a programming software (Labview 6.0, National Instruments corp. ©). The clearance rate and oxygen consumption were then calculated by the differences between the control and the oyster chamber.

Ecophysiological data processing

Clearance rate

Clearance rate was defined as the volume of water cleared of suspended particles per unit of time (Widdows and Johnson, 1988). It was calculated as follows: $CR = F(C_0 - C_1)/C_0$; where CR = clearance rate; F = water flow rate through the chamber; C_0 = outflow fluorescence concentration in the control chamber; C_1 = outflow fluorescence concentration in the oyster chamber. The CR-value was standardised as follows: $CR_s = CR / W^{0.67}$ where W

is the oyster dry weight and 0.67 are the mean allometric coefficient (see for example Pouvreau *et al.*, 1999; Ren and Ross, 2001; Riisgard, 2001). Then, the standardised oyster organic consumption rate (C , $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) was calculated from the clearance rate and the POM (particulate organic matter) concentrations as follows $C = \text{CRs} \times \text{POM}$.

Absorption efficiency

Absorption efficiency (efficiency with which organic material is absorbed from the ingested food) was measured by the ratio of Conover (1966) by measuring the organic content of food and faeces. The formula is the following: $Ae = F - E / [(1 - E) \times F]$ where Ae = absorption efficiency; F = Organic content of the food; E = Organic content of faeces. To determine organic content, samples of faeces were collected by pipette from the chambers at the end of each experiment. After, the samples were centrifuged at 350 rpm for 15 min at 4°C. The precipitates were washed twice with ammonium formate (0.3M) to remove traces of sea salt and finally re-centrifugated. Precipitates were dried into aluminum trays at 65°C for 24 h to remove ammonium formate and weighed in order to calculate the total dry weight of particulate mater. After, they were ashed for 4 h at 460°C in a muffle furnace and reweighed in order to calculate the weight of organic material combusted.

Oxygen consumption rate

The oxygen consumption (R , $\text{mgO}_2 \text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) was estimated by the following formula: $R = F \times (O_0 - O_1)$ where F = water flow rate; O_0 = outflow oxygen concentration in the control chamber; O_1 = outflow oxygen concentration in the oyster chamber. The respiration rate was calculated as follow $Rs = R/W^{0.75}$ where W is the oyster dry weight and 0.75 are the mean allometric coefficient.

Scope for growth

The scope for growth was calculated after converting all the physiological rates in a standard energy unit (Joules). The conversion factors are given in Table 1. After that, SFG ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) was calculated as the difference between energy assimilated and energy lost by excretion and respiration. The energy lost as excretion is generally considered negligible, hence the formula is the following: $SFG = AE - RE = C \times Ae - RE$, where AE = absorbed food energy ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$); C = consumption rate ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$), Ae = absorption efficiency (%) and RE = energy lost in respiration ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$).

Table 1. The energetic conversion factors for the algae's used to feed *C. gigas*, were:

Name	Conversion factors	Reference
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	12.7 $J \cdot mg^{-1} \cdot dw$	Whyte (1987)
<i>Isochysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-iso)	19.8 $J \cdot mg^{-1} \cdot dw$	Whyte (1987)
<i>Tetraselmis</i> sp	13.1 $J \cdot mg^{-1} \cdot dw$	Whyte (1987)

dw = dry weight

Statistical analysis

Comparisons for clearance rate, consumption rate, oxygen consumption rate, absorption efficiency and Scope For Growth were made between both food level conditions. Since data did not showed a normal distribution, the non-parametric Mann-Whitney U-test was employed. All tests were carried out with XLSTAT-6.1 for Microsoft® Excel (Addinsoft Inc.).

Results

Clearance rate

As a general case in our study, the clearance rates of oysters in HFL condition were systematically lower than those from LFL condition. The annual mean value of CR in HFL condition was around $0.7 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ whereas CR value in LFL condition was significantly higher around $1.9 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ ($U = 25$, $z = 2.61$, $p = 0.005$ Mann-Whitney U-test).

On a temporal basis, the clearance rates displayed a clear seasonal pattern in both oysters group (Fig. 3 A). The CR increased progressively from March to July in both groups, *i.e.* from 1.0 to $3.7 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ in LFL condition and from 0.3 to $1.4 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ in HFL condition. Up to August, the CR values progressively decreased during autumn and winter to reach a minimal value around 1.6 and $0.3 \text{ l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ in LFL and HFL conditions, respectively.

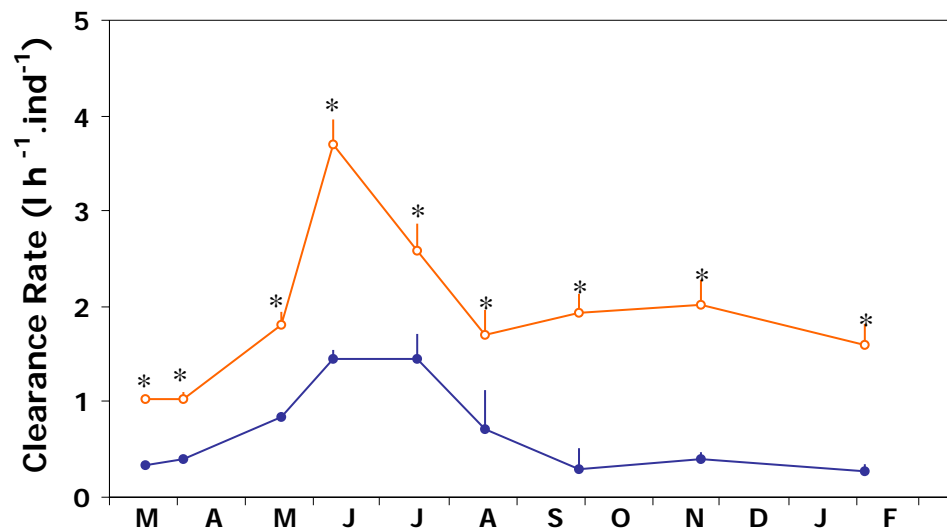


Figure 3 A. Temporal variations in Clearance Rate ($\text{l.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$), of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference.

Consumption rate

The consumption rate showed also a seasonal pattern, with higher values in summer for both groups (Fig. 3 B). From June and July the HFL group consumed $13.0 \text{ mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$

and those of LFL, only in June reached consumption values greater of $11.0 \text{ mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$. During gonadal growth period (Mars-June) no consumption differences were observed between both groups. However, after June the consumption rate for LFL groups had a marked diminution to August, since then and until February the consumption rate was stayed stable. Moreover, the HFL group had a decline in the consumption rate after July (one month later that LFL), and this decline was more intense ($-10.3 \text{ mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) than LFL group ($-5.9 \text{ mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) ($U = 419$, $z = 2.70$, $p = 0.003$ Mann-Whitney U-test). In October, while LFL group stayed in levels of $5.9 \text{ mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$, HFL group fell even $3.0 \text{ mg h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$ during winter.

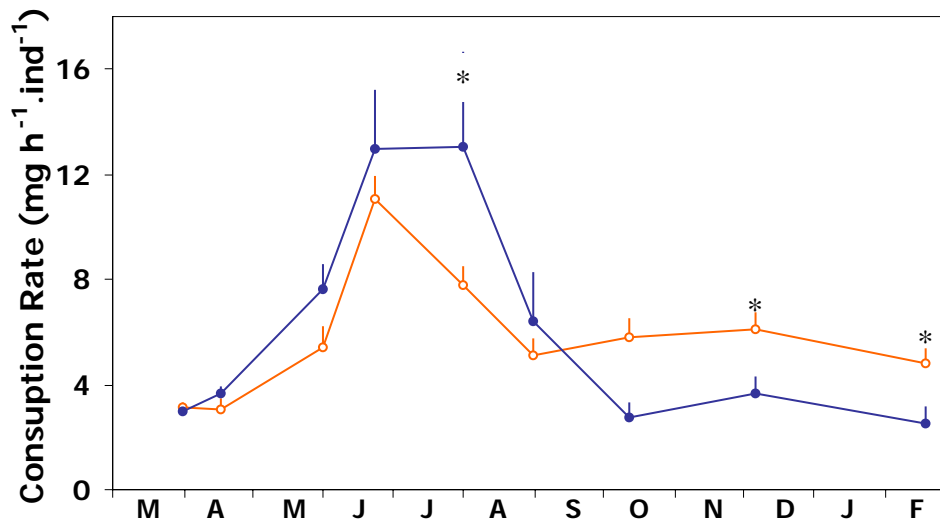


Figure 3 B. Temporal variations in Consumption Rate ($\text{mg.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference.

Absorption Efficiency

As a general case, the absorption efficiency (AE, %) displayed a clear seasonal pattern in both oysters groups (Fig. 3 C), with maximal values in spring and minimal values in summer. And contrarily to C and CR, the absorption efficiency decreased progressively from March to July for LFL oysters (*i.e.* from 54 to 37%) and from March to August for HFL oysters (*i.e.* from 54 to 22%). Thereafter, a slight increase in AE was observed in Autumn.

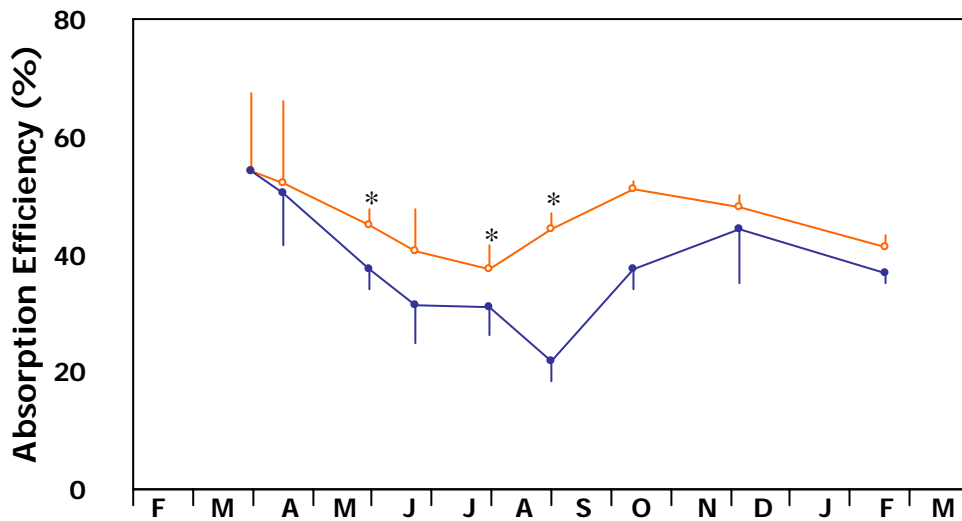


Figure 3 C. Temporal variations in Absorption efficiency (%) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference.

Surprisingly, our results showed also that the absorption efficiency of oyster in LFL condition was always higher than in HFL condition. These differences were mainly significant during from last May to early October ($U = 22$, $z = -2.02$, $p = 0.02$ Mann-Whitney U-test).

Oxygen consumption rate

In both oysters groups, oxygen uptake rates (R , $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) showed a clear seasonal pattern (Fig. 3 D) and, contrarily to CR and AE, R was positively correlated with temperature (Fig. 4). It increased slowly from March to May in both oysters groups (from 0.17 to 0.59 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$ in HFL and from 0.33 to 0.57 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) and increased markedly in June-July, almost threefold for HFL oysters (1.48 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) and twofold for LFL oysters (1.22 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{ind}^{-1}$) in comparison with May values. Summer oxygen uptake rates were significantly higher for HFL oysters ($U = 44$, $z = -2.07$, $p = 0.019$ Mann-Whitney U-test).

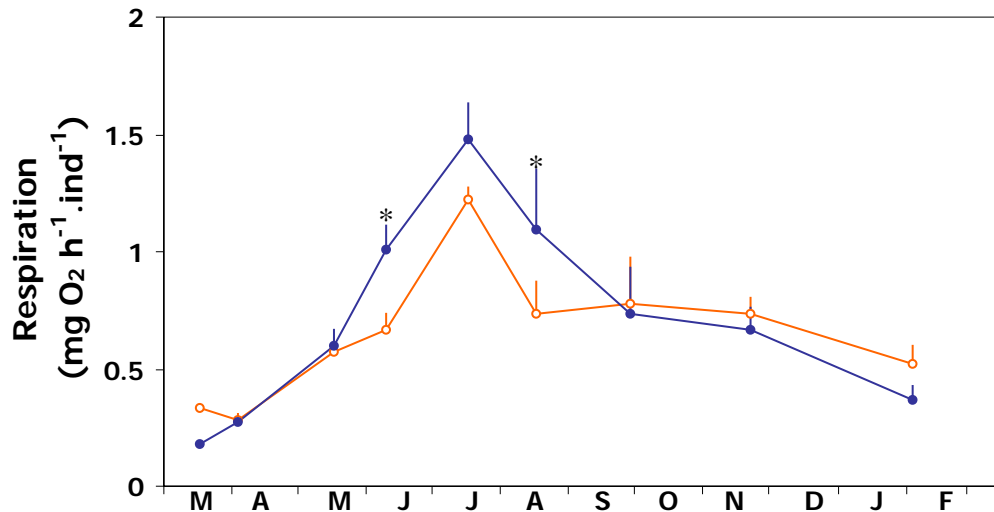


Figure 3 D. Temporal variations in Oxygen consumption rate (mgO₂ h⁻¹.ind⁻¹) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean ± SE). In orange oysters fed in low food level, in Blue oysters fed in high food level. * = significant difference.

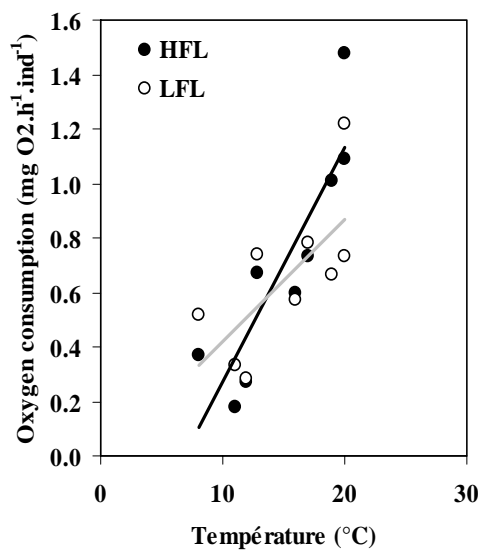


Figure 4: Relationship between oxygen consumption (R, mgO₂.h⁻¹.ind⁻¹) and temperature (T, °C) over a complete reproductive cycle in low food level condition (LFL) and high food level condition (HFL). Linear adjustment for LFL: $R = 0.044xT - 0.022$ with $R^2 = 0.478$ and for HFL: $R = 0.086xT - 0.583$ with $R^2 = 0.765$.

Bio-energetic and Scope For Growth

Figure 5 displays seasonal trend of both AE and R estimated in the both food level condition. Absorbed and respired energy showed a clear seasonal pattern: absorption reached a maximum in the spring (around 16 J.h⁻¹.ind⁻¹ in both conditions) and decreased sharply along the summer, while metabolism peaked in early summer (17.1 J.h⁻¹.ind⁻¹ in LFL

condition and $20.8 \text{ J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$ in HFL condition). In both condition, a slight recovery in AE was observed during autumn, whereas metabolism decreased after summer.

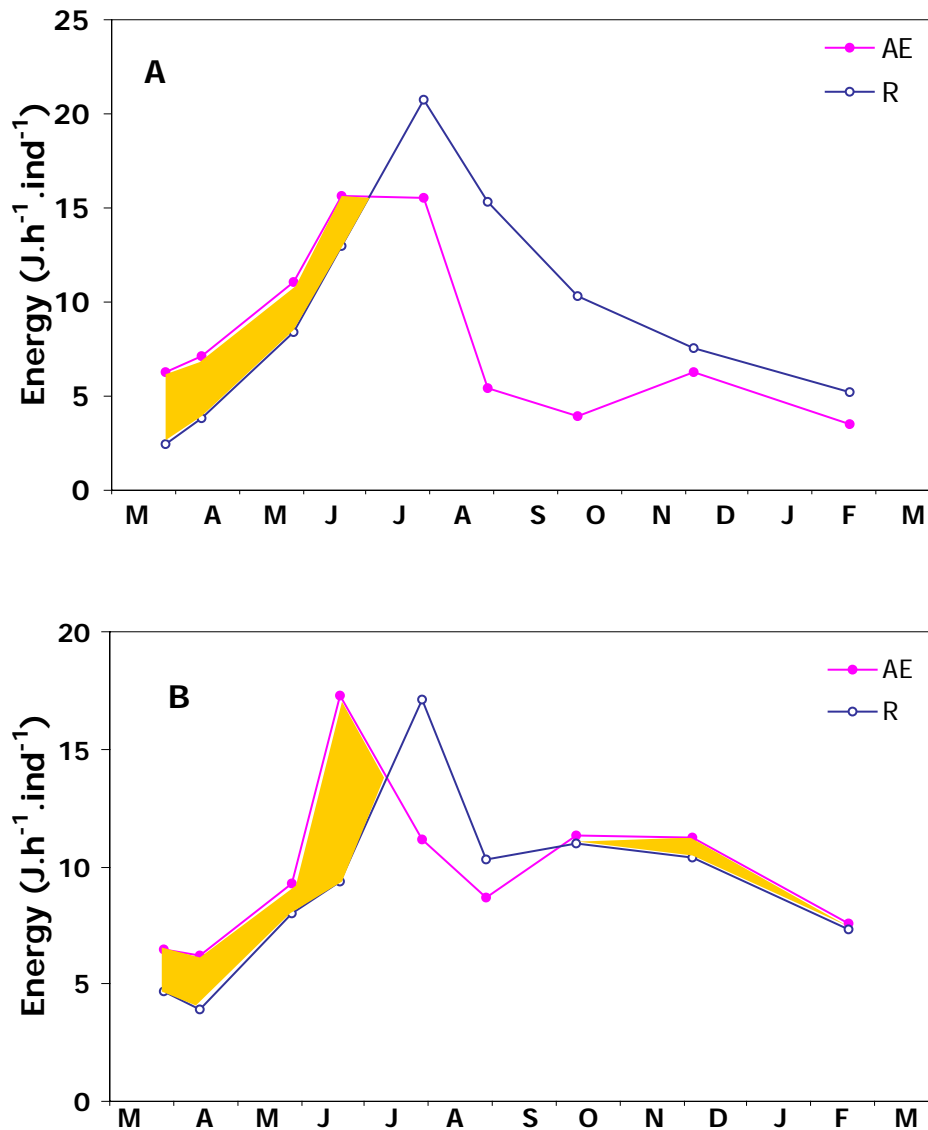


Figure 5. Seasonal trends for assimilation (AE, $\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) and respiration (R, $\text{J.h}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) observed in Pacific oysters fed at two food levels conditions: A) Low food level, B) High food level.

Such differences in the trends of the absorbed and respired energy induced a marked seasonal pattern in the SFG values (Fig. 6). In both conditions, the scope for growth was positive in spring, decreased sharply in early summer and more or less null in autumn and winter.

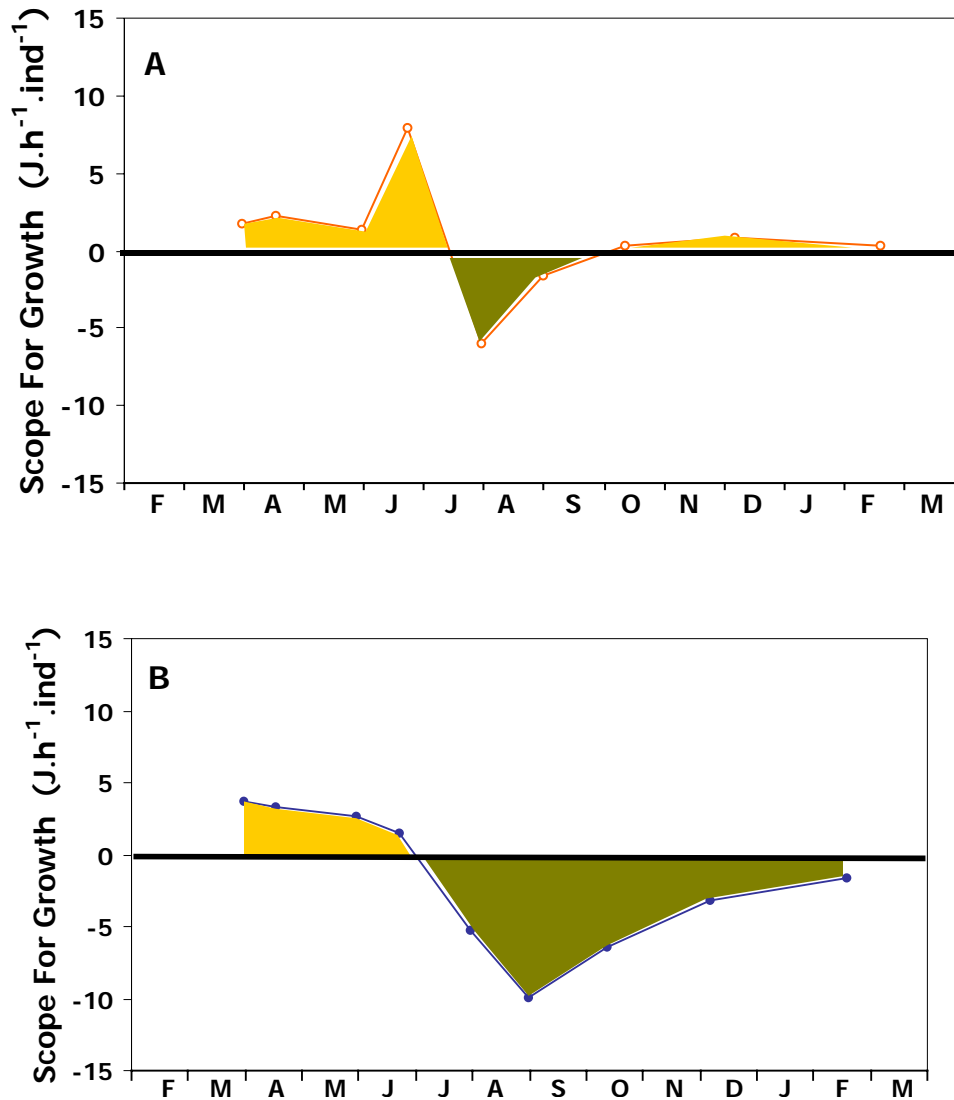


Figure 6. Seasonal trends for scope for growth (SFG, $J.h^{-1}.ind^{-1}$) observed in Pacific oysters fed in two food levels. A) Low food level, B) High food level.

More precisely, the scope for growth in LFL oysters increased continuously during March-June, with a peak in June around $7.90 J.h^{-1}.ind^{-1}$ (Fig. 6 A) and decreased to a minimum of $-5.97 J.h^{-1}.ind^{-1}$ at the end of July. After summer, LFL oysters showed a small but continuous recovery in their scope for growth until the end of winter. Concerning HFL oysters, SFG was positive from March to June (between 1.51 to $3.76 J.h^{-1}.ind^{-1}$), declined sharply in summer to a minimal value of $-9.94 J.h^{-1}.ind^{-1}$ in August (Fig. 6 B). After summer, HFL oysters showed a small but continuous recovery in their scope for growth until the end of winter. Nevertheless, in February SFG was always negative, around $-1.65 J.h^{-1}.ind^{-1}$. At a

conclusion, it appeared clearly that at both food levels, the oysters were unable to maintain a positive scope for growth during summer period, when their gametogenesis is at its maximum.

Discussion

Relationships between feeding, metabolism and gametogenesis

Working on the bioenergetics of *C. gigas*, Ren and Ross (2001) claimed in their work that “there is a strong need for quantitative investigation of energetics associated with reproduction”. It was one of the aims of the present work. And in order to evaluate the relationships between reproductive cycle and scope for growth in *C. gigas*, we realised a large experimental design during one year (March 2002- February 2003). To our knowledge, there is no comparable study on *C. gigas* in the literature. Working on the effect of temperature on clearance and oxygen consumption rate in *C. gigas*, Bougrier *et al.* (1995) concluded their work by underlining the lack of knowledge concerning the relationship between gametogenesis and ecophysiology. And they noticed that the models they proposed were probably “not applicable during the reproductive period”. Two years after, Soletchnik *et al.* (1997) gave the first detailed study concerning these aspects by providing an estimation of the oyster’s energetic budget at various stages of gametogenesis. The present study completes their work and gives a wide overview of the trend observed in the energy budget and its components (filtration, absorption and respiration) over a complete reproductive cycle.

Concerning clearance rate, the seasonal variations, observed in this work, were clearly influenced by the gametogenic activity, more than the temperature effect: the greater CR values were observed just during the active gametogenesis period (June). Whereas, in August, after spawning, when temperature was at its maximum, CR values were

significantly lower. As shown by Soletchnik *et al.* (1997), it appeared from our study that active gametogenesis in late spring stimulates and drives clearly food acquisition in oyster.

In a recent paper, Ren *et al.* (2000) argue that the feeding in *C. gigas* show large differences among studies (Gerdes 1983; Barillé *et al.*, 1994; Bougrier *et al.*, 1995; Soletchnik *et al.*, 1997). They suggested that this variation in physiological rates may have been due to experimental artefacts or to genetic differences between species. In our opinion and on the basis of this work, we suppose that this variation can also be due to gametogenic stage of the studied specimen. Another source of variation of CR may be induced by the food concentration around the bivalve. In our study, the oysters placed in high food level condition showed a low clearance rate ranging between 0.3 to 1.4 l.h⁻¹.ind⁻¹, while the oysters in low food level increase their capacity of filtration by a threefold factor: values ranged between 1.0 to 3.7 l.h⁻¹.ind⁻¹. This result shows clearly the ability of oysters to adapt their filtration rate according to the surrounding suspended matter, presumably in order to optimise their ingestion rate (Griffits and King, 1979; Navarro and Winter, 1982; Ren *et al.*, 2000; see also Navarro *et al.* (2000) working on *A. purpuratus* and Pouvreau *et al.* (2000) working on *P. margaritifera*).

Another way of feeding regulation can be operated in bivalves during absorption. In this study, the average values of absorption efficiency (AE, %) ranged between 20 to 57 % according to (1) food level condition and (2) season. Firstly, AE values were significantly lower in the high food level condition indicating a selective digestion regulation. Secondly, AE showed a clear seasonal trend for both with lower value in summer, and higher value in spring. No correlation between temperature and AE were found to explain such a trend, but on the contrary and in agreement with Soletchnik *et al.* (1997), a negative effect of gametogenesis on AE is highly supposed: in summer, when gonads were at their maximum development, AE was at its minimal value. If the inverse relationship is clear, the explanation for such a result is not obvious and we are not aware of such results in molluscs literature.

Concerning oxygen consumption, we observed also a clear seasonal variation in the same range than Bougrier *et al.* (1995) and Soletchnik *et al.* (1997). These seasonal variations were significantly correlated with water temperature. It is clearly known that temperature is the dominant factor-controlling metabolism of aquatic poikilotherms organism. And in bivalves, metabolic expenditure increases clearly with temperature (Bayne and Newell, 1983, Le Gall and Raillard, 1988). In addition, our results showed also that, during summer, oxygen consumption was significantly higher in HFL condition than in LFL condition. Since HFL oysters developed larger gonad than LFL oysters (see previous chapter), we attribute this increase to the higher requirement of gametes biosynthesis (*e.g.* Gerdes, 1983), that is generally called "cost of gametogenesis or cost of reproduction" (Honkoop, 2003).

Cost of reproduction and summer mortality

In this restrictive sense, the cost of gametogenesis, *i.e.* the oxygen consumed to fuel reproduction, is poorly documented in literature (see review in Honkoop, 2003). Soletchnik *et al.* (1997) showed in their study that the oxygen consumption increased significantly with the gain of weight related to the maturation of oyster. Similar significant positive correlation between oxygen uptake and gonad development has been reported for many species of bivalves, for example in *Mytilus edulis* (Bayne and Widdows, 1978), *Cerastoderma edule* (Newell and Bayne, 1980), *Modiolus modiolus* (Navarro and Thompson, 1996) and *Chorus giganteus* (Navarro *et al.*, 2002)

It is supposed that energy spent in reproduction is of considerable influence on the remaining energy from somatic growth in an oyster (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001). And like for mussel (Bayne *et al.*, 1976), we observed in both oysters groups that routine metabolic demand is most sensitive to temperature when the gonads are fully developed just before spawning.

The fact that an increase in oxygen uptake is observed in summer without any accompanying increases in filtration rate or assimilation efficiency (Thompson and Bayne, 1972; Navarro *et al.*, 2002) result in a decrease in scope for growth. That was clearly demonstrated in our result where we showed experimentally that the SFG decreased progressively during the development of the gametogenesis and became negative at the maximum of maturity. This overall scheme was exacerbated in HFL condition, where the decrease in SFG was higher in HFL condition and rapidly reached $-10 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$ in summer.

A negative scope for growth indicated that the environment did not supply all the energy needed to maintain a positive energy balance and the maintenance requirements has to be met with energy reserves (Bayne and Newell, 1983). In winter, this reasoning seems to be valid. But in summer, when the oyster is at its maximum maturity stage, energy reserves are at their minimal value (Li *et al.*, 2000), and consequently the maintenance requirements is presumably more difficult to satisfy and the health of the animal is endangered.

A major part of studies have associated this oyster disease was the result of physiological stress and high eutrophic conditions and water temperatures around 20°C (generally in summer), further, they were coincident with the period of maximum gonad maturation and mainly when the oysters produced an over maturation of the gonad (Mori, 1979, Hershberger *et al.*, 1984, Soletchnik, *et al.*, 1997, Gouletquer *et al.*, 1998).

We concluded that this bio-energetic imbalance produced a disturbance in the physiological activities due at great "cost of reproduction" (Myrand *et al.*, 2000; Honkoop, 2003) as a result of the gonad hypertrophy in the oysters fed in high food level. This cost could be called "survival reproduction cost", where the reproducers are more susceptible when conditions become stressful and could dead.

Acknowledgements

This project was partially founded by the Université de Bretagne Occidentale and by IFREMER as part of the research program MOREST (Mortalités Estivales – Summer Mortality). We are very grateful to the Ifremer hatchery and shellfish laboratory. Specifically, we would like to thank all the technicians from the Argenton laboratory with out whom the experiment would not have been possible: B. Le Roy and N. Fagon and their director J. C. Cochard. We would also like to thank E. Giacomini, E. Coquard, J.B. Thiebot, L. Kersaudy for their technical support. M. Enríquez-Díaz was supported by a fellowship from the CONACyT/México.

CHAPITRE IV

Reproduction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Evidence of a genotype-dependent strategy

Reproduction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Evidence of a genotype-dependent strategy

Abstract

The overall gametogenic pattern in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is relatively well known. However, there are few data concerning its reproductive intra-specific variability. In France, mass mortality events occur periodically, especially in summer during the reproductive period. In order to analyse the relationship between mortality and reproduction, a quantitative histological analysis of the gametogenesis was carried out on two population of oysters, Resistant and Sensible genetic families (IFREMER/La Tremblade Breeding survival program), reared in a common environment. Strong physiological differences between Resistant and Sensible were observed. The two oysters groups exhibited divergent gonadal development and spawning. This work demonstrates the existence of a genotype-dependant reproductive strategy in *C. gigas*. The Sensible group exhibited an earlier and more intense gametogenic activity, with two partial spawning and a long resorption period (atresia). At the opposite, the Resistant group showed a clear and restricted gametogenic cycle with an intense and total spawning. The energy spent by *C. gigas* in reproduction might explain the differential survival observed between Resistant and Sensible groups.

Keywords: Breeding program, *C. gigas*, Gametogenesis, Summer mortality

In collaboration with S. Pouvreau, Y. Le Cogic, Y. Bourles, P.G. Fleury, M. Le Pennec, E.

Bedier, P. Boudry, J.F.S Samain in revision

Introduction

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was introduced in France in the 70's. This oyster industry expanded extensively and in 2003, France is the five largest oyster producer in the world. This practice becomes the major source of French shellfish production (more than 128 000 tons per year) (CNC, 2004, FAO, 2004). Nevertheless, since 1990s, domestic production problems have been observed due to summer mass mortalities and this phenomenon began to threaten commercial yields (*e.g.* Soletchnik *et al.*, 1997; Gouletquer *et al.*, 1998). This syndrome is not recent and has been known in Pacific areas for, at least, 40 years (*e.g.* Mori, 1979; Cheney *et al.*, 2000). Summer mass mortality classically consists in sharp increases of death and persists between June and September, as observed in some culture sites of Atlantic French coast, where it may reach sometimes up to 80% of the harvestable crop (Soletchnik *et al.*, 1997; Gouletquer *et al.*, 1998; Berthelin *et al.*, 2000).

In 2001, the IFREMER began a multidisciplinary research program on the Pacific oyster, the so-called MOREST program (Samain, 2003). Studies of interactions between environment, host and pathogen organisms are the objective of this program. The final aim of this program is to bring an explanation of this mortality phenomenon in order to succeed in reducing the losses in the oyster production.

Until now, explanation about mortalities by a single factor has not been possible, the multiple stressors like pathogens, environmental factors and oyster physiological condition were associated for explain this phenomenon (Cheney *et al.*, 2000). Generally, the summer mortalities are dependant on genetic factors and are always correlated with the reproductive period (*i.e.* the energetic cost during reproductive process has been commonly supposed to play a significant role in this phenomenon) which itself is dependent on the environment, and especially the trophic level and the water temperature (Beattie *et al.*, 1980, Perdue *et al.*, 1981). Principally, during spawning and post-spawning period the glycogen content is

minimum (Perdue *et al.*, 1981; Ruiz *et al.*, 1992, Berthelin *et al.*, 2000), hence, the energetic condition is low and this would increase the oysters' susceptibility to environment stresses.

In general, most species bivalves show flexibility in their reproductive cycle according to environmental variability (Lubet, 1991, Lubet and Mann, 1987). Up to now, the genotypic and phenotypic adaptations of the reproductive cycle of *C. gigas* have received little attention in the literature. In *C. virginica*, Barber *et al.* (1991) suggested the existence of genetic differences regulated by environmental factors. These differences were observed at different time of gonadal development and spawning among various location stocks of *C. virginica* reared in the common environment.

The oyster selective breeding program at the Genetic and Pathology Laboratory (La Tremblade/IFREMER) includes a variety of wild stocks and laboratory-reared strains. During the MOREST program, this laboratory has succeed in the genetic selection of two strains of oysters, respectively susceptible and resistant to summer mortality (Degrémont *et al.*, 2003). The aim of this study is to provide deeper information concerning the relationships between intraspecific genetic variation, reproductive processes, survival and environmental factors in *Crassostrea gigas*.

Materials and Methods

Oysters origin

The Pacific oysters used in this study, were designed in the "selective" genetic programme of the Laboratory of Genetics and Pathology at La Tremblade/IFREMER (Charente-Maritime) in 2001. Adults of *C. gigas* coming from the Marennes-Oléron bay were utilised by the biparentales families production (G1), following a hierarchical crossing design (each male being cross with several females) generating half-sib families (HSF). This generation was conceived in a selective design based on the survival character. Thus, the families tested were crossing with the same male for Resistant oysters (R) and one or two

males for the Sensitive ones (S). Significant differences in survival were found between the offspring R and S (Degrémont *et al.*, 2003).

Sampling and biometry

The R and S groups were reared during one year in the shellfish nursery of IFREMER at Bouin (Vendée, France). In March 2002, R and S oyster groups were transferred to an oyster culture area in South Brittany called "Fort Espagnol" (Morbihan, France). From May 2002 to February 2003, fifteen oysters per group, were monthly collected during winter and twice a month during summer, by the IFREMER Coastal Laboratory at La Trinité (Morbihan, France). The oysters were cleaned of all epibionts, and whole live animal weight (g), soft tissue weight (g) and visceral mass weight (g) were determined for each individual.

Histology

Sampled oysters were dissected and mass visceral isolated and fixed in Davidson's solution for 48 h. For all individuals, a standard transverse section located above the pericardial area in the visceral mass was dehydrated, cleared and embedded in paraffin. 5 µm-thick sections were cut, mounted in glass slides and stained with Harris Hematoxylin and Eosin Y. Slides were examined at the IFREMER Shellfish Laboratory at Argenton (Finistère, France).

Qualitative analysis: sex ratio and histological stage

The oyster gonad slides were examined under microscope and the sex was determined for each animal by the presence of egg (female), sperm (male) or both (hermaphrodite) in the tissue section. Gonadal evolution was evaluated with a modified scale of Lubet (1959), Kennedy and Battle (1964) and Mann (1979), where five stages are

included: *Stage 0* = resting or undifferentiated; *Stage I* = early growth; *Stage II* = late growth; *Stage III* = maturation; *Stage IV* = spawning and reabsorbing.

Quantitative analysis: gonadal area and oocytes size frequency

Determinations on each slide of the total area, gonadal area and digestive area were successively performed in R and S oysters groups. Each slide was scanned at magnification $\times 400$ with a slide system-equipped scanner (HP Scanjet 7400c®). Gonad area (GA, %) and gland digestive area (GD, %) with respect to the total surface of the visceral mass were determined from histological slides with the image analysis software IMAQ Vision Builder (National Instrument ©, Le Blanc Mesnil, France). This image analysis was based on the intensity of the tissue-specific coloration. The analysis was performed using the following script: (1) the colour image was transformed in a grey level image; (2) the outlines of the histological section were defined freehandedly; (3) the area of each tissue (gonad or digestive gland) was determined by adjusting the grey level threshold specific of this tissue, (4) the area of each tissue was automatically calculated in pixels and then (5) percentages of the tissue occupied by gametes (GA, %) or digestive gland (GD, %) were then calculated.

The relative oocyte size frequency was accordingly established at three significant periods: 1) at the growth and mature stages (June), 2) prior to spawning (August) and 3) just after spawning (September). The histology slides were examined under a microscope connected to a video camera. Recorded images were processed by image analysis (Imaq Vision Builder, National Instrument ©, Le Blanc Mesnil, France). Oocytes were measured by following this script: (1) the colour image was transformed in a grey level image; (2) the outlines of the oocytes with a well-defined germinal vesicle in a field were defined freehandedly; (3) the area of each oocyte was determined by adjusting the grey level threshold specific of this tissue, (4) then, the area of the tissue was automatically calculated in pixels and expressed in μm using a relation from a previous calibration. These measures

were conducted on 500 randomly chosen oocytes per oyster, and measurements followed a unbiased systematic random sampling (Chávez-Villaba *et al.*, 2002).

Statistical analysis

General growth (whole weight, soft tissue weight and visceral weight) of the two oysters groups was compared using a Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$). Maturation stage and Sex ration (percentages) were tested using the Wilks' G^2 contingency test ($\alpha = 0.05$). Gonadal development area (GA, %) of both oysters groups was compared using a Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$). The differences between R and S oocytes size frequency were tested using a χ^2 test ($\alpha = 0.05$).

Results

General growth

The general growth registered in Resistant and Susceptible oysters showed the same progressive increase throughout the study (May 2002 to February 2003) (Figs. 1 A, 1 B and 1 C). In general, the total weight reached by both groups was similar. At the end of the study oysters weighted 62.3 g in S group and 64.8 g in R group (Fig. 1 A). Total growth rate was around $3.6 \text{ g}\cdot\text{month}^{-1}$ in both groups. At the opposite, significant differences were observed in flesh-wet weight and in the visceral mass weight (Fig. 1 B and 1 C). These differences were mainly found throughout the gametogenic period, i.e. between last June and early October ($U = 1.67$, $z = 2.012$, $p < 0.02$ Mann Whitney U test).

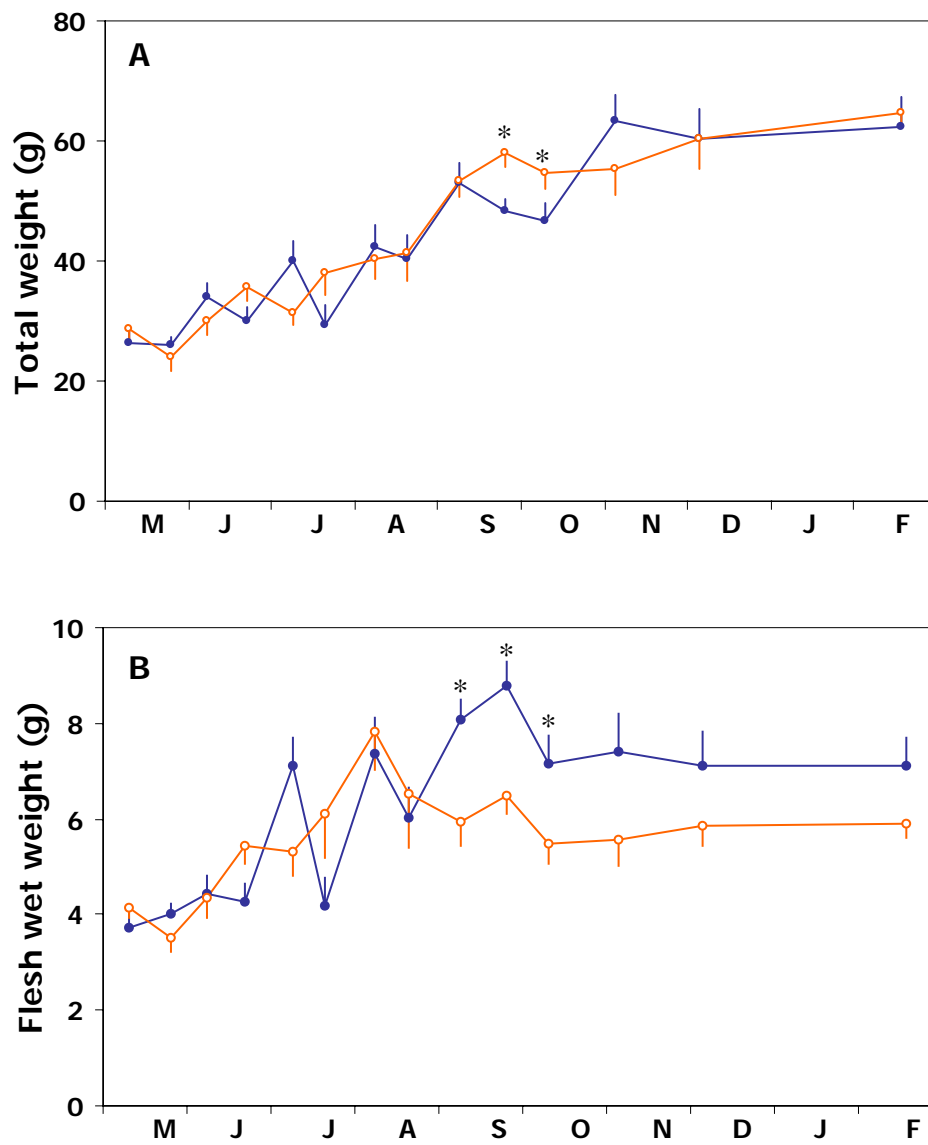


Figure 1 A & B. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Total weight (shell and flesh); B: Flesh wet weight. In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters (mean \pm SE). * = significant difference.

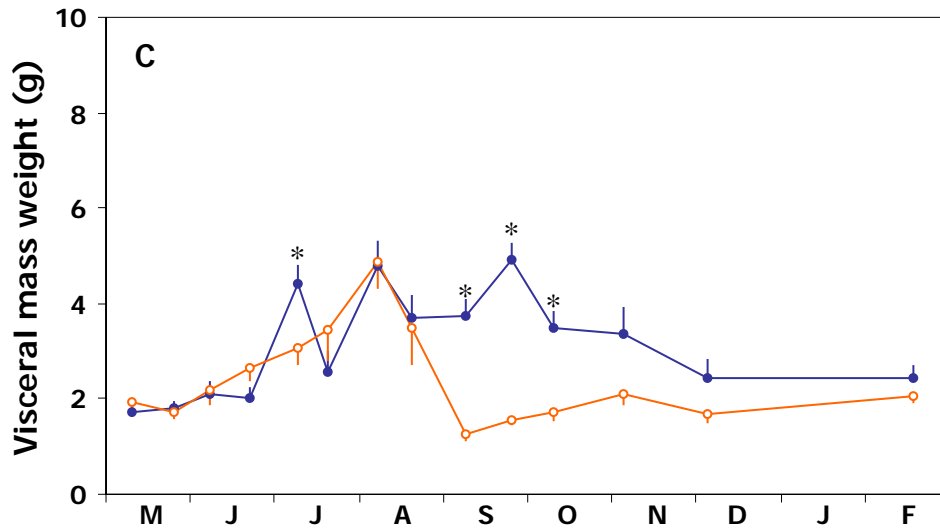


Figure 1 C. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. C: Visceral mass weight (g). In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters (mean \pm SE). * = significant difference.

Sex ratio

Of a total of 209 oysters analyzed in the Susceptible group, 44 % were females, 43% were males and 12% were undifferentiated oysters (Fig. 2 A). Among the 209 oysters of the Resistant group, 35% were females, 34% were males and 30% were sexually undifferentiated (Fig. 2 B). The sex ratio between males and females of both oysters groups were 1F:1M. Similarly, the incidence of hermaphrodites was generally low (<1 %) (Figs. 2 A and 2 B). On a seasonal basis, differences between both oysters groups (R and S) were observed. In October, significant differences in sex were observed between females and also between males of R and S oysters (G2 Wilk's contingency test, $p = 0,016$ for females, $p = 0,103$ for males), these sex-ratio differences corresponded to a great difference in the reproductive cycle between both groups (see below).

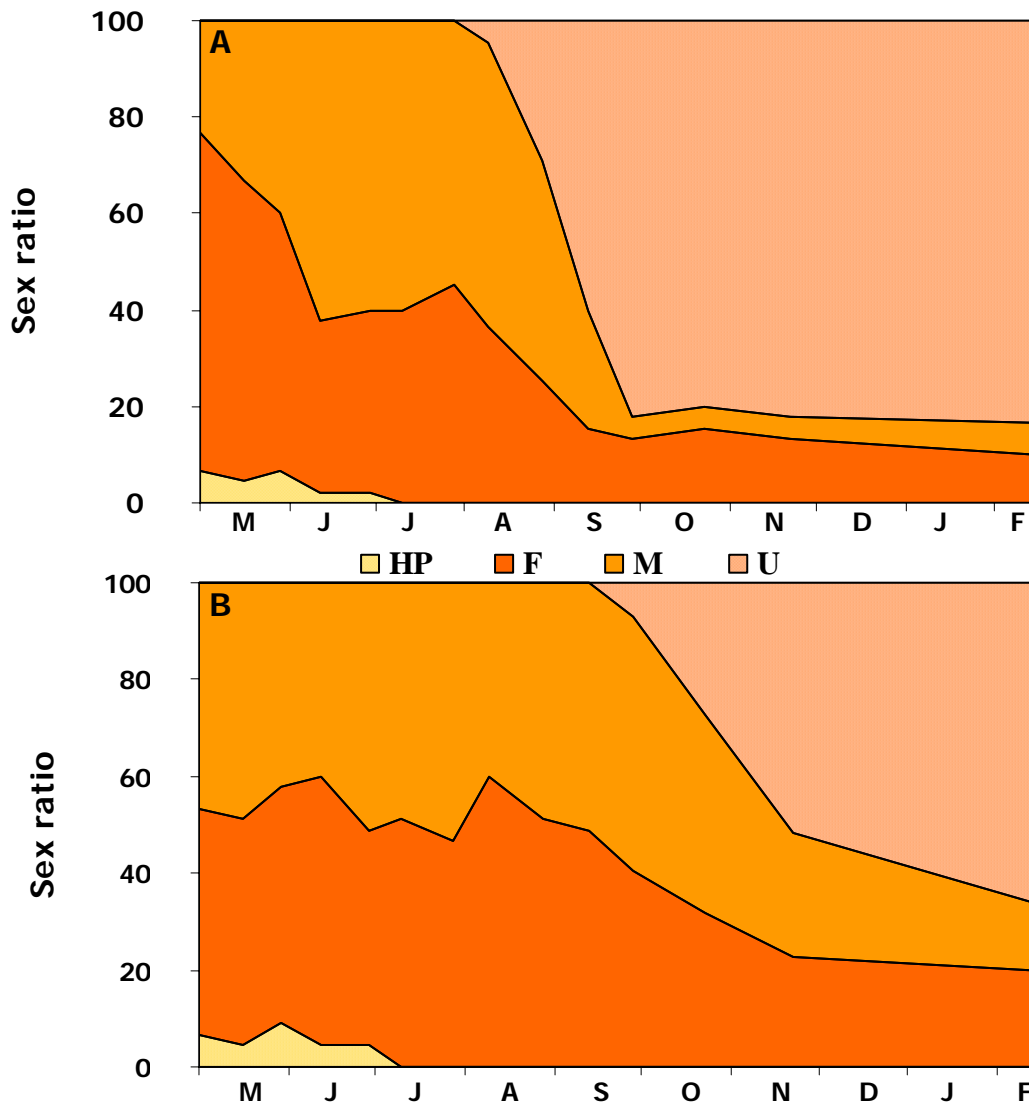


Figure 2. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). A: Susceptible oysters and B: Resistant oysters. *F* = Female; *M* = Male; *U* = Undifferentiated; *HP* = Hermaphrodite.

Reproductive cycle

Qualitative analysis

Five stages of gametes development were observed in Resistant and Susceptible oysters (Figs. 3 A and 3 B). The early and late growth stages (Stages I and II) were observed from May to June in the S oysters and from May to July in the R oysters. It appeared from these results that gametogenesis in S oysters was faster than in R ones. The maturation stage (Stage III) was observed in majority from May to December in the S

oysters and from May to September for R oysters. The spawning period (Stage IV) was initiated in July in the R oysters groups and 90% of the individuals had released their gametes in September. The spawning period for the S oysters also began in July and increased slowly throughout the time until October. In R oysters, the resting period (Stage 0) was observed after their spawning (last August) and it extended until February (last sampling).

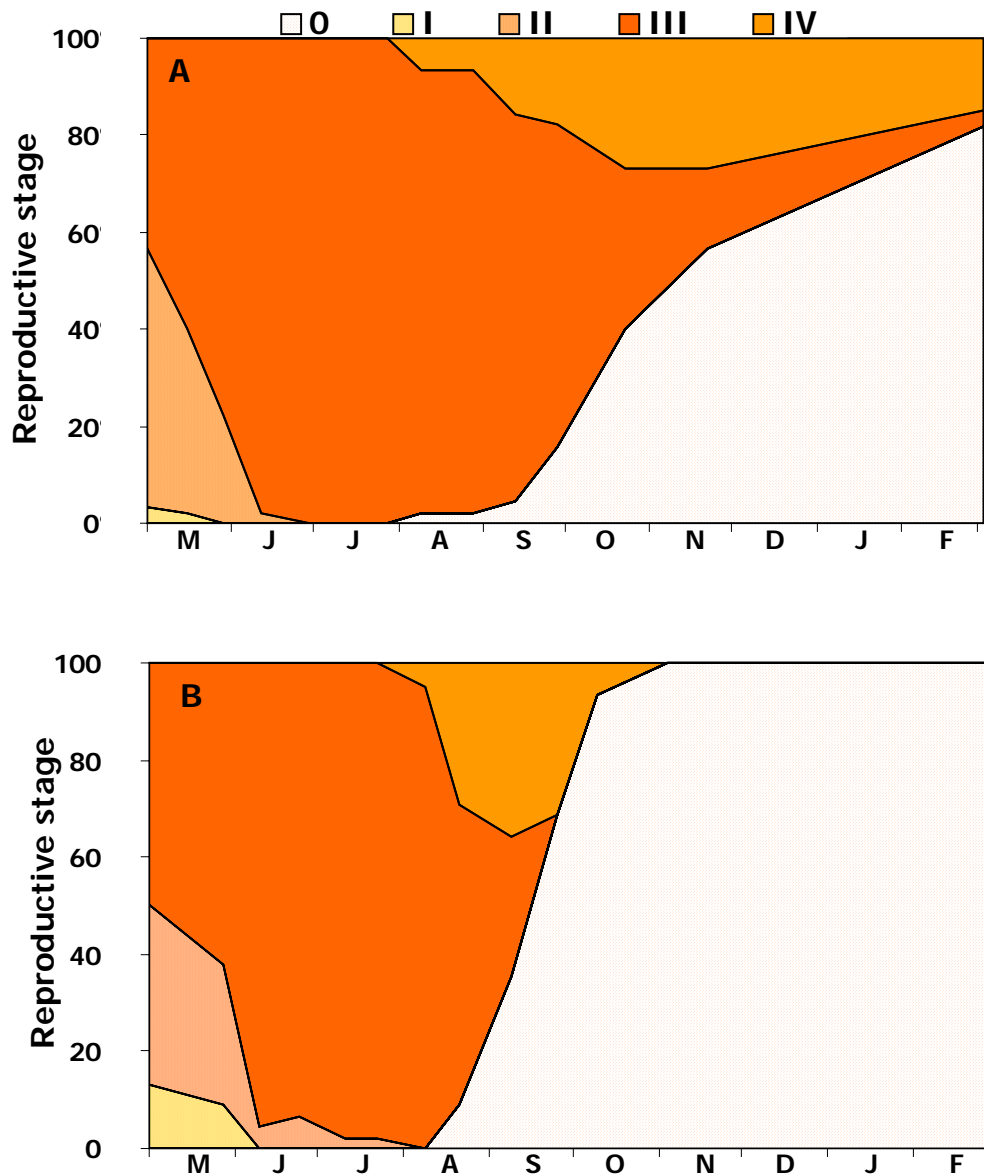


Figure 3. Seasonal changes in the reproductive stages of Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). A: Susceptible oysters and B: Resistant oysters. 0 = Resting stage; I = Early growth stage; II = Late growth stage, III = Maturation stage, IV = Spawning and reabsorbing stages.

From October, this resting stage was total (100%) in R oysters. In contrast, for the S oysters the resting stage was observed from September in few animals (7% in average) and increased slowly. In February, only 60% of the S oysters were observed in this stage. The rest of S oysters (40%) were observed in resorption or even in mature stage.

Quantitative stage

The gonadal occupation (GA, %) displayed a seasonal pattern in R and S groups (Fig. 4), reaching maximum values in summer and decreasing after the spawning period. But, since the beginning of this study to the end, strong differences in GA were observed (U = 45, $z = -2.8$, $p < 0.003$, Mann-Whitney test) between both groups. In early August, both groups reached the maximum peak of gonadal occupation (89% in S oysters and 76% in the R oysters), immediately after a spawning event was observed in both groups.

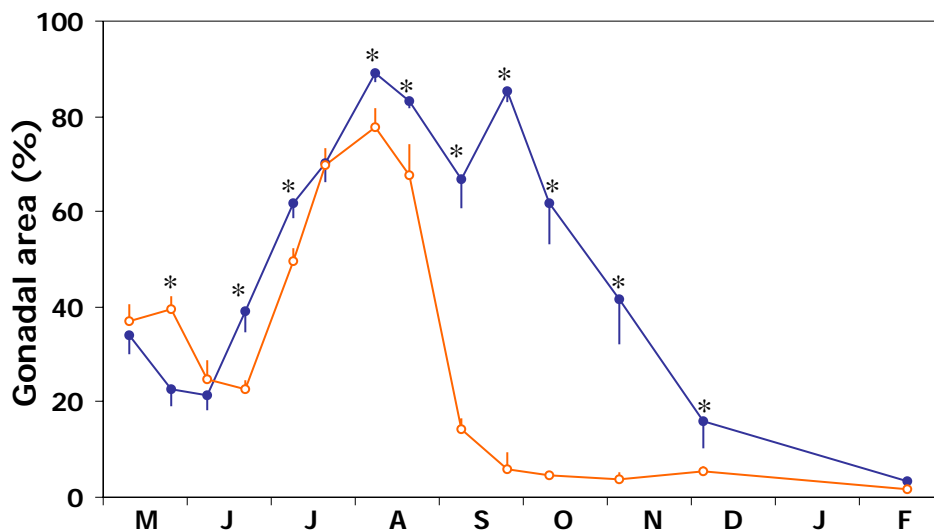


Figure 4. Seasonal variation in gonadal occupied area in Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters. * = significant difference.

The R oysters initiated a synchronous and complete spawning. In early September, the GA dropped to 5%, finalizing with a percentage of gonad occupation of 1.8% in February. Whereas, for S oysters, a first partial spawning was observed between August and the GA decreased to 66%. In last September, the GA increased once again and reached values of 85% of occupation. Later, a progressive resorption process is observed and a mean of 15% of gonadal occupation was still observed in December. In February, the GA percentage of S oysters reached approximately the same value than in R groups around 3.5%.

This strong difference in the gametogenic pattern between both groups was also confirmed when looking at the oocytes size frequency (Figs. 5 A, 5 B and 5C). The oocytes growth of the S group was more advanced than in the R group and showed significant differences in June (χ^2 test = 180.82, $p < 0.0001$, Fig. 5 A). In contrast, in August, at the maximal gametogenic activity, no significant differences in oocytes size were found: both groups showed strictly the same oocyte pattern (Fig. 5 B). In September, after spawning, the S group showed larger oocytes, indicating an incomplete spawning and the beginning of resorption activity, while R group showed oocytes in growth stage (stage II). Besides, significant differences were observed between both groups (χ^2 test = 357.75, $p < 0.0001$, Fig. 5 C).

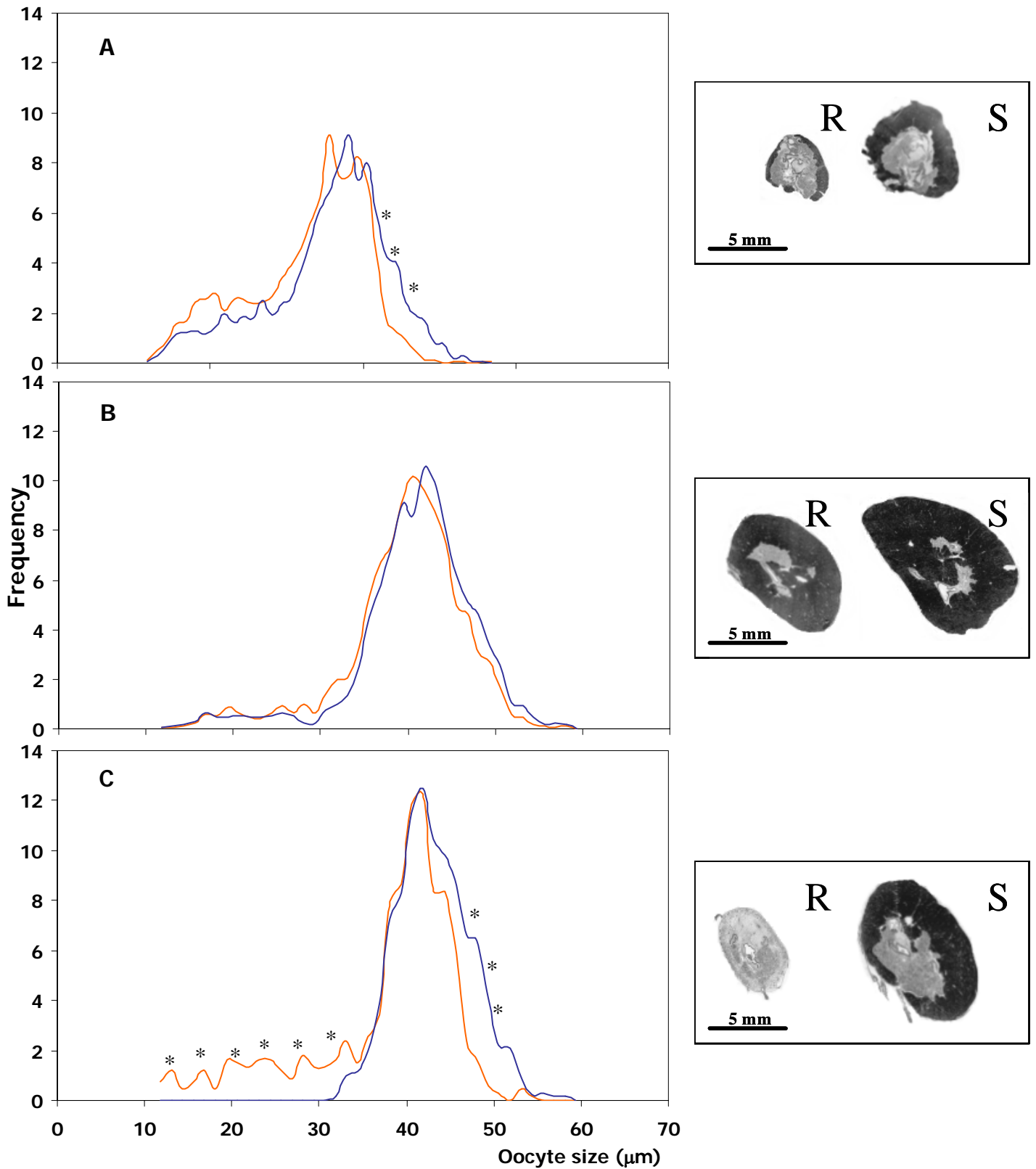


Figure 5. Temporal changes in size frequency distributions of the oocytes diameters and histological sections showing temporal changes in the gonadal area from Resistant in orange (R) and Susceptible in blue (S) oysters. A: June, B: August and C: September.

Discussion

Evidence of a genetic-dependent strategy

There are few studies that relate the reproductive cycle of *C. gigas* with their phenotypic variability (Ernande 2001). It is known that natural selection is based on the existence of phenotypic differences between individuals, which involve a reproductive success and/or a differentiated survival (Ernande, 2001).

In this study, the two oysters groups (R and S) selected for their differential sensitivity to summer mortality (breeding IFREMER program) showed a strong difference in their reproductive strategy. The gametogenesis begun earlier and was faster in S oysters, and consequently the maturation stage was reached before than in R oysters. The spawning event began at the same date in both population, and the main differences between both group is revealed during this event: spawning was complete and synchronous in R groups, whereas it was totally incomplete in the S one. After that, the difference is maintained: in autumn, unspawned S oysters, start to process of long gametic degeneration (resorption or atresia), whereas all the R oysters entered in a resting stage.

The resorption or "atresia" of unspawned gametes has been well described in other molluscs species (Lubet and Mann, 1987; Dorange and Le Pennec, 1989, Beninger and Le Pennec, 1991) but less in *C. gigas* (Steele and Mulcahy, 1999). Generally, the resorption is related to a deficit in energy due to lack of food. The residual gametes start a process of degeneration and can lead to recycling of gamete material to satisfy basal metabolism.

This difference in gametogenesis between both groups was also observed in the oocyte size (*e.g.* Lango-Reynoso *et al.*, 2000). In June, the oocyte size was larger in the S oysters than in the R one. At the maximum maturation period (August), both groups showed the same oocytes size distribution. In September, after the spawning period, distribution was one more time divergent: the R group showed oocytes in late growth stage (10-30 μm),

possibly not emitted during spawning, while S oysters showed a great number of mature and resorption oocytes (30 μm and 40 μm , respectively).

In brief, the Resistant oysters present a clearly and “normal” pattern of seasonal gametogenic development and spawning (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2000) whereas, the Susceptible oysters showed a disrupted gametogenesis and spawning. The physiological bases for such differences are not obvious, but these results were correlated with our observations in Pacific oysters when they develop a hypertrophied gonad under rich environment (M. Enriquez-Díaz, 2004, unpublished data).

Reproductive behaviour and summer mortality

Bio-energetic reasons

It appears from our work that Pacific oysters can develop different strategies of allocation resources according to their genetic basis. It is known that the allocation of resources can be plastic and it favors maintenance and survival in poor environments, whereas reproductive output and growth are enhanced when food resources are abundant (Secor *et al.*, 1998; Cheney *et al.*, 1998 and Myrand *et al.*, 2000). In this study, the general growth rate was similar in both oysters groups, but strong differences were observed in the mass visceral growth. Our work showed that these differences were mainly due to the reproductive behaviour. It is not obvious to give an explanation for this difference, but it was evident that the Resistant oysters privileged the somatic growth compared to gonad growth, while, the allocation resource in the Susceptible oysters privileged the gonad growth.

Gouletquer *et al.* (1998) suggest that high reproductive output appeared to be linked to summer mortality in *C. gigas* cultivated in Marennes-Oléron bay (France), the same conclusion has been drawn by Tremblay *et al.* (1998) and Myrand *et al.* (2000) in *M. edulis*. In this study, summer mortality rate were recorded simultaneously to our data and results are showed on figure 6.

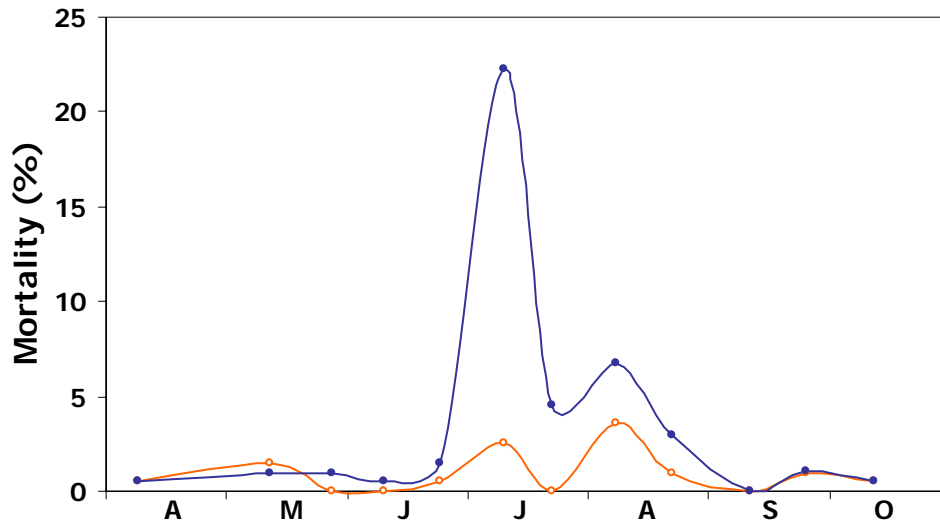


Figure 6. Day-mortality (%) in Susceptible (blue line) and Resistant oysters (orange line) cultivated in South Brittany (France).

The first significant event in term of mortality was observed at the mature gonad stage and was larger in the Sensible oysters (22 %). This high sensitivity is probably linked to reproductive behavior. The energy acquired for these oysters was depleted faster in their gonad development, hence, their metabolic request was increased and the oyster became extremely sensitive to any environment stress form (Cheney *et al.*, 1998).

In general, we observed that the genetic factor play a role selective in Sensible oysters that provoked the gonad hypertrophy and become more susceptible to environmental changes (Mori, 1979; Ernande, 2000, Enríquez-Díaz *et al.*, submitted,). Moreover genotype-dependent differences in reproduction and storage cycles may affect physiological and biomechanical performance (Secor *et al.*, 2001). These differences could affect genotype-dependent survival rates (Ernande, 2000). For example, a mussel that has a high reproductive effort or investment in storage tissues, might not allocate enough resources to maintaining its byssus attachment strength (Secor *et al.*, 2001).

Post-spawning reasons

Furthermore, another mortality event (of less intensity) was also observed just after the gametes release. In *C. gigas*, Berthelin *et al.* (2000) observed that the oysters display a fragile condition due to the energetic cost produced by the spawning events. (Beattie, 1980, Perdue, 1981).

In oysters, spawning involves the coordinated activity of the mantle margins, gills and principally the adductor muscle contractions (O Foigil and Taylor, 2000). Then, the energy expended in the gamete release by the adductor muscle contractions could be larger when the oysters develops an exacerbated gonad and could not direct the resources sufficient to maintain the shells closed which could induce a degradation of animal health (Poulet, *et al.*, 2003).

Implication in term of genetic selection

This summer oyster mortality is a problem of crucial importance to the growers because it affects growing areas, therefore, a reliance on hatchery-produced seed and industry suggest that a more organize approach to genetic strain development would be beneficial.

Generally, the oysters genetic improvement programs, consider most important the growth and the survival (Dillon and Manzi, 1993; Chew, 2001). Hershberger, *et al.* (1984), observed based on family selection, that *C. gigas* improved resistance to summer mortalities. Moreover, the triploid oyster program became important, the result of triploid induction is primarily, inhibition of gonad development during the normal reproductive period; reduction on gonad production also improves meat quality. These attribute are beneficial in aquaculture because reproduction could cause a decline in product quality, contribute to mortality, or impede growth (Allen *et al.*, 1993). Furthermore, Newkirk (1996) observed that the reduced gonad development of *C. virginica* triploids resulted in higher survival. Actually,

the possibility of producing oysters with characterized genotypes and improved culture performance under a wide range of environmental conditions is being explored (Langdon *et al.*, 2003).

Conclusion

This work demonstrates undoubtedly the existence of a strong genotype dependent reproductive strategy in *C. gigas*. The genetic Sensible group exhibited an earlier and more intense gametogenic activity, with a weak spawning leading to along resorption period (atresia). On the other hand, the genetic resistant group showed a clear and restricted gametogenic cycle with an intense and total spawning. This main physiological difference might explain the differential survival observed between both groups and constitutes essential clue to solve the problem of summer mortality observed recently on shellfish area in France.

Acknowledgments

Financial support for this study was provided by IUEM/IFREMER and was integrated to the MOREST French program (2001-2004, IFREMER program). We thank Dr. J. C. Cochard for providing facilities at the Argenton Shellfish Laboratory (IFREMER-Brest, LPI). We thank J. F. Bouget for providing environmental and mortality data. The authors would like to thank IFREMER/La trinité sur Mer for supplying the *C. gigas* oysters. We are sincerely grateful to J. B. Thiebot for his help in the image analyses. They also thank to Marie-Paule Friocourt for reviewed and improved the English text. M. Enríquez-Díaz was supported by the Ph.D. fellowship from CONACyT/Mexico.

***CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES***

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusions

Methodologie

Histologie

La méthode d'histologie quantitative mise au point lors de cette étude pour évaluer la gamétogenèse chez *Crassostrea gigas*, nous permet de connaître le pourcentage d'occupation de la gonade dans chacune des régions de la masse viscérale analysées. Elle fournit **un descripteur quantitatif efficace**, valable aussi bien chez les mâles que chez les femelles de (1) l'état des réserves ;(2) l'évolution de la gamétogenèse ; (3) l'intensité des émissions de gamètes et (4) l'évaluation de la période de résorption. Elle permet aussi de fournir par extrapolation une estimation de la masse des gonades, chez ce bivalve à gonade diffuse. Cette méthodologie quantitative a donc le mérite **de faire abstraction de la subjectivité des méthodes qualitatives** généralement utilisées et nous donne une approche plus complète du cycle reproducteur chez l'huître creuse. Néanmoins, cette technique est longue et coûteuse en temps humain, d'autres méthodes restent donc à envisager pour décrire précisément la gamétogenèse. A ce titre, un effort dans les méthodes non invasives est engagée.

Ecophysiologie

L'instrumentation automatisée du banc d'écophysiologie de la Station Expérimentale d'Argenton a permis, sur l'ensemble d'un cycle annuel, de réaliser des mesures physiologiques comme l'activité alimentaire (filtration et biodépôts) et de connaître le niveau de métabolisme (respiration) chez un bivalve, en temps réel et en continu. Ceci permet ainsi d'obtenir **une bonne estimation du bilan énergétique au cours d' un cycle physiologique complet** chez *C. gigas*. Néanmoins, cette méthode n'a pu être appliquée que sur un petit nombre d'individus. Le développement d'un outil d'écophysiologie en

mésocosme (mesure sur l'ensemble d'une population) est en cours et permettra d'acquérir des données d'écophysiologie à haute fréquence.

Cycle reproducteur

Les résultats de cette étude fournissent des réponses à plusieurs interrogations concernant différents aspects de la reproduction de *C. gigas*. Les stratégies observées chez l'huître creuse au cours de cette étude en milieu naturel (Marennes Oléron, Baie des Veys) et confirmées en milieu contrôlé (Argenton) montrent clairement **le caractère extrêmement plastique de la reproduction** chez ce bivalve. Sur une population moyenne, deux paramètres de l'environnement semblent ainsi contrôler l'intégralité du cycle reproductif à la fois en vitesse et en intensité : **la température et la densité en phytoplancton**. En outre, d'un point de vue facteur interne, un déterminisme génétique très fort semble aussi contrôler cette fonction physiologique, comme l'a montré l'analyse de différences phénotypique des souches R et S.

Dans le milieu naturel

Nous confirmons qu'en milieu naturel, et selon les conditions environnementales particulières de chaque site de culture, les huîtres de même origine génétique présentent différentes stratégies de reproduction. Dans un milieu riche en nourriture comme la baie des Veys (BDV), le nombre de gamètes émis, l'aire d'occupation de la gonade et l'effort de reproduction sont largement supérieurs à ceux présentés par les huîtres élevées à Marennes-Oléron. Cependant, chez les huîtres implantées en Baie des Veys, les émissions gamétiques ne sont que partielles, entraînant une longue période de résorption cellulaire aux conséquences physiologiques encore mal connues. Les huîtres de Marennes-Oléron, quant à elles, suivent un cycle gamétogénétique saisonnier que l'on pourrait qualifier de "classique". L'effort de reproduction est donc différent dans les deux sites et est relié au niveau trophique.

En milieu contrôlé

D'un point de vue expérimental, un niveau élevé de nourriture traduit, chez l'huître, par un fort développement de la gonade ou 'hypertrophie'. De même que les huîtres de Normandie présentent une gonade hypertrophiée, les huîtres alimentées par un fort taux de nourriture présentent aussi ce type de sur-maturation gonadique et suivent les mêmes processus (retard et inefficacité de l'émission de gamètes, rallongement du période de résorption de gamètes, ...). Si ce grand investissement énergétique vers la reproduction permet une forte production de gamètes, il aboutit à une dépense énergétique plus forte que celle observée chez des animaux élevés à un niveau de nourriture plus bas.

En outre et sur le plan zootechnique, nous avons contribué à une meilleure connaissance de la prise alimentaire par les huîtres et ceci peut conduire à une meilleure gestion des géniteurs en conditionnement en éclosérie.

En conclusion, l'expérimentation en milieu contrôlé a permis de certifier que la durée du cycle de reproduction est régulée selon de la température du milieu et que l'intensité de l'effort de reproduction est influencée par le niveau trophique.

Ecophysiologie de la reproduction

Peu d'études mettant en relation le bilan énergétique en fonction de la gamétogenèse sont disponibles chez *C. gigas*. Ici, nous avons mis en évidence que l'étude des paramètres physiologiques nous permettait de connaître le niveau d'épuisement énergétique conséquent à l'effort de reproduction. Nous avons observé que des huîtres élevées dans un milieu riche présentent **une chute du bilan énergétique d'autant plus prononcée que l'effort de reproduction est intense**. Nous avons aussi établi que les huîtres augmentent leur consommation d'oxygène et donc, en parallèle, consomment d'avantage d'énergie quand la température s'élève autour de 19°C. En terme bioénergétique, ce constat peut se traduire par un bilan énergétique SFG négatif (gain d'énergie – perte d'énergie) et donc un

affaiblissement de l'animal. **Cette détresse physiologique peut être la cause de pathologie.**

Déterminisme génétique de la fonction de reproduction

En milieu contrôlé, les huîtres R et S, issues du programme génétique de sélection d'IFREMER/La Tremblade, et placées dans le même milieu (Rivière d'Auray, Morbihan) démontrent le même type de différences dans leur stratégie de reproduction que celles observées en milieu naturel et lors de notre étude en condition contrôlée: (1) Les huîtres sensibles développent préférentiellement une hypertrophie gonadique, avec une inefficacité à la ponte et une longue période de résorption, comme celles de la baie des Veys et celles abondamment nourries ; à l'inverse, le lot résistant suit un cycle reproductif saisonnier classique avec un effort reproductif modéré, une ponte totale et une période de résorption très courte. Ce lot génétique présente en outre une bonne survie au moment de la période estivale. Il en ressort donc **la reproduction chez *C. gigas* présente un fort déterminisme génétique** : certains génotypes présentent une gamétogenèse exacerbée. Ces résultats fournissent en outre une explication à la grande variabilité que l'on peut observer dans les stades de maturation quand on observe une population à base génétique large.

Mortalités estivales

Nous confirmons le caractère multifactoriel de ce syndrome. En général, les mortalités surviennent bien pendant le période de maturation, surtout chez les huîtres à gonade hypertrophiée, mais aussi, simultanément au franchissement d'un seuil de température supérieur à 19°C.

A la lumière de notre étude, il existe **deux phases** dans la gamétogenèse qui peuvent être considérées comme des facteurs à risque et qui peuvent compromettre la survie des animaux: 1) **La phase de construction active** de la gamétogenèse, quand

l'huître consacre une majeure partie de son énergie au développement des gamètes (cas des animaux sensibles et HFL) et donc moins d'énergie à sa défense, et 2) **La phase d'émission des gamètes (émissions partielles et/ou totales)** où l'effort de ponte trop coûteux et les tissus conjonctifs abîmés peuvent fournir un terrain favorable pour le développement d'un pathogène. En outre, la période de résorption automnale plus ou moins longue est potentiellement une étape physiologique à risque, encore trop mal étudiée.

En conclusion, selon le site de culture (i.e. selon le niveau de ressource trophique et la température), l'huître a la faculté d'adapter sa gamétogenèse. **Cette adaptation lui permet de se répandre facilement dans les écosystèmes surtout à la faveur du réchauffement climatique et de l'eutrophisation des milieux.** Par contre, la contrepartie de cette stratégie passe probablement par une augmentation de sa sensibilité en période estivale.

Perspectives

Des modèles bioénergétiques utilisés pour simuler la croissance d'un organisme dans en fonction de l'environnement sont disponibles. Les modèles intégrant précisément la reproduction sont moins fréquents et moins opérationnels. Dans notre cas, de tels outils seraient nécessaire pour montrer quantitativement les relations entre le milieu environnementale, la croissance, la gamétogenèse, l'état des réserves énergétiques et la survie. Notre étude montre que les deux facteurs forçant à prendre en compte sont impérativement la température et la quantité de nourriture.

Ce type de modèle repose en outre sur la détermination du bilan énergétique et son allocation dans les différents compartiments tissulaires, notamment ceux permettant la mise en réserve des molécules énergétiques et le compartiment germinale. Un nouveau suivi de la reproduction en milieu contrôlé, avec des mesures hautes fréquences de l'environnement physiques et trophiques, des mesures quantitatives précises du développement gonadique, des émissions et des périodes de résorption, accompagné de l'estimation des lois d'écophysiologie (filtration, respiration) et des mesures de flux d'énergie (isotopie naturelle) pourraient servir de validation à cette approche de modélisation. *In situ*, des enceintes benthiques, identiques à celles mises en place en rade de Brest pour connaître des éléments de physiologie de la coquille Saint Jacques, *Pecten maximus* (ACI Pecten, L. Chauvaud/LEMAR, com. pers.) pourraient être utilisées dans le cas de l'huître, en parallèle d'un suivi haute fréquence du milieu de vie.

En définitive, la mise en place d'un modèle déterministe de la reproduction voire des mortalités, non développé au cours de notre étude, pourrait constituer un prolongement logique de nos recherches.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Allen, Jr. S. K., Gaffney, P. M., Ewart, J. W. 1993. Genetic improvement of the Eastern oyster for growth and disease resistance in the Northeast. NRAC Fact Sheet No. 210. University of Massachusetts Dartmouth
- Ansell, A. D., 1974. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from Clyde Sea area. Mar. Biol. 25,85-99.

B

- Barber, B. J., 1996. Gametogenesis of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. J. Shellfish Res. 15(2), 285-290.
- Barber, B. J., Blake, N. J., 1983. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck, at its southern distributional limit. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 66,247-256.
- Barber, B. J., Blake, N. J., 1991. Reproductive physiology. In: Shumway S.E. (Ed.), *Scallops; Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 337-428.
- Barber, B. J., Ford, S. E. and Wargo, R. N., 1991. Genetic variation in the timing gonadal maturation and spawning of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Biol. Bull. 181:216-221.
- Barillé, L., Bougrier, S., Geairon, P., Robert, J. M., 1994. Alimentation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* à l'aide de navicules bleues *Haslea ostrearia* (Simonsen) de différentes tailles. Oceanologica Acta 17(2),201–210.
- Barillé, L., Héral, M., Barillé-Boyer, A. L., 1997. Modélisation de l'écophysiologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. Aquat. Living Resour. 10,31-48.

- Barille, L., Haure, J., Pales-Espinosa, E., Morançais, M., 2003. Finding new diatoms for intensive rearing of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture* 217, 501-514.
- Barret, J., 2001. Huîtres creuses. Données par région administrative. [on line] last accessed February 2004. Available from World Wide Web: http://www.ifremer.fr/aquaculture/conchyliculture/huitres_creuses.htm
- Bayne, B. L., 2002. A physiological comparison between Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Sydney Rock oysters *Sacrostrea glomerata*: food, feeding and growth in a shared estuarine habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 232,163-178.
- Bayne, B. L., Thompson, R. J., Widdows, J., 1976. Physiology. *In*: Marine mussels: Their Ecology and Physiology. B. L. Bayne (ed). pp 121-206. Cambridge University Press, London.
- Bayne, B. L., Widdows, J., 1978. The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia* 37,137-162.
- Bayne, B. L., Bubel, A., Gabbot, P. A., Livingstone, D. N., Moore, M. N., 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L.. *Mar. Bio. Lett.* 3,89-105.
- Bayne, B.L., Newell, N.B., 1983. Physiological energetic of marine mollusc. *In*: Saleuddin A.S.M. and Wilbur K.M. (Eds), *The Mollusca*, 4. Academic Press, New York, NY, pp. 407-515.
- Bayne, B. L., Hawkins, A. J. S., Navarro, E., 1987. Feeding and digestion by the mussels *Mytilus edulis* L. (Bivalvia:Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 111,1-22.
- Bayne, B. L., Hedgecock, D., McGoldrick, D., Röss, R., 1999. Feeding behaviour and metabolic efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters [*Crassostrea gigas* (Thunberg)]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233,115-130.
- Beattie, J. H., Chew, K. K., Hershberger, W. K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters *Crassostrea gigas* during summer mortality. *Proc. Nat. Shellfish. Assoc.* 70,184-189.

- Beninger, P. G., Le Pennec, M., 1991. Reproductive System. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops, Biology, Ecology and Aquaculture*, Elsevier, Amsterdam.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M, 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Com. Biochem. Physiol. Part. B.* 125(3),359-369.
- Bodoy, A., Prou, J., Berthomé, J., 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). *Haliotis* 15,173-182.
- Bougrier, S., Gearion, P., Deslous-Paoli, J. M., Bacher, C., Jonquières, G., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134,143-154.
- Brousseau, D. J., 1978. Spawning cycle, fecundity and recruitment in a population of soft-shell clam, *Mya arenaria*, from Cape Ann, Massachusetts. *Fish. Bull.* 76(1),155-166.
- Browne, R. A. and W. D. Russel-Hunter, 1978. Reproductive effort in molluscs. *Oecologia* 37,23-27.

C

- Cáceres-Martínez, J., 1994. Aspectos de la biología del mejillón *Mytilus galloprovincialis* en la Ria de Vigo : Ciclo reproductivo, vida larvaria y fijación. PhD thesis. University of Santiago de Compostela, España.
- Chávez-Villalba, J. E., 2001. Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. PhD thesis. University of Bretagne Occidentale, France
- Chávez-Villalba, J., Mingnant, C., Cochard, J. C. and Le Pennec, M., 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30:1-12.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.C. and Le Pennec, M., 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214,115-130.
- Chávez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.C. and Le Pennec, M., 2003a. Influence of timing broodstock collection on conditioning, oocyte production, and

- larval rearing of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), at a six production sites in France. J. Shellfish Res. 22(2), 465-474.
- Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M., Cáceres-Martínez, C., 2003b. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. J. Shellfish Res. 22(3), 721-731.
- Chalkey, H.W., 1943. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J. Natl. Cancer Inst. 4,47-53.
- Cheney, D. P., MacDonald, B. T., Elston, R. A., 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J. Shellfish. Res. 19(1),353-359.
- Chew, K. K., 2001. SHELLFISH-. Delaware bay oystering and the Haskin Shellfish Research Lab. Aquaculture Magazine. 27(1):59-63.
- Collet, B., 1998. Bases génétiques des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. PhD thesis. Institut National Agronomique Paris-Grignon, France.
- CNC, 2004. Comité National de la Conchyliculture. Statistiques.[on line] last accessed February 2004. Available from World Wide Web: <http://www.cnc-france.com/actualite/Default.htm>
- Conover, R. J., 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. Limnol. Oceanogr. 11,338-354.

D

- Daniel, A., 2002. Etude de définition d'un Réseau Hydrologique Littoral in Normandie. Rapport IFREMER RST.DEL/0210/PB, France.
- Deslous-Paoli, J. M., 1982. Croissance et qualité de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron. TETHYS 10(4),365-371.
- Dinamani, P., 1987. Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. Aquaculture 64,65-76.

- Dorange, G., Le Pennec, M., 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103,339-348.
- Dégremont, L., 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. PhD Thesis. University of Caen, France
- Dunham, R.A. 1996. Contribution of genetically improved aquatic organisms to global food security. International Conference on Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security. Government of Japan and FAO, Rome, 150 pp.
- Dunham, R.A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., Liu, Z., Pongthana, N., Bakos, J., Penman, D., Gupta, M., Rothlisberg, P. & Hoerstgen-Schwark, G. 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, eds. *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000.* pp. 137-166. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

E

- Ernande, B., 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. Ph D Thesis. University of La Rochelle. France.

F

- FAO, 2004. Fisheries data. FAOSTAT [on line] last accessed February 2004. Available from World Wide Web:

http://apps.fao.org/faostat/servlet/XteServlet3?Areas=%3E862&Items=1427&Elements=220&Years=2001&Format=Table&Xaxis=Years&Yaxis=Countries&Aggregate=over_areas&Calculate=&Symbols=on&Domain=FishCatch&ItemTypes=Fishes&language=EN

- Friedman, C., Hendrick, R. P., 1990. Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J. Invert. Pathol.* 57,109-120.

- Friedman, C., Beattie, J. H., Elston, R. A., Hedrick, R. P., 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94,1-15.
- Foighil, D. O. and Taylor, D. J. 2000. Evolution of parental care and ovulation behavior in oysters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15(2):301-313.

G

- Grant A., Tyler P.A., 1983b. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocytes size/frequency data, and comparison of different types of data. *Inter. J. Invertebr. Reprod.* 6:271-283.
- Gerdes, D., 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Part II. Oxygen consumption of larvae and adults. *Aquaculture* 31,221-231.
- Giese, A. C., Kanatani, H., 1987. General aspects: seeking unity in diversity. In: Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B., (Eds.), *Maturation and Spawning in Reproduction of Marine Invertebrate IV*. Blackwell Scientific, Palo Alto and Boxwood Press Pacific Groove, CA, pp. 251-329.
- Glude, J. B., 1975. A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations (1965-1972). *Proceedings of the 3rd US Japan meeting on aquaculture at Tokyo, Japan, october, 1974.*, 29-34.
- Gouletquer P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Gearion, P., Faury, N. and Taillade, S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). *ICES CM 1998/CC (14)*.
- Gouletquer P., Wolowicz, M., Latala, A., Gearion, P., Huvet, A., Boudry, P., 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between, cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquat. Living Resour.* 12(4),271-277.
- Grant, A., Tyler, P. A., 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocytes size/frequency data, and comparison of different type of data. *Inter. J. Invertebr. Reprod.* 6,271-283.

- Griffiths, C. L., King, J. A., 1979. Some relationships between size, food availability and energy balance in the Ribbed mussel *Aulacomya ater*. Mar. Biol. 51,141-149.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). J. Cons. Int. Explor. Mer 47,399-403.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Biol. Bull. 187,309-318.
- Guo, X., DeBrosse, G.A., Allen, S.K. Jr. 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture, 142: 149-161.

H

- Heffernan, P. B., Walker, R. L., 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. J. Moll. Stud. 55,135-137.
- Héral, M., 1989. Traditional oyster culture in France. In: Barnabé (Ed), Aquaculture 1, Paris, pp. 342-387.
- Hershberger, W. K., Perdue, J. A. and Beatie, J. A., 1984. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. Aquaculture 39,237-245.
- Heude-Berthelin, C., 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. PhD thesis. University of Caen, France.
- Hilbish, T.J., 1986. Growth trajectories of shell and soft tissue in bivalves: seasonal variation in *Mytilus edulis* L.. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96,103-113.
- Hilbish, T. J., Zimmerman, K. M., 1988. Genetic and nutritional control of the gametogenic cycle in *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 98,223-228.
- Honkoop, P. J. C., 2003. Physiological cost of reproduction in the Sydney rock oyster *Sacrostea glomerata*. How expensive is reproduction? Oecologia 135,176-183.
- Hughes-Games, W. L., 1977. Growing the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical sea water fish ponds. I. Growth rate, survival and quality index. Aquaculture 11,217-229.

K

- Kang, Ch-K., Park, M.S., Lee, P. Y., Choi, W-J. and Lee, W-Ch., 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. J. Shellfish Res. 19(2),771-778.
- Kennedy, A. V., Battle, H. I., 1964. Cyclic changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 42,305-321.
- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D. W., Lucas, J. S., 2001. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccrostrea commercialis*) II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. Aquaculture 203,195-216.
- Kopp, J., Joly, J. P., Legagneur, E., Ruelle, F., 1997. Biomasses ostréicoles et mytilicoles de Normandie en 1995. Rapport Interne IFREMER DRV/RA/RST/97-07. France.

L

- Langdon, C., Evans, F. Jacobson, D. and Blouin, M., 2003. Improved family yields of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) derived from selected parents. Aquaculture 220,227-244.
- Lango-Reynoso F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). PhD. Thesis. University of Bretagne Occidentale, France.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P. J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. Invertebr. Reprod. Dev. 36(1-3),141-144.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 190,183-199.

- Lannan, J. E., Robinson, A., Breese, W. P., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture* 21,337-345.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y. M., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philiphinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 74,351-366.
- Le Gall, J. L. Raillard, O. 1988. Influence of temperature on the physiology of the oyster *Crassostrea gigas*. *Oceanis* 14,603-608.
- Le Pennec, M., Robert, R., Avendaño, M., 1998. The importance of gonadal development on larval production in pectinids. *J. Shellfish Res.* 17,97-101.
- Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Histopathological damages caused by the copepod *Myticola orientalis* in the oyster *Crassostrea gigas* from the Bay of Brest (Brittany, France). *Haliotis* 32,73-80
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J. L., Berthe, F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15,251-258.
- Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science* 66 : 502-508.
- Lipowsky, V. P and Chew, K. K., 1972. Mortality of Pacific oysters *C. gigas* : the influence of temperature and enriched seawater on survival. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* 62 :72-82.
- Lodatto, M. I., 1997. Mortalité estivale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (Bassin de Marennes-Oléron) : étude des pratiques culturelles et des caractéristiques biologiques et spatiales des élevages. PhD thesis. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. France.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1987. Mortality and quantitative aspects of storage cell utilization in mussels, *Mytilus edulis*, following exposure to diesel oil carbohydrates. *Mar. Environm. Res.* 22,243-251.
- Lubet, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission de gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques Bivalves). *Revue Trav. Inst. Pêch. Marit.* 23,387-548.

- Lubet, P., Choquet, C., 1971. Cycles et rythmes sexuels chez les mollusques bivalves et gastéropodes. Influence du milieu et étude expérimentale. *Haliotis* 1(2),129:149.
- Lubet, P., Mathieu, M., Collin, F. 1976. Tissu de réserve et cycle sexuel chez les lamellibranches. *Haliotis* 6,123-142.
- Lubet, P., 1980. Influences des facteurs externes sur la reproduction des Lamellibranches gastéropodes. *Océanis* 6(5),469-489.
- Lubet, P., Mann., R., 1987. Les différentes modalités de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Haliotis* 16,181-195.
- Lubet, P., 1991. Reproduction des mollusques. In Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tech. et Doc., 500 p.

M

- MacDonald, B. A., Thompson, R.J., 1985. Influence of temperature and food availability on the ecological energetic of the Giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25,295-303.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 59,546-559.
- Massa, M. R., 1994. The method of indivisibles of Bonaventura Cavalieri. *Butl. Soc. Catalana Mat.* 9, 68-100.
- Massapina, C., Joaquim, S., Matias, D., Devauchelle, N., 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquat. Living Resour.* 12(5),327-333.
- Mason, J., 1958. The breeding of the scallop *Pecten maximus* (L) in Manx waters. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 37,653-671.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris.
- Mathieu, M., Lubet, P., 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23(2-3),123:129.

- Maurer, D., Borel, M., 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15,125-134.
- Morales-Alamo, R., Mann, R., 1989. Anatomical features in histological sections of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) as an aid in measurements of gonadal area for reproductive assesment. *J. Shellfish Res.* 8(1),71-82
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53,361-369.
- Morvan, C., Ansell, A. D., 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.* 97,335-364.
- Muranaka M.S., Lannan J.E., 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39:217-228.
- Myrand, B., Guderley, H., Himmelman, J. H. 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands , southern Gulf of St. Lawrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197,193-207.

N

- Navarro, J. M., Winter, J. E., 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Mar. Biol.* 67,255-266.
- Navarro, E., Iglesias, J. I. P., 1995. Energetics of reproduction related to environmental variability in bivalve mollusc. *Haliotis* 24,43-55.
- Navarro, J. M., Thompson, R. J., 1996. Physiological energetics of the horse mussel *Modiolus modiolus* in a cold ocean environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 138,135-148.
- Navarro, J. M., Leiva, G. E., Martinez, G., Aguilera, .C., 2000. Interactive effects of diet and temperature of the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247,67-83.
- Navarro, J. M., Leiva, G. E., Gallardo, C. S., Varela, C., 2002. Influence of a diet and temperature on physiological energetics of *Chorus giganteus* (Gastropoda:

- Muricidae) during reproductive conditioning. N. Z. J. Mar. Freshwater Res. 36,321-332.
- Neudecker, Th., 1981. Sex determination and maturation of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) of the German coast. European Mariculture Society 6,249-254.
- Newell, R. I. E., Bayne, B. L., 1980. Seasonal changes in the physiology, reproductive condition and carbohydrate content of the cockle *Cardium* (= *Cerastoderma*) *edule* (bivalvia: Cardiidae). Mar. Biol. 56,11-19.
- Newell, R.I.E., Hilbish, T.J., Koehn, R.K., Newell, J.C., 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L (Bivalvia-Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. Biol. Bull. 162,299-310.
- Newkirk, G., 1996. Culture: Genetic Improvement. Experimental Selection of bivalves. In: Kennedy, V.S., Newell, R. I. E. and Eble, A. F. (Eds) The eastern oyster *Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland, pp 661-673.

P

- Paniagua-Chávez, C. G., Acosta-Ruiz, M. J., 1995. Gonadal development of *Crassostrea gigas* in Bahía San Quintín, Baja California, Mexico. Ciencias Marinas 20(2),225-242
- Perdue, J. A., Beattie, J. H., Chew, K. K. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J. Shellfish Res. 1(1):9-16.
- Pedue, J.A., Erickson, G., 1984. A comparison of the gametic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. Aquaculture 37,231-237.
- Poulet, S. A., Lennon, J.F., Plouvenez, F., Jalabert, F. Correc, G., Cueft, A. and Lacoste, A., 2003. A non destructive tool for the measurement of muscle strength in juvenile oysters *Crassostrea gigas*. Aquaculture 217,49-60.
- Pouvreau, S., Jonquière, G., Buestel, D., 1999. Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. Aquaculture 176, 295-314.

Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia:Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13(1),37-48.

Q

Quayle, D. B., 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. *J. Fish. Res. Board Can.* 169,1-192.

R

Ren, J. F., Ross, A. H., Schiel, D. R., 2000. Functional descriptions of feeding and energetics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zeland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208,119-130.

Ren J.S., Ross A.H., (2001) A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecol. Model.* 142, 105–120.

Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., Schiel, D. S., 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zeland. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 37,171-182.

Riisgård, H. U., 2001. On measurement of filtration rates in bivalves – The stony road to reliable data: review and interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211,275-291.

Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* 12,121-130.

Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106,89-97.

Roman, G., Acosta, C. P., 1995. Reproductive and reserve storage cycles in *Pecten maximus* reared in suspension. I: soft tissue growth and reproduction. 8th Int.

Pectinid Workshop, Cherbourg, France, 22-29 May 1991. IFREMER Actes de Colloques, No. 17, pp 183-187.

Ropert, M., 1998. Suivi de masse d'eau: Recherche d'un indicateur de qualité du milieu sur le secteur conchylicole de Grandcamp-Maisy. Rapport Scientifique et Technique du GEMEL. Agence de l'Eau Seine-Normandie.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., García-Martín, F. O., Sánchez-López, J. L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155,249-262

S

Samain, J.F., 2003. Défi "Morest". Etude des mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Synthèse des résultats présentés au cours du séminaire du 26-28 novembre 2003 à La Rochelle. [on line] last accessed March 2004. Available from World Wide Web: <http://www.ifremer.fr/com/dossier-presse/05-12-03-morest.htm>

Sastry, A.N., Blake, N.J., 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. Biol. Bull. 140,274-282.

Sastry, A. N., 1975. Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. In Vernberg F.J. (Ed), Physiological Ecology of Estuarine Organisms. University of south Caroline Press, Columbia, S. C., pp 279-299

Sastry, A. N., 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese, A. C., Pearse, J. S. (Eds), Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. 5. Academic Press, New York, pp 113-292.

Savina, M., Pouvreau, S., 2004. A comparative physiological study of infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboïdes* and *Glycymeris glycymeris*. Aquaculture, in press (August).

Secor, C. L., Day, A. D. and Hilbish, T. J., 2001. Factors influencing differential mortality within a marine mussel (*Mytilus* spp.) hybrid population in southwestern England: reproductive effort and parasitism. Mar. Biol. 138:731-739.

Shaw, B. L., Battle, H. I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 35,325-347.

- Soletchnik, P., Razet, D., Gearion, P. Faury, N., Gouletquer, P., 1997. Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour.* 10,177-185.
- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Gouletquer, P., 1998. Hydrobiology of the Marennes-Oléron bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386,131-146.
- Soniat, T. M., Ray, S. M., 1985. Relationships between possible available food and the composition, condition and reproductive state of oysters from Galveston Bay, Texas. *Contributions in Marine Science* 28,109-121.
- Sphigel, M., Barber, B. J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161,15-25.
- Stasek, C. R., 1963. Orientation and form in the bivalves Mollusca. *J. Morph.* 112,195-214.
- Steele, S., 1998. The sexual cycle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. Ph.D. thesis. National University of Ireland.
- Steele, S., Mulcahy M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 79, 673-686.

T

- Thompson, R. J., Bayne, B. L., 1972 Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9(1), 111-124.
- Thompson, R. J., MacDonald, B. A., 1991. Physiological integration and energy partitioning. In: Shumway, S. E. (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 347-376.
- Thompson, R. J., Newell, R. I. E., Kennedy, V. S., Mann, R., 1996. Reproductive process and early development. In: Kennedy, V.S., Newell, R. I. E. and Eble, A. F. (Eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland, pp 335-370.

Tremblay, R., Myrand, B. and Sévigny, J. M., 1998. Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* Linneaus, 1758), in the Magdalen Islands (southern Gulf of St. Lawrence, Canada). J. Shellfish Res. 17,1191-1202.

U

Urban, H. J., Riascos, V. J. M., 2002. Estimating gonad-somatic indices in bivalves with fused gonads. J. Shellfish. Res. 21(1),249-253.

Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 230,349-357.

Utting, S. D., Millican, P. F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalves broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. Aquaculture 155,45-54

V

Van Haren, R.J.F., Kooijman, S.A.L.M., 1993. Application of dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). Neth. J. of Sea Reas. 31, 119-133.

Velez, A., Epifanio, C.E., 1981. Effects of temperature and ration on gametogenesis and growth in the tropical mussel *Perna perna* (L). Aquaculture 22,21-26.

Versterby, A., 1993. Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical sections. Anat. Rec. 235,325-334.

W

Weibel, E. R., 1979. Stereological methods Vol. I : Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London.

Widdows, J., Johnson, D., 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46,113-121.

- Wilson, J.A., Chaparro, O.R. and Thompson, R.J., 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture* 139,63-75.
- Whyte, J. N. C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture bivalves. *Aquaculture* 60(3-4) 231-241.
- Whyte, J. N. C., Englar, J.R. and Carswell, B.L., 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture* 90,157-172.

Y

- Yakovlev, Y.M., 1977. Reproductive cycle of the Pacific oyster in the sea of Japan. *Biolog. Moyra* 3,85-87.

ANNEXES

ANNEXE I

La détermination des sexes et le stade de maturation

Des analyses qualitatives ont été réalisées sur chaque lame. Chacune a été examinée sous le microscope pour la détermination du sexe. La présence de spermatozoïdes, d'ovocytes ou l'absence de gamètes nous a permis de définir le sexe des individus en tant que mâles (**m**), femelles (**f**), hermaphrodites (**hp**) ou sexuellement indifférenciés (**u**).

Une échelle du développement gonadique a été utilisée et un niveau a été assigné pour chaque huître sur la base des descriptions proposées par Lubet (1959), Kennedy et Battle (1964) et Mann (1979) :

- **Stade 0** : phase de repos sexuel. Les acini sont réduits à des îlots de gonies quiescentes. A ce stade le sexe de l'animal ne peut pas être déterminé,
- **Stade I** : reprise de la gamétogenèse. Les gonies se multiplient par mitoses successives. Les acini sont peu développés en nombre et en volume dans le tissu conjonctif. Les parois des tubules sont tapissées de cellules primaires qui possèdent un noyau de grand taille et présentent un cytoplasme peu abondant,
- **Stade II** : développement intense des gamètes. Les cellules restent adhérentes à la paroi des acini mais elles entrent en croissance, c'est la phase de vitellogenèse. Les séquences normales de la spermatogenèse y sont observées avec des spermatocytes I et II, des spermatides et quelques spermatozoïdes. Du fait de l'augmentation de la taille des acini, le tissu conjonctif a quasiment disparu ;
- **Stade III** : période de maturité sexuelle. Les acini sont complètement remplis d'ovocytes matures (avec une taille relativement homogène), qui présentent un noyau distinctif et parfois le nucléole est visible. Les spermatozoïdes abondent et forment des paquets dans la lumière des follicules ;
- **Stade IV** : émission des gamètes matures et/ou résorption. Les gamètes matures sont émis au milieu. L'émission de gamètes peut être complète ou partiel, parfois une nouvelle gamétogenèse est réinitiée, ou parfois les gamètes se retrouvent en phase de résorption.

ANNEXE II

Estimation de la biomasse gonadique

La biomasse gonadique (BG) a été déterminée par extrapolation (principe de stéréologie établi par Versterby, 1993) comme suit:

$$BG = P_h \times AG / 100$$

où BG = biomasse gonadique en g (masse humide); AG = pourcentage moyen de tissu gonadique (moyenne des trois sections pour chaque individu) et P_h = masse humide de la masse viscérale (gonade + glande digestive, en g).

La production totale de la chair (P, en g) et de la gonade (Pr, en g) ont été calculées sur une base temporelle (entre t et t_{-1}) selon :

$$P = W(t) - W(t_{-1}) \text{ et } Pr = BG(t) - BG(t_{-1}).$$

L'effort de reproduction (ER, en %) où la part de la production assignée à la gonade a été alors calculé comme suit :

$$ER = Pr/P$$

Par ailleurs, l'intensité de l'émission de gamètes a été déterminée en analysant des échantillons juste avant (t_{s-1}) et après l'émission (t_s). La production de gamètes (Prs, en g) a été estimée à partir des pertes de masse humide de la gonade, comme suit :

$$Prs = BG(t_s) - BG(t_{s-1}).$$

La comparaison entre Pr et Prs nous permet de décrire la ponte comme étant partielle ou complète. L'efficacité de l'émission de gamètes est déterminée comme suit:

$$ES = [100 \times (BG(t_{s-1}) - BG(t_s)) / BG(t_{s-1})].$$

ANNEXE III

Détermination de l'aire d'occupation de la gonade

La analyse d'image a été réalisé sur les lames histologiques sacnées et sauvegardées en formmrate "tiff". Cette analyse est bassé sur la intensité de coloration spécifique de chaque tissu. Le "script" suivant a été utilisé:

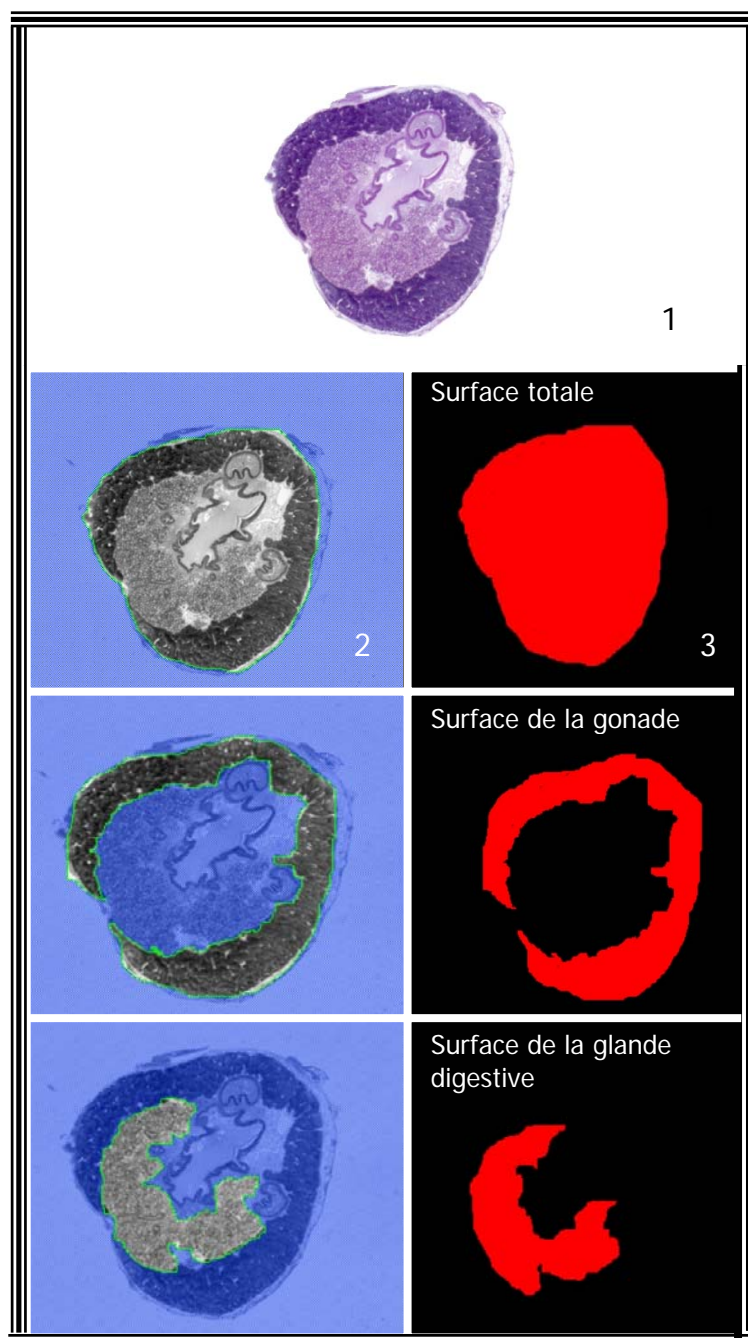
1) Transformation de l'image couleur en image de niveaux de gris, avec la fonction « color extraction »;

2) Le borde de la surface du tissu souhaite a été dessinée manuellement avec la fonction "image mask";

3) L'aire de chaque tissu (gonade ou glande digestive) a été déterminée en ajustant le seuillage (niveaux de gris) correspondant au tissu spécifique.

4) Pour finir avec le calcule automatique de l'aire occupe par le tissu souhaite, en pixels.

-Pour chaque section, les pourcentages d'occupation par le tissu gonadique ou de la glande digestive ont été calculés.



ANNEXE IV

Détermination de la taille des ovocytes

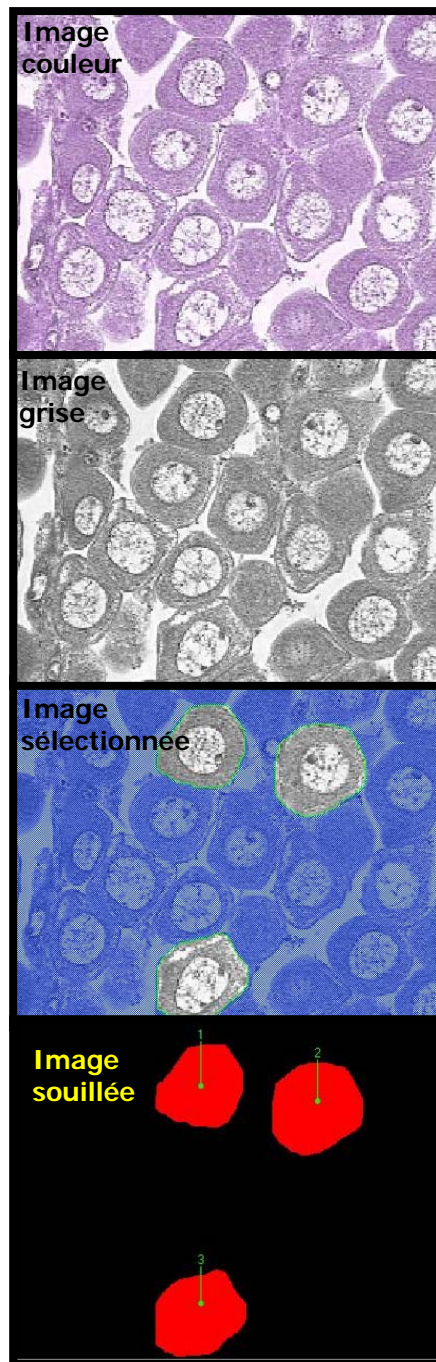
La taille des ovocytes a été déterminée en suivant le script proposé ci-dessus:

1) The image en couleur est transforme aux niveaux de gris ;

2) le périmètre des ovocytes qui avaient une vésicule germinale bien est dessiné manuellement ;

3) l'aire de chaque ovocyte est déterminée en ajustant le seuillage (niveaux de gris);

4) alors, l'aire des ovocytes est automatiquement calculé en pixels et en μm , en utilisant un calibrage préalable.



Results ...	1	2	3
Pixels	4954,00	5926,00	5350,00
Area (unit)	4954,00	5926,00	5350,00
Number of holes	0,00	0,00	0,00
Holes area (unit)	0,00	0,00	0,00
Total area w/ holes (unit)	4954,00	5926,00	5350,00

Aire en pixels

ANNEXE V

Répertoire des tableaux

Tableau 1. Évolution de la production (tonnes) de <i>Crassostrea gigas</i> en France (CNC, 2004)	3
Tableau 2. Principales données de la littérature concernant la reproduction chez <i>Crassostrea gigas</i> en condition naturelle. P= protéines, L= lipides, G = Glucides.	12
Tableau 3. Données de la littérature concernant la reproduction chez <i>Crassostrea gigas</i> en conditions contrôlées. P= protéines, L= lipides, G = glucides.	15
Tableau 4. Paramètres physiologiques du bilan énergétique calculés dans le présente étude	44
Tableau 5. Taux de filtration et de respiration observés chez <i>C. gigas</i> .	45
CHAPITRE I	
Table 1. Notes to describe the local habitat of oysters at two sites in French coast.	77
CHAPITRE II	
Table 1. Growth rate for <i>Crassostrea gigas</i> conditioning in two food rations: LFL = Low food level; HFL = High food level.	105
CHAPITRE III	
Table 1. The energetic conversion factors for the algae's used to feed <i>C. gigas</i> , were:	130

ANNEXE VI

Répertoire des figures


Figure 1. Production mondiale d'huîtres en 2001. Pays ayant une production supérieure à 52 000 tonnes (FAO, 2004).	3
Figure 2. Sites de production de <i>Crassostrea gigas</i> en France (Barret, 2001; CNC, 2004).	4
Figure 3. Représentation schématique des principaux facteurs internes et externes rapportées dans la littérature qu'interviennent dans le processus de reproduction chez l'huître creuse.	7
Figure 4. Localisation des sites d'étude: bassin de Marennes-Oléron (BMO) et baie des Veys (BDV).  Sites de culture	18
Figure 5. Dessin de <i>Crassostrea gigas</i> (adapté de Barillé <i>et al.</i> , 1997) situant les trois niveaux dans la masse viscérale où les coupes histologiques ont été effectuées. 1: section antérieure; 2: section médiane et 3: section postérieure. La direction des axes du corps a été prise d'après l'approche anatomique comparative proposée par Stasek (1963).	20
Figure 6. Variations saisonnières dans les stades de maturation chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV). 0 = Stade de repos sexuel; I= Reprise de la gamétogenèse; II= Développement des gamètes, III= Stade de maturité sexuelle, IV= Période d'émission de gamètes et/ou résorption.	24
Figure 7. Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV) : (Moyenne \pm SD). * = différences significatives.	25
Figure 8. Variations saisonnières de la biomasse de la gonade chez l'huître creuse cultivée à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV) : (Moyenne \pm SD). * = différences significatives.	26
Figure 9. Variations saisonnières en température (T°C) à Marennes-Oléron (BMO) et en baie des Veys (BDV).	28
Figure 10. Variations saisonnières en Chlorophylle <i>a</i> ($\mu\text{g/l}$) en Marennes-Oléron (BMO) et la baie des Veys (BDV).	29
Figure 11. Salle de géniteurs. Les 800 huîtres sont mises dans chacun deux bacs de conditionnement, Station Expérimentale d'Argenton.	31
Figure 12. Salle de production des micro-algues : Station Expérimentale d'Argenton.	31
Figure 13. Variations saisonnières dans les stades de maturation chez l'huître creuse cultivée à deux niveaux de nourriture. A) Huîtres nourries en condition trophique faible (LFL) et B) huîtres nourries en condition trophique forte (HFL). 0 = Stade de repos sexuel; I= Reprise de la gamétogenèse; II= Développement des gamètes, III= Stade de maturité sexuelle, IV= Période de ponte et/ou résorption.	34
Figure 14. Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse. Huîtres nourries en condition trophique faible (LFL) et huîtres nourries en condition trophique forte (HFL). (Moyenne gonadique, <i>i.e.</i> % de l'aire occupée par la gonade \pm SE). * = différences significatives.	35

Figure 15. Variations saisonnières dans la biomasse de la gonade chez l'huître creuse Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = Différences significatives.	36
Figure 16. Banc d'écophysiologie utilisé pour mesurer les taux de filtration et de consommation d'oxygène; F = sonde fluorimétrique, O = sonde d'oxygène.	50
Figure 17. Détail d'un aquarium expérimental et du positionnement de l'huître. PF = pseudo-fèces ; F = fèces.	50
Figure 18: Variation saisonnière du débit de filtration, CR ($l \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de <i>C. gigas</i> selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.	54
Figure 19: Variation saisonnière de la consommation, C ($mg \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de <i>C. gigas</i> selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.	55
Figure 20: Variation saisonnière de l'efficacité d'absorption, AE (%) de <i>C. gigas</i> selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.	56
Figure 21: Variation saisonnière de la consommation d'oxygène, R ($mg \cdot O_2 \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de <i>C. gigas</i> selon deux niveaux de nourriture (Moyenne \pm SE). Huitres nourries en condition trophique faible (LFL) et huitres nourries en condition trophique forte (HFL). * = différences significatives.	57
Figure 22: Variation saisonnière de l'assimilation ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) et de la respiration ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de <i>C. gigas</i> élevées selon deux conditions de disponibilité de nourriture. A) huitres nourries en condition trophique faible (LFL); B) huitres nourries en condition trophique forte (HFL).	58
Figure 23: Variation saisonnière du SFG ($J \cdot h^{-1} \cdot ind^{-1}$) de <i>C. gigas</i> élevées selon deux conditions de disponibilité de nourriture. Huitres nourries en condition trophique faible (LFL); huitres nourries en condition trophique forte (HFL).	59
Figure 24: Evolution saisonnière des stades de maturation chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol. S = Sensibles , R = Résistants.	67
Figure 25: Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol (Moyenne \pm SE). Huitres du lot résistant (R) et huitres du lot sensible (S). * = différences significatives	68
Figure 26. Différence de croissance gonadique chez une huître <i>Crassostrea gigas</i> résistant (a) et sensible (b)	70
Figure 27: Pourcentage de mortalité chez l'huître creuse élevée à Fort Espagnol. Huitres du lot résistant (R) et huitres du lot sensible (S). * = différences significatives.	72
CHAPITRE I	
Figure 1. Location of the field-study sites (*): Marennes-Oléron bassin and Bay of Veys.	76
Figure 2. Drawing of <i>Crassostrea gigas</i> (adapted from <i>Crassostrea gigas</i> , Barillé <i>et al.</i> , 1997) showing the three levels in which the cuts were done for image analysis. 1: Anterior section; 2: Middle section and 3: Posterior section. Directional body axes based on the comparative anatomy approach proposed by Stasek (1963).	78

- Figure 3. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Total weight (shell and flesh); B: Flesh wet weight and C: Shell length (antero-posterior axis). In orange Marennes-Oléron Bay and in blue Bay of Veys. (mean \pm SD). * = Significant difference. 81
- Figure 4. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys. F = Female; M = Male; U = Undifferentiated; HP = Hermaphrodite. 82
- Figure 5. Seasonal changes in the maturity stages of Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys. 0 = Resting stage; I= Early growth stage; II= Late growth stage, III= Maturation stage, IV= Spawning and reabsorbing stages. 84
- Figure 6. Seasonal variations in gonadal and digestive gland occupied area in Pacific oysters cultivated in: A) Marennes-Oléron Bay and B) Bay of Veys, (mean gonad and digestive gland area, *i.e.* % of field occupied by gonad or digestive gland \pm SD). In orange gonadal area of MOB and in blue gonadal area of BDV; in gray gland digestive area. * = Significant difference. 86
- Figure 7 A. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters cultivated in Marennes-Oléron Bay (mean gonad and digestive gland biomass \pm SD). In orange gonadal biomass, and in gray digestive gland biomass. * = Significant difference 87
- Figure 7 B. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters cultivated in Bay of Veys (mean gonad and digestive gland biomass \pm SD). In blue gonadal biomass, and in gray digestive gland biomass. * = Significant difference. 88
- Figure 8. A) Temperature (T°C) and B) Chlorophyll *a* (μ g/l) seasonal patterns in sampling sites. In orange Marennes Oléron Bay (Auger, cultivated site) and in blue Bay of Veys (Géfosse, cultivated site) 92

CHAPITRE II

- Figure 1. Mean temperatures and day length observed during ten years (1990-2000) in the Bay of Marennes-Oléron (unpublished data). Blue line: temperature (T°C), and pink line: day length (hours = h). 100
- Figure 2 A. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Shell length (antero posterior axis) Orange: low food level group and blue: high food level group. (mean \pm SE). 104
- Figure 2 B. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. B: Flesh wet weight. Orange: low food level group and blue: high food level group. (mean \pm SE). * = Significant difference. 105
- Figure 3. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters submitted to low food (A) or high food (B); F = Female; M = Male; U = Undifferentiated; HP = Hermaphrodite. 106
- Figure 4. Seasonal changes in the maturity stages of Pacific oysters submitted to low food (A) or high food (B); 0 = Resting stage; I = Early growth stage; II = Late growth stage, III = Maturation stage, IV = Spawning and reabsorbing stages. 108
- Figure 5. Seasonal variation in gonadal and digestive gland occupied area in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Orange: gonadal area in LFL and blue: gonadal area in HFL; gray: digestive gland area. 110
- Figure 6 A. Seasonal variation in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Orange: gonadal biomass of LFL oysters; gray: digestive gland biomass. The arrows show the date of spawning induction. 111

Figure 6 B. Seasonal variations in gonadal and digestive gland biomass in Pacific oysters submitted to two food levels (mean \pm SE). Blue: gonadal biomass of HFL oysters; gray: digestive gland biomass. The arrows show the date of spawning induction. 112

CHAPITRE III

Figure 1. Mean temperatures and day length observed during ten years (1990-2000) in the Bay of Marennes-Oléron (unpublished data). Blue line: temperature ($T^{\circ}\text{C}$), and pink line: day length (hours = h). 126

Figure 2 A. Set-up used to measure clearance and oxygen consumption rates. Flow-through system, the arrows showed the seawater flow direction; F = Fluorimetry captor, O = Oxygen captor; C_1 and C_2 = Control chambers, Oy_1 to Oy_6 = Experimental chamber (Oyster 1...). Exit system, Measure system. 127

Figure 2 B. Oyster position within experimental hermetic chamber. 128

Figure 3 A. Temporal variations in Clearance Rate ($\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$), of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference. 131

Figure 3 B. Temporal variations in Consumption Rate ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference. 132

Figure 3 C. Temporal variations in Absorption efficiency (%) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference. 133

Figure 3 C. Temporal variations in Absorption efficiency (%) of *C. gigas* reared in two food levels (Mean \pm SE). In orange oysters fed in low food level, in blue oysters fed in high food level. * = significant difference. 134

Figure 4. Relationship between oxygen consumption (R , $\text{mgO}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) and temperature (T , $^{\circ}\text{C}$) over a complete reproductive cycle in low food level condition (LFL) and high food level condition (HFL). Linear adjustment for LFL: $R = 0.044xT - 0.022$ with $R^2 = 0.478$ and for HFL: $R = 0.086xT - 0.583$ with $R^2 = 0.765$. 134

Figure 5. Seasonal trends for assimilation (AE , $\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) and respiration (R , $\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) observed in Pacific oysters fed at two food levels conditions: A) Low food level, B) High food level. 135

Figure 6. Seasonal trends for scope for growth (SFG , $\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) observed in Pacific oysters fed in two food levels. A) Low food level, B) High food level. 136

CHAPITRE IV

Figure 1 A & B. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. A: Total weight (shell and flesh); B: Flesh wet weight. In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters (mean \pm SE). * = significant difference 149

Figure 1 C. Seasonal changes in general growth of *Crassostrea gigas*. C: Visceral mass weight (g). In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters (mean \pm SE). * = significant difference. 150

Figure 2. Seasonal changes in the sex of Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). A: Susceptible oysters and B: Resistant oysters. F = Female; M = Male; U = 151

Undifferentiated; *HP* = Hermaphrodite.

Figure 3. Seasonal changes in the reproductive stages of Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). A: Susceptible oysters and B: Resistant oysters. *O* = Resting stage; *I* = Early growth stage; *II* = Late growth stage, *III* = Maturation stage, *IV* = Spawning and reabsorbing stages. 152

Figure 4. Seasonal variation in gonadal occupied area in Pacific oysters cultivated in South Brittany (France). In blue Susceptible oysters and in orange Resistant oysters. * = significant difference. 153

Figure 5. Temporal changes in size frequency distributions of the oocytes diameters and histological sections showing temporal changes in the gonadal area from Resistant in orange (R) and Susceptible in blue (S) oysters. A: June, B: August and C: September. 155

Figure 6. Day-mortality (%) in Susceptible (blue line) and Resistant oysters (orange line) cultivated in South Brittany (France). 158

Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

La variabilité de la gamétogenèse de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été évaluée, sur l'ensemble d'un cycle annuel, *in situ* dans deux milieux différents (Baie des Veys, BDV et Bassin de Marennes-Oléron, BMO) et en milieu complètement contrôlé à la Station Expérimentale d'Argenton (à deux niveaux trophiques : niveau riche, HFL et niveau pauvre, LFL). Nous avons observé que la concentration de phytoplancton (chlorophylle *a*) était un facteur primordial dans le déterminisme de la gamétogenèse. Les huîtres élevées dans une ration trophique riche (BDV et HFL) ont produit une gonade hypertrophiée. Cependant, l'efficacité pour émettre leurs gamètes était réduite et partielle. En plus, la période de résorption a été prolongée jusqu'à l'hiver. Par contre, les huîtres élevées dans une ration trophique pauvre (MOB et LFL) ont produit une gonade normalement développée avec une émission de gamètes totale pendant l'été et une période de résorption très restreinte au début de l'automne. D'ailleurs, les mesures écophysiologicals réalisées sur les huîtres élevées en condition contrôlée, montrent que la gamétogenèse influence fortement les fonctions du bilan énergétique de l'huître (la filtration, l'efficacité d'absorption et la respiration) : plus celle-ci est intense, plus le bilan est déficitaire en période estivale.

D'autre part, nous avons observé que le patrimoine génétique, était un autre facteur de variabilité du cycle reproducteur des huîtres. Deux lots de familles génétiques différentes en terme de survie estival (lignées R pour résistantes aux mortalités estivales et S pour sensibles) et élevées dans un environnement commun (Fort Espagnol, Bretagne sud) ont montré une très forte différence phénotypique de gamétogenèse. Les huîtres sensibles ont présenté un cycle reproducteur exacerbé semblable à celui observé pour les huîtres nourries aux niveaux trophiques riches (BDV et HFL). Tandis que les huîtres résistantes ont montré un cycle reproducteur modéré semblable à celui des huîtres élevées dans de conditions trophiques pauvres (MOB et LFL).

En conclusion, *Crassostrea gigas*, montre une stratégie reproductrice plastique, fortement influencé par l'environnement (richesse trophique et température) mais aussi fortement variable en terme génétique. Par conséquent, les huîtres qui développent une gamétogenèse exacerbé que ce soit pour des raisons environnementales ou des raisons génétiques présentent un bilan énergétique déficitaire en période estivale, ce qui constitue un terrain favorable à l'installation de pathologies.

Reproduction variability and bioenergetics in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

The variability in reproductive cycle of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was evaluated *in situ* (Bay of Veys, BOV and Marennes-Oléron bay, MOB) and in hatchery culture conditions. Two trophic levels were tested over one year: high food level (HFL) and low food level (LFL). We observed that the phytoplanktonic concentration (chlorophyll *a*) was the principal factor that influenced gametogenesis intensity and duration. The oysters reared within a high trophic ration (BOV and HFL) shown a hyper-gonad development. However, the spawning efficiency was reduced and partial. Therefore, the resorption period was prolonged until winter. Meanwhile, the oysters reared in a low trophic ration (MOB and LFL) produced a normal gonad with a total spawning in summer and their resorption period through the autumn. The ecophysiological measures in the conditioning oysters, showed that the gametogenesis period influenced the clearance rate, absorption efficiency and respiration responses. Furthermore, the scope for growth was influenced negatively during active gametogenesis and resorption period, mainly in the oyster fed in high trophic conditions.

On the other hand, we observed that the genetic factor, was another variability found in the reproductive cycle. Two selected genetic families by their summer survival character (the R or resistant oysters and the S or susceptible oysters at summer mortality), were reared in a common environment (Fort Espagnol, sud Brittany) and were evaluated. The susceptible oyster presented a reproductive cycle similar to that observed in oysters fed in high trophic levels (BOV and HFL). While resistant oyster showed a reproductive cycle similar to the oysters reared in low trophic conditions.

In conclusion, *Crassostrea gigas* showed a reproductive plastic strategy, influenced by the trophic level and genetic factors. The oysters that developed a hyper-gonad, could be more susceptible to summer mortality.